

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE YERLİ KOYUN IRKLARINDA OVAR-
DRB1 EKZON 2'DEKİ MOLEKÜLER
POLİMORFİZM**

Mehmet YAŞAR

**MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Metin ERDOĞAN

Bu tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından **18.SAĞ.BİL.02** proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez No: 2019-041

2019-AFYONKARAHİSAR

KABUL VE ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü

Medikal Biyoloji ve Genetik Programı

çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

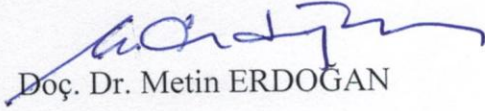
Tez Savunma Tarihi: 20 / 06 / 2019



Prof. Dr. Cevdet UĞUZ

Afyon Kocatepe Üniversitesi

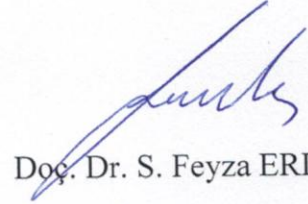
Jüri Başkanı



Doç. Dr. Metin ERDOĞAN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Üye



Doç. Dr. S. Feyza ERDOĞMUŞ

Afyonkarahisar Sağlık
Bilimleri Üniversitesi

Üye

Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Mehmet YAŞAR'ın "**Türkiye Yerli Koyun ırklarında Ovar-DRB1 Ekzon 2'deki Moleküler Polimorfizm**" başlıklı tezi günü saat da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği' nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Esmâ KOZAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Türkiye'de koyun yetiştiriciliği önemli bir yer tutmaktadır. Genetik materyalde meydana gelen defektler hayvan sağlığını ve verimini olumsuz etkilemektedir. Genlerdeki bozulma ya da değişme protein sentezinde aksaklıklara veya bozukluklara sebep olabilir. Genetik hastalıklardan kaynaklanan morfolojik ya da fizyolojik bozukluklar, hayvanlarda verim kayıplarına neden olmaktadır. Bunun sonucu olarak, koyunlarda ve diğer çiftlik hayvanlarında ekonomik kayıplar şekillenmektedir. İnsan hayatında önemli yer tutan koyunun hastalıklar nedeniyle ölmesi veya verimden düşmesi işletmeleri önemli ölçüde ekonomik sıkıntıya sokmaktadır. Bu nedenle, hastalıkların mümkün olduğunca azaltılması ve minimum düzeye indirilmesi gerekmektedir. Hayvanların hastalanmasından sonra alınan tedbirler zaman kaybı ve masrafa yol açacağından, hayvanların genetik olarak bağışıklık sistemlerinin gelişmiş olması ve hastalıklara karşı genetik direncinin yüksek olması istenir. Bu tez, Türkiye yerli koyun ırklarındaki MHC-DRB1 ekson 2 gen bölgesindeki polimorfizmin ortaya konulması ve yerli koyun ırklarının hastalıklara direnci konusunda yapılacak çalışmalara öncülük edebilecek olması nedeniyle önem arz etmektedir.

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü bölümünde yürüttüğüm yüksek lisans eğitimimde ve tez çalışmamda her türlü emeği ve desteği sağlayan, değerli tez danışman hocam Doç. Dr. Metin ERDOĞAN'a. Anabilim Dalı'nda yer alan değerli hocalarım Prof. Dr. Cevdet UĞUZ'a, Doç. Dr. Mine DOSAY AKBULUT'a ve Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk LENGER'e, yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini yanımda hissettiğim aileme, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Kabul ve Onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Tablolar	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Koyunun Tarihiçesi ve Sistematiğı.....	1
1.2. Türkiye’de Yetiştirilen Koyun Irkları.....	3
1.2.1. Akkaraman.....	4
1.2.2. Morkaraman.....	5
1.2.3. Sakız.....	6
1.2.4. Kıvırcık.....	6
1.2.5. Pırlak.....	7
1.2.6. Karayaka.....	8
1.3. Büyük Doku Uyum Kompleksi (MHC)’nin Yapısı ve Molekülleri.....	8
1.3.1. MHC Sınıf I Molekülleri.....	10
1.3.2. MHC Sınıf II Molekülleri.....	12
1.3.3. MHC Sınıf III Molekülleri.....	14
1.3.4. Ovar-DRB1.....	14
1.4. Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP)	18
2. GEREÇ VE YÖNTEM	19
2.1. Materyal	19
2.1.1. Hayvan Materyali	19
2.1.2. Kullanılan Teknik Cihazlar.....	19
2.1.2.1. PCR Cihazı.....	19

	<u>Sayfa</u>
2.1.2.2. Yatay Elektroforez Sistemi	20
2.1.2.3. Jel Görüntüleme ve Analiz Sistemi	20
2.1.2.4. DNA Dizileme Cihazı.....	21
2.2. Metot	21
2.2.1. Kandan DNA İzolasyonu.....	21
2.2.2. Primer Tasarımı	22
2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	22
2.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi	22
2.2.5. DNA Dizileme Analizi	23
2.2.6. İstatistik Analiz	24
3. BULGULAR	25
4. TARTIŞMA	33
5. SONUÇ	36
ÖZET	37
SUMMARY	38
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	46

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Santigrat derece
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FAO	Dünya Gıda ve Tarım Örgütü
gr	Gram
HLA	Human Leukocyte Antigens
Kg	Kilogram
kDa	Kilodalton
MgCl₂	Magnezyum Klorür
MHC	Major Histokompatibiliti Kompleks
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
OLA	Ovine Leukocyte Antigen
pmol	Pikamol
RFLP	Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
sn	Saniye
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
TAE	Tris- Asetat- EDTA
TAGEM	Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
ml	Mikrolitre
µm	Mikron

ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Koyun, Keçi, Sığır ve Domuzun İlk Evcilleştirilme Yerleri ve Zamanı.....	2
Şekil 1.2. Yetiştirildiği Yere Göre Küçükbaş Hayvan Irkları.....	4
Şekil 1.3. Akkaraman Koyun Irkı.....	5
Şekil 1.4. Morkaraman Koyun Irkı.....	5
Şekil 1.5. Sakız Koyun Irkı.....	6
Şekil 1.6. Kıvırcık Koyun Irkı.....	7
Şekil 1.7. Pırlak Koyun Irkı	7
Şekil 1.8. Karayaka Koyun Irkı.....	8
Şekil 1.9. Ovar-MHC'ye Ait Yapının Şematik Gösterimi.....	10
Şekil 1.10. MHC Sınıf I Molekülü Yapısı.....	11
Şekil 1.11. MHC Sınıf II Molekülü Yapısı.....	13
Şekil 2.1. PCR Cihazı	19
Şekil 2.2. Elektroforez Sistemi	20
Şekil 2.3. Jel Görüntüleme Sistemi	20
Şekil 2.4. DNA Dizileme Cihazı	21
Şekil 3.1. Gradient PCR Jel Görüntüsü.....	25
Şekil 3.2. Ovar-DRB1 Ekzon 2'de Tespit Edilen Polimorfik Bölgeler.....	28
Şekil 3.3. Türkiye Yerli Koyun Irklarının Ovar-DRB1 Ekzon 2 Gen Bölgesi Bakımından Genetik İlişkisini Gösterir 3D Grafik.....	29

TABLÖLAR

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1. Koyunun Bilimsel Sınıflandırılması.....	3
Tablo 3.1. Irklara Göre Hayvan Sayıları ve Ovar-DRB1 Ekzon 2'deki Allel Sayıları ve Heterozigotluklar.....	27
Tablo 3.2. Türkiye Yerli Koyun Irklarındaki Ovar-DRB1 Ekzon 2'deki Allel Frekansları ve Heterozigotluklar.....	30



1. GİRİŞ

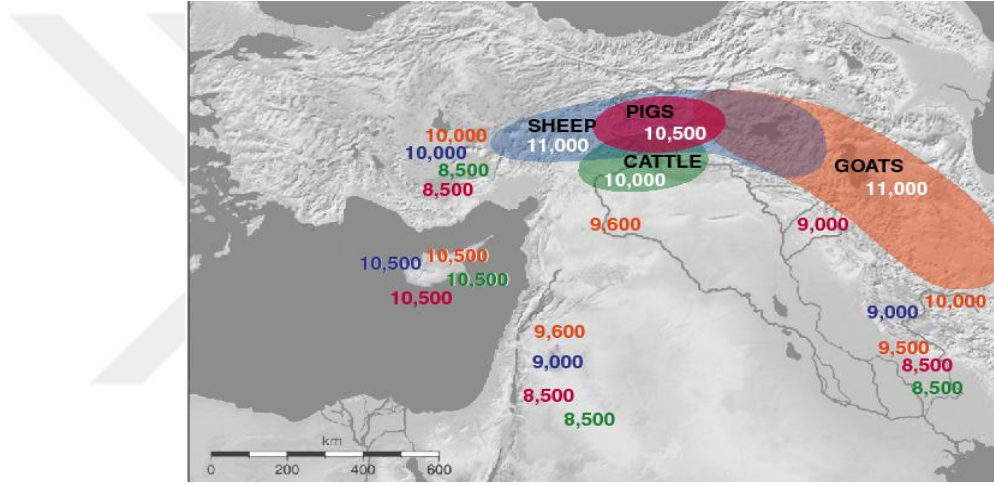
Türkiye, mera olanakları ve işletme yapıları itibariyle koyun yetiştiriciliğine uygundur. TÜİK 2018 yılı verilerine göre Türkiye koyun varlığı 35.194.972 baş olup, bu sayının önemli bir kısmını (% 93.2) düşük ve kombine verimli yerli ırklar oluşturmaktadır (Akçapınar, 2000; Türkiye İstatistik Kurumu, 2018). Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) yayınladığı verilerine göre, 1961 yılında dünya üzerinde 349 milyon baş keçi ve 994 milyon baş koyun olduğu bildirilmiştir. Bu sayı 2016 yılına gelindiğinde % 188'lik artışla 1 milyar baş keçi, % 21.7'lik artışla 1,2 milyar baş koyun varlığına ulaşmıştır (TİGEM, 2017).

Uzun yıllardır eti, sütü, derisi ve yapağısı ile insanların yaşantısında önemli temel ihtiyaçlarını karşılayan koyun, dünya üzerinde pek çok yerde yetiştiriciliği yapıldığı gibi Türkiye'nin farklı bölgelerinde de yetiştirilmektedir. Günümüzde koyun verimlerine bakıldığında ırklar arasında farklılıklar çoğalmış; bazı ırklar et verimi, bazı ırklar süt verimi, bazı ırklar yapağı verimi ya da döl verimi yönünden gelişimi sağlanmıştır (HAYGEM, 2018).

1.1. Koyunun Tarihçesi ve Sistematiği

İnsanlık tarihine bakıldığında köpekten sonra ilk evcilleştirilen türler arasında koyun bulunmaktadır. Elde edilen verim özelliklerinden dolayı faydalanılan bir tür haline gelmiştir. Ekonomik değere sahip özelliklerinden dolayı, evcilleştirmeye birlikte uzun yıllar boyunca ıslah çalışmalarının yapıldığı ilk türlerin arasında yer almıştır. Günümüze kadar yapılan seleksiyon çalışmaları ve yetiştirme programları sonucunda yabani özelliğinden çıkarak kendi başına yaşamlarını devam ettirmekte zorlanan, desteğe ihtiyaç duyan, öğrenme yeteneği düşük, kendini koruyamayan, insana bağımlı olarak yaşayan evcil bir hayvan haline gelmiştir. Dünya koyunculuk tarihinin gelişimine bakıldığında ilk evcilleştirilen koyun olarak merinos ırkı kullanılmıştır (Kaymakçı ve Sönmez, 1996).

Çiftlik hayvanlarının evcilleştirilmesinde 4 türün adı geçmektedir. Bunlar koyun, keçi, sığır ve domuzdur. Evciltme tarihleri birbirine yakın olmakla birlikte keçi ve koyunun ilk evcilleştirilen türler arasında yer aldığı bilinmektedir. İnsanlık tarihinde önemli dönüm noktaları arasında sayılan “Evcilleştirme”, yaklaşık olarak 11.000 yıl önce Neolitik çağda, Verimli Hilal (Fertile Crescent) olarak adlandırılan topraklarda başlamıştır (Zeder, 2008). Yapılan pek çok çalışmanın sonucunda edilen bilgi ve bulgulara göre koyun (*Ovis aries*) ve keçinin (*Capra hircus*) yaklaşık olarak 11.000 yıl önce evciltildiği tespit edilmiştir. Koyunun köpekten sonra evcilleştirilmiş ilk hayvan türü olduğu tespit edilmiştir (Pariset ve ark., 2011; Ryder, 1984).



Şekil 1.1. Koyun, keçi, sığır ve domuzun ilk evcilleştirilme yerleri ve zamanı (Zeder, 2008)

Yaban koyunlarında 6 tür bulunmaktadır. Bunlardan en önemli olanları; Argali koyunu (*Ovis ammon*), Muflon koyunu (*Ovis musimon*), Ural koyunu (*Ovis orientalis*), Bighorn koyunu (*Ovis canadensis*)’dur. Bu yaban koyunlarının Asya’da yayılış gösterdiği bilinmektedir. Yaban koyunları olarak bilinen koyunlar Türkiye’den başka Argali koyunu (*Ovis ammon*) Tiyanşan, Pamirler, ve Altay dağlarından Çin, Tibet ve Moğolistan’a kadar uzanan bölgede; Muflon koyunu (*Ovis musimon*) Sardunya ve Korsika adalarında; Ural Koyunu (Kızıl koyun veya Asya muflonu) (*Ovis orientalis*) Kıbrıs ve Batı İran’ın sık olmayan ağaçlı dağlarında; Bighorn (*Ovis canadensis*) İngiliz Columbia’sının Güneydoğusundan başlayıp Meksika’nın Kuzeybatısına kadar uzanan bölgede yayılmışlardır (Kırıkçı ve ark., 2003; Rezaei ve ark., 2010; Shackleton ve ark., 1997).

Tablo 1.1. Koyunun bilimsel sınıflandırılması (Ryder, 1984)

Alem	Animalia (Hayvanlar)
Şube	Chordata (Kordalılar)
Alt Şube	Vertebrata (Omurgalılar)
Sınıf	Mammalia (Memeliler)
Takım	Ungulata (Tırnaklılar)
Alt Takım	Artiodactyla (Çift Tırnaklılar)
Familya	Bovinae (Boynuzlugiller)
Alt Familya	Ovinae (Koyunlar)
Cins	Ovis (Yabani ve Evcil Koyunlar)
Tür	<i>Ovis aries</i> (Evcil Koyun)

1.2. Türkiye’de Yetiştirilen Koyun Irkları

Uzun yıllardır eti, sütü, derisi ve yapağısı ile insanların yaşantısında önemli temel ihtiyaçlarını karşılayan koyun, dünya üzerinde pek çok yerde yetiştiriciliği yapıldığı gibi ülkemizin birçok yerinde yetiştirilmektedir. Günümüzde koyun verimlerine bakıldığında ırklar arasında farklılıklar çoğalmış; bazı ırklar et verimi, bazı ırklar süt verimi, bazı ırklar yapağı verimi ya da döl verimi yönünden gelişimi sağlanmıştır (HAYGEM, 2018).

Koyunculuk özellikle ülkemizin Doğu ve Güney Doğu Anadolu Bölgesi'nde yaşayan insanların önemli gelir ve geçim kaynakları arasında yer almıştır. Coğrafi özellikler bakımından ülkemiz farklı türlerde hayvan yetiştiriciliğinin yapılabileceği uygun ortama sahiptir. Hayvancılığın, ülkemizin artan nüfusu göz önünde bulundurulduğunda yeterli ve dengeli beslenmenin yanı sıra, hayvancılığa dayalı sanayi için hammadde temini bakımından önem arz etmektedir (HAYGEM, 2018).

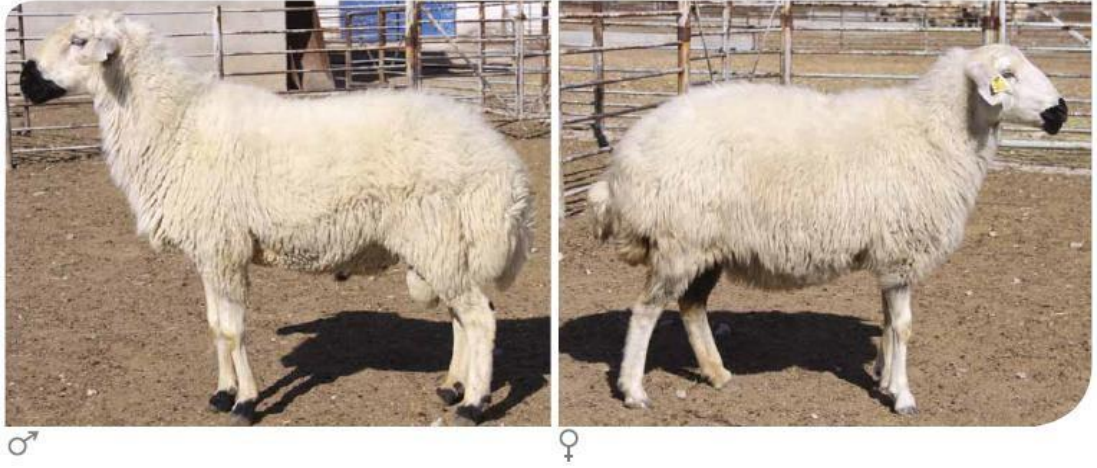
Türkiye’de yaklaşık 24 farklı koyun ırkı yetiştirilmektedir. Türkiye’de yetiştirilen koyun ırkları ve yetiştirildikleri bölgeler Şekil 1.2’de verilmiştir.



Şekil 1.2. Yetiştirildiği yere göre küçükbaş hayvan ırkları (TAGEM, 2009)

1.2.1. Akkaraman

Kütahya, Konya ve Eskişehir'den başlayarak Sivas'a kadar, kıyı bölgeler hariç Orta Anadolu'da ve bölgelerin geçiş yaptığı yerlerde yetiştirilir. Türkiye'deki koyun sayısının yarısına yakını (% 44) bu ırk tarafından oluşur. Üç lokal tipe ayrılmaktadır: Kangal tipi, Malatya ve Sivas'da; Karakaş tipi, Diyarbakır ve çevresinde; Güney Karaman tipi ise Mersin, Antalya, Gaziantep, Hatay çevrelerinde yetiştirilir. Olumsuz çevre koşullarına ve hastalıklara karşı dayanıklıdır. Vücut yapısı sağlam ve kanaatkâr hayvanlardır. Yetersiz besleme, değişken ve farklı iklim koşullarında yaşamını sürdürebilir. Yağlı kuyruklu olmasından dolayı yetersiz besleme olduğu zamanlarda yaşam gücü fazladır. Koyunlarda canlı ağırlık 50 kg, koçlarda 62 kg'dır. Koyunlarda süt verimi 50-60 kg, yapağlarının verimi 2.2 kg, kuzu verimi 1.2'dir (Akçapınar, 1994; Kaymakçı ve Sönmez, 1996; TAGEM, 2009).



Şekil 1.3. Akkaraman koyun ırkı (TAGEM, 2009)

1.2.2. Morkaraman

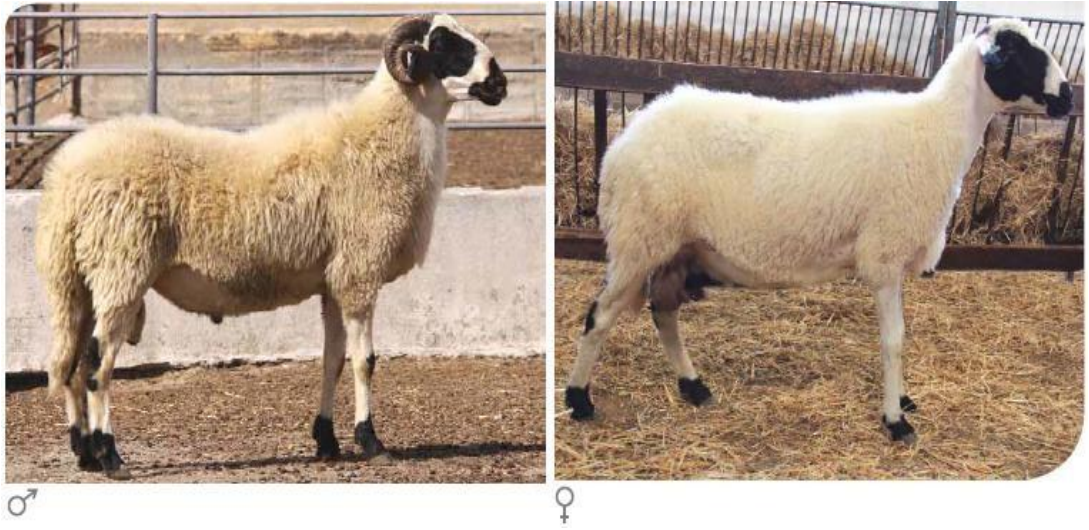
Sivas ve Malatya'nın doğusundan başlayarak Erzurum, Ağrı, Van, Kars ve Muş illeri başta olmak üzere Doğu Anadolu Bölgesi'nde yetiştirilir. Koyun sayımızın % 22'lik kısmını morkaraman oluşturur. Dayanıklılık, yüksek yaşama gücü ve kötü çevre koşullarına adaptasyon yeteneği yüksektir. Yüksek rakımlı ve fakir meraları en iyi şekilde değerlendirir. Yağlı kuyruklu olmasından dolayı uzun kış döneminde enerji kaynağı, yaşam gücü fazladır. Koyunlarda canlı ağırlık 40-60 kg, koçlarda 50-90 kg'dır. Koyunlarda laktasyon süt verimi 60 kg, yapağlarının verimi 1.5-2.0 kg, kuzu verimi 1'dir (Akçapınar, 1994; Kaymakçı ve Sönmez, 1996; TAGEM, 2009).



Şekil 1.4. Morkaraman koyun ırkı (TAGEM, 2009)

1.2.3. Sakız

Adını Sakız adasından almıştır. Marmara ve ege sahillerinde yetiştirilmektedir. Türkiye’de Çeşme, Karaburun, İzmir, Aydın, Söke’de yetiştirilir. Erken gelişim gösteren bir ırktır. Döl verimi ve süt verimi oldukça yüksektir. Adaptasyon yeteneği düşüktür. Eti lezzetlidir. 12 ay kızgınlık gösterir. Otlama ve yürüme yeteneği iyi değildir. Daha çok aile işletmelerinde yetiştirilir. Koyunlarda canlı ağırlık 50 kg, koçlarda 70 kg’dır. Koyunlarda süt verimi 180-200 kg, yapağlarının verimi 2.0 kg, kuzu verimi 2’dir (Akçapınar, 1994; Kaymakçı ve Sönmez, 1996; TAGEM, 2009).



Şekil 1.5. Sakız koyun ırkı (TAGEM, 2009)

1.2.4. Kıvırcık

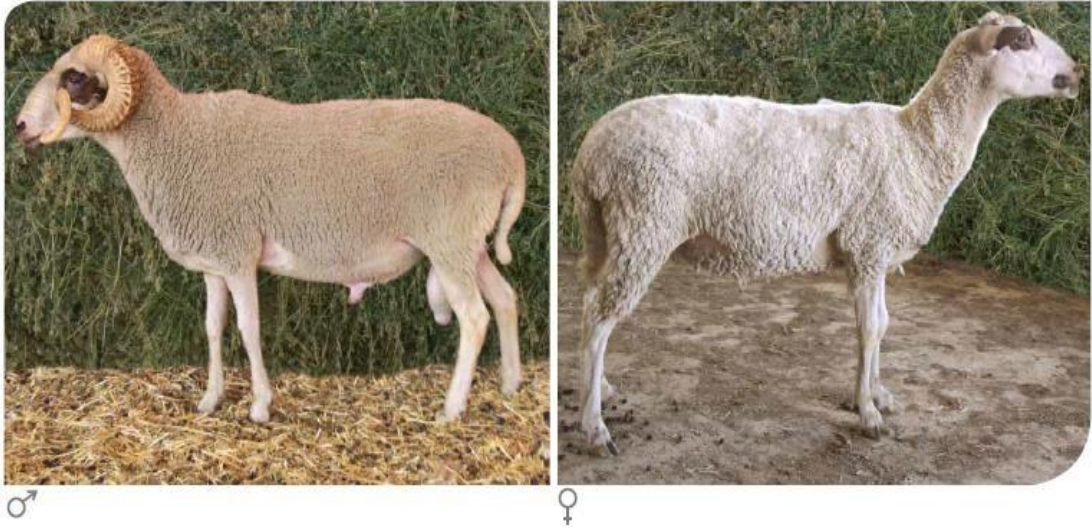
Trakya ve Marmara’nın güney doğusunda ve Kuzey Ege bölgesinde yetiştiriciliği yapılır. Türkiye’de yetiştirilen koyun sayısına göre 4. sırada bulunmaktadır. Engibeli arazilerde yürüme kabiliyeti yüksektir. Sürü içgüdüğü ve çevresine karşı adaptasyonu iyidir. Sağlam yapılı, kanaatkârdır. Olumsuz çevre şartlarına ve hastalıklara karşı dayanıklıdır. Koyunlarda canlı ağırlık 45-55 kg, koçlarda 60-70 kg’dır. Koyunlarda süt verimi 83 kg, yapağlarının verimi 1.5 kg, kuzu verimi 1.2’dir (Akçapınar, 1994; Kaymakçı ve Sönmez, 1996; TAGEM, 2009).



Şekil 1.6. Kıvrıcık koyun ırkı (TAGEM, 2009)

1.2.5. Pırlak

İç Ege Bölgesi (Uşak, Afyon, Kütahya) ile Batı Akdeniz'in kuzey kesimlerinde (Burdur, Isparta) yetiştirilir. Kötü çevre şartlarına ve hastalıklara dayanıklıdır. Koyunlarda canlı ağırlık 45-50 kg, koçlarda 50-60 kg'dır. Koyunlarda süt verimi 75-80 kg, yapağlarının verimi 2.0-2.5 kg, kuzu verimi 1.2-1.5'dir (Kaymakçı ve Sönmez, 1996; TAGEM, 2009).



Şekil 1.7. Pırlak koyun ırkı (TAGEM, 2009)

1.2.6. Karayaka

Karadeniz'in kıyı kesiminde yetiştiriciliği yapılmaktadır. Özellikle Samsun, Tokat, Ordu, Sinop ve Giresun illerinde yetiştirilir. Eğimli ve engebeli meralarda hızlı hareket eder. Sevk ve idare yönünden yetiştiriciliği oldukça zordur. Koyunlarda canlı ağırlık 40 kg, koçlarda 55 kg'dır. Koyunlarda süt verimi 40-50 kg, yapağlarının verimi 2.0-3.5 kg, kuzu verimi 1.1'dir (Akçapınar, 1994; Kaymakçı ve Sönmez, 1996; TAGEM, 2009).



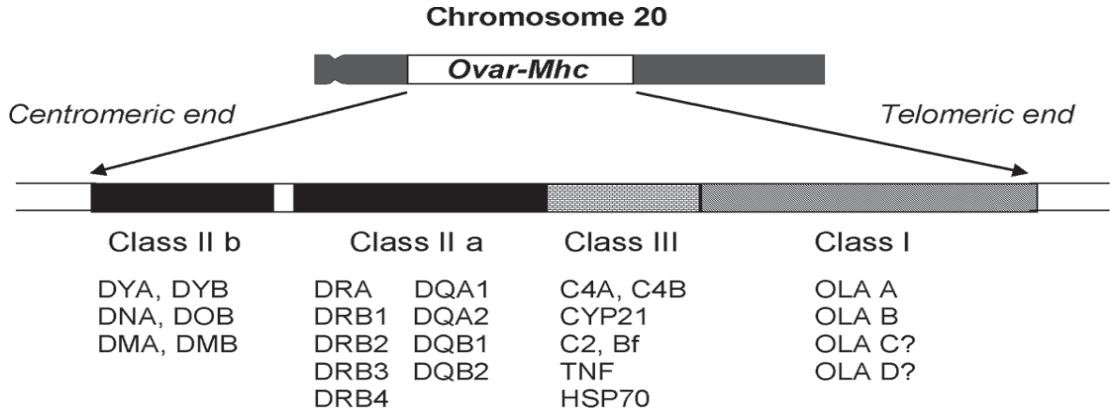
Şekil 1.8. Karayaka koyun ırkı (TAGEM, 2009)

1.3. Büyük Doku Uyum Kompleksi (MHC)'nin Yapısı ve Molekülleri

İmmün sisteminin kendinden olanı ve olmayanı tanıması için gerekli olan doku antijenlerini kodlayan gen bölgesi, MHC (Major Histocompatibility Complex)-Büyük Doku Uyum Kompleksi olarak adlandırılmaktadır (Delves ve ark. 2011). İlk olarak kemirgenlerde tanımlanan bu bölge insanlarda 6. kromozomun kısa kolunda yer almakta ve insanlarda HLA bölgesi olarak da adlandırılmaktadır. Çok sayıda genin yer aldığı yaklaşık 4000 kilobaz (kb) büyüklüğündeki bu bölgede immün yanıtla ilgisi tanımlanamamış bazı genler de bulunmaktadır. MHC, memelilerde immün cevap ile ilişkili proteinleri kodlayan bir grup geni içeren bir gen bölgesidir. Sınıf I ve Sınıf II genleri membran glikoproteinlerini kodlamaktadır (Delves ve ark. 2011). Bu glikoproteinlerin fonksiyonu immün sistem hücrelerince endofagositoz yoluyla alınan patojenleri ya da kendilerinin ürettiği endojen veya ekzojen peptidleri bağlamaktır. MHC sınıf II genleri, antijen sunan hücrelerin üzerinde bulunan MHC

sınıf II moleküllerini kodlamakta, ekzojen antijenlerin işlenmesi ve sunulmasından da sorumlu olduğu bildirilmektedir (Lamont 1989, Bremdal 2010). Antijen spesifik immun yanıt bu şekilde başlamaktadır. Koyunlarda MHC genleri koyun lökosit antijeni (Ovine leucocyte antigen, OLA) olarak adlandırılmaktadır ve 20. kromozomun q15 - q23 bölgesinde lokalize olduğu belirlenmiştir (Mahdy ve ark., 1989). MHC genlerinin karakteristik özelliği kodominant ekspresyona yani her iki allelin de heterozigot bireylerde eksprese edilebilir özelliğe sahip olmasıdır. (Stear ve ark., 1996; Jugo ve Vicario 2001). MHC genlerinin haplotipik ilişkisi allelik ilişkiden daha güçlüdür ve anlamlıdır. Özellikle, antijen sunumunda görevli Sınıf I ve Sınıf II lokuslarının bazıları oldukça polimorfiktir. Antik dönemden günümüze kadar gelen bu polimorfizmlerin bazıları türler içerisinde korunduğu bildirilmiştir (Klein ve ark., 1993). Bu polimorfizmin belirli bir patojeni veya peptidi tanıyabilecek şekilde bireysel immun yanıt oluşturmak üzere yapılandığı ifade edilmektedir (Andersson 1996).

Türlere göre MHC gen bölgesi farklı kromozomlar üzerinde bulunmaktadır. MHC, koyunda ve atta 20. kromozomda, keçide ve sığırdada 23. kromozomda, köpekte 12. kromozomda, kedide 2. kromozomda, domuzda 7. kromozomda ve insanda 6. kromozom üzerinde bulunmaktadır. Türlere göre MHC lokusundaki gen sayıları ve genlerin organizasyonu farklı olabilmektedir. MHC genlerince kodlanan moleküllere verilen adlar, türlere göre farklı isimlendirilmektedir. Koyunda OLA (Ovine Leukocyte Antigen) ya da Ovar-MHC, atta ELA (Equine Leukocyte Antigen), keçide CLA (Caprine Leukocyte Antigen), sığırdada BoLA (Bovine Leukocyte Antigen), köpekte DLA, kedide FLA, domuzda SLA, tavukta B, insanda HLA (Human Leukocyte Antigen) olarak adlandırılmaktadır. MHC diğer memelilerde olduğu gibi ruminantlarda da 3 gen bölgesinden oluşmaktadır (Dukkipati ve ark., 2006). MHC sınıf I, sınıf II ve sınıf III olmak üzere her biri farklı işlevlere sahip üç temel bölgeyi içermektedir (Amills ve ark., 1998). Ruminantlarda sınıf II bölgesi A ve B şeklinde iki alt bölgeye ayrılmaktadır (Andersson ve ark., 1988; Van Eijk ve ark., 1995). Sınıf II molekülleri heterodimer yapıdadır. Hastalıklarla genetik ilişkileri belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda DRB1, DQA ve DQB genlerinin exon-2 zincirindeki varyasyon sıklıkla kullanılmaktadır (Stear ve ark., 1996; Jugo ve Vicario 2001).



Şekil 1.9. Ovar-MHC'ye ait yapının şematik gösterimi (Dukkipati ve ark., 2006)

MHC'ler enfeksiyonlara karşı immun yanıt oluşturmada önemli ve çeşitli otoimmün bozukluklar ile alakalı bir gen kümesidir. MHC genleri peptidler ve T-hücrelerinin reseptörleri ile etkileşim kurarak bu antijenleri T-hücrelerine sunmaktadır. Genel olarak CD-8 molekülleri MHC-I molekülüne, CD-4 molekülleri de MHC-II reseptörüne bağlanmaktadır. T- hücrelerinin aktivasyonu için, T-hücresi yüzeyinde bulunan ön uyarıcı bir sinyalin antijen sunan hücrelerde yeterli miktarda bağlantı sağlaması gerekmektedir (Wagner, 2003).

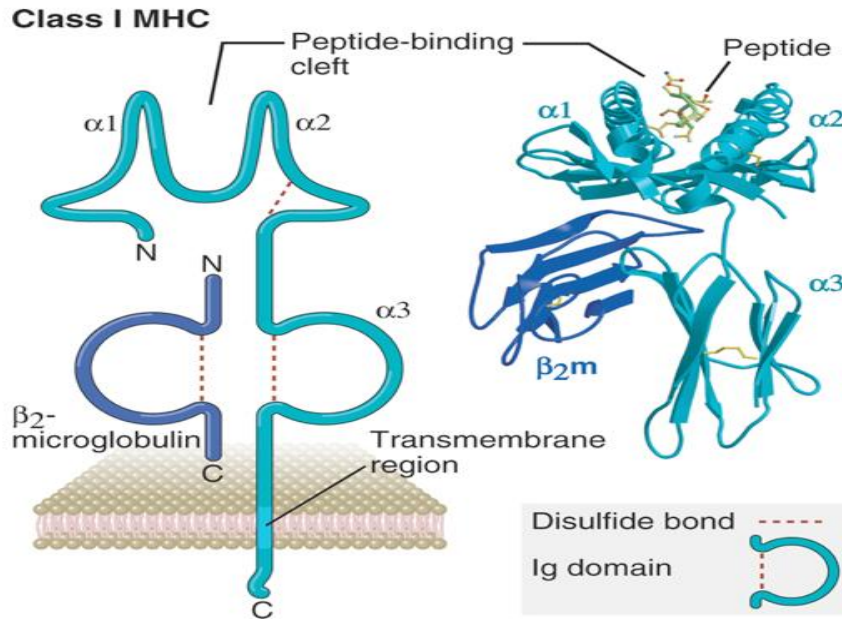
MHC Sınıf I molekülleri sitotoksik T-lenfositlere, sitozolde üretilmiş “endojen” antijenler sunarken, MHC Sınıf II molekülleri immun cevabın oluşması için aktive edilmiş T-lenfositlerin yüzeyine, ekstrasellüler proteinlerden türeyen “eksojen” antijenler sunmaktadır. Sınıf III genleri ise, bazı tamamlayıcı komponentler içermektedir. MHC Sınıf I ve MHC Sınıf II genleri antijen sunumuna katılmakta iken, MHC Sınıf III genleri antijen sunumuna katılmamaktadır (Davies ve ark., 1997).

1.3.1. MHC Sınıf I Molekülleri

İnsanlarda MHC Sınıf I (HLA A, B, C) genleri bütün çekirdekli somatik hücrelerde bulunmakta ve kromozomun telomerik ucuna yakın bir bölgede yer almaktadır. HLA -A,-B,-C olarak da tanınan klasik transplantasyon antijenlerini ve HLA-E, F,G gibi

klasik olmayan Sınıf I antijenleri kodlayan gen lokuslarını da içermektedir (Dalva, 2004).

MHC sınıf I molekülleri, kovalent olmayan bağlarla bir arada tutulan, iki polipeptid zincirinden (alfa ve beta) oluşmaktadır (Gülmezoğlu ve Ergüven 1994). Büyük olan 45 kDa ağırlığındaki alfa(α) zinciri MHC bölgesinde kodlanmaktadır. Hücre membranı boyunca ilerleyen bu molekülün amino ucu membranın dışında yer almaktadır. Membran dışındaki alfa zinciri; $\alpha 1$, $\alpha 2$ ve $\alpha 3$ domainlerden (altbirim) oluşmaktadır. Bu domainler $\alpha 1$ -90, $\alpha 2$ -63 ve $\alpha 3$ -86 aminoasit dizisinden meydana gelmektedir. Zincirin membranı geçen kısmını takiben kısa bir sitoplazmik uzantısı bulunmaktadır. Sınıf I molekülde bulunan hafif zincir ise $\beta 2$ -mikroglobulin ($\beta 2m$) olup 12 kDa ağırlığındadır. $\beta 2m$ kovalent olmayan bağlarla ağır zincire bağlanmış olup MHC dışında, 15. kromozomda kodlanmaktadır (Dalva, 2004; Hughes ve Yeager, 1998).



Şekil 1.10. MHC sınıf I molekülü yapısı (Abbas ve ark., 2011)

Molekülün üç boyutlu yapısına bakıldığında membran dışında birbirine benzerlik gösteren bölgelerin karşılıklı olarak gelmesi ile iki çift domainden oluştuğu

görülmektedir. $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ membran distalinde, $\alpha 3$ ve $\beta 2m$ de membran proksimalinde karşılıklı bir şekilde yer almaktadır. Karşılıklı yerleşen $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ zincirlerine ait 8-10 aminoasit büyüklüğünde peptidlerin yerleşebileceği, kovuğa benzer bir yapı oluşmaktadır. $\beta 2$ -mikroglobulin, molekülün üç boyutlu yapısının korunmasında rol almaktadır. MHC Sınıf I molekül genleri, 8 exon ve 7 introndan oluşmaktadır. Polimorfik bir yapı gösteren $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ bölgeleri ekzon 2 ve ekzon 3 tarafından kodlanmaktadır. (Klein ve Sato, 2000; Van Kaer 2002; Görüroğlu Öztürk 2011).

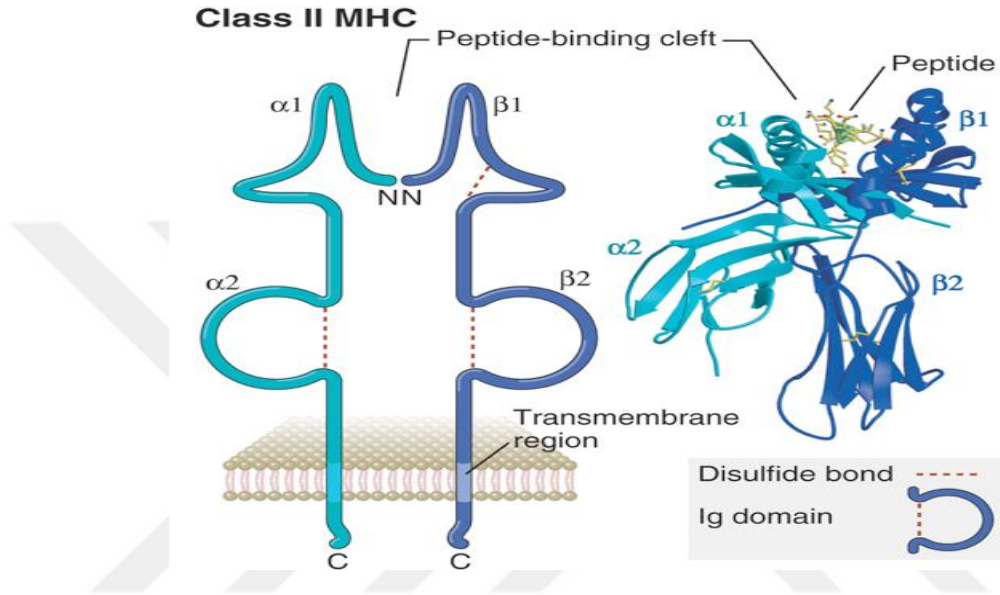
MHC Sınıf I molekülleri sitozolik proteinlerden kaynaklanan peptidleri oluşturmaktadır. Bu peptidler köken olarak selüler proteinlerin yanında, viral ve bakteriyel proteinlerden de olabilmektedir (Howard, 1995). MHC Sınıf I genlerinin sitotoksik T-lenfositleri (öldürücü T-hücreleri) için reseptör gibi görev yaptıkları düşünülmektedir (Felsburg ve ark., 1998).

1.3.2. MHC Sınıf II Molekülleri

MHC Sınıf II bölgesi sentromere yakın yerleşmiş olup; DRA, DRB, DQA, DQB, DPA, DPB, DNA, DMA ve DOB lokusları yer almaktadır. Bunlardan başka çeşitli psödogenler, LMP1, LMP2, TAP1, TAP2 gibi antijen işlenmesinde rol alan genler bu bölgede yer almaktadır. MHC Sınıf II molekülleri; 33 kDa ağırlığında alfa ve 30 kDa ağırlığında beta polipeptit zincirlerinden oluşan transmembran glikoproteinlerdir (Dalva, 2004).

MHC Sınıf II molekülleri, kovalen olmayan bağlarla bir arada tutulan alfa(α) ve beta(β) olmak üzere 2 adet transmembran glikoprotein zincirinden oluşan heterodimerlerdir. Her iki zincirinde hücre zarı dışında sırasıyla $\alpha 1$, $\alpha 2$ ve $\beta 1$, $\beta 2$ olmak üzere 2 alt birimleri bulunmaktadır. Membranın distalinde yerleşen ve polimorfik bir yapı gösteren $\alpha 1$ ve $\beta 1$ zincirleri MHC Sınıf I moleküllerinde olduğu gibi antijenlere ait peptidlerin yerleşebileceği kovuğa benzer bir yapı oluşturmaktadır. $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ bölgeleri, MHC sınıf I moleküllerdeki gibi Ig benzeri yapılar şekillendirmektedir. α zinciri A, β zinciri ise B genleri tarafından kodlanmaktadır. Bu nedenle MHC sınıf II bölgesinde yer alan DR, DQ ve DP

bölgeleri sırasıyla DRA ve DRB; DQA ve DQB; DPA ve DPB olarak ayrılmaktadır. DR bölgesinde α zinciri kodlayan tek gen varken, β zinciri için 9 farklı bölge bulunmaktadır. Bu genlerden bazıları DRB1, DRB3, DRB4 ve DRB5 ile farklı beta zincirlerini kodlamaktadır (Görüroğlu Öztürk 2011; Dalva 2004; Klein ve Sato, 2000).



Şekil 1.11. MHC sınıf II molekülü yapısı (Abbas ve ark., 2011)

MHC Sınıf II molekülleri, başlıca B lenfositler, dendritik hücreler ve makrofajlar gibi antijen sunan hücrelerin üzerinde bulunmakta ve buradan salınmaktadır (Chicz ve ark., 1992; Janeway, 2001). Fagositoz işlemi esnasında sindirilen patojenlerden kaynaklanan antijen fragmanına bağlanmakta ve sitoplazmik kesecik içinde parçalara ayrılmaktadır (Güney Saruhan ve ark. 2016). MHC sınıf II moleküllerinden çoğunlukla ekzojen kökenli peptid ve proteinler oluşmaktadır (Nagata ve ark., 2001). MHC Sınıf II bölgesi HLA-DP, -DR ve -DQ yüksek polimorfik genlerini içermektedir. Söz konusu genler normal olarak immun sistem hücreleri tarafından eksprese edilmekte, T lenfosit aktivasyonu ve antijen sunumu sırasında temel bir rol oynamaktadırlar (Stemme ve ark. 1990).

1.3.3. MHC Sınıf III Molekülleri

HLA-DRB ile HLA-B bölgeleri arasında Sınıf III genleri bulunmaktadır ve yaklaşık 60 gen içermektedir (Delves ve ark. 2011). Bu genler, kompleman komponentleri (C2, C4 ve faktör B) sitokinler (interferon, tümör nekrozis faktör), enzimler (21 hidroksilaz koenzim) ve bazı ısı şok proteinlerini kodlayan genlerdir (Pross 2007; Schulze ve ark. 2012; Trowsdale 2011). Bu bölgeden kodlanan moleküllerin çoğu direkt veya indirekt olarak immün sistem fonksiyonlarıyla ilişkisi bulunmaktadır. C4A, C4B, Bleferidin, HSP-70, C2, TNF-a, TNF-b bu bölgede kodlanan bazı genlerin ürünüdür (Campbell ve ark., 1986). Transplantasyon antijenleri olarak rol oynamadıkları gibi T-lenfositlerine de antijen sunmazlar (Yalçın 2013; Todd ve ark. 1988).

1.3.4. Ovar-DRB1

İnsan hayatında önemli yer tutan koyunun hastalıklar nedeniyle ölmesi veya verimden düşmesi işletmeleri önemli ölçüde ekonomik sıkıntıya sokmaktadır. Bu nedenle hastalıkların mümkün olduğunca azaltılması ve minimum düzeye indirilmesi gerekmektedir. Hayvanların hastalanmasından sonra alınan tedbirler zaman kaybı ve masrafa yol açacağından, hayvanların genetik olarak bağışıklık sistemlerinin gelişmiş olması ve hastalıklara karşı genetik direncinin yüksek olması istenmektedir.

Hastalıklara direnç ve MHC arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için yapılan çalışmalarda gastrointestinal nemotodlara direncin DRB1 geniyle (Buitkamp ve ark., 1994; Schwaiger ve ark., 1995; Charon ve ark., 2002; Sayers ve ark., 2005; Stear ve ark., 2005), bakterilere karşı direncin DQA1, DQA2, DQB, DRA ve DRB1 genleriyle (Litchfield ve ark., 1993; Escayg ve ark., 1997) ve virüslere direncin ise daha çok DRB1 geniyle (Yoshiko ve ark., 1999; Aida 2001; Konnai ve ark., 2003b) ilişkisi olduğu belirlenmiştir.

Nagaoka ve ark. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada OLA-DRB1 gen polimorfizm ile koyun lenfomasına sebep olan BLV (Bovine Leukemia Virüs) ile enfeksiyon sonrası hayvanlardaki tümör gelişimi arasındaki bağ araştırılmıştır.

Bovine Leukemia Virüs (BLV) ile enfekte edilmiş ve sağlıklı hayvanlarda DNA dizi analizi ve *Sall*, *RsaI*, *SacI*, *HindIII* ve *EcoR1* kesim enzimleri ile PCR-RFLP analizi yapılmıştır. Dizi analizi sonucunda Arg-Lys aminoasitlerinin kodlandığı DRB1 allelleri lenfomalı hayvanlarda % 37.5, sağlıklı hayvanlarda % 83.3 bulunmuştur. Ser-Arg aminoasitlerini kodlayan DRB1 allelleri ise lenfomalı koyunlarda daha yüksek frekansta bulunmuştur. Bu allellerin BLV enfeksiyonundan sonra tümör oluşumuna karşı dirençli olabileceği sonucuna varılmıştır.

Gutierrez-Espeleta ve ark. (2000) tarafından 206 Kanada koyununda yapılan bir çalışmada SSCP analizi ile MHC polimorfizmi incelenmiştir. Antijen bağlanma bölgesi olan 16 aminoasit pozisyonu için ortalama heterozigotluk 0.389 olarak bulunmuştur. Antijen bağlanma bölgesi içermeyen 67 aminoasit pozisyonu için heterozigotluk 0.076 olarak bulunmuştur. Elde edilen bulgular bu gende var olan farklılıkların fonksiyonel faydasının olduğunu göstermiştir.

Jugo ve Vicario (2000) tarafından Karrantzar ve Latxa koyunlarında yapılan bir çalışmada SSCP ve DNA dizi analiz yöntemi kullanılarak MHC-DRB bölgesinin 2. ekzonundaki varyasyon incelenmiştir. Sekans analizi sonucunda 6 yeni allel tespit edilmiştir. İki ırkta da DRB1*0702 allel frekansının yüksek olduğu bildirilmiştir.

Konnai ve ark. (2003a) tarafından yapılan çalışmada Suffolk, Corriedale ve Cheviot ırklarına ait 97 koyunda DNA dizi analiz çalışması yapılmıştır. Yapılan çalışmada Ovar-DRB1 gen bölgesinde, daha önce yayınlanmış 18 allel ve yeni 17 allel tanımlanmıştır. Bu yeni alleller nükleotid seviyesi bakımından % 83.4 ila 94.1 oranında, aminoasit seviyesi bakımından % 71.4 ila 90.9 oranında Ovar-DRB1*0101 alleleline benzerlik göstermiştir. Cheviot ırkında 6, Suffolk ırkında 11 yeni allel bulunmuştur. Aynı zamanda Corriedale ırkında 1, Cheviot ırkında 6, Suffolk ırkında 15 allel sadece o ırk için tespit edilmiştir. Ovar-DRB1*0702 Suffolk ırkının en sık (% 23.9) alleli, Ovar-DRB1*0203 Cheviot ırkının en sık (% 27.5) alleli ve Ovar-DRB1*0201 ise Corriedale ırkının en sık (% 25) alleli olarak bulunmuştur.

Arrieta-Aguirre ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada, 187 Latxa koyun ırkında ovar DRB1 ekzon 2 gen bölgesinin polimorfizmini araştırmak amacıyla

PCR-SSCP analizi yapılmış ve 19 allel elde edilmiştir. 8 allelin daha önceden belirlenmemiş allellerden olduğu bildirilmiştir. Heterozigotluğun % 91-95'e ulaştığı gözlenmiştir. Yeni belirlenen DRB1*14 alleli evcil koyunun atalarına ilişkin tartışmaya ışık tutacağı öngörülmüştür.

Ballingall ve ark. (2008) tarafından yapılan bir araştırmada, koyunların Ovar-DRB1 genindeki polimorfizm araştırılmıştır. Bu sayede kodlanan, kodlama yapmayan ve promotor gen bölgeleri analiz edilmiş ve 9 yeni allel tanımlanmıştır. Ovar-DRB1*0302 ve Ovar-DRB1*0401 allellerinin koyun ırkının evrimleşmesini anlamada önemli bilgiler sağladığı ifade edilmiştir.

Hermann-Hoesing ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada Kolombiya, Rambouillet ve Polypay ırklarından 383 koyunda DRB1 gen bölgesinde DNA'ya ait dizi çalışması yapılmıştır. DRB1*07012 veya DRB*0403 allellerine sahip hayvanların düşük provirüs seviyesiyle bağlantılı ve bu allellerin % 11 seviyesinde olduğu belirlenmiştir. Rambouillet koyunlarının 5 ve 6 yaşlarındaki Polypay ve Kolombiya koyunlarına göre daha düşük provirüs seviyelerine sahip oldukları gözlenmiştir.

Brujeni ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada, 82 İran Shaul koyun ırkının Ovar-DRB1 gen bölgesi için PCR-RFLP analizi yapılmıştır. Bunun için *MspI* ve *RsaI* kesim enzimleri kullanılmıştır. *MspI* enzim kesimi sonucu 5 farklı allel tanımlanmıştır. *RsaI* enzim kesimi sonucu ise 8 farklı genotip ile 5 farklı allelin tanımlanması yapılmıştır.

Li ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada MHC-DRB1 gen polimorfizmi ile Kazak koyunlarında hydatidosis (kist hidatik) genetik direnç arasındaki ilişki incelenmiştir. Ovar-MHC sınıf 2 genlerinden DRB1'in 2. ekson bölgesi, 302 hidatitozlu koyun ve 400 sağlıklı kontrol grubu olmak üzere 702 Kazak koyununun DNA örneklerinden polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır. *MvaI*, *HaeIII*, *SacI*, *SacII* ve *Hin1* kesim enzimleri ile PCR-RFLP analizi yapılmış ve 14 allel ile 28 genotip karakterize edilmiştir. Hidatitoz koyunlarda genotiplerin sıklığını kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kontrol koyunlarında *MvaIbc*, *Hin1Iab*,

SacIIab, HaeIIIde, HaeIIIIdf ve HaeIIIdd'nin genotip sıklığının, hidatitoz koyunlarına göre yüksek derecede anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir ($p<0.01$). Bu genotipler ile kist hidatitoza direnç arasında anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir.

Li ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada Sinkiang'daki üç koyun ırkında (Çin merinosu, Kazak ve Duolang koyunları) *Ovar* MHC-DRB1'in ikinci eksonu ile kist hidatik'e duyarlılık veya direnç arasındaki olası ilişkileri araştırmıştır. PCR-RFLP tekniğinde *MvaI*, *HaeIII*, *Sac I*, *SacII* ve *Hin1I* kullanılmış ve 14 allel belirlenmiştir. Sağlıklı koyunlarda bazı allellerin enfekte olmuş koyunlardan önemli ölçüde yüksek olduğu tespit edilmiştir. *Ovar-DRB1* geninin, her üç koyun ırkında da kist hidatike direnç göstermesinde rol oynayabileceği ifade edilmiştir.

Shen ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada MHC-DRB1 geninin polimorfizmi ile kistik ekinokok'a karşı direnç ilişkisini analiz etmek amaçlanmıştır. MHC-DRB1 ekson 2, sağlıklı ve hidatik koyunların PCR-RFLP tekniği ile tanımlanmıştır. Bu amaçla, beş restriksiyon enzimi (*MvaI*, *HaeIII*, *SacI*, *SacII* ve *Hin1I*) kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre Çin Merinos koyunları için MHC-DRB1 ekson 2, Kistik Echinococcus'a direnç göstermede önemli rol oynadığı tespit edilmiştir.

Paswan ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada MHC-DRB1 gen polimorfizmi ile Garole koyunlarında nematod parazitlerine karşı direnç mekanizmaları arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu amaçla PCR-RFLP analizi yapılmıştır. Bu çalışma, *Ovar-DRB1* ekson 2'nin Garole koyunlarında doğada polimorfik olduğunu ortaya koymuştur. Endonükleaz *SacI* için A allelinin ve Endonükleaz *Hin1* için B allelinin Garole popülasyonunda anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. *Ovar-DRB1* ekson 2 genindeki genomik değişkenlik Garole'de gastrointestinal nematoduna karşı direnç sağlamaktan sorumlu olabileceği düşünülmektedir.

Alp Ibex dağ keçileri (*Capra ibex ibex*) ve aynı bölgedeki evcil keçilerdeki MHC-DRB genlerini belirlemek için yapılan bir çalışmada (Grossen ve ark. 2014) her iki tipinde MHC-DRB gen bölgesi bakımından farklı allelleri taşıdıkları

bulunmuştur. Araştırmacılar, evcil keçilerdeki MHC-DRB allelerin Alp dağ keçilerine introgresyon yoluyla aktarılması sonucu MHC-DRB allelerinde zamanla bir artış olabileceğini ifade etmektedirler.

1.4. Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP)

Bir kromozom zincirinde tek bir nükleotidin bir diğeriyle yer değiştirmesi sonucunda oluşan mutasyonlar tek nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) olarak adlandırılmaktadır. SNP'ler DNA dizisindeki varyasyonlardır. Genellikle iki allel içermektedir. SNP iki farklı şekilde oluşabilmektedir. Birinci olarak bir pürin bazının (A,G) diğeri pürin bazına veya bir pirimidin bazının (C,T) diğeri pirimidin bazına değişmesi (tranzisyon), ikinci olarak bir pürin bazının bir pirimidin bazına veya pirimidinin pürine değişimi (transversiyon) şeklindedir. Genomdaki dizide meydana gelen tek nükleotidlik (A, T, G veya C) değişim sonucu meydana gelmektedir. Bir varyasyonun SNP olarak kabul edilebilmesi için, popülasyonda en az % 1 oranında izlenebiliyor olması gerekmektedir. SNP'ler bir genin hem kodlama yapan (ekzon) hem de kodlama yapmayan (intron) bölgesinde bulunabilir. Pek çok SNP'nin hücresel fonksiyon üzerine bir etkisi yok iken, bir kısmının hastalıklarda etkisi olduğu gösterilmektedir. İnsan genomunda günümüze kadar pek çok SNP tanımlanmıştır. Bunların 11 milyon civarında olduğu düşünülmektedir. (Kruglyak ve Nickerson, 2001). SNP'ler evrimsel olarak mikrosatellit markerlarına göre daha stabil ve daha düşük mutasyon oranına sahip olduğu ifade edilmektedir (Costa ve ark. 2008). Bir generasyondan diğerine değişimleri az olduğundan popülasyon çalışmalarında kullanılmaları daha kolay ve bilgilendirici niteliktedir. Bunun yanında SNP'lerin sayılarının fazla oluşu hastalık ve allel korelasyonunun kurulmasında şans ve avantaj doğurmaktadır.

Bu araştırmada, Türkiye yerli koyun ırklarındaki MHC-DRB1 ekson 2 gen bölgesindeki polimorfizmin ortaya konulması ve yerli koyun ırkları arasındaki MHC-DRB1 ekson 2 allelik farklılıkların belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Hayvan Materyali

Bu çalışmada, Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan 32 baş Pırlak, 18 baş Akkaraman, 28 baş Morkaraman, 32 baş Karayaka, 29 baş Kıvrıkcık ve 29 baş Sakız koyununa ait toplam 168 kan örneği kullanılmıştır. Araştırma, AKÜ Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulunun 24.10.2017 tarih ve 161 sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir.

2.1.2. Kullanılan Teknik Cihazlar

2.1.2.1. PCR Cihazı

DRB1 ekson 2 gen bölgelerinin çoğaltılması ve dizileme analizini yapmak amacıyla Applied Biosystems Veriti 96-Well Thermal Cycler PCR kullanılmıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. PCR Cihazı

2. 1. 2. 2. Yatay Elektrofrez Sistemi

Kandan elde edilen DNA ve PCR ürünlerinin elektrofrezde görüntülenmesi için Thermo 4000P güç kaynağı ve Thermo midicell primo EC 320 elektrofrez jel sistemi kullanılmıştır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Elektrofrez Sistemi

2. 1. 2. 3. Jel Görüntüleme ve Analiz Sistemi

DNA izolasyonu ve PCR sonucunda elde edilen ürünler elektrofrezde yürütülmesinin ardından, görüntülenebilmesi için Vilber Lourmat BIO-VISION jel görüntüleme sistemi kullanılmıştır (Şekil 2.3).



Şekil 2. 3. Jel Görüntüleme Sistemi

2. 1. 2. 4. DNA Dizileme Cihazı

PCR işleminin ardından çoğaltılan DNA'lara ait baz dizilimlerini belirlemek amacı ile Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer kullanılmıştır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. DNA Dizileme Cihazı

2.2. Metot

2. 2. 1. Kandan DNA İzolasyonu

Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında -20°C 'de saklanan Türkiye yerli koyun ırklarına ait kanlardan DNA izolasyonu, spin-kolon kullanılarak gerçekleştirildi. Öncelikle 10 μl Proteinaz-K (20 mg/ml) alınarak 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinin dip kısmına konuldu. Üzerine 200 μl kan ve 200 μl ekstraksiyon çözeltisi eklenip 15 sn. vortekslendi. Daha sonra 15 dk. 56°C 'de etüvde karıştırılarak bekletildi. Üzerine 210 μl binding buffer eklenip 15 sn. vortekslendi ve lizatlar spin-kolon tüplerine aktarıldı. Daha sonra 8.000 rpm hızda 1 dk. santrifüj edildi ve toplama tüpünün altında biriken sıvı kısım döküldü. Spin kolonların üzerine 650 μl yıkama solüsyonu-I eklenerek 8.000 rpm hızda 1 dk. santrifüj edildi, toplama tüpünün altında biriken sıvı kısım döküldü. Daha sonra spin kolonlara 500 μl yıkama

solüsyonu-II eklenerek 8.000 rpm hızda 1 dk. santrifüj edildi, toplama tüpünün altında biriken sıvı kısım döküldü. Spin kolonlara tekrar 250 µl yıkama solüsyonu-II eklenerek 14.000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Daha sonra spin kolon yeni 1,5 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı ve üzerlerine 200 µl TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0) eklenerek oda ısısında 5 dk. bekletildi. Daha sonra tüpler 8.000 rpm hızda 1 dk. santrifüj edildi ve DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20 C'de saklandı.

2. 2. 2. Primer Tasarımı

Çalışmada kullanılan Ovar MHC-DRB1 gen bölgesine ait primerler, NCBI'dan elde edilen referans diziden (NC_040271.1) yararlanılarak ve FastPCR Professional 6.1.2 paket programı (Kalendar ve ark., 2009) kullanarak tasarlandı. Primerler arasındaki dimer ve hairpin oluşumu aynı program ile kontrol edildi. Çalışmada ileri (forward) primeri Ovar DRB1_F 5'-TAT CCC GTC TCT GCA GCA CAT TTC-3' ve geri (revers) primeri Ovar DRB1_R 5'-TCG CCG CTG CAC AST GAA ACT CTC-3' kullanıldı.

2. 2. 3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Bağlanma sıcaklığının belirlenmesi amacıyla gradient PCR uygulandı. Bu amaçla 1xPCR buffer, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,3 pmol ileri primer, 0,3 pmol geri primer, 1 U Platinum Taq polimeraz (Invitrogen, 10966034) ve 20 ng/µL DNA olacak şekilde 20 µL PCR karışımı hazırlandı. PCR cihazı sırasıyla 95°C' de 2 dk bir döngü, 94°C' de 30 sn, 54 – 64°C' de 30 sn ve 72°C'de 1 dk 35 döngü ve son aşamada 72°C'de 10 dk olacak şekilde programlandı.

2. 2. 4. Agaroz Jel Elektrofrez

Agaroz jeli hazırlamak için, 1 gr agaroz ile 50 ml TAE (Tris- Asetat- EDTA) solüsyonu karıştırıldı ve mikrodalga fırında 2 dk. ısıtıldı. Hazırlanan % 2'lik agaroz jelin içerisine 1 µl RedSafe (INtRON, 21141) boya solüsyonu eklendi. Daha sonra jel

tepsisine yavaşça döküldü. Hazırlanan jelin polimerleşmesi için 30 dk oda sıcaklığında, 30 dk'da +4°C derecede bekletildi. Polimerleşmeden sonra jel içerisinde 1X TAE solüsyonu bulunan yürütme tankına yerleştirildi. Tank, jelin üstünü kaplayacak şekilde (Tris- Asetat- EDTA) ile dolduruldu. Her kuyucuğa 8,5 µl yükleme solüsyonu (1X Loading Dye) ve 2,5 µl PCR ürünü olan karışım konuldu. Yükleme işleminin ardından jele 30 dk 90 V uygulandı. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel tanktan çıkarıldı ve jel görüntüleme sistemi kullanılarak görüntüledi. Işımanın görüldüğü bantlar pozitif, ışımının görülmediği bantlar negatif olarak değerlendirildi.

2. 2. 5. DNA Dizileme Analizi

DNA dizi analizi önce çoğaltılan PCR ürünlerini temizlemek için 4 µl PCR ürünü ile 0,5 µl Exonuclease-1 (ThermoFisher, EN0581) ve 1,0 µl FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (ThermoFisher, EF0652) eklendi. Hazırlanan bu karışım 37°C'de 15 dk, 85°C'de 15 dk olacak şekilde PCR'a cihazında bekletildi. Daha sonra dizileme (sekans) PCR için örnek başına 12 µl 1x Sequencing buffer, 1 µl BigDye solüsyonu, 5 µl (1 pmol) F/R primer ve 2 µl temizlenmiş PCR ürünü eklendi. PCR cihazı 96 °C'de 2 dk 1 döngü, 96 °C'de 10 sn, 54°C'de 20 sn ve 60 °C'de 4 dk 30 döngü olacak şekilde programlandı.

Sekans PCR sonucunda elde edilen ürünleri Etanol - EDTA – Sodyum asetat yöntemine göre temizlendi. Bu amaçla her bir örneğe 1 µl EDTA (pH 8.0), 1 µl 3M sodyum asetat (NaOAc, pH 5,07) ve 50 µl Etanol (% 98) eklendi. Pleyt alüminyum sealing ile kaplanarak 4 – 5 kez alt-üst edildi ve 15 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi. Daha sonra 30 dk +4 °C' de 4000 rpm' de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üstündeki sealing çıkartıldı ve bir peçete üzerine ters çevirerek 1 dk boyunca +4 °C' de 700 rpm' de santrifüj edildi. Daha sonra örneklerin üzerine % 70' lik etanolden 70 µl eklenerek üstü pleyt sealing ile kapatıldı ve +4 °C' de 10 dk 4000 rpm' de santrifüj edildi Santrifüjden sonra üstündeki sealing çıkartıldı ve bir peçete üzerine ters çevirerek 1 dk boyunca +4 °C' de 700 rpm' de santrifüj edildi. Daha sonra pleyt oda sıcaklığında karanlık bir yerde 60 dk bekletildi. Her bir örneğin

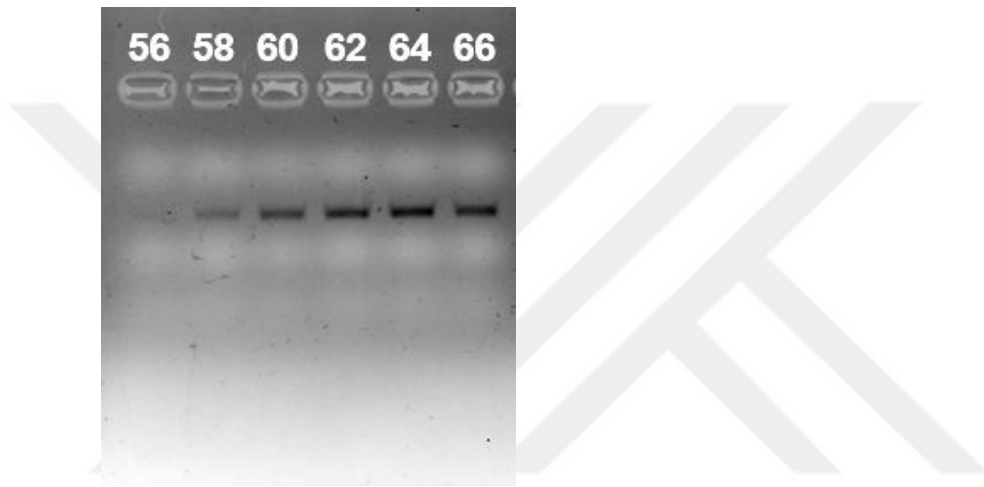
üzerine 15 µl Hi-Di Formamide ekledikten sonra pleyt sealing ile kaplandı ve kuvvetli bir şekilde vortekslenerek 1300 rpm' de kısa bir süre santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından sealing çıkarıldı ve pleyt septa ile kapatıldıktan sonra DNA dizi analizi cihazına yüklendi.

2.2.6. İstatistik Analiz

Yapılan DNA dizi analizi sonucunda elde edilen sonuçlar Sequencher Version 5.4.6 (Gene Codes Co.) paket programı ile düzenlendi ve BioEdit Sequence Alignment Editor programı (Hall, 1999) yardımıyla hizalanarak polimorfik olan SNP'ler tespit edildi.

3. BULGULAR

Çalışmada kullanılan Ovar MHC-DRB1 gen bölgesine ait primerlerin bağlanma sıcaklığının belirlenmesi amacıyla gradient PCR uygulandı ve PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 3.1). En iyi bağlanma sıcaklığı 64°C olarak belirlendi ve tüm örneklerin PCR'ı bu sıcaklıkta gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. Gradient PCR jel görüntüsü

Türkiye’de farklı bölgelerde yetiştirilen yerli koyun ırklarından 32 baş Pırlak, 18 baş Akkaraman, 28 baş Morkaraman, 32 baş Karayaka, 29 baş Kıvırcık ve 29 baş Sakız koyununun 284 bp uzunluğundaki Ovar-DRB1 ekzon 2 bölgesi analiz edilmiştir. Analiz edilen toplam 168 baş koyunda toplam 110 haplotip (allel) belirlenmiştir. Irklara göre belirlenen alleller, allel frekansları ve heterozigotluk değerleri Tablo 3.1 ve 3.2’de verilmiştir.

İncelenen ırklardan en fazla allelin Kıvırcık ırkında (36 allel), en az sayıda allelin ise Pırlak ırkında (19 allel) olduğu belirlenmiştir. Heterozigotluk değerleri incelendiğinde Morkaraman ırkının en az (% 71,4), Karayaka ırkının ise en fazla heterozigotluğa (% 93,8) sahip olduğu görülmektedir. Belirlenen 110 allelden 47’si

daha önce bildirilmemiştir ve yeni allel niteliğindedir. Yeni allellerin 3 tanesinin homozigot, geri kalanlarının ise heterozigot yapıda olduğu gözlenmiştir. Araştırmada incelen ırklarda Ovar-DRB1 ekzon 2 bölgesinin çok polimorfik olduğu görülmektedir. Bu bölgeye ait polimorfizmin bir bölümü Şekil 3.2’de ve yeni allellerin baz dizilimleri Ek’te verilmiştir.

Tablo 3.1. Irklara göre hayvan sayıları ve Ovar-DRB1 ekzon 2’deki allel sayıları ve heterozigotluklar

İrk	Akkaraman (N=18)	Karayaka (N=32)	Kıvırcık (N=29)	Morkaraman (N=28)	Pırlak (N=32)	Sakız (N=29)
Homozigot Yeni Allel				2		1
Heterozigot Yeni Allel	8	8	7	8	2	14
En Fazla Görülen Allel	1204	0702	1606	0803	0307 0402	1001
Görülme Sıklığı (%)	11.1	15.6	8.6	25	15.6	12.1
Toplam Allel	25	34	36	30	19	35
Beklenen Heterozigotluk (%)	94.6	93.9	96.1	91.5	90.8	95.2
Gözlenen Heterozigotluk (%)	88.9	93.8	82.8	71.4	71.9	86.2

Akkaraman ırkında belirlenen 25 farklı allelin 8’i heterozigot yapıdaki yeni allellerden oluşmaktadır. Yeni allellerden Ovar-DRB1*TR01 alleli Ovar-DRB1*1703 ve 1704 alleleline % 98.7, Ovar-DRB1*TR02 alleli Ovar-DRB1*1001 alleleline % 97.9, Ovar-DRB1*TR03 alleli Ovar-DRB1*0104 alleleline % 96.7, Ovar-DRB1*TR04 alleli Ovar-DRB1*0901 ve 0902 alleleline % 96.3, Ovar-DRB1*TR05 alleli Ovar-DRB1*2501 alleleline % 98.3, Ovar-DRB1*TR06 alleli Ovar-DRB1*1703 ve 1704 alleleline % 98.3, Ovar-DRB1*TR07 alleli Ovar-DRB1*0301 ve 0302 alleleline % 97.5 ve Ovar-DRB1*TR08 alleli Ovar-DRB1*1701 ve 1702 alleleline % 97.9 oranında benzemektedir. Akkaraman ırkında en fazla Ovar-DRB1*1204 alleli (0,111) bulunmuştur. Gözlenen heterozigotluk (H_{obs}) % 88.9 olarak hesaplanmıştır.

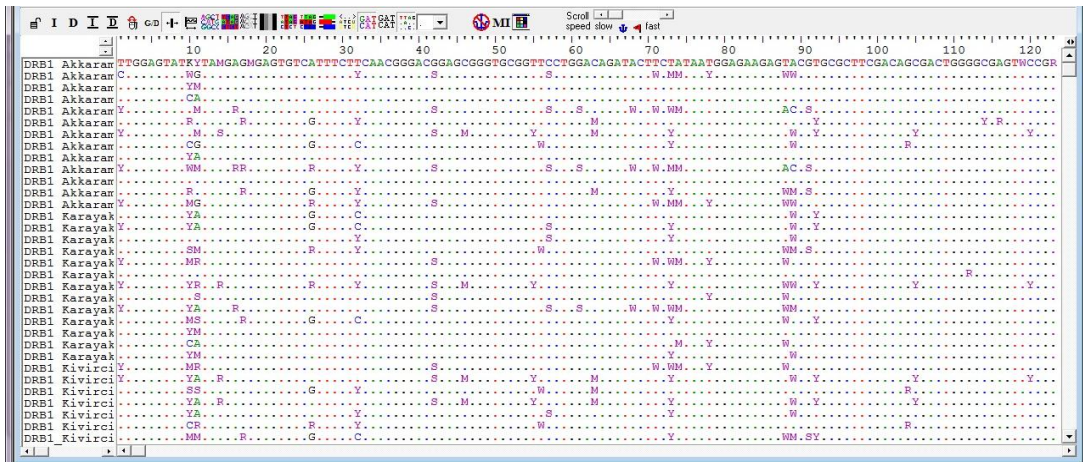
Karayaka ırkında belirlenen 34 farklı allelin 8'i heterozigot yapıdaki yeni allellerden oluşmaktadır. Bu yeni allellerden Ovar-DRB1*TR09 alleli Ovar-DRB1*0312 alleleline % 98.3, Ovar-DRB1*TR10 alleli Ovar-DRB1*2101 alleleline % 98.7, Ovar-DRB1*TR11 alleli Ovar-DRB1*0702 alleleline % 97.9, Ovar-DRB1*TR12 alleli Ovar-DRB1*1701 ve 1902 alleleline % 98.3, Ovar-DRB1*TR13 alleli Ovar-DRB1*1301 alleleline % 95.9, Ovar-DRB1*TR14 alleli Ovar-DRB1*1503 alleleline % 97.9, Ovar-DRB1*TR15 alleli Ovar-DRB1*1204 alleleline % 95.9 ve Ovar-DRB1*TR16 alleli Ovar-DRB1*1903 alleleline % 97.9 oranında benzemektedir. Karayaka ırkında en fazla Ovar-DRB1*0702 allelinin (0,156) olduğu belirlenmiştir. Gözlenen heterozigotluk % 93.8 olarak hesaplanmıştır.

Kıvırcık ırkında belirlenen 36 farklı allelin 7'si heterozigot yapıdaki yeni allellerden oluşmaktadır. Bu yeni allellerden Ovar-DRB1*TR17 alleli Ovar-DRB1*0803 ve Ovar-DRB1*1502 alleleline % 98.7, Ovar-DRB1*TR18 alleli Ovar-DRB1*1202, Ovar-DRB1*1204 ve Ovar-DRB1*0901 alleleline % 99.5, Ovar-DRB1*TR19 alleli Ovar-DRB1*2101 alleleline % 98.7, Ovar-DRB1*TR20 alleli Ovar-DRB1*0306 alleleline % 99.5, Ovar-DRB1*TR21 alleli Ovar-DRB1*1403 alleleline % 98.7, Ovar-DRB1*TR22 alleli Ovar-DRB1*160202 ve Ovar-DRB1*0402 allellerine % 98.3 ve Ovar-DRB1*TR23 alleli Ovar-DRB1*1606 alleleline % 98.7 oranında benzemektedir. Kıvırcık ırkında en fazla Ovar-DRB1*1606 alleleline (0,086) rastlanılmıştır. Gözlenen heterozigotluk değeri % 82.8 bulunmuştur.

Morkaraman ırkında tespit edilen 30 farklı allelin 2'ü homozigot ve 8'i ise heterozigot yapıdaki yeni allellerden oluşmaktadır. Bu allellerden Ovar-DRB1*TR24 alleli Ovar-DRB1*1901 alleleline % 98.7, Ovar-DRB1*TR25 alleli Ovar-DRB1*0101 alleleline % 97.9, Ovar-DRB1*TR26 alleli Ovar-DRB1*1903 alleleline % 99.2, Ovar-DRB1*TR27 alleli Ovar-DRB1*0310 alleleline % 98.7, Ovar-DRB1*TR28 alleli Ovar-DRB1*2001 ile Ovar-DRB1*2002 alleleline % 97.2, Ovar-DRB1*TR29 alleli Ovar-DRB1*0104 alleleline % 98, Ovar-DRB1*TR30 alleli Ovar-DRB1*1901 alleleline % 99.1 ve Ovar-DRB1*TR31 alleli Ovar-DRB1*2101 alleleline % 98.3 oranında benzemektedir. Morkaraman ırkında en fazla Ovar-DRB1*0803 alleli (0,250) bulunmuştur. Morkaraman ırkında % 71,4 heterozigotluk gözlenmiştir.

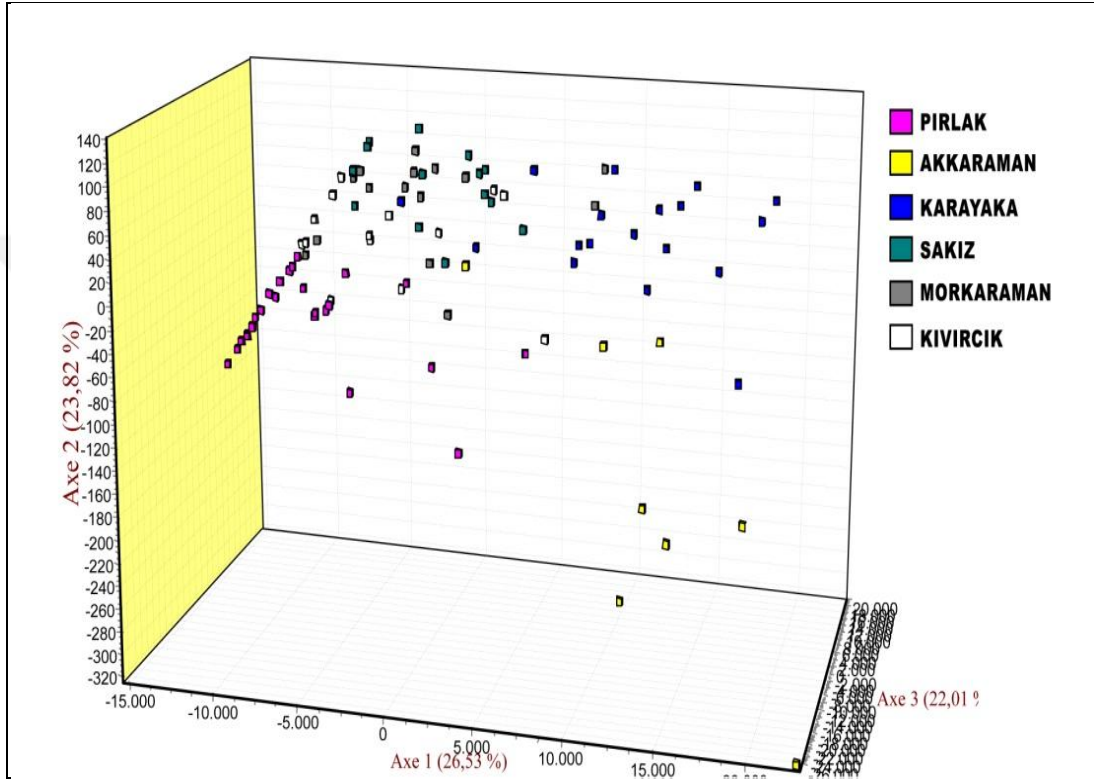
Pırlak ırkındaki toplam 19 farklı allelin 2'si heterozigot yapıdaki yeni allellerden oluşmaktadır. Bu yeni allellerden Ovar-DRB1*TR32 alleli Ovar-DRB1*0303 ve Ovar-DRB1*0702 alleleline % 94.4, Ovar-DRB1*TR33 alleli Ovar-DRB1*1702 ve Ovar-DRB1*1902 alleleline % 98.8 oranında benzemektedir. Pırlak ırkında en fazla Ovar-DRB1*0307 ve Ovar-DRB1*0402 allellerine (0,156) rastlanmıştır. Pırlaklarda gözlenen heterozigotluk % 71.9 olarak hesaplanmıştır.

Sakız ırkındaki toplam 35 farklı allelin 1'si homozigot ve 14'ü heterozigot yapıdaki yeni allellerden oluşmaktadır. Bu allellerden Ovar-DRB1*TR34 alleli Ovar-DRB1*1301 alleleline % 98.4, Ovar-DRB1*TR35 alleli Ovar-DRB1*0405 alleleline % 97.2, Ovar-DRB1*TR36 alleli Ovar-DRB1*0601 alleleline % 98.8, Ovar-DRB1*TR37 alleli Ovar-DRB1*0901 ve Ovar-DRB1*0902 allellerine % 98.4, Ovar-DRB1*TR38 alleli Ovar-DRB1*1201 alleleline % 97.2, Ovar-DRB1*TR39 alleli Ovar-DRB1*1301 alleleline % 98.8, Ovar-DRB1*TR40 alleli Ovar-DRB1*0101 alleleline % 98, Ovar-DRB1*TR41 alleli Ovar-DRB1*1903 alleleline % 98.4, Ovar-DRB1*TR42 alleli Ovar-DRB1*0101 alleleline % 98, Ovar-DRB1*TR43 alleli Ovar-DRB1*0803 ve Ovar-DRB1*1502 allellerine % 99.2, Ovar-DRB1*TR44 alleli Ovar-DRB1*1502 alleleline % 98, Ovar-DRB1*TR45 alleli Ovar-DRB1*2202 alleleline % 97.5, Ovar-DRB1*TR46 alleli Ovar-DRB1*0104 alleleline % 98, Ovar-DRB1*TR47 alleli Ovar-DRB1*0901 alleleline % 98 ve Ovar-DRB1*TR48 alleli Ovar-DRB1*0304 alleleline % 99.2 benzemektedir. Sakız ırkında en fazla Ovar-DRB1*1001 alleli (0,121) belirlenmiştir. Sakız ırkında % 86.2 heterozigotluk gözlenmiştir.



Şekil 3.2. Ovar-DRB1 ekzon 2’de tespit edilen polimorfik bölgeler

Araştırmada incelenen ırkların sahip oldukları allel frekansları ve allel yapıları ele alınarak yapılan üç boyutlu (3D) kümeleme analizinde Pırlak, Akkaraman ve Karayaka ırklarının grafiğin köşelerinde yer alırken; Morkaraman, Kıvırcık ve Sakız ırklarının ise nispeten grafiğin ortasında yerleştiği görölmektedir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Türkiye yerli koyun ırklarının Ovar-DRB1 ekzon 2 gen bölgesi bakımından genetik ilişkisini gösterir 3D grafik

Tablo 3.2. Türkiye yerli koyun ırklarındaki Ovar-DRB1 ekzon 2'deki allel frekansları ve heterozigotluklar

Allel	Akkaraman (N=18)	Karayaka (N=32)	Kıvırcık (N=29)	Morkaraman (N=28)	Pırlak (N=32)	Sakız (N=29)
	\bar{X}_i	\bar{X}_i	\bar{X}_i	\bar{X}_i	\bar{X}_i	\bar{X}_i
0101	0,028					
0103					0,031	
0104						0,017
0105				0,036	0,031	
0201			0,017		0,031	
0202					0,016	
0301			0,035			0,035
0303				0,036		
0304			0,035			
0305		0,031				
0306			0,017			
0307			0,017	0,018	0,156	
0309				0,018		
0311		0,031				
0312	0,056	0,031				
0401			0,017		0,078	
0402			0,069	0,018	0,156	
0403						0,017
0404			0,017	0,018		
0405		0,016		0,036		
0501			0,017			0,035
0601				0,036	0,031	0,035
0701		0,031			0,016	
0702	0,056	0,156		0,018		0,017
0801					0,016	0,017
0803	0,028	0,016	0,017	0,250		0,086
0804		0,047				
0901		0,016	0,035			
0902	0,028					
1001		0,016	0,017	0,054	0,031	0,121
1002		0,016				
1003		0,016				
1004		0,016	0,017	0,018	0,047	0,035
1005						0,017
1006			0,035			0,017
1008						0,017
1101						0,017
1102			0,017			0,017
1201		0,016				
1202	0,028		0,017	0,018		
1204	0,111					

Tablo 3.2. Devam

1301	0,028	0,125	0,069	0,036		0,052
1303			0,017			
1502			0,017			
1601			0,035	0,036		
1604			0,052		0,047	
1606		0,078	0,086		0,125	0,017
1607	0,028		0,052	0,018		0,069
1608	0,028	0,031	0,017	0,018		0,069
1703	0,028	0,031				0,017
1704	0,028	0,031				
1801				0,018		
1803			0,017	0,036		
1901		0,016	0,017	0,054		
1902	0,028	0,016			0,016	
2001	0,056	0,016	0,035			
2002		0,016	0,017		0,047	
2003				0,018		
2101	0,028	0,016				
2401	0,056					
2601	0,111	0,031		0,018	0,094	0,017
1201:02		0,016				
1602:02			0,017			
TR1	0,028					
TR2	0,028					
TR3	0,028					
TR4	0,028					
TR5	0,056					
TR6	0,028					
TR7	0,028					
TR8	0,028					
TR9		0,016				
TR10		0,016				
TR11		0,016				
TR12		0,016				
TR13		0,016				
TR14		0,016				
TR15		0,016				
TR16		0,016				
TR17			0,052			
TR18			0,017			
TR19			0,017			
TR20			0,017			
TR21			0,017			
TR22			0,017			
TR23			0,017			

Tablo 3.2. Devam

TR24				0,018		
TR25				0,036		
TR26				0,036		
TR27				0,018		
TR28				0,018		
TR29				0,018		
TR30				0,018		
TR31				0,018		
TR32					0,016	
TR33					0,016	
TR34						0,017
TR35						0,017
TR36						0,017
TR37						0,017
TR38						0,017
TR39						0,017
TR40						0,035
TR41						0,017
TR42						0,017
TR43						0,017
TR44						0,017
TR45						0,017
TR46						0,017
TR47						0,017
H_{exp}	0,946	0,939	0,961	0,915	0,908	0,952
H_{obs}	0,889	0,938	0,828	0,714	0,719	0,862

4. TARTIŞMA

MHC molekülü, invaziv patojenlere karşı immün tepkileri ortaya çıkarmak için antijen sunumunda önemli bir rol oynamaktadır. Hayvanlarda, hastalık direnci ve immün yanıt arasındaki ilişki MHC'deki polimorfizmlerle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Koyunlarda MHC genlerindeki polimorfizmleri ve bu polimorfizmler ile enfeksiyöz hastalıklara karşı direncin belirlenmesine yönelik çok sayıda moleküler genetik araştırma bulunmaktadır

Hastalıklara direnç ve MHC arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için yapılan çalışmalarda gastointestinal nemotodlara direncin DRB1 geniyle (Buitkamp ve ark., 1994; Schwaiger ve ark., 1995; Charon ve ark., 2002; Sayers ve ark., 2005; Stear ve ark., 2005), bakterilere karşı direncin DQA1, DQA2, DQB, DRA ve DRB1 genleriyle (Litchfield ve ark., 1993; Escayg ve ark., 1997) ve viruslara direncin ise daha çok DRB1 geniyle (Yoshiko ve ark., 1999; Aida 2001; Konnai ve ark., 2003b) ilişkisi olduğu belirlenmiştir. . Bu araştırma, Türkiye yerli koyun ırklarında Ovar-DRB1 gen bölgesindeki polimorfizmleri ortaya koymak amacıyla yapılmıştır.

Koyunların Ovar-DRB1 gen bölgesinde Karrantzar ve Latxa koyunlarında 6 allel (Jugo ve Vicario, 2000), Suffolk, Corriedale ve Cheviot ırkı koyunlarda 35 allel (Konnai ve ark., 2003), Latxa koyun ırkında 8 yeni allel (Arrieta-Aguirre ve ark. 2006), koyunlarda 9 yeni allel (Ballingall ve ark. (2008), İran Shaul koyunlarında 10 allel (Brujeni ve ark. (2009) ve Çin merinosu, Kazak ve Duolang koyunlarında 14 allel (Li ve ark., 2010 ve 2011) bildirilmiştir. Bu çalışmada, 6 farklı Türkiye yerli koyun ırklarında daha önce bildirilmemiş 47 yeni allel olmak üzere toplam 110 allel belirlenmiştir. Araştırmada hem yeni allel hem de toplam allel sayısının fazla bulunması Türkiye'de farklı coğrafi bölgelerde yetiştirilen koyun ırklarının farklı hastalık etkenlerine ve çevre koşullarına maruz kalmasının bir sonucu olduğunu düşündürmektedir.

Jugo ve Vicario (2000) Karrantzar ve Latxa koyunlarında DRB1*0702 allel frekansını yüksek bulmuşlardır. Hermann-Hoesing ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada Kolombiya, Rambouillet ve Polypay ırklarında DRB1*07012 veya DRB*0403 allellerine sahip hayvanlarda provirüs seviyesinin düşük olduğunu ve bu allellerin % 11 seviyesinde olduğunu bildirmişlerdir. Konnai ve ark. (2003a) Suffolk ırkında Ovar-DRB1*0702 allelinin (% 23.9), Cheviot ırkında Ovar-DRB1*0203 allelinin (% 27.5) ve Corriedale ırkında ise Ovar-DRB1*0201 allelin frekansının (% 25) yüksek olduğunu ifade etmişlerdir. Ballingall ve ark. (2008) Ovar-DRB1*0302 ve Ovar-DRB1*0401 allellerinin koyun ırkının evrimleşmesini anlamada önemli bilgiler sağladığını bildirmişlerdir. Türkiye yerli koyun ırklarından Akkaraman ırkında Ovar-DRB1*1204 alleli (0,111), Karayaka ırkında Ovar-DRB1*0702 alleli (0,156), Kıvırcık ırkında Ovar-DRB1*1606 alleli (0,086), Morkaraman ırkında Ovar-DRB1*0803 alleli (0,250), Pırlak ırkında Ovar-DRB1*0307 ve Ovar-DRB1*0402 allelleri (0,156) ve Sakız ırkında ise DRB1*1001 alleli (0,121) en fazla sıklıkta olduğu gözlenmiştir.

Gutierrez-Espeleta ve ark. (2000) yaptıkları araştırmada Kanada koyununda antijen bağlanma bölgesi olan 16 aminoasit pozisyonu için ortalama heterozigotluğu % 38.9 olarak tahmin etmişlerdir. Soay koyunlarında % 79.6 (Paterson ve ark., 1998), Latxa koyunlarında heterozigotluk % 91 – 95 (Arrieta-Aguirre ve ark., 2006) Kanada ve Amerika Birleşik Devletlerinde yaşayan yaban koyunlarında (*Ovis dalli*) % 31.1 (Worley ve ark, 2006) ve Iranian Makuie koyunlarında % 56.1 (Ashrafi ve ark., 2014) olarak hesaplanmıştır. Bu araştırmada, Türkiye yerli koyun ırklarında gözlenen heterozigotluk değerleri % 71.4 – 93.8 arasında bulunmuştur. İncelenen ırklarda sadece 6 allelin homozigot yapıda olduğu görülmektedir. MHC gen bölgesinde polimorfizmin ve heterozigotluğun yüksek olması paraziter ve bakteriyel direnç için bir avantaj olarak ifade edilmektedir (Stear ve ark., 2005). Türkiye yerli koyun ırklarında hem heterozigotluğun hem de allel sayısının fazla olması paraziter ve bakteriyel dirençlerin bu ırklarda kültür ırklarına oranla yüksek olabileceğini düşündürmektedir.

Araştırmada incelenen ırkların üç boyutlu (3D) kümeleme analizinde Pırlak, Akkaraman ve Karayaka ırklarının grafiğin köşelerinde yer alırken, Morkaraman, Kıvırcık ve Sakız ırklarının ise nispeten grafiğin ortasında yerleştiği görölmektedir. Bu sonuçlar Morkaraman, Kıvırcık ve Sakız ırklarındaki allel dağılımlarının benzer yapıda olmasından kaynaklanabilir.



5. SONUÇ

Ovar-DRB1 gen lokusu, Büyük Doku Uyum Kompleksinin (Ovar-MHC) en polimorfik genlerinden biridir ve antijen sunumunda fonksiyonel bir rol oynamaktadır. Hastalıklara karşı direnç ve immün yanıt oluşturmada etkili olduğu tespit edilmiştir. Son dönemlerde artan hastalıklardan kaynaklanan morfolojik ya da fizyolojik bozukluklar, hayvanlarda verim kaybına neden olmakta bu da ekonomik kayıp anlamına gelmektedir. Hayvanların hastalanmasından sonra alınan tedbirler zaman kaybı ve masrafa yol açacağından, hayvanların genetik olarak bağışıklık sistemlerinin gelişmiş olması ve hastalıklara karşı genetik direncinin yüksek olması istenmektedir. Bu nedenle, Ovar-DRB1 geninin aday gen olabileceği belirtilmektedir. Araştırmada incelenen ırklarda bazı alleller ortak iken, bazı alleller sadece belirli ırklarda bulunmuştur. Bu durum, ırkların yetiştirildikleri bölgedeki hastalıklara dirençlerinin bir göstergesi olabilir.

Sonuç olarak, Türkiye yerli koyun ırklarında Ovar-DRB1 gen lokusunda belirlenen çok sayıda allel ve yüksek heterozigotluk bu ırkların paraziter ve bakteriyel dirençlerinin kültür ırklarına oranla daha fazla olabileceğinin bir göstergesi olabilir. Farklı ülkelerde yetiştirilen koyun ırklarında belirlenmemiş, fakat Türkiye yerli koyun ırklarında farklı allellerin bulunması bu ırkların yetiştirildikleri bölgedeki hastalıklara direnç sağladığının göstergesi olabilir. İncelenen ırklarda Ovar-DRB1 lokusunda heterozigotluğun ve allel sayısının yüksek olması hastalıklara direnç açısından yerli koyun ırklarının daha detaylı araştırılmasını gerektirmektedir. Bu nedenle, Türkiye yerli koyun ırklarında MHC gen bölgesindeki diğer lokuslardaki polimorfizmlerin araştırılmasına, hastalıklara direnç ve MHC gen bölgesindeki polimorfizmler arasındaki ilişkiyi belirlemeye yönelik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca, MHC gen bölgesindeki SNP veya haplotipler ile hastalıklara direnç arasında kurulacak bir ilişki seleksiyon çalışmalarında da başarıyla kullanılabilir.

ÖZET

Türkiye Yerli Koyun Irklarında Ovar-DRB1 Ekzon 2'deki Moleküler Polimorfizm

Ovar-DRB1 gen lokusu, Büyük Doku Uyum Kompleksinin (Ovar-MHC) en polimorfik genlerinden biridir ve antijen sunumunda fonksiyonel bir rol oynamaktadır. Günümüzde birçok çalışma, OLA (ovine lenfosit antijeni) DRB1 geninin bazı koyun hastalıkları ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu araştırma, Türkiye'de farklı bölgelerde yetiştirilen yerli koyun ırklarından 32 baş Pırlak, 18 baş Akkaraman, 28 baş Morkaraman, 32 baş Karayaka, 29 baş Kıvırcık ve 29 baş Sakız koyununa ait toplam 168 kan örneği kullanılarak hastalıklara karşı direnç ve immün yanıt oluşturmada etkili olan Ovar-DRB1 Ekzon 2 gen bölgesinin moleküler polimorfizmi saptanmaya çalışılmıştır.

Yapılan çalışmada bulunan çok sayıda allel ve yüksek heterozigotluk seviyeleri göz önüne alındığında, Ovar-DRB1 lokusunun önemli miktarda genetik varyasyon içerdiği bulunmuştur. Koyun yetiştiriciliğinde, hastalıklarla mücadele kapsamında Ovar-DRB1 lokusu ile hastalıklara direnç arasındaki ilişkileri belirlemeye yönelik çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Koyun, DRB1, Ekson 2, Polimorfizm

SUMMARY

Molecular Polymorphism in Exon 2 of Ovar-DRB1 Gene in Native Turkish Sheep Breeds

The Ovar-DRB1 gene locus is one of the most polymorphic genes in the Ovis aries Major Histocompatibility Complex (Ovar-MHC) and plays a functional role in antigen presentation. Many studies have shown that the OLA (ovine lymphocyte antigen) DRB1 gene is associated with some sheep diseases. In this study, the native sheep breeds reared in different regions in Turkey, 32 Pırlak, 18 Akkaraman, 28 Morkaraman, 32 Karayaka, 29 Kıvırcık and 29 Sakız sheep breeds, totally 168 blood samples were used. In this study, molecular polymorphism of Ovar-DRB1 exon 2 gene region, effective in resistance against diseases and generate immune response, was tried to be determined.

Given the large number of alleles and high levels of heterozygosity found in the study, the Ovar-DRB1 locus has proven to contain significant genetic variation. In sheep farming, similar studies have to be done in order to reduce the economic losses in the scope of the fight against diseases.

Key Words: Sheep, DRB1, Exon 2, Polymorphism

KAYNAKLAR

- ABBAS A.K., LICHTMAN A.H., PILLAI S. (2011). Cellular And Molecular Immunology, Elsevier, 7th edition. Philadelphia, USA.
- AIDA Y. (2001). "Influence of host genetic differences on leukemogenesis-induced bovine leukemia virus." AIDS Research and Human Retroviruses 17: 12.
- AKÇAPINAR H. (2000). Koyun Yetiştiriciliği. İsmat Maatbacılık-Ankara.
- AKÇAPINAR H. (1994). Koyun Yetiştiriciliği. İsmat Maatbacılık-Ankara.
- AMILLS M., RAMIYA V., NORIMINE J., LEWIN H. A. (1998). "The major histocompatibility complex of ruminants." Rev Sci Tech. 17 (1): 108-20.
- ANDERSSON L. (1996). "Major histocompatibility complex evolution. In: The Major Histocompatibility Complex of Domestic Animal Species" Ed. L.B. Schook and S.J. Lamont, CRC Press, Boca Raton. Sy. 1-15.
- ANDERSSON L., LUNDEN A., SIGURDARDOTTIR S., DAVIES CJ., RASK L. (1988). "Linkage relationships in the bovine MHC region. High recombination frequency between class II subregions". Immunogenetics 27, 273-280.
- ARRIETA-AGUIRRE I., GARCIA-ETXEBARRIA K., JUGO B.M. (2006). Optimization of the MHC Ovar-DRB1 gene typing. Tissue Antigens 67: 222-228.
- ASHRAFI F., MARDANI K., HASHEMI A., DARVISHZADEH R., FARHADIAN M. (2014). Association of molecular polymorphism in exon 2 of Ovar-DRB1 gene with weight traits in Iranian Makuie sheep breed. Turk J Vet Anim Sci 38, 126-132.
- BALLINGALL K.T., FARDOE K., MCKEEVER D.J. (2008). Genomic organisation and allelic diversity within coding and non-coding regions of the Ovar-DRB1 locus. Immunogenetics. 60(2): 95-103.
- BREMDAL K.B. (2010). Evolution of MHC Genes And MHC Gene Expression. Uppsala University. Uppsala, Sweden.
- BRUJENI G.H.N., EMAM M., MAHMOUDZADEH H., HAMEDMONFARED E., TALEBNIA JAHROMI R., REZAEI H. (2009). Typing of Ovar-DRB1 second exon with PCR-RFLP technique in Iranian Shaul Sheep, Iranian Journal of Veterinary Research, 10(3) 28: 250-254.

- BUITKAMP J., GOSTOMSKI D., SCHWAIGER F.W., STEAR M.J., EPPLER J.T. (1994). "Association between the ovine major histocompatibility complex DRB1 gene and resistance to *Ostertagia circumcincta* infestation". *Animal Genetics* 25: 59–60.
- CAMPBELL R.D., CARROLL M.C. AND PORTER R.R. (1986). The molecular genetics of components of complement. *Adv. Immunol.* 38: 203-244.
- CHARON K.M., MOSKWA B., RUTKOWSKI R., GRUSZCZYNSKA J., SWIDEREK W. (2002). "Microsatellite polymorphism in DRB1 gene (MHC class II) and its relation to nematode faecal egg count in Polish Heath sheep". *Journal of Animal and Feed Sciences* 11: 47–58.
- CHICZ R.M., URBAN R.G., LANE W.S., GORGA J.C., STERN L.J., VIGNALI D.A., STROMINGER J.L. (1992). Predominant naturally processed peptides bound to HLADR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature*, 358(6389): 764-8.
- COSTA G., DARIO P., LUCAS I., RIBEIRO T., ESPINHEIRA R., GEADA H. (2008). Autosomal SNPs in paternity investigation. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 1: 507– 509.
- DALVA K. (2004). Her Yerde Karsında; Nedir Bu HLA Tiplendirimi. XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi, IV. Hematoloji İlk Basamak Kursu Antalya.
- DAVIES C.J., ANDERSSON L., ELLIS S.A., HENSEN E.J., LEWIN H.A., MIKKO S., MUGGLI-COCKETT N.E., VAN DER POEL J.J., RUSSELL G.C. (1997). Nomenclature for factors of the BoLA system, 1996. Report of the ISAG BoLA Nomenclature Committee. *Anim. Genet.* 28: 159-168.
- DELVES P.J., MARTIN S.J., BURTON D.R., ROITT I.M. (2011). *Membrane Receptors For Antigen. Roitt's Essential Immunology*, Wiley-Blackwell Science. 12th Edition; Sy 79-112.
- DUKKIPATI VSR., BLAIR HT., GARRICK D.J. AND MURRAY A. (2006). 'Ovar-Mhc'-Ovine major histocompatibility complex: role in genetic resistance to diseases. *N. Z. Vet. J.* 54: 153-160.
- ESCAYG A.P., HICKFORD J.G.H., BULLOCK D.W. (1997). "Association between alleles of the ovine major histocompatibility complex and resistance to footrot", *Research in Veterinary Science* 63: 283–287.
- FELSBURG P.J., SOMBERG R.L., HARTNETT B.J., HENTHORN P.S., CARDING S.R. (1998). Canine X-linked severe combined immunodeficiency. A model for investigating the requirement for the common gamma chain (gamma c) in human lymphocyte development and function. *Immunol Res.*, 17(1-2): 63-73.
- GÖRÜROĞLU ÖZTÜRK Ö. (2011). Büyük Doku Uyuşum Kompleksi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, ADANA. sy 159.

- GROSSEN C., KELLER L., BIEBACH I., CROLL D. (2014). “Introgression from Domestic Goat Generated Variation at the Major Histocompatibility Complex of Alpine Ibex”, *PLOS Genetics* 10 (6): 1-16.
- GUTIERREZ-ESPELETA G.A., KALINOWSKI S.T., BOYCE W.M., HEDRICK P.W. (2000). Genetic variation and population structure in desert bighorn sheep: implications for conservation. *Conservation Genetics* 1: 3–15.
- GÜLMEZOĞLU E., ERGÜVEN S. (1994). Doku Uygunluk Antijenleri. *İmmünoloji. Hacettepe-Taş Kitapçılık, Ankara., Sy.29-39.*
- GÜNEY SARUHAN B., TOPALOĞLU U., AKBALIK M.E., KETANI M.A., SAĞSÖZ H. (2016). Erişkin Boğa ve Koç Duktus deferensinde MHC Sınıf II Antijenlerinin Dağılımı. *Dicle Üniv Vet Fak Derg.,* 1(7): 42-47.
- HALL T.A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Series.* 41: 95-98.
- HAYGEM, (2018). T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Hayvancılık Genel Müdürlüğü. Erişim:[<https://www.tarimorman.gov.tr/HAYGEM/Menu/7/Koyun> Yetistiriciligi] Son erişim tarihi: 04/04/2019.
- TÜİK, (2018). Türkiye İstatistik Kurumu Hayvancılık İstatistikleri. Erişim: [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1002] Son erişim tarihi: 04/04/2019.
- HERRMANN-HOESING L.M., WHITE S.N., MOUSEL M.R., LEWIS G.S., KNOWLES D.P. (2008). Ovine progressive pneumonia provirus levels associate with breed and Ovar-DRB. *Immunogenetics* 60: 749-758.
- HOWARD J.C. (1995). Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules. *Curr Opin Immunol.,* 7(1): 69-76.
- HUGHES A.L., YEAGER M. (1998). Natural selection and the evolutionary history of major histocompatibility complex loci. *Front Biosci* 3: 509–516.
- JANEWAY C.A.JR. (2001). How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect.,* 3(13): 1167-71.
- JUGO B.M., VICARIO A. (2000). Single-Strand Conformational Polymorphism and Sequence Polymorphism of MHC-DRB in Latxa and Karrantzar Sheep: Implications for Caprinae Phylogeny. *Immunogenetics,* 51: 887-897.
- JUGO B.M., VICARIO A. (2001). “Lymphocyte antigens in sheep: linkage to the MHC class II DRB1 gene”, *European Journal of Immunogenetics* 28: 451–458.
- KALENDAR R., LEE D., SCHULMAN A.H. (2009). FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. *Genes, Genomes and Genomics,* 3(1): 1-14.

- KAYMAKÇI M., SÖNMEZ R. (1996). İleri Koyun Yetiştiriciliği. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova-İzmir.
- KIRIKÇI K., ZAMANİ A., DURAKBAŞI G. (2003). Konya yaban koyununun (*Ovis orientalis* Spp.) kromozomları üzerinde bir çalışma. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 27: 281-283.
- KLEIN J., SATO A., (2000). The HLA system. First of two parts. *N. Engl J. Med.*, 343(10): 702-709.
- KLEIN J., SATTA Y., O'HUIGIN C., TAKAHATA N. (1993). "The molecular descent of the major histocompatibility complex. *Annual Review of Immunology*", 11: 269–295.
- KONNAI S., NAGAOKA Y., TAKESIMA S., ONUMA M., AIDA Y. (2003a). Sequences and diversity of 17 new Ovar-DRB1 alleles from three breeds of sheep, *European Journal of Immunogenetics*, 30(4): 275-282.
- KONNAI S., TAKESIMA S., TAJIMA S., YIN S.A., OKADA K., ONUMA M., AIDA Y. (2003b). "The influence of ovine MHC class II DRB1 alleles on immune response in bovine leukemia virus infection", *Microbiology and Immunology* 47: 223–232.
- KRUGLYAK L., NICKERSON D.A. (2001). Variation is the spice of life, *Nature Genetics*, 27(3): 234-236.
- LAMONT S.J. (1989). "The Chicken Major Histocompatibility Complex in Disease Resistance and Poultry Breeding", *Journal of Dairy Science* 72: 1328-1333
- LI R.Y., JIA B., ZHANG W.J., ZHAO Z.S., SHI G.Q., SHEN H., PENG Q., LV L.M., ZHOU Q.W., DU Y.C. (2010). Analysis of the Relationship between MHC-DRB1 gene polymorphism and hydatidosis in Kazakh sheep. *Asian-Austral Journal of Animal Science*, 23(9): 1145–1151.
- LI R.Y., HUI W.Q., JIA B., SHI G.Q., ZHAO Z.S., SHEN H., PENG Q., LV L.M., ZHOU Q.W., LI H.T. (2011). The relationship between MHC-DRB1 gene second exon polymorphism and hydatidosis resistance of Chinese merino (Sinking Junken type), Kazakh and Duolang sheep. *Parasite*. 18: 163-169.
- LITCHFIELD A.M., RAADSMA H.W., HULME D.J., BROWN S.C., NICHOLAS F.W., EGERTON J.R. (1993). "Disease resistance in Merino sheep. II. RFLPs in class II MHC and their association with resistance to footrot". *Journal of Animal Breeding and Genetics* 110: 321–334.
- MAHDY E.A., MÄKINEN A., CHOWDHARY B.P., ANDERSSON L., GUSTAVSSON I. (1989). "Chromosomal localization of the ovine major histocompatibility complex (OLA) by in situ hybridization". *Hereditas*. 111(1): 87-90.

- NAGAOKA Y., KABEYA H., ONUMA M., KASAI N., OKADA K., AIDA Y. (1999). Ovine MHC class II DRB1 alleles associated with resistance or susceptibility to development of bovine leukemia virus-induced ovine lymphoma. *Cancer Research* 59(4): 975-81.
- NAGATA T., HIGASHI T., AOSHI T., SUZUKI M., UCHIJIMA M., KOIDE Y. (2001). Immunization with plasmid DNA encoding MHC class II binding peptide/CLIP-replaced invariant chain (Ii) induces specific helper T cells in vivo: the assessment of Ii p31 and p41 isoforms as vehicles for immunization. *Vaccine*, 20(1-2): 105-14.
- PARISET L., MARIOTTI M., GARGANI M., JOOST S., NEGRINI R., PEREZ T., BRUFORD M., MARSAN P.A. AND VALENTINI A. (2011). Genetic Diversity of Sheep Breeds from Albania, Greece, and Italy Assessed by Mitochondrial DNA and Nuclear Polymorphisms (SNPs). *The Scientific World Journal*, 11: 1641-1659.
- PASWAN C., PRINCE L.L.L., KUMAR R., SWARNKAR C.P., SINGH D. AND KUMAR S. (2016). Molecular characterization of Ovar-DRB1 exon2 gene in Garole sheep resilient to gastrointestinal nematodes. *Indian Journal of Animal Research*, 50(2): 143-147.
- PATERSON S., WILSON K., PEMBERTON J. M. (1998). Major histocompatibility complex variation associated with juvenile survival and parasite resistance in a large unmanaged ungulate population (*Ovis aries* L.). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 3714–3719.
- PROSS S. (2007). Major Histocompatibility Complex. *Compr. Pharmacol Ref.* 1-7.
- REZAEI H.R, NADERI S., CHINTAUAN-MARQUIER I.C., TABERLET P., VIRK A.T., NAGHASH H.R. (2010). Evolution and taxonomy of the wild species of the genus *Ovis* (Mammalia, Artiodactyla, Bovidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54: 315–326.
- RYDER M.L. (1984). Sheep. In: Mason, I.L., Ed., *Evolution of Domesticated Animals*. Longman, New York, Sy.63- 84.
- SHACKLETON D. M. (1997). *Wild Sheep and Goats and Their Relatives, Status Survey and Conservation Action Plan for Caprinae*. IUCN, Gland, Switzerland.
- SHEN H., HAN G., JIA B., JIANG S., DU Y. (2014). MHC-DRB1/DQB1 gene polymorphism and its association with resistance/susceptibility to cystic echinococcosis in Chinese Merino sheep. *Journal of Parasitology Research*, 272601: 7.
- SAYERS G., GOOD B., HANRAHAN JP., RYAN M., ANGLERES JM., SWEENEY T. (2005). “Major histocompatibility complex DRB1 gene: its role in nematode resistance in Suffolk and Texel sheep breeds”. *Parasitology* 131: 403–409.

- SCHULZE M.S., WUCHERPFENNIG K.W. (2012). The mechanism of HLA-DM induced peptide exchange in the MHC class II antigen presentation pathway. *Curr Opin Immunol.* 24: 105-11.
- SCHWAIGER F.W., GOSTOMSKI D., STEAR M.J., DUNCAN J.L., MCKELLAR Q.A., EPPLEN J.T., BUITKAMP J. (1995). "An ovine major histocompatibility complex DRB1 allele is associated with low faecal egg counts following natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection". *International Journal for Parasitology* 25: 815–822.
- STEAR M.J., BAIRDEN K., BISHOP S.C., BUITKAMP J., EPPLEN J.T., GOSTOMSKI D., MCKELLAR A., SCHWAIGER F.W., WALLACE D.S. (1996). "An ovine lymphocyte antigen is associated with reduced faecal egg counts in four-month-old lambs following natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection". *International Journal for Parasitology* 26: 423–428
- STEAR M.J., INNOCENT G.T., BUITKAMP J. (2005). "The evolution and maintenance of polymorphism in the major histocompatibility complex". *Veterinary Immunology and Immunopathology* 108: 53–57.
- STEMME S., FAGER G., HANSSON G.K. (1990). MHC class II antigen expression in human vascular smooth muscle cells is induced by interferon- gamma and modulated by tumour necrosis factor and lymphotoxin. *Immunology*, 69(2): 243-249.
- TODD JA, ACHA-ORBEA H, BELL JI, CHAO N, FRONEK Z, JACOB CO ET AL. (1988). A molecular basis for MHC class II--associated autoimmunity. *Science*, 240 (4855): 1003-1009.
- TROWSDALE J. (2011). The MHC, disease and selection. *Immunol Lett.*, 137: 1-8.
- TÜİK, (2018). Türkiye İstatistik Kurumu Hayvancılık İstatistikleri. Erişim: [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1002] Son erişim tarihi: 04/04/2019.
- TAGEM, (2009). Tarım ve Köyşleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü. Türkiye Evcil Hayvan Genetik Kaynakları, Ankara.
- TİGEM, (2017). Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü. 2017 Hayvancılık sektörü raporu, Ankara.
- VAN EIJK M.J.T., BEEVER J.E., DA Y., STEWART J.A., NICHOLAIDES G.E., GREEN C.A., LEWIN H.A. (1995): "Genetic mapping of BoLA-A, CYP21, DRB3, DYA and PRL on BTA23". *Mammalian Genome* 6: 151–152
- VAN KAER L. (2002). Major histocompatibility complex class I-restricted antigen processing and presentation. *Tissue Antigens.* 60(1): 1-9.
- WAGNER J.L. (2003). Molecular organization of the canine major histocompatibility complex. *J Hered.*, 94(1): 23-26.

WORLEY K., CAREY J., VEITCH A., COLTMAN D.W. (2006). Detecting the signature of selection on immune genes in highly structured populations of wild sheep (*Ovis dalli*). *Molecular Ecology* 15: 623–637.

YALÇIN B. (2013). Major doku uygunluk kompleksi (MHC) molekülleri: genel özellikleri ve hastalıklarla ilişkisi. *Türkderm*, 47(Özel Sayı 1): 12-17.

YOSHIKO N., KABEYA H., ONUMA M., KASAI N., OKADA K., AIDA Y. (1999). “Ovine MHC class II DRB1 alleles associated with resistance or susceptibility to development of bovine leukemia virus-induced ovine lymphoma”. *Cancer Research* 59: 975– 981.

ZEDER M.A. (2008). Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Orgins, diffusion and impact. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105 (33): 11597-1160.



ÖZGEÇMİŞ

1985 Balıkesir’de doğmuşum. İlköğretim, ortaöğretim ve lise öğrenimini Edirne’de tamamladım. 2011 yılında Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden mezun oldu ve 2012 yılında Manisa Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumunda (TKDK) göreve başladı. Evli ve 2 çocuk babasıdır.



EK:

TR01

TTGGAGTATTCTACGAGCGAGTGTCATTTCTCAACGGGACGGAGCGGGTGCGGTTCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTACGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTACCGAGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CGGAGCGCCGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACCTCCTGGAGCGGGCGCGGGCCGCCGTGGACACGTACTG
CAGACACAACACTACGGGGTCATTGAGAGTTTCACT

TR02

TTGGAGTATTCTACGAGCGAGTGTCATTTCTCAACGGGACGGAGCGGGTGCGGTTCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGACCCTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTACCGAGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CCGGACGCCAAGTACTGGAACAGCCAGAAGGAGATCCTGGAGCGGAGGCGGACCGAGGTGGACACGTACTG
CAGACACAACACTACGGGGTCATTGAGAGTTTCACT

TR03

TTGGAGTATACTAAGAAAGAGTGTCGTTTCTCAACGGGACGGAGCGGGTGCGGTTCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTACGCGCGCTTCGACAGCGACTGGGGTGGGTTCCGGGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CCGGACGCCAATACTGGAACAGCCAGAAGGAGCTCCTGGAGCGGGCGCGGGCCGCCGTGGACACGTACTG
CAGACACAACACTACGGGGTCGTTGAGAGTTTCACT

TR04

CTGGAGTATTATAGGAGCGAGTGTCATTTCTCAACGGGACCGAGAGGGTGCGGCTCTGGAAAGATACTTCC
ATAATGGAGAAGAGTTCGCGCGCTTCGACAGTACTGGGGCGAGTTTCGGGCAGTGACCGAGCTGGGGAGG
CCGACCGCTGAGCAATGGAACAGCCAGAAGAACATCCTGGAGCAGAAGCGGGCCGAGGTGGACACGTACTG
CAGACACAACACTACGGGGTCTTTGAGAGTTTCACT

TR05

TTGGAGTATCGTAAGAGCGAGTGTCGTTTCTCAACGGGACGGAGCGGGTGCGGTTCTGGACAGATACTTCC
ATAATGGAGAAGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTACCGAGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CCGGACGCCAAGTACTGGAACAGCCAGAAGGAGCTCCTGGAGCGGAGGCGGACCGAGGTGGACACGTACTG
CAGACACAACACTACGGGGTCTTTGAGAGTTTCACT

TR06

TTGGAGTATTATACGAGCGAGTGTCATTTCTCAACGGGACGGAGCGGGTGCGGTTCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTACGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTACCGAGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CGGAGCGCCGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACCTCCTGGAGCGGGCGCGGGCCGCCGTGGACACGTACTG
CAGACACAACACTACGGGGTCATTGAGAGTTTCACT

TR07

TTGGAGTATACTAAGAAAGAGTGTCGTTTCTCAACGGGACGGAGCGGGTGCGGTTCTGGACAGATACTTCC
ATAATGGAGAAGAGACCCTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTACCGAGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CCGGACGCCAAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACTTCTGGAGCGGAGGCGGACCGAGGTGGACACGTACTG
CAGACACAACACTACGGGGTCATTGAGAGTTTCACT

TR08

TTGGAGTATCATAAGAGAGAGTGTCAATTTCTCAACGGGACGGAGCGGGTTCGGTTCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTACGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CGGAGCGCCAAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACTTCTGGAGCGGGCGGGCCGCCGTGGACACGTA
CAGACACAACACTACGGGGTTCGGTGAGAGTTTCAGT

TR09

TTGGAGTATTATAAGAGCGAGTGTCTTTCTCAACGGGACGGAGCGGGTTCGGTTCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTACCGAGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CGGAGCGCCGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGAGCTCCTGGAGCGGAGGCGGACCGAGGTGGACACGTA
CAGACACAACACTACGGGGTTCGGTGAGAGTTTCAGT

TR10

CTGGAGTATTATAACGAGCGAGTGTCTTTCTCAACGGGACGGAGCGGGTTCGGTTGCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CCGGACGCCGAGTATTGGAACAGCCAGAAGGACTTCTGGAGAGCAGGAGGACCGCGGTGGACACGTA
CAGACACAACACTACGGGGTTCATTGAGAGTTTCAGT

TR11

TTGGAGTATCATAAGAGCGAGTGTCAATTTCTCAACGGGACGGAGCGGGTTCGGTTCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTACGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CCGGACGACAAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACTTCTGGAGAGCAGGAGGACCGCGGTGGAAACGTA
CAGACACAACACTACGGGGTCTTTGAGAGTTTCAGT

TR12

TTGGAGTATGCTACGAGCGAGTGTCAATTTCTCAACGGGACGGAGCGGGTTCGGTTCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTACGTGCGCTTCGACAGCGACTGGAGCGAGTTCCGGGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CGGAGCGCCGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACTTCTGGAGCGGGCGGGCCGCCGTGGACACGTA
CAGACACAACACTACGGGGTTCATTGAGAGTTTCAGT

TR13

TTGGAGTATTGTAAGAGCGAGTGTCAATTTCTCAACGGGACCGAGCGGGTTCGGTTCTGGACAGATACTTCT
ATAACGGAGAAGAGAACGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGACCGAGCTGGGGCGG
CCGGACGCTAAGCAATGGAACAGCCAGAAGGAGATCCTGGAGAGCAGGAGGACCGAGGTGGACACGTA
CAGACACAACACTACGGGGTCTTTGAGAGTTTCAGT

TR14

TTGGAGTATCATAAGAGCGAGTGTCAATTTCTCAACGGGACGGAGCGGGTTCGGTTCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTACGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CAGAGCGCCGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGAGATCCTGGAGCGGAAGCGGGCCGCCGTGGACACGTA
CAGACACAACACTACGGGGTTCGGTGAGAGTTTCAGT

TR15

TTGGAGTATCATAAGAGCGAGTGTCATTTCTTCAACGGGACGGAGCGGGTGCGGTTCTGGACAGATACTTCT
CTAACGGAGAAGAGAACGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGACCGAGCTGGGGCGG
CCGGACGCTGAGCACTGGAACAGCCAGAAGGAGTTCCTGGAGCGCAGGCGGACCGAGGTGGACACGTA
CTG
CAGACACAACACTACGGGGTCTTTGAGAGTTTCACT

TR16

TTGGAGTATCATAAGAGCGAGTGTCATTTCTTCAACGGGACGGAGCGGGTGCGGTTCTGGACAGATACTTCC
ATAATGGAGAAGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CGGAGCGCCGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGAGTTCCTGGAGCAGACGCGGGCCGAGGTGGACACGTA
CTG
CAGACACAACACTACGGGGTCTTTGAGAGTTTCACT

TR17

TTGGAGTATCATAAGAGCGAGTGTCATTTCTTCAACGGGACGGAGCGGGTGCGGTTCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTACGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CGGAGCGCCGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGAGTTCCTGGAGCGGAGGCGGGCCGAGGTGGACACGTA
CTG
CAGACACAACACTACGGGGTCTTTGAGAGTTTCACT

TR18

TTGGAGTATCATAAGAGCGAGTGTCATTTCTTCAACGGGACGGAGCGGGTGCGGTTCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTACGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CCGGAAGCCAAGTACTGGAACAGCCAGAAGGAGATCCTGGAGCGGAGGCGGACCGAGGTGGACACGTA
CTG
CAGACACAACACTACGGGGTCTTTGAGAGTTTCACT

TR19

TTGGAGTATTATACGAGCGAGTGTCATTTCTCAACGGGACGGAGCGGGTGCGGTTGCTGGACAGATACTTCC
ATAATGGAGAAGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CCGGACGCCGAGTATTGGAACAGCCAGAAGGACTTCCTGGAGAGCAGGAGGACCGAGGTGGACACGTA
CTG
CAGACACAACACTACGGGGTCTTTGAGAGTTTCACT

TR20

TTGGAGTATACTAAGAAAGAGTGTCGTTTCTCAACGGGACGGAGCGGGTGCGGTTCTGGACAGATACTTCC
ATAATGGAGAAGAGTACGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTACCGAGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CCGGACGCCAAGTACTGGAACAGCCAGAAGGAGATCCTGGAGCGGAGGCGGACCGAGGTGGACACGTA
CTG
CAGACACAACACTACGGGGTCTTTGAGAGTTTCACT

TR21

TTGGAGTATAATAAGAAAGAGTGTCATTTCTTCAATGGGACGGAGCGGGTGCGGTTGCTGGAAAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTACGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CGGAGCGCCGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGAGATCCTGGAGAGCAAGAGGACCGCGGTGGACACGTA
CTG
CAGACACAACACTACGGGGTCTTTGAGAGTTTCACT

TR22

TTGGAGTATACTAAGAAAGAGTGTCTGTTTTCTCAACGGGACGGAGCGGGTTCGGGTACCTGGACAGATACTTTT
ATAATGGAGAAGAGTACGTGCGCTTCGACAACGACTGGGGCGAGTACCGAGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CCGGACGCCAAGTACTGGAACAGCCAGAAGGAGCTCCTGGAGCGGAAGCGGGCCAATGTGGACACTTACTGC
ATACACAACACTACGGGGTCATTGAGAGTTTCACT

TR23

TTGGAGTATCGTAAGAGCGAGTGTCTGTTTTTCAACGGGACGGAGCGGGTTCGGGTTCCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGAACGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTACCGAGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CCGGACGCCAAGTACTGGAACAGCCAGAAGGAGCTCCTGGAGCGGAAGCGGGCCAATGTGGACACGTACTG
CAGACACAACACTACGGGGTCTTTGAGAGTTTCACT

TR24

TTGGAGTATGCTAAGAGCGAGTGTCTTTCTCAACGGGACGGAGCGGGTTCGGGTTCCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTACGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CGGAGCGCCGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGAATTCCTGGAGCAGACGCGGGCCGAGGTGGACACGTACTG
CAGACACAACACTACGGGGTCTTTGAGAGTTTCACT

TR25

TTGGAGTATACTAAGAAAGAGTGTCTGTTTTCTCAACGGGACGGAGCGGGTTCGGGTTCCTGGACAGATACTTCC
ATAATGGAGAAGAGACCCTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTACCGAGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CCGGACGCCAAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACTTCCTGGAGCGGAGGCGGACCGAGGTGGACACGTACTG
CAGACACAACACTACGGGGTCTTTGAGAGTTTCACT

TR26

TTGGAGTATCATAAGAGCGAGTGTCTTTCTCAACGGGACGGAGCGGGTTCGGGTTCCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTACGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCGGGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CGGAGCGCCGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACTTCCTGGAGCAGACGCGGGCCGAGGTGGACACGTACTG
CAGACACAACACTACGGGGTCTTTGAGAGTTTCACT

TR27

TTGGAGTATCATAAGAGCGAGTGTCTTTCTCAACGGGACGGAGCGGGTTCGGGTTCCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTACGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTACCGAGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CGGAACGCCAAGTACTGGAACAGCCAGAAGGAGATCCTGGAGCGGAAGCGGGCCGGCGTGGACACGTACTG
CAGACACAACACTACGGGGTTCGGTTCGAGAGTTTCACT

TR28

TTGGAGTATTGTAAGAGCGAGTGTCTTTCTCAACGGGACGGAGCGGGTTCGGGTTCCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTACGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTACCGAGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CCGGACGCCGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACTTCCTGGAGCGGAAGCGGGCCACCGTGGACACGTACTG
CAGACACAACACTACGGGGTTCGTTGAGAGTTTCACT

TR29

TTGGAGTATACTAAGAAAGAGTGTCTTTCTCCAACGGGACGGAGCGGGTTCGGTTCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTACGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CCGGACGCCAAACTGGAACAGCCAGAAGGACCTCCTGGAGCGGGCGGGCCCGTGGACACGTACTG
CAGACACAACACTACGGGGTTCGGTGAGAGTTTCAGT

TR30

TTGGAGTATGCTAAGAGCGAGTGTCAATTTCTCCAACGGGACGGAGCGGGTTCGGTTCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTACGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CGGAGCGCCGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACTTCTGGAGCAGACGCGGGCCGAGGTGGACACGTACTG
CAGACACAACACTACGGGGTTCATTGAGAGTTTCACT

TR31

TTGGAGTATTATACGAGCGAGTGTCAATTTCTCCAACGGGACGGAGCGGGTTCGGTTCTGGACAGATACTTCC
ATAATGGAGAAGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CCGGACGCCGAGTATTGGAACAGCCAGAAGGACWTCCTGGAGAGCAGGAGGACCGCGGTGGACACGTACTG
CAGACACAACACTACGGGGTTCATTGAGAGTTTCACT

TR32

TTGGAGTATAATAAGAAAGAGTGTCAATTTCTCCAACGGGACGGAGCGGGTTCGGTTCTGGACAGATACTCCT
ATAATGGAGAAGAGACCGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGAGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CCGGACGCTGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGAGCTCCTGGAGAGCAGGAGGACCGCGGTGGACACGTACTG
CAGACACAACACTACGGGGTCTGTGAGAGTTTCACT

TR33

TTGGAGTATCATAAGAGCGAGTGTCAATTTCTCCAACGGGACGGAGCGGGTTCGGTTCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTACGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CGGAGCGCCGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACTTCTGGAGCGGGCGGGCCCGTGGACACGTACTG
CAGACACAACACTACGGGGTTCGGTGAGAGTTTCAGT

TR34

TTGGAGTATCATAAGAGCGAGTGTCAATTTCTCCAACGGGACCGAGCGGGTTCGGTTCTGGACAGATACTACA
CTAACGGAGAAGAGAACGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGACCGAGCTGGGGCGG
CCGGACGCTGAGCAATGGAACAGCCAGAAGGACTTCTGGAGAGCAGGAGGACCGCGGTGGACACGTACTG
CAGACACAACACTACGGGGTCTTTGAGAGTTTCACT

TR35

TTGGAGTATCATAAGAGCGAGTGTCTTTCTCCAACGGGACGGAGCGGGTTCGGTTCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGACCCTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTACCGAGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CGGAGCGCCAAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACTTCTGGAGCGGAGGCGGACCGCGGTGGACACGTACTG
CAGACACTACTACGGGGTTCATTGAGAGTTTCACT

TR36

TTGGAGTATGGTAAGAGCGAGTGTCGTTTTCTTCAACGGGACGGAGCGGGTGC GGTTCTTGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTACGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTACCGAGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CGGAACGCCGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACTTCCTGGAGCGGAAGCGGGCCAATGTGGACACGTA CTG
CAGACACA ACTACGGGGTTCGGTGAGAGTTTCACT

TR37

CTGGAGTATTATAGGAGCGAGTGTCATTTCTTCAACGGGACCGAGCGGGTGC GGCTCCTTGACAGATACTTCC
ATAATGGAGAAGAGTTCGCGCTTCGACAGT GACTGGGGCGAGTTTCGGGCAGTGACCGAGCTGGGGAGG
CCGGCCGCTGAGCAATGGAACAGCCAGAAGA ACATCCTGGAGCAGAAGCGGGCCGAGGTGAACACGGTGTG
CAGACACA ACTATGGGGTCTTTGAGAGTTTCAGT

TR38

TTGGAGTATTATAAGAGCGAGTGTCATTTCTTCAACGGGACGGAGCGGGTGC GGTTCTTGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGACCCTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CCGAACGCCAAGTACTGGAACAGCCAGAAGGAGATCCTGGAGCGGAAGCGGGCCGACGTGGACACGTA CTG
CAGACACA ACTACGGGGTTCATTGAGAGTTTCAGT

TR39

CTGGAGTATAGTAAGAGCGAGTGTCATTTCTTCAACGGGACCGAGCGGGTGC GGTTCTTGACAGATACTACA
CTAACGGAGAAGAGAACGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGACCGAGCTGGGGCGG
CCGGACGCTGAGCAATGGAACAGCCAGAAGGACTTCCTGGAGAGCAGGAGGGCCGCGGTGGACACGTA CTG
CAGACACA ACTACGGGGTTCATTGAGAGTTTCAGT

TR40

TTGGAGTATACTAAGAAAGAGTGTCGTTTTCTCAACGGGACGGAGCGGGTGC GGTTCTTGACAGATACTTCC
ATAATGGAGAAGAGACCCTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTACCGAGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CCGGACGCCAAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACTTCCTGGAGCGGAGGCGGACCGAGGTGGACACGTA CTG
CAGACACA ACTACGGGGTTCATTGAGAGTTTCACT

TR41

TTGGAGTATCATAAGAGCGAGTGTCATTTCTTCAACGGGACGGAGCGGGTGC GGTTCTTGACAGATACTTCC
ATAATGGAGAAGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CGGAGCGCCGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACTTCCTGGAGCAGACGCGGGCCGAGGTGGACACGTA CTG
CAGACACA ACTACGGGGTTCATTGAGAGTTTCACT

TR42

TTGGAGTATACTAAGAAAGAGTGTCGTTTTCTCAACGGGACGGAGCGGGTGC GGTTCTTGACAGATACTTCC
ATAATGGAGAAGAGACCCTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTACCGAGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CCGGACGCCAAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACTTCCTGGAGCGGAGGCGGACCGAGGTGGACACGTA CTG
CAGACACA ACTACGGGGTTCATTGAGAGTTTCACT

TR43

TTGGAGTATCATAAGAGCGAGTGTCATTTCTTCAACGGGACGGAGCGGGTTCGGTTCCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTACGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CGGAGCGCCGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGAGCTCCTGGAGCGGAGGCGGGCCGAGGTGGACACGTACTG
CAGACACAACACTACGGGGTTCATTGAGAGTTTCAGT

TR44

TTGGAGTATCATAAGAGCGAGTGTCATTTCTTCAACGGGACGGAGCGGGTTCGGTTCCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTACGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CAGAGCGCCAAGCACTGGAACAGCCAGAAGGAGCTCCTGGAGCGGAGGCGGGCCAATGTGGACACGTACTG
CAGACACAACACTACGGGGTCTTTGAGAGTTTCACT

TR45

TTGGAGTATCATAAGAGCGAGTGTCGTTTCTTCAACGGGACGGAGCGGGTTCGGTTCCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTCCCTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTACCGAGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CCGGACGCCAAGTACTGGAACAGCCAGAAGGAGATCCTGGAGCGGAAGCGGGCCAATGTGGACACGTACTG
CAGACACAACACTACGGGGTTCGGTTCGAGAGTTTCAGT

TR46

TTGGAGTATACTAAGAAAGAGTGTCGTTTCTTCAACGGGACGGAGCGGGTTCGGTTCCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTACGCGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CCGGACGCCAATACTGGAACAGCCAGAAGGAGCTCCTGGAGCGGGCGCGGGCCGCCGTGGACACGTACTG
CAGACACAACACTACGGGGTTCGGTTCGAGAGTTTCACT

TR47

CTGGAGTATTGTAGGAGCGAGTGTCGTTTCTTCAACGGGACCGAGAGGGTTCGGTTCCTGGAAAGATACTTCC
ATAATGGAGAAGAGTTTCGCGCGCTTCGACAGTGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGACCGAGCTGGGGAGG
CCGGCCGCTGAGCAATGGAACAGCCAGAAGAAGTTCCTGGAGCACAAGCGGGCCGAGGTGAACACGGTGTG
CAGACACAACACTACGGGGTCTTTGAGAGTTTCAGT

TR48

TTGGAGTATACTAAGAAAGAGTGTCGTTTCTTCAACGGGACGGAGCGGGTTCGGTTCCTGGACAGATACTTCT
ATAATGGAGAAGAGTACGCGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTTCCGGGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGG
CGGAGCGCCGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGAGATCCTGGAGCGGAGGCGGACCGAGGTGGACACGTACTG
CAGACACAACACTACGGGGTTCATTGAGAGTTTCACT