



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YERLİ KARA SIĞIR IRKINDA HASTALIKLARA
DİRENÇ İLİŞKİLİ LOKUSLARIN MOLEKÜLER
GENETİK ANALİZİ**

FERİT CAN YAZDIÇ

DOKTORA TEZİ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2017

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YERLİ KARA SIĞIR IRKINDA HASTALIKLARA
DİRENÇ İLİŞKİLİ LOKUSLARIN MOLEKÜLER
GENETİK ANALİZİ**

FERİT CAN YAZDIÇ

Bu tez,
Zootekni Anabilim Dalında
DOKTORA
derecesi için hazırlanmıştır.

KAHRAMANMARAŞ 2017

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Ferit Can YAZDIÇ tarafından hazırlanan “YERLİ KARA SIĞIR IRKINDA HASTALIKLARA DİRENÇ İLİŞKİLİ LOKUSLARIN MOLEKÜLER GENETİK ANALİZİ” adlı bu tez, jürimiz tarafından 12/10/2017 tarihinde oy birliği/oy çokluğu ile Zootečni Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. M. Sait EKİNCİ (DANIŞMAN)

Zootečni Anabilim Dalı,

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Prof. Dr. Emin ÖZKÖSE (ÜYE)

Zootečni Anabilim Dalı,

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Doç. Dr. İsmail AKYOL (ÜYE)

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı,

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Doç. Dr. B. Devrim ÖZCAN (ÜYE)

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,

Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Selahattin KİRAZ (ÜYE)

Biyometri ve Genetik Anabilim Dalı,

Harran Üniversitesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Mustafa ŞEKKELİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, alıntı yapılan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Ferit Can YAZDIÇ



Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2015/3-69D

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

YERLİ KARA SIĞIR IRKINDA HASTALIKLARA DİRENÇ İLİŞKİLİ LOKUSLARIN MOLEKÜLER GENETİK ANALİZİ

(DOKTORA TEZİ)

FERİT CAN YAZDIÇ

ÖZET

Bu çalışmada Türkiye'nin yerli sığır ırklarından olan Yerli Kara sığır ırkında hastalıklara direnç ile ilişkili BoLA bölgesinde bulunan DMA, DMB, DQA, DQB, DRA, DRB2, DRB3, DYA, DYB, LMP2 ve LMP7 genlerindeki bazı ekzon bölgelerinin nükleotid dizileri belirlenerek, polimorfizm özellikleri ve filogenetik yapıları analiz edilmiştir. Ayrıca Yerli Kara sığır ırkının doğal bağışıklık sisteminin temelini oluşturan genetik direnç özellikleri ile ilişkili referans veriler elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan hayvan materyali, Amasya ve Kars illerinden toplanan, saf ırkın belirgin özelliklerinin taşıyan sığırlara ait toplam 67 adet (29, ♂ - 38, ♀) tam kan örneği kullanılmıştır. Toplanan tüm kan örneklerinden fenol-kloroform yöntemi veya ticari kit yardımıyla genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Yerli kara sığır örneklerinde BoLA-DMA-E2,3,4, -DMB-E2, -DQA1-E2, -DQA2-E3, -DQA5-E2, -DQB-E2, -DRA-E2, -DRB2-E2, -DRB3-E2, -DYA-E1, -DYA-E2, -DYA-E3,4, -DYB-E3, LMP2-E2 ve LMP7-E3,4,5 bölgelerini çoğaltmak için gerekli ileri ve geri primerler tasarlanmıştır. PZR ile amplifikasyon yapılan örnekler nükleotid dizi analiz cihazı ile ekzon dizi bilgileri elde edilmiştir. PZR ürünleri doğrudan ya da vektöre klonlanarak, universal primerler ile nükleotid dizileri belirlenmiştir. Nükleotid dizi datalarındaki heterozigot pozisyonlar ileri ve geri primerler ile toplanarak düzeltilip tanımlanmış ve elde edilen nükleotid diziler NCBI'ya yüklenmiştir. Ayrıca muhtemel protein dizileri incelenerek referans veriler elde edilmiştir. Son olarak önceki çalışmalarda elde edilen allel bilgilerinden faydalanılarak, hastalıklara direnç özellikleri incelenmiş ve tür içindeki bireyler arasındaki varyasyonun derecesi araştırılmıştır. Çalışılan her bölge için toplam bölge sayısı, G+C oranı (%), polimorfik bölge sayısı (s), haplotip sayısı (h), haplotip farklılığı (Hd) ve nükleotid farklılığı (Pi) hesaplanmıştır. Yerli kara sığır ırkından elde edilen haplotip sayısı (2-129), yüksek nükleotid (Pi: 0,051±0,0014) ve haplotip farklılığı (Hd: 1,000±0,0010) değerleri ile dünyadaki diğer sığır ırkları karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlar, Türkiye'nin sığır ırklarını evcilttilmesinde merkezi bir nokta olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen bulgular; Türkiye'deki sığır ırklarının bağışıklık özelliklerinin geliştirilmesine yardımcı olacak

bilgiler sağlayarak, infeksiyonlara karşı daha dirençli çiftlik hayvanların yetiştirilmesine katkı sağlayacaktır. Ayrıca BoLA haplotiplerinin çoğunluğu yerli kara sığır ırkına özgüdür ve ortak haplotiplerin çok azı farklı sığır ırklarında gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Major Histokompatibilite Kompleksi, Yerli Kara Sığırı, Polimorfizm, Bağışıklık sistemi, BoLA, DMA, DMB, DQA, DQB, DRA, DRB2, DRB3, DYA, DYB, LMP2 ve LMP7.



Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü,
Zootečni Anabilim Dalı, Ekim / 2017

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Sait EKİNCİ

Sayfa sayısı: 296

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF LOCI ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO DISEASES IN ANATOLIAN BLACK CATTLE

(Ph.D. THESIS)

FERİT CAN YAZDIÇ

ABSTRACT

In this study, nucleotide sequences of some exon regions of the DMA, DMB, DQA, DQB, DRA, DRB2, DRB3, DYA, DYB, LMP2 and LMP7 genes in the BoLA locus, which are related to diseases in Anatolian black cattle breed of Turkey, and their polymorphic features and phylogenetic structures were analysed. Reference data, associated with the genetic resistance properties of the natural immune system of the Anatolian black cattle breed were obtained. Whole blood samples of 67 (29, ♂ - 38, ♀) Anatolian black cattle carrying the distinctive features of pure breed according to their morphological characters, bred in the cities of Amasya and Kars, were used for DNA analysis. Genomic DNA extraction was carried out using phenol-chloroform method or commercial isolation kits. The forward and reverse primers were designed to amplify BoLA-DMA-E2,3,4, -DMB-E2, -DQA1-E2, -DQA2-E3, -DQA5-E2, -DQB-E2, -DRA-E2, -DRB2-E2, -DRB3-E2, -DYA-E1, -DYA-E2, -DYA-E3,4, -DYB-E3, LMP2-E2 and LMP7-E3,4,5 regions from extracted and purified DNAs. Exon sequence data were obtained using the nucleotide sequence analyser by either direct sequencing or by cloning in vector systems using universal primers. The nucleotide sequence data were controlled and corrected accordingly and made public in the web site of NCBI. Reference data were obtained using estimated protein sequences. Finally, the resistance abilities were analysed and degree of possible polymorphic variations among the individuals were determined using the basic information of alleles reported in previous studies. For each region studied, total number of regions, G + C ratio (%), polymorphic region number (s), haplotype number (h), haplotype difference (Hd) and nucleotide difference (Pi) were determined. When the numbers of haplotypes (2-129), high nucleotides (Pi: $0,051 \pm 0,0014$) and haplotype difference rates (Hd: $1,000 \pm 0,0010$) obtained from domestic black cattle breeds compared to other cattle breeds in the world, it could be suggested that Turkey has been situated in a central position during the domestication process of cattle. Finally, findings of current thesis may also contribute to the development of more resistant farm animals

against various infections by providing basic information that will help improve the immunity characteristics of the cattle breeds. Moreover most majority of the BoLA haplotypes are found to be specific to Anatolian black cattle, and only few of the common haplotypes have been observed in different cattle breeds.

Key words: Major histocompatibility complex, Anatolian Black Cattle, Polymorphism, Immune system, BoLA, DMA, DMB, DQA, DQB, DRA, DRB2, DRB3, DYA, DYB, LMP2 ve LMP7.



Kahramanmaraş Sütçü İmam University
Graduate School of Natural and Applied Sciences,
Department of Animal Science, October / 2017

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Sait EKİNCİ

Page Numbers: 296

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında bana her türlü destek ve kolaylığı gösteren, kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici olan başta değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet Sait EKİNCİ olmak üzere tez izleme komitesinde yer alarak değerli yardım ve önerilerini göstermekten kaçınmayan Prof. Dr. Emin ÖZKÖSE ve Doç. Dr. İsmail AKYOL hocalarıma sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunuyorum.

Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği Laboratuvarı'ndaki (BİGEM) çalışmalarım esnasında bana yardımcı olan ve yakınlıklarını esirgemeyen arkadaşlarım Arş. Gör. Altuğ KARAMAN, Elif KÖKSALAN, Tuğçe TURGUT, Kübra EKİNCİ, Büşra UZDİL başta olmak üzere tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Doktora Bursu Programı ile bu çalışmaya ve bana katkıda bulunan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK) ve kısmen maddi destek sağlayan Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, tercihlerimle hep yanımda olan, beni yüreklendiren, bugünlere gelmemde çok emekleri olan başta annem İslim YAZDIÇ ve babam Elman YAZDIÇ olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi ve minnettarlığımı bildirmek isterim. Ayrıca tez çalışmamda her türlü yardımını, desteğini ve sabrını esirgemeyen meslektaşım eşim Dr. Fadime YAZDIÇ'a teşekkür ederim.

Ferit Can YAZDIÇ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
EKLER DİZİNİ	xvii
EK ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xviii
EK ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Doğal (Doğuştan Gelen) Bağışıklık Sistemi.....	2
1.2. Edinilmiş Bağışıklık Sistemi	3
1.3. Büyük Doku Uygunluk Kompleksi (MHC: Major Histokompatibilite Kompleksi) .	4
1.3.1. MHC'nin keşfi	4
1.3.2. MHC'nin farklı türler için kullanılan terminolojisi (nomenklatür)	6
1.3.3. MHC'nin moleküler yapısı ve fonksiyonu	6
1.3.3.1. MHC sınıf I bölgesi ve molekülleri.....	8
1.3.3.2. MHC sınıf II bölgesi ve molekülleri	10
1.3.3.3. MHC sınıf III bölgesi ve molekülleri.....	11
1.3.4. MHC'nin insanlar ve farklı memeli türlerindeki genomik organizasyonu....	12
1.4. Sığır ve Hastalık Direncinin Önemi.....	19
1.5. Sığır Büyük Doku Uygunluk Kompleksi (BoLA).....	23
1.5.1. BoLA bölgesinin genomik organizasyonu	24
1.5.1.1. BoLA sınıf I bölgesi ve molekülleri.....	26
1.5.1.2. BoLA sınıf II bölgesi ve molekülleri	27
1.5.1.2.1. BoLA Sınıf IIa alt bölgesi	28
1.5.1.2.2. BoLA Sınıf IIb alt bölgesi.....	30
1.5.1.3. BoLA sınıf III bölgesi ve molekülleri	32
1.6. Türkiye Yerli Sığır Irkları.....	33
1.6.1. Yerli Kara (YK).....	33
1.6.2. Doğu Anadolu Kırmızısı.....	34
1.6.3. Güney Anadolu Kırmızısı.....	34
1.6.4. Yerli Güney Sarısı (YGS).....	35
1.6.5. Boz Irk (BOZ).....	35
1.6.6. Zavot (ZAV)	35
1.7. Çalışmanın Önemi ve Amacı.....	35
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	38
2.1. Haplotip Yapısı İle İlişkili Çalışmalar	39
2.2. Polimorfizm Çalışmalar	42
2.3. BoLA ve Hastalık İlişkisi Çalışmaları	51

3. MATERYAL ve METOD	61
3.1. Kullanılan Kimyasallar	61
3.2. Kullanılan Cihazlar ve Aletler	61
3.3. Örneklerin Toplanması	61
3.4. Kan Örneklerinin Alımı	61
3.5. DNA İzolasyonu	62
3.6. Ekzon Bölgelerin Dizi Analizi.....	64
3.6.1. Primerlerin tasarlanması	64
3.6.2. Primerlerin optimizasyonu ve ekzon bölgelerinin konvansiyonel PZR ile çoğaltılması	65
3.6.3. DNA'nın jel elektroforez ile görüntülenmesi	66
3.6.4. PZR ürünlerinin saflaştırılması.....	66
3.6.5. Nükleotid dizilerinin elde edilmesi.....	66
3.6.5.1. ExoSap basamağı	67
3.6.5.2. Döngü PZR basamağı	67
3.6.5.3. Sefadeks basamağı	67
3.6.5.4. Örneklerin cihaza yüklenmesi.....	67
3.7. Ekzon Bölgelerinin Klonlanması ve Transformant Plazmitlerin Oluşturulması	68
3.7.1. pGEM-T easy klonlama vektörüne ligasyon	68
3.7.2. CaCl ₂ yöntemi ile <i>Escherichia coli</i> 'ye plazmit transferi	69
3.7.3. Transformant plazmitlerin dna izolasyonu	70
3.7.4. Plazmit üzerinden nükleotid dizileme	71
3.8. Ekzon Bölgelerine Ait Sekans Havuzu.....	71
3.9. Dizi Analizleri.....	72
3.10. Etik Kurul Onay Bilgileri	73
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	74
4.1. Kan Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu.....	74
4.2. Hedef Gen Bölgelerinin PZR Optimizasyonu	75
4.3. Yerli Kara BoLA Bölgelerinin Klonlanması	77
4.4. BoLA-DMA ve -DMB Gen Bölgelerinin Karakterizasyonu	79
4.4.1. BoLA-DMA gen bölgesi ve yerli kara sığırında DMA bölgesinin nükleotid dizilenmesi.....	79
4.4.1.1. DMA geninin pqr amplifikasyon sonucu	80
4.4.1.2. DMA-E2,3,4 nükleotid ve amino asit dizisi.....	81
4.4.1.3. DMA-E2,3,4 bölgesinin filogenetik analizi	88
4.4.2. BoLA-DMB gen bölgesi ve yerli kara sığırında DMB bölgesinin nükleotid dizilenmesi	91
4.4.2.1. DMB geninin pqr amplifikasyonu sonucu	92
4.4.2.2. DMB-E2 nükleotid dizilenmesi ve amino asit dizi analizi	92
4.4.2.3. DMB-E2 bölgesinin filogenetik analizi	97
4.5. BoLA-DQA ve DQB Gen Bölgelerinin Karakterizasyonu	100
4.5.1. BoLA-DQA1-DQA2-DQA5 gen bölgeleri ve yerli kara sığırında DQA1, DQA2 ve DQA5 genlerinin taranması	100
4.5.1.1. DQA1-DQA2-DQA5 genlerinin pqr amplifikasyon sonucu.....	101
4.5.1.2. DQA1-E2, DQA2-E3 ve DQA5-E2'nin nükleotid ve amino asit dizileri	102

4.5.1.3. DQA1-E2, DQA2-E3 ve DQA5-E2 bölgelerinin filogenetik analizi	120
4.5.2. BoLA-DQB Gen Bölgesi ve Yerli Kara Sığırında DQB Bölgesinin nükleotid dizilenmesi	124
4.5.2.1. DQB geninin PZR amplifikasyonu sonucu	126
4.5.2.2. DQB-E2 nükleotid dizilenmesi ve amino asit dizi analizi	127
4.5.2.3. DQB-E2 bölgesinin filogenetik analizi	131
4.6. BoLA-DRA ve –DRB Gen Bölgelerinin Karakterizasyonu	135
4.6.1. BoLA-DRA gen bölgesi ve yerli kara sığırında DRA bölgesinin nükleotid dizilenmesi	135
4.6.1.1. DRA geninin PZR amplifikasyonu sonucu	136
4.6.1.2. DRA-E2 nükleotid dizilenmesi ve amino asit dizi analizi	136
4.6.1.3. DRA-E2 bölgesinin filogenetik analizi	140
4.6.2. BoLA-DRB2 gen bölgesi ve yerli kara sığırında DRB2 bölgesinin nükleotid dizilenmesi	142
4.6.2.1. DRB2 geninin PZR amplifikasyonu sonucu	143
4.6.2.2. DRB2-E2 nükleotid dizilenmesi ve amino asit dizi analizi	144
4.6.2.3. DRB2-E2 bölgesinin filogenetik analizi	149
4.6.3. BoLA-DRB3 gen bölgesi ve yerli kara sığırında DRB3 bölgesinin nükleotid dizilenmesi	151
4.6.3.1. DRB3 geninin PZR amplifikasyonu sonucu	152
4.6.3.2. DRB3 -E2 nükleotid dizilenmesi ve amino asit dizi analizi	153
4.6.3.3. DRB3-E2 bölgesinin filogenetik analizi	163
4.7. BoLA-DYA ve –DYB Gen Bölgelerinin Karakterizasyonu	169
4.7.1. BoLA-DYA gen bölgesi ve yerli kara sığırında DYB bölgesinin nükleotid dizilenmesi	169
4.7.1.1. DYB geninin PZR amplifikasyonu sonucu	170
4.7.1.2. DYB nükleotid dizilenmesi ve amino asit dizi analizi	171
4.7.1.3. DYB bölgesinin filogenetik analizi	181
4.7.2. BoLA-DYB gen bölgesi ve yerli kara sığırında DYB bölgesinin nükleotid dizilenmesi	185
4.7.2.1. DYB geninin PZR amplifikasyonu sonucu	186
4.7.2.2. DYB-E3 nükleotid dizilenmesi ve amino asit dizi analizi	186
4.7.2.3. DYB-E3 bölgesinin filogenetik analizi	190
4.8. BoLA-LMP2 ve –LMP7 Gen Bölgelerinin Karakterizasyonu	193
4.8.1. BoLA-LMP2 ve –LMP7 gen bölgeleri ve yerli kara sığırında LMP2 ve LMP7 genlerinin taranması	193
4.8.1.1. LMP2 ve LMP7 genlerinin pcr amplifikasyon sonucu	194
4.8.1.2. LMP2-E2 ve LMP7-E3, 4, 5'in nükleotid ve amino asit dizileri	195
4.8.1.3. LMP2-E2 ve LMP7-E3, 4, 5 bölgelerinin filogenetik analizi	203
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	206
6. KAYNAKLAR	217
7. EKLER	251
8. ÖZGEÇMİŞ	293

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Majör histokompatibilite kompleksinin spesiflik ve allellerinin terminoloji yorumlanması için yol haritası.....	6
Şekil 1.2. MHC sınıf I ve MHC sınıf II moleküllerinin protein yapılarının karşılaştırılması (Ribbon diagramı)	7
Şekil 1.3. İnsanlarda 6. kromozom'daki MHC gen haritası.	13
Şekil 1.4. Antijenlerin işlenmesi ve T lenfositlerine sunumundan sorumlu olan MHC lokusundaki genler ve MHC moleküllerini oluşturan α ve β zincir bölgeleri.	17
Şekil 1.5. Büyük histokompatibilite komplekslerinin karşılaştırmalı genomı.	18
Şekil 1.6. Sığır 23. kromozomu üzerindeki BoLA bölgesinin fiziksel haritalaması..	25
Şekil 1.7. Yerli Kara Sığırtı	34
Şekil 3.1. Kandan DNA izolasyonu	63
Şekil 3.2. PZR ürünlerinin pGEM-T Easy dizileme vektörüne klonlanması strateji	69
Şekil 3.3. Hedef bölgelerin dizilenmesinde kullanılan Applied Biosystems 3130xl sistemi.	71
Şekil 4.1. Yerli Kara DNA izolasyonlarının jel görüntüsü (Amasya-Merzifon).....	74
Şekil 4.2. Yerli Kara DNA izolasyonlarının jel görüntüsü (Kars-Sarıkamış).....	75
Şekil 4.3. Hedef gen bölgelerinin gradient PZR jel görüntüsü, gradiyent PZR sıcaklıkları	76
Şekil 4.4. <i>E. coli</i> DH5 α 'dan izole edilen transformat plazmidler.	78
Şekil 4.5. Transformat plazmidlerdeki hedef bölgelerin, kendi primerleri ile gerçekleştirilen PZR sonucu.	78
Şekil 4.6. YK1-38. örneklerinde DMA-E2,3,4 bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü.....	80
Şekil 4.7. YK38- 67. örneklerinde DMA-E2,3,4 bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü.....	81
Şekil 4.8. YK-DMA-E2,3,4 bölgesinin ileri primer ile elde edilen dizilime ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir.	81
Şekil 4.9. Referans DMA-E2,3,4 (Ac.No:AY957499.1) ve YK-DMA-E2,3,4 bölgesinin konsensüs dizilerinin hizalanmasının bir kısmı.	82
Şekil 4.10. Nükleotid konsensüs dizilerinden mRNA bölgesinin elde edilmesi ve aa dizilerinin belirlenmesi.	85
Şekil 4.11. YK8-DMA-PR'nin sahip olduğu domainler, kırmızı renkle gösterilen alfa domaini, yeşil renkle gösterilen immunoglobülin C1-set domaini ve sarı renkli bölge C-terminal domaini göstermektedir.....	86
Şekil 4.12. Altı yeni BoLA-DM alleli tarafından kodlanan alfa bölgelerinin tahmini amino asit dizilerinin hizalanması.	87

Şekil 4.13. BoLA-DMA Konsensüs dizilerinin filogenetik ağaçları.....	89
Şekil 4.14. Yerli kara ve diğer türlerdeki DMA bölgelerinin filogenetik ağacı.....	90
Şekil 4.15. YK1- 24. örneklerinde DMB-E2 bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü.....	92
Şekil 4.16. YK-DMB-E2 bölgesinin ileri primer ile elde edilen nükleotid dizisine ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir.	93
Şekil 4.17. Referans DMB-E2 (NM_001040481.3) ve YK-DMB-E2 bölgesinin konsensüs dizilerinin hizalanmasının bir kısmı örnek olarak verilmiştir.	93
Şekil 4.18. Nükleotid konsensüs dizilerinden transkript (mRNA) elde edilmesi ve aa dizilerinin belirlenmesi.	95
Şekil 4.19. YK1-DMB-PR'nin sahip olduğu, beta ve immunoglobülin domainleri.	96
Şekil 4.20. BoLA-DM alleli tarafından kodlanan beta bölgelerinin tahmini amino asit dizilerinin hizalanması.....	97
Şekil 4.21. BoLA-DMB Konsensüs dizilerinin filogenetik ağaçları.....	98
Şekil 4.22. Yerli kara ve diğer türlerdeki DMB bölgelerinin filogenetik ağacı.	99
Şekil 4.23. YK1- 11. örneklerinde DQA1-E2 ve DQA2-E3 bölgelerinin PZR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü, YK1-22 nolu örneklerinde DQA5-E2 bölgesinin çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü.....	101
Şekil 4.24. YK-DQA1-E2 (A), YK-DQA2-E3 (B) ve YK-DMQA5-E2 (C) bölgelerinin ileri primer ile elde edilen nükleotid dizisine ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir.	102
Şekil 4.25. Referans DQA1-E2 (FQ482091.6) ve YK-DQA1-E2 bölgesinin konsensüs dizilerinin hizalanmasının bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir.	103
Şekil 4.26. Referans DQA2-E3 (FQ482109.2) ve YK-DQA2-E3 bölgesinin konsensüs dizilerinin hizalanmasının bir kısmı. Mavi kutu ile belirtilen bölge yerli karalara özgün bölgeyi göstermektedir.	105
Şekil 4.27. Referans DQA5-E2 (FQ482109.2) ve YK-DQA5-E2 bölgesinin konsensüs dizilerinin hizalanmasının bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir.	108
Şekil 4.28. Nükleotid konsensüs dizilerinden mRNA bölgesinin elde edilmesi ve aa dizilerinin belirlenmesi.	111
Şekil 4.29. YK1-DQA1, DQA2 (A) ve DQA5-PR'nin (B) sahip olduğu, alfa, immunoglobülin ve C-terminal domainleri.	116
Şekil 4.30. BoLA-DQA1 alleli tarafından kodlanan alfa bölgelerinin tahmini amino asit dizilerinin hizalanması.	117
Şekil 4.31. BoLA-DQA2 alleli tarafından kodlanan alfa bölgelerinin tahmini amino asit dizilerinin hizalanması.	118
Şekil 4.32. BoLA-DQA5 alleli tarafından kodlanan alfa bölgelerinin tahmini amino asit dizilerinin (in silico) hizalanması.....	119

Şekil 4.33. BoLA-DQA1, DQA2 VE DQA5 konsensüs dizilerinin filogenetik ağaçları.....	121
Şekil 4.34. Yerli kara ve IPD’de bulunan <i>Bos indicus</i> (Boin-DQA), <i>Bos taurus</i> (Bota-DQA) ve <i>Bubalus bubalis</i> (Bubu-DQA) DQA allellerinin filogenetik ağacı.....	123
Şekil 4.35. YK1- 13. örneklerinde DQB-E2 bölgesinin ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü.....	126
Şekil 4.36. YK-DQB-E2 bölgesinin ileri primer ile elde edilen nükleotid dizisine ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir.	127
Şekil 4.37. Referans DQB-E2 (FQ482109.2) ve YK-DQB-E2 bölgesinin konsensüs dizilerinin hizalanmasının bir kısmı.	127
Şekil 4.38. Nükleotid konsensüs dizilerinden mRNA bölgesinin elde edilmesi ve aa dizilerinin belirlenmesi.	129
Şekil 4.39. YK2-DQB-PR’nin sahip olduğu domainler, yeşil renkle gösterilen bölgelerin ilki alfa domaini, ikincisi immunoglobülin domaini göstermektedir.	130
Şekil 4.40. Altı yeni BoLA-DQB alleli tarafından kodlanan beta bölgelerinin tahmini amino asit dizilerinin hizalanması.	130
Şekil 4.41. BoLA-DQB konsensüs dizilerinin filogenetik ağaçları.	132
Şekil 4.42. Yerli kara ve IPD’de bulunan <i>Bos indicus</i> (Boin-DQB), <i>Bos taurus</i> (Bota-DQB) ve <i>Bubalus bubalis</i> (Bubu-DQB) DQB allellerinin filogenetik ağacı. Bu çalışmada elde edilen alleller koyu renkle gösterilmiştir.	133
Şekil 4.43. YK1- 13. örneklerinde DRA-E2 bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü.....	136
Şekil 4.44. YK-DRA-E2 bölgesinin ileri primer ile elde edilen nükleotid dizisine ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir.	137
Şekil 4.45. Referans DRA-E2 (FQ482091.6) ve YK-DRA-E2 bölgesinin konsensüs dizilerinin hizalanması.....	137
Şekil 4.46. Nükleotid konsensüs dizilerinden mRNA bölgesinin elde edilmesi ve aa dizilerinin belirlenmesi.	138
Şekil 4.47. YK1-DRA-PR’nin sahip olduğu, alfa, immunoglobülin ve C1-set domainleri.	139
Şekil 4.48. BoLA-DRA konsensüs dizilerinin filogenetik ağaçları.	140
Şekil 4.49. Yerli kara ve NCBI’de bulunan DRA allellerinin [(<i>Ovis aries</i> (Ovar), <i>Bos taurus</i> (BoLA), <i>Bubalus bubalis</i> (Bubu), <i>Bos grunniens</i> (BoGr), <i>Bos indicus</i> (Boin), <i>Bubalus depressicornis</i> (Ande), <i>Bos javanicus</i> (Boja), <i>Bos gaurus</i> (Boga), <i>Capra hircus</i> (Cahi) ve <i>Bison bonasus</i> (Bibo)] filogenetik ağacı (A). <i>Bos taurus</i> (BoLA) ve yerli kara sığırlarında gözlenen DRA allellerinin filogenetik ağacı (B)..	141

Şekil 4.50. YK1-14. örneklerinde DRB2-E2 bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü.....	144
Şekil 4.51. YK-DRB2-E2 bölgesinin ileri primer ile elde edilen nükleotid dizisine ait kromatogram görüntüsünün tamamı örnek olarak gösterilmiştir.	144
Şekil 4.52. Referans DRB2-E2 (FQ482091.6) ve YK-DRB2-E2 bölgesinin konsensüs dizilerinin hizalanmasının bir kısmı.....	145
Şekil 4.53. Nükleotid konsensüs dizilerinden DRB2-mRNA bölgesinin elde edilmesi ve aa dizilerinin belirlenmesi.....	146
Şekil 4.54. YK13-DRB2-PR'nin sahip olduğu, beta ve immunoglobülin domainleri.....	147
Şekil 4.55. Farklı türlerdeki DRB2 gen bölgesinden kodlanan tahmini amino asit dizisinin hizalanması ve yerli karadan elde edilen YK-DRB2 gen bölgesindeki korunan bölgeler (A), Bos taurus BoLA-DRB2 (Ac. No: XP_010816599.2) ve YK-DRB2 amino asit dizilerinin hidropati indeksi ve farklılıkları (B ve C).....	148
Şekil 4.56. BoLA-DRA konsensüs dizilerinin filogenetik ağaçları.	150
Şekil 4.57. Yerli kara ve diğer türlerdeki DRB2 bölgelerinin filogenetik ağacı.	150
Şekil 4.58. YK1-19. örneklerinde DRB3-E2 bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü.....	153
Şekil 4.59. YK-DRB3-E2 bölgesinin ileri primer ile elde edilen nükleotid dizisine ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir.	153
Şekil 4.60. Referans DRB3-E2 (FQ482110.1) ve YK-DRB3-E2 bölgesinin konsensüs dizilerinin hizalanmasının bir kısmı örnek olarak verilmiştir.	154
Şekil 4.61. Nükleotid konsensüs dizilerinden mRNA bölgesinin elde edilmesi ve aa dizilerinin belirlenmesi.	158
Şekil 4.62. YK8-DRB3- PR'nin sahip olduğu domainler, yeşil renkle gösterilen bölgelerin ilki beta domaini, ikincisi immunoglobülin domaini göstermektedir.	161
Şekil 4.63. BoLA-DRB3 alleli tarafından kodlanan beta bölgelerinin tahmini amino asit dizilerinin hizalanması	162
Şekil 4.64. BoLA-DRB3 konsensüs dizilerinin filogenetik ağaçları.	164
Şekil 4.65. Yerli kara (YK) ve IPD'de bulunan <i>Bos indicus</i> (Boin-DRB3) ve <i>Bos taurus</i> (Bota-DRB3), DRB3 allellerinin filogenetik ağacı.....	166
Şekil 4.66. YK1- 24. örneklerinde DYA-E1 ve DYA-E2 bölgelerinin, YK1-19. Örneklerinde DYA-E3,4 bölgelerinin PZR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü.....	170
Şekil 4.67. YK-DYA-E1 (A), YK-DYA-E2 (B) ve YK-DYA-E3,4 (C) bölgesinin ileri primer ile elde edilen nükleotid dizisine ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir.....	171
Şekil 4.68. Referans BoLA-DYA geni (AY957499.1) ve YK-DYA-E1 (A), YK-DYA-E2 (B) ve YK-DYA-E3,4 (C) bölgesinin konsensüs dizilerinin hizalanmasının bir kısmı.....	172

Şekil 4.69. Nükleotid konsensüs dizilerinden mRNA bölgesinin elde edilmesi ve aa dizilerinin belirlenmesi.	177
Şekil 4.70. YK1-DYA-PR'nin sahip olduğu, alfa, immunoglobülin ve C-terminal domainleri.	179
Şekil 4.71. BoLA-DYA alleli tarafından kodlanan alfa bölgelerinin tahmini amino asit dizilerinin hizalanması.	180
Şekil 4.72. BoLA-DYA konsensüs dizilerinin filogenetik ağaçları.	182
Şekil 4.73. İnsan, domuz, koyun, sığır ve bizonlardaki MHC-DY genleri tarafından kodlanan alfa bölgelerinin tahmini mRNA dizileri (A) ve amino asit dizilerinin hizalanması (B)..	184
Şekil 4.74. YK1- 34. örneklerinde DYB-E3 bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü.....	186
Şekil 4.75. YK-DYB-E3 bölgesinin ileri primer ile elde edilen nükleotid dizisine ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir.	187
Şekil 4.76. Referans DYB-E3 (AY957499.1) ve YK-DYB-E3 bölgesinin konsensüs dizilerinin hizalanmasının bir kısmı.	187
Şekil 4.77. Nükleotid konsensüs dizilerinden mRNA bölgesinin elde edilmesi ve aa dizilerinin belirlenmesi	188
Şekil 4.78. YK1-DYB-PR'nin sahip olduğu, beta ve immunoglobülin domainleri.....	189
Şekil 4.79. BoLA-DYB alleli tarafından kodlanan alfa bölgelerinin tahmini amino asit dizilerinin hizalanması.	190
Şekil 4.80. BoLA-DYB konsensüs dizilerinin filogenetik ağaçları.	191
Şekil 4.81. Yerli kara ve diğer Bovidae ailesi türlerindeki DYB-E3 bölgelerinin filogenetik ağacı.....	192
Şekil 4.82. YK1-24 nolu örneklerinde LMP2-E2 bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü ve YK1-19 nolu örneklerinde LMP7-E3, 4, 5 bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü.	194
Şekil 4.83. YK-LMP2-E2 (A) ve YK-LMP7-E3,4,5 (B) bölgelerinin ileri primer ile elde edilen nükleotid dizisine ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir.	195
Şekil 4.84. Referans BoLA-LMP2 ve BoLA-LMP7 (AY957499.1) ile birlikte YK-LMP2-E2 (A) ve YK-LMP7-E3,4,5 (B) bölgeleri konsensüs dizilerinin hizalanmasının bir kısmı.	196
Şekil 4.85. Nükleotid konsensüs dizilerinden mRNA bölgesinin elde edilmesi ve aa dizilerinin belirlenmesi.	198
Şekil 4.86. Nükleotid konsensüs dizilerinden mRNA bölgesinin elde edilmesi ve aa dizilerinin belirlenmesi.	200
Şekil 4.87. YK1-LMP2-PR (A) ve YK1-LMP7-PR'nin (B) sahip olduğu domain, kırmızı renkle gösterilen proteazom beta domainlerini göstermektedir.	201
Şekil 4.88. BoLA-LMP2 alleleri tarafından kodlanan bölgelerin tahmini amino asit dizilerinin hizalanması.....	202

Şekil 4.89. BoLA-LMP7 alleleri tarafından kodlanan bölgelerin tahmini amino asit dizilerinin hizalanması.....	203
Şekil 4.90. BoLA-LMP2 ve BoLA-LMP7 konsensüs dizilerinin filogenetik ağaçları... ..	204
Şekil 4.91. Yerli kara ve diğer türlerdeki LMP2 ve LMP7 bölgelerinin filogenetik ağaç.....	205



ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Farklı omurgalı türlerindeki MHC bölgelerinin kromozom lokasyonları.....	15
Çizelge 1.2. BoLA- Sınıf IIa genlerinin moleküler özelliği	29
Çizelge 1.3. BoLA- Sınıf IIb genlerinin moleküler özelliği.....	31
Çizelge 2.1. Farklı BOLA-DRB3.2 Alellerinin Sığır Irklarındaki Gen Frekansları.	52
Çizelge 2.2. Farklı hastalıklarla ilişkili BoLA alelleri.....	54
Çizelge 3.1. BOLA-Sınıf II lokusu gen bölgelerine özgü tasarlanmış primer dizileri.....	64
Çizelge 3.2. Primerlerin optimizasyonu için kullanılan gradient PZR şartları.....	65
Çizelge 3.3. Tezde kullanılan mikroorganizma ve vektörlerin genel özellikleri.....	68
Çizelge 4.1. YK-DMA-E2,3,4 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.....	83
Çizelge 4.2. DMA bölgesinden transkripte olan mRNA nükleotid dizisi.....	85
Çizelge 4.3. DMA-E2,3,4 bölgesinin dizisine göre DNA polimorfizm özellikleri.....	88
Çizelge 4.4. YK-DMB-E2 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.....	94
Çizelge 4.5. DMB bölgesinden transkripte olan mRNA nükleotid dizisi	95
Çizelge 4.6. DMB-E2 bölgesinin dizisine göre DNA polimorfizm özellikleri.....	98
Çizelge 4.7. YK-DQA1-E2 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.....	104
Çizelge 4.8. YK-DQA2-E3 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.....	106
Çizelge 4.9. YK-DQA5-E2 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.....	109
Çizelge 4.10.1. DQA1 bölgesinden transkripte olan mRNA nükleotid dizisi.....	112
Çizelge 4.10.2. DQA2 bölgesinden transkripte olan mRNA nükleotid dizisi.....	113
Çizelge 4.10.3. DQA5 bölgesinden transkripte olan mRNA nükleotid dizisi.....	114
Çizelge 4.11. DQA1-E2, DQA2-E3 ve DQA5-E2 bölgelerinin dizisine göre DNA polimorfizm özellikleri.....	120
Çizelge 4.12. YK- DQB-E2 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.....	128
Çizelge 4.13. DQB bölgesinden transkripte olan mRNA nükleotid dizisi.....	129
Çizelge 4.14. DQB-E2 bölgesinin dizisine göre DNA polimorfizm özellikleri.....	131
Çizelge 4.15. YK-DRA-E2 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.....	138
Çizelge 4.16. DRA bölgesinden transkripte olan mRNA nükleotid dizisi.....	139
Çizelge 4.17. DRA-E2 bölgesinin dizisine göre DNA polimorfizm özellikleri.....	140
Çizelge 4.18. YK-DRB2-E2 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.....	145
Çizelge 4.19. DRB2 bölgesinden transkripte olan mRNA nükleotid dizisi	146
Çizelge 4.20. DRB2-E2 bölgesinin dizisine göre DNA polimorfizm özellikleri.....	149
Çizelge 4.21. YK-DRB3-E2 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.....	155
Çizelge 4.22. DRB3 bölgesinden transkripte olan mRNA nükleotid dizisi	159

Çizelge 4.23. DRB3-E2 bölgesinin dizisine göre DNA polimorfizm özellikleri.....	163
Çizelge 4.24. YK-DYA-E1 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.....	173
Çizelge 4.25. YK-DYA-E2 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.....	173
Çizelge 4.26. YK-DYA-E3,4 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.....	175
Çizelge 4.27. DYB bölgesinden transkriptte olan mRNA nükleotid dizisi.....	178
Çizelge 4.28. DYB bölgesinin dizisine göre DNA polimorfizm özellikleri	181
Çizelge 4.29. YK-DYB-E3 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.....	188
Çizelge 4.30. DYB bölgesinden transkriptte olan mRNA nükleotid dizisi.....	189
Çizelge 4.31. DYB-E3 bölgesinin dizisine göre DNA polimorfizm özellikleri.....	191
Çizelge 4.32. LMP2-E2 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.	197
Çizelge 4.33. LMP2 bölgesinden transkriptte olan mRNA nükleotid dizisi.	198
Çizelge 4.34. LMP7-E3,4,5 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.	199
Çizelge 4.35. LMP7 bölgesinden transkriptte olan mRNA nükleotid dizisi	200
Çizelge 4.36. LMP2-E2 ve LMP7-E3, 4, 5 bölgelerinin dizisine göre DNA polimorfizm özellikleri.....	203

EKLER DİZİNİ

Sayfa No

EK-1	251
------------	-----



EK ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Ek Şekil C.1. AgaroŐ jelde kullanılan DNA standartları	251
--	-----



EK ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Ek Çizelge A.1. Yerli Kara sığır ırkının genel özellikleri.	252
Ek Çizelge C.1. Yerli Kara sığır örneklerine verilen kodlar ve bazı özellikleri.....	254
Ek Çizelge C.2. BoLA-DMA-E2,3,4 Nükleotid konsensüs dizileri (1081 bç), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.	256
Ek Çizelge C.3. BoLA-DMB-E2 Nükleotid konsensüs dizileri (302 bç), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.	261
Ek Çizelge C.4.1. BoLA-DQA1-E2 Nükleotid konsensüs dizileri (310 bç), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.	263
Ek Çizelge C.4.2. BoLA-DQA2-E3 Nükleotid konsensüs dizileri (389 bç), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.	265
Ek Çizelge C.4.3. BoLA-DQA5-E2 Nükleotid konsensüs dizileri (338 bç), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.	267
Ek Çizelge C.5. BoLA-DQB-E2 Nükleotid konsensüs dizileri (374 bç), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.	269
Ek Çizelge C.6. BoLA-DRA-E2 Nükleotid konsensüs dizileri (305 bç), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.	271
Ek Çizelge C.7. BoLA-DRB2-E2 Nükleotid konsensüs dizileri (394 bç), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.	273
Ek Çizelge C.8. BoLA-DRB3-E2 Nükleotid konsensüs dizileri (414 bç), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.	275
Ek Çizelge C.9. BoLA-DYA-E1, E2 ve E3,4 Nükleotid konsensüs dizileri (E1:179 bç, E2: 316 bç, E3,4: 1159 bç), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.	277
Ek Çizelge C.10. BoLA-DYB-E3 Nükleotid konsensüs dizileri (307 bç), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.	284
Ek Çizelge C.11.1. BoLA-LMP2-E2 Nükleotid konsensüs dizileri (159 bç), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.	286

Ek Çizelge C.11.2. BoLA-LMP7-E3,4,5 Nükleotid konsensüs dizileri (1102 bç), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.	288
--	-----



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µl	: Mikrolitre
A	: Adenin; Alanin
aa	: Amino asit
Ac. No	: Accession Number
APC	: Antigen Presenting Cell
ARS	: Antigen Recognition Sites
B	: G, T veya C; Aspartat
bç	: Baz çifti
Bibi	: <i>Bison bison</i>
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
BLV	: Bovine leukemia virus
BoLA	: Sığır lökosit antijen
BRD	: Sığırların Solunum Sistemi Hastalık Kompleksi
BSE	: Deli Dana Hastalığı (Bovine Spongiform encephalopathy)
C	: Sitozin; Sistein
CaCl₂	: Kalsiyum klorür
CD	: Cluster of Differentiation
cDNA	: Complementary DNA
D	: G, A veya T; Aspartat
Da	: Dalton
DAD-IS	: Domestic Animal Diversity Information System
ddNTP	: Dideoksi nükleotit trifosfat
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
E	: Glütamik asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
Et-Br	: Etidium Bromür
F	: Fenilalanin
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
FMDV	: Foot and Mouth Disease Virus (Şap virüsü)
G	: Guanin; Glisin
H	: A, C veya T; Histidin
HLA	: İnsan lökosit antijeni

I	: İzolösin
IgG1-2	: Immunoglobulin G
IPD	: Immuno Polymorphism Database
JC	: Jukes-Cantor
K	: G veya T; Lizin
kb	: Kilobaz
KCl	: Potasyum klorür
kDa	: KiloDalton
KHCO₃	: Potasyum bikarbonat
KL	: Kalıcı lenfositoz
L	: Lösin
M	: A veya C; Metiyonin
Mb	: Megabaz
MgCl₂	: Magnezyum klorür
MHC	: Majör histokompatibilite kompleks
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
N	: A, G, C veya T; Asparajin
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NH₄Cl	: Amonyum klorür
NJ	: Neighbour joining
nm	: Nanometre
°C	: Santigrad derece
P	: Prolin
pH	: Potential of Hydrogen
pI	: İzoelektrik noktası
PL	: Persistent Lymphocytosis
pmol	: Pikomol
PZR	: Polimer Zincir Reaksiyonları
Q	: Glütamin
R	: G veya A; Arjinin

RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	: Ribonükleik Asit
S	: G veya C; Serin
SBT	: Sekans baz tiplendirmesi
SCC	: Somatik hücre sayısı
SCS	: Somatik hücre skoru
SDS	: Sodium Dodesil Sülfat
SNP	: Single-Nucleotide Polymorphism
sp.	: Tür
SSCP	: Single-Strand Conformation Polymorphism
T	: Timin; Treonin
TBE	: Tris, Borik asit, EDTA
TLR	: T lenfosit antijen reseptörü
TLR	: Toll Like Receptor
Tm	: Erime sıcaklığı
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
U	: Uridin
U	: Ünite
UPGMA	: Unweighed Pair Group Method of Arithmetic Averages
URR	: Upstream Regulatory Regions
UV	: Ultra viyole
V	: G, C veya A; Valin
v	: Hacim
W	: A veya T; Triptofan
X	: Herhangi bir amino asit
Y	: T veya C; Tirozin
YK	: Yerli Kara
YKD	: Yerli Kara DNA
YKÖ	: Yerli Kara Örnek
Z	: Glütamik asit/Glütamin
α	: Alfa
β	: Beta

1. GİRİŞ

Sığır, yük hayvanı olarak binlerce yıldır insanlar tarafından kullanılmasının yanı sıra boynuz, deri, süt ve eti kullanılmaktadır. İnsan göçleri ile sığırların hareketi, yabani sığır genlerinin geri melezlemesi ve seleksiyona dayalı ıslah programlarının özel kullanımları ve kendi karakteristikleri ile farklı ırklarda yüzlerce popülasyona yol açmıştır (Ellis ve Hammond, 2014). Dünya genelinde sığırcılıkta kullanılan genetik seçim programlarındaki amaç ekonomik özellikleri artırmaya yöneliktir ve çoğunlukla hastalıklara direnç göz ardı edilmektedir. Seleksiyon sırasında ihmal edilen hastalık direnci hayvanların bireysel performansı ve hastalıklar arasındaki istenilmeyen ilişki yüzünden ekonomik değerlerde düşüslere neden olabilir. Bu problemi çözmenin bir yolu hastalık direnciyle ilişkili genleri taşıyan inek ve boğalarda doğrudan seleksiyona gitmektir. Fakat şu ana kadar hastalıklara dirençle ilişkilendirilen çok az genetik marker tanımlanmıştır. Bu yüzden sığırlarda ki seleksiyon indekslerini geliştirmek için hastalıklara dirençli veya duyarlı ayrımı yapmaya olanak sağlayacak yeni markerlerin belirlenmesi son derece önemlidir. Sığır solunum hastalığı (BRD) her yıl hastalık endüstrisine yaklaşık 750 milyon dolara mal olmaktadır (Holland ve ark., 2010). Sığır süngerimsi beyin hastalığı (BSE=Delili Dana) salgınındaki tecrübeler göstermiştir ki endüstriye maliyeti milyonlarca doları bulmaktadır. 2004'deki BSE salgınının kabaca maliyeti Amerika'daki ihracat ve perakende ürünler üzerinde 3,3-4,7 milyar dolar olduğu tahmin edilmiştir (Pendell ve ark., 2007).

Genotip ve fenotip karakterlerine bakılarak oluşturulan FAO DAD-IS sisteminin 2007 verilerine göre çeşitli hastalıklara karşı direnç/toleransı bulunan 59 sığır cinsi, 33 koyun cinsi, 5 at cinsi ve 3 domuz cinsi belirlenmiştir (Jovanovic ve ark., 2009). Bu açıdan bakıldığında Yerli Kara ırkımız hastalık ve zararlılara karşı dirençli olması nedeniyle ülkemiz için çok değerli bir gen kaynağı olmasına rağmen günümüzde yanlış melezleme politikaları sonucu hızla azalmakta hatta yetiştirici elinde saf olarak neredeyse hiç kalmadığı düşünülmektedir. Diğer taraftan Kilis ırkı kene ve kan parazitlerinin meydana getirdiği hastalıklara dayanıklıyken, Yerli Güney Sarısı ve Boz ırkı hastalık ve zararlılara karşı oldukça dayanıklıdırlar, hastalandıkları takdirde çok hızlı iyileşirler, doğada hiçbir insan müdahalesi olmadan yaşama, beslenme ve üreme yeteneğine sahiptirler. Ayrıca Doğu Anadolu Kırmızısı şap vb. salgın hastalıklara karşı özellikle yaşlı hayvanlar çok dayanıklıdır. Anadolu Mandası şap hastalığının dayanıklıdır, kan parazitlerinin yol açtığı

hastalıklara direnç gösterir (Ün ve ark., 2008; Resmi Gazete 2004). Bu açıdan yerli sığır ırklarımız vazgeçilmez bir gen kaynağı olduğu anlaşılmaktadır.

Konakçı ve parazit arasında her zaman bir baskın gelme rekabeti söz konusudur. Konakçı ve parazit arasındaki ilişki özellikle enfeksiyon hastalıklarının dinamikleriyle ilişkilidir. Parazitin genetik varyasyonu, konakçı içerisinde zamanla uyum sağlar ve virülans özelliği konakçı ve parazit arasındaki birliktelik sürecinden güçlü bir şekilde etkilenebilir (Biek ve Real, 2010). Konakçı genomu işgalci patojene karşı koruyucu birçok mekanizmaya sahiptir ve her patojene karşı verilen immün cevabın bir hafızası oluşturulmaktadır. Bu mekanizmanın genel adı immün sistemidir. Bu sistemi, bireyleri patojen organizmalar tarafından enfeksiyona karşı korumak için geliştirmiştir, patojen olmayan organizmaları tolere eder ve kendinden olana saldırmazlar. Patojen organizmalar (bakteriler, virüsler ve parazitler), konakçının bağışıklık sistemini yenmek için bu sisteme paralel bir şekilde gelişirler. Patojenik organizmalar ile birey arasındaki bu savaşta, bir çoğu birbirini etkileyen hücreleri ve kimyasalları içeren bir bağışıklık sistemin gelişmesiyle sonuçlanmıştır. Omurgalılarda bağışıklık sistemi son derece karmaşıktır ve birbirini etkileyen iki bölünmeden oluşur, bunlardan ilki doğuştan gelen diğeri edinilmiş bağışıklık sistemidir. Doğal bağışıklık tepkisi (doğuştan gelen), işgalci patojenlere karşı spesifik olmayan, hızlı bir şekilde hareket eden ve enfeksiyona karşı birincil bir engeli oluşturan bir sistemdir. Bu sistemin en önemli ve hayati fonksiyonu, edinilmiş bağışıklık sistemindeki yanıtı başlatması ve yönlendirmesidir. Öte yandan edinilmiş bağışıklık yanıt patojene ilk maruz kalındığında yavaş hareket eder, ancak belirli hedefe yönelik bir şekilde hareket ettiği için, sonraki maruz kalınmalarda hızlı bir tepki başlatır. Son yıllardaki çalışmalarda bu iki sistemin birbirine yakın ilişkileri üzerine odaklanılmaktadır (Chaplin, 2010; Donia ve ark., 2017; Wang ve ark., 2017; Yatim ve ark., 2017).

1.1. Doğal (Doğuştan Gelen) Bağışıklık Sistemi

Doğal bağışıklık, antijenin vücutta görünmesinin hemen ardından, enfeksiyona karşı konakçıyı savunan, kalıtsal öğeleri içeren, evrensel ve spesifik olmayan savunma mekanizmalarını ifade eder (Cruvinel ve ark., 2010; Murphy ve Weaver, 2016). Bu mekanizmalar cilt (epitel tabaka), kan içindeki kimyasallar ve vücudun yabancı hücrelerine saldıran bağışıklık sistemi hücreleri gibi fiziksel engeller içerir (Janeway ve Medzhitov, 2002). Doğal bağışıklığı oluşturan tüm unsurların ortak özelliği, mikroorganizmaları tanıyarak cevap verirken, bunlar dışındaki maddelere karşı bir reaksiyon

oluşturamamalarıdır (Abbas ve ark., 2012). Doğal bağışıklık yanıtı, antijenin kimyasal özellikleri ile aktive edilir (Janeway ve Medzhitov, 2002). Temel hücresi lökositler (fagositler, makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreleri, mast hücreleri, eozinofiller, bazofiller ve doğal öldürücü hücreler) olan bu sistem bir patojen karşısında uzun süreli bir koruma sağlamaz (Cruvinel ve ark., 2010). Bu hücreler bütün patojenleri tanır, yutarak ya da temasa geçerek onları öldürürler, B ve T lenfositlerinin aktivasyonunu sağlayarak edinilmiş bağışıklık sistemini etkinleştirirler ve bu özelliklerinden dolayı son derece önemlidirler (Murphy ve Weaver, 2016).

1.2. Edinilmiş Bağışıklık Sistemi

Omurgalılar, patojenleri benzersiz olarak hedef alan savunma mekanizmalar geliştirmiştir (Janeway ve Medzhitov, 2002). Edinilmiş (adaptif) bağışıklık sistemi, antijene özgü immün yanıt anlamına gelir. Edinilmiş bağışıklık sisteminde reseptör üretme mekanizması, reseptör gen bölümlerinin çok sayıda değişkenlik ve düzenlenişini içerdiğinden, yabancı antijenler, immünolojik enfeksiyon belleği ve patojene özgü bağdaştırıcı proteinlerin spesifik olarak tanınmasını sağlayabilir (Chistiakov ve ark., 2016). Bununla birlikte, edinilmiş bağışıklık yanıtı alerji, otoimmünite ve doku aşılarının reddinden sorumludur. Edinilmiş bağışıklık sistemi, doğal bağışıklık sisteminden daha karmaşıktır. Antijen önce işlenip daha sonra lenfosit antijen reseptörü ile tanınmalıdır (Abbas ve ark., 2012). Bir antijen tanımlandıktan sonra, edinilmiş bağışıklık sistemi bu antijene saldırmak için özel olarak tasarlanmış bir bağışıklık hücresi ordusu oluşturur. B (Plazma hücreleri & Bellek B hücreleri) ve T (Sitotoksik/Öldürücü - Yardımcı - Düzenleyici T hücresi) lenfositleri tanıdıkları antijenler açısından farklılık gösterir (Murphy ve Weaver, 2016). Bir patojene ilk maruz kaldıktan sonra edinilmiş bağışıklık sistemi hafıza hücreleri üretilir ki bu hücreler patojene maruz kalınması üzerine gelecekteki yanıtları daha verimli hale getiren bir "bellek" içerir ve bu bellek hücreleri sayesinde daha hızlı ve güçlü bir cevap oluşturularak yok edilir (Cruvinel ve ark., 2010).

İmmün sistem için bu kadar önemli olan bu hücrelerin sayılarının da fazla olması beklenirken, herhangi bir antijene özgü lenfositlerin sıklığı 105 hücrede birdir. Çok düşük sayıdaki bu lenfositlerin, antijenlerin yerlerini belirleyip, cevap oluşturması ve farklı tip patojenlerle başa çıkması için immün sistemde antijenleri yakalayıp lenfositlere sunmak üzere bir sistem geliştirilmiştir (Cruvinel ve ark., 2010; Chistiakov ve ark., 2016). B ve T lenfositleri antijene özgü reseptör taşıyan tek hücre grubudur, B hücreleri humoral

bağıışıklığı düzenlerken, T hücreleri hücresele bağıışıklığı oluştururlar (Abbas ve ark., 2012). B hücre reseptörleri, çözünür antijenleri ve mikropların veya diğere hücre yüzeyindeki antijenleri tanırken, T lenfosit antijen reseptörleri (TLR) yalnızca lineer peptid yapıli antijenleri tanır, bu peptidler majör histokompatibilite kompleksi (MHC) adı verilen özel peptid sunan moleküllere bağılı durumdadır (Chistiakov ve ark., 2016).

1.3. Büyük Doku Uygunluk Kompleksi (MHC: Major Histokompatibilite Kompleksi)

Büyük doku uygunluk kompleksi (MHC: Major Histokompatibilite Kompleksi) immünolojik ve immünolojik olmayan fonksiyonlara sahip gen kümelerinin birbirlerine sıkıca bağılandığı bir bölgedir ve çenesiz omurgalıları dışındaki tüm omurgalılarıda immün sisteminin temel kısmını oluşturur (Edwards ve Hedrick, 1998; Tizard, 2004; Gowane ve ark., 2013). Omurgalılarıda bulaşıcı hastalıklara dirençlilik için en önemli genetik sistemlerden birisini oluşturan bu sistemin yapı, fonksiyon ve farklılığın tanımlanması, omurgalı türlerinde immün yanıt mekanizmasının anlaşılabilmesi için önem arz etmektedir (Hill, 1998; Hedrick ve ark., 2000; Behl ve ark., 2012).

1.3.1. MHC'nin keşfi

Bilim adamları, büyük doku uygunluk kompleksi (MHC)'ni genleri, evcil fare ve tavşanların kullanıldığı, doku naklinin reddi için yapılan çalışmaların, biyolojik temelinin araştırılması sırasında keşfedilmişlerdir (Dustin, 2002). Little ve Tyzzer (1916), farelerde tümör nakli gerçekleştirmiş ve tümörlerin bazı fareler arasında nakledilirken bazıları arasında reddedildiğini belirlemişlerdir. Birçok dominant Mendel faktörünün farelerdeki tümör greftlerinin (greft; vücuttaki herhangi bir dokunun, vücuttaki başka bir bölgeye nakil edilmek amacıyla, bu dokuyu besleyen damar ve sinir bağılantısı olmadan alınmasıdır) direncini etkilediğı ve böylelikle ilk kez nakil reddinin sorumlusu genetik temelli olduğu gösterilmiştir (Little ve Tyzzer 1916). Bu hipotezi doku nakli sırasında donör ve alıcının tek yumurta ikizleri olduğunda doku naklinin reddedilmediğininin belirlenmesi ve 1950'de böbrek yetmezliğı olan bir hasta ikiz kardeşinden başarılı bir şekilde böbrek nakli sonrası kurtarılmasıyla desteklenmiştir (Bauer, 1927; Hume ve ark., 1955). George Snell, konjenik fareleri kullanarak yaptığı nakil çalışmalarında MHC'yi keşfetmiştir (Snell 1948; Snell ve Higgins 1951). Gorer MHC'yi "Antijen II" olarak adlandırırken, Snell "Histokompatibilite Lokusu" veya "H lokusu" olarak isimlendirmiştir. Terimleri bir araya getirilerek farelerdeki MHC "Histokompatibilite İki" olarak adlandırılmış ve "H-2"

olarak kısaltılmıştır (Gorer ve ark., 1948). H-2 tanımı bugün hala farelerdeki MHC için kullanılmaktadır (Ellis ve ark., 2006).

Daha sonraki çalışmalarda doku reddine neden olan histokompatibilite genlerinin aynı kromozom üzerinde birbirleriyle bağlantılı olarak bulunduğu gösterilmiş ve bu sisteme MHC (büyük doku uygunluk kompleksi) adı verilmiştir (Dustin, 2002). Gen içeriği ve işlevine dayanılarak MHC Sınıf I, Sınıf II ve Sınıf III olmak üzere üç alt bölgeye ayrılmıştır. MHC Sınıf I moleküllerinin serolojik tiplendirmesi farelerde 1930'lerden sonra başlamasına karşın (Gorer, 1936), benzer çalışmalar insanlarda 1970'de yoğunlaşmaya başlamıştır, bu süre zarfında MHC'nin gerçek immünolojik fonksiyonları, bağışıklık cevaplarının MHC molekülleri ve T lenfositleri arasındaki etkileşim ile kontrol edildiği saptanmıştır (Van Rood ve ark., 1968). İnsan büyük histokompatibilite kompleksi adı veya insan lökosit antijeni (Human Leukocyte Antigen; HLA), insanlardaki beyaz kan hücrelerinin (lökositlerin) başka bir kişiye transfüzyonu (kan aktarımı) sonrasında aglütine olmasından gelmektedir (Chalmers ve ark., 1959; Dausset ve ark., 1954). Bu nedenle, insan lökosit antijenleri başlangıçta verici antijenler olarak tespit edilmiştir ve bunlar transplantların (doku nakilleri) alıcılar tarafından reddedilmesine neden olmuştur (Dustin, 2002).

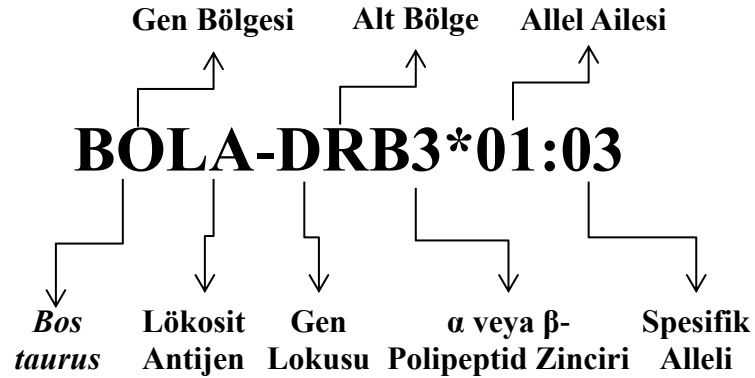
Jean Dausset (1958), ilk olarak bir MHC antijenini tarif etmiş ve "MAC" olarak adlandırmıştır, bugün bu antijen HLA-A2 olarak bilinmektedir (Dausset, 1958). Baruj Benacerraf (1981), ise MHC genlerinin immün cevapla bağlantılı olduğunu belirtmiştir (Benacerraf, 1981). Dausset tarafından belirlenen HLA-A2 allelinden sonra sınıf I molekülünün üç-boyutlu yapısı tanımlanmıştır ve sınıf I molekülleri ve T hücrelerinin etkileşimi ortaya çıkarılmıştır (Bjorkman ve ark., 1987a; Bjorkman ve ark., 1987b). CD8+ T hücrelerinin sitotoksik işlevinin MHC sınıf I molekülleri ile sınırlı olduğunun keşfinden sonra ve benzer bir durumun MHC sınıf II molekülü ile CD4+ T hücreleri arasında da görüldüğü rapor edilmiştir (Zinkernagel ve Doherty 1975; Stern ve ark., 1994; Swierkosz ve ark., 1978).

"MHC kısıtlaması" T hücre reseptörüyle eşleşen MHC molekülü bir antijene bağlı olduğu süre boyunca bir T hücresi uygun antijeni tanıyamaz ve uygun bir şekilde cevap oluşturamaz anlamına gelmektedir (Zinkernagel ve Doherty, 1997). MHC kısıtlamasının keşfi MHC araştırmalarında önemli bir dönüm noktası olmuştur çünkü doku nakillerindeki kritik kısmı oluşturan kazanılmış bağışıklık yanıtındaki MHC nin rolünün anlaşılmasını genişletmiştir (Doherty ve Zinkernagel 1975b). Bununla birlikte, modern tıpta nakil

reddedilmesinde MHC'nin rolünün fark edilmesi önemli bir etki yapmıştır. 1960'ların başlarında, doktorlar başarılı organ nakilleri için donör ve alıcılardaki HLA allellerini eşleştirilmesinin önem arz ettiği belirlenmiştir (Terasaki, 1991). Daha sonrasında MHC moleküllerinin hücresel yanıtı ilaveten bir antikor aracı olduğu tespit edilmiştir. 1980'li ve 1990'lı yıllarda, MHC moleküllerinin yapısı X-ışını kristalografisi çalışmaları ile ortaya çıkarılmıştır.

1.3.2. MHC'nin farklı türler için kullanılan terminolojisi (nomenklatür)

Büyük histokompatibilite kompleksine (MHC) farklı türlerde farklı isimler verilmiştir (Klein, 1986). Farede *H-2*, insanlarda *HLA*, evcil tavuklarda *B*, sıçanda *RT1* ve köstebekte *Smh* olarak adlandırılmıştır. İncelenen türlerin çoğunda, MHC'ye lenfosit veya lökosit antijeninden dolayı “*LA*” sembolü ile atıf yapılır, ön ek olarak da türlerin ortak isimleri kısaltılır. Örneğin, şempanze için *ChLA*, gorilde *GoLA*, rhesus maymununda *RhLA*, tavşanda *RLA*, evcil sığırlarda *BoLA*, domuzda *SLA* ve benzeri adlar verilir. Aynı şekilde allelerin adlandırılmasında kullanılan ilk harfler gen bölgesini, diğer harfler sırasıyla gen lokusu, alt bölgeyi, sonrasında harf ve rakam α veya β polipeptid zincirini, sonrasında gelen ilk iki rakam allel ailesini diğer iki rakam spesifik alleli gösterir (Cruvinel ve ark., 2010) (Şekil 1.1).

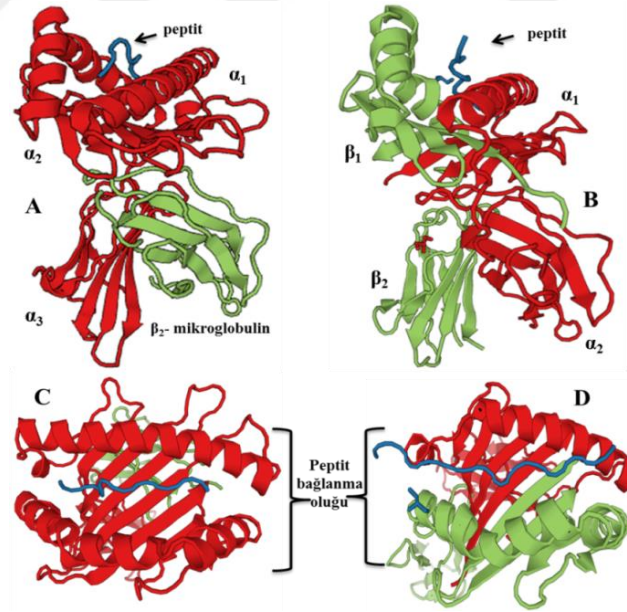


Şekil 1.1. Majör histokompatibilite kompleksinin spesifiklik ve allellerinin terminoloji yorumlanması için yol haritası (Cruvinel ve ark., 2010).

1.3.3. MHC'nin moleküler yapısı ve fonksiyonu

MHC molekülleri glikoproteinlerden oluşan peptit antijenlerini T lenfositlerine sunan membran proteinleridir (Behl ve ark., 2012; Dustin, 2002). MHC moleküllerinin 3 boyutlu yapısı X-ışını kristalografisi yardımıyla belirlenmiş ve antijen ile T-hücre reseptörlerinin interaksyonu ve peptit bağlanma bölgeleri açığa çıkartılmıştır (Garrett ve

ark., 1989; Brown ve ark., 1993). MHC molekülünün alt kısmında hücre zarına bağlanma bölgesi, üst kısmında ise ufak bir oluk bulunur ve bu bölge antijen bağlanma bölgesi olarak bilinir. İşte bu bölge küçük peptitlerin T hücrelerine sunulduğu yerdir. Antijen bağlama yeri, aynı zamanda peptid-bağlama bölgesi, peptit-bağlama oluğu, peptit-bağlanma alanı, antijen tanıma bölgesi veya antijen sunum bölgesi olarak ifade edilebilir. Antijen bağlanma alanının peptit yapısı belirlenir, epitoplara bağlanır ve bir immün cevabını etkilemek için T hücrelerine sunulur (Doherty ve Zinkernagel 1975b; Stern ve ark., 1994). MHC molekülleri iki ayrı polipeptid zincirinden oluşur, bunlar moleküler olarak ağır bir veya daha fazla olan alfa zincirleri ve onlardan daha hafif bir veya iki adet beta zincirleridir (Amills ve ark., 1998) (Şekil 1.2). MHC'nin immün regülasyonunda birden çok fonksiyonu olduğu keşfedilmiştir (Benacerraf ve McDevitt, 1972; Bonner, 1986; Penn ve Potts, 1999). MHC moleküllerinin fonksiyonları immünolojik fonksiyonlar ve immünolojik olmayan fonksiyonlar olmak üzere iki başlık altında ele alınabilir. İmmünolojik fonksiyonlar; transplantasyon, antijen işleme ve sunum, anti-tümör aktivitesinin aktivasyonu gösterilirken, immünolojik olmayan fonksiyonlar olarak steroidal metabolizmadaki (steroid hidroksilaz enzimini düzenlemesi) ve stres yanıtındaki (HSP70 gibi ısı şok proteinlerini kodlaması) rolü gösterilebilir (Stocki ve Dickinson, 2012; Garrido ve ark., 2016).



Şekil 1.2. MHC sınıf I ve MHC sınıf II moleküllerinin protein yapılarının karşılaştırılması (Ribbon diagramı). (A) MHC sınıf I molekülünün diagramı, (B) MHC sınıf II molekülünün diagramı, (C) sınıf I bağlanma oluğu, (D) sınıf II bağlanma oluğunu (α_1 bölgesi hariç tüm alanlar disülfür bağı ile dengelenir) göstermektedir (Deng ve Mariuzza, 2006; Ratcliffe, 2016; MHC Class I, Protein Data Bank: 5IB1, MHC Class II, Protein Data Bank: 4AEN ,<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

Gen kompozisyonları, sıra, düzen ve sekans farklılıkları türler arasında değişmekle birlikte tüm omurgalı genomları bir MHC lokusuna sahiptirler (Kelley ve ark., 2005). Memeli MHC lokusu I, II ve III olmak üç farklı bölüme ayrılır. Bu bölgelerin tamamı orantısız bir şekilde yüksek seviyede immün fonksiyonlarla ilişkili genlerden oluşur ki bu bölgelerde genellikle fonksiyonel gruplar bir arada kümelenmiştir (Traherne, 2008).

1.3.3.1. MHC sınıf I bölgesi ve molekülleri

Diğer bölgelere göre daha telomerik MHC sınıf I bölgesi (HLA sınıf I) yaklaşık 2 Mb'lık bir bölgeyi kapsar ve protein kodlayan genlere ek olarak birçok sessiz gen içerir. HLA sınıf I molekülleri sınıf Ia (klasik) molekülleri ve sınıf Ib (non-klasik) molekülleri şeklinde ikiye ayrılmaktadır (Shiina ve ark., 1999). Hem klasik sınıf Ia hem de non-klasik sınıf Ib genleri doğal katil hücreleri için ligandlar (bir biyomoleküle bağlanarak bir kompleks oluşturan bir bileşiktir) olarak görev yapabilirler (Braud ve ark., 1998; Sivori ve ark., 1996). İnsan vücudundaki çekirdekli hücrelerin her birisi 100 000'den fazla MHC sınıf I molekülü içerirler. Bunların fonksiyonu Sitotoksik T lenfositlere hücre içinden ki (endojen antijenleri) antijenleri sunmaktır (Takeshima ve Aida, 2006). Klasik sınıf Ia genleri polimorfiktir ve bunlar insan vücudunun hemen her yerinde görülen çekirdekli hücrelerde, transmembran glikoproteinleri şeklinde ifade edilirler (Daar ve ark., 1984). CD8+T ve doğal katil hücrelere kısa antijenik peptidleri sunarlar (Townsend ve ark., 1985). Böylece hücre içindeki patojenlerin varlığını belirleyerek bağışıklık sistemini uyarırlar (Trowsdale, 2001). Bu durum, dendritik hücreler tarafından antijen sunumunda birlikte rol alırlar bunun anlamı, uyarlanabilir ve doğal bağışıklıktaki bağlantılarıyla kilit rol oynarlar (Schmidt ve ark., 2014; Joffe ve ark., 2012). Sınıf Ia molekülleri, viral hastalıklarda ve kanserlerde kendinden olan ve olmayan peptidleri ayırt ederek temel edinilmiş bağışıklık tepkisinde önemli bir rol oynar (Bjorkman ve ark. 1987b). HLA tüm haplotip üzerinde mevcut olan üç klasik sınıf Ia loci içerir (HLA-A, HLA-B ve HLA-C) (Cao ve ark., 2001; Horton ve ark., 2008). MHC sınıf I genleri insanlarda eş seçimi ve gebelik sonucu gibi diğer alanlarla da ilişkilendirilmişlerdir (Ruff ve ark., 2012). Sınıf Ib klasik olmayan moleküller (HLA-E, HLA-F ve HLA-G), T hücrelerine korunmuş mikrobiyal epitopları sunarlar ve sınırlı doku ekspresyonu sergileme ve çok polimorfik değillerdir (Koller ve ark., 1988; Geraghty ve ark., 1990; McMaster ve ark., 1995). Sınıf I bölgesi içerisindeki diğer genler, MOG (Myelin oligodendrocyte glycoprotein: Miyelin Oligodendrosit glikoprotein) ; miyelin kılıfının bir parçası, MICA ve MICB; epitelde stres belirteci olarak kabul edilirler, HFE; demir seviyesinin düzenlenmesinde görev alan bir gen

ve BTN (butirofilin genleri); immüoglobülin süper ailesinin bir üyesi ve T hücrelerinin uyarılmasına yardımcı görevleri bulunan genler gösterilebilir (Zai ve ark., 2004; Bahram ve ark., 1994; Feder ve ark., 1996; Rhodes ve ark., 2001).

MHC sınıf I molekülleri, ağır bir alfa zinciri (45 kDa) ve hafif bir β 2 mikroglobulini zinciri (12 kDa) içerirler ve bu zincirler üç tane ekstraselüler alfa domaininden, bir adet transmembran bölgesi ve bir de sitoplazmik domaininden oluşurlar (Bjorkman ve ark., 1987b). Polimorfik olan bölge alfa bölgesidir, polimorfik olmayan β 2 mikroglobulini MHC dışındaki (15. İnsan Kromozomunda) bir bölgede bulunan genler tarafından kodlanır ve non-kovalent bağ ile bağlanır (Goodfellow ve ark., 1975). Alfa bölgesini oluşturan α 1, α 2 ve α 3 bölgelerinden, en polimorfik olan α 1 ve α 2 özellikle peptit bağlayıcı bölgeyi oluştururlar (Bjorkman ve Parham, 1990; Flutter ve Gao, 2004). Non-polimorfik olan α 3 bölgesi MHC I molekülünün CD8+T hücrelerine bağlanmasını sağlar. Oldukça korunumlu α 3 ve β 2 mikroglobulin alanları disülfid bağı ile birleştirilen iki anti-paralel β -tabakadan oluşurlar (Becker & Reeke, 1985; Bjorkman ve ark., 1987a; Cunningham ve ark., 1975). α 3 ve β 2 mikroglobulin domainleri hücre zarı yakındırlar ve sınıf I moleküllerinin peptit bağlayıcı yarığını oluşturan aşırı değişken α 1 ve α 2 domainleri için destek görevi görürler. α 1 ve α 2 domainlerinin üçüncül yapıları benzerdir, her biri, C-ucunda uzun bir α -sarmal bölge olan dört anti-paralel β -zincirinden oluşur. α 1 ve α 2 domainindeki sekiz β -zinciri büyük bir β -tabakasını oluşturur, bu yapı peptit bağlanan yarığın taban kısmıdır ve iki α -heliks yarığın çevresel sınırlarını oluşturur. Peptidler, genellikle uzunluk olarak 8 ila 10 amino asitten oluşurlar, hücre yüzeyine ulaşmaları öncesinde sınıf I molekülü ile stabilize edilirler. Bu peptidler kendi proteinlerinden türetilbilirler veya enfekte olmuş hücrelerdeki patojen proteinlerinden olabilir (Townsend ve ark., 1985; Davis ve Bjorkman, 1989). Sonrasındaki durumda peptit/MHC kompleksi CD8+T hücreleri tarafından tanınması bir bağışıklık tepkisi başlatabilir. İki polimorfik domain tarafından oluşturulan peptit bağlanma bölgesinin değişken doğası sayesinde, her MHC alleli peptidlerle kısıtlı bir diziye bağlanacaktır, bu peptidler birkaç yapışkan bölgeleri ile karakterize edilirler (Saper ve ark., 1991). Bir bireyde, her sınıf I geninin iki farklı alleli ifade edebilir. İnsanlar üç klasik sınıf I geni taşıdıklarından her birisi kendi peptit bağlayıcı özelliklerine sahip maksimum altı ayrı allel ile ifade edilir (Bodmer, 1987). Bu güne kadar insanlarda HLA sınıf I allel sayısı 11,553 olarak belirlenmiştir (<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>).

1.3.3.2. MHC sınıf II bölgesi ve molekülleri

Sentromerik MHC sınıf II bölgesinin tamamı yaklaşık 0.7 Mb yayılan ve klasik sınıf II genlerinin (HLA -DQ, -DR ve -DP) yanı sıra, sessiz genleri ve LMP1, LMP2, TAP1, TAP2 gibi antijenlerin işlenmesinde görevli genleri içermektedir (Yuhki ve ark., 2007). Bu klasik sınıf II genleri, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi antijen sunan hücrelerin yüzeyi üzerinde sentezlenen glikoproteinleri kodlarlar. Klasik sınıf II moleküllerinin temel görevi humoral immün tepkisini başlatmak için CD4 + yardımcı T hücrelerine kısa ekzojen peptitleri sunmaktır (Hughes ve Nei, 1990). Sınıf II klasik ve klasik olmayan genlerinde α/β gen çiftleri bulunur, ve burdaki her bir gen, bir alfa (30-34 kDA) veya beta zincirini (26-29 kDA) kodlar, ki bunlar transmembran heterodimerik α/β proteini oluştururlar (Stern ve ark., 1994; Wan ve ark., 2009). MHC sınıf I moleküllerine benzer şekilde, hücre yüzeyine yakın alanlarda α_2 ve β_2 alt birimleri ki bunlar immünoglobülin benzeri yapılardır ve α_1 ve β_1 alanları ise MHC sınıf I α_1 ve α_2 bölgelerine benzemektedir. Her iki zincirin amino ucunda bulunan α_1 ve β_1 alt birimleri oldukça polimorfik noktaları içerirler ve 10-30 amino asit uzunluğunda peptidlerin yerleşebileceği büyüklükte bir peptid bağlama oluğu oluştururlar. Değişken olmayan β_2 alt birimi T hücre eş-reseptörü CD4'ün bağlanma noktasını içerir. CD4 yalnızca sınıf II MHC moleküllerini bağladığı için CD4+ T hücreleri yalnızca sınıf II MHC moleküllerinin sunduğu peptidlere yanıt verebilir (Abbas ve ark., 2012).

Sınıf II molekülleri, makrofaj gibi uzmanlaşmış antijen sunum hücreleri üzerinde ifade edilirler (Vogt ve ark., 1997). Temel fonksiyonları yardımcı T hücrelerine peptit sunmaktır. Yardımcı T hücreleri, makrofajlar ve B lenfositlerini aktive etmekte dahil birçok önemli rolleri vardır. Makrofajların görevi ekstrasellüler virüsleri, bakterileri ve diğer paraziter işgalcilerin bağışıklık hücreleri tarafından sunulan parçalarını bulmak ve yok etmektir. Ayrıca makrofajlar patojenleri sindirirler ve yardımcı T hücrelerine peptit örneklerinin sunumunda sınıf II moleküllerini kullanırlar. Yardımcı T hücreleri CD4 moleküllerine sahiptirler bunlar sunum sırasında etkileşimle yüzey stabilizasyonunu sağlarlar. Peptidler yabancı olarak tanımlandığında, yardımcı T hücreleri diğer makrofajlar aktive ederler. Sınıf II molekülleri, B hücrelerinde ifade edilir. Bir B hücresinin yüzeyinde yer alan bir immünoglobulin yabancı bir antijenine bağlandığı zaman, B hücrelerinde çoğalma geçirir ve antikör salgılayan plazma hücreleri haline gelirler. Antikörler bağlanır ve yabancı istilacıları etiketlerin böylelikle bağışıklık sistemi verimli bir şekilde onları ortadan kaldırabilir. Fakat bir B hücresi aktive hale gelmeden önce, yardımcı T hücreleri

tarafından yabancı bir antijenin sunulması gereklidir (Abbas ve ark., 2012; Ratcliffe, 2016).

MHC sınıf II bölgesindeki genlerin bir çoğu polimorfiktir fakat HLA tek bir monomorfik DRA geni ve farklı HLA haplotipleri arasında değişken sayıda DRB genlerini içerir (Hughes ve Nei 1990). Klasik olmayan HLA -DM ve -DO genler klasik sınıf II molekülleri üzerine peptidlerin uygun yüklemesi ile ilgilendirler (Wan ve ark., 2009). HLA sınıf II bölgesi birkaç tane sessiz gen içerir; sınıf I molekülleri ile ilişkili TAP1 ve TAP2 taşıyıcı genleri; PSMB8 ve PSMB9 proteazom genleri; Tapasin kodlayan bir TAPBP geni, sınıf I antijen sunumu ile ilişkili bir şaperon molekülü; ve BTNL2, immünoglobülin superfamilyasının bir üyesidir (Rhodes ve ark., 2001; Wan ve ark., 2009). Bu güne kadar insanlarda HLA sınıf II allel sayısı 4,082 olarak belirlenmiştir (<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>).

1.3.3.3. MHC sınıf III bölgesi ve molekülleri

HLA sınıf III bölge sınıf I ve II bölgeler arasında sıkışmış bir bölgedir ve hem doğuştan hem de edinisel bağışıklıkta rolleri bulunan, bununla birlikte hiçbir belirgin immünolojik fonksiyonu olmayan proteinleri kodlayan genlerin (yaklaşık 900 kb genomik dizide 60'dan fazla geni kodların) heterojen bir koleksiyonu içerir (Yu ve ark., 2000). Bu bölge, MHC sınıf I ve sınıf II bölgelerinden daha heterojen bir gen seti içerir. Sınıf III bölgesinin gen içeriği ve organizasyonu farklı türler arasındaki tüm MHC bölgelerinin en korunmuş olanıdır (Xie ve ark., 2003). Bu genlerin fonksiyonları arasında, inflamasyon ve hücre stresi, hormonal sentez, ısı şoku proteinleri, hücre dışı matris organizasyonu ve immünoglobulin süper ailesi gösterilebilir (Hauptmann ve Bahram, 2004). İnsanlarda sınıf III bölgesi tamamlayıcı rol oynayan genleri içerir (C2, CFB, C4A ve C4B); hormonal sentez, CYP21; inflamasyon ve hücre stres, NFKBIL1, LTA, TNF α , LTB, LST1, NCR3, AIF1; ısı şok proteinleri HSPA1A, HSPA1B, HSPA1L; hücre dışı matriks organizasyon, TNX; düzenleyici reseptörler NOTCH4 ve AGER; ve immünoglobulin superfamily LY6G5B ve LY6G6C (Carroll ve ark., 1984; Yu ve ark., 2000). HLA sınıf III bölgesi tüm insan genomunda gen açısından en yoğun bölümdür, 700 kb alana 60 gen yayılmıştır, buda yaklaşık 12,9 kb her bölgeye bir gen demektir (Xie ve ark., 2003). HLA diğer bölgelerin aksine, sessiz genler sınıf III bölgesinde hemen hemen yoktur (Xie ve ark., 2003). Tamamlayıcı genler sınıf III bölgesinin en polimorfik olanlarıdır (Polimorfik genler (çok biçimli), her lokusta birden fazla alele sahiptirler) ve HLA haplotiplerinde C4 geninin sayısı iki ile altı kopya olarak değişebilir (Schneider ve ark., 1986; Yang ve ark., 2007).

1.3.4. MHC'nin insanlar ve farklı memeli türlerindeki genomik organizasyonu

MHC lokusu tüm hayvanlarda bulunan, kromozom üzerinde 200'den fazla kodlanan loci içeren bir gen koleksiyonudur (Dustin, 2002). MHC bölgesi tüm spesifik immün yanıtları kontrol eden sınıf I ve II genlerinin yanında büyüme, gelişme, üreme, koku ve koku alma duyusunu etkileyen birçok gen içerir. Bağışıklık sistemini kontrol eden sınıf I ve II MHC loci omurgalılar arasında bilinen en yüksek polimorfik genler bulundurulur. Mevcut MHC genetiği bilgisi öncelikle insan MHC veya insan lökosit antijeni (HLA) ve fare MHC (H-2 genleri) çalışmalarına dayanmaktadır. Sentromer'den telomere kadar MHC genleri genellikle sınıf I, sınıf II, sınıf III, genişletilmiş sınıf I ve genişletilmiş sınıf II bölgeler dahil olmak üzere benzer işlevleri olan bölgelere ayrılmıştır (Klein, 1977; Herberg ve ark., 1998; Stephens ve ark., 1999). Her bölgenin gen sayısı ve varlığı türler arasında değişir. Sınıf I bölgesi, klasik (Ia) ve klasik olmayan (Ib) genlerden oluşur. Klasik sınıf I molekülleri genelde CD8+ T lenfositlerine peptid antijenler, T hücresi reseptörleri vasıtasıyla sunulurken klasik olmayan genlerin fonksiyonları çeşitlidir (O'Callaghan ve Bell 1998; Williams ve ark., 2002). Her iki kategorideki üyeler doğal öldürücü hücreler üzerindeki reseptörler için ligand görevi yapabilir. Sınıf II moleküller, CD4+ T lenfositlerine antijenler sunabilir (Villadangos, 2001). Sınıf I bölgenin dönüşüm oranı genel olarak sınıf II bölgesinden daha büyük olarak gözlemlenmektedir (Takahashi ve ark., 2000). Sınıf III bölge, çeşitli bağışıklık ve bağışık olmayan genlerin oldukça yoğun bir seçimini içerir (Aguado ve ark., 1996; Xie ve ark., 2003).

İnsanlarda MHC ve non-MHC genleri (örneğin sitokin genleri ve doğuştan gelen bağışıklığın reseptör genleri) immünogenetik araştırmalarda ayrıntılı bir şekilde çalışılmıştır (Donaldson, 2004; Trowsdale ve Knight, 2013; Matzaraki ve ark., 2017). İnsan büyük doku uygunluk kompleksi (HLA), 6. kromozom üzerinde (6p21.1-21.3) 4 Mb'dan fazla alana yayılmış, % 40'ı bağışıklık tepkisinde yer alan 120'den fazla geni kapsayan, insan genomundaki en yoğun ve en polimorfik gen bölgelerinden birini temsil eder (Mungall ve ark., 2003; Robinson ve ark., 2003). Şekil 1.3' de insan MHC'sinin, kromozom 6'daki temel genom organizasyonunu gösterilmiştir. HLA içinde birçok gen yabancı patojenleri belirlemek, kendinden olan ve kendinden-olmayan arasındaki ayrım yapabilme yeteneği ile doğal ve edinilmiş immün yanıtta önemli rol oynarlar (Ovsyannikova ve ark., 2006). Bu nedenle, en fazla bilinen otoimmün koşullar da dahil olmak üzere her hangi bir genomik bölgeden daha çok, bir çok hastalık HLA ile ilişkilendirilmiştir (Baschal ve ark., 2009). MHC içinde dizi varyasyonları hastalığa

HLA işlevsel olarak üç bölgeye ayrılmıştır (Sınıf I, II ve III). Bu bölgelerin tamamı orantısız bir şekilde dağılan yüksek seviyede immün fonksiyonlarla ilişkili genlerden oluşur ki bu bölgelerde genellikle fonksiyonel gruplar bir arada kümelenmiştir (Traherne, 2008) (Şekil 1.3). Bu kümelenme HLA genleri için bir avantaj olarak kabul edilebilir, şöyle ki benzer özelliklere sahip özelliklerde immün fonksiyonlar için ihtiyaç duyulan genlerin sekans değişim ve rekombinasyonu için hızlı bir şekilde çeşitlendirme ve gen ifadesinin koordinasyonu için benzer genlerin birlikte bulunması büyük bir avantajdır. Fakat bu avantaj aynı zamanda bu gen kümelerindeki polimorfik genlerin bağlantı dengesizliği seviyesinin artmasına neden olabilir (Traherne, 2008).

Sınıf II bölgesinde HLA-DP, -DQ ve -DR lokusu, çift olarak bulunur ve heterodimerik molekülün α - ve β -zincirlerini kodlar. Bu genlerden “-DR” bilinen en fazla polimorf allele (~900) sahip olmaktadır. Sınıf II bölgesinde sınıf II moleküllerin yanı sıra LMP ve TAP lokusu tarafından antijen alımına katkı sağlayan klasik olmayan HLA-DM ve -DO lokusları da bulunmaktadır (Kelley ve ark., 2005). LMP lokusu, proteozom kompleksinin bileşenlerini kodlar ve TAP proteinleri, tapasin proteini vasıtasıyla sınıf I moleküllerine yüklenmeden önce, ER membranı boyunca sitoplazmadaki antijen peptid taşınmasında yer alırlar (Rhodes ve Trowsdale, 1999; Mehra ve Kaur, 2003) (Şekil 1.4). İnsan sınıf I bölgesi, antijen sunan moleküllerin ağır zincirini kodlayan üç klasik gene (HLA-A, -B ve -C) ev sahipliği yapar, bunlar homolog klasik olmayan genler veya sınıf Ib genleri (HLA-E, -F ve -G) ve bir takım sessiz genlerdir. Fiziksel haritalama çalışmaları bu güne kadar 12 sessiz geni tanımlamış ve karakterize etmiştir. Bunlardan dördü tam olarak bulunurken, geri kalanlar kısaltılmış genler veya tekli intron-ekzon parçaları halinde görülmüştür (Geraghty ve ark., 1992). Filogenetik analizler, insan sınıf I sessiz genleri’nin, sınıf Ia genlerinin duplikasyonundan kaynaklandığını ortaya koymaktadır (Hughes, 1995). Bu iki bölge arasında doğuştan gelen bağışıklık sistemi işlevlerine karışan molekülleri kodlayan sınıf III bölge genleri vardır (Kelley ve ark., 2005). Kompleman sisteminin bileşenleri C2 ve C4 de sınıf III bölgesinden kodlanır (Klein ve Sato, 1998). Bununla birlikte, sınıf I ve sınıf II bölgelerinde olduğu gibi, sınıf III bölgesinde bulunan birçok genin, edinilmiş veya doğuştan gelen bağışık yanıtla ilgili bağlantıları açıklanmayı beklemektedir (Ratcliffe, 2016).

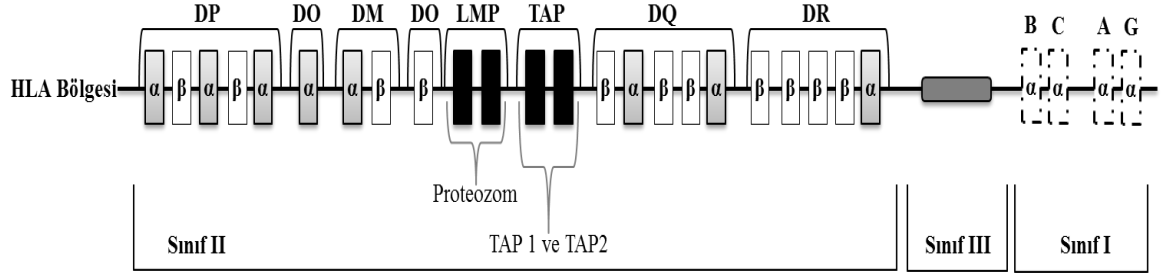
Çizelge 1.1. Farklı omurgalı türlerindeki MHC bölgelerinin kromozom lokasyonları.

Organizma	MHC	RefSeq (Ac.No)	Kromozom No. (Sayısı)	Büyüklik (Mb)	GC%	Gen Sayısı	Sessiz Gen Sayısı
İnsan (<i>Homo sapiens</i>)	HLA	NC_000006.12	6. Kromozom (2n: 46)	170.81	39.6	3 000	876
Fare (<i>Mus musculus</i>)	H-2	NC_000083.6	17. Kromozom (2n: 40)	94.99	42.9	2 005	427
Rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	RT1	NC_005119.4	20. Kromozom (2n: 42)	56.21	43.9	1 124	267
Kedi (<i>Felis catus</i>)	FLA	NC_018727.2	B2. Kromozom (2n: 38)	153	40.4	1 552	216
Köpek (<i>Canis lupus</i>)	DLA	NC_006594.3	12. Kromozom (2n: 78)	72.5	39.0	818	156
Domuz (<i>Sus scrofa</i>)	SLA	NC_010449.4	7. Kromozom (2n: 38)	134.76	43.8	2 595	177
At (<i>Equus caballus</i>)	ELA	NC_009163.2	20. Kromozom (2n: 64)	64.17	41.3	1 100	95
Tavuk (<i>Gallus gallus</i>)	BF-BL	NC_006103.4	16. Kromozom (2n: 78)	0.652338	54.0	115	5
Koyun (<i>Ovis aries</i>)	OLA	NC_019477.2	20. Kromozom (2n: 54)	51.05	43.6	1 022	75
Keçi (<i>Capra hircus</i>)	GLA	NC_030830.1	23. Kromozom (2n: 58)	48.87	43.8	990	98
Sığır (<i>Bos taurus</i>)	BoLA	AC_000180.1	23. Kromozom (2n: 60)	52.53	43.4	1 134	93

Omurgalıların en yakın yaşayan omurgasız akrabası olan ilkel omurgalı amphioxus da MHC bulunmaz (Castro ve ark., 2004). Ancak, edinilmiş (kazanılmış) bağışıklık fonksiyonları olmayan MHC genlerinin insan ortologları, *Branchiostoma floridae* amphioxus türünde bulunmuştur (Vienne ve ark., 2003). İnsan MHC ve amphioxus arasındaki bu iyi korunmuş genler " anchor genleri -bağlantı genleri" olarak adlandırılır. Anchor genleri içeren Amphioxus'un tek bir kromozomu içinde haritalanmıştır (Castro ve ark., 2004). İlginç olan dokuz MHC anchor geninin insanlarda üç farklı kromozomda (1., 9. ve 19. kromozomlarda) paralog olarak bulunmasıdır (Abi-Rached ve ark. 2002; Castro ve ark., 2004). Aynı zamanda bu anchor genleri plasentalılardaki MHC sınıf II ve Sınıf III genomik bölgelerinin mevcut pozisyonlarına karşılık gelmektedir. MHC sınıf I genleri plasentalılarda tek bir kromozom boyunca sınıf I, III ve II şeklinde düzenlenmişlerdir (Ohta ve ark., 2002). Tavuklardaki sınıf III bölgesi, sınıf I ve II bölgesinin dışında yer alan 92 kb'lık olan "en küçük temel MHC" bölgesidir (Kaufman ve ark., 1999). Aslında, Sınıf I ve II bölgelerinin Teleost balık (gerçek kemikli balıklar) (sınıf I ve II bölgeleri ayrı kromozomlar üzerindedir) hariç bugüne kadar rapor edilmiş olan tüm memeli olmayan türlerde birbirine bitişiktir (Sato ve ark., 2000). Teleost balıklardaki MHC yapısı, sınıf I ve II lokuslarının normal fonksiyonlarını yerine getirmesi için sınıf I ve II bölgesinin spesifik bir organizasyonuna gerek olmadığını göstermektedir. Bunun aksine köpek balıklarında MHC sınıf I ve II birlikte bulunur (Ohta ve ark. 2002) (Şekil 1.5).

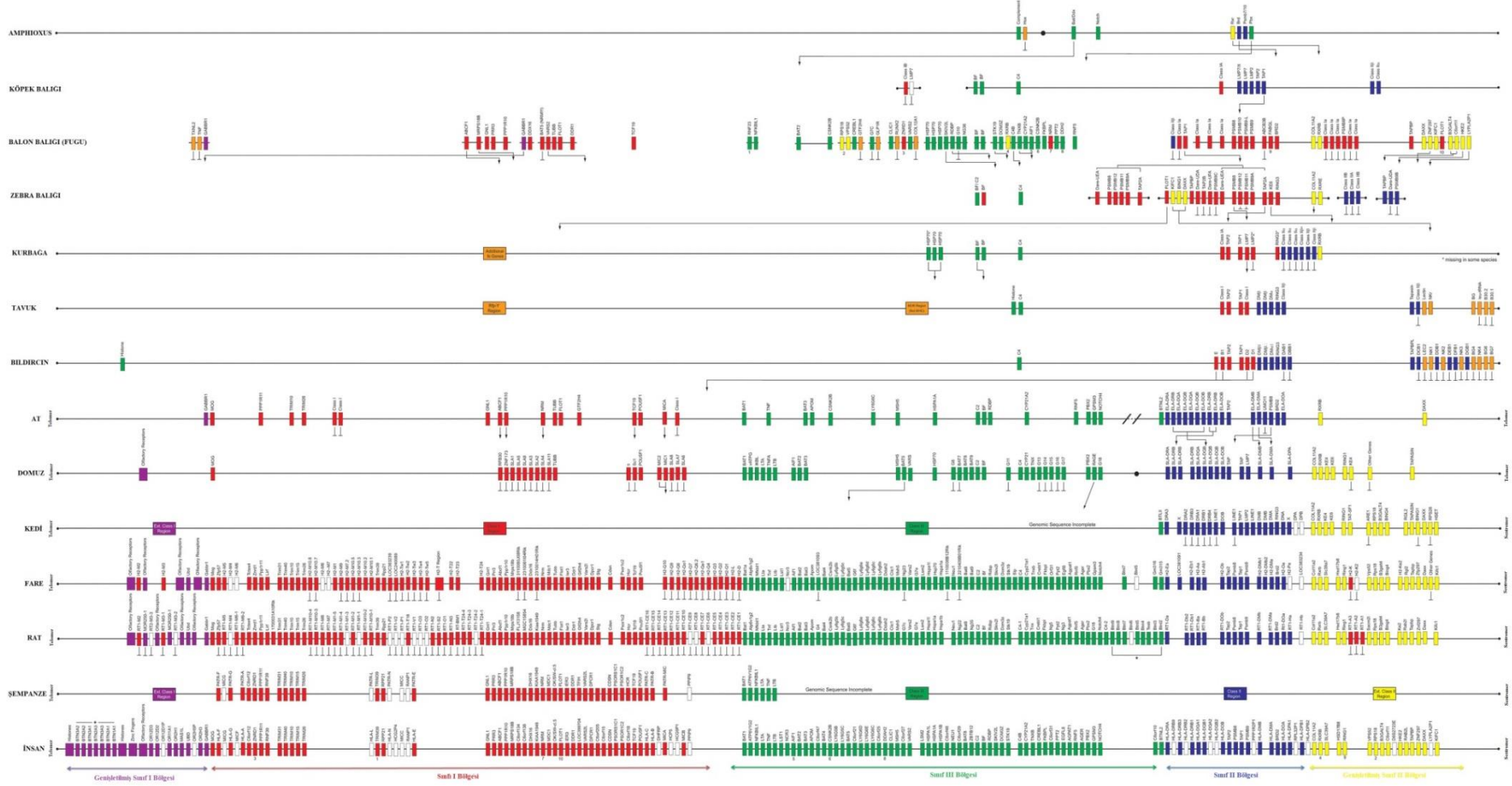
Sığır, domuz, monotremata'larda (tek delikli) ve keselilerde MHC farklı şekillerde olduğu görülmüştür, bunlarda sınıf I ve II genleri fonksiyonlarını koruyarak kromozom üzerindeki düzenlenmeleri farklı olabilmektedir. BoLA'da yaklaşık 20 Mb uzunluğunda, perisentrik konumda bulunan BoLA sınıf II bölgesi geniş bir inversiyon yer değiştirmesidir (Childers ve ark., 2006). Yer değiştiren bölge, BoLA IIb olarak adlandırılır, yaklaşık 450 kb uzunluğunda ve HLA klasik sınıf II ile homolog genler içerir ve bazı istisnalar dışında sınıf II bölgesi genişletilmiştir (Kelley ve ark., 2005). Domuzlarda, 7. kromozomda bulunan domuz lökosit antijen kompleksi (SLA) sınıf II bölgesi diğer MHC'lerden farklı olarak sentromer ile ayrılır ve sınıf II antijen genleri q kolunda bulunurken, sınıf I ve III genleri p kolunda bulunur (Smith ve ark., 1995). Plasentalılarda (memelilerde) sınıf I ve sınıf II bölgeleri karşılıklı olarak sınıf III bölgesinden ayrılmıştır (Belov ve ark., 2006). Kangurularda sınıf I genleri diğer canlıların aksine çok istisnai bir şekilde 6 farklı kromozoma dağılmıştır (Deakin ve ark., 2007). Sınıf I sessiz genleri insan sınıf II bölgesinde bulunur ve fonksiyonel veya fonksiyonel olmayan genler benzer şekilde

farelerde de sınıf II bölgesinde bulunmaktadır (Hurt ve ark., 2004). Plasentalılardaki MHC sınıf II bölgesi antijen işleyen genleri içerir (TAP1, TAP2, PSMB8 ve PSMN9) ki bu genler MHC sınıf I moleküllerinin sunumu için endojen peptitleri işler ve taşırlar. Homolog antijen işlem genleri memeli olmayanlarda sınıf I bölgesinde bulunurlar (Kaufman ve ark., 1999).



Şekil 1.4. Antijenlerin işlenmesi ve T lenfositlerine sunumundan sorumlu olan MHC lokusundaki genler ve MHC moleküllerini oluşturan α ve β zincir bölgeleri (Mehra ve Kaur, 2003).

Farklı omurgalı türleri arasında MHC içerisindeki genlerin yerleşimleri değişkenlik göstermektedir. Daha açık bir ifadeyle MHC bölgeleri farklı omurgalılarda farklı kromozomların, farklı kollarında ve farklı sayılarda genler içerirler. MHC genleri genellikle birlikte kümelenmiş halde bulundukları nedeniyle fonksiyonları kendi gruplamaları bozulsa bile değişme göstermez (Ohta ve ark., 2002). İnsanda (*Homo sapiens*) 6. kromozomda bulunan MHC bölgesi ve genleri (HLA), farelerde (H-2) 0 17., koyun (OLA) ve ratlarda (RT1) 20., tavuklarda (BF-BL) 16., keçi (GLA) ve sığırdan (BoLA) 23. kromozomlarda bulunur (Çizelge 1.1).



Şekil 1.5. Büyük histokompatibilite komplekslerinin karşılaştırmalı genomu. Genler, şeklin alt kısmında belirtildiği gibi ait oldukları bölgelere göre renklendirilmiştir. Mor renk; genişletilmiş sınıf I bölgesini, kırmızı renk; sınıf I bölgesini, yeşil renk; sınıf III bölgesini, mavi renk; sınıf I bölgesini, sarı renk; genişletilmiş sınıf II bölgesi (Kelley ve ark., 2005).

Plasentalı memelilerde DR, DQ ve DP sınıf II genleri ortaktır ve yardımcı T hücrelerine eksojen peptidleri sunmak için sınıf II moleküllerini kodlarlar (Wan ve ark. 2009). Birçok eutherian (plesantalı) 'da sınıf II bölgesi tek bir DRA genine sahiptir, fakat kedilerde 4 fonsiyonel DRA geni bulunur (Yuhki ve ark. 2008). Kedi MHC'si fonsiyonel DQ bölgesinden yoksundur ve sadece DP geninin homolog sessiz genine sahiptir (Yuhki ve ark., 2008). Ruminantlardaki MHC'ler fonsiyonel DYA ve DYB gen çifti ve bir veya iki fonsiyonel DQ gen çiftlerine sahiptir (Ballingall ve ark., 2004a; Sigurdardóttir ve ark., 1992). Atlar, iki ya da üç fonsiyonel DQ gen çiftine sahip olabilir ve dev pandalarda iki fonsiyonel DQ gen çiftleri bulunur (Fraser ve Bailey, 1998; Wan ve ark., 2009).

Dev pandalar, korunmuş sınıf II gen bölgelerini içeren diğer memeliler gibi (insanlar, kediler, köpekler, sığır, domuz ve fareler) sınıf II gen kümesine (DOB, TAP2, PSMB8, TAP1, PSMB9, DMB, DMA, BRD2, DOA) sahiptirler (Wan ve ark., 2009). Bu korunmuş sınıf II bölge içindeki genler arasına DO ve DM genleri dahildir, klasik olmayan sınıf II molekülleri ki bunlar klasik sınıf II molekülleri üzerine peptidler yüklenmesinde yardımcı olurlar; PSMB, sınıf I molekülleri tarafından sunulan peptitlere bağlanan bir proteazom alt ünitesini oluşturur; TAP, antijen işlenmesinde bir taşıyıcıdır; BRD2, bir mitojen aktive edici çekirdek kinaz ve BTNL2, immünoglobülin üst ailesinin bir üyesi (Wan ve ark., 2009). İnsan MHC'sinde birden çok DR, DQ ve DP genleri vardır. Bugüne kadar insan, HLA'da iki fonsiyonel DPA ve DPB genlerine sahip tek türdür (Wan ve ark., 2009). DM genleri sadece sınıf II kümesinde bulunduranlar memeliler, kuşlar, kurbağalar, kemikli ve kıkırdaklı balıklardır (Kumanovics ve ark., 2003).

MHC'de en korunumlu bölge MHC sınıf II bölgesidir, şu ana kadar tüm memeli türlerinde tespit edilmiştir, ayrıca deniz kestanesi gibi derisi dikenlilerde ve *C. elegans* ve *D. Melanogaster*'daki proteozomlara benzer homololojiye sahiptirler (Trachtulec ve Forejt, 2001; Danchin ve ark., 2003). Bu MHC sınıf III genlerinin MHC'nin genomik bölgesine özgün genler olduğunu ve edinilmiş bağışıklık sisteminin gelişimi sırasında şans eseri sıkışıp kaldığını göstermektedir. Sınıf I ve II MHC genleri sınıf III bölgesinde kendilerini konumlandırılmış ve daha sonra kopyalanmış, farklılaşmış ve günümüzdeki memelilerde görülen MHC genlerini oluşturmuşlardır (Kelley ve ark., 2005; Wan ve ark., 2009).

1.4. Sığır ve Hastalık Direncinin Önemi

Şimdilerde soyu tükenmiş olan 10 milyon yıl önce Neolitik dönemde coğrafik olarak yaygın olan yabani Auroch (*Bos primigenius*), modern sığır ırklarının atalarının

atası olarak kabul edilir (Beja-Pereira ve ark., 2006). Paleolitik kaya ve mağara resimlerinde tasvir edilen Aurochlar, insanlar için önemli bir besin kaynağı ve aynı zamanda ritüellerinde önemli bir rol almış olabileceğini göstermektedir (Götherström ve ark., 2005). Fosil kanıtları, Hindistan'daki öncü türlerin (*Bos acutifrons*) 1.5 ile 2 milyon yıl önce Aurochlardan evirildiğini ve sonrasında Avrupa ve Kuzey Afrika ya yayıldığını göstermektedir (Hassanin ve Douzery 1999; Pilgrim, 1947). Modern sığır ırkları arasındaki genetik varyasyon analizleri Aurochların sığır popülasyonlarına büyük bir etkisi olduğunu göstermektedir (Gibbs ve ark., 2009). Auroch'ların genetik bir şekilde ayrılan 3 alttür Avrupa (*Bos primigenius primigenius*), Asya (*Bos primigenius namadicus*) ve Afrika da (*Bos primigenius opisthonomus*) dahil olmak üzere değişik coğrafik bölgelerde tespit edilmiştir (Loftus ve ark., 1994). Aurochlar uzun bir zaman boyunca geniş bir coğrafik alana yayılmıştır, bu yüzden birden fazla zamanda ve yerde evcilleştirilmiş olması düşünülmektedir. Yaygın görüş, en az iki ayrı evcilleştirmenin olduğu ve sonucunda Auroch'dan farklı iki alt türün modern *Bos indicus* ve *Bos taurus* sığırlarının oluştuğudur (Loftus ve ark., 1994).

Afrika *Bos taurus* ırkları, Avrupadaki *Bos taurus* ırklarına göre daha büyük ısı tolerans ve hastalık direnci göstermektedir (Bradley ve ark., 1996; Freeman ve ark., 2004). Afrika da görülen çeçe sineği (*Glossina morsitans*), tripanozomiyaz diğer bir deyişle uyku hastalığına neden olan parazitin (*Trypanosoma gambiense*) sığır ırklarında yayılmasını sağlar. Fakat, Batı Afrika *Bos taurus* ırkları çeçe sineğinin görüldüğü bölgelerde gelişebilir, çünkü tripanozomiyaz karşı bir direnç geliştirmişlerdir (Freeman ve ark., 2004). Tripanotolerans olarak bilinen bu eşsiz kalıtsal direnci, *Bos indicus* veya Avrupa *Bos taurus* sığır ırkının herhangi birinde bulunmaz (MacHugh ve ark., 1998). Her ne kadar Afrika sığırının mtDNA'sı *Bos indicus* sığır ırkına göre Avrupa *Bos taurus* sığır ırkına daha çok benzer olsa da, modern Afrika *Bos taurus* ırkları Avrupa *Bos taurus* ırklarından ayırt edilebilir.

Mitokondriyal DNA (mtDNA) evrim çalışmaları için idealdir çünkü anneden kalıtılır, rekombinasyon yoktur, genellikle nükleer DNA'dan daha yüksek mutasyon oranına sahiptir ve ayrıca her memeli hücresi nükleer DNA'dan bir veya iki kopya bulunurken mtDNA 10.000 kopyaya kadar çıkabilir (Robin ve Wong, 1988). MtDNA artan kopya sayısı, antik DNA çalışmalarında özellikle kullanılır, orijinal materyaldeki özgün DNA'nın çoğu bozulmuş veya kaybedilmiştir, soyu tükenmiş Aurochs'ların kemik iliğinden ekstre edilmiş mtDNA en iyi örnektir. Mitokondriyal D-loop (displacement loop:

yer değişim halkası) sık bir şekilde evrimsel çalışmalarda kullanılır çünkü nükleotit farklılık oranının en yüksek olduğu yerdir (Robin ve Wong, 1988). Mitokondriyal D-loop varyasyon analizi özellikle sığır ırklarının ayırımında kullanılmaktadır.

Arzu edilen özellikler için yapılan seleksiyonlar farklı ırkların yüzlerce çeşitlendirilmesine yol açmıştır (Scherf, 2000). Evcil sığırlardan et, süt ve deri gibi ürünler elde edilir, birçok insan toplumları için otlakların kullanılmasında nc hayvan olmuştur. Bunlara ek olarak insan kültürel değişimini etkilemiştir, sığırın evcilleştirilmesi insan popülasyonundaki bazı selektif genetik baskıları yerleştirmiştir. İnsan besini olan sığır, ilk evcilleştirilmesinden ve tarımın ortaya çıkmasından bu yana çok değişmiştir ve hala insanoğlu bu besini geliştirmeye çalışmaktadır, en yoğun seleksiyon yapılan sığır ırkı Holsteins'dır, en ysek süt üretimine sahip bu ırk yıllarca seleksiyona tabi tutulmuştur (Jakobsen ve ark., 2002; Shook, 2006). Selektif yetiştiricilik sığırılarda, sağlığında dahil olduğu konformasyon ve doğurganlık sorunlarıyla ilişkili problemlere yol açmıştır (Fisher ve Mellor, 2008). Bu problemlerin önüne geçmek için birçok yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemlerin başında da aşılama gelmektedir.

Enfeksiyona neden olan patojenlerden hayvanları korumak için kullanılan aşı uygulaması, tüm hayvanlarda aynı derecede immün cevap ve aynı derecede koruma sağlamamıştır (Duff ve Galyean, 2007; Salak-Johnson, 2007). Kantitatif zelliklerin geliştirilmesi (yemden yararlanma, büyüme, randıman ve diğer özellikler) için genetik seleksiyon uygulanmaya başlanmıştır. Fakat bu seleksiyon uygulanırken hiçbir zaman hayvan sağlığı veya hastalık direnci ve duyarlılığı gibi özellikler dikkate alınmamıştır. Bunun altındaki asıl neden immün cevap ve hastalık direncinin genetik mekanizmasını anlayamayışımız, fenotipteki komplekslik, komplikasyon ve kaliteli data toplamadaki kısıtlamalar ve maliyet gösterilebilir.

Sığırılardaki hastalık salgınları hayvan refahını ve verimliliği, antibiyotik kullanımına talebin artmasını, yiyeceklerde bulunma riski ve uluslararası ticareti etkilemektedir (Thompson ve ark., 2002). Bu tür hastalıklar, bakterilerin ve virüslerin, i ve dış parazitlerin, yem kaynaklı toksinlerin ve genetik bozuklukların neden olduğu hastalıkları kapsamaktadır. Daha önceden sınırlar ile kısıtlanan bulaşıcı hastalık salgınları, hayvansal üretim ve ticaretteki büyük ölçekli büyüme sınırların ortadan kakmasıyla bulaşıcı hastalık salgınlarını giderek daha çok uluslararası bir sorun haline getirmiştir. İlaç tedavileri hastalık salgınlarını önlemede genellikle etkili olur, ancak hayvansal ürünlerdeki kimyasal kalıntısı ve yaygın kullanılan ilaçların patojenlerde direnç geliştirmesi, bilim

insanlarını alternatif metotlar aramaya yönlendirmiştir. Genetik olarak hastalıklara dirençli sığır yetiştiriciliğinin seçilmesi “kimyasaldan arındırılmış” bir çevrenin oluşturulmasına yardımcı olabilir. Dünyada kullanılan tüm antibiyotiklerin % 50’si veteriner amaçlar için kullanıldığı tahmin edilmektedir (Teuber, 2001).

Sığır endüstrisinde antibiyotikler, enfeksiyonların tedavisinin yanında genel sağlık, büyüme ve yem kullanımını artırmak için kullanılabilmektedir (Teuber, 2001). Hayvanlarda kullanılan bu antibiyotikler zamanla bakterilerde antibiyotik direncinin gelişmesine yol açacağı ve bunun sonucu olarak da insanlardaki hastalıklara etkili olan antibiyotikler etkilerini yitireceği ön görülmektedir. Bakteriler ek olarak bazı çiftlik hayvanlarındaki parazitler geleneksel ilaç tedavilerine karşı direnç kazanmaktadırlar. Nematodların, koyun ve sığırlarda kullanılan bazı ilaçlara karşı direnç kazandığını gösteren verilerin yanında sığırlardaki kenelerinde (*Boophilus microplus*) böcek ilaçlarına karşı dirençli olduğunu belirten çalışmalar vardır (Anziani ve ark., 2001; Li ve ark., 2005).

Sürü yönetimi, hayvan yetiştirme, aşılar ve veteriner bakımı idaresi, çevre sıcaklığı ve beslenme kalitesi dahil birçok genetik olmayan faktör hayvanlardaki immün cevabın kuvvetini etkileyebilir (Frisch, 1981). Ancak patojenlere karşı meydana gelen immün yanıtta değişkenliğin önemli bir kısmını genetik miras oluşturur. MHC’de bulunan genler omurgalılarındaki bir çok hastalıkla ilişkilendirilmiştir ve MHC’nin hastalıkla ilişkisi hakkında en fazla çalışılma insanlardadır (Stewart ve ark., 2004). Bunun bir sonucu olarak BoLA hastalık ilişkisini araştırmak için yapılacak çalışmalarda, HLA hastalık bağlantılı araştırmalar kullanılabılır.

Hastalıklara direnç ve immün cevaptaki varyasyon genellikle yüksek düzeyde polimorfik MHC’ye atfedilmiş ve ilişkili gen markerları, serotipler ve son zamanlarda SNP haplotipleri tanımlanmıştır (Kelley ve ark., 2005). Hastalıklarla ilişkili çalışmalar immün cevap ile ilişkili çok sayıda değişik allel gösterilmiştir. Sığırlarda sınıf II allellerinin şap, dematofilosis, mastitis ve sığır lösemi virüsü gibi hastalıklara karşı hayvandan hayvana değişen hastalık duyarlılığı ile ilişkilendirilmiştir (Lewin ve ark., 1999; Untalan ve ark., 2007; Fadista ve ark., 2010; Miyasaka ve ark., 2011). Hastalık ve ürün özellikleri arasındaki dolaylı ilişkinin DRB3 allelinin mastitise duyarlı/dirençli özelliğine dayandırılarak gösterilmiştir (Oprzadek ve ark., 2012). Bazı tanımlanmış hastalıklarda, etkilenmiş bireylerde yüksek frekansa sahip yaygın haplotiplerin belirlenmesiyle haplotip ve hastalık duyarlılık ilişkisi gösterilmiştir (Todd ve ark., 1988). Fakat tanımlanan SNP-Haplotiplerinin bağışıklık cevaptaki varyasyonlarla ilişkili olduğunu göstermek için daha

fazla kanıtı ihtiyaç vardır. İmmünite ile ilgili genom bölgelerindeki genetik yapının anlaşılması, immün cevabın altında yatan genetik mekanizmayı anlamamızı kolaylaştırırken hayvanların geliştirilmesinde kullanılmak üzere ileri seleksiyonda programlarında kullanılabilecek bir potansiyele sahiptir. Bu açıdan MHC'nin sığırlardaki karşılığı olan BoLA hakkındaki bilgiler detaylı bir şekilde araştırılmalıdır.

1.5. Sığır Büyük Doku Uygunluk Kompleksi (BoLA)

Bos taurus ve *Bos indicus* daki MHC araştırmalarının immünogenetik orijinleri ve keşiflerinin açıklanabilmesi için insanlardaki lökosit antijen (HLA) sistemi ve farelerdeki H-2 kompleksi üzerindeki çalışmalardan yararlanılmıştır (Klein, 1986). HLA gibi, sığır MHC araştırmalarının temeli klasik serolojik ve transplantasyon genetiğine dayanır. Sığırlardaki MHC'nin keşfi Amorena ve Stone (1978) ve Spooner ve ark. (1978)'larına atfedilmektedir. Genetik bölgeleri, deri transplantları ve alloimmünizasyon kullanılarak üretilen serolojik reaktifler kullanılarak tanımlanmış ve sığır lökosit antijen (BoLA) sistemi olarak isimlendirmiştir (Spooner ve ark. 1979). Sığır major histokompatibiliti kompleksi (MHC) immün cevap veya hastalık duyarlılığı ile ilgili temel genlerin yoğunlaştığı, sığır 23. kromozomu üzerinde yer alan bir gen bölgesidir (Miyasaka ve ark., 2011; Takeshima ve Aida, 2006). BoLA, sınıf I, II ve III olarak 3 bölgeye bölünmüştür, diğer memelilerdeki MHC'ler ile benzerlik gösterirken genomik organizasyonunda sınıf II bölgesi diğer memelilerden farklılık göstermektedir (Kelley ve ark., 2005).

BoLA sınıf II bölgesinde büyük bir inversiyon (ters çevirme) görülmektedir, MHC II bölgesinin sentromere yakın bölgesine IIB bölgesi denilmektedir, bu bölge temel MHC bölgesinden yaklaşık 20 Mb non-MHC (MHC olmayan) DNA ile ayrılmıştır (Childers ve ark., 2006). BoLA sınıf IIa bölgesi sınıf I bölgesine sıkı bir şekilde bağlıdır, ekspresyonu gerçekleşen DQ ve DR genlerinden oluşur, MHC haplotip gruplarının çeşitlenmesini sağlayan bölgedir (Davies ve ark., 1997). BoLA sınıf I ve IIa yüksek düzeyde polimorfik olmalarıyla sınıflandırılırlar ve çeşitli bağışıklık yanıtları ile ilişkilendirilmiştirler. BoLA sınıf I deki varyasyonların büyük bir kısmı bu bölgedeki delesyon ve duplikasyonlardan meydana geldiği düşünülmektedir, bunun sonucunda genleri oluşturan nükleotid dizilerinde farklılıklar oluşmaktadır (Ellis ve ark., 1999). Diğer taraftan gen bölgelerindeki SNP'lerden, kaynaklanan immün cevaplardaki farklılıklara olabildiği gibi polimorfik BoLA ve BoLA haplotiplerindeki varyasyon immün cevaptaki farklılığı katkıda bulunmaktadır (Baker ve ark., 2006).

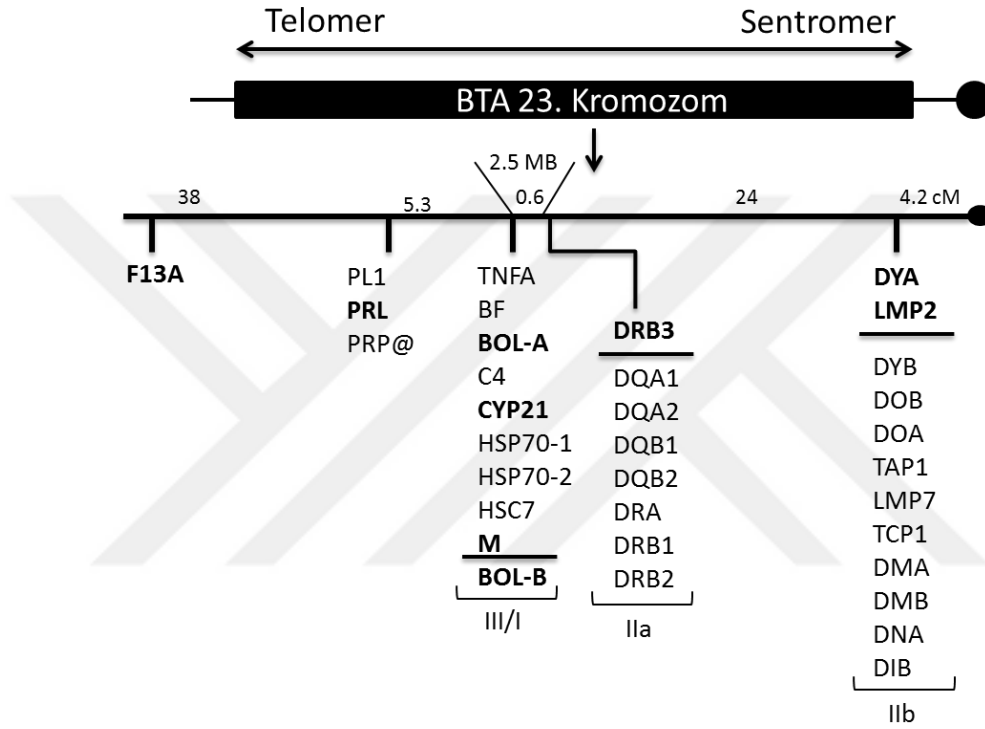
BoLA genleri 5 Adet peptit-bağlanma proteini kodlar: DQ, DR, DN, DO ve DY (Kelley ve ark., 2005; Baker ve ark., 2006). Sınıf I ve MHC IIa genlerin bağışıklık fonksiyonunu anlamada odak noktayı oluşturmaktadırlar. MHC sınıf IIa bölgesi sınıf I bölgesine sıkı bir şekilde bağlıdır, ekspresyonu gerçekleşen DQ ve DR genlerinden oluşur, MHC haplotip gruplarının çeşitlenmesini sağlayan bölgedir (Davies ve ark., 1997). MHC sınıf II allerleri yüksek düzeyde polimorfiktir, bu da bireylerde tanımlanabilir epitoplara (antikorların antijenleri tanımak için baktıkları kısımlarına verilen ad) arttırmaktadır (Norimine ve Brown, 2005). Sığırlardaki MHC’de sınıf II deki DQ α , DQ β ve DR β genleri en polimorfik genlerdir, diğer türlerle benzerlik gösterirler (Andersson ve ark., 1986b). 5 farklı DQ α ve DQ β geni ve 3 tane DR β genleri tanımlanmıştır. En çok ifade edilen iki tane DQ α ve DQ β genleri ve bir tane fonksiyonel DR β geni belirlenmiş, DQ genlerinin sayısı haplotiplerde çeşitlilik gösterir (Andersson ve ark., 1988; Gelhaus ve ark., 1999; Takeshima ve Aida, 2006). Bu güne kadar 106 DRB3, 46 DQA ve 52 DQB alelleri bildirilmiştir (Norimine ve Brown, 2005; Baxter ve ark., 2009). Polimorfik MHC genleri ve MHC haplotiplerindeki varyasyon, immün cevapların çok çeşitli olmasına katkıda bulunur.

1.5.1. BoLA bölgesinin genomik organizasyonu

Sığır genomunda 23. otozomal kromozomunda (BTA23) haritalanan BoLA bölgesi yapısal genler içerir ve bu kromozom sığır türlerinde en iyi biçimde karakterize edilmiştir kromozomdur (Fries ve ark., 1993; Takeshima ve Aida, 2006). Yapısal genlerin birçoğu sperm tiplendirme ve aile çalışmaları kullanılarak bağlantı haritaları belirlenmiştir (Şekil 1.6). Sığır MHC bölgesinin fiziksel haritasının tamamlanmasıyla birlikte, bu bölgenin 154 genin içerdiği ve genlerden 60 tanesinin sınıf I bölgesinde, 38 tanesi sınıf IIa ve sınıf IIb’de ve 56 tanesinin de sınıf III bölgesinde bulunduğu belirlenmiştir (Bensaid ve ark., 1991; Takeshima ve Aida, 2006).

Sınıf I bölgesi 770-1650 Kb’lık bir dizilime sahiptir. Birbirine sıkı bir şekilde bağlı yaklaşık 200 Kb uzunluğunda BoL-A ve BoL-B şeklinde iki bölgeden oluşur (Bensaid ve ark., 1991). Sığır MHC sınıf I; 10 gen ve sessiz genlerden oluşur, bu genlerden 4’ü transkripte olur fakat ekspresyonları bireyler arasında değişkenlik gösterir (Babiuk ve ark., 2007). Yirmi sekiz farklı sınıf I nükleotid dizilimi tespit edilmiştir (Takeshima ve Aida, 2006). Alellik polimorfizm antijen-bağlanma bölgesi ile ilişkilidir ki bu ilişki kazanılmış immün cevabın özgünlüğünü ve haplotiplerin tanımlanması için kullanılır (Ballingall ve ark., 1998). Sınıf III bölgesi immünolojik ve diğer fonksiyonları oluşturan gen setlerinin

heterojen bir şekilde dağılmasından oluşur, örneğin bu bölgede BF ve C4 tamamlayıcı faktörler, CYP21 (steroid 21-hydroxylase), HSP70 (heat shock protein 70) TFNA ve TFNB (tumour necrosis factor α ve β) genleri bulunur (Teutsch ve ark., 1989; Bishop ve ark., 1994; Barendse ve ark., 1994; Andersson ve ark., 1995; Obexer-Ruff ve ark., 1996; Schwaiger ve ark., 1996). Sınıf I genlerinin rekombinasyon ile ayrılmadığı gösterilmiştir (Lindberg ve Andersson, 1988). BoLA-A lokusu, en fazla eksprese olan sınıf I genidir, sınıf IIa bölgesinin telomeriğinde yer alır (Eijk ark., 1995).



Şekil 1.6. Sığır 23. kromozomu üzerindeki BoLA bölgesinin fiziksel haritalaması. Değerler santimorgan birimleri (cM) olarak ifade edilmiştir. Lokuslar kalın yazılmıştır. (Amills ve ark., 1998; Takeshima ve Aida, 2006).

Sınıf II bölgesinin genetik haritalanması sonucunda, iki alt bölgesi tanımlanmıştır (Andersson ve ark 1988; Eijk ve ark., 1993). Bu iki alt bölge arasında büyük bir mesafe vardır, sınıf IIB'deki DYA geni ile sınıf IIA'daki DRB3 geni sekans dizilimleri arasında 15 cM uzunluğunda bir bölgedir. Bu yüzden BoLA genleri bir sistem olarak düşünülebilir, bu genler kümeler halinde organize edilmiştir ve bazı lokuslar yakın bir şekilde bağlıyken diğerleri kısmen birbirlerinden uzaktırlar. Sığırlardaki MHC'yi insan ve farelerdekinden ayıran en önemli özellik sınıf II teki bu iki alt bölge arasındaki genetik mesafedir. Sınıf IIA alt bölgesi DR ve DQ gen kümelerinden oluşur. Fiziksel ve genetik haritalama sığır DR ve DQ genlerin yakın bulunduğunu göstermektedir (Andersson ve ark 1986a; Scott ve ark

1987). Sınıf IIb bölgesinin gen içeriği ve yerleri tüm Pecoran (İnfa takım) ruminatların karakteristik özelliğidir (Childers ve ark., 2006). Sınıf IIb bölgesi DMA, DMB, LMP2, LMP7 ve TAP genleri kapsayan bir bölgedir, bu genler antijen sunumu ve taşımasıyla görevlidir, bunların dışındaki sınıf II genlerinden olan DOA, DOB, DYA ve DYB gibi genlerin fonksiyonları henüz bilinmemektedir (Lewin, 1996; Russell ve ark 1997; Davies ve ark 1997).

Sınıf I ve II genlerine ek olarak CYP21, BF, HSP70 ve C4 sınıf III genleri sığır MHC bölgesinde sınıf IIa bölgesinin telomeriğinde gösterilmiştir (Lewin, 1996). BoLA sınıf III bölgesi genleri, HLA sınıf III genlerinde görülen fonksiyon ve organizasyonlarını korunduğu görülür (Brinkmeyer-Langford ve ark., 2009). BoLA genleri belirli bir sistemde kromozom üzerinde yerleşmelerine rağmen, kümeler şeklinde düzenlenmişlerdir, başka bir deyişle bazıları birbirine sıkıca bağlı ve nispeten diğerlerinden uzaktır. Farklı sığırlar arasında, DRB3 ve DYA arasındaki rekombinasyon oranlarında önemli varyasyonlar gözlenmiştir (Park ve ark., 1995; Park ve ark., 1999).

1.5.1.1. BoLA sınıf I bölgesi ve molekülleri

Sığırlarda, sınıf I bölgesi en az 10 adet sınıf I geni ve birden fazla sessiz gen içerir (Lindberg ve Andersson, 1988; Bensaid ve ark., 1991). Klonlama, cDNA, transfeksiyon/ekspresyon ve dizi analizleri kullanılarak, sığırlarda en az 4 sınıf I locisinin transkripsiyonu olduğunu belirlenmiştir (Ellis ve ark., 1999; Birch ve ark., 2006). BoLA sınıf I genleri yüksek düzeyde polimorfiktir ve immün cevapla ilişkili çok sayıda haplotip gösterilmiştir. İnsanlarda, üç sınıf polimorfik sınıf I geni (*HLA-A*, *-B* ve *-C*) haplotipi bulunmaktadır. Fakat sığırlardaki dört sınıf I geninin aynı haplotiplerle ekspresyon olup olmadığı tam olarak açıklanamamıştır. Klasik sınıf I, α zinciri ve kısmen polimorfik bir β_2 mikroglobulin (MHC lokusunda kodlanmayan) zincirinden oluşan heterodimer yapıda moleküllerdir. BoLA'nın Sınıf I bölgesinin organizasyonu MHC sınıf II genlerine göre daha karmaşıktır ve daha az anlaşılabilmiştir. BoLA sınıf I bölgesinin karmaşıklığı interlokus rekombinasyonundan kaynaklanmaktadır ve buda alleller arasında çeşitliliğin artırılmasına yardımcı olmaktadır (Holmes ve ark., 2003; Babiuk ve ark., 2007).

CD8⁺ T lenfositleri (CTLs), enfekte olmuş hücrelerin yüzeyi üzerinde MHC-I ile gösterilen antijenleri ile etkileşen, virüs ile enfekte hücreleri öldürebilen sitotoksik hücrelerdir. Bu sınıf T hücreler viral enfeksiyonlarda konakçının cevabı için yüksek bir önem taşıdığı kabul edilmektedir (Murphy ve ark., 2008). MHC sınıf I molekülleri

intraselüler peptitleri (8 ya da 9 amino asit uzunluğunda) CD8⁺ T hücrelerine sunarlar ve NK hücreler ile etkileşimdedirler, sınıf I genlerinin polimorfizmler, özellikle viral enfeksiyonlara immun cevap üzerinde bir etkiye sahiptir (Childerstone ve ark., 1999; Guzman ve ark., 2008). Bütün hücrelerde, hücresel proteinlerin dönüşümü sabittir ve sitoplazmada multimerik proteolitik kompleksler küçük peptitlere ayrılır (Rivett, 1993). Memelilerde MHC sınıf II bölgesinden kodlanan iki proteozom bileşenleri vardır, bunlar düşük molekül kütleli polipeptit; **low molecular mass polypeptide** (LMP2) ve LMP7'dir. LMPler ve Sınıf I moleküllerinin ekspresyonu sitokinlerin interferon gama tarafından artırılır. Proteazomdan elde edilen peptitler dimerik bir protein (MHC Sınıf II bölgesinden kodlanan taşıyıcı protein: TAP) yardımıyla endoplazmik retikulum (ER) zarına taşınmaktadır. ER'de, Sınıf I molekülleri peptid ve β_2 -mikroglobulin ile bir kompleks oluşturur ve daha sonra hücre yüzeyine taşınırlar. CTL'ler TCR'lerin yardımıyla vücutta sürekli gözetleme yaparlar. Herhangi bir enfeksiyonun yokluğunda, sınıf I molekülü kendi peptitlerine bağlı bulunur. Bir virüs ya da başka bir hücre içi parazitli enfeksiyon sırasında, kendinden olmayan veya yabancı peptitler proteazom tarafından bazı proteinlere yıkılır (Chaplin,2010). CTL'ler MHC I ve yabancı peptidin oluşturduğu kompleksle karşılaştıklarında sitotoksik reaksiyon ile enfekte olmuş hücreyi öldürürler. CTL'ler sadece kendi MHC sınıf I ile bağlanmış yabancı peptitleri tanıyabilir, MHC I CTL'in sınırlayıcısı olarak bilinir (Zinkernagel ve Doherty, 1974). Ancak şimdiye kadar sığırlarda TAP'la ilgili bir rapor bildirilmemiştir.

Bununla birlikte, 107 allel (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/BoLA/>) tespit edilmiş ve MHC sınıf I serotipleri ve hastalık arasında ilişki bulunmuştur. Kene saldırılarına karşı dirençli BoLA Sınıf I allelleri (w6.1 ve w7) tespit edilmiş ve bu allellerin kenelere karşı koruyucu olduğu vurgulanmıştır (Stear ve ark.,1984, 1990). Birçok çalışmada BoLA sınıf I molekülleri ile mastitis ve *Mycobacterium bovis* gibi hastalıklar arasında direnç veya duyarlılık ilişkisi olduğu belirlenmiştir (Weigel ve ark., 1990; Mejdell ve ark., 1994; Aarestrup ve ark., 1995; Mallard ve ark., 1995). FMDV enfeksiyonu (şap hastalığı) ve aşılama sonrasında konakçıdaki MHC sınıf I ile FMD virüsüne (FMDV) özgün CD8⁺ T hücrelerinin bulunduğu kanıtlanmıştır (Guzman ve ark., 2008).

1.5.1.2. BoLA sınıf II bölgesi ve molekülleri

Sınıf II bölgesi serolojik teknikler, heterolog ve homolog sınıf II problemleri klonlanarak, RFLP, PZR-RFLP ve nükleotid dizileme kullanılarak karakterize edilmiştir (Andersson ve Rask, 1988; Groenen ve ark., 1989; Sigurdardottir ve ark., 1991; Davies ve

ark., 1992; Davies ve ark., 1994; Maillard ve ark., 1999). Sınıf II bölgesi iki farklı alt bölgeye dağılmıştır. Sınıf IIa fonksiyonel bir şekilde ekspresyon olan *DR* ve *DQ* genlerinden ve sınıf IIb bölgesi de fonksiyonları henüz tanımlanmamış *DYA*, *DYB*, *DMA*, *DMB*, *DOB*, *DOA*, *TAP1*, *TAP2*, *LAP2* ve *LMP7* genlerinden oluşur. Bu sınıfın *DRB3* ve *DQB* gibi bazı genleri yüksek ölçüde polimorfiktir. BoLA sınıf II molekülleri APC'lerde (antigen-presenting cell) ifade edilir. BoLA sınıf II sisteminde, *DQ* daha kompleks iken, *DRB3* hem ifade edilir hem de fonksiyoneldir (Glass, 2004). Sığırlarda BoLA-*DR* ve BoLA-*DQ* lokus ürünlerinin ekspresyonu görülür. *DRA*, *DRB3*, *DQA* ve *DQB* genleri transkripsiyonu gerçekleşir, *DR* ve *DQ* ürünleri CD4⁺ T-helper hücrelerinde restriksiyon elementi olarak hücre yüzeyinde tespit edilebilirler (Glass ve ark., 2000). İnsanların aksine sığırlarda MHC bölgesinde *DP* genleri yoktur. BoLA sınıf II polimorfizm üzerine yapılan bir çok çalışmada, BoLA sınıf II genleri ve hastalık direncinin bağlantılı olduğu gösterilmiştir, birçok ıslah programında bu durum kullanılmıştır, örneğin dermatophilosis'e duyarlı hayvanların itlaf edilmesi buna en iyi örnektir (Maillard ve ark., 2003). Sığır solunum sistemi sinsitiyal virüsü (BRVS), sığırlarda BoLA sınıf II CD4⁺ ve CD8⁺ taşıyan sınırlı T hücrelerinde enfeksiyona neden olurken ve buzağılarda solunum sisteminde T hücrelerinin azalmasına yol açmaktadır. Buda hücrel bağışıklığının sığırların korunması için nedenli önemli olduğunun en iyi göstergesidir (Taylor ve ark., 1995; Gaddum ve ark., 1996; Fogg ve ark., 2001).

1.5.1.2.1. BoLA Sınıf IIa alt bölgesi

Temel sınıf II bölgesinin sınırlarını oluşturması ve yüksek oranda polimorfizm göstermesi nedeniyle Sınıf IIa bölgesindeki genler ve gen ürünleri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Sınıf IIa bölgesinde 1 adet *DRA*, 3 adet *DRB* (*DRB1-DRB3*), 5 adet *DQA* (*DQA1-DQA5*) ve 5 adet *DQB* (*DQB1-DQB5*) geni olmak üzere toplam on dört tane gen tanımlanmıştır (Çizelge 1.2). İnsan çalışmalarının aksine *HLA-DP* problemleri ile yapılan hibridizasyon çalışmalarının sonucunda sığır genomunda *DP* genlerine (insan bağışıklığı için önemli) rastlanmamıştır (Takeshima ve Aida, 2006).

DR alt bölgesinin genetik yapısı tüm canlılarda en korunumlu bölgedir, neredeyse non-polimorfik *DRA* geni, birkaç tane ifade edilen *DRB* geni, sessiz genler ve gen fragmentlerinden oluşur. Popülasyondaki fonksiyonel MHC çeşitliliğinin yüksek seviyesi, *DRA* geni ile en az bir yüksek bir şekilde polimorfik *DRB* geninin birlikte ifade edilmesi ile oluşturulur. *DR* sınıf II molekülleri heterodimerdir, *DRA* monomorfik bir α zincirinin ve *DRB* de yüksek oranda polimorfik β zincirini oluşumunu sağlar. BoLA-*DRA* uzun süre

monomorfik olarak tanımlanmıştır, çünkü tek bir alleli rapor edilmiştir. Fakat son çalışmalar BoLA-DRA lokusunun sığırlardaki allel varyasyonları gösterilmiştir (Zhou ve ark., 2007).

Çizelge 1.2. BoLA- Sınıf IIa genlerinin moleküler özelliği

BoLA Sınıf IIa 23. kromozom genomu:AC_000180.1						
Gen	Moleküler Özelliği	Ekzon Sayısı	Uzunluk (mRNA)	Allel Sayısı	mRNA (Ac.No)	Kaynak
BoLA-DRA	DR Alfa zincirini, monomorfik .	4 ekzon	726 bp-253 aa	5	XM_005910872.1	Aida ve ark.,(1994); Zhou ve ark.,(2007); Behl ve ark.,(2012)
BoLA-DRB1	Sessiz gen (Beta1 stop kodonu ve transmembran domaini). Düşük polimorfizim.	-	-	2	-	Davies ve ark.,(1997)
BoLA-DRB2	Düşük seviyede ekspresyon, Beta1 domainin 19 pozisyonunda glikosilasyon alanından yoksundur, monomorfik.	6 ekzon	791 bp-263 a	1	XM_002697316.2	Davies ve ark.,(1997); Muggli-Cockett ve Stone (1989).
BoLA-DRB3	Yüksek seviyede ekspresyon, yüksek polimorfizim.	5 ekzon	801 bp-266 aa	132	NM_001012680.2	Davies ve ark.,(1997); Aida ve ark.,(1995); Sun ve ark.,(2013); Anonim, (2017).
BoLA-DQA1	DQ alfa zinciri. Yüksek polimorfizim.	4 ekzon	768 bp-255 aa	31	NM_001013601.3	Davies ve ark.,(1997); Nishino ve ark.,(1995); Takeshima ve ark.,(2007); Miyasaka ve ark., (2011).
BoLA-DQA2	Yüksek polimorfizim.	4 ekzon	765 bp-254 aa	13	XM_005196597.1	Davies ve ark.,(1997); Morooka ve ark.,(1995); Miyasaka ve ark., (2011).
BoLA-DQA3	Polimorfik	4 ekzon	765 bp-254 aa	2	NM_001079577.1	Davies ve ark.,(1997); Ballingall ve ark.,(1997); Ballingall ve ark.,(1998); Miyasaka ve ark., (2011).
BoLA-DQA4	Monomorfik	-	-	-	-	Davies ve ark.,(1997); Ballingall vd.,(1998); Miyasaka ve ark., (2011).
BoLA-DQA5	Monomorfik	4 ekzon	768 bç-255 aa	-	NM_001012675.2	Davies ve ark.,(1997); Gelhaus ve ark.,(1999b); Miyasaka ve ark., (2011).
BoLA-DQB1	DQ beta zinciri. Yüksek polimorfizim.	5 ekzon	786 bç-261 aa	81	NM_001012676.3	Davies ve ark.,(1997); Dikiniene ve Aida (1995); Wang ve ark.,(2005); Anonim, (2017).
BoLA-DQB2	Yüksek polimorfizim.	5 ekzon	786 bç-261 aa	81	-	Davies ve ark.,(1997); Dikiniene ve Aida (1995); Wang ve ark.,(2005); Anonim, (2017).
BoLA-DQB3	Yüksek polimorfizim.	5 ekzon	786 bç-261 aa	81	-	Davies ve ark.,(1997); Marelllo ve ark.,(1995); Wang ve ark.,(2005); Anonim, (2017).
BoLA-DQB4	Yüksek polimorfizim.	5 ekzon	786 bç-261 aa	81	-	Davies ve ark.,(1997); Wang ve ark.,(2005); Anonim, (2017).
BoLA-DQB5	Yüksek polimorfizim.	5 ekzon	786 bç-261 aa	81	-	Gelhaus ve ark.,(1999a); Wang ve ark.,(2005); Anonim, (2017).

DR molekülünden kodlanan β -zinciri diğer genlerin aksine yüksek derecede polimorfiktir. Polimorfizm yüksek düzeyde 2. ekzondadır, bu bölge peptit bağlanma bölgesinin değişken parçasıdır. Sığırlarda en az 3 DRB loci'si bulunurken sadece 1 tane DRB (DRB3) geni fonksiyoneldir. BoLA-DRB1 stop kodonu, β 1 ve transmembran bölgesi içeren bir sessiz gendir bu yüzden çoklu stop kodonları görülür. Çok düşük seviyede polimorfizm gösterir. BoLA-DRB2 zayıf bir ekspresyon sergiler ve monomorfiktir (Burke ve ark., 1991). BoLA-DRB3 geni ifade edilir, yüksek düzeyde polimorfiktir (şimdiye kadar bildirilen 111 allelleri vardır) ve fonksiyonel bir sınırlama elemanı kodlar (Davies ve ark., 1997; <http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/group/BoLA>). Bu eleman, DRB3'ün 6 ekzonundan en

polimorfik olan, 2. ekzonundan kodlanan peptit bağlanma boşluğudur. Birçok çalışma bu gendeki polimorfizmlerin immün cevapla önemli bir şekilde ilişkili olduğunu göstermiştir (Xu ve ark., 1993; Sharif ve ark., 2000; Garcia-Briones ve ark., 2000; Baxter ve ark., 2009; Gowane ve ark., 2013a-b).

MHC sınıf IIa bölgesindeki DQ genleri fare, sıçan, domuz ve tavşanlarda tek kopya şeklindedir. İnsan ve köpeklerde multi DQ genleri tanımlanmış fakat sadece bir DQ molekülünün ekspresyon olduğu görülmüştür (Kappes ve Strominger, 1988; Ando ve ark., 1989). MHC sınıf II DQ genleri heterodimer şeklinde kodlanır, α zinciri: DQA ve β zinciri: DQB den oluşur. DR genlerinin aksine her ikisi de polimorfiktir. DQ bölgesi 5 DQA locisi ve 5 DQB locisinden oluşur, DQA1, DQA2, DQB1 ve DQB2'nin ekzon 2 bölgeleri en polimorfik bölgeleri oluşturur. Sığırlarda 31 adet DQA1 alleli, 13 adet DQA2 alleli, 9 adet DQB1 alleli ve 4 adet DQB2 alleli vardır (Takeshima ve ark., 2007) (Çizelge 1.2). BoLA haplotiplerinde bir veya daha fazla DQ ürünleri ifade edilir. Yaygın sınıf II haplotiplerinin yaklaşık yarısında DQ genleri duplikasyon şeklinde görülür, bu durumda DQ duplikasyonlarının her ikisi de eksprese olabilir (Xu ve ark., 1994). Sığır DQ molekülleri sığır CD4⁺ T hücrelerine antijen sunabilirler. Fakat DQ genlerindeki polimorfizm hakkında bilgi DRB3 genlerine göre daha kısıtlıdır. DQ polimorfizmi ile ilişkili bazı çalışmalarda, DQB*1804 alleleline sahip hayvanların sığır dermatophilosisne duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Maillard ve ark., 2003). Ancak, bu DQ alleli bir DRB3 haplotipi ile bağlantılıdır (DQB*1804-DRB3.2*09/*45), bu açıdan hastalığın DQ veya DR polimorfizmlerinin etkileri ile bağlantılı olup olmadığı henüz net değildir. Mastitise duyarlılık BoLA haplotipleriyle DQ genlerinden tek bir kümesi ile ilişkilendirilmiştir; son zamanlarda DQA heterozigotluk mastitis direnci ile ilişkili olduğu belirlenmiştir ve bunun da DRB3 allel direnci ile bağlantıya sahip olabileceği vurgulanmıştır (Park ve ark., 2004; Takeshima ve ark., 2008). Bununla birlikte, bunların gen ürünlerinin T-hücre cevabı için önemli olduğundan, bu genler, bulaşıcı patojenlere karşı farklı immün cevaplar açısından önemli olması muhtemeldir, DQ polimorfizmi ve bakteriyel, viral ve parazitik istilası ile ilgili yapılan birçok çalışma bunu en iyi göstergesidir (Glass ve ark., 2000; Norimine ve Brown, 2005).

1.5.1.2.2. BoLA Sınıf IIb alt bölgesi

Sınıf IIa genlerinin aksine, sınıf IIb alt bölgesinde bulunan DY genleri sadece geviş getiren hayvanlarda görülmüştür. Düşük seviyede polimorfizm sergilerler ve dendritik hücredeki sınırlı dağılımları ile transkripsiyon edilirler (Ballingall ve ark., 2004a). İlk

olarak sığırlarda DYB ve DYB transkriptlerinin tam uzunlukta analizi ile sırasıyla 253 ve 259 amino asit proteinden oluşan open reading frameslerin bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca sığırlardaki DRA, DOA ve DYB genlerinin nükleotid dizileri ortaya çıkartılmıştır (Van der Poel ve ark., 1990). Sınıf II MHC α ve β polipeptit zincirlerinden farklı olarak translasyon yeteneğine sahip DY genleri sığırlarda ilk defa ekspresyon analizi ile etiketlenerek gösterilmiştir (Ballingall ve ark., 2004a). İnsanlarda, DMA ve DMB genleri sınıf II molekülleri ile tüm peptitler ile kompleks oluşturan bir molekül kodlar bunun aksine DNA, DOA ve DOB den kodlanan proteinler DM molekülünün işlevini düzenlemektedir (Sloan ve ark., 1995; Liljedahl ve ark., 1996). Sığırlarda DMA/DMB ve DNA/DOB ortolog olarak tanımlanmışlardır (Amills ve ark., 1998; Niimi ve ark., 1995). Sığırlarda, DM ve DO genleri insanlardaki diziler kullanılarak elde edilen cDNA primerleri ile dizilenmiştir (Niimi ve ark., 1995). Sığırlarda sınıf IIb bölgesi proteazom alt birimlerini kodlayan LMP2 ve LMP7 genlerinin ve endoplazmik retikulumun lümenine sitosol peptidlerin taşınmasında rol oynayan moleküllerini kodlayan TAP1 ve TAP2 genlerini kodlar (Shalhevet ve ark., 1995) . Başka bir sığır sınıf II β -zincir geni (BoLA-DIB) nükleotid dizisi DRB/DQB genlerinden farklıdır. Bu DIB geni sıkı bir şekilde DOB genine bağlanmıştır, bu durumun DIB geninin sığır sınıf II genlerinden ikinci grup içerisinde olduğunu göstermektedir (Muggli-Cockett ve Stone, 1991; Stone ve Muggli-Cockett, 1993) (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3. BoLA- Sınıf IIb genlerinin moleküler özelliği.

BoLA Sınıf IIb 23. kromozom genomu:AC_000180.1						
Gen	Moleküler Özelliği	Ekzon Sayısı	Uzunluk (mRNA)	Allel Sayısı	mRNA (Ac.No)	Kaynak
BoLA-DMA	DM alfa zinciri. Transkripsiyonal olarak aktif ve monomorfik	4 ekzon	783 bç-260 aa	-	NM_001012674.2	Davies ve ark.,(1997); Niimi ve ark.,(1995);
BoLA-DMB	DM beta zinciri. Transkripsiyonal olarak aktif ve monomorfik	6 ekzon	789 bç-262 aa	-	XM_005223197.1	Davies ve ark.,(1997) ; Niimi ve ark.,(1995);
BoLA-DOA	DO alfa zinciri. Transkripsiyonal olarak aktif ve monomorfik	5 ekzon	754 bç-250 aa	-	NM_001205920.1	Davies ve ark.,(1997); Takeshima ve Aida (2006);
BoLA-DOB	DO beta zinciri. Transkripsiyonal olarak aktif ve monomorfik	6 ekzon	816 bç-271 aa	-	AB117945.1	Davies ve ark.,(1997) ; Takeshima ve Aida (2006);
BoLA-DYA	DY alfa zincir . Seçerek ekspresyon ve düşük polimorfik.	4 ekzon	762 bç-253 aa	3	BC149795.1	Davies ve ark.,(1997); Ballingall ve ark.,(2004);
BoLA-DYB	DY beta zinciri. Selektif ekspresyon ve monomorfik.	5 ekzon	780 bç-259 aa	-	NM_001012679.1	Ballingall ve ark.,(2004);
TAP1	Peptid transporter	11 ekzon	2254 bç-750 aa	-	XM_005223252.1	Davies ve ark.,(1992)
TAP2	Transkripsiyonal olarak aktif ve polimorfik.	8 ekzon	1689 bç-562 aa	2	NM_174222.2	Ambagala ve ark., (2002)
LMP2	Proteozom alt ünitesi.Ekspresyon.	6 ekzon	660 bç-219 aa	-	BC102963.1	Davies ve ark.,(1997); Eleuteri ve ark.,(1997)
LMP7	Proteozom alt ünitesi.Ekspresyon.	6 ekzon	780 bç-259 aa	-	XM_005223195.1	Eleuteri ve ark.,(1997); Cannon ve Pate (2003).

PZR-RFLP tekniği kullanılarak DRB, DQA, DQB, DYA, DOB, ve DIB genlerinin polimorfizmleri ve 5 sınıf IIb (DYA-DOB-DIB) haplotipi belirlenmiştir (Davies ve ark., 1994; (Gelhaus ve Forster, 2001). DOA ve DOB locilerinin bağlantı analizleri sonucunda BoLA sınıf IIb bölgesinde genetik haritaları ortaya çıkartılmıştır. MHC DOA ve DOB locilerinin ikinci ekzonunun tamamı incelendiğinde DOA için iki DOB için ise 4 allelik varyasyon olabileceği tespit edilmiştir (Gelhaus ve Forster, 2001). Amino asit dizileri DOB'nin non-informatif iken, DOA genlerinin polimorfizmlerin varyasyonlara uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. DY polipeptitlerinin sığır, insan ve faredede MHC alfa ve beta zincirlerinin sekanslarının karşılaştırılarak yapılan analizde varsayılan peptit bağlanma bölgelerinde benzersiz 16 amino asit tespit edilmiştir. Bunlara rağmen hala DYA ve DYB genlerinin işlevi bilinmemektedir (Ballingall ve McKeever, 2005). DYA genleri koyun ve sığırlarda (yaklaşık 20 milyon yıl önce birbirinden ayrıldığı iki tür) karşılaştırıldıklarında pseudogenlerden ziyade fonksiyonel genler gibi daha çok korunmuşlardır. Korunma seviyeleri promotorda % 97, kodlanan bölgede % 94 ve intronik bölgede % 91 şeklindedir, bu oranlar fonksiyonel MHC genleriyle karşılaştırıldıklarında elde edilen sonuçlardır. Bu sınıf II MHC genleri arasındaki koruma derecesi evrim ile tutarlıdır, bu genler ruminatlarda bu özellikleriyle benzersiz bir fonksiyonu barındırmaktadır (Behl ve ark., 2012).

1.5.1.3. BoLA sınıf III bölgesi ve molekülleri

Sınıf III molekülleri oldukça farklı MHC moleküllerini oluştururlar, bu ürünler daha çok immün süreçle ilişkilendirilmiştir, bunlara en iyi örnek tamamlayıcı sistem bileşenleri, steroid 21-hidrolaz enzimleri ve tümör nekrosis faktörleridir (TNF) (Behl ve ark., 2012). BoLA sınıf III bölgesindeki TNF α geninin promotor bölgesindeki polimorfizmlerin, BLV enfeksiyonun ilerlemesine katkısı olduğu belirlenmiştir (Konnai ve ark., 2006). Bu gibi moleküller MHC sınıf III genlerinin MHC'nin genomik bölgesine özgün genler olduğunu ve edinilmiş bağışıklık sisteminin gelişimi sırasında oluştuğunu göstermektedir (Baxter ve ark.,2010). BoLA sınıf III bölgesi genleri sınıf IIa ve sınıf I bölgeleri arasında yer alan bir bölgedir ve tıpkı HLA sınıf III genleri gibi fonksiyon ve organizasyonlarını korumaktadırlar (Brinkmeyer-Langford ve ark., 2009). Sınıf III bölgesi TFNA, C4, BF, HSP70-1, HSP70-2 ve PRL gibi genleri içerdiği belirlenmiş olmasına rağmen hala BoLA sınıf III bölgesi ve genleri üzerinde araştırmalara ihtiyaç vardır.

1.6. Türkiye Yerli Sığır Irkları

Türkiye'deki biyolojik çeşitlilik, genetik kaynaklar açısından yüksek bir potansiyele sahiptir. Bu potansiyelin önemli bir kısmını da hayvan genetik varlığımız oluşturmaktadır. TÜİK verilerine göre toplam sığır varlığımız 13.994.071'dir. Bunun 1.874.925'ini yerli sığır ırkları oluştururken, 6.385.343'ünü kültür ve 5.733.803'ü de melez sığır ırkları oluşturur (27 Aralık-2016, <http://www.tuik.gov.tr/>). 2002 TÜİK verilerine göre, yerli sığır ırkımızın sayısı 3.586.163 iken, kültür ırkları 1.859.786 ve melez ırkların sayısı 4.357.549'dur. Yerli ırklarımızdaki bu azalışın en önemli sebeplerinden bir tanesi, hayvan başına düşen verimin diğer ırklara oranla çok düşük oluşudur. Genotipleri göz ardı edilecek olursa, düşük verimin özelliklerinde, çevresel etkiler, kalitesiz yemlerin kullanımı gibi bakım ve beslenme koşulları önemli bir paya sahiptir. Verim özellikleri geliştirilen kültür ırklarının aksine yerli ırklarımız ülkemizdeki ekolojik şartlara, bakım ve beslenme olanaklarına daha da önemlisi salgın ve hastalıklara karşı adaptasyon yetenekleri daha yüksektir (Bakır ve Kaygısız, 2003). Başka bir açıdan bakıldığında sığır evcilleştirme bölgesinin Çatalhöyük (Türkiye) olduğu ve Avrupadaki sığır ırklarındaki dominant mitokondriyal DNA haplotiplerinin Anadolu kökenli olduğu düşünüldüğünde yerli sığır ırklarımızın nedenli önemli gen kaynağı potansiyeline sahip olduğu ortaya çıkmaktadır (Troy ve ark., 2001; Mannen ve ark., 2004). Türkiye'de yetiştirilen yerli sığır ırkları olarak; Yerli Kara (YK), Kilis (Güney Anadolu Kırmızısı-GAK), Yerli Güney Sarısı (YGS), Boz Irk (BOZ), Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK) ve Zavot (ZAV) gösterilebilir. Bu ırkların en önemli özelliklerinden bir tanesi yüksek oranda hastalıkların neden olduğu salgınlara dirençli oluşlarıdır.

1.6.1. Yerli Kara (YK)

Yerli Kara sığır ırkı, *Bos taurus primigenius*'un (kısa boynuzlu grup) alt grubu olan *Bos taurus taurus*'tan (kısa boynuzlu bir ırk) köken aldığı belirtilmektedir (Kumlu, 2003). Türkiye'de en yaygın ve en büyük (sığır varlığımızın yaklaşık %3.4' lük kısmı) popülasyona sahip olan yerli sığır ırkı olup, siyah renkli ve küçük cüsselidir (Şekil 1.7). Orta ve Kuzey Anadolu da yayılmıştır. Renkleri siyah, alçak boylu, bedeni uzun yapılı, kısa boynuzlu, memeleri ve meme başları ufak, memelerinde tüylenme görülebilir, et ve süt verimi düşük, iyi besli tutmayan, kas gelişimi yetersiz, göğüs dar, butlar zayıf ve ince, ergin dişilerde canlı ağırlık yaklaşık 200 kg iken erkeklerde 250 kg dolayında olan bir ırktır. İnce derili, kıllar mevsime göre değişken, yazları kısa ve ince, kışları uzundur (Batu, 1962; Mason, 1969). Anadolu'nun ekstansif koşullarına uyum sağlamış, hastalık ve

zararlılara karşı direnci yüksektir (Ek Çizelge A.1’de bazı özellikleri özetlenmiştir). Sayıları her geçen gün giderek azalmaktadır (Özhan ve ark., 2004; TUİK, 2016).



♂



♀

Şekil 1.7.Yerli Kara Sığırı (Tagem Katalog-TC Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı-2004).

1.6.2. Doğu Anadolu Kırmızısı

Başta Erzurum, Kars ve Ardahan illeri olmak üzere Doğu ve Kuzeydoğu Anadolu Bölgesinde yetiştirilen kombine verimli (et ve süt) bir yerli ırktır. Küçük yapılı ve sert mizaçlı genellikle renkleri kırmızı ve tonları şeklindedir. Kulak kenarları, boyun, göğüs, ön bacakların ön yüzleri, tırnakların deriyle birleştiği kısımlar koyudur. Erkek ve dişileri kısa boynuzlu olup, boynuzları koyu renkli öne doğru kıvrımlıdır. Olumsuz çevre şartlarına dayanıklıdır ve kalitesiz yemlerle hayatlarını sürdürebilirler. Engebeli alanlardaki otlakları değerlendirebilir ve hastalıklara karşı dirençleri yüksektir (TAGEM, 2009).

1.6.3. Güney Anadolu Kırmızısı

Diğer kombine verimli yerli sığır ırkımız Güney Anadolu Kırmızısı kökenini *Bos taurus brachyceros* yabani ırkından aldığı belirtilmektedir. Güney Anadolu Bölgesinde yayılış gösterirken, Suriye, Lübnan, Irak ve Ürdün gibi ülkelerde yetiştiriciliği yapılmaktadır. Asil ve zarif görünümünün yanında boyun kısa, baş dik, cidago belirgin ve yüksektir. En çok rastlanan renkleri sarımsı kırmızıdır ancak sarıdan kırmızıya ve kahverengiye kadar farklı renklilere de görülebilir. Kuyruk püskülü siyah renklidir. Kısa boynuzlu sığır ırklarındandır. Boynuzlar dar, ince, yukarı ve iki yana doğru uzanır. Türkiye’nin en iri ve süt verimi en yüksek yerli ırkıdır. Güney Anadolu ve Akdeniz’in sıcak iklimine uyum sağlamıştır. Kene ve kan parazitlerinin meydana getirdiği hastalıklara dayanıklıdır. Bakım ve beslemenin düzenli olmadığı şartlarda çok az sorunla yetiştirilebilir (TAGEM, 2009).

1.6.4. Yerli Güney Sarısı (YGS)

Başta Mersin, Hatay ve Şanlıurfa illeri ile Toros ve Amanos dağları arasında kalan bölgeler de yetiştirilen kombine verimli bir yerli ırktır. Küçük yapılı, kısa boynuzlu, boynuz rengi siyahımsı koyu, kendi rengi sarıdan kırmızı olan bir sığır ırkıdır. Keçi gibi dağlara tırmanabilir. Hastalıklara dirençli, kötü çevre şartlarına dayanıklıdır. Engebeli arazilerde otlayabilme yeteneğinde olup dağlık bölgelere uyum sağlamıştır. İlkel bakım, besleme ve barındırma koşullarında yaygın olarak köy sürüleri şeklinde yetiştirilir (TAGEM, 2009).

1.6.5. Boz Irk (BOZ)

Trakya, Marmara, Batı Anadolu, Kuzey ve İç Ege’de yayılış gösterirler. Kombine verimli , sağlam vücut yapısına sahip, kıl rengi açık gümüşten koyu kül rengine kadar değişiklik gösteren, İnekler boğalara göre daha açık renkli olan bir sığır ırkıdır. En belirgin özellikleri anüs bölgesinin siyah renkte olması gösterilmiştir. Erkek ve dişileri hilal şeklinde boynuzlara sahiptir. Ani yem değişikliklerine dayanıklıdır. Düşük kalitedeki yemleri değerlendirebilecek sindirim sistemine sahiptir. Her türlü olumsuz doğa şartlarına, yetersiz beslenmeye ve hastalıklara karşı oldukça dayanıklıdır. Hastalandığı takdirde çok hızlı iyileşir (TAGEM, 2009).

1.6.6. Zavot (ZAV)

Kars ve Ardahan illerinin çevresinde yetiştirilen kombine verimli bir yerli ırktır. Vücutları orta büyüklükte, sağlam mizaçlı genellikle beyaz renklidirler. Dişi ve erkek bireyleri boynuzludur. Karasal iklime, engebeli ve dağlık arazilere, ilkel barınakların bulunduğu şartlara adapte olmuşlardır. En önemli özelliklerinin başında zor iklim şartlarına ve hastalıklara karşı dayanıklılık gösterilebilir (TAGEM, 2009).

1.7. Çalışmanın Önemi ve Amacı

Şimdiye kadar hayvanlar üzerinde uygulanan genetik seleksiyon programlarında genellikle verime odaklanılmış ve buna paralel olarak doğal hastalık direnci potansiyeli azalmıştır. Aslında birçok çalışma, hayvansal üretimdeki artışın, hastalıklara direnci azalttığını göstermiştir (Boettcher ve ark., 1992; Lund ve ark., 1994; Luttinen ve ark., 1997; Rogers ve ark., 1998). Yerli ırklarımızın tamamı hastalıklara ve zararlılara karşı bir çok kültür ırkına göre daha dirençli olması nedeniyle ülkemiz için bulunmaz gen kaynaklarındandır. Yüzyıllar boyunca özel ilgi göstermeden ekstansif olarak yetiştirmeleri sağlanan bu ırkların hastalıklara direnç noktasında yüksek potansiyele sahip olmaları

şşırtıcı bir sonuç değildir. Bugün bir çok verim özelliğinden yararlandığımız çiftlik hayvanlarında dünya genelinde uygulanan seleksiyon programları yüksek verim özelliklerini baz almaktadır. Kùltür ırkı olarak isimlendirdiğimiz bu ırklar sadece verim özellikleri iyileştirilmiş ancak bu ırkların ne çevre koşullarına dayanıklılıkları ne de hastalıklara direnç özellikleri üzerinde tam anlamıyla durulmamıştır.

MHC lokusu sığır ırklarındaki adı ile BoLA bölgesi yerli ırklarımızda yeterince çalışılmamış bir bölge oluşu, bu bölgenin dünyadaki diğer ırklarla farklılık gösterme oranı ve hepsinden önemlisi bu bölgenin immün sistemle ilişkisi bu bölgeyi çalışılır kılmaktadır. Yerli sığır ırklarının dışındaki ırklarda, bu lokusdaki ilgili genler üzerinde yapılan çalışmaların birçoğunda gen bölgelerinin tamamı yerine belirli ekzonlara yoğunlaşmaktadır. Enfeksiyon hastalıklarını sebepleri birçok faktörün kontrolünde olabilir ancak enfeksiyon hastalıklarından kaynaklanan sonuçlardaki değişkenlik büyük ölçüde bireyin genetik yapısındaki varyasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu nedenle hastalıklara karşı verilen tepkilerin bireyin genetik yapısıyla ilişkisini belirlemeye çalışılarak hastalıklara doğal direnç geliştirilmeye çalışılmalıdır. Literatür taraması gösterdiği; Türkiyede Bozkaya vd. (2007) MHC bölgesine yerleşmiş mikrosatellitler kullanarak koyun, keçi ve sığır türleri arasında genetik mesafeyi inceledikleri çalışma ile Öner ve Elmacı (2011) sığırlarda BoLA-DRB3 geni polimorfizimi adlı derleme çalışmasından başka bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmanın temel amacı, yerli sığır ırklarımızdan olan Yerli Kara ırkının bağışıklık kapasitesi ve bu özellikleri yönünden diğer ırklardan benzerlik ve farklılıklarını belirlenmek, MHC (Major Histocompatibility Complex-Büyük Doku Uygunluk Kompleksi-sığırlardaki karşılığı BoLA veya sığır lökosit antijenleri) lokusunun moleküler düzeyde analizi gerçekleştirmek, bu açıdan BoLA bölgesindeki; BoLA-DMA, BoLA-DMB, BoLA-DQA, BoLA-DQB, BoLA-DRA, BoLA-DRB2, BoLA-DRB3, BoLA-DYA, BoLA-DYB, LMP2, LMP7 genlerindeki farklı ekzon bölgelerinin dizi analizi gerçekleştirilerek, Yerli Kara sığır ırkının doğal bağışıklık sisteminin temelini oluşturan bu gen bölgeleri ile ilişkili referans veriler elde etmektir.

Bu amaç doğrultusunda, ilk olarak sayıları her geçen gün azalan Yerli Kara (YK) sığır ırkımızdan Amasya-Merzifon (İnalani, Derealan ve Aşağıbük köyleri) ve Kars-Sarıkamış (Karaköse köyü) bölgelerinden 67 kan (29, ♂ - 38, ♀) örneği temin edilmiştir. Örnekler belirlenirken hayvanların saf ırkın beliğın özelliklerini (ırka özgü fenotipik özellikler) göstermesine dikkat edilmiştir. Bu örneklerin DNA'ları laboratuvara

kazandırılarak diğ er çalışmalar için kaynak oluşturulmuştur. İkinci olarak yukarıda bahsedilen gen bölgelerine özgün primer dizaynları edilerek bu bölgelere özgün nükleotid dizi karakterizasyonu yapılmıştır. Elde edilen nükleotid diziler NCBI'ya girilerek uluslar arası bir boyut kazandırılmıştır. Ayrıca muhtemel protein dizileri incelenerek referans veriler elde edilmiştir. Son olarak önceki çalışmalarda elde edilen allel bilgilerinden faydalanılarak, hastalıklara direnç özellikleri incelenmiş ve tür içindeki bireyler arasındaki varyasyonun derecesi araştırılmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Sığırlardaki serolojik yaklaşımlarda, insan ve farelerdeki MHC ürünleri gibi benzer özelliğe sahip belirleyici moleküllerin biyokimyasal özelliklerinden faydalanılmıştır (Hoang-Xuan ve ark. 1982a, b). Karışık lenfosit reaksiyonu (MLR) ve allospesifik sitotoksik T lenfosit (CTL) gibi histogenetik yöntemler, MHC sınıf I ve II antijenlerinin özelliklerini tanımlamak için kullanılmıştır (Usinger ve ark. 1981; Teale ve ark. 1985). BoLA araştırmalarının modern geçmişi, Southern blot ve restriksiyon fragment uzunluk polimorfizm (RFLP) analizleri ile başlamıştır. HLA genlerinden elde edilen moleküler problemler, nükleik asit hibridizasyonlarında kullanılarak ortolog genlerini tanımlamak, sınıf II genlerindeki polimorfizmleri ortaya çıkarmak ve BoLA haplotiplerinin belirlemek için kullanılmıştır (Andersson ve ark. 1986a, b). BoLA sınıf I ve sınıf II moleküllerini kodlayan genlerin sekanslanması ve moleküler klonlanmaları HLA genlerine benzerliklerini ortaya çıkarmıştır. PZR teknolojisi uygulamaları ile genomik sekans analizleri, BoLA genlerini oluşturan ekzonların varyasyonlarının belirlenmesine izin vermiştir (Takeshima ve ark., 2001). BoLA bölgesi için kullanılan tüm bu yöntemler, hastalıklarla olan ilişkisini ortaya çıkarmak için uygulanmıştır (Andersson ve ark., 1991; Aida ve ark., 2000).

Artiodactyla (çift toynaklılar) takımındaki eutherian (plasentalı) memelilerin en kapsamlı genom dizisi, ilk tam olarak gösterilen evcil sığırdır (Tellam ve ark., 2009). Sığır genom dizisi, memeli evrimi tarihinin ve sığır karmaşık fenotipik özellikleri ile genetik varyantları arasındaki ilişkiyi anlamak için çok önemlidir. *Bos taurus* genom dizisinin kapsamlı bir çalışması 2009 yılında yayımlanmış ve sığır genomunun belirli özelliklerinin analiz edildiği birçok yayın buna eşlik etmiştir. Özellikle, insan genomundaki protein benzerliğinin ve kromozomal korumanın herhangi bir kemirgen genom dizisinden daha büyük bir ölçüde, sığır genomunda bulunduğu keşfedilmiştir. Sığır genomunun yaklaşık 2.87 Gbp, 22.000'in üzerinde protein kodlayan gen ve bu genlerin yaklaşık 1,217'sinin eutherianlara özgün olduğu görülmüştür (Elsik ve ark., 2009; Bovine HapMap Consortium, 2009). Sığır spesifik evrimsel kesme noktaları kapsayan bölgelerdeki parçasal duplikasyonlar ve tekrar elementlerin yüksek yoğunlukta bulunması, nonallelik homolog rekombinasyonlar, parçasal duplikasyonlar ve tekrar elementleri gibi işlemler tarafından mevcut *Bos taurus* karyotipi biçimlendirilmiştir (Elsik ve ark., 2009; Bovine HapMap Consortium, 2009). Segmental duplikasyonlar sığır genomunun %3,1'inde tespit edilmiştir. Ayrıca % 76'sında tam veya kısmi gen duplikasyonları içerdiği görülmüştür. Bu

duplike olmuş genlerin birçoğunun, dış çevreye müdahale eden proteinleri kodladığı belirlenirken, buna en iyi örnek olarak, immün ve duyu genlerin ekspresyonu gösterilebilir. Sığırlardaki spesifik gen duplikasyonları, farklı ruminant fizyolojisinin gelişimi veya çevredeki değişimlere hızlı adaptasyon için işlevsel olarak önemli olabilmektedir. Doğuştan gelen bağışıklık, β -defensin ve interferon genleri gibi genlerin yaygın duplikasyonları ve ayrışmasının bir sonucu olarak, sığır evrimi boyunca enfeksiyöz hastalık ajanlarına bir çeşit adaptasyon için gerekli olduğunu göstermektedir. Bağışıklık ilgili genlerdeki değişiklikler, mikrobiyal fermantasyonun gelişimi veya bir sürü ortamında hastalık bulaşma oranlarının artışı veya geçişi ile ilişkili olabilmektedir (Elsik ve ark., 2009; Bovine HapMap Consortium, 2009).

2.1. Haplotip Yapısı İle İlişkili Çalışmalar

MHC haplotip yapısı hemen hemen tüm memelilerde korunmuş durumdadır, fakat sığır ve diğer ruminantlarda çoklu DQA ve DQB lokuslarının ekspresyonu benzersizdir, bu özelliğin immün fenotiplerdeki varyasyonların gözlenmesine katkı sağlayabileceği vurgulanmıştır (Scott ve ark., 1987). En az 4 DQB lokusu tanımlanırken, 5. DQB lokusu için güçlü kanıtlar vardır, tek bir haplotipte sadece iki DQA ve DQB lokusu tanımlanmıştır (Gelhaus ve ark., 1999). DQ lokusları tek ve kopyalanmış çeşitleri ile haplotiplenir, tüm lokuslar fonksiyonel olarak bulunur (Gelhaus ve ark., 1999). Bir heterozigotta var olan DQ duplikasyonu immün fenotiplerinin çeşitliliğinde artışa sebep olabilir ve bu durum bazı varyasyonlarla açıklayabilir, ki bu varyasyonlar daha önceden SNP-haplotiplendirilmesi ile tanımlanmamış olsa bile, eğer gendeki duplikasyonlar klasik SNP panelleri ile belirlenmemiş ise yeni lokuslar olarak tanımlanabilmektedir. Bu fikri destekler nitelikte, Gelhaus ve ark. aynı haplotipte DQA5 ve DQB5 birlikte bulunabileceğini, DQA5 ve DQB5 ürünleri farklı immünolojik fonksiyonlar gösteren farklı formlarda DQ molekülleri oluşturabileceğini söylemişlerdir (Gelhaus ve ark., 1999). Bunlara ek olarak, DQ duplikasyonunun bulunması, inter- ve intra- haplotiplere alfa ve beta zincirlerini sağlayarak hücre yüzeyindeki sınıf II moleküllerinin, çeşitlerini artırma potansiyeline sahiptir (Glass ve ark., 2000). Haplotipleri oluşturan genlerdeki duplikasyonlar immün cevaptaki varyasyonlara avantaj sunabilir ki bu avantajın sığırlara uyarlanması mümkündür.

Yaklaşık 92 BoLA haplotipi çeşitli sığır ırklarındaki SNP'ler karşılaştırılarak belirlenmiştir. Haplotiplerdeki farklılıklar diğer yapısal farklılıklardan ziyade SNP'ler ile

daha önce tanımlanmıştır (Downey ve ark., 2014). Spesifik varyasyonlar ile aynı genotiplerin oluşturulmasını, sekans farklılaşması veya olası kopya sayısı etkiler (Usinger ve ark., 1981). Bir genin birden fazla kopyası bir haplotip olarak ifade edilebilir fakat mevcut metotlarla haplotip tanımlanması yetersizdir. Açıklanamamış kopya sayısı varyasyonları ve ekspresyonlar tek bir haplotip ile ilişkili immün cevapların çeşitliliğini etkileyebilir (Ellis ve ark., 1999). Henüz tespit edilmemiş bazı polimorfizimler, BoLA haplotiplerindeki varyasyonlardan kaynaklanmaktadır.

Park ve ark. (2004), gelişmiş hastalık direnci için seçilebilecek genetik ve immünolojik belirteçleri tanımlamak için, Flow (akış) sitometrik analizi ve mikroarray tiplendirme tekniğini kullanarak mastitise karşı genetik direnç ile ilişkili olduğu tahmin edilen haplotipleri belirlemeye çalışmışlardır. Bunun için çalışmada sığır lökosit antijenlerine ve Flow sitometrisine özgü monoklonal antikorları kullanarak mastitise dirençli ve duyarlı ineklerden alınan lenfosit hücrelerinin alt popülasyonları analiz edilmiştir. Mastitis yatkınlığı ile ilişkili olan DH24A ve DH07A haplotiplerinin daha önce tek bir DQ gen setine sahip oldukları belirlenirken mastitis direnci ile ilişkili görünen DH16A ve DH08A haplotiplerinin daha önce çoğaltılmış DQ genleri olduğu gösterilmiştir. Ayrıca duyarlı ineklerin hem meme bezi salgıları hem de periferik kanında T yardımcı hücrelerinde CD4 (ayırım kümesi: clustel of differentiation) ve T sitotoksik hücrelerinde CD8 moleküllerinin oranlarının birden az olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlara bakarak, bir ineğin sahip olduğu DQ genlerinin sayısının ve / veya bir inek CD4: CD8 oranının, sığır mastisine yatkınlık göstergesi olarak kullanılabilme olasılığını artırdığını söylemişlerdir.

Traul ve ark. (2005), Amerikan bizonlarında (*Bison bison*) yaptıkları bir çalışmada, Amerikan bisonu ve evcil sığırların (*Bos taurus* ve *Bos indicus*) 1-1.4 milyon yıl önce ortak bir atadan evrimleştiğini ve bununla beraber bulaşıcı hastalıklara duyarlılıklarında ani farklılıklar gösterdiklerini, ki buna [malignant catarrhal fever (MCF)] mavi dil hastalığının da dahil olabileceğini ve Bizon popülasyonu içerisinde, majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf II genlerindeki polimorfizmlerin, MCF'ye direnci etkilediği hipotezini öne sürmüşlerdir. Bizonlardaki MHC haplotiplerini (Bibi) ilk defa karakterize etmişlerdir. Bunu için 14 bizon tarafından taşınan MHC sınıf II haplotiplerini, DRB3, DQA ve DQB allellerinin PZR temelli klonlanması ve dizilenmesini kullanmışlardır. 14 bizonda 12 MHC sınıf II haplotipi tanımlamış ve bu haplotiplerin altı tanesinin daha önceden bildirilmiş haplotipler olduğunu gösterirken, altı *Bibi-DRB3* ve on bir *Bibi-DQA*

ve on *Bibi-DQB* alelini yeni olduklarını belirtmişlerdir. Dahası, bu haplotiplerin ortolog sığır haplotipleri ile aynı atasal haplotiplerden kaynaklandığı vurgulanmıştır.

Codner ve ark. (2012), Kanada'daki Holstein sütçü boğalarındaki MHC sınıf I bölgesinde genetik çeşitliliğin kapsamını araştırmak, çeşitliliğin zamanla kaybolup kaybolmadığını tespit etmek ve süt sığırlarında MHC çeşitliliğini etkileyen seçici kuvvetleri belirlemek için yaptıkları çalışmada, 20 yıl boyunca MHC çeşitliliğinde bir azalma olduğuna dair herhangi bir kanıt bulunmazken, bazı haplotiplerin görülme sıklığının değiştiği: eski örneklerde nadir görülen A12 (w12B) haplotipinin A15 ile birlikte en yaygın hale gelmişken, önceki örneğe egemen olan A19'un frekansının önemli ölçüde azaldığını vurgulamışlardır. MHC ile üretim, hastalık ve doğurganlık özellikleri arasında anlamlı ilişkiler tespit etmişler ve MHC çeşitliliğinin, bu kontrollü ıslah sisteminde sadece hastalık tarafından şekillendirilmez olduğunu göstermişlerdir. Çeşitlilikteki, zaman içindeki frekans değişiklikleri, hastalık, fertilité ve üretim özellikleriyle ilişki analizler, süt sığırlarındaki sınıf I MHC çeşitliliğinin seçimi dengeleyerek sürdürülmekte olduğunu söylemişlerdir.

Sığır lösemi virüsü (BLV) sığırların en yaygın neoplastik hastalığı olan enzootik sığır lökosisinin etyolojik ajanıdır. Miyasaka ve ark. (2013), Japon siyah sığırlarında BLV proviral yükün ve BoLA sınıf II polimorfizminin ilişkilendirilmesi üzerine yaptıkları çalışmada; BoLA-DRB3 ve BoLA-DQA1 için, 186 BLV ile enfekte olmuş ve klinik olarak normal olan sığırlarda, polimeraz zincir reaksiyon-dizilemeye dayalı yöntemi kullanarak genotiplendirme yapmışlardır. BoLA-DRB3*0902 ve BoLA-DRB3*1101 düşük proviral yükü (LPVL), BoLA-DRB3*1601 ise yüksek bir proviral yükü (HPVL) ilişkilendirirken, BoLA-DQA1*0204 LPVL ve BoLA-DQA1*10012 HPVL ile ilişkilendirmişlerdir. Dahası DRB3-DQA1 haplotipi ve BLV proviral yük arasındaki korelasyonu teyit etmişlerdir. Düşük bir BLV proviral yük ile ilişkili olarak 0902B veya C (DRB3*0902-DQA1*0204) ve 1101A (DRB3*1101-DQA1*10011) olmak üzere iki haplotip, 1601B (DRB3*1601-DQA1*10012) yüksek bir BLV proviral yük ile ilişkili bir haplotip tanımlamışlardır. Dirençliğinin baskın bir özellik olduğunun, duyarlılığın ise resesif bir özellik olduğu sonucuna varmışlardır. Buna ek olarak, Japon siyahı ve Holstein sığırları arasında dirençli alellerin ortak ve duyarlı alellerde farklılık olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca bu çalışma DRB3-DQA1 haplotipi ile BLV proviral yükündeki varyasyonlar arasındaki ilişkiyi tanımlayan ilk rapordur.

Downey ve ark. (2014), yüksek çözünürlüklü radyasyon hibrid haritalaması ile BoLA-BSA'nın (AF396750.1) sekansını lokalize olduğu, 92 farklı BoLA haplotipindeki BSA allellerinin dağılımını ve çeşitliliğini karakterize etmek için dizileme de kullanmıştır. BSA, sınıf I bölgenin distal ucunda kromozom 23'te BoLA bölgesinde lokalize olduğunu belirlemişlerdir. BSA lokusunun 62 benzersiz alleli tanımlamışlardır. Test edilen BoLA haplotiplerinin yaklaşık % 61'i BSA dizisini içerirken, BSA ampliconları haplotiplerin % 39'unda bulunmamıştır. Filogenetik analiz, BSA allellerinin çeşitlilik gösterdiğini ve en az yedi farklı evrimsel gruptan oluştuğunu vurgulamışlardır.

Sa ve ark. (2015), mezbahanedeki hayvanların yumurtalıklarından elde edilen parthenogenetik sığır embriyolarından alınan hücreleri kullanarak, bireylerdeki BoLA haplotiplerini karakterize etmeye çalışmışlardır. Bu şekilde elde edilen 15 parthenogenetik embriyonun, 8'inde BoLA bölgesi üzerinde mayotik rekombinasyon gerçekleşmemiş ve BoLA haplotiplerini tanımlamak için kullanılmıştır. BoLA'nın tek nükleotid polimorfizm (SNP) analizi, Illumina'daki BovineHD chip SNP'lerden tasarlanan özel bir GoldenGate genotiplendirme assay kullanılarak gerçekleştirilmiştir. BoLA sınıf IIa bölgesinin detaylı analizi sonucunda yedi haplotip gösterilmiş bunlardan altı tanesinin daha önce tanımlanmadığı ve ayrıca iki adet BoLA-DQA ve bir BoLA-DQB yeni allelinin bulunduğunu belirtmişlerdir. Ek olarak yöntemlerinin BoLA haplotiplerini tanımlamak için güvenilir homozigot DNA kaynağı sağladığını söylemişlerdir.

2.2. Polimorfizm Çalışmalar

Memeli genomlarının en polimorfik genlerini MHC içermektedir. Yüksek düzeyde polimorfizme sahip MHC genleri, patojenlere tepki ve immün cevaptaki bireysel farklılıkların gelişmesine katkı sağlamaktadırlar (Babiuk ve ark., 2007). BOLA sınıf I ve II genlerindeki polimorfizmler, peptit bağlama bölgelerini, antijen sunumunu, T-hücreleri repertuarını, humoral cavabı, sitotoksik yanıtı, sitokin ağları, aşı cevabını ve hastalık duyarlılığını etkileyerek immün yanıtı etkileyebilir (Miyasaka ve ark., 2011; Takeshima ve Aida, 2006). HLA sınıf II genlerindeki SNP'ler immün cevabın özgüllüğünü belirlemede ve hastalıklara duyarlılıkta rol oynadıkları gösterilmiştir (Nagaoka ve ark., 1999). Benzer şekilde, SNP'ler ve insersiyon/delesyon polimorfizmleri tanımlanmış ve sığırlarda bireysel değişimi ile ilişkilendirilmiştir (Schridder ve Hahn, 2010). Allellerdeki spesifik polimorfizimler, sığır ırkları arasında farklılık göstermiştir ve bağışıklık fenotipleri

çeşitliliği ile birlikte bağışıklık cevabının süresini etkileyebileceği belirlenmiştir (Miyasaka ve ark., 2011; Baxter ve ark., 2009).

Maillard ve ark. (1999), Batı Hint adalarında 568 zebu Brahman sığırında (*Bos indicus*) MHC sınıf II DRB3 geninin ikinci ekzonunda, RsaI, BstYI ve HaeIII restriksiyon enzimleri kullanılarak PCR-Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizm (RFLP) tekniği ile 18 yeni BoLA-DRB3 alleli karakterize edilmiştir. RsaI ile sindirim yapılarak dört yeni PCR-RFLP örneği elde edilmiştir. Bu kalıplar 'v', 'w', 'x' ve 'y' olarak adlandırılmıştır.

Ledwidge ve ark. (2001), Multi-primer hedef polimeraz zincir reaksiyonu (MPT-PCR) spesifik BoLA-DRB3 allellerinin tanımlanması için hızlı bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Tek bir PCR işlemi ile Kanadalı Holstein sığırlarda mastitis riskini artıran iki DRB3.2*23 (DRB3*2701-2703, 2705-2707) allelinin ve riski azaltan DRB3.2*16 (DRB3*1501,1502) allelinin tespit edilebilir olduğunu söylemişlerdir. Bu yöntemde hedef bölge iki dış primer ile çoğaltılırken aynı zamanda iki iç primer ile allel spesifikliği artırılarak örneklerdeki alleler çoğaltılmaktadır. Kullandıkları yöntemi PCR-RFLP genotiplendirme tekniği ile kıyaslayarak, bu tekniğin tüm örneklerinde doğru sonucu verdiğini ve BoLA allellerinin tanımlamasında kolaylık sağlayacağını dile getirmişlerdir.

De ve ark. (2002), nehir mandalarındaki (*Bubalus bubalis*) majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf II DRB genindeki polimorfizm belirleme çalışılmalarında, genotiplendirme ve yeni allellerin hızlı tanımlanması için doğrusal olmayan kompozit jelle, tek zincir konformasyon polimorfizmi (SSCP) ve heterodubleks bantlar (HA) aynı anda analiz edilmiştir. SSCP, HA ve son dizilim, 25 bağlantısız Hint nehir mandasında, 22 MHC-DRB ekson 2 alleli tanımlamasına izin vermiştir. Bunlar, bildirilen ilk nehir mandası DRB ikinci ekson dizileridir. Peptid bağlama bölgelerini kodlayan dizilerde yüksek derecede bir polimorfizm gözlemlenmiş ve bazı amino asit bölgelerinin, nehir mandaları için benzersiz olduğunu bulmuşlardır.

Miltiadou ve ark. (2003), BoLA-DRB3 ekson 2 için hızlı, yüksek çözünürlüklü sekans-baz tiplendirme (dizi tabanlı=sequence-based typing)(SBT) sistemi geliştirmişlerdir. Ekzon bölgesinin amplifikasyonunun nested PZR ile yaparak direk PZR ürününün sekanslamasını gerçekleştirmişlerdir. Heterozigot dizi verileri, her iki allelin otomatik dizi analizi ile elde edilmiştir. Tüm heterozigot pozisyonların tanımlanmasını doğrulamak için ileri ve geri sekans verileri toplanılmıştır. Allelik tayini için özel yazılım olan Haplofinder (Roslin Enstitüsü Yazılımı, Roslin, Birleşik Krallık) kullanılmıştır.

Holstein-Charolais sürüsünde yaptıkları bu analizin ,SBT stratejisi ve Haplofinder yazılımı uygun locus-spesifik primerlerin ve alelik dizilerin mevcut olduğu herhangi bir polimorfik lokusun analizine uygulanabilir olduğunu belirtmişlerdir.

Sena ve ark. (2003), MHC DRB (Bubu-DRB) ve DRA (Bubu-DRA) lokuslarındaki polimorfizm için dört farklı ırktan (üçü nehir ve bir bataklık mandası) olmak üzere yetmiş beş *Bubalus bubalis* örneğinde yaptıkları çalışmada, Bubu-DRB'nin sekiz allelini belirlemişlerdir ve bataklık ırkındaki alellerin hepsinin üç nehir ırkı ile paylaşıldığını göstermişlerdir. Bununla birlikte filogenetik analizleri sonucu, DRB ve DRA genlerinin, *Bubalus* ve *Bos* arasındaki farklı genetik varyasyon modellerini ortaya koyduğunu belirtmişlerdir.

Ballingall ve ark. (2004a), yaptıkları çalışmada DYA ve DIB genlerinin herhangi bir işlevsel önemi olup olmadığını ortaya koymaya çalışmışlardır. Ayrıca BoLA-DIB geninin yeniden adlandırılarak bu genin BoLA-DYB olduğunu göstermişlerdir. İlk tam uzunlukta DYA ve DYB transkriptlerinin analizi ile sırasıyla 253 ve 259 amino asit proteinlerin oluşturma potansiyeline sahip açık okuma çerçeveleri ortaya çıkartılmıştır. DY polipeptidleri ile sığırlar, insan ve farelerdeki sınıf II MHC α ve β polipeptit zincirleri arasındaki karşılaştırmalı dizi analizi, varsayımlanan peptid bağlama bölgesini oluşturup şekillendirdiği tahmin edilen pozisyonlarda, 16 benzersiz amino asit kalıntısı belirlenmiştir. Ayrıca sığırlardaki DY genlerinin MHC sınıf II α ve β polipeptit zincirlerini translasyon yapabildiklerinin ilk kanıtı sunulmuştur.

Ripoli ve ark. (2004), 15 farklı sığır ırkında URR-BoLA-DRB3 (upstream regulatory regions: üst düzenleyici bölge; +1 ile -220 nükleotitler arası) bölgesi içindeki polimorfizmi polimeraz zincir reaksiyonu-tek zincirli konformasyon polimorfizmi (PZR-SSCP) analizi ile belirlemişlerdir. Toplam olarak, yedi PCR-SSCP tanımlı allel tespit edilmiştir. Çalışılan dizilerin hizalanması ile konsensüs dizi kutuları değişmez iken, BoLA-DRB3 yukarı düzenleyici bölgenin (URR) inter-konsensus bölgelerinde altı polimorfik bölge (dört geçiş, bir transversion ve bir delesyon) gösterilmiştir. Belirlenen altı polimorfik bölgenin beşinde inter-konsensus bölgelerinde bir nükleotid farklılık bulunmuştur. Bu bölgedeki farklılığın ekspresyona bir etkisinin olmayacağı beklenirken CCAAT ve TATA kutuları arasında AY364455 dizisindeki delesyonun, promotor bölge ve transkripsiyon faktörleri arasındaki afiniteyi etkileyeceği belirtilmiştir. Ayrıca analiz edilen URR-BoLA-DRB3 DNA sekanslarının orta seviyede nükleotid çeşitliliği göstermiştir.

Nassiry ve ark. (2005), İran holstein sığırlarında yaptıkları BoLA-DRB3 allellerini belirleme çalışmalarında, bu allelin frekansının belirlemek için hemi-nested PZR-RFLP tekniğini kullanmışlardır. Yüksek düzeyde polimorfik olan BoLA-DRB3 lokusunda 26 allel belirlemişlerdir. İncelenen sığırlardaki allellerin yaklaşık % 67'sini, BoLA-DRB3.2*8, *24, *11 ve *16 olarak adlandırılan dört allelin oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Allel frekansları % 1'den düşük olarak ise DRB3.2 *54, *37, *36, *28, *25, *14, *13, *10, *1 allellerinin göstermişlerdir. İncelenen İran holstein sığırları ile diğer sığır ırkları arasında önemli farklar bulmuşlardır, bunu en açık göstergesi, diğer holstein sığırlarında daha düşük kistik ovaryum hastalığı riski ile ilişkili allellere (BoLA-DRB3.2 *22, *2 ve *16) sahip olduğu, mastitis direnci ve sığır lösemi virüsü (sığır löykozu) enfeksiyonuna ilişkili allellerin frekansı sırasıyla % 10,4 ve % 4.4 olarak tespit edilmiştir. Bunun sonucu olarak İran holstein sığırlarının çeşitli hastalıklara dirençli olduğunu vurgulamışlardır.

Paswan ve ark. (2005), 75 melez çiftlik sığırdaki DRB3 ekzon 2 bölgesindeki genetik polimorfizm için PZR-RFLP tekniğini kullanmış ve 284 bp PZR ürünü için HaeIII restriksiyon enzimi ile kesme yapılarak beş genotip belirlenmiştir, yani HaeIII-a, HaeIII-b, HaeIII-e, HaeIII-ab ve HaeIII-ae şeklinde gözlemlemişlerdir. RsaI restriksiyon enzimi ile, 24 farklı restriksiyon notası bulurken, PstI ile DRB3.2 geninin 284 bp PZR ürününün kesiminde herhangi bir restriksiyon bölgesi bulamamışlardır. Bu sonuçlar, bazı hayvanlarda tanıma alanının bulunmadığını ortaya koymuştur.

Babiuk ve ark. (2007), 36 adet Charolais sığır melezi ile yaptıkları çalışmada, allel varyasyon derecesini belirlerken, BoLA sınıf I sekanslarının tam uzunluğu için cDNA klonlarını kullanmışlardır. Yirmi farklı BoLA sınıf I allelini tespit ettikleri bu çalışmada sadece dört tanesinin daha önceki çalışmalarda belirlendiğini bulmuşlardır. Hayvanlardaki allel sayısının 1 ile 4 arasında değiştiğini göstermişlerdir. Polimorfik amino asit bölgeleri, ADAPTSITE programı kullanılarak pozitif ve negatif seleksiyon için analiz edilmiştir. Antijen tanıma bölgelerinde (ARS), pozitif seçim altında olacağı tahmin edilen sekiz pozisyon ve negatif seçim altında olacağı tahmin edilen üç pozisyon olabileceği toplamda 62 pozisyon belirlenmiştir. Buna karşılık, non-antijen tanıma bölgeleri (ARS olmayan) için, pozitif seçim altında olduğu tahmin edilen üç pozisyon ve negatif seçim altında olacağı tahmin edilen 20 pozisyon belirlenirken toplamda 278 pozisyon bulunmuştur. Bunun sonucu olarak, Antijen tanıma bölgeleri içinde amino asitlerin pozitif seçiminin daha büyük bir sıklıkta gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Takeshima ve ark. (2007), BoLA-DQA1 için hızlı, yüksek çözünürlüklü dizi tabanlı bir tiplendirme (SBT) sistemi geliştirmişlerdir. Yeni tasarladıkları primerler kullanılarak 355 bp BoLA-DQA1'i tamamen nested polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifiye ettikten sonra her bir ürünün doğrudan sekanslamasını yapmışlardır. Bu yöntemi kullanarak Beşinci Uluslararası BoLA Workshop BoLA haplotipleri karakterize edilen 51 hayvandaki lokus bölgesi araştırmıştır. 15 farklı DQA1 alleli tanımlamış ve PCR-SBT'nin tiplendirme sonucu ile restriksiyon fragment uzunluğu polimorfizm analizi arasında herhangi bir farklılık bulunmamıştır. BoLA-DRB3 tiplendirilirken geliştirilen bu yöntemle birlikte, BoLA-DQA1 için PZR-SBT, ayrıntılı sınıf IIa haplotip analizi için açık bir araç olarak önermişlerdir.

Takeshima ve ark. (2008a), Japonyadaki 352 sığırdaki (95 Japon Siyahı, 91 Holstein, 102 Japon Shorthorn ve 64 Jersey sığır) BoLA- DQA1 geni, sekans-baz tiplendirme metodunu kullanarak dizilemişlerdir. Bunu sonucu olarak toplamda 19 yeni allel belirlemişlerdir. Bu allerlerden 13 tanesi Holstein, 12 tanesi Jersey, 10 tanesi Japon Shorthorn ve 15 tanesi Japon siyah (Japanese Black) ırklarında bulunmuştur. Dört Japon sığır ırkının DQA1 gen alel frekansları, neighbor-joining yöntemiyle oluşturulan dendrogram, Holstein ve Japon Siyah ırklarının birbirlerine en yakın olduklarını, Jersey Shorthorn'dan bu iki ırktan daha uzak olduğunu gösterilmiştir. Buna ek olarak, Wu-Kabat analizi, sırasıyla, Holstein ve Japon Siyahı DQA1 allellerinin en çok ve en az polimorf olduğunu göstermiştir. Filogenetik analizler sığır, koyun, bizon ve keçi gibi Bovidae'nin DQA1 geninin domuz SLA-DQA genlerine insan HLA-DQA1 ve köpek DLA-DQA genlerinden daha çok benzer olduğu belirlenmiştir. Sığır, keçi, bizon, koyun, insan ve domuz DQA1 molekülleri amino asit dizisi polimorfizminde benzer oranlara sahipken, polimorfik kalıntılarının dağılımı köpek DQA1 proteinindeki farklılıklar göstermiştir.

Yoshida ve ark. (2008), Tokyodaki Tama bölgesindeki sütçül holstein sürülerinde BoLA-DRB3'ün alel frekansı ve mastitisle ilişkisini, PZR-RFLP tekniği ve somatik hücre skorları dikkate alınarak belirlenmişlerdir. Bunun için 26 süt sürüsünde 702 baş BoLA-DRB3 alleli polimorfizm açısından incelenmiştir. Allelik frekanslar $< \% 1$ ile $\% 20.3$ arasında değişen yirmi allel gözlemlenmiştir. Allelerin $\% 90$ 'ını oluşturan dokuz allel sırayla DRB3.2*24, *16, *8, *23, *22, *3, *11, *10 ve *7'dir. Somatik hücre sayısı (SCC) yönünden sınıflandırılan hayvanlardaki allel frekanslarına dikkate alınmış ve DRB3 allellerinin tek başına istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, allel kombinasyonları düşünüldüğünde, DRB3.2 *8 / *23 ($P < 0.1$) ve DRB3.2 *16 /*24 ($P < 0.05$) frekansları,

anlamalı derecede yüksektiği görülmüştür. Bu nedenle, mastitis direncinin veya ineklerin duyarlılığının, BoLA-DRB3 allellerinin kombinasyonuna göre değişebileceği belirtilmiştir.

Juliarena ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada daha önceden sığır lösemi virüsü (sığır löykozu: BLV) ile enfekte olan 230 holstein sığırını, düşük ve yüksek proviral yüklerle (sırasıyla LPL ve HPL) karakterize edilen iki enfeksiyon profiline ayırarak, bu hayvanlarda BoLA-DRB3.2* genindeki polimorfizm etkisini araştırmışlardır. Genotiplendirme sonrasında, BoLA-DRB3.2* alelleri ile BLV enfeksiyon profili arasındaki ilişki, olasılık oranı (OR) olarak belirlemişlerdir. Allel *11'in iki alt tipi belirlenmiştir (ISAG*0901 ve *0902). Allel ISAG*0902, alel*11'in kendisinden (OR = 5.82; P <0.0001) LPL profiliyle (OR = 8.24; P <0.0001) güçlü bir ilişki göstermiştir. Allele ISAG*1701 (*12) ayrıca LPL profili ile anlamlı ilişki göstermiştir (OR = 3.46; P <0.0055). Yalnızca bir allel, ISAG*1501 veya 03 (*16), HPL ile anlamlı ilişki göstermiştir (OR = 0.36; P <0.0005). Allel ISAG*0902'nin holstein sığırlarında BLV direnci gösteren en iyi allel olduğunu belirtmişlerdir.

Baxter ve ark. (2008), çok sayıdaki heterozigot sığırdaki BoLA-DRB3 alleli için hızlı ve sağlam dizi tabanlı genotiplendirme yöntemi kullanarak daha önceden belirlenen 104 allelin konsensüs dizisi HAPLOFINDER yazılımı aktarılmıştır. Bu yazılımın en önemli özelliği, hataları kontrol ederek, çok sayıda örneği işleme yeteneğini geliştiren bir ön-işleme basamağına sahip oluşudur. Bu yaklaşımı kullanarak BoLA-DRB3 için 400'den fazla HolsteinXCharolais sığır genotiplendirilmiştir.

Behl ve ark. (2009a), üç *Bos indicus* ırkı, yani Sahiwal, Rathı ve Haryana'daki BoLA-DRB3.2 lokusunun polimorfizmi, RsaI, Bst Y1 ve Hae III enzimlerini kullanarak PZR-RFLP tekniği ile incelemişlerdir. 3 *Bos indicus* ırkında toplam 30 farklı BoLADRB3.2 aleli bulunmuştur. BoLA-DRB3 allellerinin frekanslarına dayanan UPGMA metodu kullanılarak bir dendrogram oluşturulmuştur. Rathı ve Haryana ırkları genetik olarak en uzakta bulunurken, Haryana ırkı, diğer iki ırktan (Rathı ve Sahiwal) farklı bir dala kümelenmiştir. DRB3 allelleri için en küçük genetik uzaklıklar Sahiwal ve Rathı arasında 0.5461 mesafelerdeyken, Haryana ve Sahiwal arasındaki genetik uzaklık ise 0.6123 olarak bulunmuştur.

Ruzinaa ve ark. (2010), BoLA-DRB3 geninin polimorfizmi, *Bos taurus* turanomongolicus grubunu temsil eden üç sığır ırkında (Moğolca, Kalmyk ve Yakut) PCR-RFLP tekniği kullanılarak incelemişlerdir. 35 BoLA-DRB3.2 alelleri, Moğol ırkında ve 34

allelin ise Kalmyk ırkında tespit edilmiştir. Her iki popülasyondaki allel frekansları eşit olarak dağılmıştır; Moğal ırkında en çok görülen allelerin (*18, *20 ve *28) frekansları % 7.75 ila % 8.45 arasında değişirken, Kalmyk sığırlarının en sık alelleri *28 (% 14.52), *24 (% 7.26) ve *12 (% 6.45) olarak belirlenmiştir. Yakut sığır ırkında sadece beş allel tespit edilmiştir, bu allelerden en sık görüleni *29 alleli % 77.3, sonrasında *1 alleli % 13.1, kalan üç allel ise sadece % 9.6 şeklinde frekansları hesaplanmıştır. Bu daha önce sığır ırklarında belirlenmiş BoLA-DRB3 alelleri için en düşük çeşitlilik seviyesi olarak tanımlanmıştır.

Wu ve ark. (2010), Çin Holstein sığırlarındaki BoLA-DRB3 ekzonunun (BoLA-DRB3.2) genetik çeşitliliğini araştırmışlardır. PZR ürünlerinin Hae III, Bst YI ve Rsa I ile kesiminden (RFLP) sırasıyla 6, 4 ve 11 farklı fragment elde etmişlerdir. 25 DRB3.2 allelinin DNA sekansı gösterilmiştir. GLM (General Linear Model) modelleme analizi, laktasyon ve buzağılama sezonun ile SCC (Somatik Hücre Sayısı) arasında pozitif bir korelasyon sergilerken, BoLA-DRB3.2*3, *8, *18 ve *26 alelleri düşük SCC ile ilişkilendirilmiştir ($p<0.01$).

Sena ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada ekonomik olarak önemli olan bir sığır türü olan su mandasında (*Bubalus bubalis*) DQB allelerini analiz etmişlerdir. Bubu-DQB (*Bubalis bubalis*-DQB) için 12 allel, nükleotid dizisi analizi ile belirlenmiştir. Filogenetik analiz yapılarak, sığırlarda bulunan en az üç farklı lokus (BoLA-DQB1, BoLA-DQB3 ve BoLA-DQB4) ile ilişkili su mandalarındaki alleller ile çok sayıda trans-tür polimorfizmini ortaya çıkartılmıştır. Su mandaları ve sığırların ortak ataları nedeniyle DQB bölgesinin mevcut düzenini paylaştıkları sonucuna varmışlardır.

Chu ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada Beijing Holstein ineklerinin, BoLA-DRB3 geninin 2. ekzonundaki polimorfizmi ve somatik hücre skoruyla olan ilişkisini incelemişlerdir. 211 Beijing Holstein örneğinde genetik polimorfizmi belirlemek için endonükleaz HaeIII ve BstYI kullanılmıştır. PZR ürünlerinin HaeIII ile kesilmesi sonucunda yedi genotip tespit edilmiştir. AA, AB, AC, AD, BB, BC ve BF genotiplerinin frekansı sırasıyla 0.4638, 0.0193, 0.0193, 0.3478, 0.0290, 0.0386 ve 0.0822 olarak belirlenmiştir. Aynı PZR ürünlerinin BstYI ile kesilmesinde üç genotip bulunmuştur. AA, AB ve BB genotiplerinin frekansı sırasıyla 0.0569, 0.2844 ve 0.6587 olarak hesaplanmıştır. PCR ürünlerini BstYI ile sindirerek üç genotip bulundu. AA, AB ve BB genotiplerinin sıklığı sırasıyla 0.0569, 0.2844 ve 0.6587'dir. BoLADRB3 geninin ekson 2'sindeki polimorfizmler ile Pekin Holstein ineklerinde somatik hücre skoru (SCS) arasındaki ilişki,

en küçük kareler doğrusal modeli ile analiz edildi. Yedi HaeIII-RFLP genotipi için somatik hücre skorunun (SCS) en küçük kareler ortalamaları arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($P > 0.05$). BstYI-RFLP analizi için, AA için SCS'nin en küçük kareler ortalamasının AB veya BB için olana oranla anlamlı derecede düşük olduğunu bulunmuştur, ayrıca AB ve BB genotipleri arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($P > 0.05$). Mastitis direnci için en uygun genotip BstYI AA iken, en uygunsuz olan genotip olarak BstYI BB belirlenmiştir.

Das ve ark. (2012), PZR-RFLP metoduyla Güney Hindistan'daki Malnad Gidda, Hallikar ve Ongole (*Bos indicus*) sığır ırklarındaki BoLA-DRB3.2 lokusunun genetik polimorfizminin değerlendirmişlerdir. Malnad Gidda popülasyonunda, % 1.87 frekansına sahip yeni bir DRB3*2503 allelide (GenBank: HM031389) dahil olmak üzere 37 BoLA-DRB3.2 alleli tespit edilmiştir. Aynı zamanda Hallikar ve Ongole popülasyonlarında sırasıyla 29 ve 21 adet BoLA-DRB3.2 alleli belirlenmiştir. Malnad Gidda popülasyonundaki en yaygın BoLA-DRB3.2 alelleri ve frekansları (allel frekansı $> \% 5$) sırasıyla; DRB3.2*15 (% 10.30), DRB3*5702 (% 9.35), DRB3.2*16 (% 8.41), DRB3.2*23 (% 7.01) ve DRB3.2*09 (% 5.61) allelleridir. Hallikar popülasyonunda en sık görülen alelleri; DRB3.2*11 (% 13.00), DRB3.2*44 (% 11.60), DRB3.2*31 (% 10.30), DRB3.2*28 (% 5.48) ve DRB3.2*51 (% 5.48)'dir. Ongole popülasyonundaki en yaygın aleller; DRB3.2*15 (% 22.50), DRB3.2*06 (% 20.00), DRB3.2*13 (% 13.30), DRB3.2*12 (% 9.17) ve DRB3.2*23 (% 7.50)'dür. *Bos indicus* ve *Bos taurus* sığır ırkında gözlemlenen BoLA-DRB3.2 allel frekanslarına dayanılarak oluşturulan filogenetik ağaç, spesifik *Bos indicus* sığır ırklarının birbirinden farklı kümeleşmesi ile bunların arasında gözlenen benzersiz genetik farklılıkları ortaya koymuştur.

Lee ve ark. (2012), Kore yerli sığır ırkı alaeon Hanwoo ve Holstein popülasyonundaki BoLA-DRB3.2 alleli incelenmiştir. Hanwoo'da 11 yeni allel (BoLA-DRB3*1303, *4702, *7101, *7501, *7201, *7301, *7601, *1104, *7701, *7401 ve *50021) birlikte 38 allel ve Holstein ırkında da yeni bir allelinde (BoLA-DRB3*7601) dahil olduğu dokuz allel belirlenmiştir.

Giovambattista ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada Latin Amerika'daki Bolivian Yacumeño ve Colombian Hartón del Valle Creole sığır ırklarında MHC-DRB3 çeşitliliğinin karakterizasyonunu yapmışlardır. Yacumeño ırkında 35 allel belirlerken bu allelerden üçünün yeni olduğunu, Hartón del Valle ırkında ise belirlenen 24 allelin ikisinin yeni alleler olduğunu vurgulanmıştır. İlginç olan Latin Amerika Creole sığırlarındaki

küçük populasyon hacmine rağmen yüksek düzeyde gen çeşitliliği göstermişlerdir ve belirlenen 10 allelden üç'ü yeni allel olduğu görülmüştür. Filogenetik ağaçtan elde edilen sonuçlara göre Yacumeño ve Hartón del Valle ırklarının birbirleriyle yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Gowane ve ark. (2013b), kapalı ve melez bir sığır popülasyonunda, in aktif üç değerli (O, A ve Asya1) şap hastalığı virüsü aşısına karşı bağışıklık tepkisinde değişkenlik gösteren, bağlanma ceplerindeki varyasyonlar kullanılarak DRB3'ün 2. ekzonundaki polimorfizm ile ilişkisini araştırmışlardır. Korunmuş (≥ 1.8) ve korunmasız (< 1.8) hayvanları ayırmak için antikor titresi ≥ 1.8 (genellikle serumun mililitresinde bulunan ve ünite olarak ifade edilen mevcut antikor miktarı) kesme değeri olarak ayarlanmıştır. Çalışılan melez popülasyonda frekans değeri %3'ün üzerinde 11 farklı allel tespit edilmiştir. DRB3*0201, *0801 ve *1501 alleleri her zaman koruyucu immün yanıtın yüksek düzeyi ile bağlantılıyken, *0701, *1103 ve *1101 alleleri ise her üç serotip içinde korunmasız bağışıklık cevabın düşük düzeyi ile bağlantılı bulunmuştur. Benzer şekilde bağlanma ceplerindeki spesifik kalıntılar FMD aşısına karşı immün yanıt için çok önemli olduğu belirlenmiştir.

Ramirez ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada Kolombiyadaki sığırlarda subklinik mastitis ile BoLA-DRB3 ve TLR4 (toll benzeri reseptör) allellerinin ilişkisini araştırmışlardır. İki yıl boyunca 32 sürüdeki laktasyon dönemindeki 996 baş örnek aylık olarak değerlendirilmiş ve subklinik mastitis için teşhis edilmiştir. Ayrıca TLR4 alıcı-bağlayıcı bölge 2 (T4CRBR2) ve BoLA-DRB3'ün ikinci ekzonu için genotiplendirilmiştir. Aday alleller ile subklinik mastitis arasındaki ilişki lojistik regresyon analizi ile ölçülmüştür. Populasyonda en sık görülen BoLA-DRB3 alleleri sırasıyla DRB3.2 *8, *22, *24, *16, *10, *23, *gba, *11, *2, *mbb, *jba, *3 ve *15 şeklindedir belirlenmiş ve popülasyonun % 58.9'unu oluşturdukları tespit edilmiştir. T4CRBR2-A ve -B alleleri için frekanslar sırasıyla 0.352 ve 0.647 olarak hesaplanmıştır. DRB3.2 *23 allelinin subklinik mastitis ve koagülaz-negatif *Staphylococci* enfeksiyonu ile ilişkilendirilmiştir. Hiçbir allel *Streptococcus agalactiae* enfeksiyonu ile ilişkilendirilememiştir. Allel *mbb koagülaz-negatif *Staphylococci* enfeksiyonu oluşumu ile ilişkiliyken, allel *jba ve *15'in koagülaz-negatif *Staphylococci* enfeksiyonuna dirençle ilişkilendirilmiştir. Ancak T4CRBR2 ve subklinik mastitis arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir.

Xi ve ark. (2014), Çin'deki yakow (*Bos grunniens* x *Bos taurus*) ırkındaki MHC sınıf II DQB 2. Ekzon allellerindeki nükleotid dizisi ve polimorfizmi diğer bovidae

türlerinde daha önce bildirilen örneklerle karşılaştırarak hastalık direnci ile ilişkili genetik faktörleri araştırmışlardır. Dizi analizleri sonucunda, 44 Çinli yakow arasında 36 DQB ekson 2 alleli olduğu ortaya çıkartılmıştır. Çin yakow arasındaki bu çeşitliliğin, geniş bir yelpazede bulunan peptitlere veya patojenlere bağışıklık tepkileri verme yeteneği kazandırdığı sonucuna varmışlardır.

He ve ark. (2014), çalışmalarında, 32 yak'tan (*Bos grunniens*) MHC sınıf II DQB geninin 2. ekzonunu klonlanmış, dizilemiş ve daha önce bildirilen diğer bovidae modelleri ile karşılaştırmışlardır. Sekans analizleri ile 32 yak arasında 25 DQB ekson 2 aleli ve tüm alellerin DQB1 lokusuna ait olduğu ortaya çıkartılmıştır. Bu alellerin, peptid bağlanma yerlerini oluşturan pozisyonlarda ortaya çıkan amino asit varyasyonlarının çoğunun yüksek derecede bir nükleotid ve amino asit polimorfizmleri sergilediği belirlenmiştir. Yaklar arasındaki bu değişkenliğin, geniş bir yelpazede bulunan peptitlere veya patojenlere bağışıklık tepkileri yükleyebilme yeteneği kazandırdığını vurgulamışlardır.

Takeshima ve ark. (2015), yaptıkları çalışmalarında, ılıman ve soğuk bölgelerde yerel yerli ırklarla seleksiyon ve/veya melezleme yoluyla yetiştirilen Güney Amerika Holstein (Arjantin, Şili, Japonya, Paraguay, Peru ve Bolivya) popülasyonlarında BoLA-DRB3 geninin genetik çeşitliliğini incelemişlerdir. Arjantin ve Paraguay holsteinde en yüksek frekansa sahip allel olarak *0101 allelini 17.7 (%15.2–20.4) belirlemişken, Bolivya, Paraguay, Peru ve Şilideki holsteinlarda *1501 alleli sırasıyla 18.2 (%14.2–22.9), 17.7 (%13.2–23.0), 21.4 (%16.7–26.9) ve 21.7 (%16.5–27.6) frekansa sahip olduğunu göstermişlerdir. Filogenetik analiz ile ılıman veya soğuk bölgelerde yetiştirilen Holstein'lara kıyasla Bolivya'nın subtropikal popülasyonunun genetik farklılığının en büyük olduğu ve bu popülasyonun Bolivya'daki Creole sığırlarıyla yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir.

2.3. BoLA ve Hastalık İlişkisi Çalışmaları

MHC birçok türde hastalıklara duyarlık ve immün cevapla ilişkilendirilmiştir (Kelley ve ark., 2005). Hastalıklarla ilişkili çalışmalarda immün cevap ile ilişkili çok sayıda değişik allel belirlenmiştir. Sığırlarda sınıf II allelleri şap, dematofilosis, mastitis ve sığır lösemi virüsü gibi hastalıklara karşı hayvandan hayvana değişen hastalık duyarlılığı ile ilişkilendirilmiştir (Lewin ve Bernoco 1986; Xu ve ark., 1993; Sharif ve ark., 1998; Untalan ve ark., 2007; Fadista ve ark., 2010; Miyasaka ve ark., 2011). Bir çok çalışmada sığır ırkları ve hastalık özellikleri arasındaki ilişki DRB3 allelinin mastitise duyarlı/dirençli

özelliğine dayandırılarak açıklanmıştır (Oprzadek ve ark., 2012). Bazı tanımlanmış hastalıklarda, etkilenmiş bireylerde yüksek frekansa sahip yaygın haplotiplerin belirlenmesiyle haplotip ve hastalık duyarlılık ilişkisi gösterilmiştir (Todd ve ark., 1988).

DR lokusundan kodlanan beta zinciri diğer genlerin aksine yüksek derecede polimorfiktir. Polimorfizm yüksek düzeyde 2 ekzondadır, bu bölge peptit bağlanma bölgesinin değişken parçasıdır. Sığırlarda en az 3 DRB locisi bulunurken sadece bir tanesi DRB geni (DRB3) fonksiyoneldir. BOLA-DRB1; stop kodonu, beta1 ve transmembran bölgesi içeren bir psödogendir. Çok düşük seviyede polimorfizm gösterir. BOLA-DRB2; çok düşük seviyede ifade edilir ve monomorfiktir (Burke ve ark.,1991). DRB3 lokusunda yapılan birçok polimorfizm çalışmaları bu bölgedeki antijen bağlanma bölgesi ve bu bölgedeki varyasyonların özellikle patojenlere karşı farklı bireylerde değişik immün cevaplarla önemli ilişkisi olabileceğini göstermiştir. Ayrıca çeşitli sığır ırklarındaki DRB3.2 (DRB3 geni 2. Ekzonu) lokusunun genetik varyasyonların, yüksek dercede polimorfik oluşunun, gen frekansının ve allel spektrumunun farklı sığır ırklarında farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Farklı BOLA-DRB3.2 Alellerinin Sığır Irklarındaki Gen Frekansları.

İrk	Toplam Alel Sayısı	Gen Frekansı %5'den Fazla Olan Aleller	N	Kaynak
Aberdeen Angus	16	BOLA-DRB3.2 *36,*8,*4,*5,*22,*20,*10	65	Golijow ve ark.,(1996)
Argentine Creole	21	BOLA-DRB3.2 *05,*15,*18,*20,*24,*27	194	Giovambattista ve ark.,(1996)
Ayrshire	18	BOLA-DRB3.2 *8,*7,*28,*10,*24	129	Udina ve ark.,(1998)
Black Pied	-	BoLA-DRB3.2*22, *24, *11,*16, *18, *23, *8	200	Sulimova ve ark.,(1995)
Black Pied	-	BoLA-DRB3.2*22,*24,*11,*16	129	Udina ve ark.,(1998)
Chinese Yellowq	23	BOLA-DRB3.2*2002, *2003, *3101, *3103, *4302, *5702, *6001	80	Wang ve ark.,(2008)
Gir	27	BOLA-DRB3.2 *7,*16,*20,*27,*29,*35	424	Machado ve ark.,(2005)
Harianan	16	BOLA-DRB3.2*02, *06, *08, *20 ve *36	35	Behl ve ark.,(2009a)
Holstein	27	BOLA-DRB3.2*03, *08, *11, *16, *22, *23 ve *24	835	Sharif ve ark.,(1998)
Holstein	29	BOLA-DRB3.2*22, *24, *08, *16, *23 ve *11	1100	Dietz ve ark.,(1997b)
Holstein	22	BOLA-DRB3.2*08, *11, *23, *22 ve *16	127	Dietz ve ark.,(1997a)
Holstein	16	BoLA-DRB3.2*3,*7,*8,*16,*22,*23,*24,*27	752	Oprzadek ve ark.,(2012)
Holstein	19	BOLA-DRB3.2 *3,*7,*8,*9,*10, *11, *16,*22, *23,*24,*27	186	Starkenbourg ve ark.,1997
Holstein	18	BoLA-DRB3.2*3,*7,*8,*16,*22,*23,*24,*27	101	Takeshima ve ark.,(2003)
Holstein	12	BOLA-DRB3.2 *8, *11,*23,*24,*22,*16,*27	137	Kelm ve ark.,1997
Holstein	26	BoLA-DRB3.2*3,*7,*8,*16,*22,*23,*24,*27	250	Nassiry ve ark.,(2005)
Iranian Golpayeganik	19	BOLA-DRB3.2*52, *45, *28, *19, *16, *11 ve *10	50	Mosafer ve Nassiry, (2005)

Çizelge 2.1. Devamı.

İrk	Toplam Alel Sayısı	Gen Frekansı %5'den Fazla Olan Aleller	N	Kaynak
Iranian Holsteinp	28	BOLA-DRB3.2*08, *11, *16, *22, *23 ve *24	262	Pashmi ve ark.,(2009)
Iranian Sistanir	32	BOLA-DRB3.2*08, *10, *11, *20, *34 ve *X	65	Mohammadi ve ark.,(2009)
Japanese Blackt	22	BOLA-DRB3*0201, *0503, *1001, *1101, *1201, *1501 ve *1601	507	Miyasaka ve ark.,(2011)
Japanese Holsteins	16	BOLA-DRB*0101, *1501, *1201 ve *1101	194	Yoshida ve ark.,(2009b)
Japanese Holsteint	17	BOLA-DRB*0101, *1001, *1101, *1201, *1501 ve *2703	143	Miyasaka ve ark.,(2011)
Japanese Shorthornh	21	BOLA-DRB3.2*08, *09, *21, *27, *07 ve *24	176	Takeshima ve ark.,(2002)
Jersey	13	BOLA-DRB3.2*07, *10, *17, *21, *20, *28 ve *32	66	Sharif ve ark.,(1998)
Jersey	24	BOLA-DRB3.2*08, *10, *15, *21, *36 ve *ibe	172	Gilliespie ve ark.,(1999)
Kankrejm	24	BOLA-DRB3.2*15, *06, *20, *37, *46, *34	50	Behl ve ark.,(2007)
Norwegian Redl	27	BOLA-DRB3.2*03, *07, *08, *11, *24, *26, *27	523	Kulberg ve ark.,(2007)
Rathin	13	BOLA-DRB3.2*10, *15, *08, *09 ve *37	51	Behl ve ark.,(2009a)
Russian Ayrshirei	18	BOLA-DRB3.2*07, *28, *08, *10 ve *24	127	Udina ve ark.,(1998)
Saavedrenof	22	BOLA-DRB3.2*16, *36, *08, *11, *27, *37 ve *07	125	Ripoli ve ark.,(2004b)
Sahiwaln	20	BOLA-DRB3.2*02, *15, *08, *09, *37		Behl ve ark.,(2009a)
Sistani	32	BoLA-DRB3.2* 8, *10, *11, *20	65	Mohammadi ve ark.,(2009)
Tharparkaro	15	BOLA-DRB3.2*01, *37, *taa, *i1cc ve *10	33	Behl ve ark.,(2009b)
Zebu × Holstein	40	BoLA-DRB3.2*16, *51, *23, *11	409	Duangjinda ve ark.,(2009)

Mastitis ya da meme bezi iltihabı, süt sığırlarında en sık görülen bulaşıcı bir hastalıktır ve süt ürünleri endüstrisi için önemli bir ekonomik sorun oluşturmaktadır. Mastitis, hem genetik hem de genetik olmayan faktörleri içeren karmaşık etyolojiye sahip multi-faktörel bir hastalıktır (Heringstad ve ark., 2000). Hijyen, barınak, iklim, sağım ekipmanları ve prosedürleri, meme yaralanmalarının tedavisinde ve yem kalitesi dahil olmak üzere birçok yönetim uygulamaları hayvandaki mastitis duyarlılığını etkileyebilmektedir (Hameed ve ark., 2008). Mastitis enfeksiyonları ağır klinik ve hafif subklinik arasında değişmektedir. Klinik enfeksiyonlar, sütün miktarını ve kompozisyonunu değiştiren, somatik hücre sayısını artıran ve ölümcül olma potansiyeline sahip enfeksiyonlardır (Heringstad ve ark., 2000). Mastitise neden olan başlıca patojenler, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* ve *Mycoplasma bovis* olarak gösterilebilir (Hameed ve ark., 2008). Mastitise neden olan başlıca çevresel patojen bakterilerin tipik özellikleri gram-negatif oluşudur, koliform grubunda; *Citrobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Serratia*, *Pseudomonas sp.*, *Proteus*

gösterilirken, streptokok grubunda ise; *Streptococcus equines*, *Streptococcus uberis* ve *Streptococcus dysgalactiae* gösterilebilir. Çevresel patojenler, klinik enfeksiyonlara değişik derecelerde yol açarlar ve süreleri nispeten daha kısadır (Hameed ve ark., 2008). Sığırlardaki bazı bulaşıcı hastalıklara duyarlılık/dirençlilik ile BoLA alellerinin bir veya daha fazla ilişkisi olduğu birçok çalışma ile rapor edilmiştir. Sığırlarda belirli bir DRB aleli birçok viral hastalılara duyarlılık ve direnç özelliğini göstermiştir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Farklı hastalıklarla ilişkili BoLA alelleri.

Hastalık	BoLA alleli	Özelliği (Dirençli/Duyarlı)	Kaynak
BLV enfeksiyonlu sığırlarda KL'ye	DRB3.2*11, DRB3.2*23, DRB3.2*28	Direnç	Xu ve ark., (1993)
Lösemi	BoLA-DRB3.2*11, *23 ve *28	Direnç	Sulimova ve ark., (1995)
Dermatophilosis	BoLA-A8, BoLA-DRB3 "E1AY"	Yüksek Direnç	Maillard ve ark., (1996)
Şiddetli mastitis	BoLA-DRB3.2*23	Yüksek Duyarlılık	Sharif ve ark., (1998)
Yavru zararının atılmaması	BoLA-DRB3.2*03	Düşük Duyarlılık	
Kistik ovaryum hastalığında	BoLA-DRB3.2*16, *22	Risk azaltıcı	
Şap sonrası bağışıklığa karşı koruma seviyelerinin artması,	DRB3.2*1, DRB3.2*3, DRB3.2*7		
Şap sonrası bağışıklığa karşı koruyamama	DRB3.2*12, DRB3.2*18		Garcia-Briones ve ark., (2000)
Ticari kene aşısına karşı yüksek immün yanıt	DRB3*0201		Sitte ve ark., (2002)
Kalıcı lenfositoz	DRB3.2*7	Direnç	Udina ve ark., (2003)
Dermatophilosis	DRB3*0301-0302 / DRB3*3401-3402 ve DQB*1804	Yüksek Duyarlılık	Maillard ve ark., (2003)
<i>Theileria parva</i>	DRB3*2703, DRB3*1501	karşı koruma ve sonrasında bağışıklığı artırma	Ballingall ve ark., (2004a)
Klinik mastitis	DRB3.2*03, DRB3.2*11	Düşük Duyarlılık	Rupp ve ark., (2007)
Klinik mastitis	DRB3.2*08	Yüksek Duyarlılık	
Somatik hücre sayısında	DRB3.2*3, DRB3.2*11	Azalış	
Somatik hücre sayısında	DRB3.2*22, DRB3.2*23	Artış	
Klinik mastitis	DRB3.2*13, *18, *22 ve *27	Düşük Duyarlılık	Kulberg ve ark., (2007)
<i>Amblommma americanum</i> 'nin neden olduğu kene istilası	DRB3*4401	Direnç	Untalan ve ark., (2007)
Sığır Lösemi Virüsünün neden olduğu lenfosarkom ve kalıcı lenfositoz	BoLA DRB3.2 *11 alt tipi ISAG*0902	Direnç	Juliarena ve ark., (2008)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> 'nin neden olduğu sub-klinik mastitis	DRB3*2701-2707	Yüksek Duyarlılık	Hameed ve ark., (2008)
Subklinik mastitis	BoLA-DRB3.2*08	Yüksek Duyarlılık	Pashmi ve ark., (2009)
Mastitis	DRB3*0101, *1501	Duyarlılık	Yoshida ve ark., (2009a-b)
Mastitis	DRB3*1101, *1401, *1201	Direnç	
Kalıcı lenfositoz	DRB3*0902 ve DRB3*1701	Direnç	Juliarena ve ark., (2009)
Kalıcı lenfositoz	DRB3*1501 veya DRB3*1503	Duyarlılık	
Klinik mastitis	DRB3*1, DRB3*52	Risk artışı	Duangjinda ve ark., (2009)
Klinik mastitis	DRB3*15, DRB3*51, DRB3*22	Direnç	
Klinik mastitis	DRB3.2*16	Direnç	Firouzamandi ve ark., (2010)
40 mer (40 nükleotitlik) VP1 FMDV peptit bağışıklığına karşı düşük IgG1 ve IgG2	DRB3*1601, DRB3*1801		Baxter ve ark., (2009)
40 mer (40 nükleotitlik) VP1 FMDV peptit bağışıklığına karşı yüksek IgG1 ve IgG2	DRB3*1001		
<i>T. brucei</i> neden olduğu enfeksiyon (trypanosomiasis :rodezya uyku hastalığı)	DRB3*15	Risk artışı	Karimuribo ve ark., (2011)
<i>T. congolense</i> neden olduğu enfeksiyon (trypanosomiasis :rodezya uyku hastalığı)	DRB3*35, *16 ve *23	Risk artışı	

BoLA gen varyasyonları ve mastitis duyarlılık ilişkisi, birçok sığır hastalığıyla ilişkili çalışmaların odak noktası olmuştur. BoLA sınıf I haplotipleri ve sub-klinik mastitis arasında küçük bağlantılar bulunmuştur, ancak heterozygosity ve kopya numarası yardımıyla DQ allel sayısının artırılması mastitis direncini artırdığı öngörülmüştür (Aarestrup ve ark., 1995; Park ve ark., 2004). DQ genlerinin yalnızca bir çiftine sahip inekler mastitise daha duyarlı olduğu ve sırasıyla *Streptococci* ve *Escherichia*'nın neden olduğu mastitise karşı duyarlılığın, homozigot DQA1*0101 ve DQA1*10011 allellerinin artırdığı bulunmuştur (Park ve ark., 2004; Takeshima ve ark., 2008y). Polimorfik klasik BoLA sınıf II geni (DRB3), birçok mastitis hastalığı ile ilişkili çalışmalarda, aday gen olarak değerlendirilmiştir. Ağırlıklı olarak koliformların neden olduğu ciddi klinik mastitis ve DRB3*2701-2707 alleleri arasında önemli bir ilişki bulunmuştur ($P<0.05$) (Sharif ve ark., 1998). Aynı zamanda mastitis duyarlılığı için, DRB3 geninin antijen bağlama alanı içinde belirli bir pozisyonda bulunan amino asitler ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Sharif ve ark., 2000). *Staphylococcus aureus*'un neden olduğu sub-klinik mastitis ile DRB3*1501-1502 ve DRB3*2701-2707 alleleri arasında hiçbir bağlantı tanımlanmamıştır, fakat *Streptococcus dysgalactiae*'in neden olduğu sub-klinik mastitise duyarlılığın artırışı ve DRB3*2701-2707 arasında bir ilişki bulunmuştur (Hameed ve ark., 2008). Holstein sığırlarındaki DRB3*1501-1502 ile düşük somatik hücre sayısı ve mastitis direnci arasında önemli bir ilişki olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$) (Sharif ve ark., 1998). Fakat klinik mastitis direnci ile DRB3*1501-1502 arasındaki bağlantının aksini belirten raporlarda yayınlanmıştır (Kelm ve ark., 1997; Starkenburg ve ark., 1997). Bu çelişkiler daha geniş popülasyonlardaki örneklemeler yapılarak, neden olan mikroorganizmaların türleri dikkate alınarak ve tek bir lokustaki alleller yerine BoLA haplotiplerinin tamamı dikkate alınarak çözümlenebilir.

Dermatofilosis, *Dermatophilus congolensis*'in neden olduğu bir deri enfeksiyonudur, genellikle etkilenen sığırlar tropik çevrelerde yaşarlar, bu hastalık etkeniyle birlikte verim azalışı ve ortalama % 15 mortalite oranı gösterirler (Maillard ve ark., 2003). DRB3*0301-0302 / DRB3*3401-3402 ve DQB*1804 allelerini içeren BoLA sınıf II haplotipi ile Fransız Batı Hint Adalarındaki Martinik Adasında yaşayan Brahman sığır popülasyonunda ($n=568$) dermatofilosis'e duyarlılık ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir ($P<0.0001$) (Maillard ve ark., 2003). Sığır lösemi virüsü (Bovine Leukemia Virus), kan ve sütteki B lenfositlerini enfekte eden bir sığır onkogenik retrovirüsüdür (Udina ve ark., 2003). Tüm BLV enfeksiyonlarının yaklaşık % 30'u BLV-

enfekte B hücrelerinde çoğalır fazda zararsız ve sub-klinik olarak bulunurlar, kalıcı lenfositoz olarak bilinir (PL: persisten lymphocytosis, KL: kalıcı lenfositoz). BLV enfeksiyonlarının sadece % 10'u ölümcül klinik aşaması olan lenfosarkomun oluşturmaktadır, ama lenfosarkom frekansı, PL olan sığırlarda BLV taşıyan sığırlara göre yaklaşık 1/3 daha yüksektir (Juliarena ve ark., 2008). BLV için uygun bir aşı bulunmamaktadır, bu yüzden retrovirüs ile enfekte lenfositleri içeren vücut sıvılarının iletimi yoluyla hayvandan hayvana yayılmaya devam eder (Udina ve ark., 2003). Haplotiplerin tanımlanmasından sonra Holstein sığırlarındaki kalıcı lenfositoz (KL) duyarlılık ve direnç ile ilişkili sınıf II bölgesi tanımlanmıştır (Zanotti ve ark. 1996). DRB3*0902 ve DRB3*1701 allellerinin KL direnci ile ilişkisi bulunurken, DRB3*1501 veya DRB3*1503 allellerinin KL duyarlılıkla bağlantısı bulunmuştur (Juliarena ve ark., 2009). Sığırlardaki kene enfestasyonlarına duyarlılığın kalıtsal bir bileşene sahip olduğu düşünülmektedir, bunun en önemli sebebi doğaları gereği farklı sığır ırklarının diğerlerine göre daha dirençli olduğu bilinmektedir, fakat neden olan genetik unsurlar hala tam olarak bilinmemektedir (Untalan ve ark., 2007). Untalan ve ark. (2007), sığır sürüsündeki (Lone Star kenesine duyarlı fenotipli, *Amblyomma americanum*) kene direnciyle ilişkili üç BoLA mikrosatelitini ve DRB3 ekzon 2'yi analiz etmişlerdir. Bu çalışmanın bir sonucu olarak BoLA-DRB3 geninin ikinci ekzonun ile bağlantılı DRB3*4401 allelinin kenelere direnç sağlayan bir fenotipe sahip olduğunu belirlemişlerdir (Untalan ve ark., 2007).

BoLA bölgesi aynı zamanda, aşı yanıtının bireyler arasındaki varyasyonunun genetik temeli için aday bir bölgedir. BoLA sınıf I genleri, sığırlardaki respiratuvar sinsityal virüs, *Brucella abortus*, *Theileria annulata* ve *Theileria parva* gibi hücre içi patojenlere verilen immün cevap için önemlidir (Newman ve ark., 1996; McKeever ve ark., 1999; Gaddum ve ark., 2003). Hücre içi patojenler için en etkili aşılar epitoplara ihtiyaç duyar ki bunlar sınıf I molekülleri tarafından başarılı bir şekilde sunulabilir ve sitotoksit T-hücreleri tarafından tanınmalarını sağlar; fakat BoLA sınıf I genlerindeki aşırı değişkenlik epitop tasarımını zorlaştırmaktadır (Glass, 2004). Bu açıdan bakıldığında BoLA sınıf II genleri daha iyi bir alternatif olabilir. Sığırlardaki DRB3*0201 ve DRB3*3301 allelleri (her ikisinde DRB3 genindeki 2. ekzonda 65. üçlü kodondaki (lizin) bir delesyona sahiptirler), ticari kene aşısı (TickGARD) için daha yüksek bir yanıtı göstermişlerdir (Sitte ve ark., 2002). Sığırlarda *Theileria parva* için kullanılan bir aşı, DRB3*2703 alleleline sahip sığırlarda ($P = 0.027$) başarılı bir koruma sağlarken aynı aşı DRB3*1501 alleleline ($P = 0.013$) sahip sığırlarda *Theileria parva* karşı korumasız olmuştur

(Ballingall ve ark., 2004b). Şap virüsü (FMDV) için geliştirilen aşılarda etkinliğinin, DRB3 polimorfizmi ile ilişkili olduğu, FMDV peptidlerinin başarıyla DQA allel 22021 ve DQB allel 1301 tarafından sunulduğunun gösterilmesiyle belirlenmiştir (Garcia-Briones ve ark., 2000; Gerner ve ark., 2009). Glass ve ark. (2000), FMDV peptidlerinin DR ve DQ molekülleri ile sunulabilir olduğunu ve hayvanlardaki FMDV peptitlerinin sayısının DQA ve DQB gen duplikasyonlarının interhaplotip çiftleri ile artış gösterebileceğini göstermişlerdir.

Takeshima ve ark. (2008b), yaptıkları çalışmada klinik mastitli 120 Holstein sığırdan 85 örnek rasgele seçilerek dizi analizine göre (BoLA)-DRB3 ve BoLA-DQA1 genleri genotiplendirilmiştir. Mastitisli sığırlar mastitisin neden olduğu bakteri türlerine (*Staphylococcus aureus*, *Streptococci*, *Escherichia* ve *koagülaz negatif stafilkoklara*) göre dört gruba ayrılmıştır. Her bir grubun BoLA-DRB3 ve BoLA-DQA1 heterozigotluğu, kontrol sığırlarınıninki ile karşılaştırılmıştır. *Escherichia* kaynaklı ve *Streptococci* kaynaklı mastitis grupları arasında BoLA-DQA1 genleri açısından beklenen ve gözlemlenen heterozigotluklar arasında önemli farklar göstermiştir. BoLA-DRB3 genleri bakımından herhangi bir grup için herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir. BoLA-DQA1*0101 ve BoLA-DQA1*10012 allelleri *Streptococci* kaynaklı mastitise duyarlılığı arttırdığı bulunmuştur. Aynı zamanda homozigot BoLA-DQA1*0101/0101 ve BoLA-DQA1*10011/10011 allelleri sırasıyla *Streptococci* ve *Escherichia* kaynaklı mastitise duyarlılığı arttırdığı belirlenmiştir.

Schwab ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada; sığır, koyun ve keçilerde aborta (vaktinden önce doğan canlı veya cansız yavru) neden olan *Neospora caninum* için bilinen enfeksiyona (*Neosporosis*) sahip 56 sığır örneğinin genotipi belirlenmiştir. Bu popülasyonda 14 farklı DRB3 ve 10 farklı DQA1 alleli tespit edilmiştir. DRB3 veya DQA genlerinin allel frekansının dağılımı ile *N. caninum* enfeksiyonu arasında bir ilişki bulunamamıştır. Bununla birlikte, allel DRB3*1001 ve allel DRB3*2703'ün, enfeksiyon durumuna bakılmaksızın gebelik kaybına karşı direnç ve duyarlılıkla ilişkisi saptanmıştır.

Baxtera ve ark. (2009), BoLA-DRB3 allelleri ve bağlanma cepleri ile şap virüsü (FMDV) VP1'den türetilen 40-mer peptid'e immün cevabı araştırmışlardır. Charolais ve Holstein sığırlarından oluşan bir melez popülasyonda (n=197), FMDV peptidi ile immünize edilip, spesifik IgG1 ve IgG2 yanıtları ölçülmüştür. Bu popülasyonda on sekiz farklı DRB3 alleli tespit edilmiş ve bunların birçoğun antikor yanıtı ile çok önemli ilişkiler sergilediği vurgulanmıştır. DRB3*1601 alleli nispeten düşük IgG1 ve IgG2 yanıtlarıyla

korelasyon gösterirken, DRB3*1001 nispeten yüksek IgG1 ve IgG2 yanıtlarıyla ilişkilendirilmiştir (p <0.001). DR molekülünün peptid bağlayıcı yarığ içindeki birkaç konumdaki amino asitler ile antikor tepkisi seviyesi arasında anlamlı bir ilişki belirlenmiştir (p <0.001). Yapılan analizler, bağlanma ceplerindeki spesifik notların aşısı tasarımı için çok önemli olduğu gösterilmiştir. Özellikle, cep 4'teki 70. pozisyonunda bulunan polimorfizmlerden glutamik asit düşük FMDV peptid spesifik IgG1 ve IgG2 yanıtı ile ilişkili iken, aynı pozisyonundaki arginin yüksek FMDV peptid spesifik IgG1 ve IgG2 seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir (p <0.001). Veriler, DRB3 allellerinin bağlayıcı ceplerindeki amino asitlerin, bağışıklık yanıtı derecesini belirlemek için kritik olduğunu ve ek olarak IgG1/IgG2 oranını etkileyebileceğini ve bunun da koruyucu bağışıklığın başlatılması için peptidin etkinliğini etkileyeceğini göstermektedir.

Yoshida ve ark. (2009a), Japon Holstein ineklerinde, BoLA-DRB3 allellerinin amino asit motifleri ve mastitis'e neden olan, Streptokoklar, koagülaz-negatif *Staphylococci*, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* arasındaki ilişkiyi PZR-sekans baz tiplendirme metodu ile belirlemeye çalışmışlardır. Mastitis kaynaklı patojenlere duyarlılık veya direncin, 9., 11., 13. ve 30. pozisyonlarındaki amino asitlerin varlığına göre değiştiği belirtmişlerdir. DRB3*0101 ve DRB3*1501 allelleri Glu⁹, Ser¹¹, Ser¹³ ve Tyr³⁰ amino asidi motiflerine sahiptirler ve 4 mastitis patojeni içinde duyarlı olduğu bulunmuştur. Bunun tam tersi olarak, DRB3*1101 ve DRB3*1401 allellerindeki Gln⁹, His¹¹, Gly¹³, His³⁰ ve Val⁸⁶ amino asidi motiflerinin, streptokokal ve koagülaz-negatif stafilokokal mastitise karşı dirençli olduğu kabul edilmiştir. Ayrıca *Escherichia coli*'nin neden olduğu mastitisi karşı, 9, 11, 13 ve 30 konumlarındaki amino asit konumlarının çok düşük bir etkisinin bulunduğu, daha ziyade 7. bağlanma cebindeki 47, 67 ve 4. cepteki 71, 74 pozisyonlarındaki, Tyr⁴⁷, Ile⁶⁷, Ala⁷¹ ve Ala⁷⁴ amino asitleri dirençle ilişkilendirilmiştir. Bu motif DRB3*1201'de bulunmuştur.

Yoshida ve ark. (2009b), Japonya'daki 5 bölgeden alınan 194 Holstein inek örneğinde (2 veya 3 tür patojenin enfeksiyon bulaşmış 24 karışık enfeksiyonlu, 41 sağlıklı ve 153 mastitis ineği) çalışmışlardır. 16 BoLA-DRB3 alleli tespit edilmiştir. Belirlenen allellerden DRB3*0101, *1501, *1201 ve *1101'in tüm allerin % 56.8'ini oluşturmaktadır. Bu dört allelin dört farklı mastitis patojenine karşı direnç ve duyarlılık ile ilişkilendirilmiştir. DRB3*0101 allelinin, koagülaz-negatif *Staphylococci* ve *Escherichia coli*'ye duyarlıyken, DRB3*1501 alleli *Escherichia coli* duyarlılıkla ilişkilendirilmiştir. DRB3*1101 alleli, *Streptococci* ve koagülaz-negatif *Staphylococci*'nin neden olduğu

mastitisi karşı dirençli olurken, DRB3*1201 allelinin ise *Streptococci*, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* karşı dirençli olarak belirlenmiştir.

Lei ve ark. (2012), şap virüsüne (foot-and-mouth disease virüs-FMDV) maruz kalmış Wanbei sığırlarında BoLA-DRB3 geni polimorfizmi ve FMDV'ye karşı direnç/duyarlılık ilişkisini araştırmışlardır. Asemptomatik ve FMD'li 100 hayvanda yapılan incelemede BoLA-DRB3 genlerinin 2. Ekson amplifiye edilerek RFLP tekniğinde Hae III enzimi kullanılarak genotip frekansları hesaplanarak analiz edilmiştir. Bunun sonucu olarak 6 RFLP deseni belirlenmiştir. FMD'li sığırlardaki enfeksiyonlu ve sağlıklılar arasındaki genotipik frekansları ve alleleri analiz edilerek, Wanbei sığırlarındaki FMD'ye Hae III A allelinin duyarlılığa ($P < 0.05$), Hae III C'nin dirence ($P < 0.01$) ve FMD'ye karşı güçlü bir koruyucu etkiye sahip olduğunu söylemişlerdir. Hae III CC ve Hae III BC genotipi FMD'ye direnç ile ilişkiliyken, Hae III AA genotipi FMD'e duyarlılıkla ilişkilendirilmiştir ($P < 0.01$).

Rastislav ve Mangesh (2012), *Mycobacterium avium* subsp. neden olduğu paratüberküloz ile enfekte ve sağlıklı sığırlardaki DRB3 geninin antijen tanıma bölgesindeki tek nükleotid polimorfizm ve mutasyonlar ile enfeksiyona karşı değişen duyarlılık arasında bir korelasyon olup olmadığını araştırmışlardır. 200 hayvandan oluşan bir popülasyonun % 19.6'sı paratüberküloz ile enfekte olmuş örneklerden oluşmuştur. Bu popülasyonda 19 genotip belirlenmiştir. Dört mutasyonun “Val53Glu (OR 453.7), Val53Leu (OR 453.7), Asp57His (OR 1.944) ve Arg84Gly (OR 1.458)” enfeksiyon duyarlılığını artırırken, Asp57Asn (OR 0) ve Phe60Tyr (OR 0.453) mutasyonlarının direnci arttırdığı bulunmuştur.

Yoshida ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada, 26 sütçül sığır sürüsündeki 714 baş Japon Holstein ineği uzun süreli somatik hücre sayımı (SCC) temel alınarak sağlıklı veya mastitik olarak yeniden sınıflandırılmıştır. Birinci veya ikinci laktasyondan beşinci laktasyona kadara üçten fazla laktasyon kayıtlarına sahip olan inekler seçilerek BoLA-DRB3 alleleri PCR-RFLP ile daha önceden tanımlanmış inekler seçilmiştir. Tüm aylık kayıtlarında ml'deki SCC sayısı $< 200\ 000$ 'den az olan sığır örnekleri ($n=91$) sağlıklı kabul edilirken, ardışık iki test sonucu $> 300\ 000$ hücre/mL olan veya ardışık olmayan dört test sonucu $> 500\ 000$ hücre/mL olan örnekler mastitisli olarak kabul edilmiştir ($n = 201$). Sağlıklı inekler ve çeşitli derecelerde mastitisli inekler arasındaki DRB3 allelik frekanslarındaki farklılıklar ve mastitis patojenlerine karşı dirençli veya duyarlı olan DRB3 allellerindeki çeşitli amino asit motiflerinin ilişkileri yeniden incelenmiştir. DRB3.2*22

(DRB3*1101), DRB3.2*23 (DRB3*2703) ve DRB3.2*24 (DRB3*0101) allelleri, direnç ile ilişkili bulunmuşken, DRB3.2*8 (DRB3*1201) ve DRB3.2*16 (DRB3*1501) allellerin duyarlılıkla ilişkili olduğu bulunmuştur.

Lützelshwab ve ark. (2016), yaptıkları çalışmada sığır lösemi virüsü (BLV) deneysel enfeksiyonunun konakçı immünolojik parametreleri ve *Mycobacterium bovis* enfeksiyonunun bazı virolojik etkilerini belirlemeyi amaçlamaktadır. Direnç ilişkili markör alleli BoLA-DRB3*0902'i taşıyan 26 Arjantinli Holstein buzağı, duyarlılıkla ilişkili marker alleli BoLA-DRB3*1501 veya nötr BoLA-DRB3 alleleri *M. bovis*'e maruz bırakılanlar kullanılmıştır. Yirmi buzağıya BLV ile inoküle edilmiştir, üçü doğal olarak enfekte olan ve diğer üçü BLV-negatif olarak kullanılmıştır. BoLA-DRB3*0902'i alleninin sığır lösemi virüsüne verilen immün cevabı değiştirmedeği bulunmuştur.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışması boyunca temel kimyasalları farklı firma belirtilmedikçe, Merck (Almanya) ve Sigma (Almanya) grubundan; moleküler biyoloji sarf malzemeleri ve kitleri Fermentas (USA), Promega (UK), Thermo Fisher Scientific (USA) ve Favorgen'den (Tayvan) temin edilmiştir.

3.2. Kullanılan Cihazlar ve Aletler

Su banyosu (J.P. selecta), soğutmalı santrifuj (J.P. selecta), PZR cihazı (Favorgen-Peltier-based Thermal Cyclers, Model FAPCR 96G ve Eppendorf- Mastercycler EpS Thermal Cyclers), hassas terazi (Vibra), vortex (Velp), otomatik pipetler (Eppendorf veya Biohit), inkubator (nüve), spektrofotometri (J.P. selecta), NanoDrop (thermofisher), DNA dizileme (3130xl Genetic Analyzers, Applied Biosystems), elektroforez tankı (Thermo Scientific- Owl™ A6 Wide Gel Horizontal Electrophoresis System), U. V. cihazı (UVP), jel görüntüleme (Olympus), kullanılmıştır.

3.3. Örneklerin Toplanması

Tez çalışması kapsamında, Yerli Kara (YK) sığır ırkımızdan Amasya-Merzifon (İnalanı, Derealan ve Aşağıbüyük köyleri) ve Kars-Sarıkamış (Karaköse köyü) bölgelerinden 67 kan (29, ♂ - 38, ♀) örneği temin edilmiştir. Örnekler belirlenirken hayvanların saf ırkın belinin özelliklerini (ırka özgü fenotipik özellikler) göstermesine dikkat edilmiştir. Küpe numaraları T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı- Veteriner Bilgi sisteminden kontrol edilmiştir. Çalışmada kullanılan ırklara ait örneklerde cinsiyet faktörü dikkate alınmıştır.

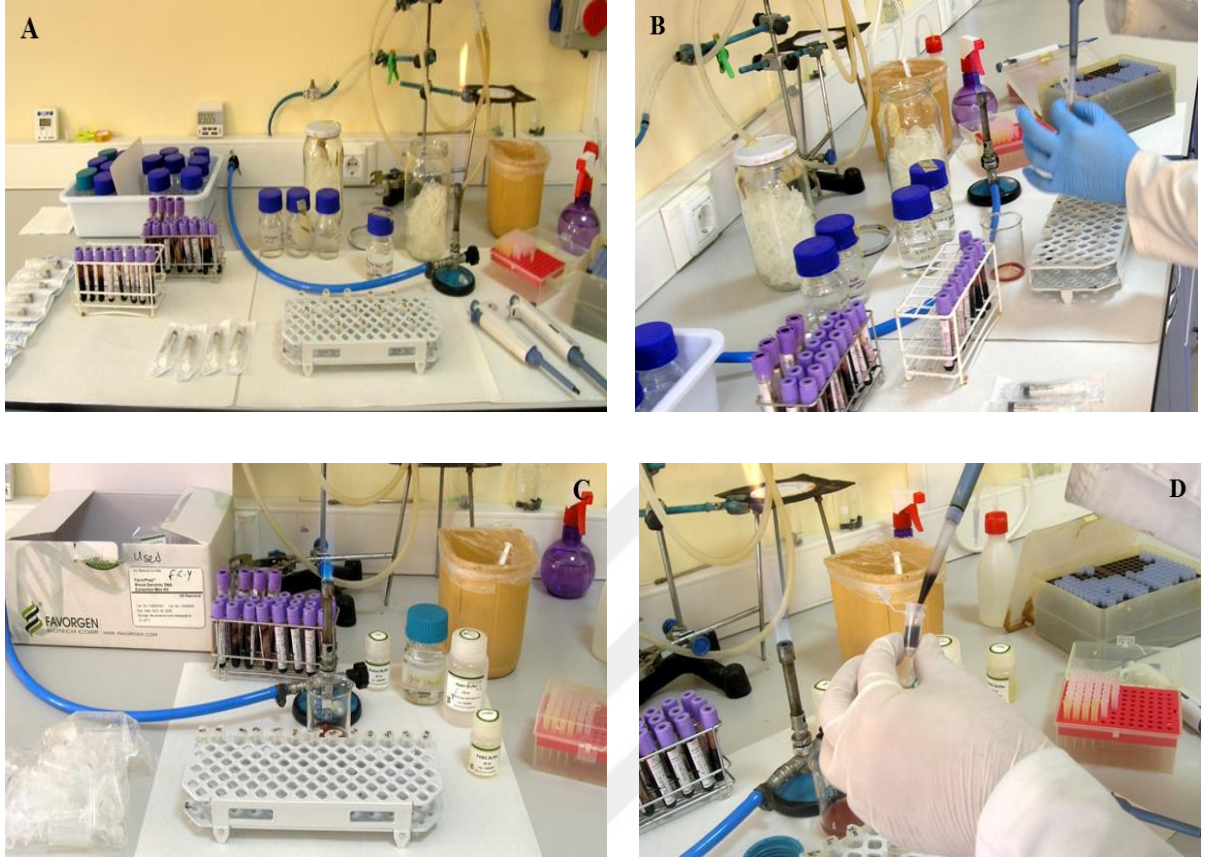
3.4. Kan Örneklerinin Alımı

Yerli Kara sığır ırkından 67 kan (29, ♂ - 38, ♀) örneği EDTA'lı tüp içerisinde toplanmıştır. Kan alma işleminde sterilizasyona azami derecede dikkat edilmiştir. Hayvanların boynunun sol tarafında bulunan “Venae Jugularis Externa” toplar damarından kan alınmış ve kan alınan tüpler alt-üst ettirilerek kanın EDTA ile iyice karışması sağlanmıştır. Her bir tüp laboratuvara gelene kadar soğuk zincirde takip edilerek muhafaza edilmiştir. Tüplerin birbiri ile karıştırılmaması için hayvanın küpe numarası tüp üzerindeki etikete kaydedilmiş ve etiketlenerek (örn; YKÖ-1: Yerli Kara Örnek 1 şeklinde) kodlanmıştır (Ek çizelge C.1).

3.5. DNA İzolasyonu

Laboratuvara getirilen örneklerden DNA izolasyonu gerçekleştirilene kadar sıvı azot ile ön muamele şeklinde dondurulmuş ve daha sonra -80 °C de saklanmıştır. Kandan DNA izolasyonu FavorPrep Blood Genomic DNA Extraction Mini Kit; (Kat. No: FABGK 001, Favorgen, Tayvan) kullanılarak, üretici firmanın protokolüne uyularak yapılmıştır. Her örnek için A ve B serisi olmak üzere 2 tüp DNA izolasyonu yapılmıştır. Sonuç alınamaması veya saflık ve konsantrasyonunun yetersiz kalması durumunda DNA izolasyonu fenol/kloroform yöntemi ile aşağıda belirtildiği şekilde kısmi modifikasyon yapılarak gerçekleştirilmiştir (Green ve Sambrook, 2012) (Şekil 3.1). Ependorf tüplerine (2 ml'lik) 500 µl kan örneği eklenmiş, daha sonrasında kan örneklerin üzerine 10 µl 0,5 M EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) (pH'ı 8.0'a ayarlamak için NaOH çözeltisi kullanılmıştır) ve lysis buffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃ ve 0.5 mM EDTA) çözeltisi ile 2 ml'e tamamlanmıştır. Örnek tüpleri nazikçe ters düz edilmiş ve 30 dakika buzda bekletilmiştir. Buzdan alınan tüpler 5000 g'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj (soğutmalı santrifüj-J.P. Selecta) edilmiştir. Santrifüj sonrası tüpte süpernatant fazı uzaklaştırılmış ve pellet üzerine 300 µl SE-Buffer (75 mM NaCl, 25 mM EDTA) (1 M NaOH ile pH 8.0'a ayarlanır) eklenerek vorteks (Velp) ile iyice karıştırılmıştır. Daha sonrasında ependorf tüplerine 50 µl %10'luk SDS (Sodyum dodesil sülfat-Sigma) (w:v) ve 25 µl Proteinaz K (10 mg/ml) eklenerek çalkalamalı inkübatörde (Nüve; NF800) 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında tüplerin üzerine 1 ml fenol (pH 8.0) eklenmiştir. Tüpler 10 dakika ters düz edilerek nazikçe karıştırılmıştır ve 5000 g'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve sonrasında süpernatant kısmı yeni bir ependorfa alınmıştır. Eşit hacimde fenol/kloroform/isoamil alkol karışımı (25:24:1) eklenmiş 10 dakika ters düz edilerek 5000 g'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonrasında süpernatant kısmı yeni bir ependorfa alınmış ve üzerine 1 ml kloroform/isoamilalkol (24:1) eklenmiş 1-2 dakika ters düz edilerek 5000 g'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan üst faz yeni tüpe alınmış, üzerine 300 µl 3 M sodyum asetat (pH 5.2) ve 1 ml isopropanol eklenmiş, 5000 g'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj ile yoğunlaşan DNA'nın çökmesi sağlanmıştır. Örnekler 1 ml %70 etanol ile 65 °C'de 30 dakika bekletilerek yıkanmış ve tuzların uzaklaşması sağlanmıştır. DNA pelleti 5000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Etanolün tamamen uzaklaştırılması için tüplerin kapakları açık bir şekilde +70 °C'de 10 dakika bekletilmiş ve elde edilen DNA pelletleri 100 µl TE tamponu (1 mM TrisHCl, pH 8.0; 0.1

mM EDTA) veya dH₂O içerisinde çözülmüş ve kullanılıncaya kadar -20 °C’de saklanmıştır.



Şekil 3.1. Kandan DNA izolasyonu; manuel DNA izolasyonu (A-B), ticari kit DNA izolasyonu (C-D).

Her iki yöntem ile elde edilen DNA örneklerinin varlığı (kalitatif), saflık ve konsantrasyonu (kantitatif) belirlenmiştir. İzolasyonunu gerçekleştirilen DNA’nın varlığını belirlemek için agaroz jel elektroforez sistemi kullanılmıştır. DNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonunun belirlenmesi için spektrofotometre (Thermo-NanoDrop 2000) kullanılarak ölçüm yapılmıştır. 260 nm DNA’nın, 280 proteinin ve 230 ise fenolün maksimum absorbands verdiği dalga boylarıdır. DNA’nın saflığı değerlendirilirken A260/A280 ve A260/A230 oranlarına bakılmış ve 1.8-2.0 arasındaki değerlerde DNA örnekleri saf olarak kabul edilmiştir. İzolasyonu istenilen saflıktaki DNA örnekleri PZR uygulaması için – 20 °C de saklanmıştır. DNA örnekleri YKD-1 (Yerli Kara DNA-1) şeklinde etiketlenmiştir (Ek şekil C.2).

3.6. Ekzon Bölgelerin Dizi Analizi

3.6.1. Primerlerin tasarlanması

NCBI'deki referans *Bos taurus* genomunun (BTA23; AC_000180.1) nükleotid dizisi Clone Manager 9 programına indirilerek MHC sınıf II bölgesindeki hedef gen bölgeleri belirlenmiştir. Bu bölgelere özgü PZR amplifikasyonu ve DNA dizilimi için kullanılacak spesifik primerler aşağıdaki kriterlere göre tasarlanmıştır. Primerlerin GC içeriği (primerdeki G ve C sayısının, toplam bazlara göre yüzdesi) %40-60 olmasına, uzunluklarının 18-22 bp arasında kalmasına ve erime sıcaklığının (Tm) 55-60 °C'yi geçmemesine dikkate edilmiştir. Ayrıca her bir PZR reaksiyonunun ileri ve geri primerleri yaklaşık olarak aynı Tm'ye sahip olacak şekilde tasarlanmıştır. OligoAnalyzer version 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>), Clone Manager 9 veya $(Tm) ^\circ C = 2 (A+T) + 4(G+C)$ eşitliği kullanılarak yapışma sıcaklıkları ve GC oranları hesaplanmıştır (Çizelge 3.1). Tasarlanan primerler Iontek (İstanbul) firmasından temin edilmiştir ve üretici firmanın belirttiği konsantrasyona göre steril ddH₂O ile dilüsyona tabi tutulmuştur.

Çizelge 3.1. BOLA-Sınıf II lokusu gen bölgelerine özgü tasarlanmış primer dizileri

Gen Adı	Gen Bölgesi	Primer Listesi	Nükleotid Dizi Uzunluğu (ekzon bç)	Tm	GC %	BTA23 (AC_000180.1)
BoLA-DMA	Ekzon 2-3-4	F: GGTCCCATCTGAGCTTCCTT R: TGAGAACCTGAACACCTCCT	1081 bç (279-126-5 bç)	59.08 57.90	55.00 50.00	7206015 7207096
BoLA-DMB	Ekzon 2	F: CCTACAGGTGGTTTTGTGGC R: CCCTCTCTCCTTACGTGTCC	302 bç (282 bç)	59.04 58.90	55.00 60.00	7191976 7191674
BoLA-DQA1	Ekzon 2	F: TTTTCCACCTTCCTGCTCCT R: AGAGAAGTAGAATGGTGACACT	310 bç (249 bç)	58.85 58.58	50.00 43.48	25490280 25489970
BoLA-DQA2	Ekzon 3	F: TCTGTGCTGTTTCCTCACCA R: GACTGTGAGACTGAGGGACC	389 bç (279 bç)	59.16 59.11	50.00 60.00	25352005 25351616
BoLA-DQA5	Ekzon 2	F: ACTCCTCACCTGAATCAGC R: AAGGAAGAAGGGAGTGAGGC	338 bç (249 bç)	59.09 59.01	55.00 55.00	25408111 25407773
BoLA-DQB	Ekzon 2	F: TGCCCTGTGAAGCTATGGAG R: CTCGGAATCTGGGGTGGAG	374 bç (270 bç)	59.46 59.17	55.00 63.16	25377100 25377474
BoLA-DRA	Ekzon 2	F: CTTCTCTCCTGGTTCCAC R: TGGAGCAGAGGTACCATTGG	305 bç (246 bç)	59.38 59.09	60.00 55.00	25590093 25589788
BoLA-DRB2	Ekzon 2	F: TCAGTCATTTCCAGGAGCCC R: CACACACACATTCCTGCACA	394 bç (270 bç)	59.38 58.98	55.00 50.00	25552796 25553190
BoLA-DRB3	Ekzon 2	F: CTCTGCAGCACATTTCTGG R: GACCCAGAGTGAGTGAAGGAT	414 bç (270 bç)	59.19 58.82	55.00 52.38	25472153 25472595
BoLA-DYA	Ekzon 1	F: TGGAGGAGGAGGAGGATGAA R: ACCATCTGAGCCACCATACT	179 bç (76 bç)	58.98 58.11	55.00 50.00	7011955 7012134
		F: GTATCCTGCGTCCCTGTTCT R: GAGAGGCCACACTTACCACT		59.18 59.02	55.00 55.00	7013851 7014167
	Ekzon 3-4	F: CAGAAGGCACAGTTGTGAGA R: ACCTTCCCCTCTTTACAGGCC	1159 bç (282-155 bç)	57.75 59.67	50.00 55.00	7015570 7016729
BoLA-DYB	Ekzon 3	F: TGTCTCGTTTTCTCTAGTGG R: GCCCTTACGCCATTCTACTG	307 bç (282 bç)	58.83 58.42	52.38 55.00	7038878 7038571
LMP2	Ekzon 2	F: GCTCTTCTGCTCTGACGTTT R: CATTAGGCGCCATGGACTTC	158 bç (68 bç)	58.65 59.05	55.00 55.00	7129004 7129162
LMP7	Ekzon 3-4-5	F: AACTCTCTCCCTGGACTGTC R: GGTCCCTGAGTCAGCCAG	1102 bç (130-205-89 bç)	58.07 59.01	55.00 66.67	7114579 7113477
Ort.*				58,90	53,77	

*: Ortalama, Tm: Erime sıcaklığı (°C), bp: baz çifti, GC: Guanin ve Sitozin oranı.

3.6.2. Primerlerin optimizasyonu ve ekzon bölgelerinin konvansiyonel PZR ile çoğaltılması

Primerlerin yapışma sıcaklığının tam olarak belirlenmesi için her primer çifti için gradient PZR işlemi yapılmıştır (Çizelge 3.2). Bu işlemler tüm primerler için uygulanmıştır. Primerlerin yapışma sıcaklıkları PZR reaksiyonunun spesifikliğini optimize etmek için en kritik bileşendir. Bu bileşenin belirlenmesinde gradient PZR, en az sayıda basamak kullanılarak optimum yapışma sıcaklığının deneysel olarak belirlenmesine olanak tanıyan kullanışlı ve basit bir tekniktir. Çizelge 3.1’de gösterilen primer sıcaklıkları baz alınarak PZR cihazlarında kullanılacak en yüksek gradient PZR sıcaklığı belirlenmiş diğer sıcaklıklar buna göre hesaplanarak kullanılmıştır. Ayrıca gerek Favorgen gerekse Eppendorf PZR cihazlarında gradient programının sıcaklığı hesaplanırken 12’lik blokların ortasındaki nokta primerlerin Tm değerleri dikkate alınarak 5 derece altında olacak şekilde cihazlara girildiğinde, kullanılan cihazlar optimum sıcaklık aralıklarını hesaplamakta ve bunu da doğrusal bir eğri şeklinde yapmaktadırlar. PZR işlemi toplam 40 µl hacimde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2. Primerlerin optimizasyonu için kullanılan gradient PZR şartları.

Sıcaklık (°C)													Zaman	Döngü
İlk Denatürasyon	95												5 dak.	1
Denatürasyon	94												40 sn.	35
Yapışma (Gradient)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	40 sn.	
	40	40.5	42	44	46.4	48.8	51.2	53.6	56	58	59.5	60		
Uzama	72												50 sn.	
Son Uzama	72												4 dak.	1
Son Sıcaklık	4												∞	1

PZR işleminde iki farklı taq DNA polimeraz (Thermoscientific-Taq DNA Polymerase ve Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase) enzimi kullanılmıştır. Her iki enziminde ortak özelliği 5’→3’ eksonükleaz aktivitesine sahip oluşları ve deoksiniükleotidil transferaz aktivitesi göstererek, PZR ürünlerinin 3’ ucuna fazladan bir adenin ilavesi etmeleridir. Her iki enzim için farklı bufferlar kullanılmıştır, birinci enzim için 10X [750 mM Tris-HCl (25°C’de pH 8.8), 25 mM MgCl₂, 200 mM (NH₄)₂SO₄, %0.1

(v/v) Tween 20] kullanılırken, Maxima Hot Start için 10X [200 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 200 mM KCl, 50 mM (NH₄)₂SO₄] bufferı kullanılmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu için; 4 µl buffer (10X), 1 µl dNTP (1 mM), ileri ve geri primerlerden 1'er µl (20 pmol), 0.5 µl DNA polimeraz (5 u/µl), 1 µl kalıp DNA (~400 ng/ml) ve 40 µl'ye tamamlamak üzere 31.5 µl dH₂O ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.6.3. DNA'nın jel elektroforez ile görüntülenmesi

DNA ve PZR sonuçları ürün büyüklüklerine göre farklı konsantrasyonlarda agaroz jel hazırlanmıştır. Bunun için; 500 bp-10 kb için %1, 200 bp-3 kb için %1.5 ve 50 bp-2 kb için ise %2 oranında agaroz, 1X TBE (90 mM Trizma Base+ ; 90 mM Borik Asit+ 2 mM EDTA; pH 8.0) tampon çözeltisinde çözündürülmüştür. Eritilen agaroz, jel tankına (Thermo Scientific- Owl™ A6 Wide Gel Horizontal Electrophoresis System) döküldükten sonra polimerize olması için beklenmiştir. Analiz edilecek örnekler uygun miktarlarda ki bu genellikle 5-10 µl olacak şekilde alınarak 1-2 µl yükleme solüsyonu [10 ml DNA loading buffer için; 0.025 mg (v/v) bromophenol blue, %40 sükröz ve 2.5 ml EDTA (100 mM) (pH 8.0)] ile karıştırılarak yükleme hazırlanmıştır. Hazırlanan PZR ve DNA örnekleri büyüklüklerini belirlemek için 50 (Favorgen), 100 veya 1000 baz çiftlik DNA markörler (Thermo) (Ek şekil C.1) ile birlikte jele yüklenmiş ve jel büyüklüklerine göre 60-100 Volt altında koşturulmuştur (Thermo Electron Corporation -Instruction Manual EC250-90 Electrophoresis Power Supply). Koşturulan agaroz jel Et-Br (0.5 µg/ml) ile konsantrasyonlarına göre farklı dakikalarda (10, 15 ve 20) boyanmıştır (post-staining). DNA örnekleri UV ışığı altında (590 nm'de portakal kırmızısı renginde) görüntülenmiş ve fotoğrafları alınmıştır (Olympus, C5060). Daha sonrasındaki çalışmalarda kullanılmak üzere PZR ürünleri -20 °C'de saklanmıştır.

3.6.4. PZR ürünlerinin saflaştırılması

Primer ve dNTP kalıntıları Favorgen Gel/PZR Purification Kiti ile üretici firmanın protokolüne uygun olarak temizlenmiş ve 3.4.3'de anlatıldığı gibi tekrar agaroz jele yüklenerek kontrol edilmiştir.

3.6.5. Nükleotid dizilerinin elde edilmesi

Gen bölgelerinin agaroz jelde teyit edilmesiyle, PZR ürünleri iki yönlü olarak merkez laboratuvarındaki 3130xl DNA dizileme cihazı ile dizilenmiştir (ÜSKİM). Bu işlem, ExoSap (Thermo Fisher Scientific), döngü PZR, sefadeks ve dizi bilgilerinin elde edilmesi basamaklarından oluşmaktadır.

3.6.5.1. ExoSap basamağı

Nükleotit dizilerinin analizi için, çalışılacak örneklerin PZR reaksiyonundaki fazla primer ve birleşmemiş nükleotidleri ortadan kaldırmak için uygulanan enzimatik temizleme yöntemidir. Bu işlem için örnekler ExoSap ile muamele edilmiştir. DNA ürünlerinden 5 µl alınarak üzerine 3 µl ExoSap (Thermo Fisher Scientific) ilave edilerek steril ependorflarda karıştırılmış, 37 °C de 30 dak bekletilmiş ve 80 °C de 15 dak inaktive edilmiştir.

3.6.5.2. Döngü PZR basamağı

ExoSap yardımıyla temizlenen PZR ürünleri BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem) kullanılarak, PZR (Cycle Sequence) yapılmıştır (2 µl DNA, 1 µl primer (3,2 pmol/ ml), 1 µl BigDye Terminator V1.1, V3.1 5xSequencing Buffer, 2 µl BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing RR-100, 4 µl ultra saf su). Daha sonra karışım PZR cihazına yerleştirilmiş ve cihaz 96 °C’de 1 dakika da 1 döngü, 96 °C’de 10 saniye, 50 °C’de 5 saniye, 60 °C’de 4 dakika da 30 döngü ve 4 °C’de bekletilecek şekilde ayarlanmıştır. Bu işlem PZR ürünlerinin farklı boyalar ile işaretlenmiş olan dideksinükleotidler (ddNTP; A: yeşil, T: kırmızı, G: siyah ve C: mavi) ile sonlanmasını sağlar.

3.6.5.3. Sefadeks basamağı

Döngü PZR işlemi görmüş örneklerde (10 µl) bulunabilecek dNTP, ddNTP kalıntılarının uzaklaştırılması ve saflaştırmak için Sefadex G-50 (Sigma-Aldrich) kolonlar kullanılmıştır. Bu amaçla, 1 gr Sephadex G-50 ile 15 ml ultra saf su da 5 dakika çözölmüş ve boş spin kolonlara 650 µl eklenmiştir. Yarım saat beklendikten sonra 1200 g’de 2 dakika santrifüj edilmiş ve kolondan geçen su uzaklaştırıldıktan sonra, döngü PZR ürünleri (10 µl) sephadeks kolonlara eklenmiş ve 2000 g’de 2 dakika santrifüj edilerek kullanılmıştır.

3.6.5.4. Örneklerin cihaza yüklenmesi

Kolondan geçen PZR ürünlerinden 10 µl, 96’lık mikropalakların dip kısmına dikkatlice aktarılmıştır. Mikropalaklarda aynı zamanda olmayan örnekler Hi-Di TM formamide (Applied Biosystems) ile tamamlanmıştır. Daha sonra mikropalaklar dizileme cihazına (3130x Genetic Analyzer, Applied Biosystems) yerleştirilerek, 3130 pop-7 TM Performance optimized Polymeri kullanılarak DNA dizilimleri gerçekleştirilmiştir.

3.7. Ekzon Bölgelerinin Klonlanması ve Transformant Plazmitlerin Oluşturulması

Nükleotid dizilimi sonrasında örnekler arasında farklı dizilere sahip ekzon bölgeleri DNA kütüphanesini oluşturmak ve dizideki farklılıkları doğrulamak için pGEM-T Easy vektöre aktarılmıştır. *E. coli* DH5 α LB (Luria-Bertani) Broth besi ortamında çalkalamalı olarak veya LB-Agar'da 37 °C'de geliştirilmiştir (Sambrook ve ark., 2001) (Çizelge 3.3).

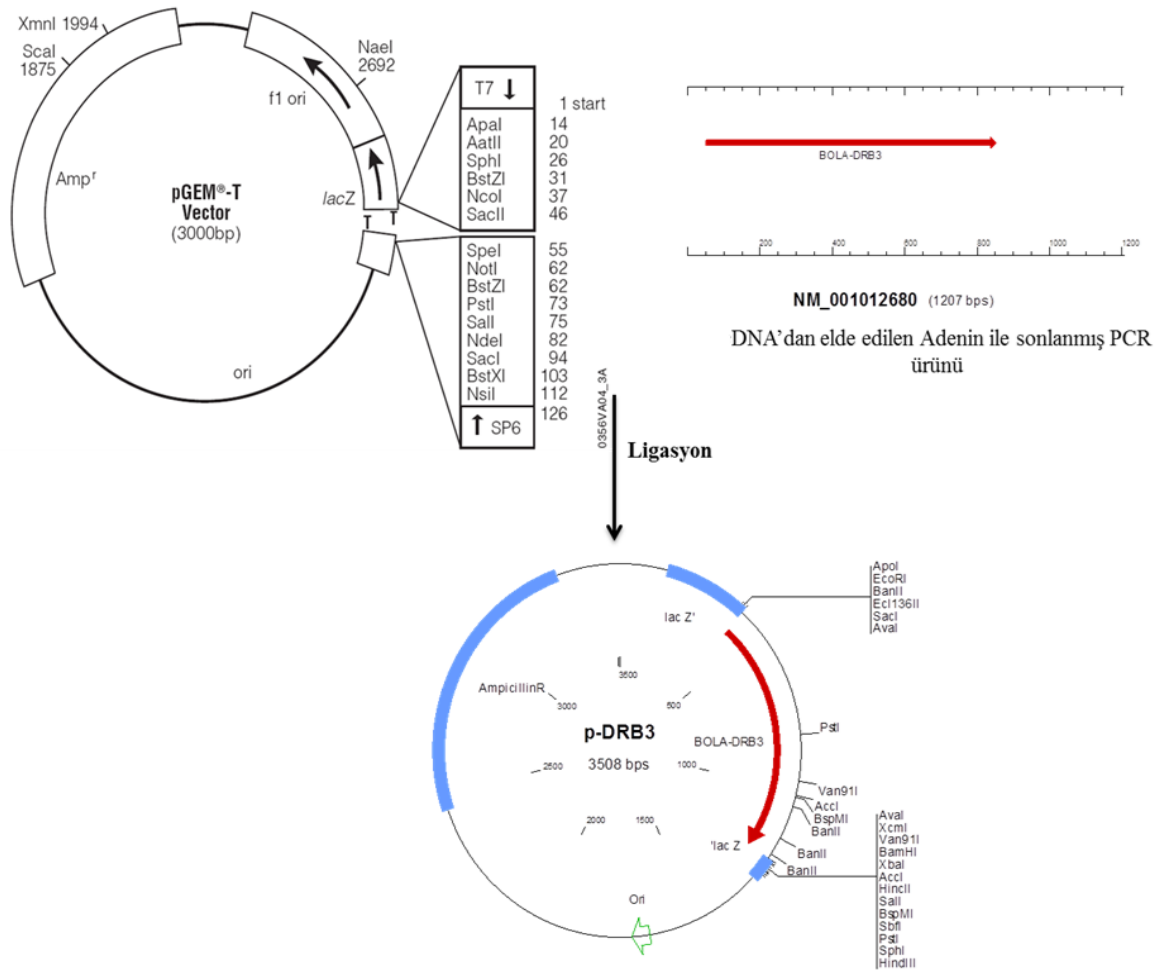
Çizelge 3.3. Tezde kullanılan mikroorganizma ve vektörlerin genel özellikleri

Bakteri türü	Genetik içerik	Besiyeri	Sıcaklık (°C)	Referans
<i>E. coli</i> DH5 α	Plazmit içermeyen referans suş	LB	37	Laboratuvar stok
pGEM-T Easy	LacZ, Amp ^R	-	-	Promega

3.7.1. pGEM-T easy klonlama vektörüne ligasyon

Klonlama işlemleri Promega'dan temin edilen “pGEM-T Easy vektör kiti” ve aynı firmanın “Thermostable DNA Polimerase” enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu enzimin en önemli özelliği PZR ürününün 3'-5' uçlarına adenin (A) eklemesidir. PZR ürünlerinin kolaylıkla klonlanması için kullanılan pGEM-T Easy vektörünün en önemli özellikleri her iki ucundaki 3'-terminal bölgesinin birer timin nükleotidi ile lineerleştirilmiş olmasıdır. Bu özelliği vektörün tekrar sirküle olmasını önleyerek belirli taq DNA polimerazlar tarafından üretilen (adenin ile sonlanmış) PZR ürünlerinin bağlanmasını büyük ölçüde kolaylaştırmaktadır. Ayrıca pGEM-T Easy vektör açık uçlu, lacZ, amp^r (ampisilin direnç geni) ve α -peptid içeren ticari bir vektördür.

Yapılan PZR işlemi ile çoğaltılan DNA bölgesi bir gecelik ligasyon işlemi ile pGEM-T Easy vektör ile birleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı 4 μ l PZR ürünü, 1 μ l pGEM-T vektör ve 5 μ l ligasyon karışımından oluşmaktadır. Etkin bir ligasyon reaksiyonu için plazmid vektörünün miktarı insertin dörtte biri olmalıdır. Karışım 4 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmış ve ligasyonun durdurulması için karışım 50 °C'de 10 dak bekletilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. PZR ürünlerinin pGEM-T Easy dizileme vektörüne klonlanması strateji

3.7.2. CaCl₂ yöntemi ile *Escherichia coli*'ye plazmit transferi

Plazmit örnekleri *E. coli* DH5α suşuna standart CaCl₂ metodu ile aktarılmıştır (Sambrook ve ark., 2001). 37°C'de 1 gece LB besi yerinde büyütülmüş *E.coli* DH5α suşu 1 ml alınarak 100 ml'lik LB besi yerinde çalkalamalı inkübatörde 1,5-2 saat inkübe edilmiştir. Hücreler OD₆₀₀=0,3-0,4 değerine ulaştığında toplanmak üzere 10 dakika buz üzerinde bekletilerek büyümeleri durdurulmuştur. Bunun için öncelikle hücreler 1250 g'de +4°C'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülerek elde edilen pelet kısmına 10 ml buzda bekletilmiş CaCl₂ (100 mM) ekleyip pelet çözündürülmüş ve 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. CaCl₂'de çözdürdüğümüz pelet 1250 g'de +4°C'de 10 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatant yine dökülerek, pelet bu kez 1 ml buzda bekletilmiş CaCl₂'de (100 mM) çözündürülerek 10 dakika daha buzda bekletilmiştir. Kompetent hale getirilmiş *E.coli* DH5α hücresi 200 µl'lik tüplere bölünmüştür.

Kompetent *E.coli* DH5 α hücrelerine ligasyon ürünleri eklenip 30 dakika buzda bekletildikten sonra sıcak şokla 42°C'de 2.5 dakika bekletilmiştir. Ligasyonlu hücreler sıcak şokun ardından 10 dakika daha buzda bekletilmiştir. Hücrelere 800 μ l'lik LB besi yeri eklenerek 37°C'de çalkalamalı inkübatörde 1-1.5 saat büyütüldükten sonra, büyüyen hücreler santrifüj edilerek süpernatant kısım peletten uzaklaştırılmıştır. Peletlerin üzerine 200 μ l LB besi yeri eklenerek peletler çözündürülmüştür. Hücreler seçici antibiyotik (amp^r) ve X-gal (5-bromo-4chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyronoside) (80 μ g/ml) içeren LB katı besi yerine ekilerek 37°C'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Kullanılan plazminin özelliğinden dolayı DNA fragmanları vektöre yerleştirildiğinde, LacZ üretimi bozulmakta ve bu nedenle hücreler hiçbir β -galaktosidaz aktivitesi göstermemektedir. Enzim sentezlenemediği için Xgal'ı ayrıştıramaz ve kolonilerin etrafı renksiz olarak görülür. Bu tür koloniler (lac, amp^r) seçilir ve saf olarak üretilir. Eğer beta galactosidase geni sağlamsa, inaktive olmamışsa, sentezlenen enzim, Xgal'ı ayrıştırarak koloni etrafında mavi renk meydana getirir (lac+, amp^r dirençli koloniler).

3.7.3. Transformant plazmitlerin dna izolasyonu

Plazmit DNA izolasyonu, FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini Kiti (Favorgen) kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bir gece boyunca ampicilin'li LB-Broth besiyerinde büyütülmüş transformant plazmidleri içeren *E.coli* kültürü kullanılmıştır. Gelişmiş olan bakteri kültürleri 1200 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, pellet üzerine 200 μ l FAPD1 ilave edilerek pipet ile çözündürülmüş, daha sonra sırasıyla 200 μ l FAPD2 ve 300 μ l FAPD3 eklenip nazıkçe ters-düz edilmiştir. Bu işlemlerin ardından 12000 g'de 3 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmının tamamı spin kolonlara transfer edilmiştir. Kolona alınan örnekler 8000 g'de santrifüj edilerek plazmid DNA'nın kolona tutunması sağlanmıştır. Kolon filtresinin altına geçen sıvı uzaklaştırıldıktan sonra 400 μ l yıkama solüsyonu (Wash I) eklenmiş ve 1 dakika santrifüj edilmiştir. Filtreden geçen sıvı uzaklaştırıldıktan sonra aynı basamak bu sefer ikinci yıkama (600 μ l-Wash II) solüsyonu ile tekrar edilmiştir. Tekrar filtreden geçen sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, kalan etanolü uzaklaştırmak ve kolonu kurutmak için 1 dakika daha santrifüj edilmiştir. Kuruyan kolon yeni ve steril bir ependorfa (1.5 ml) transfer edilmiştir. 50 μ l steril saf su kolona eklenmiş ve oda sıcaklığında 2 dakika bekletildikten sonra 3 dakika santrifüj edilmiştir. İzolasyon sonucu 3.6.3'de anlatıldığı gibi

agaroz jele yüklenerek kontrol edilmiştir. Elde edilen transformat plazmit DNA'ları sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de stoklanmıştır.

3.7.4. Plazmit üzerinden nükleotid dizileme

Ampicilinli ortamda (100µg/ml) gelişen *E.coli* bakterisinden plazmit izolasyonu yapılarak, pGEM-T Easy vektöre klonlanmış PZR ürünleri 3.6.5.'de bahsedildiği gibi pGEM-T Easy Vector Systems klonlama kitinden elde edilen universal SP6: 5'-(TATTTAGGTGACACTATAG)-3' ve T7: 5'-(TAATACGACT-CACTATAGGG)-3' primerleri ile ayrı ayrı döngü PZR yapıp iki yönlü olarak merkez laboratuvarındaki 3130xl DNA dizileme aleti ile dizilenmiştir (Şekil 3.3). Buradaki amaç dizileme esnasında hedef nükleotid dizilerinin başlangıç ve sonunda meydana gelen hataları minimuma indirmektir.



Şekil 3.3. Hedef bölgelerin dizilenmesinde kullanılan Applied Biosystems 3130xl sistemi.

3.8. Ekzon Bölgelerine Ait Sekans Havuzu

DNA dizi analizi için kapiller elektroforeze (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, CA, ABD) yüklenen örneklerin her bir dizilim reaksiyonuna ait DNA baz dizisi verileri otomatik olarak bilgisayara kaydedilmiştir. Çalışılan tüm örneklerle ait sekans dizilimlerinin tamamlandıktan sonra analiz programlarında (Bioedit; Hall, 1997) değerlendirilmiştir. Konsensüs nükleotid dizileri Yerli Kara Gen adı-Ekzon Numarası şeklinde (ör. YK1-DRB3-E2) isimlendirilerek ekzon bölgelerine ait diziler farklı formatlarda (Fasta, Mega, Nexus ve Roehl) kaydedilmiş ve dizi analizlerinde kullanılmıştır. Her populasyon için 4 farklı konsensüs olmak üzere toplamda 16 farklı

konsensüs oluşturulmuştur (Amasya için; YK1-4 İnalın Köyü, YK5-8 Derealan, YK9-12 Aşağıbük, Kars için; YK13-16 Karaköse).

3.9. Dizi Analizleri

Nükleotid dizileri belirlenen bölgeler, şimdiye kadar belirlenmiş benzer dizilerdeki farklılıklarının ortaya çıkartılması için NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) ve Uniprot (<http://services.uniprot.org/blast/blast-20100729-0748405592>) gibi uluslararası farklı veri tabanlarında incelenmiştir. Ayrıca sekans dizisi hakkında bilgi edinmek ve belirli formatlara (Fasta, Java v.b.) dönüştürmek için aşağıdaki programlardan yararlanılmıştır. BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>); ham olarak elde edilen örneklerdeki aynı lokusa ait ileri ve geri primerler ile elde edilen nükleotid dizi kromatogramlarını BioEdit Version 7.2.6.1 programında açılarak alt alta sıralanmış, geri primeri ile okunan örneklerin komplementeri alınarak ileri primerler ile elde edilen diziler ile karşılaştırılmış ve her bireye ait konsensüs dizilerinin oluşturulması için kullanılmıştır. Clone Manager 9; entegre araç setleri içeren kapsamlı bir yazılım paketi ve sanal klonlamada kullanılırken, Treeview (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview>); yeniden yapılandırılan filogenetik ağaçları görselleştirmek ve düzenlemek için kullanılmıştır. ClustalX (<http://www.clustal.org/clustal2/>); ham dizi veri dosyalarını farklı formatlara (Fasta, Nexus, NBRF/PIR) çevirmek ve hizalamak için kullanıldı. Ayrıca Applied Biosystems DNA Sequencing Analysis Software v5.1 gibi bilgisayar üzerindeki kullanıma açık programlardan yararlanılmıştır, internet tabanlı NCBI Blast, ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>), Expasy (http://www.expasy.org/tools/pi_tool) programları kullanılmıştır.

Bu açıdan elde edilen dizi bilgileri, öncelikle NCBI'daki benzer genlerin bulunması için BLAST (NCBI'daki temel hizalama ve arama aracı; nükleotid veya protein dizilerini karşılaştırarak ve aralarında yerel benzerlik bularak homolog nükleotidleri ve proteinleri tanımlamak için kullanılmaktadır, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) programı kullanılmıştır (Altschul ve ark., 1997). Nükleotid dizilerinin çoklu hizalanması ClustalX programı ile tam hizalama seçeneği ile gerçekleştirilmiş ve buradan elde edilen dizileme, farklı formatlarda kaydedilerek (Fasta, Nexus, NBRF/PIR) SplitsTree4 programı yardımı ile Kimura2 parametresi kullanılarak Neighbour Joining (NJ) veya Unweighed Pair Group Method of Arithmetic Averages (UPGMA) metodları ile dendrogramları elde edilmiştir (Thompson ve ark., 1997; Huson ve Bryant, 2006). Bu işlem her gen bölgesi için ayrı ayrı hem nükleotid hem de amino asit dizilerine uygulanmıştır.

Bunun dışında DnaSP V5.10 programı kullanılarak gen dizilimleri Mega formatına dönüştürülmüş ve Mega 7 programında clustalw [eşzamanlı hizalama değerleri (10-0.1), çoklu hizalama değerleri (10-0.2), DNA ağırlığı Matrisi (ClustalW 1.6)] yapılarak, Jukes-Cantor veya Kimura-2 parametrisi ile istatistiksel metod olarak NJ veya UPGMA metodları, filogenetik test metodu olarak Bootstrap (1000 tekrar) ile dendogramları elde edilmiştir (Kumar ve ark., 1993; Rozas ve ark., 2003). Populasyonlar için toplam bölge sayısı, polimorfik bölge sayısı (S), haplotip sayısı (h), haplotip farklılığı (Hd: haplotype diversity), nükleotid farklılığı (Pi: nucleotide diversity) değerleri DnaSP 5.10 ve ARLEQUIN 3.11 programları kullanılarak her gen bölgesi için ayrı ayrı olacak şekilde belirlenmiştir. Ayrıca immün sistemdeki polimorfik genlerle ilişki oluşturulan verilerin bulunduğu IPD (Immuno Polymorphism Database-<http://www.ebi.ac.uk/ipd/>)’deki daha önceki çalışmalarda elde edilen hastalıklarla ilişkisi kanıtlanmış DQA, DQB ve DRB3 gibi genlerin farklı allellerinin dizileri 3.8.’de tanımlanan formatlarda bilgisayara kaydedilerek, mevcut dizilerle birlikte analiz edilmiştir.

3.10. Etik Kurul Onay Bilgileri

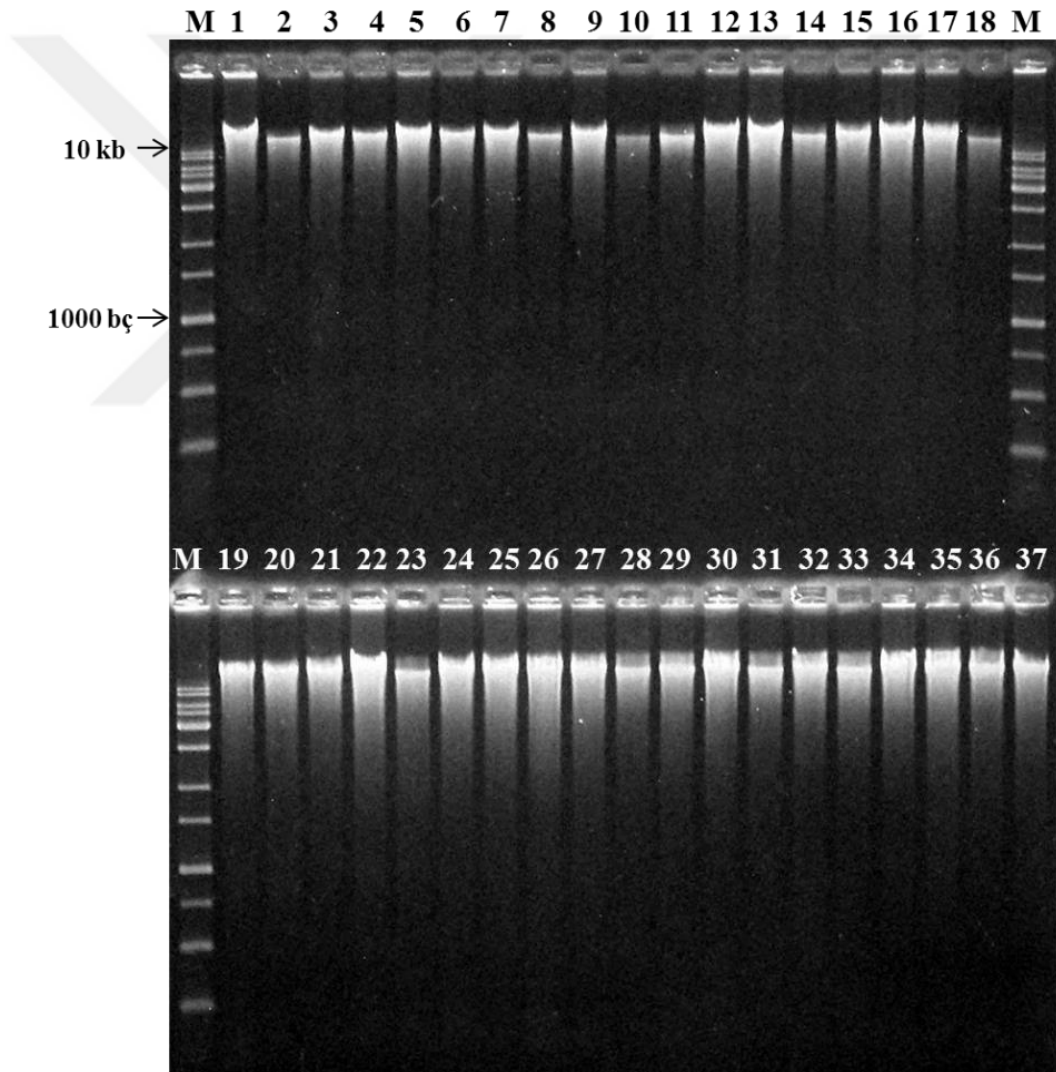
Etik kurul adı: K.S.Ü. Ziraat Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Etik kurul kararının sayısı: 2016/01-01.

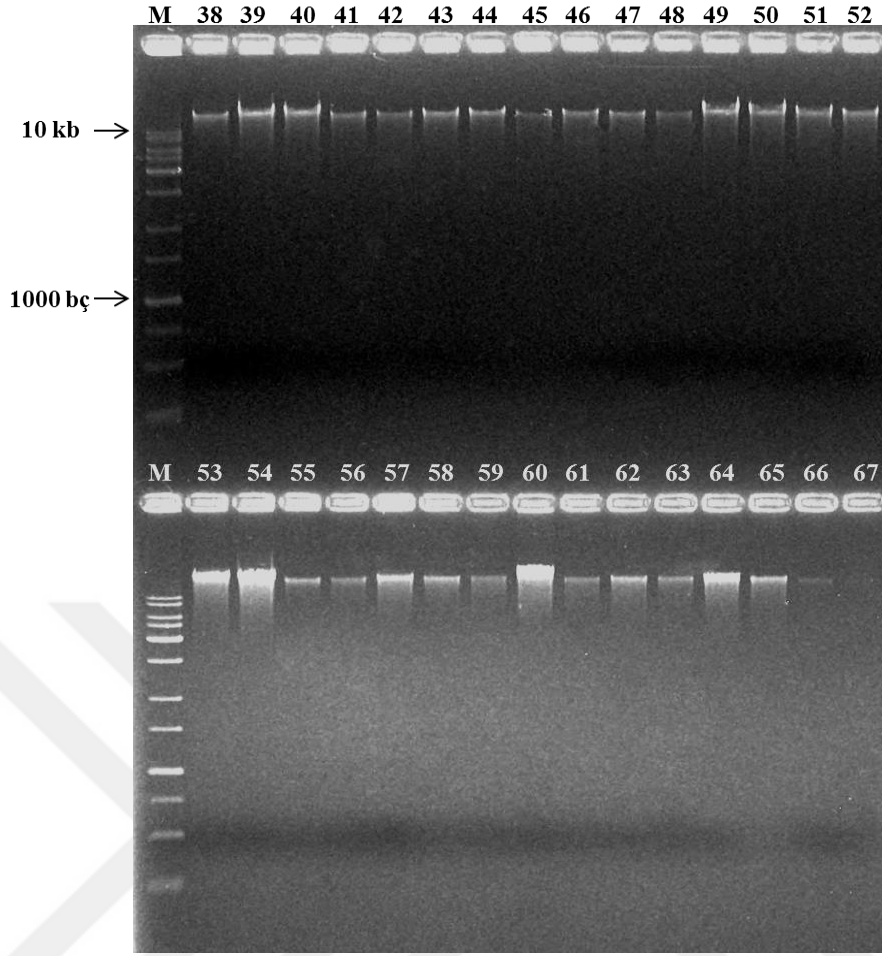
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Kan Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu

Bu çalışmada, Amasya-Merzifon (İnalanı, Derealan ve Aşağıbük köyleri) ve Kars-Sarıkamış (Karaköse köyü) bölgelerinden elde edilen 67 adet Yerli Kara sığır kanından (29, ♂ - 38, ♀), bölüm 3.3.'de ayrıntılı bir şekilde anlatılan yöntemler kullanılarak, başarılı bir şekilde DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA örneklerinin izolasyon etkinliği %1'lik agaroz jel elektroforez ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.1 ve 4.2). DNA örneklerinin genotiplendirme analizlerinde kullanılabilecek kalitede saflığa ve konsantrasyona sahip olduğu gözlenmiştir.



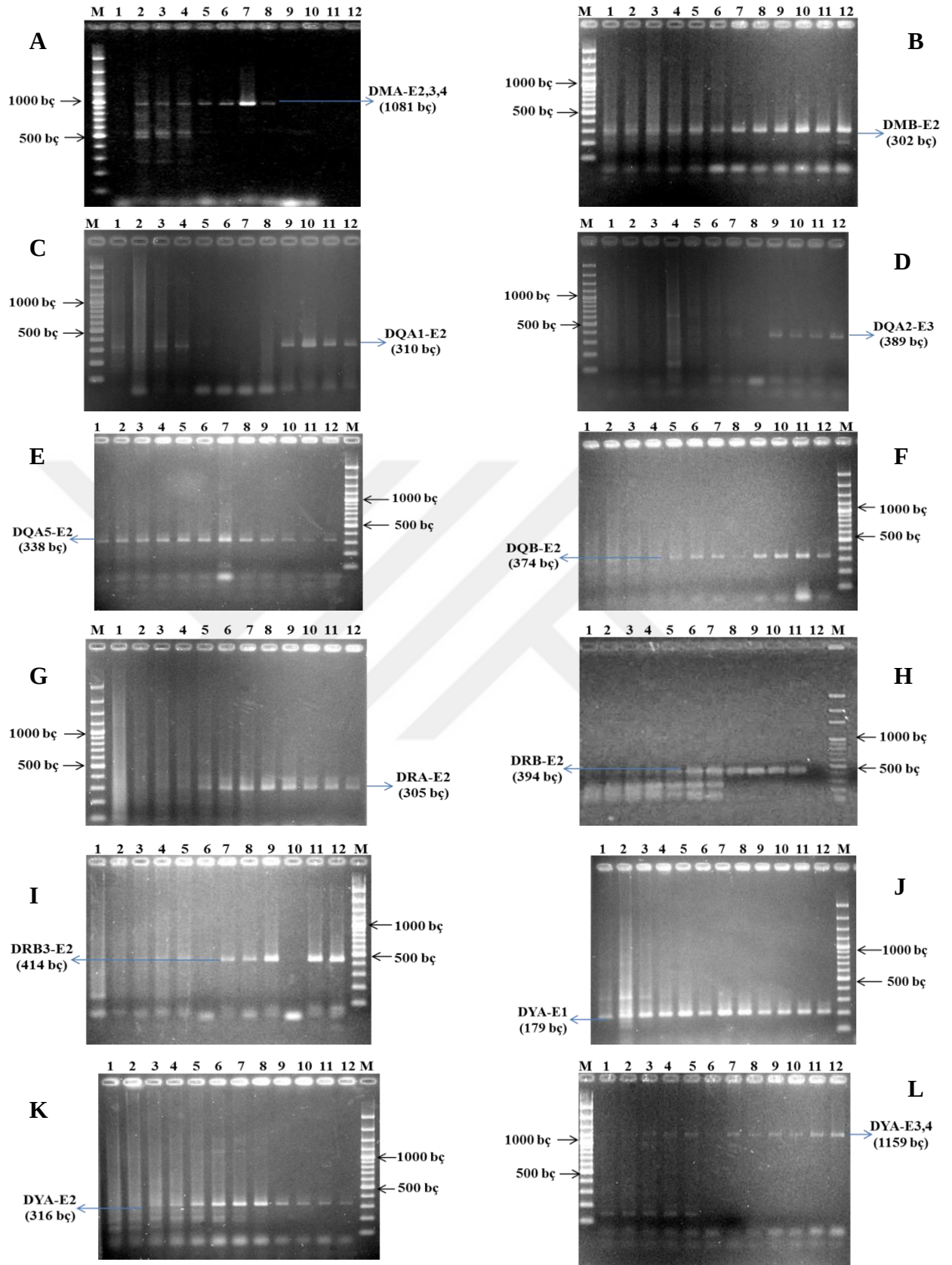
Şekil 4.1. Yerli Kara DNA izolasyonlarının jel görüntüsü (Amasya-Merzifon). (M: 1 kb DNA standardı-Thermo Scientific).



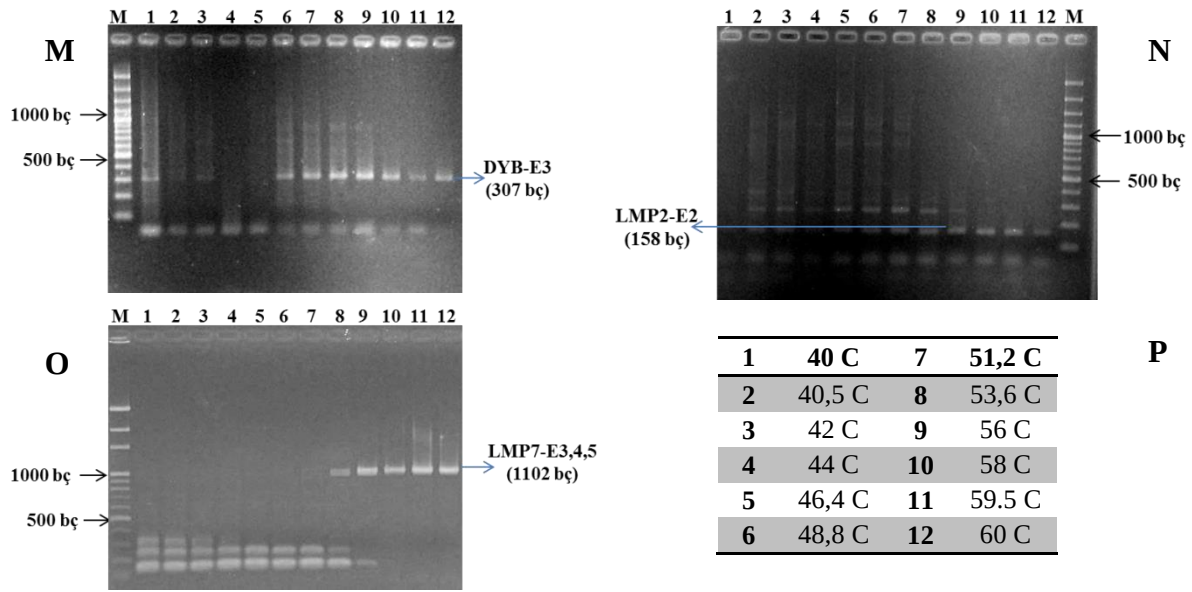
Şekil 4.2. Yerli Kara DNA izolasyonlarının jel görüntüsü (Kars-Sarıkamış). (M: 1 kb DNA standardı-Thermo Scientific).

4.2. Hedef Gen Bölgelerinin PZR Optimizasyonu

Yerli kara sığır örneği için belirlenen genlerle ilgili NCBI’da hiçbir dizi bulunmamasından dolayı, kullanılan *Bos taurus* genomundan (Çizelge 3.1) (BTA23; AC_000180.1) tasarlanan primerler ile konvansiyonel PZR amplifikasyon çalışmaları yürütülmüştür. 3.4.1 ve 3.4.2’de bahsedilen şekilde tasarlanan primer çiftleri ve gradient PZR işlemi tüm gen ekzonlarına (DMA-E2,3,4, DMB-E2, DQA1-E2, DQA2-E3, DQA5-E3, DQB-E2, DRA-E2, DRB2-E2, DRB3-E2, DYA-E1,E2,E3,4, DYB-E3, LMP2-E2 ve LMP7-E3,4,5) uygulanmıştır (Şekil 4.3). Primer sıcaklıklarının belirlenmesi için yapılan gradient PZR ile primer sıcaklıkları tam olarak belirlenmiştir. Bunu için tek DNA (YKD17) örneği kullanılarak 12 farklı sıcaklık kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Bu sıcaklıklardan en uygun olanı ile diğer örnekler (YKD1-67) 16’lı seriler halinde PZR yapılmıştır. Çalışılan her örnek için kullanılan DMA-E2,3,4, DMB-E2, DQA1-E2, DQA2-E3, DQA5-E3, DQB-E2, DRA-E2, DRB2-E2, DRB3-E2, DYA-E1,E2,E3,4, DYB-E3, LMP2-E2 ve LMP7-E3,4,5 primer çiftleri (ileri ve geri) ile PZR ürünü elde edilmiştir.



Şekil 4.3. Hedef gen bölgelerinin gradient PZR jel görüntüsü (A-O), gradiyent PZR sıcaklıkları (P) (M: 100 bç DNA standardı).



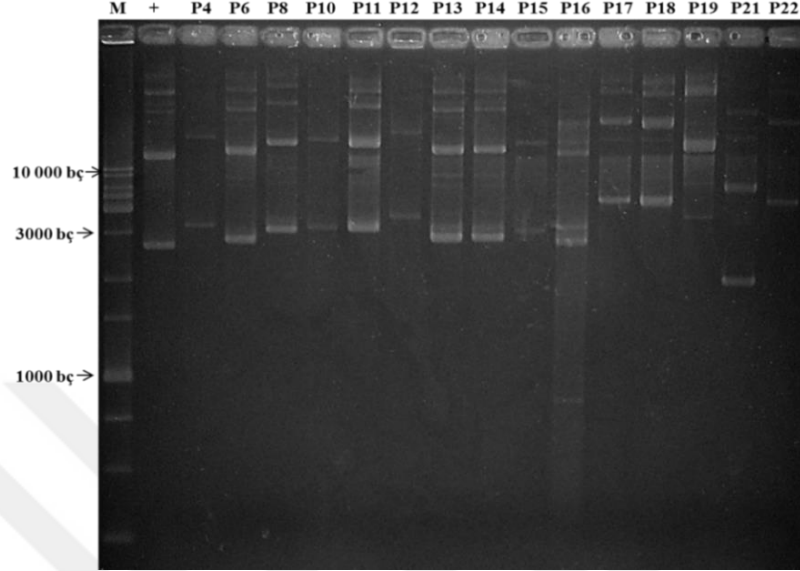
Şekil 4.3. Devamı.

Şekil 4.3 incelendiğinde, YKD1-67 örnekleri için kullanılacak PZR amplifikasyonunda DMA-E2,3,4 bölgesi için 7 nolu yapışma sıcaklığının (51,2 °C) yaklaşık uzunluğu 1081 bp olan hedef bölge için ideal olduğu görülmüştür (Şekil 4.3.A). Diğer bölgeler ele alındığında, 338 bp'lik DQA5-E3 ve 316 bp'lik DYA-E2 bölgeleri için 8 nolu yapışma sıcaklığının (53,6 °C) (Şekil 4.3.E,K), 394 bp'lik DRB2-E2 bölgesi için 9 nolu yapışma sıcaklığı (56 °C) (Şekil 4.3.H), 310 bp'lik DQA1-E2, 307 bp'lik DYB-E3 ve 158 bp'lik LMP2-E2 bölgeleri için 10 nolu yapışma sıcaklığının (58 °C) (Şekil 4.3.C, M, N), 302 bp'lik DMB-E2, 374 bp'lik DQB-E2, 305 bp'lik DRA-E2, 414 bp'lik DRB3-E2 ve 179 bp'lik DYA-E1 bölgeleri için 11 nolu yapışma sıcaklığının (59,5 °C) (Şekil 4.3.B, F, G, I, J) ve 389 bp'lik DQA2-E3, 1159 bp'lik DYA-E3,4 ve 158 bp'lik LMP7-E3,4,5 bölgeleri için 12 nolu yapışma sıcaklığının (60 °C) (Şekil 4.3.D, L, O) uygun olabileceği belirlenmiştir.

4.3. Yerli Kara BoLA Bölgelerinin Klonlanması

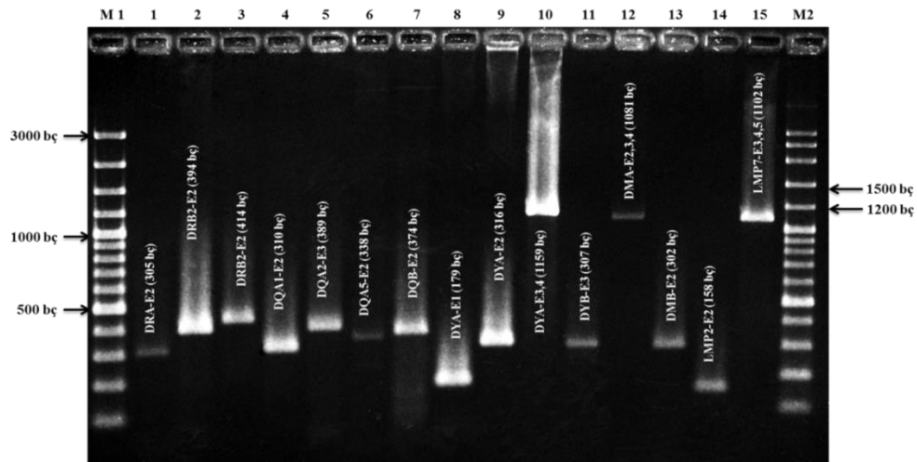
Hedef bölgelerin doğrudan dizilenmesi işleminde okunmaması veya hatalı okunması durumlarında, ayrıca farklılık arz eden örneklerde hedef bölgeler klonlama vektörü olan pGEM-T Easy'e aktarılmıştır. *E.coli*'de replike olan bu vektör ampisilin direnç genine sahiptir. Bu vektörün en önemli özelliklerinden birisi klonlama bölgesinin açık uçlu olması ve 3'-5' uçlarında timin (T) bulundurmasıdır. Bununla birlikte kullanılan DNA polimeraz enzimlerinin (Thermo Taq DNA Polymerase ve Thermo Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase) PZR ürünlerinin 3'-5' uçlarına adenin (A) eklemesi özelliği kullanılarak transformat plazmidler elde edilmiştir (Bkz. 3.5). Daha sonrasında transformat

vektörler CaCl₂ metodu ile *E. coli* DH5 α 'ya aktarılmıştır. Seçilen beyaz koloniler diğer bir değişle transformant hücreler 50 μ g/ml amphisilin içeren sıvı LB'de geliştirilerek plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen plazmidler ve pGEM-T Easy vektörü % 1,5'lik agaroz jelde birlikte koşturulmuştur (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. *E. coli* DH5 α 'dan izole edilen transformant plazmidler. M: 1 kb DNA standartı, +: pGEM-T Easy vektörü , P4-P22: izole edilen plazmidler.

İzole edilen transformant plazmidlerdeki hedef bölgelerin varlığının belirlenmesi için her bölge kendine özgü primerler ile PZR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.5). PZR sonuçları % 1,5'lik agaroz jelde görüntülenmiş ve hedef bölgeleri içerdiği tespit edilen plazmidler saflaştırılarak dizileme çalışmalarında kullanılmak üzere – 20 °C'de stoklanmıştır.



Şekil 4.5. Transformant plazmidlerdeki hedef bölgelerin, kendi primerleri ile gerçekleştirilen PZR sonucu. M1: 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific), M2: 100 bp DNA ladder (Vivantis).

4.4. BoLA-DMA ve –DMB Gen Bölgelerinin Karakterizasyonu

4.4.1. BoLA-DMA gen bölgesi ve yerli kara sığırında DMA bölgesinin nükleotid dizilenmesi

BoLA sınıf II histokompatibilite molekülü veya DM α zincir öncüsü, kısaca BoLA-DMA bölgesi, bu bölge diğer MHC bölgeleri gibi insanlardaki benzeri dikkate alınarak açıklanmıştır. HLA-DMA, HLA sınıf II alfa zinciri paraloglarına aittir. Bu sınıf II molekül, bir alfa (DMA) ve bir beta zincirinden (DMB) oluşan bir heterodimerdir ve her ikisi de membran içinde sabitlenmişlerdir. Hücre içi veziküllerde (keseciklerde) bulunur. DM, CLIP (Class II-associated invariant chain peptide: sınıf II ilişkili değişmez zincir peptid) molekülünün peptit bağlama bölgesinden salınmasına yardımcı olarak MHC sınıf II moleküllerinin peptid yüklenmesinde merkezi bir rol oynamaktadır (Álvaro-Benito ve ark., 2015). CLIP veya Sınıf II'ye bağlı değişmez zincir peptidi değişmez zincirin MHC sınıf II oluk ile bağlanan kısmıdır ve MHC reseptörü tamamen monte edilinceye kadar orada kalır. CLIP'in amacı, endo/lizozom içinde MHC II lokalizasyonu öncesinde kendi peptit fragmanlarının bağlanmasını önlemektir. MHC II montajı sırasında, değişmez zincir, MHC II kompleksiyle kompleks oluşturur. MHC II bölgesi olarak adlandırılan özel bir endozomda, katapsin S değişmez zinciri parçalayıp CLIP MHC II kompleksine bağlanır. Antijen peptid fragmanlarının varlığında HLA-DM MHC II molekülüne bağlanır ve CLIP salınır ve peptitlerin bağlanmasına izin verir. Bağlanmış antijen ile MHC II sonra sunum için hücre zarına nakledilir. HLA-DO, HLA-DM tarafından katalize edilen reaksiyonu inhibe edebilir. Sınıf II molekülleri, antijen sunan hücrelerde (APC: B lenfositleri, dendritik hücreler, makrofajlar) ifade edilir (Álvaro-Benito ve ark., 2015). İnsanlardaki HLA-DMA'nın alfa zinciri yaklaşık 29194 Da büyüklüğünde 261 amino asit uzunluğuna sahip, 5 ekzondan oluşan bir bölgedir (UniProt, <http://www.uniprot.org/uniprot/Q31604>). Ekzon 1 lider peptidi kodlarken, ekzon 2 ve 3 iki ekstraselüler bölgeyi kodlar ve ekzon 4'de zar geçiş alanını ve sitoplazmik kuyruğu kodlamaktadır (Zwart ve ark., 2005). HLA-DMA bölgesinden eksprese olan protein sığırlardaki karşılığı olan BoLA-DMA proteinine %84 oranında benzemektedir (Childers ve ark., 2006).

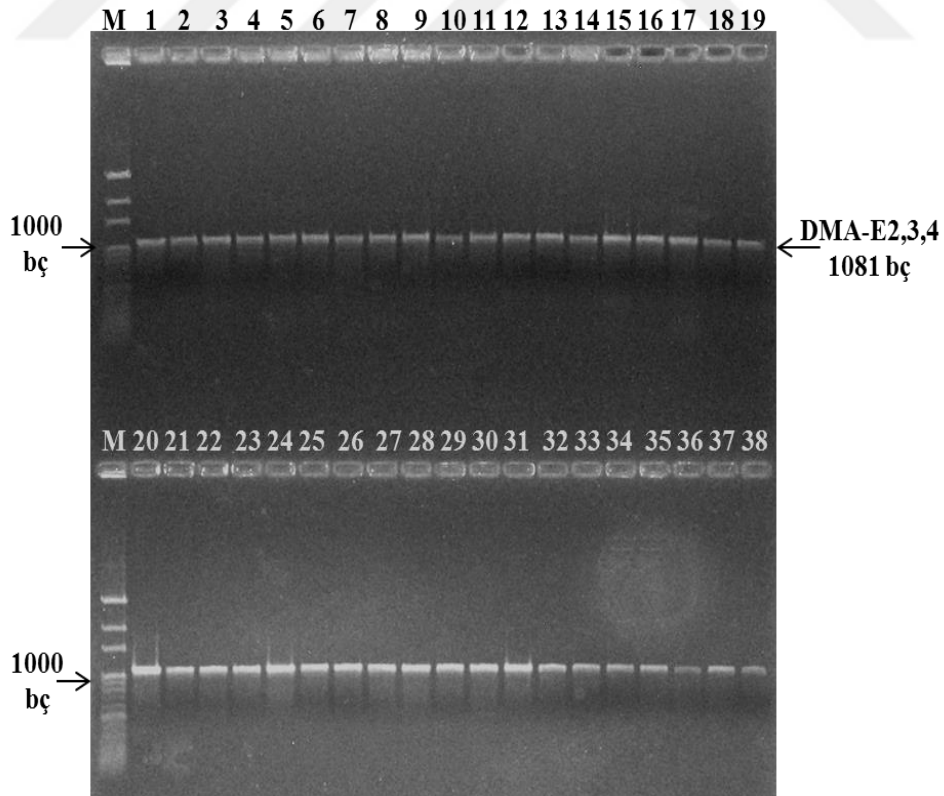
DMA gen bölgesi insanlarda 5 ekzondan oluşurken sığırlarda 4 ekzondan meydana gelmektedir. Sığırlardaki DMA gen bölgesi, 23. Kromozomun (AC_000180.1) 23q12-q13 bölgesinde, yaklaşık uzunluğunda 3052 bp (7204350..7207401) olan linear bir gen bölgesidir. BoLA-DMA proteini 260 amino asit uzunluğunda, moleküler ağırlığı yaklaşık 28883.01 Da ve izoelektrik noktası (pI) 4.47 olan bir proteindir. Tahmini yarılanma süresi

memeli retikülositlerinde 30 saat (in vitro), mayalarda >20 saat (in vivo) ve *Escherichia coli*'de (in vivo) >10 saat şeklindedir. İlk 26 amino asit signal peptit bölgesini, 234 aa olgunlaşmış polipeptidi oluştururken, 41→123 aa alfa domainin, 216→250 C-terminal domani ve 126→218 aa arası immünoglobulin domanini oluşturmaktadır (Niimi ve ark., 1995; Hess ve ark., 1999; (RefSeq-<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=BoLA-DMA>; Expasy-protparam, <http://web.expasy.org/protparam/>).

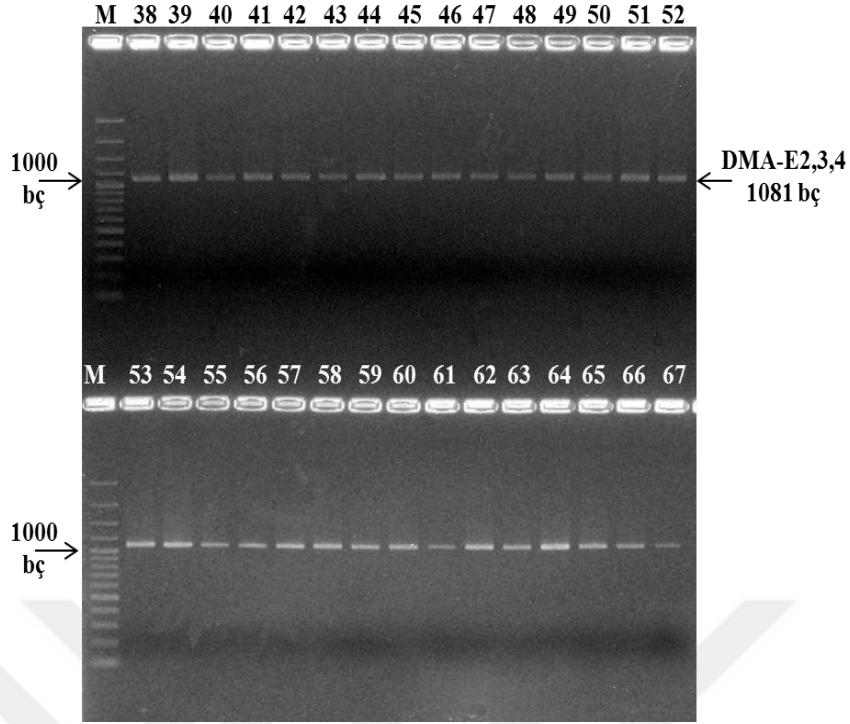
Çalışmanın bu kısmında, BoLA-DMA gen bölgesinin nükleotid dizi özelliklerinin belirlenmesi için tüm örnekler PZR işlemi, dizileme ve nükleotid dizi analizi yapılmıştır.

4.4.1.1. DMA geninin pzs amplifikasyon sonucu

Yerli kara sığır örneklerindeki BoLA-DMA gen bölgesini oluşturan ekzon II, III ve IV için 3.4.1'de bahsedilen şekilde tasarlanan primerler kullanılarak (Çizelge 3.1) PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonu, 3.4.2'de detaylandırılan PZR şartları kullanılarak yapılmış ve çoğaltılan bölge % 1,5'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.6-7). Hedef bölge yaklaşık 1081 bç (ekzon uzunlukları; 279-126-5 bç) uzunluğunda lineer bir bölgedir.



Şekil 4.6. YK1-38. örneklerinde DMA-E2,3,4 bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı.

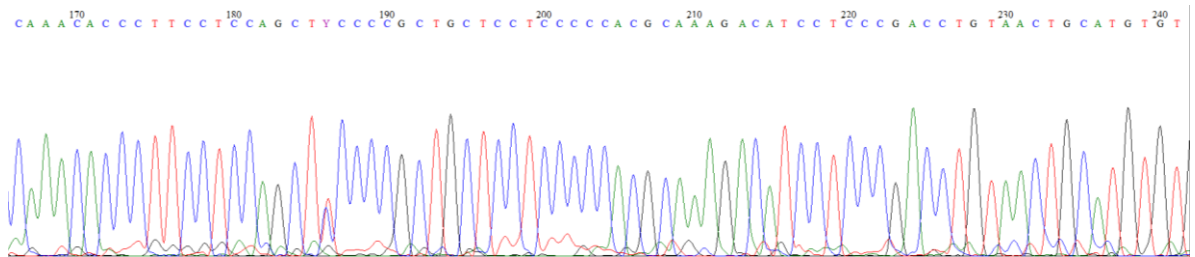


Şekil 4.7. YK38- 67. örneklerinde DMA-E2,3,4 bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı.

4.4.1.2. DMA-E2,3,4 nükleotid ve amino asit dizisi

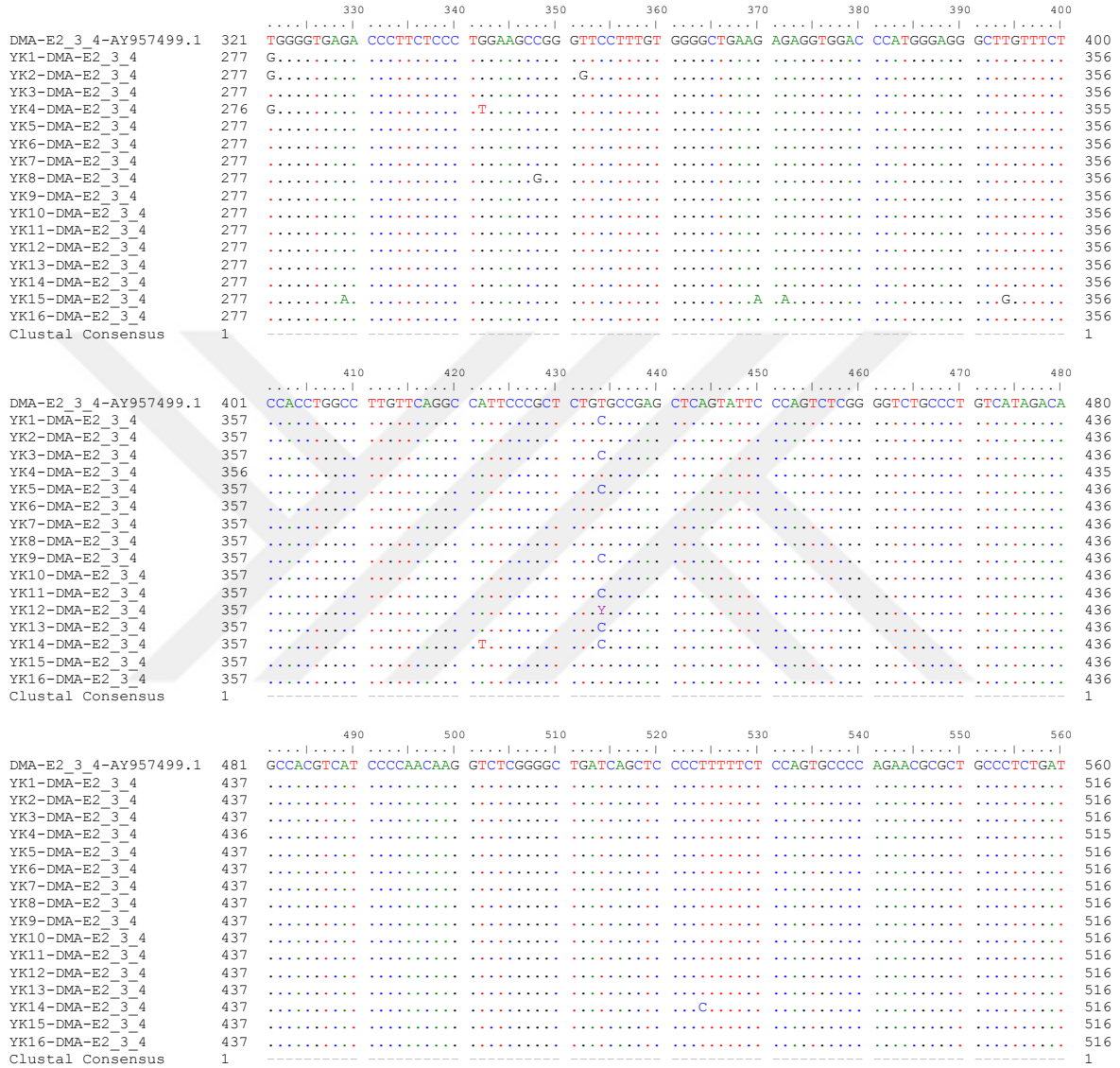
YK-DMA-E2,3,4 bölgesinin her iki zinciri de ileri ve geri primerleri kullanılarak nükleotid dizisi belirlenmiştir (1081 bç). Tüm örneklerden elde edilen dizi bilgileri farklı formatlarda kaydedilmiştir. 3.6’da ayrıntılı bir şekilde bahsedildiği gibi hedef bölge için farklı olarak düşünülen örneklerin kromatogramlarına bakılarak YK1-16-DMA-E2,3,4 şeklinde konsensüs dizileri belirlenmiştir (Şekil 4.8). Gen bölgesinin tam dizisi kullanılarak amino asit dizileri elde edilmiştir.

Kümeleme işlemi ve nükleotid dizilerinin kromatogram pik yükseklikleri incelenerek elde edilen konsensüslerin nükleotid dizileri ek çizelge C.2’de ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 4.8. YK-DMA-E2,3,4 bölgesinin ileri primer ile elde edilen dizilime ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir.

Konsensüs dizileri ve referans gen bölgesi öncelikle ClustalX programı yardımı ile Fasta, Phylip, Nexus ve Clustal fromatlarında kaydedilmiştir. Daha sonrasında Bioedit ve Clustal Omega programı kullanılarak hizalanmıştır ve farklılıkları belirlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Referans DMA-E2,3,4 (Ac.No:AY957499.1) ve YK-DMA-E2,3,4 bölgesinin konsensüs dizilerinin hizalanmasının bir kısmı.

Nükleotid hizalama işlemi sonunda intron bölgelerinin de içerisinde bulunduğu konsensüs dizilerinde en fazla nükleotid farklılık YK-16-DMA-E2,3,4 nolu konsensüs dizisinde (18 nükleotid), en az farklılık YK-6 ve YK11-DMA-E2,3,4 nolu konsensüs dizilerinde (1 nükleotid) gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar çizelge 4.1’de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde DMA-E2,3,4 bölgesinde genetik polimorfizmi ve alelik varyasyona sahip 91 polimorfik nükleotid farklılığın bulunduğu görülmüştür.

Çizelge 4.1. YK-DMA-E2,3,4 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.

Nükleotid Pozisyonları	48	50	53	78	96	99	122	186	232	235	245	321	329	342	348	352	370	372	394	422	434	524	657	664	686	690	692	696	706
Konsensüs	T	C	C	C	C	A	T	G	T	C	C	T	G	G	C	T	G	G	T	A	T	T	G	G	G	G	G	G	C
DMA-E2,3,4-AY957499.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK1-DMA-E2,3,4	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.	.	.	.
YK2-DMA-E2,3,4	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK3-DMA-E2,3,4	.	.	.	G	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.
YK4-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	.	.	K	.	.	.	Y	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK5-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	G	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	S	.	.	.	.	.
YK6-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK7-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK8-DMA-E2,3,4	.	.	.	G	G	C	.	.	C	T	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.	.	.	.
YK9-DMA-E2,3,4	A	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	.	.	.
YK10-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK11-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.
YK12-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.
YK13-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.	.	.	.
YK14-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	C	C	.	S	.	.	.	.	.
YK15-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	A	A	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK16-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	A	G
Özet	1A	1T	1-	4G	2G	2C	1K*	1T	1C	1T	2Y	3G	1A	1T	1G	1G	1A	1A	1G	1T	7C, 1Y	1C	1A	1A, 2C, 2S	1C	1A	1C	1A	1G

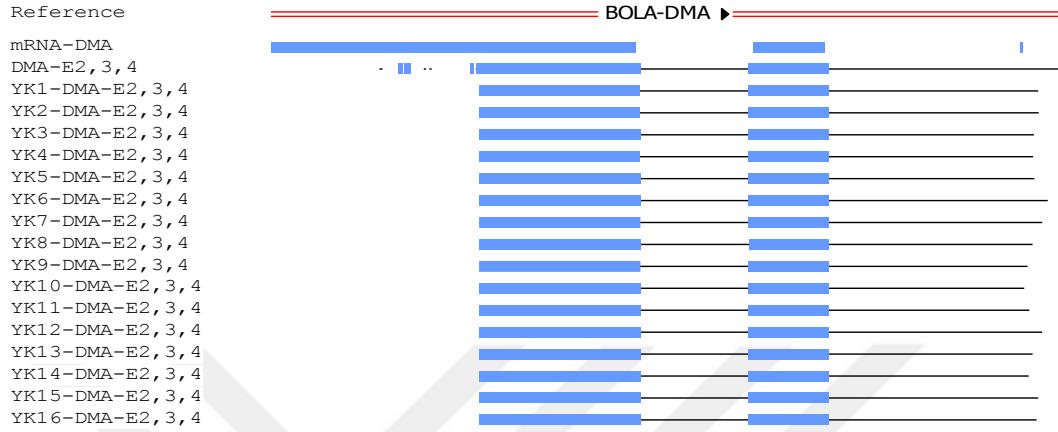
*K: G veya T, Y: T veya C, S: G veya C.

Çizelge 4.1. Devamı.

Nükleotid Pozisyonları	709	713	724	725	735	742	761	767	773	785	787	792	801	811	821	822	828	829	860	872	977	994	998	1000	1001	1002	1003	Toplam Farklılık
Konsensüs	A	G	A	G	G	A	T	G	G	A	A	T	T	G	A	T	T	A	G	A	C	A	T	C	T	T	T	
DMA-E2,3,4-AY957499.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK1-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	.	W	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	7
YK2-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3
YK3-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3
YK4-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	6
YK5-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	5
YK6-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
YK7-DMA-E2,3,4	.	.	C	A	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	A	.	.	C	G	7
YK8-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	C	A	.	.	C	.	14
YK9-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	.	W	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	6
YK10-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK11-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
YK12-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	G	C	.	.	A	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	7
YK13-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	3
YK14-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	5
YK15-DMA-E2,3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	5
YK16-DMA-E2,3,4	C	T	.	.	T	.	.	.	C	C	C	C	.	.	C	A	A	C	.	.	.	.	.	T	C	.	.	18
Özet	1C	1T	1C	1A	1T	2W	1C	2T	1C	2C	1C	1C	1G	1C	1C	1A	2A	2C	2A	6R*	1A	1C	2A	1T	1C	2C	1G	91

*W: A veya T, R: G veya A.

DMA-E2,3,4 için belirlenen konsensüs dizilerindeki intron bölgelerinin uzaklaştırılması ve ekzon bölgelerden sentezlenen protein dizisindeki amino asit farklılıkları belirlemek için clone manager programında deneysel diziler karşılaştırılarak amino asit dizileri belirlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Nükleotid konsensüs dizilerinden mRNA bölgesinin elde edilmesi ve aa dizilerinin belirlenmesi (Referans: mRNA-DMA, Ac. No. NM_001012674.2, YK1-16 konsensüs dizileri, mavi bölgeler ortak noktaları ve ekzon bölgelerini göstermektedir).

DMA-E2,3,4 nükleotid konsensüs dizileri kullanılarak elde edilen DMA-mRNA (783 bp uzunluğunda) dizilerinden yola çıkılarak 6 farklı haplotip belirlenmiştir (in silico). YK1 ve YK2 aynı haplotiplere sahipken, YK3,4,5,6,8 ve 9 nolu konsensüs dizileri farklı haplotiplere sahip olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.2). Burda dikkat çeken nokta ise nükleotid dizisinde belirlenen 91 polimorfik nükleotid bölgesinin 22 ye düşmesidir. Bunun en önemli nedeni mRNA dizisi üzerinde belirlenen farklılıkların tamamının ekzon bölgelerindeki polimorfizmden kaynaklandığıdır.

Çizelge 4.2. DMA bölgesinden transkripte olan mRNA nükleotid dizisi

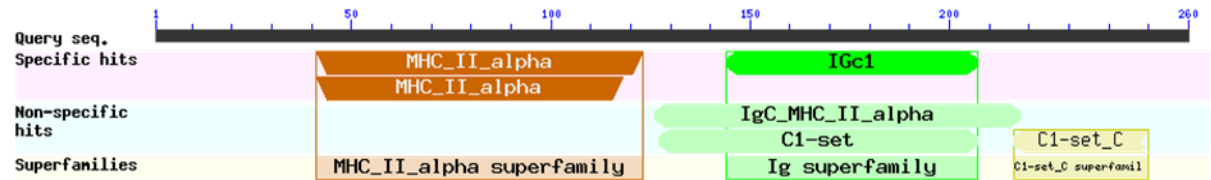
Nükleotid Pozisyonları	376	378	406	424	427	450	514	560	563	573	649	775	Toplam Farklılık
Konsensüs	T	C	C	C	A	T	G	T	C	C	T	G	
DMA-mRNA-NM_001012674.2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK1-DMA-mRNA	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	G	.	2
YK2-DMA-mRNA	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	G	.	2
YK3-DMA-mRNA	.	.	G	.	.	.	T	.	.	.	.	.	2
YK4-DMA-mRNA	G	T	.	.	.	K	.	.	.	Y	G	.	5
YK5-DMA-mRNA	.	.	.	G	C	.	.	.	.	.	.	.	2
YK6-DMA-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	1
YK7-DMA-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK8-DMA-mRNA	.	.	G	G	C	.	.	C	T	.	.	A	6

Çizelge 4.2. Devamı

Nükleotid Pozisyonları	376	378	406	424	427	450	514	560	563	573	649	775	Toplam Farklılık
YK9-DMA-mRNA	A	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2
YK10-DMA-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK11-DMA-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK12-DMA-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK13-DMA-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK14-DMA-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK15-DMA-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK16-DMA-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
Özet	1A, 1G	2T	4G	2G	2C	1K*	1T	1C	1T	2Y	3G	1A	22

*K: G veya T, Y: T veya C.

Elde edilen amino asit dizileri (260 aa uzunlukta) NCBI’da Blast yapılarak hedef bölge olduğu teyit edilmiştir (Şekil 4.11). DMA proteinin ilk 1-26 amino asitlik bölümü signal peptid dizisini, 41-123 alfa domainini, 126-218 immunoglobülin domaini ve 216-250 arası C-terminal domainin oluşturmaktadır (Şekil 4.11). C1 set domainleri klasik Ig (immunoglobülin) benzeri bölgelerdir ve sadece bağışıklık sistemi moleküllerinde bulunurlar (Zajonc ve ark., 2005). BoLA-MHC genleri immünoglobulin multigen süperfamilyasına aittir. Aynı zamanda bu familya T-hücre reseptörleri ve antikorları da içerir, bu moleküllerin ortak bir atadan evrimleştiği düşünülmektedir (Miyauchi ve ark., 1990).



Şekil 4.11. YK8-DMA-PR'nin sahip olduğu domainler, kırmızı renkle gösterilen alfa domaini, yeşil renkle gösterilen immunoglobülin C1-set domaini ve sarı renkli bölge C-terminal domaini göstermektedir.

Belirlenen YK-DMA haplotiplerinin oluşturduğu proteinlerinin NCBI Blast sonuçlarına göre; *Bos taurus*'dan eksprese olan MHC sınıf II DM alfa zincirine (Ac. No: NP_001012692.2) benzerlik oranı YK6 ve 9 %99,6, YK1, 2 ve 3 %99,2, YK4 %98,5 ve YK8 %97,7 olarak bulunmuştur. Ayrıca YK1-2'inin moleküler ağırlığı 28727.81, YK3'ün 28986.13, YK4'ün 28727.28, YK6'nın 28880.23 ve YK9'un 28848.99 olarak hesaplanırken pI değerleri 4,47 olarak belirlenmiştir (in siliko). YK5 moleküler ağırlığı 28880.01, pI değeri 4,54 iken YK8'in moleküler ağırlığı 28953.10 ve pI değeri 4,60 olarak hesaplanmıştır. Amino asit pozisyonlarına bakıldığında; YK1-2 için 136. pozisyonadaki prolin→alanine ve 217.

pozisyonundaki triptofan→glisine, YK3’de benzer şekilde 136. pozisyonundaki prolin→alanine dönüşürken 172. pozisyonunda glisin→triptofana dönüşmüştür. YK4’de 126 (fenilalanin→valine) ve 217 (triptofan→glisine), YK5’de 142 (prolin→alanine) ve 143 (asparajin→histidin), YK8’de 136 (prolin→alanine), 142 (prolin→alanine), 143 (asparajin→histidin), 187 (fenilalanin→serine) ve 188 (serine→fenilalanin), YK9’da 126 (fenilalanin→izolösin) amino asit pozisyonlarında değişimlere rastlanmıştır (Şekil 4.12). Belirlenen tüm farklılıkların IgC1 domaninde olmasının en önemli nedeni olarak antijenlere karışı antikor fonksiyonu görmelerinden kaynaklandığı düşünülmüştür.



Şekil 4.12. Altı yeni BoLA-DM alleli tarafından kodlanan alfa bölgelerinin tahmini amino asit dizilerinin hizalanması. Numaralar olgunlaşmış protein içindeki amino asit pozisyonlarını, noktalar referans protein ile özdeş amino asitleri göstermektedir (in silico).

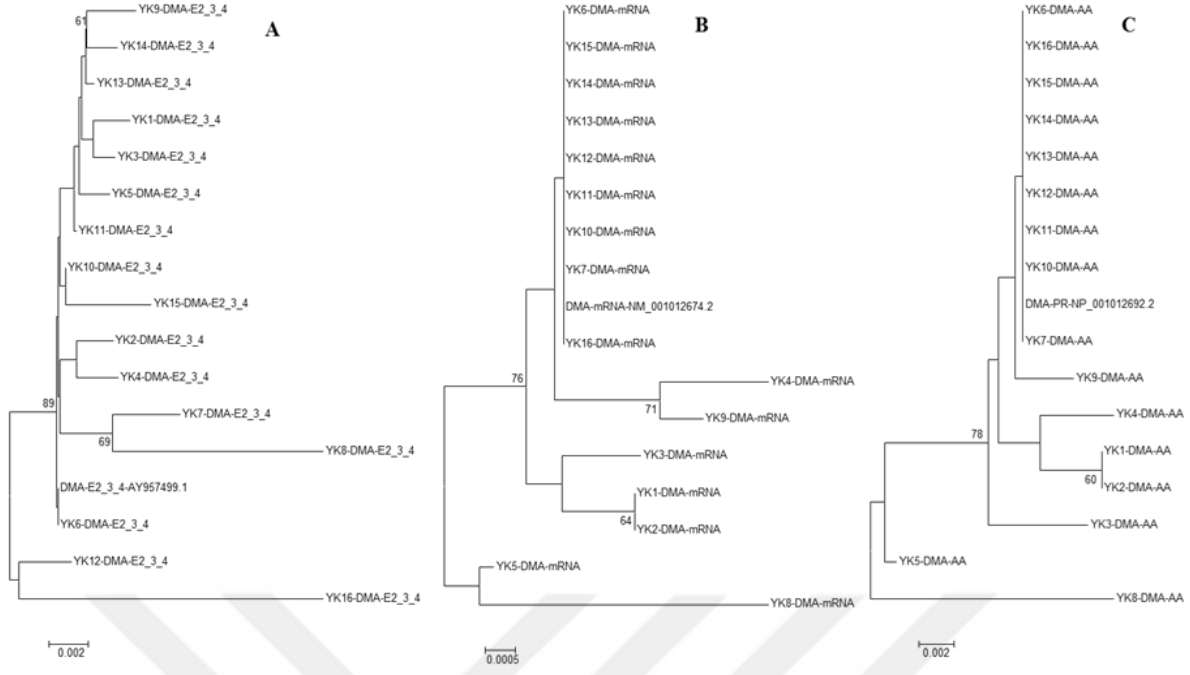
4.4.1.3. DMA-E2,3,4 bölgesinin filogenetik analizi

Yapılan çalışma ile yerli kara sığır ırkındaki BoLA-DMA-E2,3,4 bölgesinin intron ve ekzon bölgelerine nükleotid dizileri belirlenmiştir. Bu diziler kullanılarak NCBI’da daha önceden belirlenen BoLA-DMA gen bölgeleri ile beraber filogenetik analiz yapılmıştır. Yerli kara sığırının DMA-E2,3,4 bölgesinin dizi bilgileri analiz edilerek, DNA polimorfizm özellikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Yerli karada toplam 91 farklı bölge belirlenirken, bu bölgelerin 55 tanesini polimorfik olduğu ve haplotip sayısının 34 olduğu tespit edilmiştir. 4.4.1.2’de bahsedilen haplotip sayısının farklı belirlenmesinin en önemli nedeni DNAsp 6.10.01 programının “Y: T veya C” gibi heterozigot allellerinin ayrı ayrı programa girilmesidir. Yerli kara sığırlarında, haplotip farklılığı $0,998 \pm 0,007$ olarak, nükleotid farklılığı $0,00822 \pm 0,0000012$ olarak hesaplanmıştır. Yerli karalardaki haplotipler arasındaki genetik uzaklıklar 0,0010-0,0331 (ortalaması: 0,0083) arasında ve oldukça düşük değerlerde bulunmuştur. Yapılan çalışma ile yerli kara sığır ırkındaki BoLA-DMA-E2,3,4 bölgesinin intron ve ekzon bölgelerine nükleotid dizileri belirlenmiştir. Bu diziler kullanılarak NCBI’da daha önceden belirlenen BoLA-DMA gen bölgeleri ile beraber filogenetik analiz yapılmıştır.

Çizelge 4.3. DMA-E2,3,4 bölgesinin dizisine göre DNA polimorfizm özellikleri

Özellikler	Genel
Toplam Bölge Sayısı	91
G+C	58,45
Polimorfik Bölge Sayısı (s)	55
Haplotip Sayısı (h)	34
Haplotip Farklılığı (Hd)	$0,998 \pm 0,007$
Nükleotid Farklılığı (Pi)	$0,00822 \pm 0,0000012$

Yerli kara sığır ırkı için oluşturulan filogenetik ağaçlar Neighbor-Joining (NJ) yöntemi, Jukes–Cantor modeli ve Bootstrap metoduna (1000) dayanmaktadır. Dallar üzerinde gösterilen değerler bootstrap değerleridir. Konsensüs dizileri filogenetik ilişkileri bakımından referans diziye göre (nükleotid için AY957499.1, mRNA için NM_001012674.2 ve aa için NP_001012692.2) nükleotid ve amino asit dizisi ayrımı %20 hesaplanırken mRNA dizisi %50 şeklinde belirlenmiştir (Şekil 4.13). Tanımlanan YK-DMA bölgesindeki SNP’ler, cins veya ırk tipine göre benzer şekilde kümelenmişlerdir.

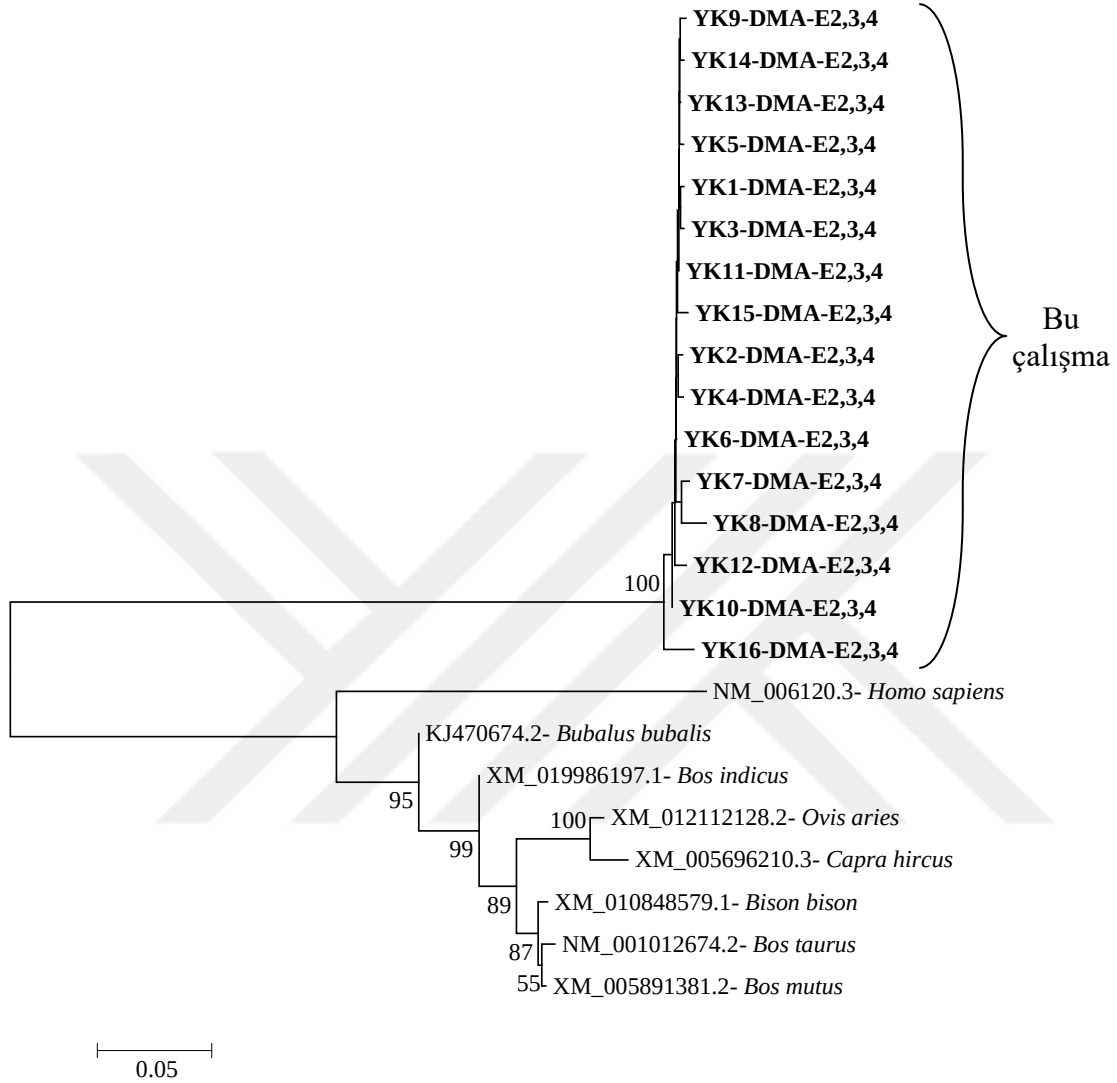


Şekil 4.13. BoLA-DMA Konsensüs dizilerinin filogenetik ağaçları. Yerli kara BoLA-DMA allelerinin (YK1-16) 1081 bç'lik nükleotid dizilerinden oluşturulmuş Neighbor-joining ağacı (A), 783 bazlık mRNA dizilerinden oluşturulmuş Neighbor-joining ağacı (B) ve 260 amino asit uzunluğundaki dizilerden oluşturulmuş Neighbor-joining ağacı (C).

NJ ağacının sonuçlarına göre DMA bölgesi üç farklı ana kola (clade) ayrılmıştır. Bu kollardan ilkinin yerli kara grubu oluştururken, ikincisini insanlardaki (NM_006120.3-*Homo sapiens*) DMA bölgesi ve üçüncü grub ise sığır (NM_001012674.2-*Bos taurus* , XM_005891381.2-*Bos mutus*, XM_019986197.1-*Bos indicus*), koyun (XM_012112128.2-*Ovis aries*), keçi (XM_005696210.3-*Capra hircus*), bison (XM_010848579.1-*Bison bison*) ve mandadan (KJ470674.2-*Bubalus bubalis*) oluşmaktadır (Şekil 4.14). Sonuç olarak çalışılan yerli kara popülasyonu diğer örneklerden genetik olarak ayrı olduğu görülmüştür. Bu bölgenin farklı türlerde korunduğu düşünüldüğünde yerli kara sığırı içinde bu görüşün geçerli olduğu söylenebilir (Álvaro-Benito ve ark., 2015).

HLA-DM, klasik olmayan bir MHC sınıf II proteindir. İmmün sistemde, MHC için peptid repertuarını düzenler ve peptid değişimde katalizör görevi görür. Her ne kadar aynı gen lokusundan eşlenmelerine rağmen MHC sınıf II proteinleri yüksek derecede polimorfizm sergilerken, HLA-DM için düşük değişkenlik gözlemlenmiştir. HLA-DM aktivitesi direkt olarak immünodominant peptid sunumunu desteklediğinden, HLA-DM (DMA veya DMB zinciri) polimorfizmleri, otoimmünite ve bağışıklık bozuklukları için önemli bir risk faktörü olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca HLA-DM polimorfik kalıntılarının HLA-DM katalitik

aktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Álvaro-Benito ve ark., 2015).



Şekil 4.14. Yerli kara ve diğer türlerdeki DMA bölgelerinin filogenetik ağacı.

Klasik MHC sınıf II polimorfizmleri ile hastalık arasında net bir bağlantı olsa da, HLA-DM varyantlarının genetik çalışmaları ve otoimmünitesi tartışmalıdır. Ancak son zamanlarda yapılan birkaç otoimmün hastalık (enflamasyona sebep olan, doku ve organlarda hasar oluşturan, vücudun kendi hücre ve dokularına karşı immün reaksiyonların oluşumunu sağlayan hastalıklar) ve DMA bölgesi arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Heterodimer haricindeki HLA-DM varyantlarının biyokimyasal özellikleri şimdiye kadar incelenmediğinden, biyolojik fonksiyonlarındaki potansiyel farklılıkları anlamada açık bir moleküler temel bulunmamaktadır. Yakın zamanda yapılan biyofiziksel ve yapısal çalışmalar,

DM peptit değişim katalizinin genel mekanizması yanı sıra DO tarafından DM inhibisyonu üzerine ışık tutmuştur. Kütle spektrometresi ile birlikte hidrojen-döteryum değişimini içeren çalışmalar, MHC-II'deki 3/10-sarmalın dinamik özelliklerinin, DM'ye duyarlılığını belirlediğini göstermiştir (Painter ve ark., 2011; Anders ve ark., 2011; Pos ve ark., 2012; Guce ve ark., 2013).

Bugüne kadar insanlarda sadece dört HLA-DMA alleli açıklanmıştır ve bu alleler bir veya iki tek nükleotid polimorfizm içerdiği belirlenmiştir. Bu tekli nükleotid polimorfizmleri, olgun proteinin 140, 155 ve 184 pozisyonlarında amino asit değişikliklerine neden olur (Robinson ve ark., 2013). Buradaki dikkat çekici nokta, belirlenen tüm farklılıkların, immunoglobülin domaininde (126-218) olmasıdır. Bu olgu yerli kara sığır ırkı için de geçerli görülmektedir. 4.4.2.'de anlatıldığı gibi yerli kara sığırında belirlenen aa pozisyonlarındaki değişikliklerin, sığırlarda görülen bazı otoimmün hastalıklara (*Eosinophilic myositis*, *Arthrogriposis congenita* ve idiopathic bovine leucosis) karşı etkili olma potansiyeli bulunmaktadır. Bu aa farklılıklarının yerli kara sığır ırkına özgü olup olmadığı ileride yapılacak çalışmalar ile belirlenmeli ve hastalıklar ile ilişkisi ortaya çıkartılmalıdır.

4.4.2. BoLA-DMB gen bölgesi ve yerli kara sığırında DMB bölgesinin nükleotid dizilenmesi

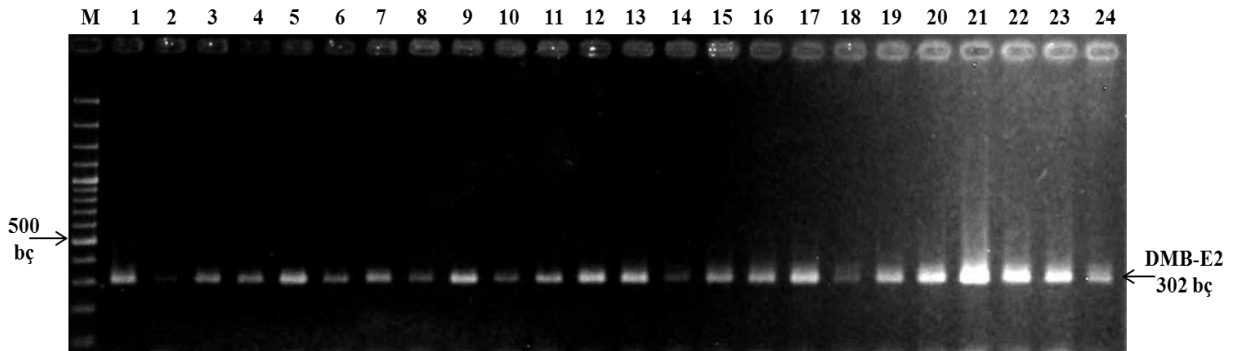
BoLA sınıf II histokompatibilite molekülü, heterodimer beta zinciri veya kısaca BoLA-DMB geni, tıpkı BoLA-DMA'da olduğu gibi sınıf II bölgesi beta zinciri paraloglarına ait bir gen bölgesidir. BoLA-DMA gibi peptid bağlanma yerinden CLIP (sınıf II ilişkili değişmez zincir peptid) molekülünün serbest bırakılmasına yardımcı olarak MHC sınıf II moleküllerinin peptid yüklenmesinde merkezi bir rol oynamaktadır. Sınıf II moleküller, antijen sunan hücrelerde (APC: B lenfositleri, dendritik hücreler, makrofajlar) ifade edilir. İnsanlardaki HLA-DMB bölgesinin, beta zinciri yaklaşık 26-28 kDa'dır ve geni 6 ekzonıçermektedir. Eksonlardan ilki lider peptidi kodlar, ekzon 2 ve 3 iki ekstraselüler domainleri kodlarken, ekzon 4 transmembran domaini kodlar ve ekzon 5 ise sitoplazmik kuyruğu kodlamaktadır (Weber ve ark., 1996). Tümör immünolojisindeki rolü tanımlanmamıştır, ancak yumurtalık kanserinde artmış T hücre infiltrasyonu ve ilerlemiş prognoz ile pozitif korelasyon olduğu gösterilmiştir (Kinseth ve ark., 2014). HLA-DMB bölgesinden eksprese olan protein sığırlardaki karşılığı olan BoLA-DMB proteinine %75 oranında benzemektedir (Childers ve ark., 2006).

DMB bölgesi hem insanlarda hem de sığırlarda 6 ekzondan oluşmaktadır. İnsanlarda 792 baz uzunlukta olgunlaşmış bir mRNA'dan 263 amino asitlik, moleküler ağırlığı 28943.13 Da ve pI değeri 7.09 olan bir proteindir. Buna nazaran Sığırlardaki DMB gen bölgesi, 23. Kromozomun (AC_000180.1) 23q12-q13 bölgesinde, yaklaşık uzunluğu 6844 bp (7186801..7193645) olan linear bir gen bölgesidir. BoLA-DMB gen bölgesinden 262 amino asit uzunluğunda, moleküler ağırlığı yaklaşık 29070.21 Da ve pI değeri 6.43 olan bir protein kodlanmaktadır. İlk 18 amino asit signal peptit bölgesini geriye kalan 244 aa olgunlaşmış polipeptidi oluştururken, 27→105 aa beta domainin ve 113→195 İmmünoglobulin C1-set domaini oluşturmaktadır (Niimi ve ark., 1995; <http://www.uniprot.org/uniprot/P28068>; <http://www.genecards.org>; Expasy, <http://web.expasy.org/>).

BoLA-DMB gen bölgesinin yerli kara sığır ırkındaki moleküler özelliklerinin belirlenmesi için tüm örneklerde PZR kullanılarak tarama gerçekleştirilmiştir.

4.4.2.1. DMB geninin pZR amplifikasyonu sonucu

Yerli kara sığır örneklerindeki BoLA-DMB gen bölgesini oluşturan ekzon II için 3.4.1'de bahsedilen şekilde dizayn edilen primerler kullanılarak (Çizelge 3.1) PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonu, 3.4.2'de detaylandırılan PZR şartları kullanılarak yapılmış ve çoğaltılan bölge % 1,5'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.15). Hedef bölge yaklaşık 302 bp (ekzon uzunluğu; 282 bp) uzunluğunda lineer bir bölgedir.

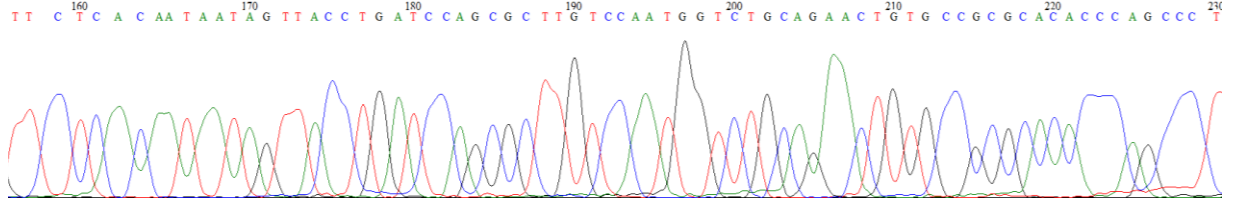


Şekil 4.15. YK1- 24. örneklerinde DMB-E2 bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: 100 bp DNA standardı.

4.4.2.2. DMB-E2 nükleotid dizilenmesi ve amino asit dizi analizi

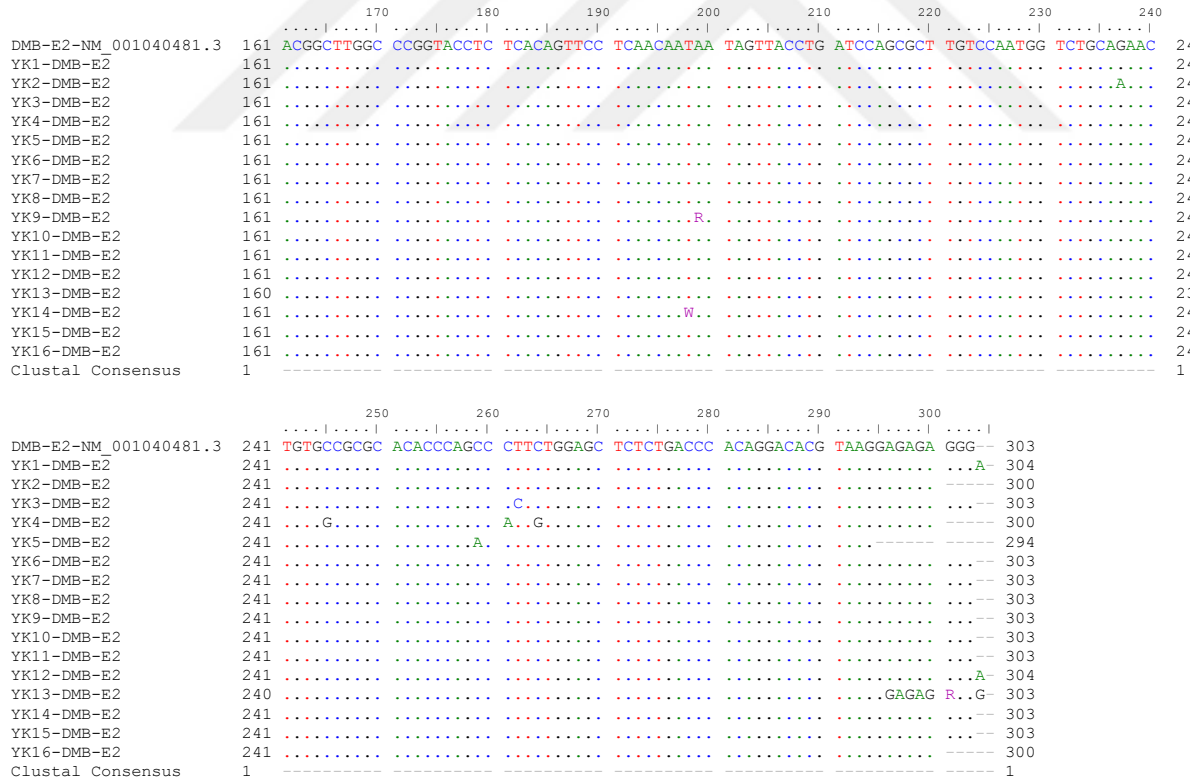
YK-DMB-E2 bölgesinin her iki zincirinde ileri ve geri primerleri kullanılarak nükleotid dizisi belirlenmiştir (302 bp). Tüm örneklerden elde edilen dizi bilgileri farklı formatlarda kaydedilmiştir. 3.6'da ayrıntılı bir şekilde bahsedildiği gibi hedef bölge için farklı

olarak düşünölen örneölerin öromatogramlarına bakılarak YK1-16-DMB-E2 öeklinde konsensüs dizileri belirlenmiştir (Şekil 4.16). Gen bölgesinin tam nükleotid dizisi kullanılarak amino asit dizileri elde edilmiştir. Kümeleme işlemi ve nükleotid dizilerinin öromatogram pik yükseklikleri incelenerek elde edilen konsensüslerin nükleotid dizileri ek çizelge C.3’de ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 4.16. YK-DMB-E2 bölgesinin ileri primer ile elde edilen nükleotid dizisine ait öromatogram görüntüsünün bir kısmı örneö olarak gösterilmiştir.

Konsensüs dizileri ve referans gen bölgesi öncelikle ClustalX programı yardımı ile Fasta, Phylip, Nexus ve Clustal formatlarında kaydedilmiştir. Daha sonrasında Bioedit ve Clustal Omega programı kullanılarak hizalanmış ve farklılıkları belirlenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Referans DMB-E2 (NM_001040481.3) ve YK-DMB-E2 bölgesinin konsensüs dizilerinin hizalanmasının bir kısmı örneö olarak verilmiştir.

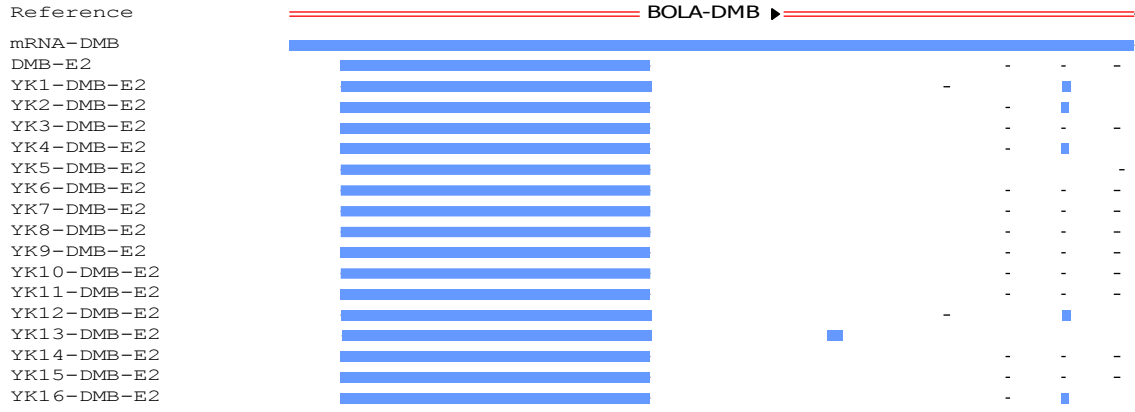
Hizalama işlemi sonunda intron bölgelerinin de içerisinde bulunduğu konsensüs dizilerinde en fazla farklılık YK-4-DMB-E2 nolu konsensüs dizisinde (3 nükleotid), en az farklılık ise YK-2,3,5,9,14 ve YK15-DMB-E2 nolu konsensüs dizilerinde (1 nükleotid) gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar aşağıdaki 4.4 nolu çizelgede özetlenmiştir. Çizelge incelendiğinde YK-DMB-E2 bölgesinde genetik polimorfizmi ve alelik varyasyona sahip toplam 13 polimorfik nükleotid farklılığının bulunduğu görülmüştür.

Çizelge 4.4. YK-DMB-E2 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.

Pozisyon	26	59	67	199	200	238	246	260	262	263	265	297	302	Toplam Farklılık
Konsensüs	T	-	A	T	A	G	C	C	C	T	C	-	A	
DMB-E2-AY957499.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK1-DMB-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK2-DMB-E2	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	1
YK3-DMB-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	1
YK4-DMB-E2	.	.	.	.	.	.	G	.	A	.	G	.	.	3
YK5-DMB-E2	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	1
YK6-DMB-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK7-DMB-E2	.	G	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2
YK8-DMB-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK9-DMB-E2	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	1
YK10-DMB-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK11-DMB-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK12-DMB-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK13-DMB-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	R	2
YK14-DMB-E2	.	.	.	W	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
YK15-DMB-E2	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
YK16-DMB-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
Özet	1K	1G	1-	1W	1R	1A	1G	1A	1A	1C	1G	1G	1R	13

*R: G veya A, W: A veya T, K: G veya T.

DMB-E2 için belirlenen konsensüs dizilerinde intron bölgelerinin uzaklaştırılması yapılmamıştır. Çünkü bu bölge için tasarlanan primer çifti hedef bölgedeki ekzon için spesifiktir. Daha sonrasında hedef bölgeden sentezlenen protein dizisindeki farklılıkları belirlemek için clone manager programında karşılaştırılarak amino asit dizileri belirlenmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Nükleotid konsensüs dizilerinden transkript (mRNA) elde edilmesi ve aa dizilerinin belirlenmesi (Referans: mRNA-DMB, Ac. No. NM_001040481.3, YK1-16 konsensüs dizileri, mavi bölgeler ortak noktaları göstermektedir).

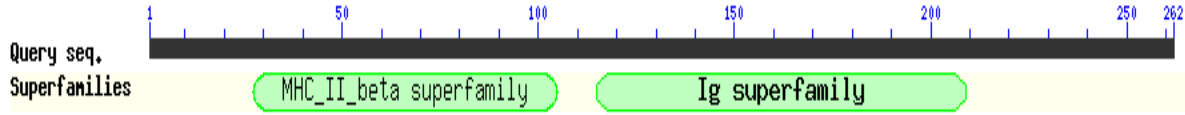
DMB-E2 nükleotid konsensüs dizileri kullanılarak elde edilen DMB-mRNA (789 bp uzunluğunda) dizilerinden yola çıkılarak 9 farklı haplotip belirlenmiştir (in silico). Belirlenen haplotiplere bakılarak bu gen bölgesi yönünden YK9,14 ve 15 nolu konsensüs dizilerin oluşturulduğu popülasyonlardaki bireylerde heterozigotluğun (R, W ve K) yaygın olarak görüldüğü belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. DMB bölgesinden transkriptte olan mRNA nükleotid dizisi

Nükleotid Pozisyonları	49	51	52	74	107	115	247	248	286	294	308	310	311	313	Toplam Farklılık
Konsensüs	C	T	A	T	-	A	T	A	G	C	C	C	T	C	
DMB-mRNA-NM_001040481.3	G**	A	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3
YK1-DMB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK2-DMB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	1
YK3-DMB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	1
YK4-DMB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	A	.	G	3
YK5-DMB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	1
YK6-DMB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK7-DMB-mRNA	.	.	.	.	G	-	.	.	.	.	.	.	.	.	2
YK8-DMB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK9-DMB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	1
YK10-DMB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK11-DMB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK12-DMB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK13-DMB-mRNA	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
YK14-DMB-mRNA	.	.	.	.	.	.	W*	.	.	.	.	.	.	.	1
YK15-DMB-mRNA	.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
YK16-DMB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
Özet	2G	1A	1G	1K	1G	1-	1W	1R	1A	1G	1A	1A	1C	1G	15

*R: G veya A, W: A veya T, K: G veya T.**Farklılık arz eden bölge.

Elde edilen amino asit dizileri (262 aa uzunlukta) NCBI'da Blast yapılarak hedef bölge olduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.19). İlk 18 asit signal peptit bölgesini, 27→105 aa beta domainin ve 113→195 immünoglobulin domaini oluşturmaktadır (Niimi ve ark., 1995; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd>).

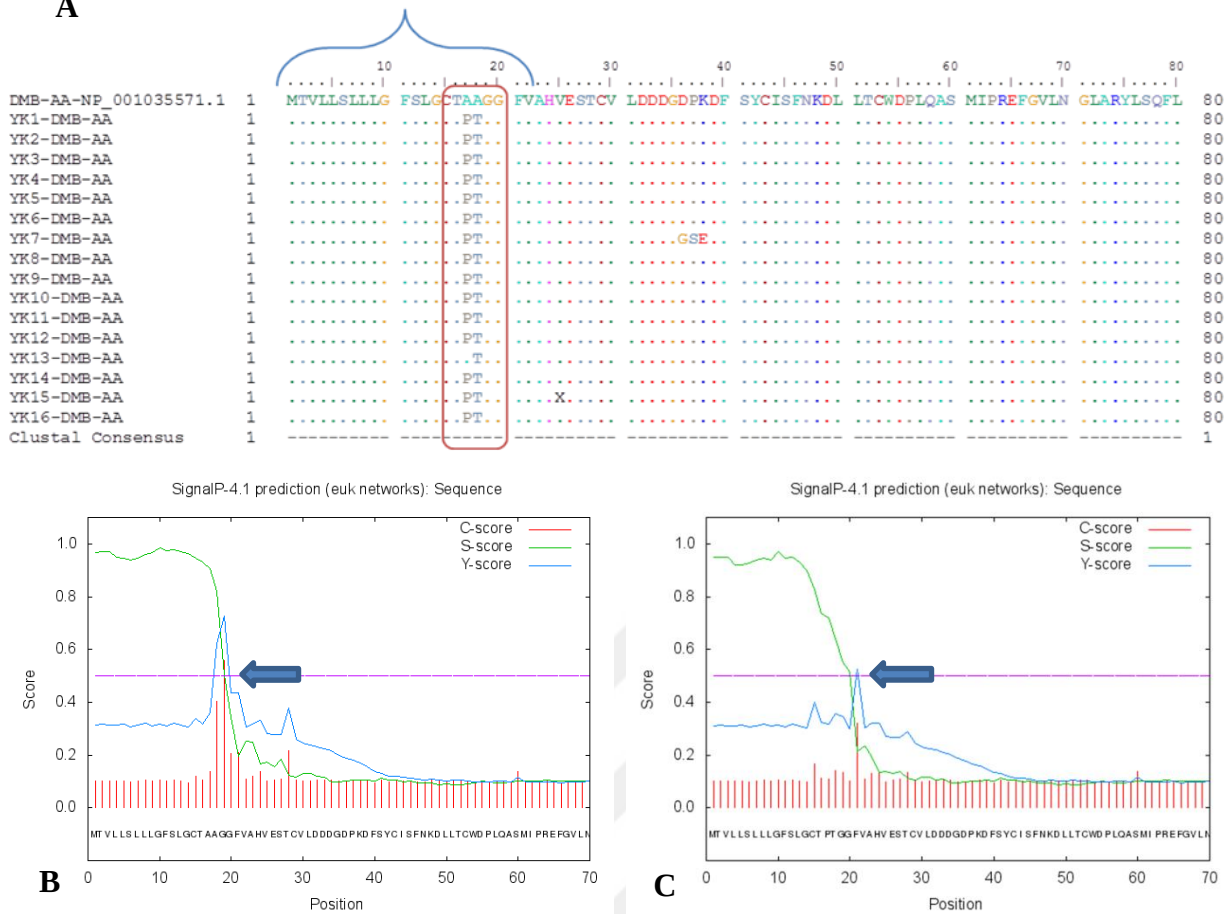


Şekil 4.19. YK1-DMB-PR'nin sahip olduğu, beta ve immunoglobülin domainleri.

Belirlenen YK-DMB haplotiplerinin oluşturduğu proteinlerinin NCBI Blast sonuçlarına göre; *Bos taurus*'dan eksprese olan MHC sınıf II DM beta zincirine (Ac. No: NP_001035571.1) benzerlik oranı YK1,3,5 ve 13 için %99, YK4 ve YK7 için ise %98 olarak bulunmuştur. Ayrıca belirlenen haplotiplerin moleküler ağırlığı 29059,14-29130,27 Da arasında değişirken (YK7-YK5), pI değerleri 6,21-6,43 olarak hesaplanmıştır. Amino asit pozisyonlarına bakıldığında, 17. ve 18. pozisyonlarda bulunan apolar bir amino asit olan alalin yerine, porlin (17. pozisyon için) ve polar bir amino asit olan treonin (18. pozisyon için) gelmesidir. Bu bölge sinyal peptid bölgesi içerisinde (Niimi ve ark., 1995). Sinyal peptid bölgesindeki bu farklılığın herhangi bir değişikliğe sebep olduğunu belirlemek için SignalP 4.1 online (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) programından yararlanılmış ve bu bölgede bir değişikliğe sebep olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.20). Sinyal peptid bölgesi yeni sentezlenen bir proteinin doğru yere veya hücresel bölüme yönlendiren 15-30 amino asit uzunlukta bir bölgedir. Ayrıca bu bölge proteinin endoplazmik retikulum transferi ve olgun protein oluşurken, uygun bölgeden sinyal peptidaz tarafından kesilmesini sağlamaktadır (Heijne ve Gavel, 1988; Käll ve ark., 2004).

Sinyal peptid bölgesindeki mutasyonlar insanlarda bazı genetik hastalıkların önemli bir nedenidir. Buna en iyi örnek hipoparatiroidizm gösterilebilir. Bu hastalık sinyal peptidin 18. pozisyonundaki T→C bir değişiklik sonucu amino asit dizisinde sisteinden arjinine dönüşmesiyle sinyal dizisinin hidrofobik yapısının bozulması sonucunda ortaya çıkmaktadır (Arnold ve ark., 1990). Paratriod hormon salınımındaki düşüş hipokalsemi ve hiperfosfatemi ile sonuçlanır. Hayvanlarda hipokalsemik sendromuna en iyi örnek süt verimi yüksek ineklerindeki doğum felcidir (DeGaris ve Lean, 2008).

Sinyal peptid dizisi



Şekil 4.20. BoLA-DM alleli tarafından kodlanan beta bölgelerinin tahmini amino asit dizilerinin hizalanması (A). Kutu içerisindeki bölge signal peptid dizisindeki değişikliği göstermektedir (A). Sinyal peptid bölgesi analiz sonucu (B-C). B: Referans dizi (NP_001035571.1), C: Yerli Kara dizisi. S-score (signal peptid skoru; her amino asit için ayrı ayrı hesaplanan bu skor, amino asitlerin signal peptid dizisine ait olup olmadığını göstermektedir), C-score (signal peptid ile olgun proteinin ayrıldığı nokta) ve Y-score (S ve C skorlarının birlikte değerlendirildiğindeki, tahmini ayrılma skoru).

4.4.2.3. DMB-E2 bölgesinin filogenetik analizi

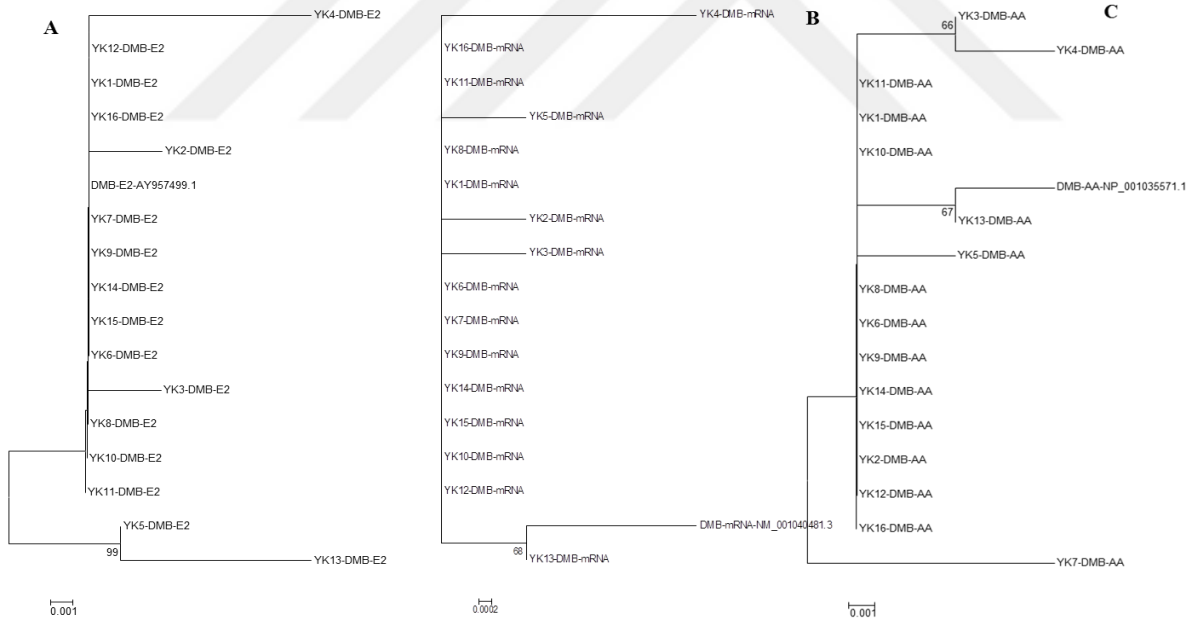
Çalışmanın bu kısmında yerli kara sığır ırkındaki BoLA-DMB-E2 bölgesine ait dizilim ortaya çıkartılmıştır. Bu diziler kullanılarak NCBI’da daha önceden belirlenen BoLA-DMB gen bölgeleri ile beraber filogenetik analiz yapılmıştır. Yerli kara sığırının DMB-E2 bölgesinin dizi bilgileri analiz edilerek, DNA polimorfizm özellikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Yerli karada toplam 13 farklı bölge belirlenirken, bu bölgelerin 12 tanesini polimorfik olduğu ve haplotip sayısının 9 olduğu tespit edilmiştir. Yerli kara sığırlarında, haplotip farklılığı $0,653 \pm 0,122$ olarak, nükleotid farklılığı $0,00478 \pm 0,0000029$ olarak

hesaplanmıştır. Yerli karalardaki haplotipler arasındaki genetik uzaklıklar 0,0033-0,0373 (ortalaması: 0,0080) arasında ve oldukça düşük değerlerde bulunmuştur.

Çizelge 4.6. DMB-E2 bölgesinin dizisine göre DNA polimorfizm özellikleri

Özellikler	Genel
Toplam Bölge Sayısı	13
G+C	53,94
Polimorfik Bölge Sayısı (s)	12
Haplotip Sayısı (h)	9
Haplotip Farklılığı (Hd)	0,653 ± 0,122
Nükleotid Farklılığı (Pi)	0,00478 ± 0,0000029

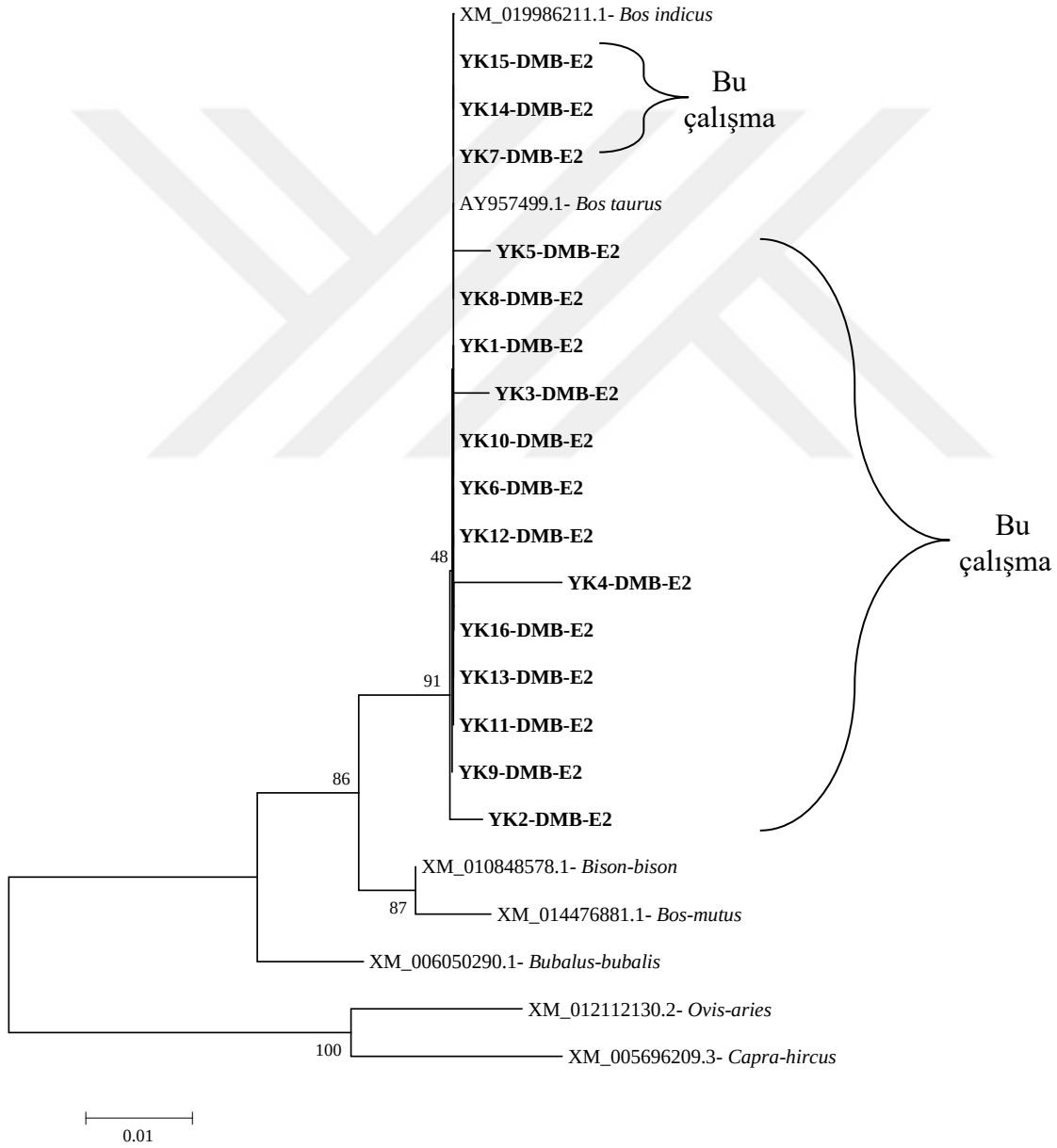
Yerli kara sığır ırkı için oluşturulan filogenetik ağaçlar Neighbor-Joining (NJ) yöntemi, Jukes–Cantor modeli ve Bootstrap metoduna (1000) dayanmaktadır. Konsensüs dizileri filogenetik ilişkileri bakımından referans diziye göre (nükleotid için AY957499.1, mRNA için NM_001040481.3 ve aa için NP_001035571.1) nükleotid ve amino asit dizisi ayrımı %10 hesaplanırken mRNA dizisi %20 şeklinde belirlenmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. BoLA-DMB Konsensüs dizilerinin filogenetik ağaçları. Yerli kara BoLA-DMB allelerinin 302 b'lık nükleotid dizilerinden oluşturulmuş komşu birleştirme (Neighbor-joining) ağacı (A), 789 bazlık mRNA dizilerinden oluşturulmuş Neighbor-joining ağacı (B) ve 262 amino asit uzunluğundaki dizilerden oluşturulmuş Neighbor-joining ağacı (C).

NJ ağacının sonuçlarına göre DMB bölgesi iki farklı ana kola (clade) ayrılmıştır. Bu kollardan ilkinin yerli kara, *Bos taurus* (AY957499.1) ve *Bos indicus* (XM_019986211.1)

grubu oluştururken diğer grubu *Bison bison* (XM_010848578.1), *Bos mutus* (XM_014476881.1), *Bubalus bubalis* (XM_006050290.1), *Ovis aries* (XM_012112130.2) ve *Capra hircus* (XM_005696209.3) oluşturmaktadır (Şekil 4.22). Diğer bir nokta yerli kara sığırının DMB-E2 bölgesi yönünden *Bos taurus* ve *Bos indicus* ile yakın ilişki göstermesidir. Dünyada şu anda 800 üzerinde tanınan sığır ırkı vardır. En az iki ayrı evcilleştirme olayının olduğu ve bu olay sonucunda iki farklı tür olan modern *Bos indicus* ve *Bos taurus* sığırlarının olduğu ve bu 800 ırkın bunlardan köken almış olabileceği görüşü yaygındır (Loftus ve ark., 1994).



Şekil 4.22. Yerli kara ve diğer türlerdeki DMB bölgelerinin filogenetik ağacı.

4.5. BoLA-DQA ve DQB Gen Bölgelerinin Karakterizasyonu

4.5.1. BoLA-DQA1-DQA2-DQA5 gen bölgeleri ve yerli kara sığırında DQA1, DQA2 ve DQA5 genlerinin taranması

BoLA-sınıf II histokompatibilite moleküllerinin bir diğeri de, heterodimer alfa zincirini oluşturan BoLA-DQA gen lokusudur. Bu lokusdan eksprese olan genler birer paralog gendir. Antijenin işlenmesi ve peptit veya polisakkarid antijenin MHC sınıf II üzerinden sunumunda görev alırlar. Bağışıklık yanıtla ilişkilendirilmişlerdir. MHC sınıf II bölgesinin DQ genleri, fare, sıçan, domuz ve tavşanda tek-kopya genler şeklinde bulunurlar. İnsanlarda ve köpeklerde birden fazla kopyaya sahip yani multi-gen şeklinde görünürler ancak bu genlerden sadece bir DQ molekülünün eksprese olduğu görülmüştür (Kappes ve Strominger 1988; Gelhaus ve ark., 1999).

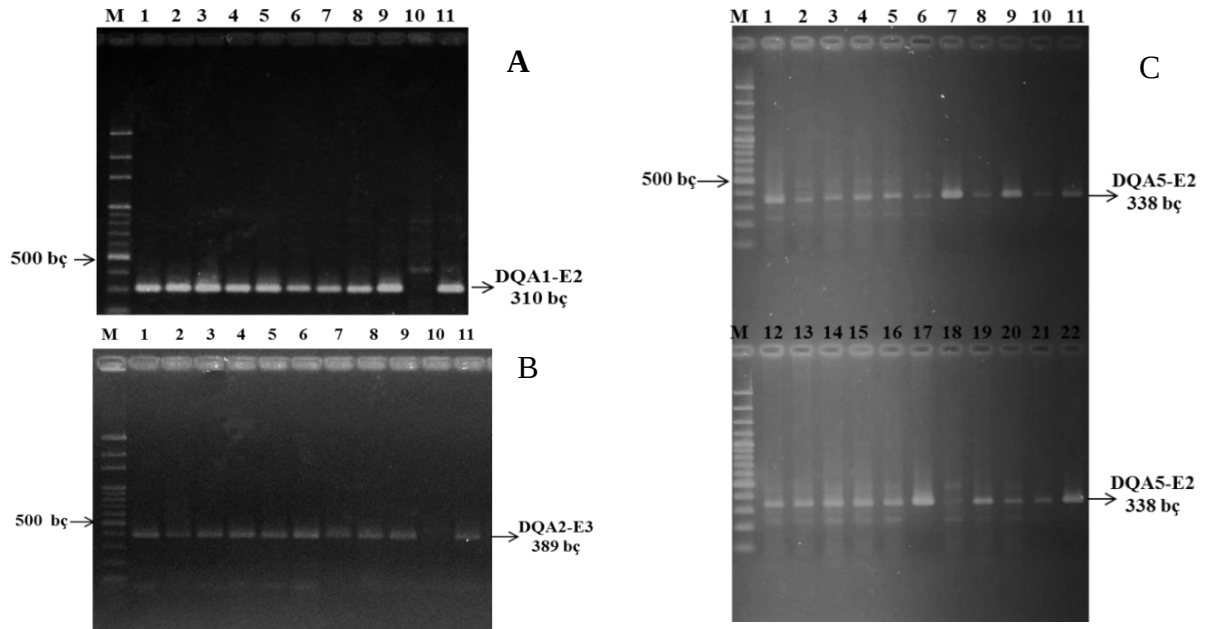
DQ lokusunun ruminantlardaki en belirgin ve özgün özelliği, bu lokusun sayısındaki değişkenliktir (Andersson ve Rask 1988; Scott ve ark., 1991). Sığırların bir çok haplotipinde duplike olmuş DQ genleri bulunur (Gelhaus ve ark., 1999). Bu genlerin her ikisinin de moleküler olarak ifade edildiğine dair kanıtlar bulunmuştur (Xu ve ark., 1994; Russell ve ark., 1997). DQ lokusu, DQA1, DQA2, DQA3, DQA4 ve DQA5 olmak üzere beş genden oluşur (Takeshima ve ark., 2007). BoLA-DQA4 ve -DQA5 genlerinin aksine, -DQA1, -DQA2 ve -DQA3 genleri polimorfiktir (Garrick ve Ruvinsky, 2014). Bu beş DQA geninin içerisindeki en polimorfik gen DQA1 genidir (Takeshima ve ark., 2008). Ayrıca bugüne kadar belirlenen toplam DQA alleli sayısı 54'dür (IPD, <http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/bola>).

İnsanlarda 6. Kromozom üzerinde yaklaşık 17443 bç (lokasyonu, 32637403..32654846 ve Ac. No. NC_000006.12) uzunluğuna sahip HLA-DQA bölgesi, 254 amino asit uzunluğunda (1-23 arası signal peptid dizisi, 24-255 olgunlaşmış polipeptid kısmını oluşturur) ve 27805 Da moleküler ağırlığa sahiptir. Sığırlardaki 23. Kromozom üzerindeki DQA genleri sırasıyla; DQA1 yaklaşık 7929 bç (Ac. No: FQ482091.6), DQA2'nin 6039 bç (Ac. No: AC_000180.1), DQA3 3525 bç (Ac. No: FQ482110.1) ve DQA5 11903 bç (Ac. No: AC_000180.1) uzunluğuna sahip linear gen bölgeleridir. Bu uzunluklara intron bölgeleri de dahildir (NCBI; <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HLA-DQA1&keywords=bola-dqa1>). Çalışmanın bu kısmında DQA1, DQA2 ve DQA5 gen bölgeleri seçilmiştir. Bunun en önemli nedeni DQA1, DQA2 ve DQA5 gen bölgelerinin hastalıklara duyarlılık ve direnç açısından diğerlerine göre daha ön plana çıkmasıdır. BoLA-DQA gen bölgelerinden 255 amino asit uzunluğunda, DQA1 için 28003.05 Da ve pI değeri

4,80 (NP_001013619.3), DQA2 için 27935.90 Da ve pI değeri 4,85 (XP_015315336.1) ve DQA5 içinde 28423.75 Da ve pI değeri 5,09 (NP_001012693.2) olan bir protein kodlanmaktadır. Bu 255 aa uzunluğundaki proteinin, 1→23 signal peptit bölgesini, 31→110 alfa domaini, 112→205 immünoglobulin domaini ve 203→254 C-terminal domainini oluşturmaktadır. Ayrıca aa 116,118..120,122,140..142,162..165,170..171,176 pozisyonları polipeptid katlanma noktalarını oluşturmaktadır (<http://www.uniprot.org>; Takeshima ve ark., 2007). Yukarıda bahsedilen DQA1, DQA2 ve DQA5 gen bölgelerinin moleküler farklılıklarını belirlemek için tüm yerli kara örneklerinde pzs ile taraması gerçekleştirilmiştir.

4.5.1.1. DQA1-DQA2-DQA5 genlerinin pzs amplifikasyon sonucu

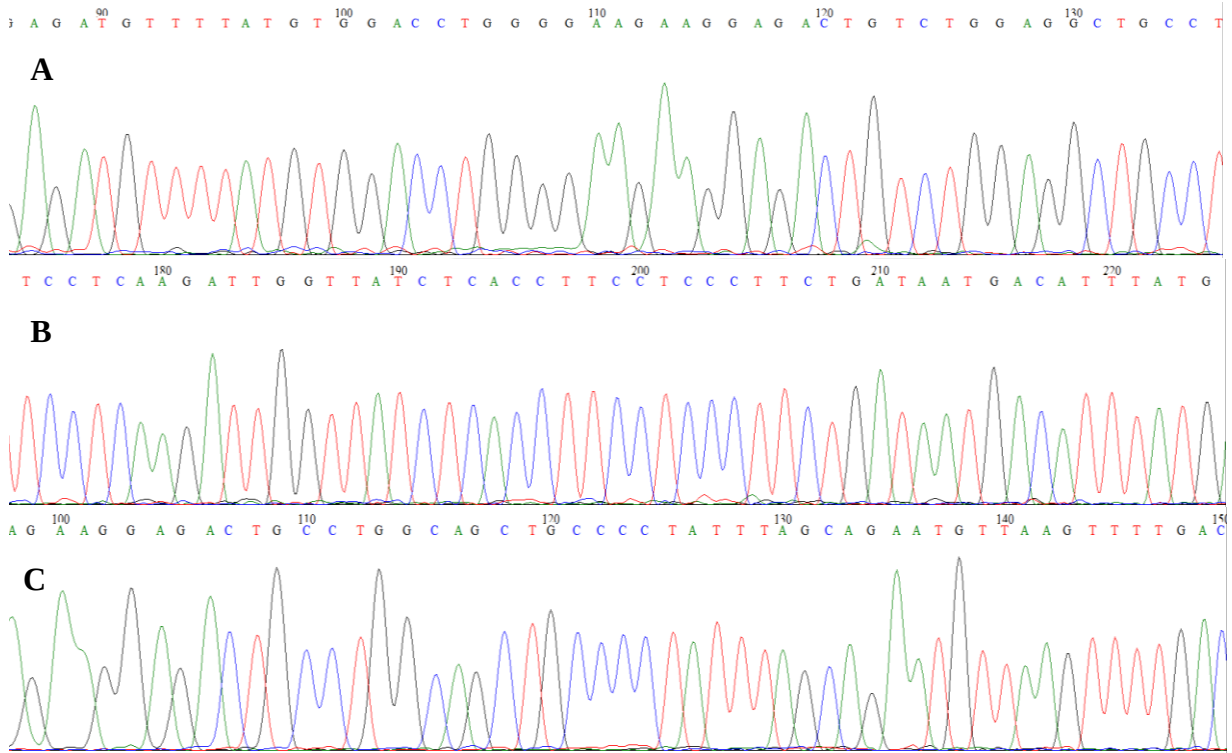
Yerli kara 67 sığır örneğindeki BoLA-DQA1 gen bölgesini oluşturan ekzon II, BoLA-DQA2 gen bölgesini oluşturan ekzon III ve BoLA-DQA5 gen bölgesini oluşturan ekzon II için 3.4.1’de bahsedilen şekilde dizayn edilen primerler (Çizelge 3.1) kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonu, 3.4.2’de detaylandırılan PZR şartları kullanılarak yapılmış ve çoğaltılan bölgeler % 1,5’lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.23). Hedef bölgeler sırasıyla, yaklaşık 310 bç (II. ekzon uzunlukları; 249 bç), 389 bç (III. ekzon uzunlukları; 279 bç) ve 338 bç (II. ekzon uzunlukları; 249 bç) uzunluğunda lineer bir bölgelerdir.



Şekil 4.23. YK1- 11. örneklerinde DQA1-E2 ve DQA2-E3 bölgelerinin PZR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü, YK1-22 nolu örneklerinde DQA5-E2 bölgesinin çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü, M: 100 bç DNA standardı.

4.5.1.2. DQA1-E2, DQA2-E3 ve DQA5-E2'nin nükleotid ve amino asit dizileri

YK-DQA1-E2 (310 bç), YK-DQA2-E3 (389 bç) ve YK-DQA5-E2 (338 bç) bölgelerinin her iki zincirinden ileri ve geri primerleri kullanılarak nükleotid dizisi belirlenmiştir. Tüm örneklerden elde edilen dizi bilgileri farklı formatlarda kaydedilmiştir. 3.6'da ayrıntılı bir şekilde bahsedildiği gibi hedef bölge için farklı olarak düşünülen örneklerin kromatogramlarına bakılarak YK1-16-DQA1-E2,-DQA2-E3 ve -DQA5-E2 şeklinde konsensüs dizileri belirlenmiştir (Şekil 4.24). Gen bölgesinin tam dizisi kullanılarak amino asit dizileri elde edilmiştir. Kümeleme işlemi ve nükleotid dizilerinin kromatogram pik yükseklikleri incelenerek elde edilen konsensüslerin nükleotid dizileri ek çizelge C.4.1, C.4.2 ve C.4.3'de ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 4.24. YK-DQA1-E2 (A), YK-DQA2-E3 (B) ve YK-DQA5-E2 (C) bölgelerinin ileri primer ile elde edilen nükleotid dizisine ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir.

Konsensüs dizileri ve referans gen bölgesi öncelikle ClustalX programı yardımı ile Fasta, Phylip, Nexus ve Clustal formatlarında kaydedilmiştir. Daha sonrasında Bioedit ve Clustal Omega programı kullanılarak hizalanmış ve farklılıkları belirlenmiştir (Şekil 4.25). Bu işlemler sırasıyla DQA1-E2, DQA2-E3 ve DQA5-E2'ye uygulanmıştır.

		10	20	30	40	50	60	70	80	
DQA1-E2-FQ482091.6	1	TTTTCACCT	TCCTGCTCCT	CACCTCACT	TATCAGCTGA	CCACATTGGC	ACCTACGGTG	CAGACTCTTA	CCAATCTCAT	80
YK1-DQA1-E2	1						.T..T..CA	...GA...		80
YK2-DQA1-E2	1						.T..T..CA	...GA...		80
YK3-DQA1-E2	1						.T..T..CA	...GA...		80
YK4-DQA1-E2	1						.T..T..CA	...GA...		80
YK5-DQA1-E2	1						.T..T..CA	...GA...		80
YK6-DQA1-E2	1						.T..T..CA	...GA...		80
YK7-DQA1-E2	1						.T..T..CA	...GA...		80
YK8-DQA1-E2	1						.T..T..CA	...GA...		80
YK9-DQA1-E2	1						.T..T..CA	...GA...		80
YK10-DQA1-E2	1						.T..T..CA	...GA...		80
YK11-DQA1-E2	1						.T..T..CA	...GA...		80
YK12-DQA1-E2	1						.T..T..CA	...GA...		80
YK13-DQA1-E2	1						.T..T..CA	...GA...		80
YK14-DQA1-E2	1						.T..T..CA	...GA...		80
YK15-DQA1-E2	1						.T..T..CA	...GA...		80
YK16-DQA1-E2	1						.T..T..CA	...GA...		80
Clustal Consensus	1									1

		90	100	110	120	130	140	150	160	
DQA1-E2-FQ482091.6	81	GGTCCCTCTG	GCCAGTACAT	CCATGAATTT	GATGGAGATG	AGTTGTTTTC	TGTGGACCTG	GGGAAGAAGG	AGACTGTCTG	160
YK1-DQA1-E2	81									160
YK2-DQA1-E2	81									160
YK3-DQA1-E2	81									160
YK4-DQA1-E2	81									160
YK5-DQA1-E2	81									160
YK6-DQA1-E2	81									160
YK7-DQA1-E2	81									160
YK8-DQA1-E2	81									160
YK9-DQA1-E2	81									160
YK10-DQA1-E2	81									160
YK11-DQA1-E2	81									160
YK12-DQA1-E2	81									160
YK13-DQA1-E2	81									160
YK14-DQA1-E2	81									160
YK15-DQA1-E2	81									160
YK16-DQA1-E2	81									160
Clustal Consensus	1									1

		170	180	190	200	210	220	230	240	
DQA1-E2-FQ482091.6	161	GCAGCTGCCT	ATGTTTGGTG	AATTAACAAG	TTTGAAGCA	CAAGATGCGC	TGAATGAAAT	AGCTAAAGCA	AAACACACCT	240
YK1-DQA1-E2	161	.AG.....	A.CC	.G..TG..G.	CC..	.G.C..A..	...G.....	...C.T...	A..	240
YK2-DQA1-E2	161	.AG.....	A.CC	.G..TG..G.	CC..	.G.C..A..	...G.....	...C.K..	A..	240
YK3-DQA1-E2	161	.AG.....	A.CC	.G..TG..G.	CC..	.G.C..A..	...G.....	...C.T...	A..	240
YK4-DQA1-E2	161	.AG.....	A.CC	.G..TG..G.	CC..	.G.C..A..	...G.....	...C.K..	A..	240
YK5-DQA1-E2	161	.AG.....	A.CC	.G..TG..G.	CC..	.G.C..A..	...G.....	...C.T...	A..	240
YK6-DQA1-E2	161	.AG.....	A.CC	.G..TG..G.	CC..	.G.C..A..	...G.....	...C.K..	...TT..A..	240
YK7-DQA1-E2	161	.AG.....	A.CC	.G..TG..G.	CC..	.G.C..A..	...G.....	...C.C..	A..	240
YK8-DQA1-E2	161	.AG.....	A.CC	.G..TG..G.	CC..	.G.C..A..	...G.....	...C.T...	A..	240
YK9-DQA1-E2	161	.AG.....	A.CC	.G..TG..G.	CC..	.G.C..A..	...G.....	...C.T...	A..	240
YK10-DQA1-E2	161	.AG.....	A.CC	.G..TG..TT	CC..	.G.C..A..	...G.....	...C.T...	A..	240
YK11-DQA1-E2	161	.AG.....	A.CC	.G..TG..G.	CC..	.G.C..A..	...G.....	...C.T...	A..	240
YK12-DQA1-E2	161	.AG.....	A.CC	.G..TG..G.	CC..	.G.C..A..	...G.....	...C.C..	A..	240
YK13-DQA1-E2	161	.AG.....	A.CC	.G..TG..G.	CC..	.G.C..A..	...G.....	...C.C..	A..	240
YK14-DQA1-E2	161	.AG.....	A.CC	.G..TG..G.	CC..	.G.C..A..	...G.....	...C.C..	A..	240
YK15-DQA1-E2	161	.AG.....	A.CC	.G..TG..G.	CC..	.G.C..A..	...G.....	...C.T...	A..	240
YK16-DQA1-E2	161	.AG.....	A.CC	.G..TG..G.	CC..	.G.C..A..	...G.....	...C.C..	A..	240
Clustal Consensus	1									1

Şekil 4.25. Referans DQA1-E2 (FQ482091.6) ve YK-DQA1-E2 bölgesinin konsensüs dizilerinin hizalanmasının bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir.

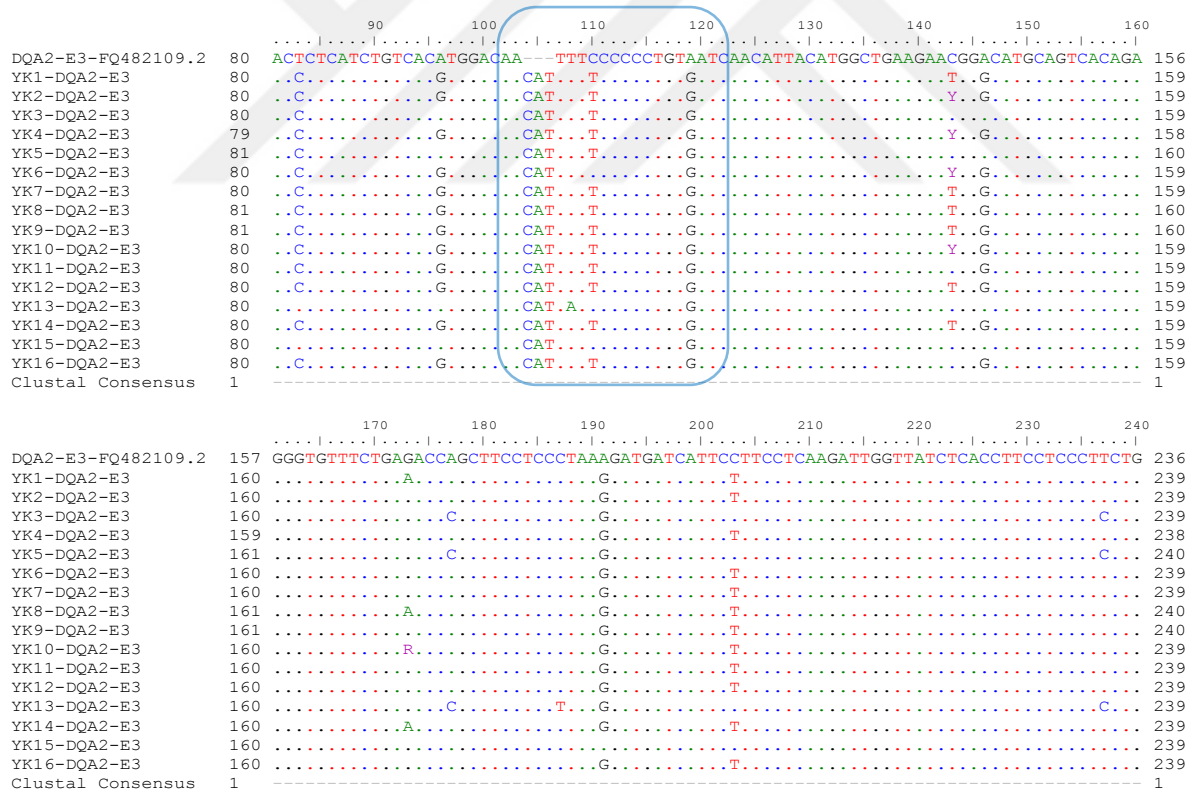
Hizalama işlemi sonunda, polimorfik bölgelerin tamamı ekzon 2 bölgesi içerisinde olduğu görülmüştür. Referans dizi ve elde edilen Konsensüs dizileri kıyaslandığında yerli karadaki DQA1-E2 bölgesinin en az 28 en fazla 37 adet nükleotid farklılık içerdiği görülmüştür. Bu polimorfik noktaların sonuçları aşağıdaki 4.5 nolu çizelgede özetlenmiştir.

Çizelge 4.7. YK-DQA1-E2 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.

Nükleotid Pozisyonları	51	52	56	59	60	65	66	100	104	119	123	149	162	163	177	179	180	182	185	186	189	190	191	197	198	203	205	209	214	226	228	234	235	238	246	284	294	Toplam Farklılık
Konsensüs	A	C	T	C	A	G	A	C	G	C	A	G	A	G	A	C	C	G	T	G	G	G	T	C	C	G	C	A	G	C	T	C	A	A	G	T	C	
DQA1-E2-FQ482091.6	.	.	C	T	G	C	T	T	T	T	T	.	C	A	G	T	G	A	A	A	A	.	.	A	G	A	A	G	A	A	G	.	.	C	.	.	.	27
YK1-DQA1-E2	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	28
YK2-DQA1-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	28	
YK3-DQA1-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	37
YK4-DQA1-E2	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	M	30	
YK5-DQA1-E2	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	M	29	
YK6-DQA1-E2	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	K	T	T	.	S	Y	.	34	
YK7-DQA1-E2	.	T	.	.	.	.	.	.	.	M	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	31	
YK8-DQA1-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	37	
YK9-DQA1-E2	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	28	
YK10-DQA1-E2	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	30	
YK11-DQA1-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	37	
YK12-DQA1-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	30	
YK13-DQA1-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	30	
YK14-DQA1-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	29	
YK15-DQA1-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	M	30	
YK16-DQA1-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	M	32	
Özet	2 T	3 T	3 C	1 T	1 G	1 C	1 T	1 T	1 T	1T	1 C, 1 T, 1 M	4 A	1 C	1 A	1 G	1 T	1 G	1 A	1 A	1 A	1A ,1 T	1 T	4 G	1 A	1 G	1 A	1A ,1 T	1 G	1 A	1 A	6G ,3 K	1 T	1 T	1 C	1 S	1 Y	4 M	500

* K: G veya T, S: G veya C, Y: T veya C, M: A veya C.

Çizelge 4.7 incelendiğinde yerli kara DQA1-E2 bölgesinde 51-294. nükleotid pozisyonları arasında toplam 500 polimorfik nokta belirlenmiştir. En fazla farklılık 37 nükleotid ile YK3,8 ve 11 nolu konsensüs dizilerinde elde edilirken, en az farklılık 28 nükleotid ile YK1,2 ve 9 nolu konsensüs dizilerinde görülmüştür. Bu sonuçlar ve referans dizi dikkate alındığında yerli karadaki bu bölgenin şimdiye kadar belirlenmiş olan DQA1-E2 bölgelerinden farklı olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuç bölüm 4.6.3’de ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Bioedit ile yapılan hizalama işleminde DQA2-E3 bölgesinin polimorfik bölgeleri belirlenmiştir. Diğer bölgelerden farklı olarak DQA2-E3 bölgesinde 103-105. pozisyonunda üç nükleotidden oluşan bir insersiyon gözlemlenmiştir (Şekil 4.26). Bu tüm yerli kara sığır örneklerinden oluşturulan konsensüs dizilerin tamamında görülmesi, bu bölgenin yerli karalara özgü bir değişim olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Referans dizi ve elde edilen konsensüs dizileri kıyaslandığında yerli karadaki DQA2-E3 bölgesinin en az 23 (YK5-DQA2-E3) en fazla 37 (YK12-DQA2-E3) adet nükleotid farklılık içerdiği görülmüştür. Bu polimorfik noktaların sonuçları aşağıdaki 4.6 nolu çizelgede özetlenmiştir.



Şekil 4.26. Referans DQA2-E3 (FQ482109.2) ve YK-DQA2-E3 bölgesinin konsensüs dizilerinin hizalanmasının bir kısmı. Mavi kutu ile belirtilen bölge yerli karalara özgün bölgeyi göstermektedir.

Çizelge 4.8. YK-DQA2-E3 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.

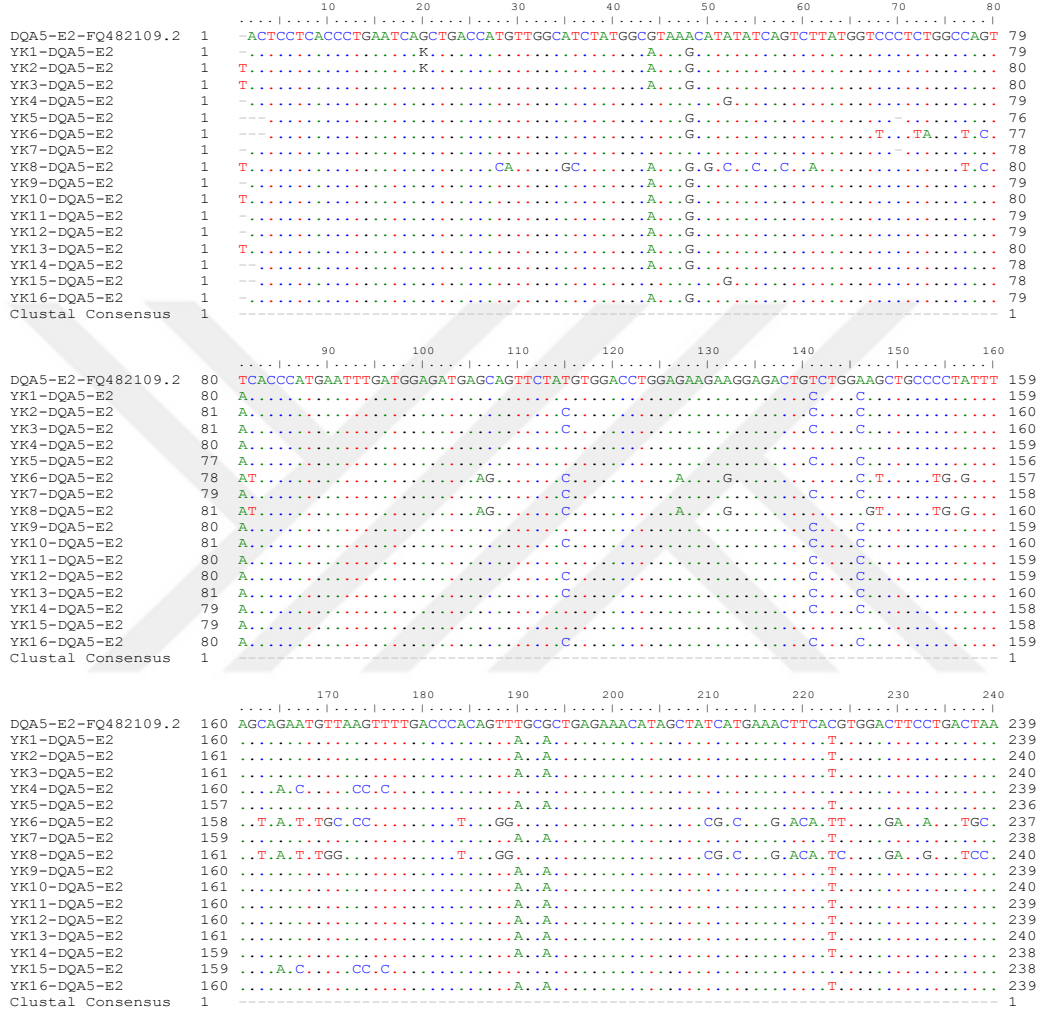
Nükleotid Pozisyonları	26	32	35	60	63	65	68	69	71	80	83	96	104	105	106	108	110	119	143	146	173	177
Konsensüs	G	A	G	G	A	G	G	G	T	C	C	G	C	A	T	T	T	G	C	G	G	A
DQA2-E3-FQ482109.2	A	T	A	A	G	.	.	.	C	T	T	A	-	-	-	.	C	A	.	A	.	.
YK1-DQA2-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.
YK2-DQA2-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.
YK3-DQA2-E3	A	T	A	A	G	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	A	.	C
YK4-DQA2-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.
YK5-DQA2-E3	A	T	A	A	G	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	A	.	C
YK6-DQA2-E3	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	Y	.	.	.
YK7-DQA2-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.
YK8-DQA2-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.
YK9-DQA2-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.
YK10-DQA2-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	R	.
YK11-DQA2-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK12-DQA2-E3	A	T	A	A	.	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.
YK13-DQA2-E3	A	T	A	A	G	.	.	.	C	T	T	A	.	.	.	A	C	.	.	A	.	C
YK14-DQA2-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.
YK15-DQA2-E3	A	T	A	A	G	.	.	.	C	T	T	A	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.
YK16-DQA2-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Özet	6A	6T	6A	6A	5G	1C	1S*	1A	3C	3T	3T	5A	1-	1-	1-	1A	4C	1A	6T,4Y	5A	3A,1R	3C

Çizelge 4.8. Devamı.

Nükleotid Pozisyonları	187	191	203	237	243	249	260	276	278	286	293	296	304	308	315	330	352	354	355	395	Toplam Farklılık
Konsensüs	C	G	T	T	A	A	C	G	T	A	T	G	G	T	R	A	C	A	T	A	
DQA2-E3-FQ482109.2	.	A	C	.	G	G	T	A	C	.	G	C	.	.	G	T	A	G	C		29
YK1-DQA2-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	C	33
YK2-DQA2-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	A	G	C		34
YK3-DQA2-E3	.	.	C	C	G	G	T	.	C	.	G	C	A	C	G	T	A	G	A		23
YK4-DQA2-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		30
YK5-DQA2-E3	.	.	C	C	G	G	T	.	C	.	G	C	A	C	G	T	A	G	A		23
YK6-DQA2-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	.	.	.	34
YK7-DQA2-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.		31
YK8-DQA2-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	T	.	.	.	.	33
YK9-DQA2-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.		31
YK10-DQA2-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		31
YK11-DQA2-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.		30
YK12-DQA2-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.		37
YK13-DQA2-E3	T	.	C	C	G	G	T	.	C	.	G	C	A	.	G	T	A	G	A		28
YK14-DQA2-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	A	.	A	G	C		36
YK15-DQA2-E3	.	A	C	.	G	G	T	A	C	.	G	C	.	.	G	T	A	G	C		25
YK16-DQA2-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	30
Özet	1T	2A	5C	3C	5G	5G	5T	2A	5C	1R	6G	5C	3A	2C	7A,7G	6T	8A	7G	3A,4C	1C	489

*S: G veya C , Y: T veya C ,R: G veya A.

Çizelge 4.8 incelendiğinde yerli kara DQA2-E3 bölgesinde 26-395. nükleotid pozisyonları arasında toplam 489 polimorfik nokta belirlenmiştir (Şekil 4.27). Bu sonuçlar ve referans dizi dikkate alındığında yerli karadaki bu bölgenin şimdiye kadar belirlenmiş olan DQA2-E3 bölgelerinden farklı olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuç 4.6.3’de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.27. Referans DQA5-E2 (FQ482109.2) ve YK-DQA5-E2 bölgesinin konsensüs dizilerinin hizalanmasının bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir.

Hizalama işlemi sonunda intron bölgelerinin de içerisinde bulunduğu konsensüs dizilerinde en fazla farklılık YK8-DQA5-E2 nolu konsensüs dizisinde (64 nükleotid), en az farklılık ise YK12 ve YK13-DQA5-E2 nolu konsensüs dizilerinde (11 nükleotid) gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar aşağıdaki 4.9 nolu çizelgede özetlenmiştir. Çizelge 4.9 incelendiğinde YK-DQA5-E2 bölgesinde genetik polimorfizmi ve alelik varyasyona sahip toplam 308 polimorfik nükleotid farklılığın bulunduğu görülmüştür.

Çizelge 4.9. YK-DQA5-E2 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.

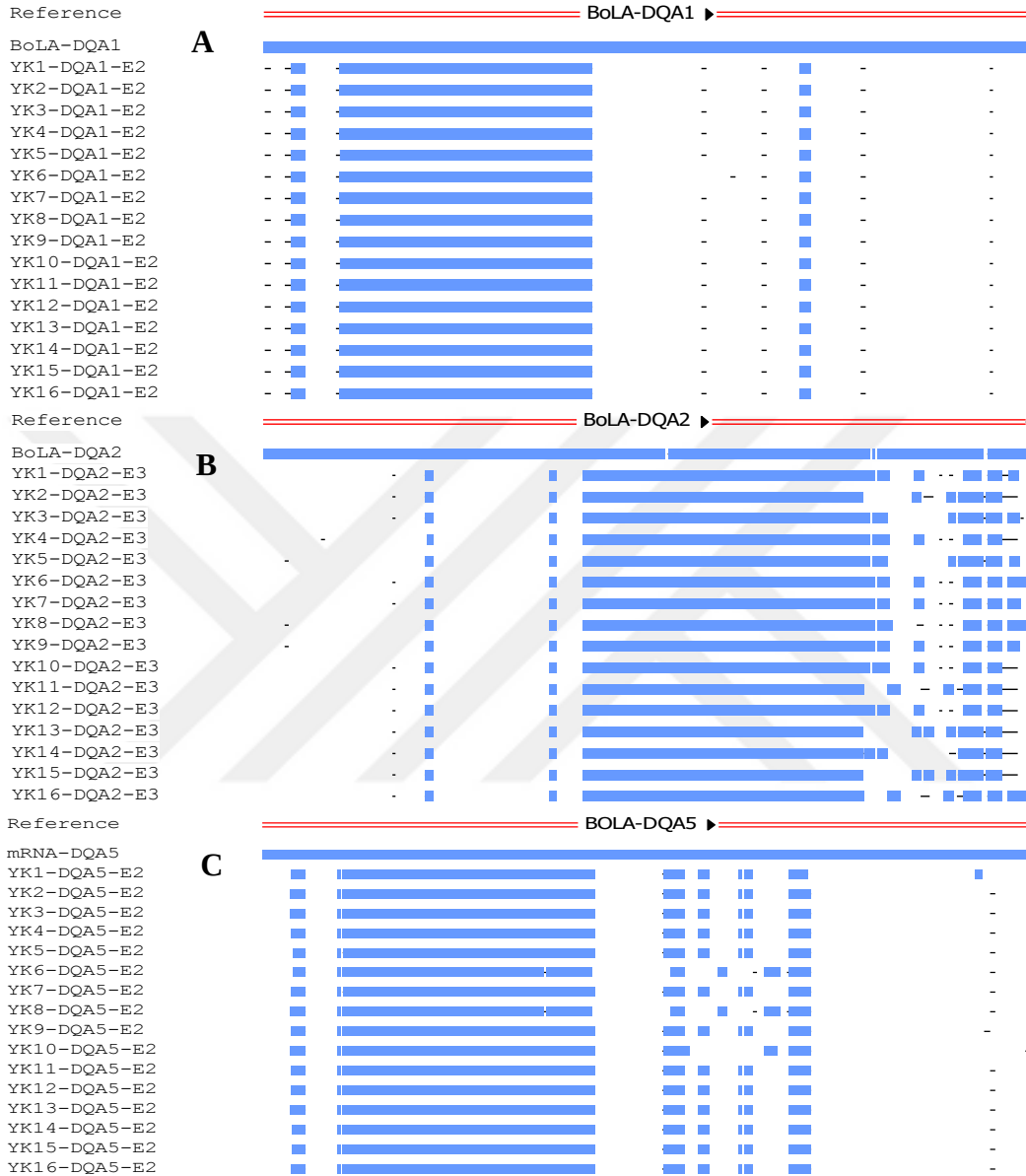
Nükleotid Pozisyonları	20	28	29	35	36	44	48	50	52	55	58	61	68	70	72	73	77	79	81	82	106	107	115	127	132	141	146	147	148	154	155	157	163	165	167	169	170	171	173	174	176	184	
Konsensüs	G	T	G	A	T	A	G	A	A	T	G	T	C	C	C	T	C	G	A	C	G	C	C	G	A	C	C	A	G	C	C	A	C	G	A	G	T	T	A	G	T	A	
DQA5-E2-FQ482109.2	.	.	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	T	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK1-DQA5-E2	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
YK2-DQA5-E2	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
YK3-DQA5-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
YK4-DQA5-E2	.	.	.	.	.	G	A	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	C	C	C	.
YK5-DQA5-E2	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK6-DQA5-E2	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	T	.	T	A	T	C	.	T	A	G	.	A	G	T	.	.	T	T	G	G	T	A	T	T	G	C	C	C	.	T	
YK7-DQA5-E2	.	.	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK8-DQA5-E2	.	C	A	G	C	.	.	G	C	C	C	A	.	.	.	.	T	C	.	T	A	G	.	A	G	T	A	G	T	T	G	G	T	A	T	T	G	G	.	.	.	T	
YK9-DQA5-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK10-DQA5-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK11-DQA5-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK12-DQA5-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK13-DQA5-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK14-DQA5-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK15-DQA5-E2	.	.	.	.	.	G	A	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	C	C	C	.
YK16-DQA5-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Özet	2 K	1 C	1 A	1 G	1 C	6 G	4 A	1 G	1 C	1 C	1 A	1 T	2 -	1 T	1 A	2 T	2 C	1 T	2 T	2 A	2 G	2 G	8 T	2 A	2 G	5 T	4 A	1 G	2 T	2 T	2 G	2 G	2 T	4 A	2 T	2 G	1 C , 1 G	3 C	3 C	2 C	2 T		

Çizelge 4.9. Devamı.

Nükleotid Pozisyonları	188	189	190	193	210	211	213	217	219	220	221	223	224	229	230	233	237	238	239	242	243	244	268	273	278	280	283	284	291	292	298	300	301	302	308	309	313	317	320	321	322	340	Toplam Farklılık			
Konsensüs	T	T	A	A	T	C	T	A	T	T	C	T	G	C	T	C	C	T	A	T	T	C	T	C	T	A	A	T	C	C	G	T	G	A	C	A	T	T	G	A	C	A				
DQA5-E2- FQ482109.2	.	.	T	G	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	T		11		
YK1- DQA5-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		13		
YK2- DQA5-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	.		13		
YK3- DQA5-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.		12		
YK4- DQA5-E2	.	.	T	G	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.		15		
YK5- DQA5-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.		15		
YK6- DQA5-E2	G	G	T	G	C	G	C	G	A	C	A	.	T	G	A	A	T	G	C	A	G	G	C	T	C	-	.	C	T	.	A	.	A	.	.	-	C	C	.	G	.	.		58		
YK7- DQA5-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		14	
YK8- DQA5-E2	G	G	T	G	C	G	C	G	A	C	A	.	C	G	A	G	T	C	C	A	G	G	C	T	C	-	R	C	T	.	A	.	A	.	.	-	C	C	.	G	.	.		64		
YK9- DQA5-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	.		13	
YK10- DQA5-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	T		17	
YK11- DQA5-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		12	
YK12- DQA5-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		11	
YK13- DQA5-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		11	
YK14- DQA5-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		12	
YK15- DQA5-E2	.	.	T	G	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	.		16	
YK16- DQA5-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	.		12
Özet	2 G	2 G	5 T	5 G	2 C	2 G	2 C	2 G	2 A	2 C	2 A	3 C	1 C , 1 T	2 G	2 A	1 A , 1 G	2 T	1 C , 1 G	2 C	2 A	2 G	2 G	2 C	2 T	2 C	2 -	1 R	2 C	2 T	1 -	2 A	1 -	2 A	1 -	1 -	2 -	2 C	2 C	3 K	8 G	1 A	2 T		308		

*K: G veya T ,R: G veya A.

DQA1-E2, DQA2-E3 ve DQA5-E2 konsensüs dizilerindeki farklılıkların protein yapısında ne gibi değişiklikler yaptığını belirlemek için clone manager programı kullanılarak amino asit dizileri belirlenmiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Nükleotid konsensüs dizilerinden mRNA bölgesinin elde edilmesi ve aa dizilerinin belirlenmesi (Referans: mRNA-DQA1, Ac. No. NM_001013601.3 (A), mRNA- DQA2, Ac. No. XM_015468906.1 (B), mRNA- DQA5, Ac. No. NM_001012675.2 (C), YK1-16 konsensüs dizileri, mavi bölgeler ortak noktaları göstermektedir).

DQA1-E2, DQA2-E3 ve DQA5-E2 nükleotid konsensüs dizileri kullanılarak elde edilen DQA1, DQA2 ve DQA5-mRNA (768, 765 ve 768 bç uzunluğunda) dizilerinden yola çıkılarak, DQA1 için 12 adet farklı haplotip, DQA2 için 13 adet farklı haplotip ve DQA5 için ise 7 adet farklı haplotip belirlenmiştir (Çizelge 4.10.1, 4.10.2 ve 4.10.3).

Çizelge 4.10.1. DQA1 bölgesinden transkripte olan mRNA nükleotid dizisi

Nükleotid Pozisyonları	97	98	102	105	106	111	112	146	150	165	169	195	208	209	223	225	226	228	231	232	235	236	237	243	244	249	251	255	260	272	274	280	281	284	292	330	Toplam Farklılık
Konsensüs	A	C	T	C	A	G	A	C	G	C	A	G	A	G	A	C	C	G	T	G	G	G	T	C	C	G	C	A	G	C	T	C	A	A	G	T	
DQA1-mRNA-NM_001013601.3	.	.	C	T	G	C	T	T	T	T	T	.	C	A	G	T	G	A	A	A	A	.	.	A	G	A	A	G	A	A	G	.	.	C	.	.	27
YK1-DQA1-mRNA	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	28
YK2-DQA1-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	28
YK3-DQA1-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	27
YK4-DQA1-mRNA	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	27
YK5-DQA1-mRNA	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	28
YK6-DQA1-mRNA	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	K	T	T	.	S	Y	34
YK7-DQA1-mRNA	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	M	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	31
YK8-DQA1-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	27
YK9-DQA1-mRNA	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	27
YK10-DQA1-mRNA	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	30
YK11-DQA1-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	27
YK12-DQA1-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	30
YK13-DQA1-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	30
YK14-DQA1-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	29
YK15-DQA1-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	27
YK16-DQA1-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	31
Özet	2 T	3 T	3 C	1 T	1 G	1 C	1 T	1 T	1 T	1 T	1 C, 1 T, 1 M	4 A	1 C	1 A	1 G	1 T	1 G	1 A	1 A	1 A	1 A, 1 T	1 T	4 G	1 A	1 G	1 A	1 A, 1 T	1 G	1 A	1 A	6 G, 3 K	1 T	1 T	1 C	1 S	1 Y	461

* K: G veya T, S: G veya C, Y: T veya C, M: A veya C

Çizelge 4.10.2. DQA2 bölgesinden transkripte olan mRNA nükleotid dizisi

Nükleotid Pozisyonları	329	330	333	339	342	367	370	372	375	376	378	387	390	403	411	412	413	415	417	426	450	453	480	484	494	498	510	544	550	556	567	583	585	593	600	603	Toplam Farklılık
Konsensüs	A	T	G	A	G	G	A	G	G	G	T	C	C	G	C	A	T	T	T	G	C	G	G	A	C	G	T	T	A	A	C	G	T	A	T	G	
DQA2-mRNA-XM_015468906.1	.	.	A	T	A	A	G	.	.	.	C	T	T	A	-	-	-	.	C	A	.	A	.	.	.	A	C	.	G	G	T	A	C	.	G	C	24
YK1-DQA2-mRNA	T	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	28
YK2-DQA2-mRNA	T	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	28	
YK3-DQA2-mRNA	.	.	A	T	A	A	G	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.	.	C	C	G	G	T	.	C	.	G	C	27
YK4-DQA2-mRNA	T	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	27
YK5-DQA2-mRNA	.	.	A	T	A	A	G	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.	.	C	C	G	G	T	.	C	.	G	C	27
YK6-DQA2-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	27
YK7-DQA2-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	25
YK8-DQA2-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	26
YK9-DQA2-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	25
YK10-DQA2-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	26
YK11-DQA2-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	24
YK13-DQA2-mRNA	.	.	A	T	A	A	G	.	.	.	C	T	T	A	.	.	.	A	C	.	.	A	.	C	T	.	C	C	G	G	T	.	C	.	G	C	29
YK12-DQA2-mRNA	.	.	A	T	A	A	.	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	27
YK14-DQA2-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	26
YK15-DQA2-mRNA	.	.	A	T	A	A	G	.	.	.	C	T	T	A	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	.	A	C	.	G	G	T	A	C	.	G	C	25
YK16-DQA2-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	24
Özet	3 T	3 A	6 A	6 T	6 A	6 A	5 G	1 C	1 S	1 A	3 C	3 T	3 T	5 A	1 -	1 -	1 -	1 A	4 C	1 A	6T, 4Y	5 A	3A ,1R	3 C	1 T	2 A	5 C	3 C	5 G	5 G	5 T	2 A	5 C	1 R	6 G	5 C	421

*S: G veya C , Y: T veya C ,R: G veya A.

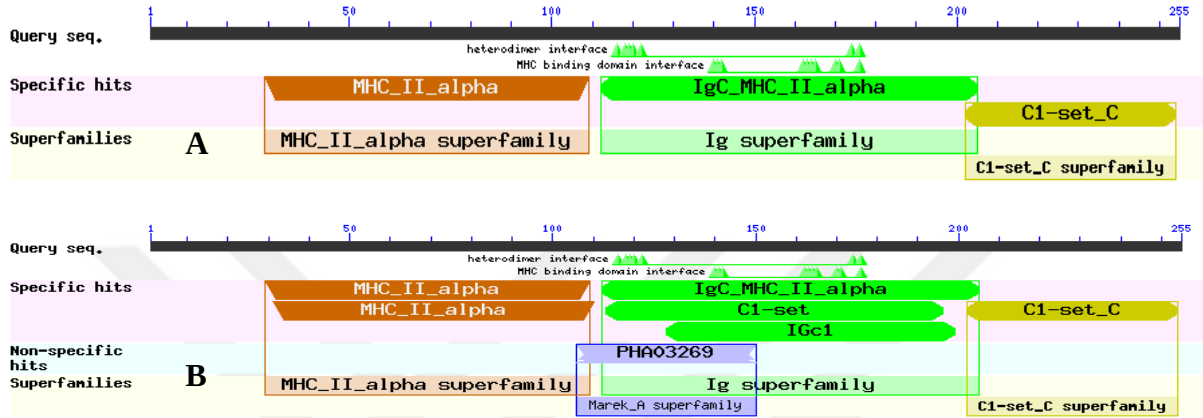
Çizelge 4.10.3. DQA5 bölgesinden transkripte olan mRNA nükleotid dizisi

Nükleotid Pozisyonları	90	91	97	98	106	110	112	114	117	120	123	130	134	135	139	141	143	144	168	169	177	189	194	203	208	209	210	216	217	219	225	227
Konsensüs	T	G	A	T	A	G	A	A	T	G	T	C	C	T	C	G	A	C	G	C	C	G	A	C	C	A	G	C	C	A	C	G
DQA5-mRNA-NM_001012675.2	.	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	T	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.
YK1-DQA5-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK2-DQA5-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK3-DQA5-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK4-DQA5-mRNA	.	.	.	.	G	A	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	A
YK5-DQA5-mRNA	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK6-DQA5-mRNA	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	T	T	A	T	C	.	T	A	G	.	A	G	T	.	.	T	T	G	G	T	A
YK7-DQA5-mRNA	.	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK8-DQA5-mRNA	C	A	G	C	.	.	G	C	C	C	A	.	.	.	T	C	.	T	A	G	.	A	G	T	A	G	T	T	G	G	T	A
YK9-DQA5-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK10-DQA5-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK11-DQA5-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK12-DQA5-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK13-DQA5-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK14-DQA5-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK15-DQA5-mRNA	.	.	.	.	G	A	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	A
YK16-DQA5-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Özet	1 C	1 A	1 G	1 C	6 G	4 A	1 G	1C,2 G	1 C	1 C	1 A	1 T	1 T	1 A	2 T	2 C	1 T	2 T	2 A	2 G	8 T	2 A	2 G	5 T	4 A	1 G	2 T	2 T	2 G	2 G	2 T	4 A

Çizelge 4.10.3. Devamı.

Nükleotid Pozisyonları	229	231	232	233	235	236	238	246	250	251	252	255	272	273	275	279	281	282	283	285	286	291	292	295	299	300	301	304	305	306	Toplam Farklılık
Konsensüs	A	G	T	T	A	G	T	A	T	T	A	A	T	C	T	A	T	T	C	T	G	C	T	C	C	T	A	T	T	C	
DQA5-mRNA- NM_001012675.2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	G	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	9
YK1-DQA5-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10
YK2-DQA5-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	9
YK3-DQA5-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	9
YK4-DQA5-mRNA	C	.	.	.	C	C	C	.	.	.	T	G	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	14
YK5-DQA5-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	11
YK6-DQA5-mRNA	T	T	G	C	C	C	.	T	G	G	T	G	C	G	C	G	A	C	A	.	T	G	A	A	T	G	C	A	G	G	46
YK7-DQA5-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	11
YK8-DQA5-mRNA	T	T	G	G	.	.	.	T	G	G	T	G	C	G	C	G	A	C	A	.	C	G	A	G	T	C	C	A	G	G	51
YK9-DQA5-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10
YK10-DQA5-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	9
YK11-DQA5-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10
YK12-DQA5-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	9
YK13-DQA5-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	9
YK14-DQA5-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10
YK15-DQA5-mRNA	C	.	.	.	C	C	C	.	.	.	T	G	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	14
YK16-DQA5-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	9
Özet	2C, 2T	2 T	2 G	1C, 1G	3 C	3 C	2 C	2 T	2 G	2 G	5 T	5 G	2 C	2 G	2 C	2 G	2 A	2 C	2 A	3 C	1C, 1T	2 G	2 A	1A, 1G	2 T	1C, 1G	2 C	2 A	2 G	2 G	241

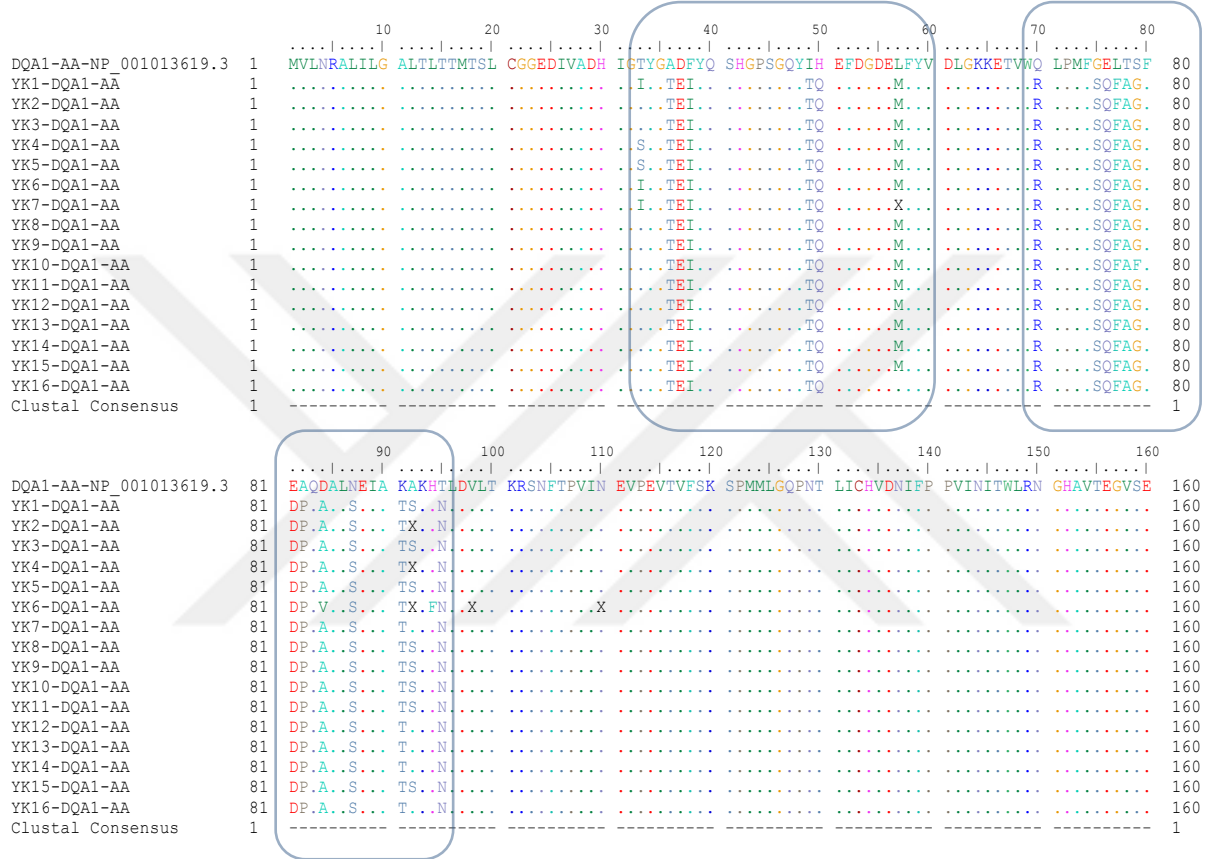
Elde edilen amino asit dizileri (255 aa uzunlukta) NCBI’da Blast yapılarak hedef bölge olduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.29). İlk 23 amino asit (1→23) signal peptit bölgesini, 31→110 alfa domainini, 112→205 immünoglobulin domainini ve 203→254 C-terminal domainini oluşturmaktadır. Ayrıca aa 116, 118..120, 122, 140..142, 162..165, 170..171, 176 pozisyonları polipeptid katlanma noktalarını oluşturmaktadır (<http://www.uniprot.org>; Takeshima ve ark., 2007; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd>).



Şekil 4.29. YK1-DQA1, DQA2 (A) ve DQA5-PR’nin (B) sahip olduğu, alfa, immunoglobülin ve C-terminal domainleri.

Belirlenen YK-DQA1 haplotiplerinin oluşturduğu proteinlerin NCBI Blast sonuçlarına göre; *Bos grunniens*’den eksprese olan MHC sınıf II DQA1 alfa zincirine (Ac. No: AFM37579.1) benzerlik oranı YK6 %92, YK2, 7, 10, 12, 13, 14 ve 16 %93 ve YK1, 3,4, 5, 8, 9, 11 ve 15 %94 olarak bulunmuştur. *Bos taurus*’dan eksprese olan MHC sınıf II DQA1 alfa zincirinin (Ac. No: NP_001013619.3), moleküler ağırlığı 28003,05 Da ve pI değeri 4,80’dir. YK1-16 DQA1 proteini için moleküler ağırlık 27968,02-27996,08 Da arasında hesaplanırken pI değerleri 4,85 olarak belirlenmiştir. Yerli kara sığır ırkının DQA1 geni yönünde amino asit pozisyonları dikkate alındığında, oluşturulan tüm konsensüs dizilerinde 36., 37. ve 38. pozisyonundaki alanin, aspartik asit ve fenilalanin (A,D,F) üçlü amino asit dizisi yerine treonin, glutamik asit ve izolösin’den (T,E,I) oluşan bir üçlü amino asit dizisi belirlenmiştir. Bununla birlikte 49. ve 50. pozisyonlardaki izolösin ve histidin (I,H)→treonin ve glutamin (T,Q) dönüşmüştür. Referans dizideki 57. aa pozisyonundaki lösin (L) YK1-15’de metiyonin’e (M) dönüşürken, sadece YK16 konsensüs dizisinde lösin (L) olarak kalmıştır. Yine referans dizisinin 70. pozisyonunda glutamin (Q)→arjinin’e (R) dönüşmüştür. Diğer dikkat çeken bir nokta olarak referans verideki 5’lik amino asit değişim blokları gözlenmiştir. Referans diziye göre 75.-79. pozisyonlardaki amino asit dizisini oluşturan glisin, glutamik asit, lösin, treonin ve serin (GELTS) beşlisi, yerli kara sığır ırkında serin, glutamin,

fenilalanin, alanin ve glisin (SQFAG) beşlisine dönüşmüştür. Ayrıca 81. ve 82. pozisyonadaki glutamik asit ve alanin bloğu (E,A), aspartik asit ve prolin'e (D,P) dönüşürken, 87. pozisyonunda asparajin (N)→serin'e (S), 91. pozisyonadaki lizin (K)→treonin'e (T) ve 95. pozisyonadaki treonin (T)→asparajin'e (N) dönüşmüştür. Bununla birlikte bazı konsensüs dizilerde YK1,3,5,8,9,10,11 ve 15'de 92. pozisyonunda alanin (A)→serin'e (S) dönüşmüştür (Şekil 4.30)



Şekil 4.30. BoLA-DQA1 alleli tarafından kodlanan alfa bölgelerinin tahmini amino asit dizilerinin hizalanması.

Belirlenen YK-DQA2 haplotiplerinin oluşturduğu proteinlerin NCBI Blast sonuçlarına göre; *Bos taurus*'dan eksprese olan MHC sınıf II DQA2 alfa zincirine (Ac. No: BAA08765.1) benzerlik oranı YK3, 5 ve 13 için %95, YK15 için %96, YK2, 4, 6, 10 ve 12 için %97 ve YK1,7, 8, 9, 11, 14 ve 16 için ise %98 olarak bulunmuştur. *Bos taurus*'dan eksprese olan MHC sınıf II DQA2 alfa zincirinin (Ac. No: XP_015315336.1), moleküler ağırlığı 27935, 90 Da ve pI değeri 4,85'dir. YK1-16 DQA2 proteini için moleküler ağırlık 27978,51-28098,18 Da arasında hesaplanırken pI değerleri 4,92-4,99 olarak belirlenmiştir. Amino asit pozisyonlarına bakıldığında; YK1,2 ve 4 için 110. pozisyonadaki asparajin (N) →izolösin'e (I) dönüşürken, YK1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14 ve 16 için 123. pozisyonadaki metiyonin (M) →

valin'e (V), 124. pozisyonundaki valin (V) → metiyonin'e (M) ve 135. pozisyonundaki metiyonin (M) → valin'e (V) değişimi gözlemlenmiştir. Dikkat çekici noktalardan birisi de yerli kara sığırlarındaki DQA2 gen bölgesi yönünden 138. amino asit pozisyonunda izolosin (I) amino asidinin eklenmiş olmasıdır. Ayrıca YK3, 5 ve 13'de 162. pozisyonunda serin (S) → arjinin'e (R) ve 182. pozisyonundaki serin (S) → prolin'e (P) dönüştüğü görülmüştür. YK3, 5, 13 ve 15 konsensüs örnekleri dışındaki tüm YK konsensüslerinde 184. (aspartik asit→asparajin'e) ve 186. (valin→izolösine) pozisyonlarında farklılıklar belirlenmiştir. Son olarak YK15 dışındaki tüm örneklerde 195. pozisyonunda serin (S)→glisin'e (G) dönüşümü görülmüştür (Şekil 4.31).

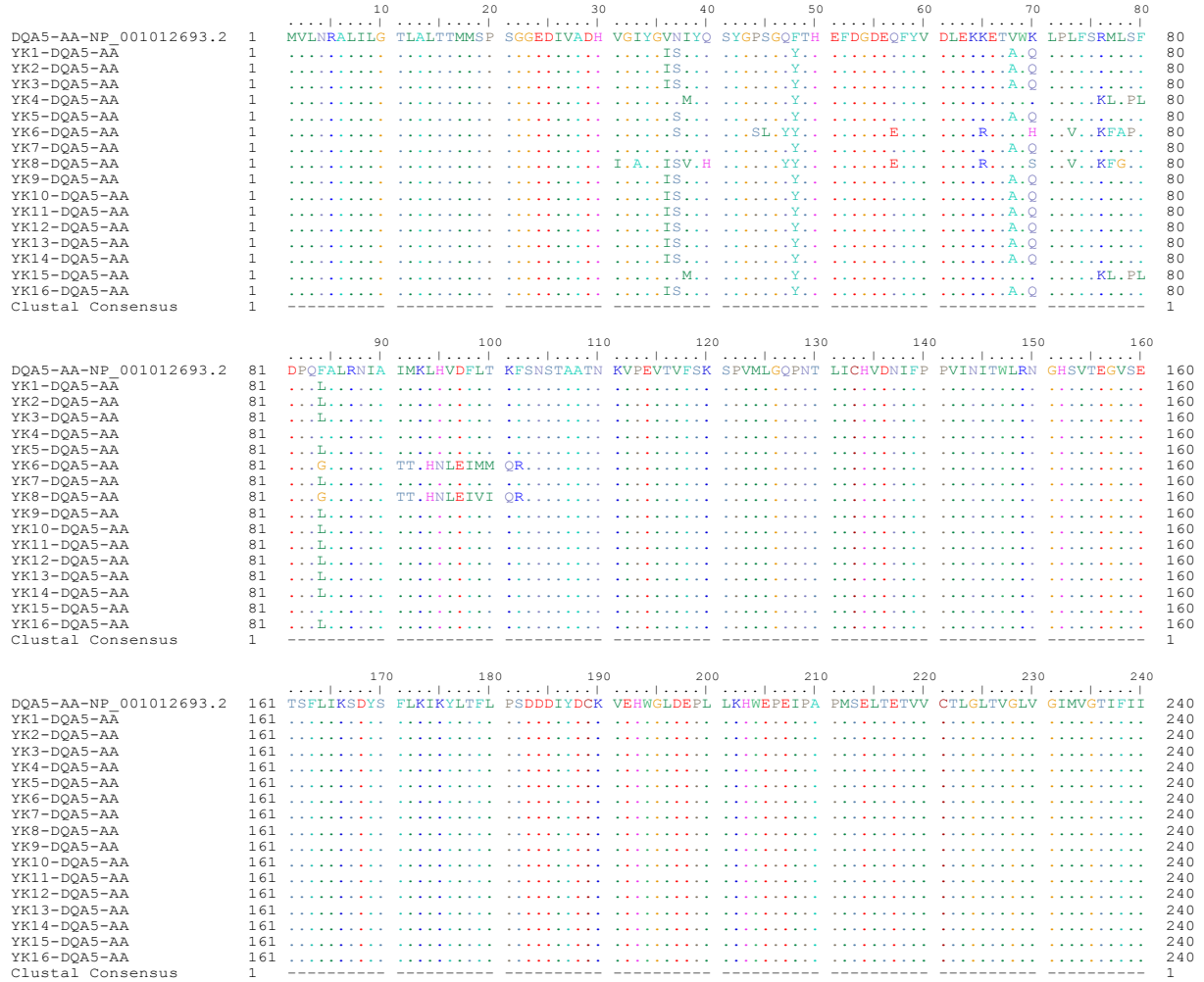
		90	100	110	120	130	140	150	160	
DQA2-AA-XP_015315336.1	81	DPQAALSEIA	TAKHNLDVLT	KRSNFTPVIN	EVPEVTVFSK	SPMVLGQPNT	LICHMDN-FP	PVINITWLKN	GHAFTGVSE	159
YK1-DQA2-AA	81			I		..VM.....	V.I..			160
YK2-DQA2-AA	81			I		..VM.....	V.I..	X		160
YK3-DQA2-AA	81						V.I..			160
YK4-DQA2-AA	81			I		..VM.....	V.I..	X		160
YK5-DQA2-AA	81						I..			160
YK6-DQA2-AA	81					..VMX.....	V.I..	X		160
YK7-DQA2-AA	81					..VM.....	V.I..			160
YK8-DQA2-AA	81					..VM.....	V.I..			160
YK9-DQA2-AA	81					..VM.....	V.I..			160
YK10-DQA2-AA	81					..VM.....	V.I..	X	X	160
YK11-DQA2-AA	81					..VM.....	V.I..			160
YK12-DQA2-AA	81					..I.S.....	V.I..			160
YK13-DQA2-AA	81						II..			160
YK14-DQA2-AA	81					..VM.....	V.I..			160
YK15-DQA2-AA	81						I..			160
YK16-DQA2-AA	81					..VM.....	V.I..			160
Clustal Consensus	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1

		170	180	190	200	210	220	230	240	
DQA2-AA-XP_015315336.1	160	TSFLPKDDHS	FLKIGYLTFL	PSDDVDYDCK	VEHWSLDEPL	LKHWEPEVPA	PMSELTETVV	CALRLTVGLV	GIVVGTIFII	239
YK1-DQA2-AA	161			..N.I..	G					240
YK2-DQA2-AA	161			..N.I..	G	X				240
YK3-DQA2-AA	161	..R.....		..P.....	G					240
YK4-DQA2-AA	161			..N.I..	G					240
YK5-DQA2-AA	161	..R.....		..P.....	G					240
YK6-DQA2-AA	161			..N.I..	G					240
YK7-DQA2-AA	161			..N.I..	G					240
YK8-DQA2-AA	161			..N.I..	G					240
YK9-DQA2-AA	161			..N.I..	G					240
YK10-DQA2-AA	161			..N.I..	G					240
YK11-DQA2-AA	161			..N.I..	G					240
YK12-DQA2-AA	161			..N.I..	G					240
YK13-DQA2-AA	161	..R..L.....		..P.....	G					240
YK14-DQA2-AA	161			..N.I..	G					240
YK15-DQA2-AA	161									240
YK16-DQA2-AA	161			..N.I..	G					240
Clustal Consensus	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1

Şekil 4.31. BoLA-DQA2 alleli tarafından kodlanan alfa bölgelerinin tahmini amino asit dizilerinin hizalanması.

Belirlenen YK-DQA5 haploitlerinin oluşturduğu proteinlerin NCBI Blast sonuçlarına göre; *Bos taurus*'dan eksprese olan MHC sınıf II DQA2 alfa zincirine (Ac. No: AAD02920.1) benzerlik oranı YK6 ve 8 için %89, YK4 ve 14 için %95, diğer örnekler için ise %98 olarak bulunmuştur. *Bos taurus*'dan eksprese olan MHC sınıf II DQA5 alfa zincirinin (Ac. No: NP_001012693.2), moleküler ağırlığı 28423,75 Da ve pI değeri 5,09'dir. YK1-16 DQA5 proteini için moleküler ağırlık 28204,17-28387,76Da arasında hesaplanırken pI değerleri 4,99-5,09 olarak belirlenmiştir. Amino asit pozisyonlarına bakıldığında; YK1, 2, 3, 9, 10, 11,

12, 13, 14 ve 16 konsensüs dizilerindeki 36. ve 37. pozisyonlarındaki valin ve asparajin (V,N)→izolösün ve serin'e (I,S), 68. pozisyonlarındaki valin (V)→alanin (A) ve 84. pozisyonlarındaki fenilalanin (F)→lösün'e (L) dönüştüğü belirlenmiştir. Tüm yerli kara konsensüs dizilerinde 48. apolar bir amino asit olan pozisyonadaki fenilalanin (F)'in polar bir amino asit olan tirozin'e (Y) dönüştüğü görülmüştür (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. BoLA-DQA5 alleli tarafından kodlanan alfa bölgelerinin tahmini amino asit dizilerinin (in silico) hizalanması.

Yerli kara sığır ırkındaki DQA1, DQA2 ve DQA5 genleri yönündeki farklılıklar son derece önemlidir. DQA geni İmmün Polimorfizm Veritabanına (IPD) girilen üç genden (DQA, DQB ve DRB3) bir tanesidir. Bu veri tabanında *Bos indicus* (5 allel), *Bos taurus* (56 allel) ve *Bubalus bubalis* (8 allel) ırklarına ait allellerin veri tabanı oluşturulmuştur (IPD-<http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/group/BoLA>; Robinson ve ark., 2012). Farklılıkların alfa ve immüoglobulin domainlerinde görülmesi bu bölgelerin yerli karanın bağışıklık sistemine önemli katkısı olduğu düşünülmüştür. Ancak bu sonuç için daha ayrıntılı çalışmalıdır. Sonuç olarak DQA1-E2, DQA2-E3 ve DQA5-E2 bölgelerindeki farklılıkların daha iyi anlaşılması

için filogenetik kısmında ayrıntılı olarak tartışılmıştır (Bkz. 4.6.3). IPD bulunan DQA ile kıyaslanması gerçekleştirilmiştir.

4.5.1.3. DQA1-E2, DQA2-E3 ve DQA5-E2 bölgelerinin filogenetik analizi

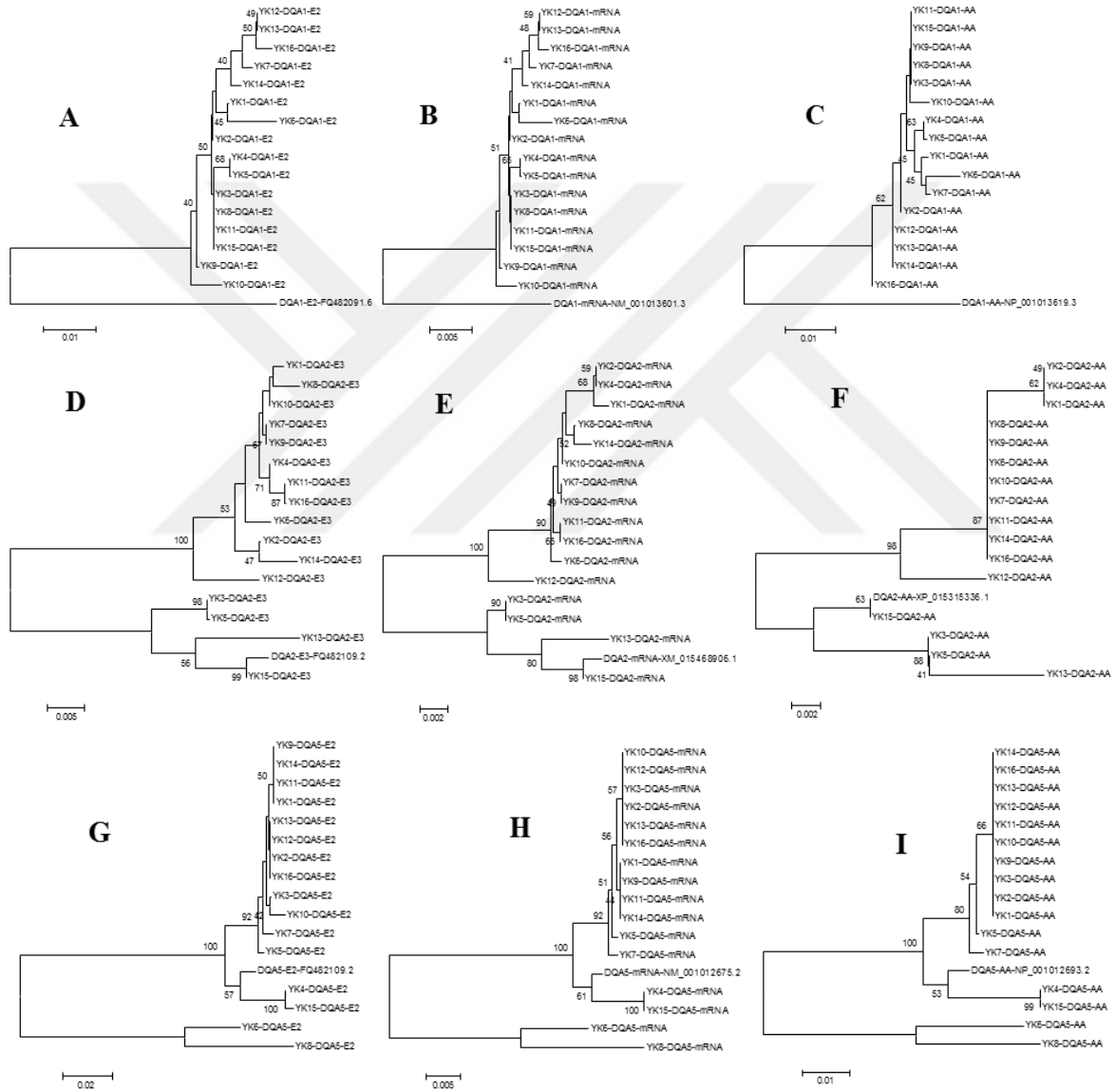
Yapılan çalışma ile yerli kara sığır ırkındaki BoLA-DQA1-E2, BoLA-DQA2-E3 ve BoLA-DQA5-E2 bölgelerinin ekzon bölgelerine ait nükleotid dizileri ortaya çıkartılmıştır. Bu diziler kullanılarak NCBI ve IPD'deki daha önceden belirlenen *Bos indicus*, *Bos taurus* ve *Bubalus bubalis* DQA allelleri ile beraber filogenetik analiz yapılmıştır. Yerli kara sığırının DQA1-E2, DQA2-E3 ve DQA5-E2 bölgelerinin dizi bilgileri analiz edilerek, DNA polimorfizm özellikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.11). Yerli karada DQA1-E2, DQA2-E3 ve DQA5-E2 bölgeleri için sırasıyla toplam 500, 489 ve 308 farklı bölge belirlenirken, bu bölgelerin 15, 37 ve 75 tanesini polimorfik olduğu ve haplotip sayılarının 24, 26 ve 16 olduğu tespit edilmiştir (4.5.1.2'de bahsedilenin haplotip sayısının iki katı). Yerli kara sığırlarında, haplotip farklılığı DQA1-E2 için $0,972 \pm 0,020$, DQA2-E3 için $0,975 \pm 0,014$ ve DQA5-E2 için ise $0,949 \pm 0,031$ olarak hesaplanırken, nükleotid farklılığı ise DQA1-E2, DQA2-E3 ve DQA5-E2 bölgeleri için sırasıyla $0,01375 \pm 0,0000015$, $0,02070 \pm 0,0000209$ ve $0,0534 \pm 0,0003318$ olarak hesaplanmıştır. Yerli karalardaki haplotipler arasındaki genetik uzaklıklar ise DQA1-E2 için 0,0032-0,0362 (ortalama: 0,0139), DQA2-E3 için 0,0025-0,0805 (ortalama: 0,0211) ve DQA5-E2 için ise 0,0029-0,2197 (ortalama: 0,0595) arasında bulunmuştur.

Çizelge 4.11. DQA1-E2, DQA2-E3 ve DQA5-E2 bölgelerinin dizisine göre DNA polimorfizm özellikleri

Özellikler	Genel (DQA1-E2)	Genel (DQA2-E3)	Genel (DQA5-E2)
Toplam Bölge Sayısı	500	489	308
G+C	47,58	47,46	45,26
Polimorfik Bölge Sayısı (s)	15	37	75
Haplotip Sayısı (h)	24	26	16
Haplotip Farklılığı (Hd)	$0,972 \pm 0,020$	$0,975 \pm 0,014$	$0,949 \pm 0,031$
Nükleotid Farklılığı (Pi)	$0,01375 \pm 0,0000015$	$0,02070 \pm 0,0000209$	$0,0534 \pm 0,0003318$

Yerli kara DQA1 konsensüs dizileri filogenetik ilişkileri bakımından referans diziye göre (nükleotid için FQ482091.6, mRNA için NM_001013601.3 ve aa için NP_001013619.3) nükleotid ve amino asit dizisi ayırımındaki bootstrap test değeri %10 hesaplanırken mRNA dizisi %50 şeklinde belirlenmiştir (Şekil 4.33 A, B ve C). Yerli kara DQA2 konsensüs dizileri filogenetik ilişkileri bakımından referans diziye göre (nükleotid için FQ482109.2, mRNA için

XM_015468906.1 ve aa için XP_015315336.1) nükleotid dizisi ayrımındaki bootstrap test değeri %50 hesaplanırken mRNA ve amino asit dizisi %20 şeklinde belirlenmiştir (Şekil 4.33 D, E ve F). Yerli kara DQA5 konsensüs dizileri filogenetik ilişkileri bakımından referans diziye göre (nükleotid için FQ482109.2, mRNA için NM_001012675.2 ve aa için NP_001012693.2) nükleotid dizisi ayrımındaki bootstrap test değeri %20 olarak hesaplanırken, mRNA dizisi %50 ve amino asit dizisi %10 şeklinde hesaplanmıştır (Şekil 4.33 G, H ve I).

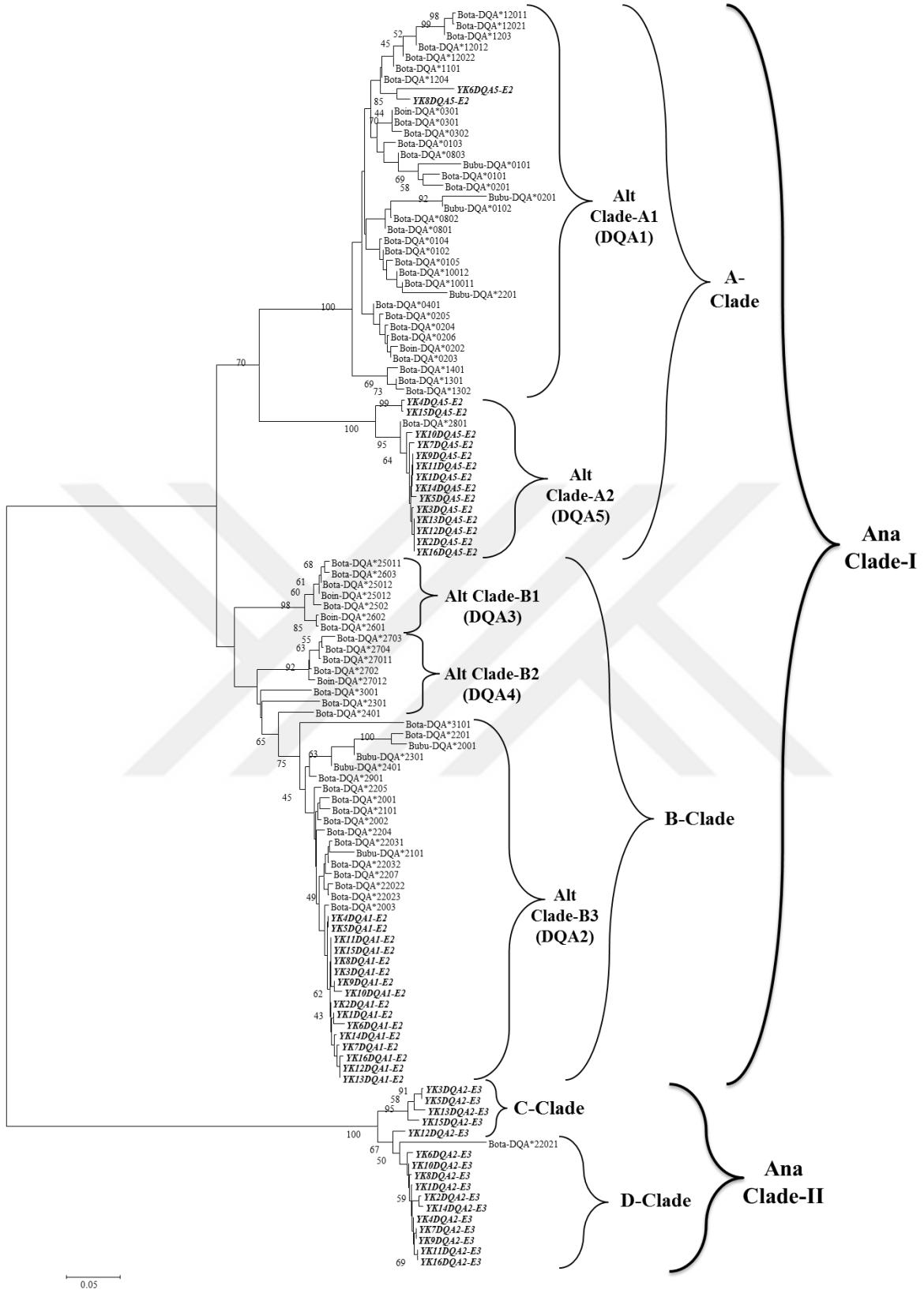


Şekil 4.33. BoLA-DQA1, DQA2 VE DQA5 konsensüs dizilerinin filogenetik ağaçları. Yerli kara BoLA-DQA1, DQA2 VE DQA5 allelerinin sırasıyla 310 bç, 389 bç ve 338 bç'lik nükleotid dizilerinden oluşturulmuş komşu birleştirme (Neighbor-joining) ağacı (A, D ve G), DQA1, DQA2 ve DQA5-mRNA sırasıyla 768, 765 ve 768 bç uzunluğunda dizilerinden oluşturulmuş Neighbor-joining ağacı (B, E ve H) ve 255 amino asit uzunluğundaki dizilerden oluşturulmuş Neighbor-joining ağacı (C, F ve I).

BoLA-DQA ve DQB gen bölgeleri antijenik epitop bağlayıcı repertuarını artırmak için bağışıklık sistemi tarafında kullanılabilecek polimorfizm sergilerler (Lewin ve ark., 1999). Bu moleküllerin bağışıklık sistemlerindeki rolüne en iyi örnek olarak yine insanlarda görülen insüline bağımlı diyabet (ömür boyu insülin yetersizliği) ve çölyak hastalığı (glütene karşı ömür boyu kronikleşen alerji) hastalığına karşı immünolojik olarak aracılık edilen hastalıklarda DR molekülleri ile birlikte hastalıklara pozitif yada negatif etkileri şeklinde gösterilmeleridir (Norimine ve Brown, 2005). Sığırlarda, monoklonal antikor bloke edici test kullanılarak, şap hastalığı virüsü epitoplarının BoLA-DQ molekülleri yardımıyla CD4+T hücrelerine sunumda belirlenmiştir (Glass ve ark., 2000). Benzer şekilde bu molekülleri tarafından CD4+T hücrelerine *Babesia bovis* (sıtma) ve *Anaplasma marginale* epitoplarının sunumunda benzer etkileri gösterdiği belirlenmiştir (Brown ve ark., 2003; Norimine ve ark., 2004; Garrick ve Ruvinsky, 2014).

IPD'de bulunan DQA alleleri ve yerli kara sığırından elde edilen konsensüs dizilerinin, dizi verileri ve filogenetik analizleri bize, yerli karadaki DQA1, DQA2 ve DQA5'in farklı alleleri temsil ettiklerini düşündürmektedir. Yerli kara sığırındaki DQA genlerin bugüne kadar belirlenen DQA alleleri arasındaki yerinin belirlenmesinde kullanılan filogenetik ağacın topolojisine bakıldığında, NJ yöntemi, Jukes-Cantor (JC) modeli ve Bootstrap metoduna (1000) dayanan DQA allelerin oluşturan filogenetik ağaç 2 ana dala (clade-I ve II) ayrılmıştır. Ana clade I, alt clade-A1 (DQA1), alt clade-A2 (DQA5), alt clade-B1(DQA3), alt clade-B2(DQA4) ve alt clade-B3(DQA5) şeklinde 5 alt dala ayrılmıştır. Bu sonuç önceki çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (Miyasaka ve ark., 2012). Ana clade II, C ve D dallarına ayrılmıştır, bu dal ağacı köklendirmek için kullanılmıştır. Diğer örneklerin hepsi ekzon 2 bölgesinden oluşurken bu dal ekzon 3 bölgesinden oluşmaktadır (Şekil 4.34).

DQA1 geninin en önemli paralogu DQA2 genidir. Yerli kara sığırlarında görülen DQA1 geni, daha önceden belirlenen DQA2 genleriyle aynı clade'de (alt clade-B3) yer alması bu görüşü destekler niteliktedir (Gelhaus ve ark., 1999). DQA2 ve DQA3 yakın ilişkili görülmektedir. Ayrıca DQA3 (alt clade-B1)'ün DQA1'den ziyade DQA2'den ayrılmış olabileceği hipotezini destekler niteliktedir (Ballingall ve ark., 1998). DQA2'nin DQA1'den ayrıldığı düşünüldüğünde yerli kara DQA1 allelerinin DQA2 ile benzer dalda bulunması yakın ilişkili olduklarının en açık göstergesidir. Sığırlarda görülen DQA genlerinin geniş getiren ve getirmeyen türler arasındaki ayrılmanın ardından gen tekrarlarıyla gelişmiş olabileceği düşüncesidir (Gelhaus ve ark., 1999).



Şekil 4.34. Yerli kara ve IPD’de bulunan *Bos indicus* (Boin-DQA), *Bos taurus* (Bota-DQA) ve *Bubalus bubalis* (Bubu-DQA) DQA allellerinin filogenetik ağacı. Bu çalışmada elde edilen alleller koyu renkle gösterilmiştir.

Bugüne kadar, farklı sığır ırklarında 34 DQA1 alleli, 18 DQA2 alleli, 7 DQA3 alleli ve 8 DQA4 alleli ekzon2'nin DNA dizilimi veya tam uzunluktaki tamamlayıcı DNA (cDNA) klonlaması ile tanımlanmıştır (IPD-MHC Dizilim Veritabanının BoLA isimlendirme bölümüne bakınız: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/bola/index.html>). Ayrıca sığır ırklarında sadece *Bos taurus*'da tek bir allel şeklinde tanımlanan DQA5 gen bölgesinin varlığı yerli kara sığırında ilk defa bu çalışma ile belirlenmiştir. Daha önceden tanımlanan DQA5*2801'den alleninden farklı 16 allele belirlenmiştir. Fonksiyonel yönleri tanımlanarak açıklandığı önceki çalışmalarda periferik lökositlerde eksprese olabilecekleri gösterilmiştir (Gelhaus ve ark., 1999).

Farklı sığır ırklarındaki DQA1 allel varlığı ve frekansları incelendiğinde, DQA1*0101 allelinin en yaygın allel olduğu görülmüş ve mastitisle ilişkili allel olarak rapor edilmiştir (Park ve ark., 2004; Takeshima ve ark., 2007). Bununla birlikte sığırlardaki bu allel veya BoLA-DQA1*10011 alleli için homozigot olan hayvanlarda mastitis progresyonuna duyarlı olduklarından, BoLA-DQA1 heterozigotluğu, sığır mastitisine karşı seçici bir avantaj sağladığı görülmektedir. İkinci olarak, alleller BoLA-DQA1*0101 ve BoLA-DQA1*10012 arasında streptokokların neden olduğu mastitis ilerlemesi arasında pozitif bir ilişki vardır (Takeshima ve ark., 2008). Başka bir deyişle bu alleller yönünden homozigot olan bireyler mastitise daha duyarlıdır. Bu açıdan düşünüldüğünde Şekil 4.34'de gösterilen filogenetik ağaca göre yerli kara DQA1 allellerinin bu allele göre en uzak nokta bulunmaları mastitise direnç için bir gösterge kabul edilebilir. Çünkü daha önceden belirlen allellerin bir çoğu, verim kapasitesi yüksek olan kültür ırklarında belirlenen allellerdir. Ancak bunun belirlenmesi için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Sonuç olarak DQA1, DQA2 ve DQA5 alleleri bakımından, bazılarının antijen sunumunda diğer allele göre baskın rol oynadığının belirlenmiş olması ve sığırlardaki patojenlere karşı immün sistem tarafından verilen tepkilerin MHC sınıf II allerinden etkileniyor olması etkili aşılarda geliştirilmesi veya ıslah stratejileri açısından BoLA-DQA allellerinin karakterizasyonunu son derece önemli kılmaktadır. Buna birde sahip olduğumuz yerli ırklardaki immün sistem yönündeki genetik çeşitlilik eklenince son derece önemli hale gelmektedir.

4.5.2. BoLA-DQB Gen Bölgesi ve Yerli Kara Sığırında DQB Bölgesinin nükleotid dizilenmesi

BoLA sınıf II histokompatibilite molekülü heterodimer beta zinciri veya kısaca BoLA-DQB geni, tıpkı DQA'da olduğu gibi sınıf II bölgesi beta zinciri paraloglarına ait bir gen bölgesidir. Ekstraselüler proteinlerden türetilen peptidleri sunarak bağışıklık sisteminde

merkezi bir rol oynar. HLA-DQB geninden eksprese olan beta zinciri yaklaşık 26-28 kDa'dır ve altı ekzoniçerir. Ekzon 1 lider peptidi, ekzon 2 ve 3 iki hücre dışı alanı, ekzon 4 zar geçiş alanını ve ekzon5 sitoplazmik kuyruğu kodlamaktadır (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HLA-DQB1&keywords=HLA-DQB1>). HLA-DQB1, çölyak hastalığı multipl skleroz ve creutzfeldt-jakob hastalıkları ile ilişkilendirilmişlerdir (Nelsen, 2002; Kaushansky ve ark., 2009). DQB gen bölgesi insanlarda 6. Kromozom üzerinde, 6p21.32 (Ac. No: NC_000006.12-32659464..32666689) lokasyonunda bulunan 7225 bç uzunluğundaki bölgeden 6 ekzon tarafından kodlanan 261 aa uzunluğunda 29,991 Da ağırlığında ve pI değeri 6,76 olan bir proteindir. Buna nazaran sığırlardaki DQB gen bölgesi, 23. kromozomun (AC_000180.1) 23q21 bölgesinde, yaklaşık uzunluğu 13360 bç (25375261..25388621) olan linear bir gen bölgesidir. İnsanların aksine sığırlardaki bu bölge 5 ekzondan oluşmaktadır. BoLA-DQB gen bölgesinden 261 amino asit uzunluğunda, moleküler ağırlığı yaklaşık 29617,83 Da ve pI değeri 6,60 olan bir protein kodlanmaktadır. İlk 32 amino asit signal peptit bölgesini geriye kalan 229 aa olgunlaşmış polipeptidi oluştururken, 45→117 aa beta domainin ve 129→222 immünoglobulin domaini oluşturmaktadır (<http://www.uniprot.org/>; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/282495>).

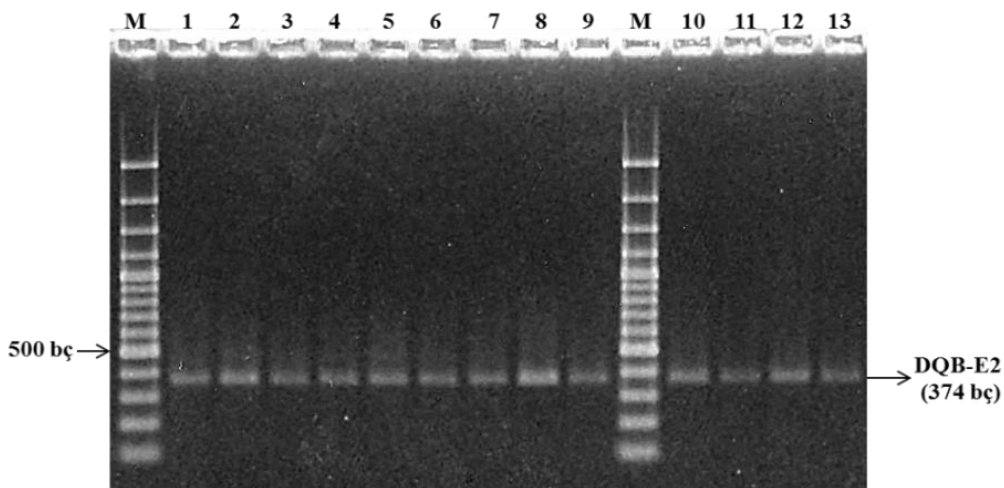
Bazı MHC genlerinin en çarpıcı özelliği, bir çok doğal popülasyonda diğer genlere kıyasla yüksek derecede polimorfizm olmasıdır (Klein, 1986; Yuhki ve O'Brien, 1990). Bu polimorfizmin en önemi nedeni muhtemelen, çeşitli peptidleri ve dolayısıyla çeşitli patojenleri tanıma yeteneğini gerektiren bireydeki bağışıklık tepkisi ile ilgilidir (Andersson,1996). Sınıf II genlerin genetik polimorfizmleri ağırlıklı olarak peptid bağlama bölgelerini (PBS) kodlayan birinci alan ekzonda (ekzon 2) bulunur ve işlevsel olarak önemlidir (Wang ve ark., 2007). Değişken derecelerde polimorfizm sergileyen ve büyük bir haplotip dizisine sahip olan, sığırlarda beş DQA ve beş DQB geninin (lokus) varlığına dair kanıt bulunmaktadır (Sena ve ark., 2011). BoLA-DQB1 ve BoLA-DQB2'nin ayrı lokus olarak belirlenmesi, homozigot bireylerin allelik varyasyonlarının analizine dayanmaktadır (Gelhaus ve ark., 1999b). BoLA-DQB1, BoLA-DQB2 ve BoLA-DQB5'in ayrımı translasyona uğramamış 3' bölgelerindeki farklılıklar ile belirlenmişlerdir. BoLA-DQB3 ve BoLA-DQB4 allellerin belirlenmesi, nükleotid dizilerinin ve filogenetik birlikteliklerinin korunmasına dayanır (Russell, 2000). DQB lokusunun kromozomal dağılımı, kromozom başına en fazla iki loci ile sınırlandırılmıştır (Gelhaus ve ark., 1999a; b; Russell, 2000). Fonksiyonel olarak, çoğaltılmış BoLA-DQA ve BoLA-DQB genleri hücre membranlarında heterodimerler olarak ifade edildiğinde hem haplotip içi hem de inter-haplotip ilişkilerini gösterir, böylece CD4 T

lenfositleri tarafından tanınabilen varsayılan patojen peptitlerin repertuarını arttırır (Norimine ve Brown, 2005). En önemli özellikleri , DQB1 en yaygın tip olup hemen hemen tüm haplotiplerde bulunmasıdır (Xu ve ark., 1994).

Bugüne kadar BoLA-DQA ve BoLA-DQB polimorfizmleri, Holstein, Jersey, Japon Shorthorn, Japon Black and African sığırlarda incelenmiştir (Maillard ve ark., 2001; Wang ve ark., 2007; Takeshima ve ark., 2008; Miyasaka ve ark., 2012). IPD-MHC veri tabanında şimdiye kadar 15 adet *Bos indicus* DQB alleli, 68 adet *Bos taurus* DQB alleli ve bir adet *Bubalus bubalis* DQB alleli olmak üzere toplam 84 DQB alleli kaydedilmiştir. Henüz yerli sığır ırklarımızda MHC genleri hakkında bir bilgi bulunmamaktadır. Yerli kara sığır ırkı için DQB geninin genomik çeşitliliği hakkında detaylı bir bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu açıdan çalışmanın bu kısmında yerli kara sığır ırkındaki MHC sınıf II DQB geninin ekzon2'sinin genomik çeşitliliğin inceleme hedeflenmiştir. Bahsi geçen gen bölgesinin yerli kara sığır ırkındaki moleküler özelliklerinin belirlenmesi için tüm örneklerde PZR amplifikasyonu yapılarak tarama gerçekleştirilmiştir.

4.5.2.1. DQB geninin PZR amplifikasyonu sonucu

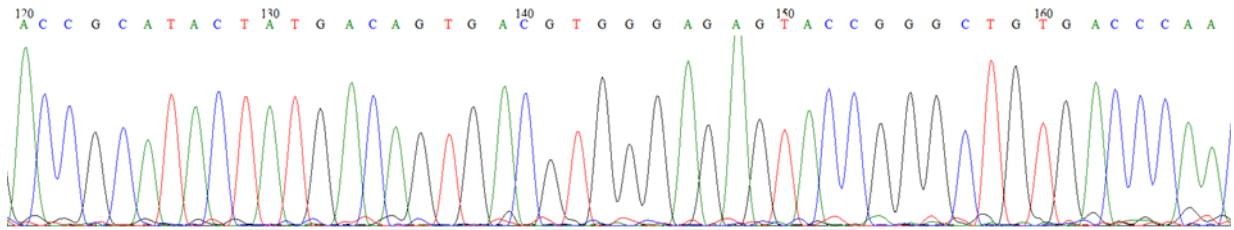
Yerli kara sığır örneklerindeki BoLA-DQB gen bölgesini oluşturan ekzon II için 3.4.1'de bahsedilen şekilde dizayn edilen primerler kullanılarak (Çizelge 3.1) PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonu, 3.4.2'de detaylandırılan PZR şartları kullanılarak yapılmış ve çoğaltılan bölge % 1,5'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.35). Hedef bölge yaklaşık 374 bp (ekzon uzunlukları; 270 bp) uzunluğunda lineer bir bölgedir.



Şekil 4.35. YK1- 13. örneklerinde DQB-E2 bölgesinin ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: 100 bp DNA standardı.

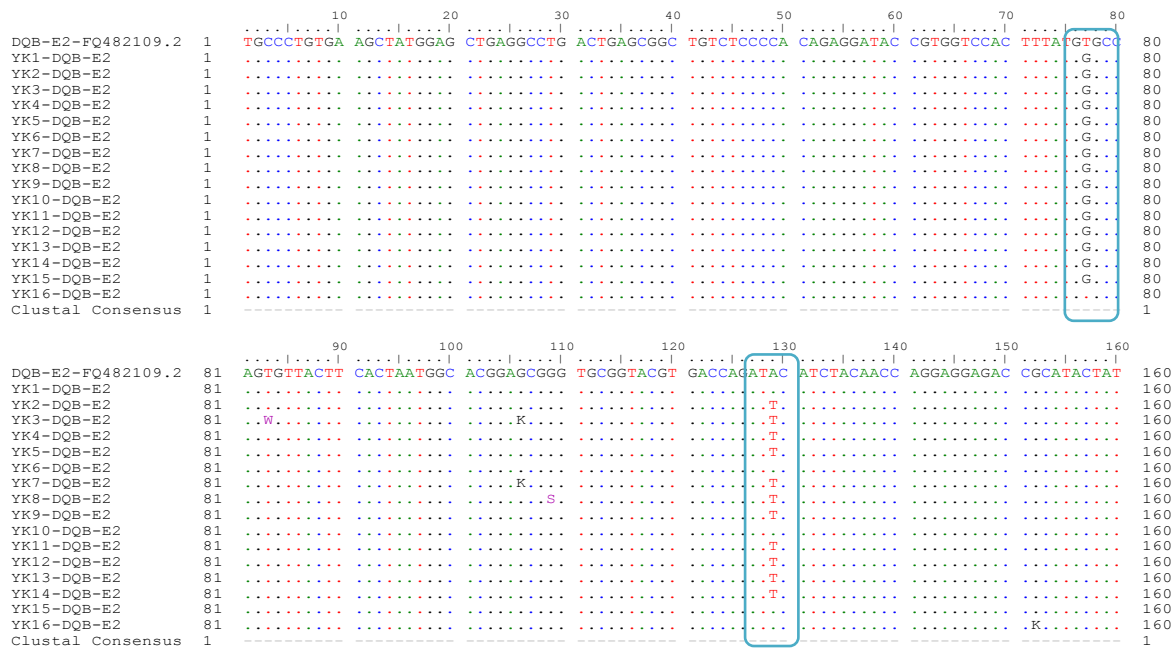
4.5.2.2. DQB-E2 nükleotid dizilenmesi ve amino asit dizi analizi

YK-DQB-E2 bölgesinin her iki zincirinde ileri ve geri primerleri kullanılarak nükleotid dizisi belirlenmiştir (374 bp). Tüm örneklerden elde edilen dizi bilgileri farklı formatlarda kaydedilmiştir. 3.6’da ayrıntılı bir şekilde bahsedildiği gibi hedef bölge için farklı olarak düşünülen örneklerin kromatogramlarına bakılarak YK1-16-DQB-E2 şeklinde konsensüs dizileri belirlenmiştir (Şekil 4.36). Gen bölgesinin tam dizisi kullanılarak amino asit dizileri elde edilmiştir. Kümeleme işlemi ve nükleotid dizilerinin kromatogram pik yükseklikleri incelenerek elde edilen konsensüslerin nükleotid dizileri ek çizelge C.5’de ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 4.36. YK-DQB-E2 bölgesinin ileri primer ile elde edilen nükleotid dizisine ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir.

Konsensüs dizileri ve referans gen bölgesi öncelikle ClustalX programı yardımı ile Fasta, Phylip, Nexus ve Clustal formatlarında kaydedilmiştir. Daha sonrasında Bioedit ve Clustal Omega programı kullanılarak hizalanmış ve farklılıkları belirlenmiştir (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. Referans DQB-E2 (FQ482109.2) ve YK-DQB-E2 bölgesinin konsensüs dizilerinin hizalanmasının bir kısmı. Kutucuklar korunan bölgeler.

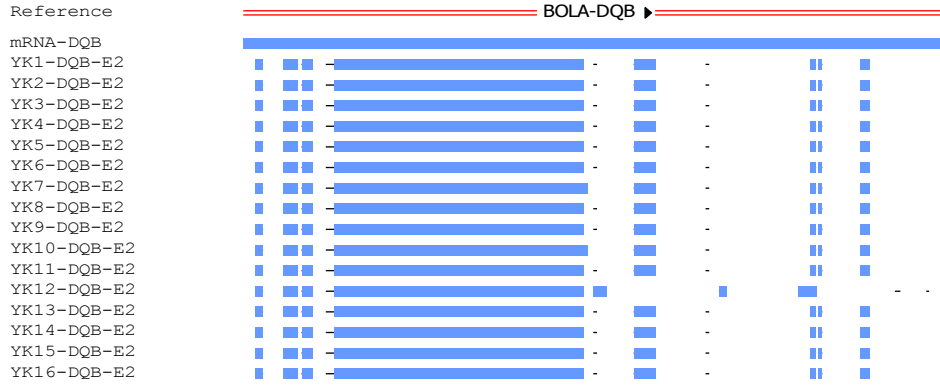
Hizalama işlemi sonunda, polimorfik bölgelerin tamamı ekzon 2 bölgesi içerisinde olduğu görülmüştür. Referans dizi ve elde edilen konsensüs dizileri kıyaslandığında yerli karadaki DQB-E2 bölgesinin en az 2, en fazla 7 adet nükleotid farklılık içerdiği görülmüştür. Bu polimorfik noktaların sonuçları aşağıdaki 4.12 nolu çizelgede özetlenmiştir. Burada dikkat çeken nokta yerli kara sığır ırkındaki DQB-E2 bölgesindeki 77. nükleotid pozisyonundaki G→T, 129. pozisyonundaki T→A ve 166. pozisyonundaki T→C dönüştüğü ve 77. ve 166. nükleotidlerin yerli kara DQB konsensüs dizilerinin tamamında korunduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.12. YK- DQB-E2 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.

Nükleotid Pozisyonları	77	83	106	109	129	152	166	170	279	305	321	325	365	367	369	371	Toplam Farklılık
Konsensüs	G	T	G	G	T	G	T	G	G	A	A	T	C	G	T	C	
DQB-E2-FQ482109.2	T	.	.	.	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3
YK1-DQB-E2	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2
YK2-DQB-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3
YK3-DQB-E2	.	W*	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	5
YK4-DQB-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3
YK5-DQB-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3
YK6-DQB-E2	.	.	.	.	A	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	4
YK7-DQB-E2	.	.	K	.	.	.	.	.	.	M	.	K	.	.	.	.	6
YK8-DQB-E2	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4
YK9-DQB-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3
YK10-DQB-E2	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	C	K	.	.	.	.	5
YK11-DQB-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3
YK12-DQB-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	W	T	7
YK13-DQB-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3
YK14-DQB-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3
YK15-DQB-E2	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2
YK16-DQB-E2	T	.	.	.	A	K	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	3
Özet	2T	1W	2K	1S	6A	1K	1C	1K	1R	¹ _M	1C	2K	1A	1A	¹ _W	1T	62

* W: A veya T, K: G veya T, S: G veya C, M: A veya C.

DQB-E2 için belirlenen konsensüs dizilerindeki intron bölgelerinin uzaklaştırılması ve hedef bölgeden sentezlenen protein dizisindeki farklılıkları belirlemek için clone manager programında karşılaştırılarak amino asit dizileri belirlenmiştir (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. Nükleotid konsensüs dizilerinden mRNA bölgesinin elde edilmesi ve aa dizilerinin belirlenmesi (Referans: mRNA-DQB, Ac. No. NM_001012676.3, YK1-16 konsensüs dizileri, mavi bölgeler ortak noktaları göstermektedir).

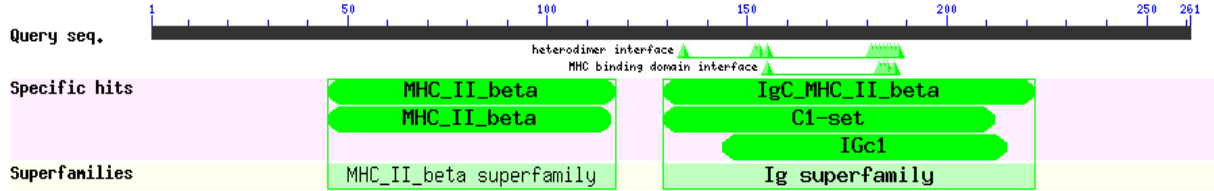
DQB-E2 nükleotid konsensüs dizileri kullanılarak elde edilen DQB-mRNA (786 bp uzunluğunda) dizilerinden yola çıkılarak 8 farklı haplotip belirlenmiştir (in silico). YK2, 4, 5, 9, 11, 12, 13 ve 14 aynı haplotipe sahipken, YK1 ve YK15 aynı haplotipi bulundururken, YK3, 6, 7, 8, 10 ve 16 nolu konsensüs dizileri farklı haplotiplere sahip olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.13). Burda dikkat çeken nokta ise nükleotid dizisinde belirlenen 62 polimorfik nükleotid bölgesinin 57'ye düşmesidir. Bunun en önemli nedeni mRNA dizisi üzerinde belirlenen farklılıkların tamamının ekzon bölgelerindeki polimorfizmden kaynaklandığıdır.

Çizelge 4.13. DQB bölgesinden transkripte olan mRNA nükleotid dizisi

Nükleotid Pozisyonları	133	139	162	165	185	208	222	226	335	361	377	Toplam Farklılık
Konsensüs	G	T	G	G	T	G	T	G	G	A	A	
DQB-mRNA-NM_001012676.3	T	.	.	.	A	.	C	.	.	.	.	3
YK1-DQB-mRNA	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	2
YK2-DQB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3
YK3-DQB-mRNA	.	W	K	.	.	.	.	.	.	.	.	5
YK4-DQB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3
YK5-DQB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3
YK6-DQB-mRNA	.	.	.	.	A	.	.	.	R	.	.	4
YK7-DQB-mRNA	.	.	K	.	.	.	.	.	.	M	.	5
YK8-DQB-mRNA	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	4
YK9-DQB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3
YK10-DQB-mRNA	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	C	4
YK11-DQB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3
YK12-DQB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3
YK13-DQB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3
YK14-DQB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3
YK15-DQB-mRNA	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	2
YK16-DQB-mRNA	T	.	.	.	A	K	.	K	.	.	.	4
Özet	2T	1W	2K	1S	6A	1K	1C	1K	1R	1M	1C	57

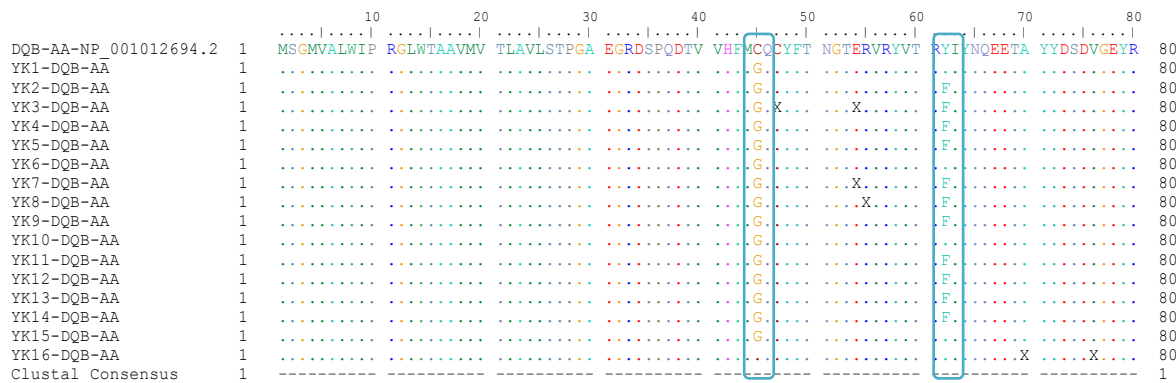
* W: A veya T, K: G veya T, R: G veya A, M: A veya C.

Dizilerin translasyonu yapılarak elde edilen amino asit dizileri (261 aa uzunlukta) NCBI’da Blast yapılarak hedef bölge olduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.39). DQB proteininin ilk 1-32 amino asitlik bölümü signal peptid dizisini, 45-117 bölümü beta ve 129-222 bölümü immunoglobülin domaini oluşturmaktadır (Şekil 4.39) (<http://www.uniprot.org>; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).



Şekil 4.39. YK2-DQB-PR’nin sahip olduğu domainler, yeşil renkle gösterilen bölgelerin ilki alfa domaini, ikincisi immunoglobülin domaini göstermektedir.

Belirlenen YK-DQB haplotiplerinin oluşturduğu proteinlerinin NCBI Blast sonuçlarına göre; *Bos taurus*’dan eksprese olan MHC sınıf II DQ beta zincirine (Ac. No: NP_001012694.2) benzerlik oranı % 98-99 arasında bulunmuştur. Ayrıca YK1-16 DQB aa konsensüs dizilerinin moleküler ağırlığı 29510,89-29670,28 Da olarak hesaplanırken pI değerleri 6,31-7,02 olarak belirlenmiştir. Amino asit pozisyonlarına bakıldığında; YK16 dışındaki tüm konsensüslerde 45. pozisyonundaki sistein → glisine dönüşürken, YK2, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 13 ve 14 konsensüslerinde 62. pozisyonundaki tirozin → fenilalanine dönüşmüştür. Ayrıca YK10 konsensüsünde 126. pozisyonundaki glutamin → proline dönüştüğü belirlenmiştir (Şekil 4.40).



Şekil 4.40. Altı yeni BoLA-DQB alleli tarafından kodlanan beta bölgelerinin tahmini amino asit dizilerinin hizalanması. Numaralar olgunlaşmış protein içindeki amino asit pozisyonlarını, noktalar referans protein ile özdeş amino asitleri göstermektedir (in silico). Mavi kutucuklar korunan bölgeler.

Yerli kara sığır ırkındaki DQB geni yönündeki farklılıkların belirlenmesi son derece önemlidir. DQB geni İmmün Polimorfizm Veritabanına (IPD) girilen üç genden (DQA, DQB ve DRB3) bir diğeridir. Bu veri tabanında DQB alleleri yönünden, *Bos indicus* (15 allel), *Bos taurus* (68 allel) ve *Bubalus bubalis* (1 allel) ırklarına ait allellerin veri tabanı oluşturulmuştur (IPD-<http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/group/BoLA>; Robinson ve ark., 2012). Tanımlanan allelerin tamamına yakını ekzon 2 bölgesine göre belirlenmiştir. Bu bölgenin eşsiz oluşu ve peptid bağlama bölgelerindeki farklılıkların belirlenmesinde öncü rol oynaması bu bölgesi benzersiz yapmaktadır. Yerli kara sığır ırkında bu bölgede korunan ve diğer ırklardan farklılık gösteren pozisyonların oluşu yerli karanın bağışıklık sisteminde farklılığa yol açacağı ön görülmüştür. Sonuç olarak DQB-E2 bölgesindeki farklılıkların daha iyi anlaşılması için filogenetik kısmında ayrıntılı olarak tartışılmıştır. IPD bulunan DQB alleleri ile kıyaslanması gerçekleştirilmiştir.

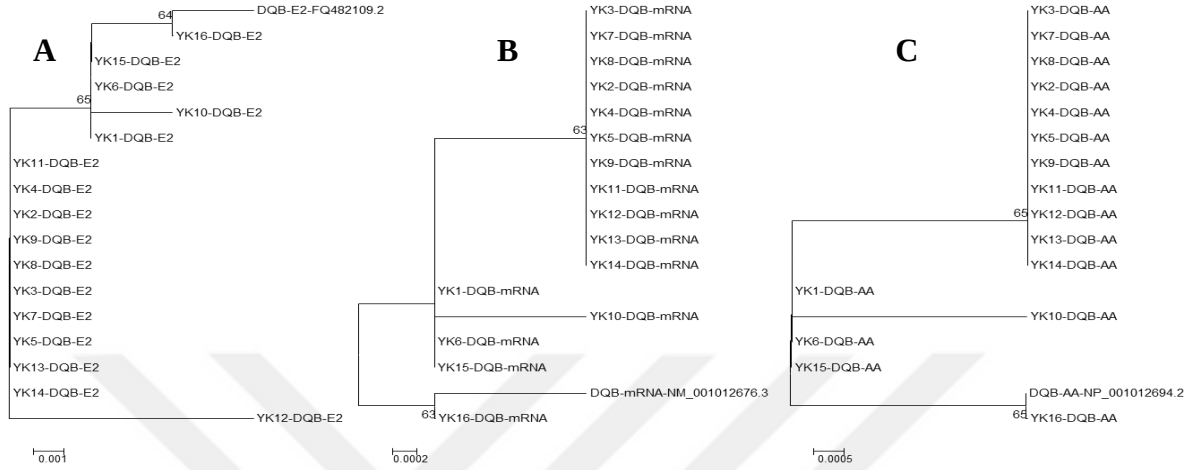
4.5.2.3. DQB-E2 bölgesinin filogenetik analizi

Yapılan çalışma ile yerli kara sığır ırkındaki BoLA-DQB bölgesinin, 2. ekzon bölgesine ait nükleotid dizleri ortaya çıkartılmıştır. Bu diziler kullanılarak NCBI ve IPD'deki daha önceden belirlenen *Bos indicus*, *Bos taurus* ve *Bubalus bubalis* DQB alleleri ile beraber filogenetik analiz yapılmıştır. Yerli kara sığırının DQB-E2 bölgesinin dizi bilgileri analiz edilerek, DNA polimorfizm özellikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.14). Yerli karada toplam 62 farklı bölge belirlenirken, bu bölgelerin 15 tanesini polimorfik olduğu ve haplotip sayısının 21 olduğu tespit edilmiştir. Yerli kara sığırlarında, DQB-E2 bölgesi yönünden haplotip farklılığı $0,907 \pm 0,044$ olarak, nükleotid farklılığı $0,00654 \pm 0,000089$ olarak hesaplanmıştır. Yerli karalardaki haplotipler arasındaki genetik uzaklıklar 0,0027-0,0216 (ortalaması: 0,0066) arasında bulunmuştur.

Çizelge 4.14. DQB-E2 bölgesinin dizisine göre DNA polimorfizm özellikleri

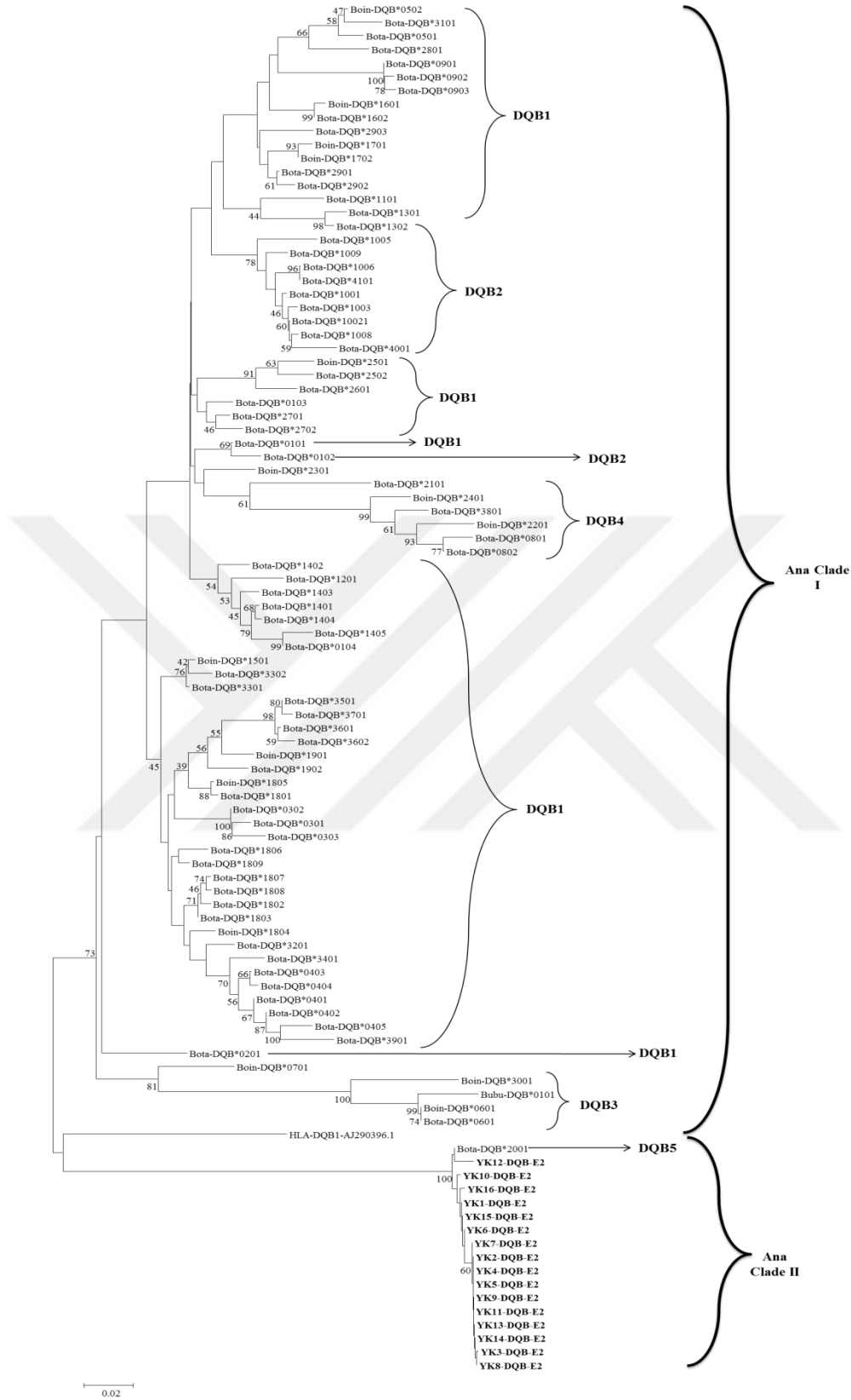
Özellikler	Genel
Toplam Bölge Sayısı	62
G+C	57,86
Polimorfik Bölge Sayısı (s)	15
Haplotip Sayısı (h)	21
Haplotip Farklılığı (Hd)	$0,907 \pm 0,044$
Nükleotid Farklılığı (Pi)	$0,00654 \pm 0,000089$

Yerli kara DQB konsensüs dizileri filogenetik ilişkileri bakımından referans diziye göre (nükleotid için FQ482109.2, mRNA için NM_001012676.3 ve aa için NP_001012694.2) nükleotid için %10, amino asit için %20 ve mRNA dizisi için %50 bootstrap test değeri belirlenmiştir (Şekil 4.41 A, B ve C).



Şekil 4.41. BoLA-DQB konsensüs dizilerinin filogenetik ağaçları. Yerli kara BoLA-DQB allelerinin sırasıyla 374 bç'lik nükleotid dizileri, 786 bç'lik mRNA dizleri ve 261 amino asit uzunluğundaki dizilerin oluşturduğu Neighbor-joining ağacı (A, B ve C).

İlk domainin ekzonlarındaki dizi farklılıklarından yola çıkarak BoLA-DQB sekansları DQB1 ila DQB5 olarak adlandırılan beş gruba ayrılmıştır (Gelhaus ve ark., 1999a). DQB allelerinin çift halinde bulunduğu durumlarda ikinci DQB sekansları DQB2 olarak adlandırılmıştır, ancak sekans karşılaştırmaları ile ayırt edilememişlerdir. Bunun aksine DQB3, DQB4 ve DQB5, DQB1'in paralogları olmasına rağmen, oldukça eşsiz ekzon 2 yapılarına sahiptirler (Marello ve ark., 1995; Gelhaus ve ark., 1999a). Elde edilen sonuçlar bu görüşü destekler niteliktedir (Şekil 4.42).



Şekil 4.42. Yerli kara ve IPD’de bulunan *Bos indicus* (Boin-DQB), *Bos taurus* (Bota-DQB) ve *Bubalus bubalis* (Bubu-DQB) DQB allellerinin filogenetik ağacı. Bu çalışmada elde edilen alleller koyu renkle gösterilmiştir.

IPD’de bulunan DQB alleleri ve yerli kara sığırından elde edilen konsensüs dizilerinin, dizi verileri ve filogenetik analizleri bize, yerli karada belirlenen DQB allellerinin farklı bir clade ile temsil edildiğini göstermiştir. Yerli kara sığırındaki DQB-E2 bölgesinin bugüne kadar belirlenen DQB-E2 alleleri arasındaki yerinin belirlenmesinde kullanılan filogenetik ağacın topolojisine bakıldığında, YK-DQB allellerinin, DQB1 ve DQB2’ye yol açan duplikasyon olayından önce DQB allelerinden ayrıldıktan sonra ortak bir atasal genden ayrılmış olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca HLA-DQB1’e yakın konumda bulunması YK-DQB allellerinin diğer allelerden farklı olduğunu açık bir göstergesidir. DQB5 allelinin şimdiye kadar sığırlarda tek bir şekli tanımlanmış olması ve yerli kara sığırındaki DQB bölgelerinin bu allel ile aynı clade bulunması yerli kara sığırlarının diğer ırklara göre benzersiz bir özelliğini yansıtmaktadır. Daha da önemlisi ve dikkat çekici olan DQA5 ve DQB5’in bir haplotipte birlikte görülmesi, DQA5 ve DQB5 ürünlerinin farklı bir immünolojik fonksiyona sahip bir DQ molekülünü oluşturmak üzere birleştiğini akla getirmektedir (Auffray, 1985; Gelhaus ve ark., 1999a). Yerli kara sığırındaki DQA5 ve DQB5 allellerinin birlikte görülmesi bu hipotezi destekler niteliktedir (Bkz. 4.6.3). Benzer şekilde, CD4/beta zinciri etkileşimi, T hücrelerinin antijenden bağımsız tutunmasını negatif yönde düzenleyici olarak etkiledi belirtilmiştir (Mazerolles ve ark., 1990). Bu açıdan bakıldığında, bu fonksiyondaki eksiklik, bağışıklık tepkisinde oldukça geniş kapsamlı sonuçlar doğurabileceği aşikârdır.

DQB alleleri içerisinde dikkat çeken en önemli allel dermatofilosis ile ilişkilendirilen DQB*1804 allelidir. Dermatofilosis ciddi üretim kayıplarına ve ortalama %15 ölüm oranına sahip sığır, at, koyun, keçi gibi hayvanlarda ve insanlarda görülen bulaşıcı ve şiddetli bir deri enfeksiyonudur (Awad ve ark., 2008). Enfeksiyon nedeni genellikle tropik bölgelerde görülen *Amblyomma variegatum* kenesi ile ilişkili gram pozitif bir bakteri olan *Dermatophilus congolensis* etkenidir. Tropik bölgelerde yağın olan bu enfeksiyon son yıllarda Avrupa (İngiltere, İsveç ve Fransa)’da rastlanmıştır. Ülkemizde henüz bir olguya rastlanmamıştır. Henüz bu hastalığa karşı başarılı bir aşılama yöntemi bulunamamıştır. Akarsidler ve antibiyotik kullanım yöntemleri hedef organizmalarda kemorezistansın gelişimine yol açıklarından hayvan yetiştiriciliğinde genetik uygulamalar ön plana çıkmaktadır. Bahsedilen hastalığa duyarlılık ilişkili olarak BoLA-DQB*1804 alleli arasında güçlü bir korelasyon olduğu belirlenmiştir (Yonow, 1995; Maillard ve ark., 2003). Peptit bağlanma bölgesindeki polimorfik bölgelerden kaynaklandığı bilinen bu duyarlılığa karşı, yerli kara sığırlarında 45. (C→G) ve 65. (Y→F) pozisyonlarındaki korunan amino asit dizilerinin bu hastalığa karşı bir

direnç veya duyarlılığının belirlenmesi son derece önemlidir. Ancak bunun için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Sonuç olarak, bu çalışmada, MHC sınıf II DQB geninin ekzon2 izole edilmiş ve ilk defa yerli kara sığırında karakterize edilmiştir. Yerli kara 8 yeni allel tespit edilmiştir. Ancak dikkat çeken nokta YK2, 4, 5, 9, 11, 12, 13 ve 14 konsensüs dizilerini oluşturan allelin korunuyor olmasıdır. Bu da yerli kara ırkında bu allelin güçlü bir pozitif seçimi olduğunu doğrulamaktadır.

4.6. BoLA-DRA ve –DRB Gen Bölgelerinin Karakterizasyonu

4.6.1. BoLA-DRA gen bölgesi ve yerli kara sığırında DRA bölgesinin nükleotid dizilenmesi

BoLA-sınıf II histokompatibilite kompleksi molekülü alfa zinciri veya kısaca BoLA-DRA geni, tıpkı diğer MHC genleri gibi sınıf II bölgesi alfa zinciri paraloglarından bir diğeridir. Bu gen bölgesinin genomik organizasyonu insanlardakine benzer, HLA-DR bölgesinden beta bölgesini kodlayan 5 gen bölgesi bulunurken (DRB1-5), alfa zincirini oluşturan tek bir gen bulunmaktadır (DRA). Ekstraselüler proteinlerden türetilen peptidleri sunarak bağışıklık sisteminde merkezi bir rol oynar. İnsanlarda 6. Kromozom üzerinde bulunan bir genden kodlanan alfa zinciri yaklaşık 33-35 kDa'dır ve 5 ekzondan oluşmaktadır. HLA-DRA ile ilişkili hastalıklar arasında Lassueur-Graham-Little Sendromu (saçlı deride skatrisyel alopesi ve gövdede yaygın foliküler papüllerle karakterize bir hastalıktır) ve Kalp lenfoması (Kanser hastalıkları, İmmün hastalıklar, Kardiyovasküler hastalıklar) bulunur (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HLA-DRA&keywords=DRA>). İnsanlar ve farelerde bu gen bölgesi hakkında detaylı çalışmalar mevcuttur (Poel ve ark., 1990; Lapaque ve ark., 2009). Büyük histokompatibilite kompleksi DRA lokusu, pek çok türde incelenmiş ve çok az varyasyon ya da hiç değişiklik bildirilmemiştir. Majör histokompatibilite kompleksi sınıf II lokusu açısından düşünüldüğünde bu önemli bir farklılıktır. Sığırlarda, DRA derinlemesine araştırılmamıştır ve bu lokustaki varyasyonun derecesi henüz bilinmemektedir.

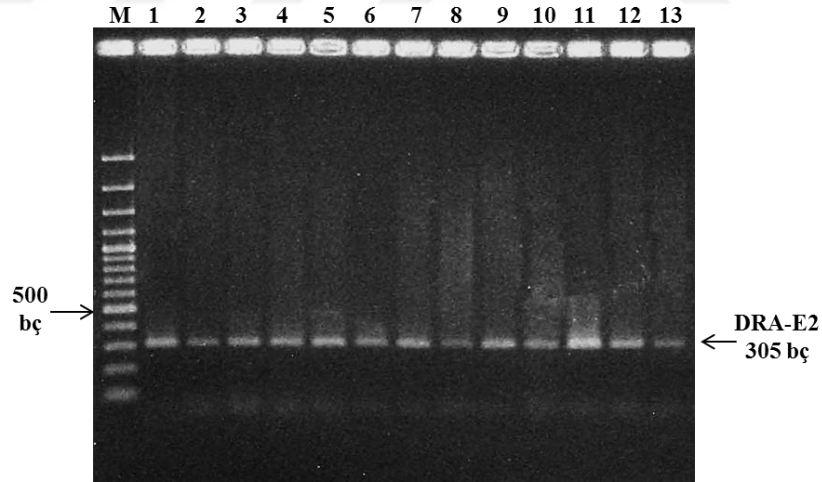
DRA bölgesi hem insanlarda hem de sığırlarda 5 ekzondan oluşmaktadır. İnsanlarda 765 baz uzunluğunda olgunlaşmış bir mRNA'dan 254 amino asitlik, moleküler ağırlığı 28606,92 Da ve pI değeri 4,91 olan bir proteindir. BoLA-DRA bölgesi sığırlarda, 23. Kromozomun (AC_000180.1) 23q21 bölgesinde, yaklaşık uzunluğu 4701 bp (25587526..25592227) olan linear bir gen bölgesidir. BoLA-DRA gen bölgesinden 253 amino asit uzunluğunda, moleküler ağırlığı yaklaşık 28407, 01 Da ve pI değeri 5,41 olan bir protein

kodlamaktadır. İlk 24 amino asit signal peptit bölgesini geriye kalan 229 aa olgunlaşmış polipeptidi oluştururken, 29→105 aa alfa domainin, 110→203 alfa immüoglobulin domainini ve 201→252 immüoglobulin C1-set domaini oluşturmaktadır (Aida ve ark., 1994; <http://web.expasy.org/protparam>; <http://www.uniprot.org>; <http://www.genecards.org>).

Şimdiye kadar, MHC-DRA dizisi Avrupa sığırlarında ve zebu, manda, koyun, keçi, eşek, domuz, kedi, fare, makat maymunu ve insanda bildirilmiştir (Hirsch ve ark., 1992; Subramanian ve ark., 2005; O'Conner ve ark., 2007; Ballingall ve ark., 2010; Vranova ve ark., 2011). Şu ana kadar, yerli sığır ırklarında MHC-DRA bölgesiyle iliği bir bilgi bildirilmemiştir. Bahsi geçen gen bölgesinin yerli kara sığır ırkındaki moleküler özelliklerinin belirlenmesi için tüm örneklerde PZR kullanılarak tarama gerçekleştirilmiştir.

4.6.1.1. DRA geninin PZR amplifikasyonu sonucu

Yerli kara sığır örneklerindeki BoLA-DRA gen bölgesini oluşturan ekzon II için 3.4.1'de bahsedilen şekilde dizayn edilen primerler kullanılarak (Çizelge 3.1) PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonu, 3.4.2'de detaylandırılan PZR şartları kullanılarak yapılmış ve çoğaltılan bölge % 1,5'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.43). Hedef bölge yaklaşık 305 bç (ekzon uzunlukları; 246 bç) uzunluğunda lineer bir bölgedir.

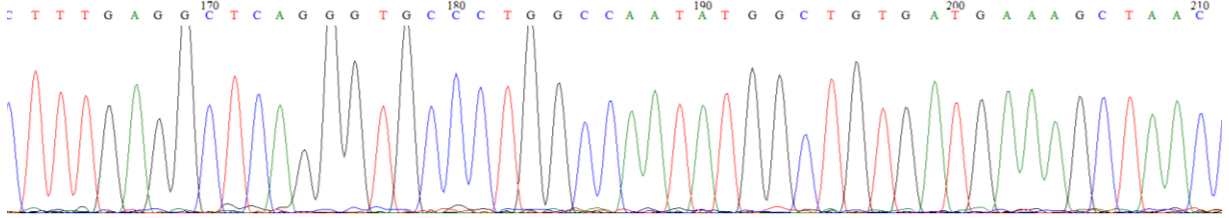


Şekil 4.43. YK1- 13. örneklerinde DRA-E2 bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı.

4.6.1.2. DRA-E2 nükleotid dizilenmesi ve amino asit dizi analizi

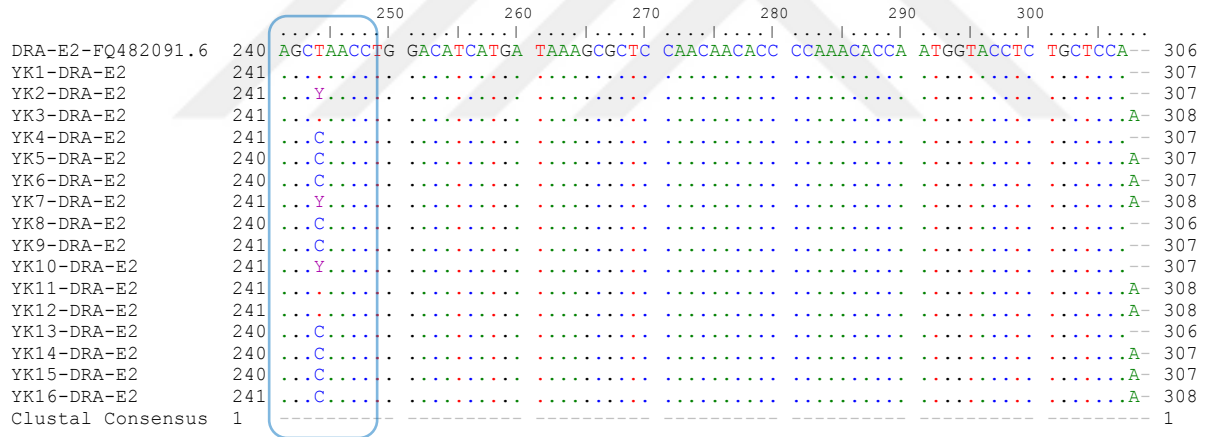
YK-DRA-E2 bölgesinin her iki zincirinde ileri ve geri primerleri kullanılarak nükleotid dizisi belirlenmiştir (305 bç). Tüm örneklerden elde edilen dizi bilgileri farklı formatlarda kaydedilmiştir. 3.6'da ayrıntılı bir şekilde bahsedildiği gibi hedef bölge için farklı

olarak düşünülen örneklerin kromatogramlarına bakılarak YK1-16-DRA-E2 şeklinde konsensüs dizileri belirlenmiştir (Şekil 4.44). Gen bölgesinin tam dizisi kullanılarak amino asit dizileri elde edilmiştir. Kümeleme işlemi ve nükleotid dizilerinin kromatogram pik yükseklikleri incelenerek elde edilen konsensüslerin nükleotid dizileri ek çizelge C.6'da ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 4.44. YK-DRA-E2 bölgesinin ileri primer ile elde edilen nükleotid dizisine ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir.

Konsensüs dizileri ve referans gen bölgesi öncelikle ClustalX programı yardımı ile Fasta, Phylip, Nexus ve Clustal formatlarında kaydedilmiştir. Daha sonrasında Bioedit ve Clustal Omega programı kullanılarak hizalanmış ve farklılıkları belirlenmiştir (Şekil 4.45).



Şekil 4.45. Referans DRA-E2 (FQ482091.6) ve YK-DRA-E2 bölgesinin konsensüs dizilerinin hizalanması.

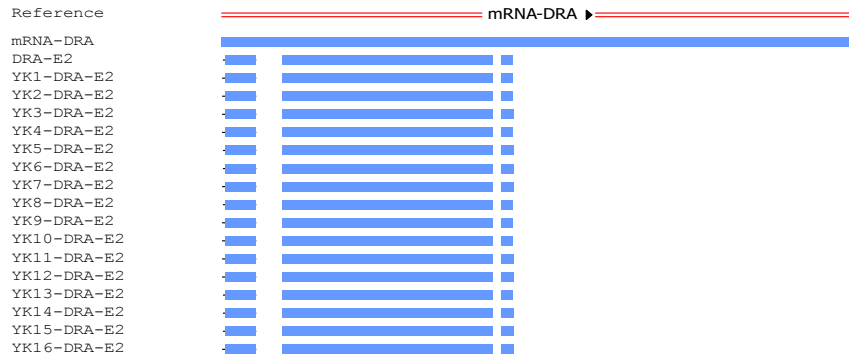
Hizalama işlemi sonunda intron bölgelerinin de içerisinde bulunduğu konsensüs dizilerinde en fazla farklılık YK-2-DRA-E2 nolu konsensüs dizisinde (2 nükleotid) gözlemlenirken, diğer dizilerde sadece 1 nükleotid farklılık belirlenmiştir. Bu sonuçta daha önceki çalışmaları doğrular niteliktedir (Zhou ve ark., 2007). Bu sonuçlar aşağıdaki 4.15 nolu çizelgede özetlenmiştir. Çizelge incelendiğinde YK-DRA-E2 bölgesinde genetik polimorfizmi ve alelik varyasyona sahip 4 polimorfik nükleotid farklılığının bulunduğu görülmüştür.

Çizelge 4.15. YK-DRA-E2 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.

Nükleotid Pozisyonları	100	244	Toplam Farklılık
Konsensüs	C	C	
DRA-E2-FQ482091.6	.	T	1
YK1-DRA-E2	.	T	1
YK2-DRA-E2	Y*	Y	2
YK3-DRA-E2	.	T	1
YK4-DRA-E2	.	.	1
YK5-DRA-E2	.	.	1
YK6-DRA-E2	.	.	1
YK7-DRA-E2	.	Y	1
YK8-DRA-E2	.	.	1
YK9-DRA-E2	.	.	1
YK10-DRA-E2	.	Y	1
YK11-DRA-E2	.	T	1
YK12-DRA-E2	.	T	1
YK13-DRA-E2	.	.	1
YK14-DRA-E2	.	.	1
YK15-DRA-E2	.	.	1
YK16-DRA-E2	.	.	1
Özet	1Y	5T,3Y	18

*Y: T veya C.

DRA-E2 için belirlenen konsensüs dizilerinde intron bölgelerinin uzaklaştırılması yapılmamıştır. Çünkü bu bölge için tasarlanan primer çifti hedef bölgedeki ekzon için spesifiktir. Daha sonrasında hedef bölgeden sentezlenen protein dizisindeki farklılıkları belirlemek için clone manager programında karşılaştırılarak amino asit dizileri belirlenmiştir (Şekil 4.46).



Şekil 4.46. Nükleotid konsensüs dizilerinden mRNA bölgesinin elde edilmesi ve aa dizilerinin belirlenmesi (Referans: mRNA-DRA, Ac. No. NM_001012677.1, YK1-16 konsensüs dizileri, mavi bölgeler ortak noktaları göstermektedir).

DRA-E2 nükleotid konsensüs dizileri kullanılarak elde edilen DRA-mRNA (762 bp uzunluğunda) dizilerinden yola çıkılarak 4 farklı haplotip belirlenmiştir (in silico). Belirlenen haplotiplere bakılarak bu gen bölgesi yönünden YK2,7 ve 10 nolu konsensüs dizilerin

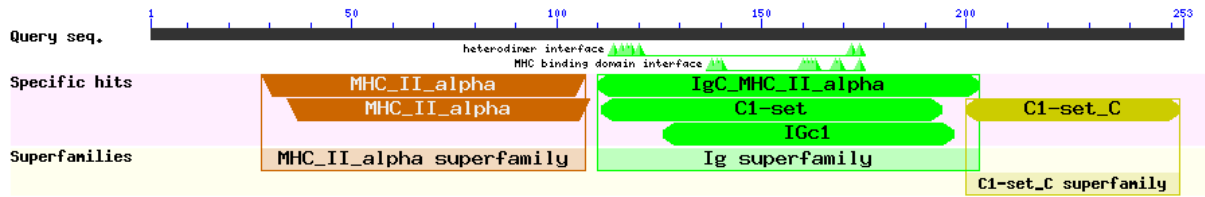
oluşturulduğu popülasyonlardaki bireylerde heterozigotluğun yaygın olarak görüldüğü belirlenmiştir (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16. DRA bölgesinden transkripte olan mRNA nükleotid dizisi

Nükleotid Pozisyonları	132	276	Toplam Farklılık
Konsensüs	C	C	
DRA-mRNA-NM_001012677.1	.	T	1
YK1-DRA-mRNA	.	T	1
YK2-DRA-mRNA	Y*	Y	2
YK3-DRA-mRNA	.	T	1
YK4-DRA-mRNA	.	.	1
YK5-DRA-mRNA	.	.	1
YK6-DRA-mRNA	.	.	1
YK7-DRA-mRNA	.	Y	1
YK8-DRA-mRNA	.	.	1
YK9-DRA-mRNA	.	.	1
YK10-DRA-mRNA	.	Y	1
YK11-DRA-mRNA	.	T	1
YK12-DRA-mRNA	.	T	1
YK13-DRA-mRNA	.	.	1
YK14-DRA-mRNA	.	.	1
YK15-DRA-mRNA	.	.	1
YK16-DRA-mRNA	.	.	1
Özet	1Y	5T,3Y	18

*Y: T veya C.

Elde edilen amino asit dizileri (253 aa uzunlukta) NCBI’da Blast yapılarak hedef bölge olduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.47). İlk 24 amino asit (1→24) signal peptit bölgesini, 29→105 aa alfa domainin, 110→203 alfa immüoglobulin domainini ve 201→252 immüoglobulin C1-set domaini oluşturmaktadır (Aida ve ark., 1994; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd>).



Şekil 4.47. YK1-DRA-PR’nin sahip olduğu, alfa, immunoglobülin ve C1-set domainleri.

Belirlenen YK-DRA haplotiplerinin oluşturduğu proteinlerinin NCBI Blast sonuçlarına göre; *Bos taurus*’dan eksprese olan MHC sınıf II DR alfa zincirine (Ac. No: NP_001012695.1) benzerlik oranı % 99-100 arasında bulunmuştur. Ayrıca YK1-16 DRA aa konsensüs dizilerinin moleküler ağırlığı 28407,01-28487,51 Da olarak hesaplanırken pI değeri 5,41 olarak belirlenmiştir. Amino asit pozisyonlarına bakıldığında; YK1-16 konsensüs dizilerinde belirlenen nükleotid farklılıklar hiçbir amino asit değişikliğine neden olmamıştır.

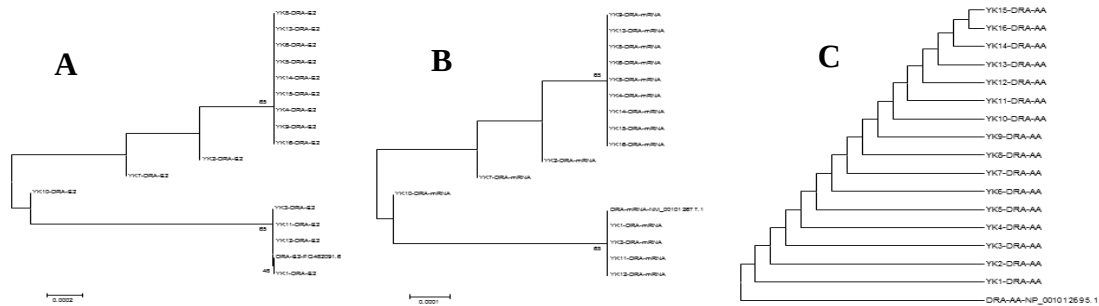
4.6.1.3. DRA-E2 bölgesinin filogenetik analizi

Yapılan çalışma ile yerli kara sığır ırkındaki BoLA-DRA bölgesinin, 2. ekzon bölgesine ait nükleotid dizileri ortaya çıkartılmıştır. Bu diziler kullanılarak NCBI daha önceden belirlenen *Ovis aries* (3 allel), *Bos taurus* (4 allel), *Bubalus bubalis* (16 allel), *Bos grunniens* (2 allel), *Bos indicus* (2 allel), *Bubalus depressicornis* (2 allel), *Bos javanicus* (1 allel), *Bos gaurus* (1 allel), *Capra hircus* (1 allel) ve *Bison bonasus* (1 allel) DRA allelleri ile beraber filogenetik analiz yapılmıştır. Yerli kara sığırının DRA-E2 bölgesinin dizi bilgileri analiz edilerek, DNA polimorfizm özellikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17. DRA-E2 bölgesinin dizisine göre DNA polimorfizm özellikleri

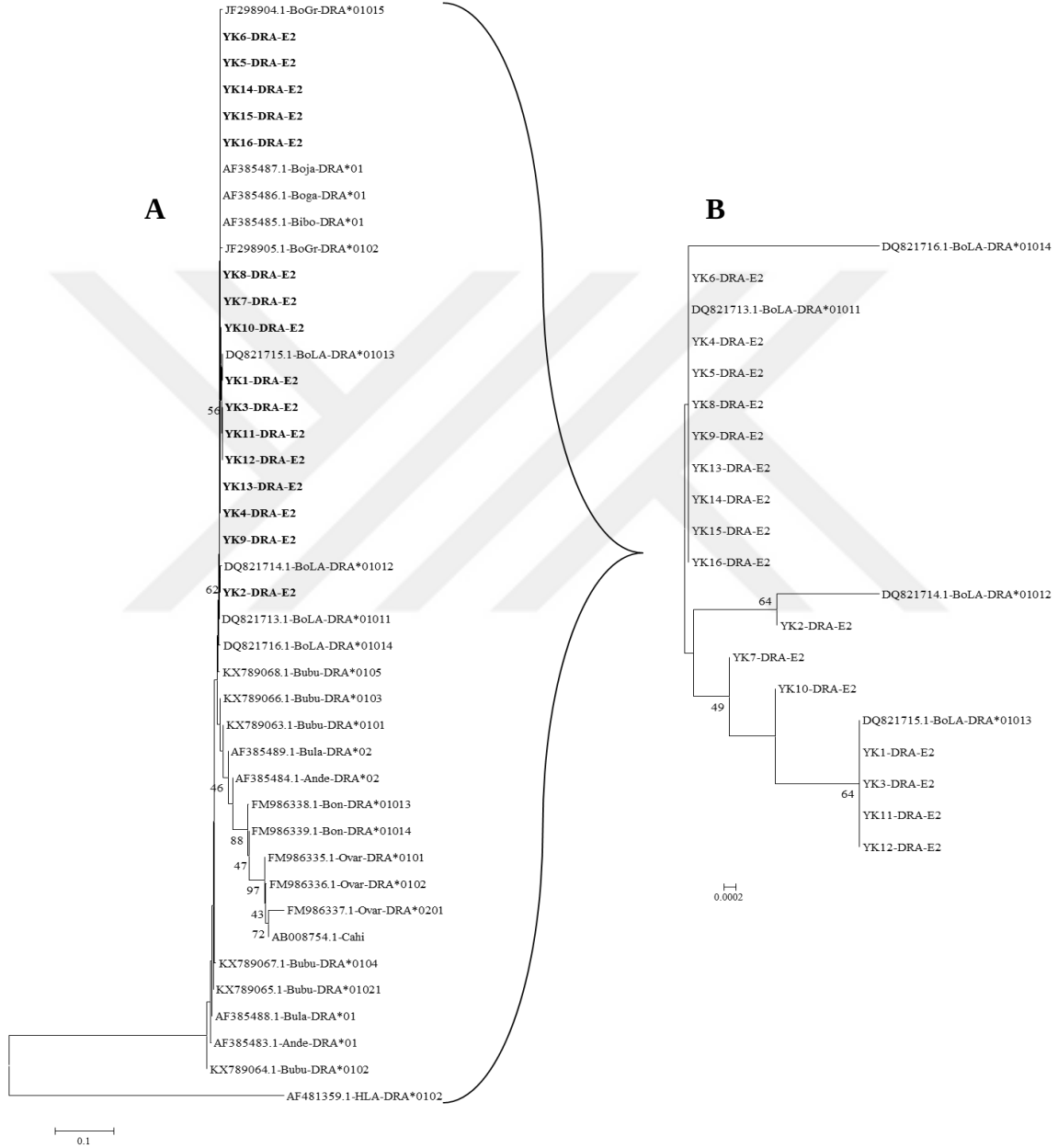
Özellikler	Genel
Toplam Bölge Sayısı	18
G+C	48,53
Polimorfik Bölge Sayısı (s)	2
Haplotip Sayısı (h)	4
Haplotip Farklılığı (Hd)	0,586 ± 0,079
Nükleotid Farklılığı (Pi)	0,00221 ± 0,00040

Yerli karada toplam 18 farklı bölge belirlenirken, bu bölgelerin 2 tanesini polimorfik olduğu ve haplotip sayısının 4 olduğu tespit edilmiştir. Yerli kara sığırlarında, DRA-E2 bölgesi yönünden haplotip farklılığı $0,586 \pm 0,079$ olarak, nükleotid farklılığı $0,00221 \pm 0,00040$ olarak hesaplanmıştır. Yerli karalardaki haplotipler arasındaki genetik uzaklıklar 0,0033-0,0066 (ortalaması: 0,0022) arasında bulunmuştur. Yerli kara DRA konsensüs dizileri filogenetik ilişkileri bakımından referans diziye göre (nükleotid için FQ482091.6 ve mRNA için NM_001012677.1) nükleotid için %20 ve mRNA dizisi için %10 bootstrap test değeri belirlenmiştir (Şekil 4.48 A, B ve C).



Şekil 4.48. BoLA-DRA konsensüs dizilerinin filogenetik ağaçları. Yerli kara BoLA-DRA allellerinin sırasıyla 307 bp'lik nükleotid dizileri, 762 bp'lik mRNA dizileri ve 253 amino asit uzunluğundaki dizilerin oluşturduğu Neighbor-joining ağaçları (A, B ve C).

MHC-DRA'nın araştırılan tüm türlerde korunduğu gözlemlenmiştir (Sun ve ark., 2014). Şekil 4.49 (A)'daki fiolgenetik ağacın topolojisine bakıldığında şimdiye kadar ruminantlarda belirlenen DRA allelerinin (NCBI) bir clade'da toplandığı görülmektedir. Yerli kara sığırlarında belirlenen allelerinde, diğer MHC genlerine göre polimorfik bölgelerindeki eksiklik, bu gen bölgesinin korunduğu fikrini destekler niteliktedir.



Şekil 4.49. Yerli kara ve NCBI'de bulunan DRA allellerinin [(*Ovis aries* (Ovar), *Bos taurus* (BoLA), *Bubalus bubalis* (Bubu), *Bos grunniens* (BoGr), *Bos indicus* (Boin), *Bubalus depressicornis* (Ande), *Bos javanicus* (Boja), *Bos gaurus* (Boga), *Capra hircus* (Cahi) ve *Bison bonasus* (Bibo)] filogenetik ağacı (A). *Bos taurus* (BoLA) ve yerli kara sığırlarında gözlenen DRA allellerinin filogenetik ağacı (B). Ağacı köklendirmek için HLA-DRA dizisi kullanılmıştır. Bu çalışmada elde edilen alleller koyu renkle gösterilmiştir.

Bos taurus (BoLA-DRA) ırkında şüana kadar 4 farklı allel belirlenmiştir (Zhou ve ark., 2007). Bu allelerin tamamı yerli kara sığır ırkında görölmüştür (Şekil 4.49 (B)).YK4, 5, 6, 8, 9, 13, 14, 15 ve 16 konsensüs dizileri BoLA-DRA*01011 alleli ile benzerken, YK1, 3, 11 ve 12 dizileri BoLA-DRA*01013 alleli ile benzer bulunmuştur. Dikkat çeken nokta YK2, YK7 ve YK10 nolu konsensüs dizilerinde belirlenen heterozigotluk ve bu heterozigotluğun korunuyor olmasıdır. YK1-16 konsensüs dizilerinde belirlenen SNP'nin tümü aynıydı ve sığır DRA molekülünün alfa alanında herhangi bir amino asit polimorfizmi belirlenememiştir. Bununla birlikte, bu SNP'nin işlevsel önemi göz ardı edilemez çünkü kodlama bölgelerindeki mutasyonların tek başına veya aynı transkript içerisindeki diğer mutasyonlarla kombinasyon halinde mRNA stabilitesini ve translasyonunu etkileyerek, fonksiyonel etkilere neden olabileceği rapor edilmiştir (Duan ve ark., 2003). Buna ek olarak belirlenen SNP, işlevsel veya yapısal önemi olan diğer DR gen bölgelerindeki varyasyonla bağlantılı olabilir. Ayrıca immün yanıtta MHC genlerinin rolünü belirlemek için MHC polimorfizminin doğal oluşumunu daha iyi anlamak önemlidir. Bu açıdan DRA gen bölgesinin farklı sığır ırklarında da korunup korunmadığının ortaya çıkartılması gereklidir.

Bu çalışmada, YK-DRA'daki polimorfik bölgelerin eksikliği, yalnızca ruminantlarda değil, aynı zamanda tüm memeli türleri içinde korunan DRA geniyle tutarlıdır. Bu bölge, benzer patojenlere ait ortak antijenik bölgelerin veya türlerin çoğunda ortak olabilecek çok spesifik antijenlerin tanımlanması için kullanılıyor olabilir. Ayrıca DRA geninin yerli kara da dahil olmak üzere ruminantlarda ki yakın benzerliği, geviş getirenlerin benzer seleksiyon baskısına maruz kaldığını gösterebilir. Kısaca özetlemek gerekirse yerli kara sığır ırkından DRA geni ilk kez karakterize edilmiştir. YK-DRA'nın, özellikle memelilerin çoğunda olduğu gibi, ekzon 2'nin oldukça korunmuş olduğunu gözlemlenmiştir.

4.6.2. BoLA-DRB2 gen bölgesi ve yerli kara sığırında DRB2 bölgesinin nükleotid dizilenmesi

BoLA sınıf II histokompatibilite molekülü, heterodimer beta zinciri tip iki veya kısaca BoLA-DRB2 geni, tıpkı BoLA-DRA'da olduğu gibi sınıf II bölgesi beta zinciri paraloglarına ait, düşük seviyede ekspresyon olan beta1 domaininin 19 pozisyonundaki glikosilasyon bölgesinden yoksun, monomorfik bir gen bölgesidir (Takeshima ve Aida, 2006). İnsanlarda fonksiyonel 5 farklı tipte HLA-DRB (1-5) gen bölgesi gözlemlenirken, sığırlarda bir DRA gen bölgesine karşılık en az üç BoLA-DRB (1-3) locisi bulunur. Bu bölgelerden sadece tek bir DRB geni (BoLA-DRB3) fonksiyonel ve polimorfiktir. İnsanlarda HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 ve -DRB5'de ekspresyon gözlemlenirken, HLA-DRB2, -DRB6, -DRB7, -DRB8 ve -

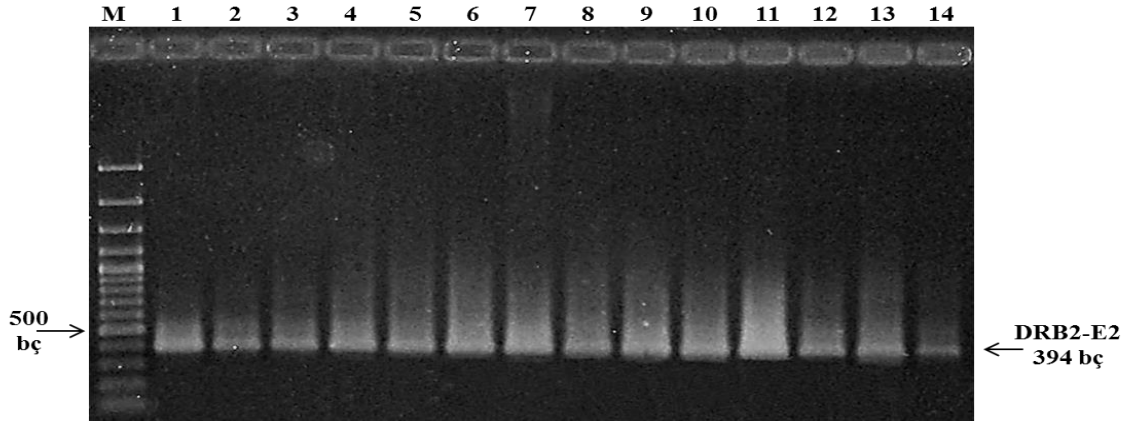
DRB9, 5 adet ilgili sessiz gen vardır (<http://www.genecards.org>). Bunun aksine sığırlarda BoLA-DRB1 geni ekspresyon olmayan bir sessiz gen (çoklu stop kondonları veya erken stop kodonlarına sahip gen bölgeleri) iken, BoLA-DRB2 geni zayıf ekspresyona sahip ve bazı polimorfizmler sergileyen bir gen bölgesidir (Burke ve ark., 1991; Russell ve ark., 1994). Holstein-Frizye sığırında (Siyah-Alaca) sığır lösemi virüsü enfeksiyonunun subklinik ilerlemesi ile BoLA sınıf II haplotiplerinin ilişkisini gösteren bir çalışmada, kalıcı lenfositozu (PL) direnci ile DQA*3A-DQB*3A-DRB2*2A-DRB3.2*11 haplotipi arasında önemli ve mutlak bir ilişkinin yanında düşük lenfosit sayısı ile bağlantılı olduğu belirlenirken, aynı çalışmada DQA*12-DQB*12-DRB2*3A-DRB3.2*8 haplotipinin PL yatkınlık ve yüksek lenfosit sayıları ile ilişkili bulunmuştur (Zanotti ve ark., 1996). Bu açıdan düşünüldüğünde DRB2'nin diğer gen bölgelerine etkilerinin ortaya çıkartılması son derece önemlidir.

BoLA-DRB2 bölgesi 6 ekzondan oluşan, 23. Kromozomun (AC_000180.1) üzerinde yaklaşık uzunluğu 20793 bç (25539597..25560389) olan linear bir gen bölgesidir. BoLA-DRB2 gen bölgesinden 320 amino asit uzunluğunda, moleküler ağırlığı yaklaşık 36737,29 Da ve pI değeri 8,17 olan bir protein kodlanmaktadır. Bu proteinin, 96→167 amino asitlik bölgesi beta domainin kodlarken, 180→273 amino asitlik bölge immünoglobulin domainini oluşturmaktadır (Muggli-Cockett ve Stone, 1989; Aida ve ark., 1995; <http://www.uniprot.org>; <http://web.expasy.org>).

Bahsi geçen gen bölgesinin yerli kara sığır ırkındaki moleküler özelliklerinin belirlenmesi için tüm örneklerde PZR kullanılarak tarama gerçekleştirilmiştir.

4.6.2.1. DRB2 geninin PZR amplifikasyonu sonucu

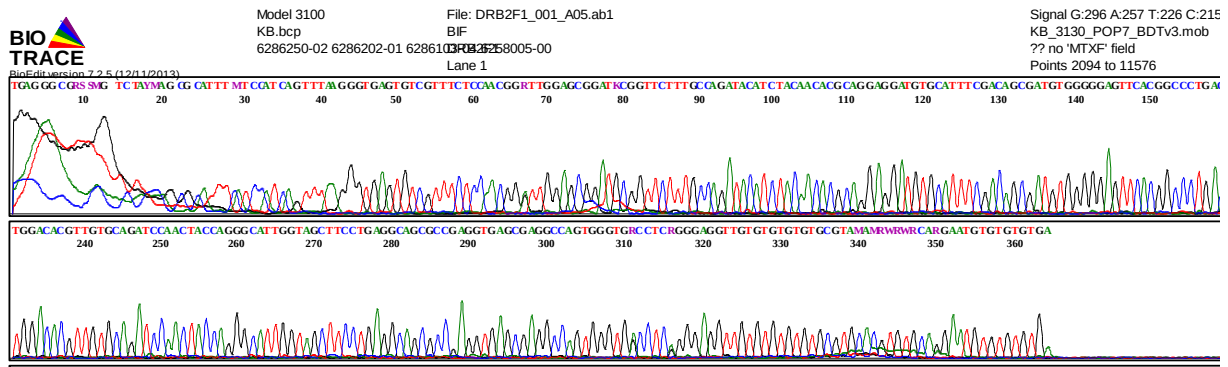
Yerli kara sığır örneklerindeki BoLA-DMB gen bölgesini oluşturan ekzon II için 3.4.1'de bahsedilen şekilde dizayn edilen primerler kullanılarak (Çizelge 3.1) PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonu, 3.4.2'de detaylandırılan PZR şartları kullanılarak yapılmış ve çoğaltılan bölge % 1,5'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.50). Hedef bölge yaklaşık 394 bç (ekzon uzunluğu; 270 bç) uzunluğunda lineer bir bölgedir.



Şekil 4.50. YK1-14. örneklerinde DRB2-E2 bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı.

4.6.2.2. DRB2-E2 nükleotid dizilenmesi ve amino asit dizi analizi

YK-DRB2-E2 bölgesinin her iki zincirinde ileri ve geri primerleri kullanılarak nükleotid dizisi belirlenmiştir (394 bç). Tüm örneklerden elde edilen dizi bilgileri farklı formatlarda kaydedilmiştir. 3.6’da ayrıntılı bir şekilde bahsedildiği gibi hedef bölge için farklı olarak düşünülen örneklerin kromatogramlarına bakılarak YK1-16-DRB2-E2 şeklinde konsensüs dizileri belirlenmiştir (Şekil 4.51). Gen bölgesinin tam dizisi kullanılarak amino asit dizileri elde edilmiştir. Kümeleme işlemi ve nükleotid dizilerinin kromatogram pik yükseklikleri incelenerek elde edilen konsensüslerin nükleotid dizileri ek çizelge C.7’de ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 4.51. YK-DRB2-E2 bölgesinin ileri primer ile elde edilen nükleotid dizisine ait kromatogram görüntüsünün tamamı örnek olarak gösterilmiştir.

Konsensüs dizileri ve referans gen bölgesi öncelikle ClustalX programı yardımı ile Fasta, Phylip, Nexus ve Clustal fromatlarında kaydedilmiştir. Daha sonrasında Bioedit ve Clustal Omega programı kullanılarak hizalanmış ve farklılıkları belirlenmiştir (Şekil 4.52).

		90	100	110	120	130	140	150	160	
DRB2-E2-FQ482091.6	81	GTGTCGTTTC	TCCAACGGGT	TGGAGCGGAT	GCGGTTCTTT	GCCAGATACA	TCTACAACAC	GCAGGAGGAT	GTGCATTTCG	160
YK1-DRB2-E2	58		R.							137
YK2-DRB2-E2	59									138
YK3-DRB2-E2	81			R.						160
YK4-DRB2-E2	80			R.					Y.	159
YK5-DRB2-E2	81			R.						160
YK6-DRB2-E2	56									135
YK7-DRB2-E2	79								Y.	158
YK8-DRB2-E2	80									159
YK9-DRB2-E2	59			R.					Y.	138
YK10-DRB2-E2	59									138
YK11-DRB2-E2	59			R.						138
YK12-DRB2-E2	58									137
YK13-DRB2-E2	60			R.					Y.	139
YK14-DRB2-E2	60			R.					Y.	139
YK15-DRB2-E2	78			R.					Y.	157
YK16-DRB2-E2	81									160

Şekil 4.52. Referans DRB2-E2 (FQ482091.6) ve YK-DRB2-E2 bölgesinin konsensüs dizilerinin hizalanmasının bir kısmı

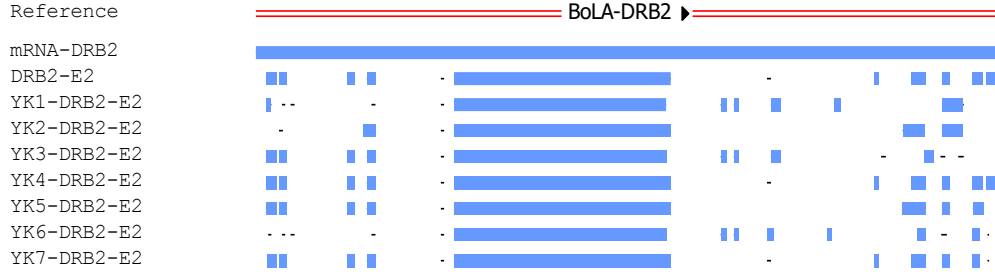
Hizalama işlemi sonunda intron bölgelerinin bir kısmında içerisinde bulunduğu konsensüs dizilerinde en fazla farklılık YK14-DRB2-E2 nolu konsensüs dizisinde (4 nükleotid), en az farklılık ise YK-2,5,7,11,12 ve YK16-DRB2-E2 nolu konsensüs dizilerinde (1 nükleotid) gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar aşağıdaki 4.18 nolu çizelgede özetlenmiştir. Çizelge incelendiğinde YK-DRB2-E2 bölgesinde genetik polimorfizmi ve alelik varyasyona sahip 11 polimorfik nükleotid farklılığın bulunduğu görülmüştür. Ayrıca 107, 159 ve 270 nükleotid pozisyonlarda heterozigotlugin yaygın olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.18. YK-DRB2-E2 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.

Nükleotid Pozisyonları	54	99	107	159	183	214	270	335	343	348	382	Toplam Farklılık
Konsensüs	G	G	G	C	G	G	G	A	G	G	G	
DRB2-E2- FQ482126.2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK1-DRB2-E2	.	R*	.	.	.	R	.	.	A	.	.	3
YK2-DRB2-E2	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	1
YK3-DRB2-E2	R	.	R	.	.	.	.	.	A	.	.	3
YK4-DRB2-E2	.	.	R	Y	.	.	R	.	.	.	.	3
YK5-DRB2-E2	.	.	.	.	.	.	.	M*	.	.	.	1
YK6-DRB2-E2	.	.	.	.	.	A	.	.	.	A	.	2
YK7-DRB2-E2	.	.	.	Y*	.	.	.	.	.	.	.	1
YK8-DRB2-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK9-DRB2-E2	.	.	R	Y	.	Y	.	.	A	.	.	3
YK10-DRB2-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK11-DRB2-E2	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	1
YK12-DRB2-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	1
YK13-DRB2-E2	.	.	R	Y	.	.	R	.	.	.	.	3
YK14-DRB2-E2	.	.	R	Y	.	.	R	.	.	.	R	4
YK15-DRB2-E2	.	.	R	Y	.	.	R	.	.	.	.	3
YK16-DRB2-E2	.	.	.	.	S*	.	.	.	.	.	.	1
Özet	1R	1R	7R	6Y	1S	1A,1R	4R	1C,1M	4A	1A	1R	30

*R: G veya A, Y: T veya C, S: G veya C, M: A veya C.

DRB2-E2 için belirlenen konsensüs dizilerinde intron bölgelerinin uzaklaştırılmıştır. Daha sonrasında hedef bölgeden sentezlenen protein dizisindeki farklılıkları belirlemek için clone manager programında karşılaştırılarak amino asit dizileri belirlenmiştir (Şekil 4.53).



Şekil 4.53. Nükleotid konsensüs dizilerinden DRB2-mRNA bölgesinin elde edilmesi ve aa dizilerinin belirlenmesi (Referans: mRNA-DRA, Ac. No. XM_015468908.1, YK1-16 konsensüs dizileri, mavi bölgeler ortak noktaları göstermektedir).

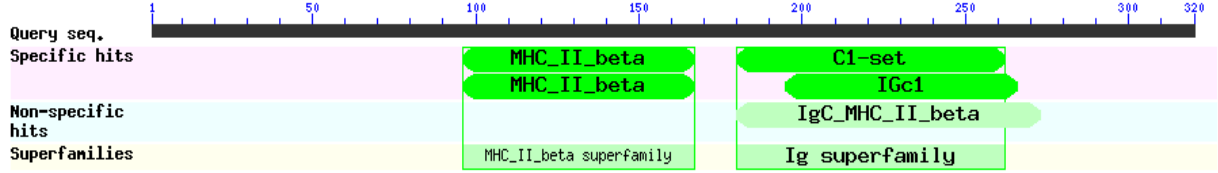
DRB2-E2 nükleotid konsensüs dizileri kullanılarak elde edilen DRB2-mRNA (964 bp uzunluğunda) dizilerinden yola çıkılarak 10 farklı haplotip belirlenmiştir (in silico). Belirlenen haplotiplere bakılarak bu gen bölgesi yönünden YK1, 3, 4, 9, 11, 13, 14, 15 ve 16 nolu konsensüs dizilerin oluşturulduğu popülasyonlardaki bireylerde heterozigotluğun yaygın olarak görüldüğü belirlenmiştir (Çizelge 4.19). Ayrıca yerli kara sığır ırkındaki DRB2-E2 bölgesinde (YK3-16) üçlü nükleotid dizisi olan A,C ve G (pozisyon 259, 260 ve 262)'nin bir çok örnekte korunmuş olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.19. DRB2 bölgesinden transkripte olan mRNA nükleotid dizisi

Nükleotid Pozisyonları	259	260	262	264	309	317	369	393	424	480	533	534	Toplam Farklılık
Konsensüs	A**	C**	G**	G	G	G	C	G	G	G	G	T	
DRB2-mRNA-XM_015468908.1	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	T	G	5
YK1-DRB2-mRNA	C	A	C	.	R	.	.	.	R	.	T	G	7
YK2-DRB2-mRNA	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3
YK3-DRB2-mRNA	.	.	.	R*	.	R	.	.	.	.	T	G	4
YK4-DRB2-mRNA	.	.	.	.	.	R	Y*	.	.	R	.	.	3
YK5-DRB2-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK6-DRB2-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	T	G	3
YK7-DRB2-mRNA	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	1
YK8-DRB2-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK9-DRB2-mRNA	.	.	.	.	.	R	Y	.	.	.	.	.	2
YK10-DRB2-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK11-DRB2-mRNA	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	1
YK12-DRB2-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK13-DRB2-mRNA	.	.	.	.	.	R	Y	.	.	R	.	.	3
YK14-DRB2-mRNA	.	.	.	.	.	R	Y	.	.	R	.	.	3
YK15-DRB2-mRNA	.	.	.	.	.	R	Y	.	.	R	.	.	3
YK16-DRB2-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	S*	.	.	.	.	1
Özet	3C	3A	3C	1R	1R	7R	6Y	1S	1A, 1R	4R	4T	4G	39

*R: G veya A, Y: T veya C, S: G veya C. **Farklılık arz eden bölge.

Elde edilen amino asit dizileri (320 aa uzunlukta) NCBI’da Blast yapılarak hedef bölge olduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.54). 96→167 amino asitlik bölgesi beta domaininden ve 180→273 amino asitlik bölge ise immünoglobulin domainini oluşturmaktadır (Aida ve ark., 1995; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd>).

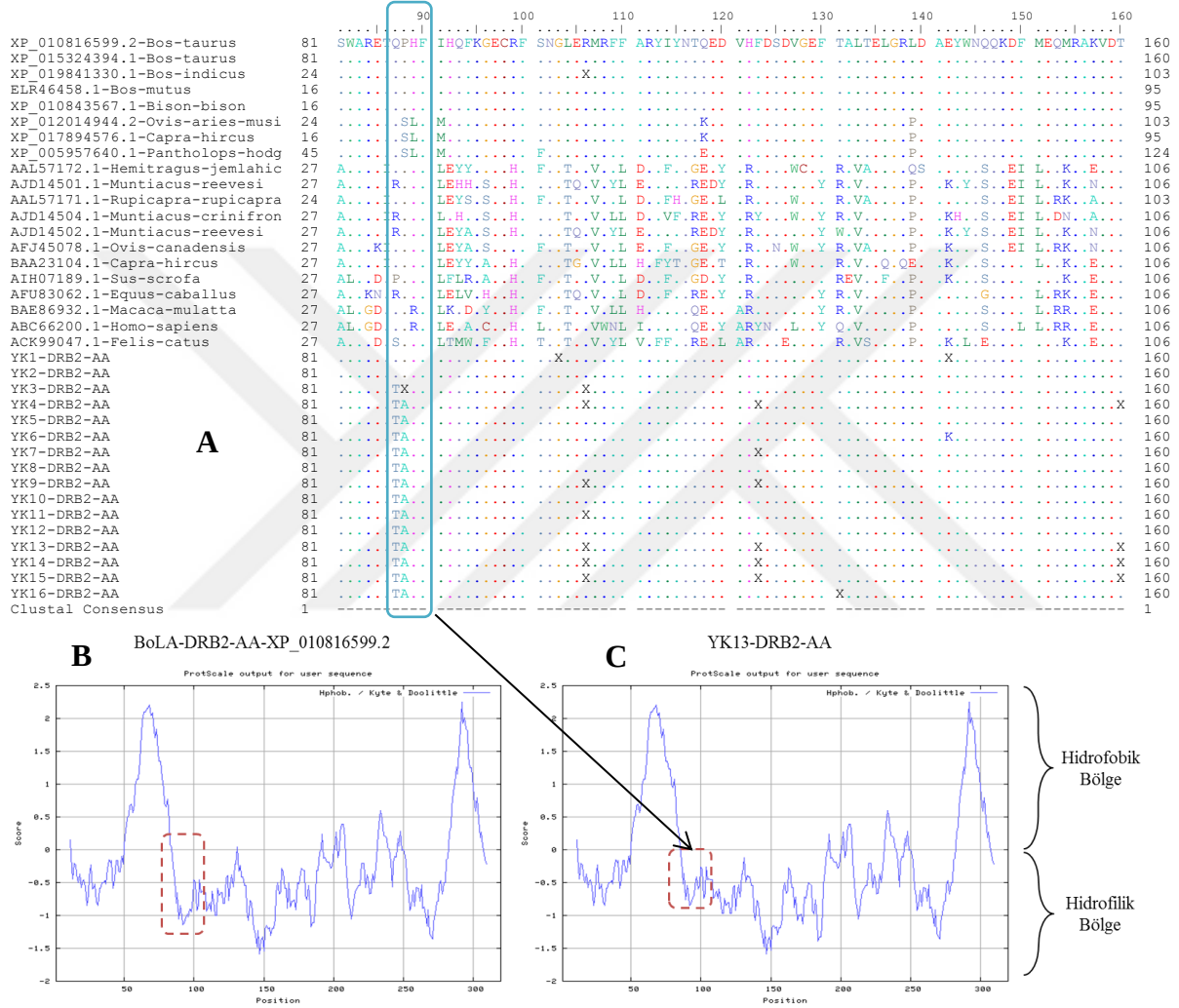


Şekil 4.54. YK13-DRB2-PR’nin sahip olduğu, beta ve immünoglobülin domainleri.

Belirlenen YK-DRB2 haplotiplerinin oluşturduğu proteinlerinin NCBI Blast sonuçlarına göre; *Bos taurus*’dan düşük seviyede eksprese olan MHC sınıf II DM beta zincirine (Ac. No: XP_010816599.2) benzerlik oranı %98-99 arasında bulunmuştur. Ayrıca belirlenen haplotiplerin moleküler ağırlığı 36561,44-36773,78 Da arasında değişirken (YK1-YK16), pI değerleri 7,71-8,46 olarak hesaplanmıştır. Amino asit pozisyonlarına bakıldığında, 87. pozisyonda bulunan polar bir amino asit ve hidropati indeksi -3,5 olan glutamin yerine treonin (polar, hidropati indeksi; -0,7) gelirken, 88. pozisyonda bulunan prolin (hidropati indeksi; -1,6) yerine alanin (hidropati indeksi; +1,8) ve 178. pozisyonda bulunan valin (hidropati indeksi; +4,2) yerine glisin (hidropati indeksi; -0,4) gelmesidir. Bu amino asit değişikliğinin en önemli sonucu, yerli kara sığırlarına özgün oluşlarıdır. Ayrıca bu amino asit değişiklikler YK-DRB2 molekülünün hidrofobikliğini artırmaktadır (Şekil 4.55). Hidropati indeksi için ProtScale online programından yararlanılmıştır (Kyte ve Doolittle, 1982; <http://web.expasy.org/protscale/>).

Her MHC sınıf II proteini, MHC bölgesindeki genler tarafından kodlanan bir alfa ve bir beta zincirini içerir. Bu protein zincirleri iki hücre dışı alandan oluşur. Bunlardan ilki olan ve polimorfikliğinin yaygın olduğu alfa 1 ve beta 1 bölgeleridir. İkincisi yaklaşık 94 amino asit uzunluğundaki alfa 1 ve beta 1 bölgesine göre daha fazla korunmuş olan alfa 2 ve ya beta 2 bölgeleridir. Bunlarla birlikte yaklaşık 36 amino asitlik bir transmembran bölgesi, kısa bir karboksil terminali ve yaklaşık 12 amino asitlik sitoplazmik bir alan daha bulunmaktadır (Muggli-Cockett ve Stone, 1991). Bu alanların her biri farklı ekzonlar tarafından kodlanır ve bu yapılarıdaki değişiklik protein konformasyonlarına neden olabilmektedir. İmmün sistem ile bağlantılı bu bölgelerdeki değişiklik hastalıklara karşı verilen tepkinin şiddetini etkileyebilmektedir. Yerli kara sığırındaki (87 ve 88 pozisyonundaki amino asitler) Treonin-Alanin bölgesi beta 1 bölgesinin (10-90 aa’lık ilk bölge) bitiş bölgesinde bulunurken, Glisin

bölgesinin de beta 2 bölgesinin bitiş bögesinde (100-180 aa'lık ikinci bölge) bulunması, DRB2 molekülünü oluşturan proteinin katlanmasında bir değişikliğe sebep olabileceği ön görülmüştür. Hidrofobik amino asitler proteinlerin 3D yapısına dahil olma eğilimindedirler (Betts ve Russell, 2003). Ayrıca bu bölgeden görülen yaygın bir hastalığa karşı direnç ile ilişkili olabileceği veya diğer MHC moleküllerine destek niteliğinde korunuyor olması muhtemeldir.



Şekil 4.55. Farklı türlerdeki DRB2 gen bölgesinden kodlanan tahmini amino asit dizisinin hizalanması ve yerli karadan elde edilen YK-DRB2 gen bölgesindeki korunan bölgeler (A), Bos taurus BoLA-DRB2 (Ac. No: XP_010816599.2) ve YK-DRB2 amino asit dizilerinin hidropati indeksi ve farklılıkları (B ve C).

Dünyada subtropikal bölgelerde ve Türkiye’de yaygın bir şekilde, büyükbaş hayvanlarda görülen Babesiosis; *Ixodes ricinus* kenesi ile taşınan başlıca parazit olan *Babesia divergens*, *Babesia bovis* ve *Babesia bigemina* olan bir hastalıktır (Hoffmann ve ark., 1971; Delbecq ve ark., 2006). Avrupa’da, *Babesia divergens*, et ve süt endüstrilerinde ekonomik kayıplara neden olan bir hastalıktır (Kuttler, 1988). Bahsi geçen bu hastalıkla ilişkili bir

çalışmada, rekombinat proteinlerin kullanımı ve bu proteinlerdeki hidrofobik bölgelerin varlığı, sığırlarda görülen bu hastalığa karşı koruyucu bir bağışıklık sağladığı vurgulanmıştır. Hidrofobik etkinin koruyucu antikorların üretilmesine yönelik bağışıklık tepkisini yönlendirebilir olabileceği ve hastalıklara karşı koruyucu bağışıklık tepkisinin özelliklerinin belirlenmesi, diğer paraziter protozoalara karşı aşılarda geliştirilmesi için yararlı olabileceği belirtilmiştir (Delbecq ve ark., 2006). Sonuç olarak, farklı sığır ırklarındaki koruyucu bağışıklık tepkisi oluşturmak için hidrofobik etkinin belirlenmesi önemli olabilir.

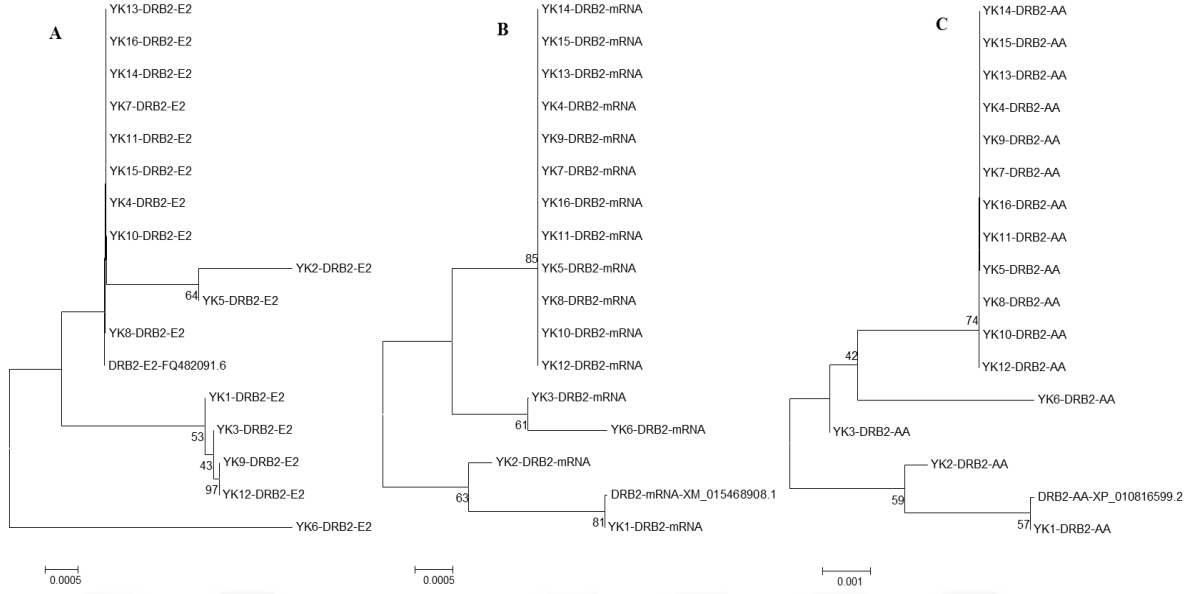
4.6.2.3. DRB2-E2 bölgesinin filogenetik analizi

Çalışmanın bu kısmında yerli kara sığır ırkındaki BoLA-DRB2-E2 bölgesinin nükleotid dizileri belirlenmiştir. Bu diziler kullanılarak NCBI’da daha önceden belirlenen BoLA-DRB2 gen bölgeleri ile beraber filogenetik analiz yapılmıştır. Yerli kara sığırının DRB2-E2 bölgesinin dizi bilgileri analiz edilerek, DNA polimorfizm özellikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.20). Yerli karada toplam 30 farklı bölge belirlenirken, bu bölgelerin 10 tanesini polimorfik olduğu ve haplotip sayısının 20 olduğu tespit edilmiştir. Yerli kara sığırlarında, DRB2-E2 bölgesi yönünden haplotip farklılığı $0,931 \pm 0,013$ olarak, nükleotid farklılığı $0,00595 \pm 0,00036$ olarak hesaplanmıştır. Yerli karalardaki haplotipler arasındaki genetik uzaklıklar 0,0025-0,0197 (ortalaması: 0,0060) arasında bulunmuştur.

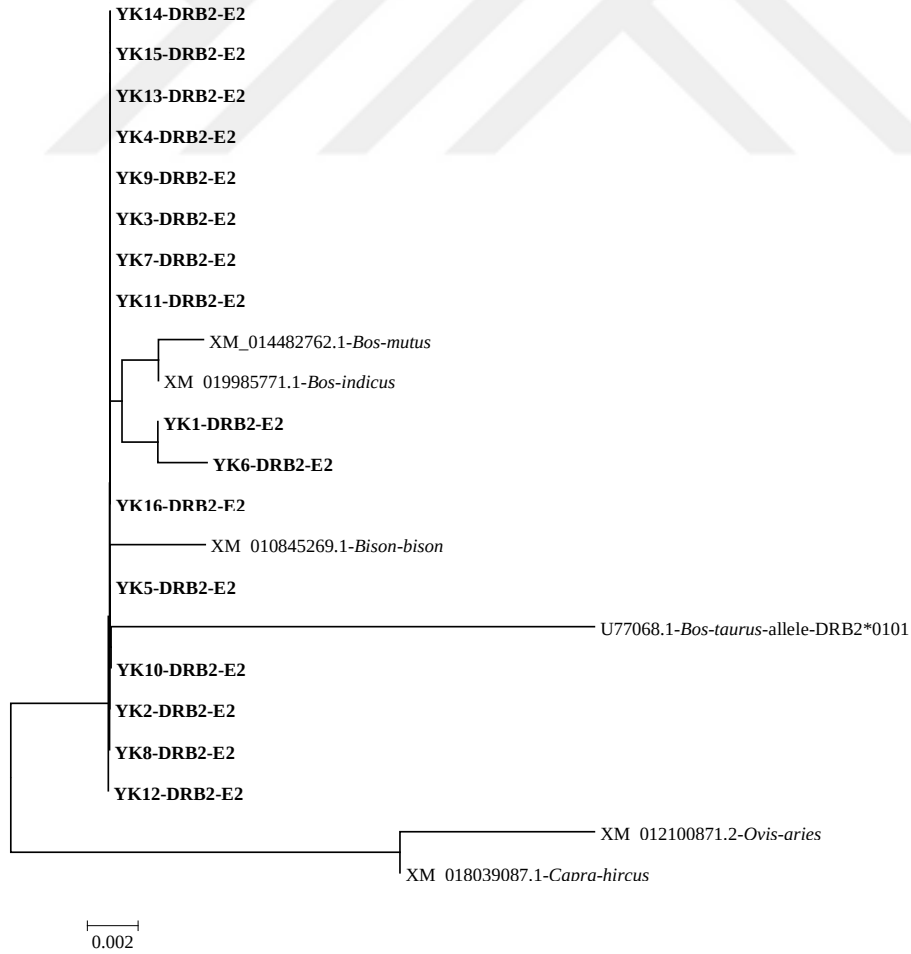
Çizelge 4.20. DRB2-E2 bölgesinin dizisine göre DNA polimorfizm özellikleri

Özellikler	Genel
Toplam Bölge Sayısı	30
G+C	57,22
Polimorfik Bölge Sayısı (s)	10
Haplotip Sayısı (h)	20
Haplotip Farklılığı (Hd)	$0,931 \pm 0,013$
Nükleotid Farklılığı (Pi)	$0,00595 \pm 0,00036$

Yerli kara sığır ırkı için oluşturulan filogenetik ağaçlar Neighbor-Joining (NJ) yöntemi, Jukes–Cantor modeli ve Bootstrap metoduna (1000) dayanmaktadır. Konsensüs dizileri filogenetik ilişkileri bakımından referans diziye göre (nükleotid için FQ482091.6, mRNA için XM_015468908.1 ve aa için XP_010816599.2) nükleotid ve amino asit dizisi ayırımındaki bootstrap test değeri %50 hesaplanırken mRNA dizisi %10 şeklinde belirlenmiştir (Şekil 4.56).



Şekil 4.56. BoLA-DRB2 konsensüs dizilerinin filogenetik ağaçları. Yerli kara BoLA-DRB2 allelerinin sırasıyla 394 bç'lik nükleotid dizileri, 964 bç'lik mRNA dizleri ve 320 amino asit uzunluğundaki dizilerin oluşturduğu Neighbor-joining ağaçları (A, B ve C).



Şekil 4.57. Yerli kara ve diğer türlerdeki DRB2 bölgelerinin filogenetik ağacı.

BoLA-DRB2 dizileri yerli kara sığırında ilk tanımlama olduğundan, NCBI'daki Bovidae ailesi DRB2 nükleotid dizleri arasındaki genetik ilişki filogenetik ağaç ile araştırılmıştır. NJ ağacının sonuçlarına göre yerli kara DRB2 bölgesi *Bos taurus* (Ac. No: U77068.1-allele-DRB2*0101) *Bos indicus* (Ac. No: XM_019985771.1) *Bos mutus* (Ac. No: XM_014482762.1) ve *Bison bison* (Ac. No: XM_010845269.1)'daki bölgelerle aynı clade bulunması, YK-DRB2 konsensüs dizilerinin oluşturan allellerin DRB2'yi temsil ettiğinin açıkça göstermektedir (Şekil 4.57).

4.6.3. BoLA-DRB3 gen bölgesi ve yerli kara sığırında DRB3 bölgesinin nükleotid dizilenmesi

BoLA sınıf II histokompatibilite molekülü, sınıf II heterodimer DR beta zinciri tip üç veya kısaca BoLA-DRB3 geni, tıpkı BoLA-DRB2'de olduğu gibi sınıf II bölgesi beta zinciri paraloglarına aittir. İnsanlarda fonksiyonel 5 farklı tipte HLA-DRB (1-5) gen bölgesi gözlemlenirken, sığırlarda bir DRA gen bölgesine karşılık en az üç BoLA-DRB (1-3) locisi bulunur. HLA-DRB3, HLA-DRB1-5 paraloglarından beş kat daha yüksek seviyede ekspresyonu gerçekleştirilmektedir. Benzer şekilde sığırlarda gözlemlenen DRB3 gen bölgesi diğer paraloglarına (BoLA-DRB1 ve DRB2) oranlar daha yüksek bir seviyede ekspresyonu gerçekleştirir (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HLA-DRB3&keywords;> <http://www.uniprot.org/uniprot/A4IFT0>; Miretti ve ark., 2001). Sığırlarda bildirilen ve BoLA sınıf IIa bölgesindeki bulunan en polimorfik üç genden (DQA, DQB ve DRB3) birisidir (Glass, 2004). MHC sınıf II DRB molekülünü oluşturan varyasyonların tamamı ilk domainde yer almaktadır ve bu bölge peptid bağlanma oluklarının oluşumundan sorumludur (Brown ve ark., 1993). Bunun anlamı ekzojen antijenlerin etkin bir humoral immün tepki uyandırmak için yardımcı T hücrelerine bağlanması ve sunulmasıdır (Stern ve ark., 1994).

Şimdiye kadar sığırlarda, *Bos taurus*'da 69 ve *Bos indicus*'da 42 olmak üzere toplam 111 BoLA-DRB3 alleli bildirilmiştir (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/group/BoLA>). Nispeten monomorfik DRA ile DRB3 gen çiftleri ve DQA ve DQB gen ürünlerinin fonksiyonel heterodimerik sınıf II moleküllerini oluşturmak üzere birleşirler (Zhou ve ark., 2007). Böylelikle ekstraselüler proteinlerden türetilen peptidleri sunarak bağışıklık sisteminde merkezi bir rol oynamaktadırlar. Bu gen bölgesi insan ve koyunlarda ortologus bir gendir, immün cevap, bulaşıcı hastalıklarla ilişkisi, genetik çeşitlilik ve evrimsel süreçteki rolleri yüzünden dikkat çekicidirler (Schwaiger ve ark., 1994; Schwaiger ve Epplen, 1995). BoLA-DRB3 alelleri veya bağlantılı genler ve birçok bulaşıcı hastalık arasındaki ilişkini gösteren bir çok çalışma bulunmaktadır (Glass ve ark., 1991; Xu ve ark., 1993; Buitkamp ve Epplen,

1996; Maillard ve ark., 1999; Miretti ve ark., 2001). BoLA-DRB3 gen, bağışıklık cevabının oluşumuna katılması ve yüksek derecede polimorfik olmasından dolayı, populasyon genetiği analizleri ve hastalık direncinin genetik temeli çalışmalarında kullanılmaya aday bir genidir. Bu açıdan farklı sığır ırklarındaki DRB3 geninin benzerlik ve farklılıklarının ortaya çıkartılması son derece önemlidir.

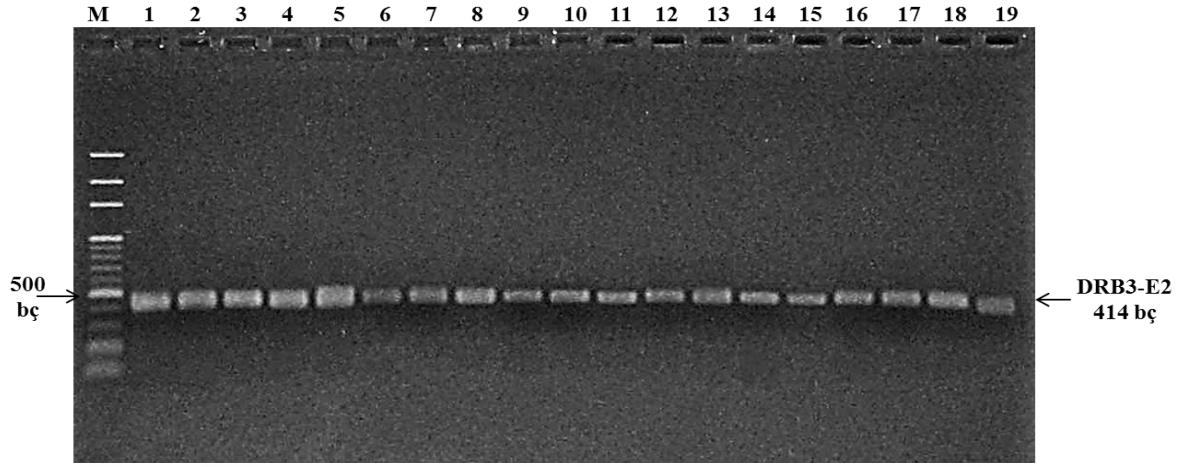
DRB3 bölgesi insanlarda 6 ekzondan oluşurken, sığırlarda 5 ekzondan oluşmaktadır. HLA-DRB3 geni 6. Kromozom üzerinde 6p21,3 lokusunda, yaklaşık 13065 bp uzunluğunda lineer bir gen bölgesidir. Bu bölgeden transkripte olan 1158 bp'lik mRNA'dan yaklaşık 266 amino asitlik, moleküler ağırlığı 29962,02 Da ve pI değeri 8,81 olan bir protein şeklinde ekspresyonu gerçekleşmektedir. Bununla birlikte sığırlardaki BoLA-DRB3 geni ise, 23. Kromozomun (AC_000180.1) 23q21 bölgesinde, yaklaşık uzunluğu 4724 bp (25472161..25476885) olan linear bir gen bölgesidir. BoLA-DRB3 gen bölgesinden sentezlenen olgunlaşmış mRNA'sı 801 bp uzunluğunda, 266 amino asitten oluşan yaklaşık 30533,83 Da moleküler ağırlıklı ve pI değeri 6,55 olan bir proteindir. İlk 29 amino asit signal peptit bölgesini geriye kalan 237 aa olgunlaşmış polipeptidi oluştururken, 42→116 aa beta domainini ve 126→219 immünoglobulin domainini oluşturmaktadır (<http://web.expasy.org/protparam>; <http://www.uniprot.org>; <http://www.genecards.org>; Duangjinda ve ark., 2013; Oprzadek ve ark., 2015).

Bugüne kadar farklı sığır ırklarındaki birçok DRB3 alleli, mastitis (meme iltihabı), dermatofilosis, kalıcı lenfositoz, Lone Star kenesine konakçı direnci ve enfeksiyon hastalıklarının epitoplarına aşı tepkisi gibi çeşitli sığır hastalıklarına karşı immün sistemlerindeki direnç ve duyarlılıkla ilişkilendirilmiştir (Bkz. Çizelge 2.2) (Garcia-Briones ve ark., 2000; Maillard ve ark., 2003; Ballingall ve ark., 2004b; Park ve ark., 2004; Untalan ve ark., 2007; Juliarena ve ark., 2008). Henüz yerli sığır ırklarımızdaki BoLA-DRB3 gen bölgesi ve alleleri hakkında bir bilgi bildirilmemiştir. Bahsi geçen gen bölgesinin yerli kara sığır ırkındaki moleküler özelliklerinin belirlenmesi için tüm örneklerde PZR kullanılarak tarama gerçekleştirilmiştir.

4.6.3.1. DRB3 geninin PZR amplifikasyonu sonucu

Yerli kara sığır örneklerindeki BoLA-DRB3 gen bölgesini oluşturan ekzon II için 3.4.1'de bahsedilen şekilde dizayn edilen primerler kullanılarak (Çizelge 3.1) PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonu, 3.4.2'de detaylandırılan PZR şartları kullanılarak

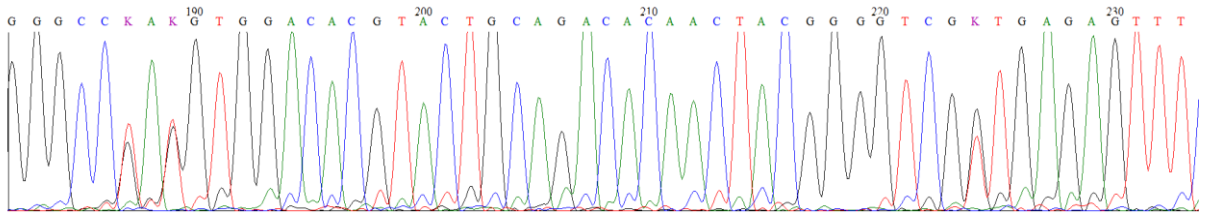
yapılmış ve çoğaltılan bölge % 1,5'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.58). Hedef bölge yaklaşık 414 bç (ekzon uzunluğu; 270 bç) uzunluğunda linear bir bölgedir.



Şekil 4.58. YK1-19. örneklerinde DRB3-E2 bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı.

4.6.3.2. DRB3 -E2 nükleotid dizilenmesi ve amino asit dizi analizi

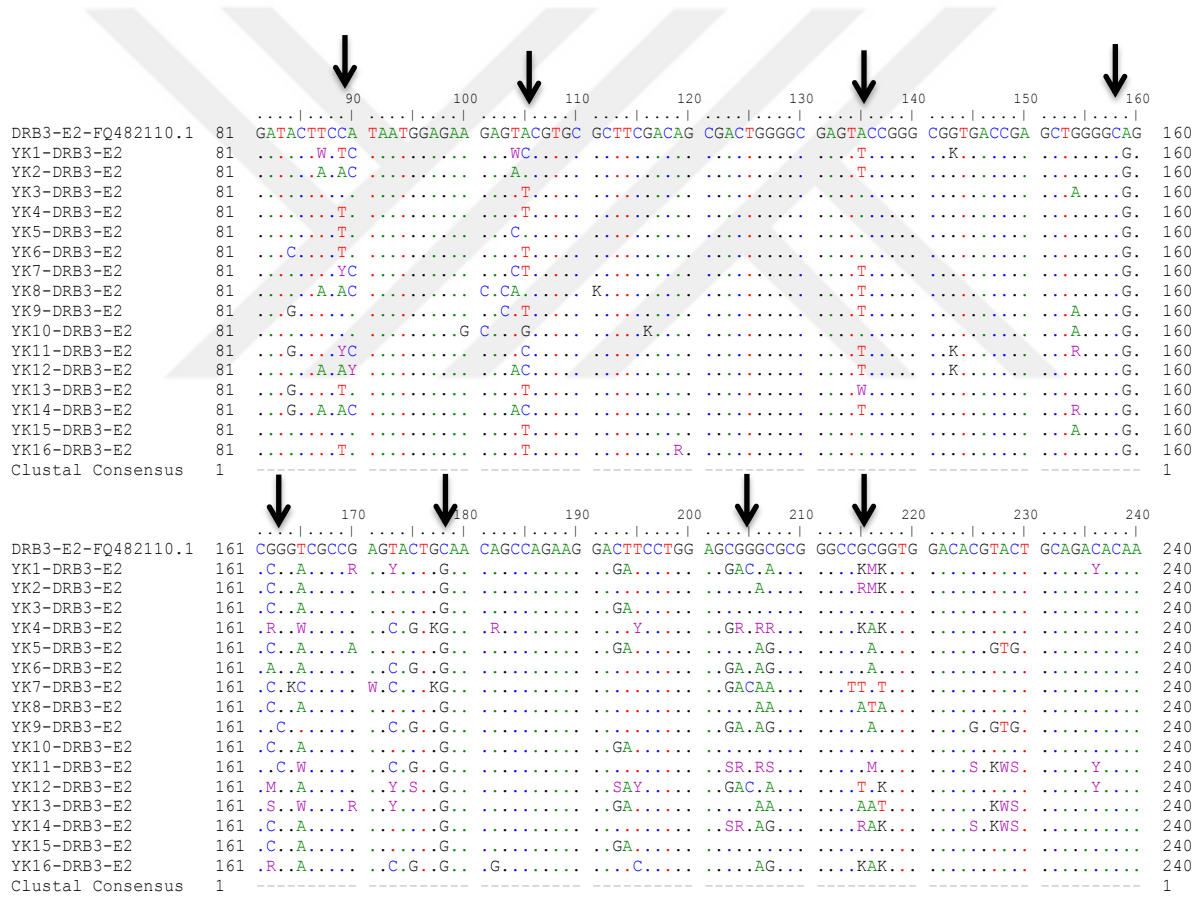
YK-DRB3-E2 bölgesinin her iki zincirinde ileri ve geri primerleri kullanılarak nükleotid dizisi belirlenmiştir (414 bç). Tüm örneklerden elde edilen dizi bilgileri farklı formatlarda kaydedilmiştir. 3.6'da ayrıntılı bir şekilde bahsedildiği gibi hedef bölge için farklı olarak düşünülen örneklerin kromatogramlarına bakılarak YK1-16-DRB3-E2 şeklinde konsensüs dizileri belirlenmiştir (Şekil 4.59). Gen bölgesinin tam dizisi kullanılarak amino asit dizileri elde edilmiştir. Kümeleme işlemi ve nükleotid dizilerinin kromatogram pik yükseklikleri incelenerek elde edilen konsensüslerin nükleotid dizileri ek çizelge C.8'de ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 4.59. YK-DRB3-E2 bölgesinin ileri primer ile elde edilen nükleotid dizisine ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir.

Konsensüs dizileri ve referans gen bölgesi öncelikle ClustalX programı yardımı ile Fasta, Phylip, Nexus ve Clustal formatlarında kaydedilmiştir. Daha sonrasında Bioedit ve Clustal Omega programı kullanılarak hizalanmış ve farklılıkları belirlenmiştir (Şekil 4.60).

Hizalama işlemi sonunda, polimorfik bölgelerin tamamı ekzon 2 bölgesi içerisinde olduğu görülmüştür. Referans dizi ve elde edilen konsensüs dizileri kıyaslandığında yerli karadaki DRB3-E2 bölgesinin en az 9 (YK6-DRB3-E2) en fazla 26 (YK12-DRB3-E2) adet nükleotid farklılık içerdiği görülmüştür. Bu polimorfik noktaların sonuçları aşağıdaki 4.21 nolu çizelgede özetlenmiştir. Burada dikkat çeken nokta yerli kara sığır ırkındaki DRB3-E2 bölgesindeki 89. pozisyonundaki C→T, 105. pozisyonundaki A→T, 135. pozisyonundaki A→T, 159. pozisyonundaki A→G, 162. pozisyonundaki G→C, 165. pozisyonundaki T→A, 173. pozisyonundaki T→C, 178. pozisyonundaki C→G, 193 ve 194. pozisyonundaki CT→GA, 203-207. pozisyonundaki CGGGC→SRSAR ve 252. pozisyonundaki G→T, nükleotidlerin yerli kara DRB3 konsensüs dizilerinin tamamında korunduğu belirlenmiştir. Buna göre elde edilen yerli kara konsensüs dizilerinin her biri birbirinden farklı birer alleli temsil ettiği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.60. Referans DRB3-E2 (FQ482110.1) ve YK-DRB3-E2 bölgesinin konsensüs dizilerinin hizalanmasının bir kısmı örnek olarak verilmiştir.(↓: Polimorfik bölgeleri göstermektedir).

Çizelge 4.21. YK-DRB3-E2 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.

Nükleotid Pozisyonları	46	47	49	50	51	52	56	57	64	65	72	77	79	84	87	89	90	100	101	103	104	105	111
Konsensüs	C	T	C	A	A	C	A	C	G	G	T	G	C	A	T	T	A	A	G	G	T	T	G
DRB3-E2- FQ482110.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	A	.
YK1-DRB3-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	W*	.	C	.	.	.	W	C	.
YK2-DRB3-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	C	.	.	.	A	A	.
YK3-DRB3-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.
YK4-DRB3-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK5-DRB3-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.
YK6-DRB3-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK7-DRB3-E2	T	C	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	C	.	.	.	C	.	.
YK8-DRB3-E2	.	.	.	.	.	.	G	A	.	.	A	C	.	.	A	A	C	.	C	C	A	A	K
YK9-DRB3-E2	.	C	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.	C	.	.	.
YK10-DRB3-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	C	.	G	C	.	.	G	.
YK11-DRB3-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	Y	C	.	.	.	.	C	.
YK12-DRB3-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	Y	.	.	.	A	C	.
YK13-DRB3-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	A	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK14-DRB3-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	A	C	.	.	.	A	C	.
YK15-DRB3-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.
YK16-DRB3-E2	.	.	.	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Özet	1T	2C	1T	1C	1C	1G	2G	2A	2T	1T	2A	1A,1C	1G,1S	1C,4G	4A,1W	4A,5C,2Y	6C,1Y	1G	2C	2C	4A,2C,1W	4A,4C,1G	1K

* S: G veya C , W: A veya T, Y: T veya C, K: G veya T.

Çizelge 4.21. Devamı.

Nükleotid Pozisyonları	116	119	135	143	154	159	162	163	164	165	170	171	173	175	177	178	182	193	194	195	203	204	205
Konsensüs	G	A	W	G	G	G	C	G	G	A	G	A	T	C	G	G	A	C	T	T	C	G	G
DRB3-E2-FQ482110.1	.	.	A	.	.	A	G	.	.	T	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.
YK1-DRB3-E2	.	.	T	K	.	.	.	.	.	.	R	.	Y	.	.	.	.	G	A	.	G	A	C
YK2-DRB3-E2	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK3-DRB3-E2	.	.	A	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	.	.	.	.
YK4-DRB3-E2	.	.	A	.	.	.	R	.	.	W	.	.	C	G	K	.	R	.	.	Y	G	R	.
YK5-DRB3-E2	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	G	A	.	.	.	.
YK6-DRB3-E2	.	.	A	.	.	.	A	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	G	A	.
YK7-DRB3-E2	.	.	T	.	.	.	.	.	K	C	.	W	C	.	K	.	.	.	.	.	G	A	C
YK8-DRB3-E2	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK9-DRB3-E2	.	.	T	.	A	.	G	C	.	T	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	G	A	.
YK10-DRB3-E2	K*	.	A	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	.	.	.	.
YK11-DRB3-E2	.	.	T	K	R	.	G	C	.	W	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	S	R	.
YK12-DRB3-E2	.	.	T	K	.	.	M	.	.	.	.	.	Y	S	.	.	.	S	A	Y	G	A	C
YK13-DRB3-E2	.	.	.	.	.	.	S	.	.	W	R	.	Y	.	.	.	.	G	A	.	.	.	.
YK14-DRB3-E2	.	.	T	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	R	.
YK15-DRB3-E2	.	.	A	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	.	.	.	.
YK16-DRB3-E2	.	R	A	.	.	.	R	.	.	.	.	.	C	G	.	.	G	.	.	C	.	.	.
Özet	1K	1R	8A,8 T	3K	4A,2 R	1A	1A,3 G,2 R,1 M,1 S	2C	1K	1C,2 T,3 W	1A,2 R	1W	6C,3 Y	5G,1 S	2K	1C	1G,1 R	6G,1 S	7A	1C,2 Y	6G,2 S	5A,3 R	3C

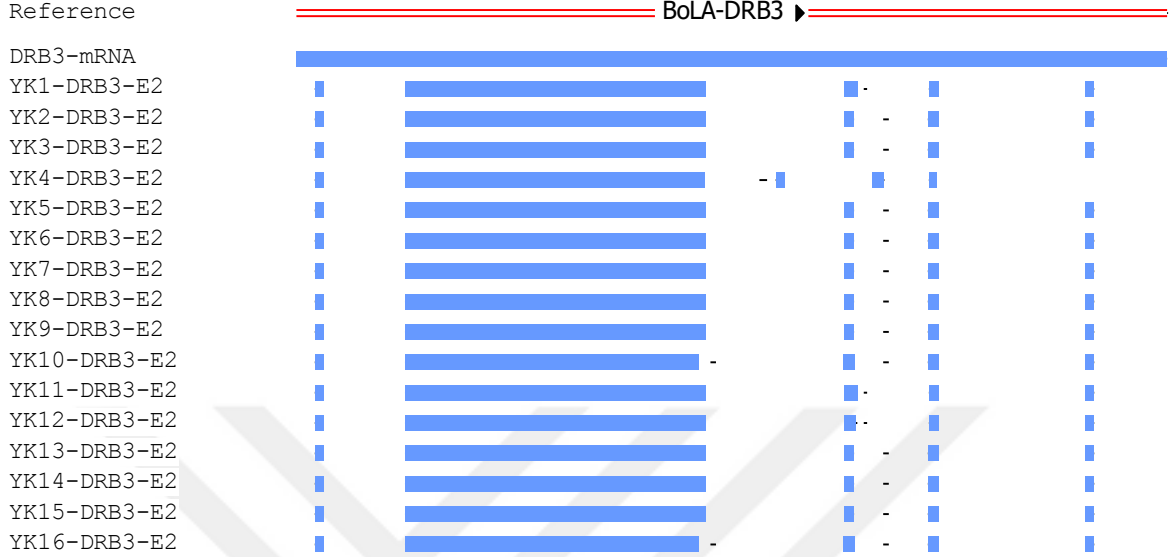
* S: G veya C , W: A veya T, Y: T veya C, K: G veya T, R: G veya A, M: A veya C.

Çizelge 4.21. Devamı.

Nükleotid Pozisyonları	206	207	214	215	216	217	225	227	228	229	236	249	250	251	252	253	288	290	295	Toplam Farklılık
Konsensüs	A	G	C	G	A	G	C	T	A	C	C	T	C	G	T	T	G	G	A	
DRB3-E2-FQ482110.1	G	C	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	11
YK1-DRB3-E2	G	A	.	K	M	K	.	.	.	.	Y	.	.	.	G	G	.	S	R	23
YK2-DRB3-E2	.	C	.	R	M	K	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	11
YK3-DRB3-E2	G	C	.	.	C	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	G	.	.	.	10
YK4-DRB3-E2	R	R	.	K	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	R	.	.	17
YK5-DRB3-E2	.	.	.	.	.	.	.	G	T	G	.	.	.	.	.	G	.	.	.	10
YK6-DRB3-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	9
YK7-DRB3-E2	.	A	T	T	C	T	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	22
YK8-DRB3-E2	.	A	.	A	T	A	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	18
YK9-DRB3-E2	.	.	.	.	.	.	G	G	T	G	.	.	.	.	.	G	.	.	.	20
YK10-DRB3-E2	G	C	.	.	C	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	G	.	.	.	15
YK11-DRB3-E2	R	S	.	.	M	.	S	K	W	S	Y	.	.	.	G	G	.	.	R	25
YK12-DRB3-E2	G	A	.	T	C	K	.	.	.	.	Y	.	.	.	G	.	R	S	R	26
YK13-DRB3-E2	.	A	.	A	.	T	.	K	W	S	.	.	Y	.	K	.	.	.	.	18
YK14-DRB3-E2	.	.	.	R	.	K	S	K	W	S	.	.	.	K	.	G	.	.	.	18
YK15-DRB3-E2	G	C	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	10
YK16-DRB3-E2	.	.	.	K	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	12
Özet	6G,2 R	5A,5 C,1R, 1S	1T	2A,2 T,2R, 3K	6C,1 T,3M	1A,2 T,6K	1G,2 S	2G,3 K	2T,3 W	2G,3 S	3Y	2G	1Y	3T,1 K	6G,2 K	7G	1A,2 R	2S	3R	275

* S: G veya C, W: A veya T, Y: T veya C, K: G veya T, R: G veya A, M: A veya C.

YK-DRB3-E2 için belirlenen konsensüs dizilerindeki intron bölgelerinin uzaklaştırılması ve hedef bölgeden sentezlenen protein dizisindeki farklılıkları belirlemek için clone manager programında karşılaştırılarak amino asit dizileri belirlenmiştir (Şekil 4.61).



Şekil 4.61. Nükleotid konsensüs dizilerinden mRNA bölgesinin elde edilmesi ve aa dizilerinin belirlenmesi (Referans: mRNA-DRB3, Ac. No. NM_001012680.2, YK1-16 konsensüs dizileri, mavi bölgeler ortak noktaları ve ekzon bölgelerini göstermektedir).

DRB3-E2 nükleotid konsensüs dizileri kullanılarak elde edilen DMA-mRNA (801 bç uzunluğunda) dizilerinden yola çıkılarak 16 farklı haplotip belirlenmiştir (Çizelge 4.22). Ayrıca YK-DRB3-E2 bölgesinde 46-295. Nükleotidleri arasında 65 farklı polimorfik nokta belirlenmiştir. Burada dikkat çeken nokta ise nükleotid dizisinde belirlenen 275 polimorfik nükleotid bölgesinin neredeyse tamamı yaklaşık 273 nükleotid farklılığın korunuyor olmasıdır.

Çizelge 4.22. DRB3 bölgesinden transkriptte olan mRNA nükleotid dizisi

Nükleotid Pozisyonları	124	126	138	139	141	142	143	144	148	149	156	157	164	169	171	175	176	179	181	182	192	193	195	196	197	203	208	211	227	235	246	254	255
Konsensüs	A	A	C	T	C	A	A	C	A	C	G	G	T	G	C	T	A	T	T	A	A	G	G	T	T	G	G	A	T	G	G	C	G
DRB3-mRNA- NM_001012680.2	G	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK1-DRB3- mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	W	.	C	.	.	.	W	C	.	.	.	.	K	.	.	.
YK2-DRB3- mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	C	.	.	.	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.
YK3-DRB3- mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	.	.	.
YK4-DRB3- mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S*	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	R	.
YK5-DRB3- mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	A	.	.	.	.
YK6-DRB3- mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	A	.
YK7-DRB3- mRNA	.	.	T	C	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	C	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK8-DRB3- mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	.	.	A	C	.	.	.	A	A	C	.	C	C	A	A	K	.	.	.	.	.	.	.
YK9-DRB3- mRNA	.	.	.	C	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	A	G	C
YK10-DRB3- mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	C	.	G	C	.	.	G	.	K	.	A	.	A	.	.
YK11-DRB3- mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	Y	C	.	.	.	.	C	.	.	.	.	K	R	G	C
YK12-DRB3- mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	Y	.	.	.	A	C	.	.	.	.	K	.	M	.
YK13-DRB3- mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	A	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	W	.	.	S	.
YK14-DRB3- mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	A	C	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	R	.	.
YK15-DRB3- mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	.	.
YK16-DRB3- mRNA	.	.	.	.	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	A	.	.	R	.
Özet	1 G	1 C	1 T	2 C	1 T	1 C	1 C	1 G	2 G	2 A	2 T	1 T	2 A	1A ,1C	1G ,1S	1 C	1C, 4G	4A, 1W	4A,4 C,2Y	6C, 1Y	1 G	2 C	2 C	4A,2 C,1 W	3A,4 C,1G	1 K	1 K	1 R	7A, 1W	3 K	4A ,2R	1A,2G,2 R,1M,1S	2 C

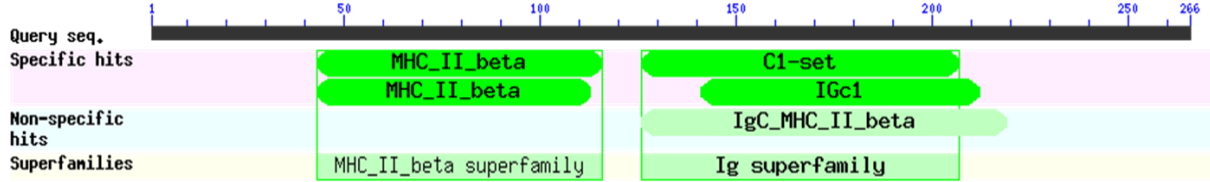
* S: G veya C , W: A veya T, Y: T veya C, K: G veya T, R: G veya A, M: A veya C.

Çizelge 4.22. Devamı.

Nükleotid Pozisyonları	256	257	262	263	265	267	269	274	285	286	287	295	296	297	298	299	306	307	308	309	317	319	320	321	328	341	342	343	344	345	T.F
Konsensüs	G	A	G	A	Y	C	G	A	C	T	T	C	G	G	A	R	C	G	A	G	C	T	A	C	C	T	C	G	T	T	
DRB3-mRNA-NM_001012680.2	.	C	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	A	.	.	.	.	G	G	T	G	.	G	T	.	.	G	16
YK1-DRB3-mRNA	.	.	R	.	.	.	.	.	G	A	.	G	A	C	G	A	.	K	M	K	.	.	.	.	Y	.	.	.	G	G	19
YK2-DRB3-mRNA	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	R	M	K	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	11
YK3-DRB3-mRNA	.	.	.	.	T	.	.	.	G	A	.	.	.	.	G	C	.	.	C	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	G	11
YK4-DRB3-mRNA	.	W*	.	.	C	G	K	R	.	.	Y	G	R	.	R	.	.	K	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	15
YK5-DRB3-mRNA	.	.	A	.	T	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	G	T	G	.	.	.	.	.	G	12
YK6-DRB3-mRNA	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	.	G	A	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	10
YK7-DRB3-mRNA	K	C	.	W	C	.	K	.	.	.	.	G	A	C	.	A	T	T	C	T	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	21
YK8-DRB3-mRNA	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	T	A	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	18
YK9-DRB3-mRNA	.	T	.	.	C	G	.	.	.	.	.	G	A	.	.	G	.	.	.	.	G	G	T	G	.	.	.	.	.	G	20
YK10-DRB3-mRNA	.	.	.	.	T	.	.	.	G	A	.	.	.	.	G	C	.	.	C	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	G	16
YK11-DRB3-mRNA	.	W	.	.	C	G	.	.	.	.	.	S	R	.	R	S	.	.	M	.	S	K	W	S	Y	.	.	.	G	G	23
YK12-DRB3-mRNA	.	.	.	.	.	S	.	.	S	A	Y	G	A	C	G	A	.	T	C	K	.	.	.	.	Y	.	.	.	G	.	21
YK13-DRB3-mRNA	.	W	R	.	.	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	A	.	A	.	T	.	K	W	S	.	.	Y	.	K	.	18
YK14-DRB3-mRNA	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	S	R	.	.	G	.	R	.	K	S	K	W	S	.	.	.	K	.	G	19
YK15-DRB3-mRNA	.	.	.	.	T	.	.	.	G	A	.	.	.	.	G	C	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	11
YK16-DRB3-mRNA	.	.	.	.	C	G	.	G	.	.	C	.	.	.	.	G	.	K	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	12
Özet	1 K	2C,1 T,3 W	1A ,2 R	1 W	7C ,7 T	5G ,1S	2 K	1G ,1 R	6G ,1S	7 A	1C ,2 Y	6G ,2S	6A ,3 R	3 C	5G ,2 R	6A,4C ,5G,1S	1 T	2A,2T, 2R,3K	5C,1 T,3 M	1A,2 T,6K	2G ,2S	3G ,3 K	3T, 3W	3G ,3S	3 Y	3 G	1T, 1Y	3 T , 1 K	5 G , 2 K	8G	273

* S: G veya C , W: A veya T, Y: T veya C, K: G veya T, R: G veya A, M: A veya C.

Elde edilen amino asit dizileri (266 aa uzunlukta) NCBI’da Blast yapılarak hedef bölge olduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.62). DRB3 proteinin ilk 1-29 amino asitlik bölümü signal peptid dizisini, 42-116 bölümü beta ve 126-219 bölümü immunoglobülin domaini oluşturmaktadır (<http://www.uniprot.org>; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd>).

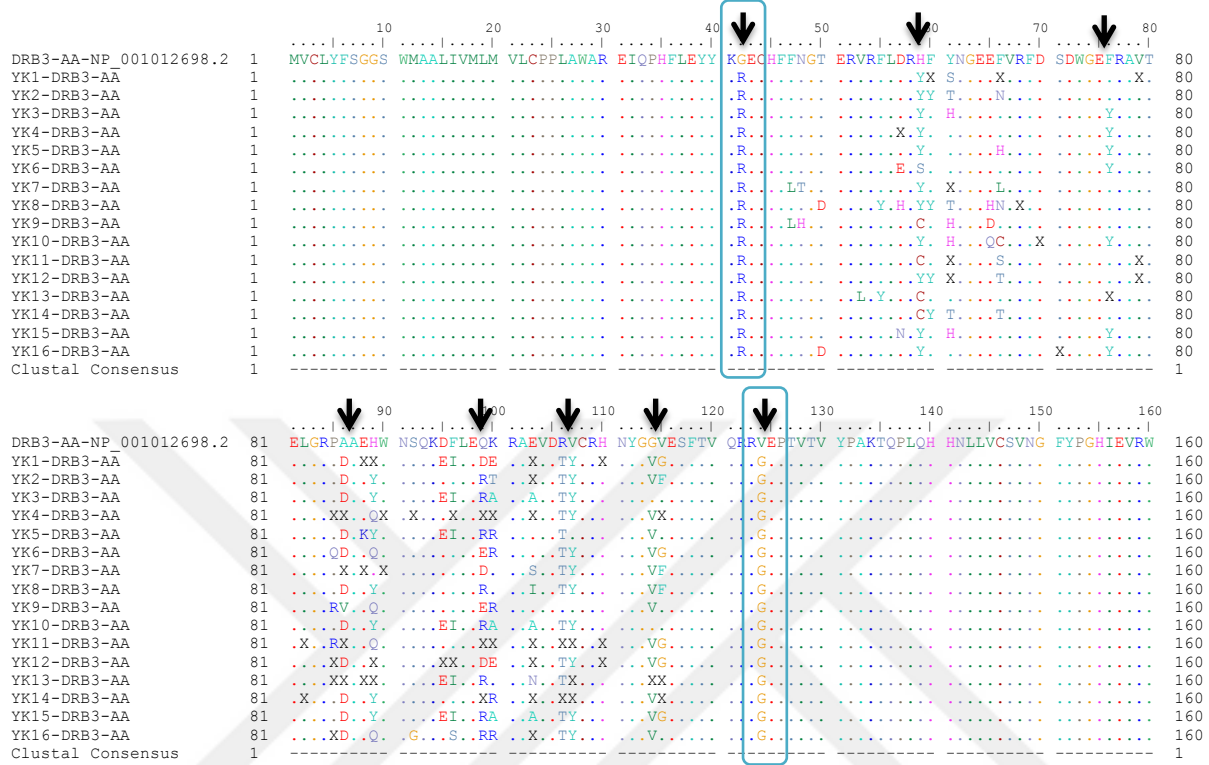


Şekil 4.62. YK8-DRB3- PR’nin sahip olduğu domainler, yeşil renkle gösterilen bölgelerin ilki beta domaini, ikincisi immunoglobülin domaini göstermektedir.

Belirlenen YK-DBR3 haplotiplerinin oluşturduğu proteinlerinin NCBI Blast sonuçlarına göre; *Bos taurus*’dan eksprese olan MHC sınıf II DRB3 beta zincirine (Ac. No: AAM94505.1) benzerlik oranı, YK13 için %92, YK4 için %93, YK1, 3, 7, 10, 11 ve 16 için %94, YK5, 8, 12 ve 15 için %95, YK6 ve YK9 için %96 ve YK2 için %97 olarak bulunmuştur. YK1-16 DRB3 aa konsensüs dizilerinin moleküler ağırlığı 30415,02-30719,57 Da olarak hesaplanırken pI değerleri 6,00-7,64 olarak belirlenmiştir.

Yerli kara sığır ırkının DRB3 geni yönünde amino asit pozisyonları dikkate alındığında referans *Bos taurus* DRB3 (Ac. No. NP_001012698.2) proteinine göre, oluşturulan tüm konsensüs dizilerinde 42. pozisyonundaki nötr bir amino asit olan glisin yerine kuvvetli bazik bir amino asit olan arjinine (G→R) ve 124. pozisyonundaki apolar bir amino asit olan valin (hidropati indeksi; 4,2) yerine yine apolar amino asit olan glisin’e (hidropati indeksi; -4) (V→G) dönüştüğü ve popülasyonlarda korunduğu belirlenmiştir. Referans dizideki 59. aa pozisyonundaki histidin (H) YK1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 12,15 ve 16’da tirozine (Y) dönüşürken, sadece YK6 konsensüs dizisinde serine (S) ve YK9, 11, 13 ve 14’de de sisteine (C) dönüşmüştür. Benzer şekilde 76. pozisyonlardaki fenilalanin tirozine (F→Y) (YK3, 4, 5, 6, 10, 15, 16), 86. pozisyonlardaki alanin aspartik asite (A→D), 89. pozisyonlardaki YK2, 3, 8, 10, 14 ve 15’de histidin tirozine (H→Y) dönüşürken, YK4, 6, 9, 11 ve 16 histidin glutamin (H→Q) dönüşmüştür. Bununla birlikte 95. ve 96. pozisyonlardaki YK1, 3, 5, 10, 13 ve 15’de aspartik asit ve fenilalanin (D,F)→ glutamik asit ve izolösine (E,I) dönüşmüştür. Referans dizideki 99. ve 100. glutamin ve lizin (Q,K), YK1 ve YK12’de aspartik asit ve glutamik asite (Q,K→D,E), YK2’de arjinin ve treonine (Q,K→R,T), YK3, YK10 ve YK15’de arjinin ve alanine (Q,K→R,A), YK5 ve YK16’da arjinin ve arjinine (Q,K→R,R), YK6 ve YK9’da glutamik asit ve arjinine (Q,K→E,R), YK7’de aspartik asit ve

lizine (Q,K→D,K) son olarak da YK8 ve YK13'de de arjinin ve lizine (Q,K→R,K) dönüşmüştür. Bununla birlikte bazı konsensüs dizilerde 106 ve 107. Pozisyonadaki arjinin ve valin, treonin ve tirozine (R,V→TY) dönüşmüştür (Şekil 4.63).



Şekil 4.63. BoLA-DRB3 alleli tarafından kodlanan beta bölgelerinin tahmini amino asit dizilerinin hizalanması. (↓: Amino asit değişikliğinin olduğu bölgeleri, mavi kutular tüm örneklerde korunan bölgeleri göstermektedir).

Yerli kara sığır ırkındaki DRB3 geninde ilk defa belirlenen farklılıklar son derece önemlidir. DRB3 geni İmmün Polimorfizm Veritabanına (IPD) girilen üç genden (DQA, DQB ve DRB3) bir tanesi ve en önemlisidir. Bu veri tabanında *Bos indicus* (42 allel) ve *Bos taurus* (69 allel) ırklarına ait allellerin veri tabanı oluşturulmuştur (IPD- <http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/group/BoLA>; Robinson ve ark., 2012). Farklılıkların tamamı beta domaininde (42→116) görülmesi bu bölgelerin yerli karanın bağışıklık sistemine önemli katkısı olduğu düşünülmüştür. Şöyle ki, BoLA sınıf IIa DRB3 geninin ekzon 2 dizisindeki farklılıklar DRB3 allellerinin belirlenmesindeki en önemli faktördür çünkü bu bölge mastitis (meme iltihabı), dermatofilozis, kalıcı lenfositoz, Lone Star kenesine konakçı direnci ve enfeksiyon hastalıklarının epitoplara aşı tepkisi gibi çeşitli sığır hastalıklarına karşı immün sistemlerindeki direnç ve duyarlılıkla ilişkilendirilmiştir (Bkz. Çizelge 2.2) (Garcia-Briones ve ark., 2000; Maillard ve ark., 2003; Ballingall ve ark., 2004b; Park ve ark., 2004; Untalan ve ark., 2007; Juliarena ve ark., 2008). BoLA sınıf IIa DRB3 geninin ekzon 2 dizisi yüksek

düzeyde polimorfiktir ve antijen bağlanma bölgelerindeki temel peptitleri kodlarlar, bunun anlamı ekzojen antijenlerin etkin bir humoral immün tepki uyandırma için yardımcı T hücrelerine bağlanması ve sunulmasıdır (Stern ve ark., 1994; Zinkernagel ve Doherty 1975). Ancak bu sonuç için daha ayrıntılı çalışmalıdır. Sonuç olarak DRB3-E2 bölgesindeki farklılıkların daha iyi anlaşılması için filogenetik kısmında ayrıntılı olarak tartışılmıştır (Bkz. 4.6.3). IPD bulunan DRB3 alleleri ile kıyaslanması gerçekleştirilmiştir.

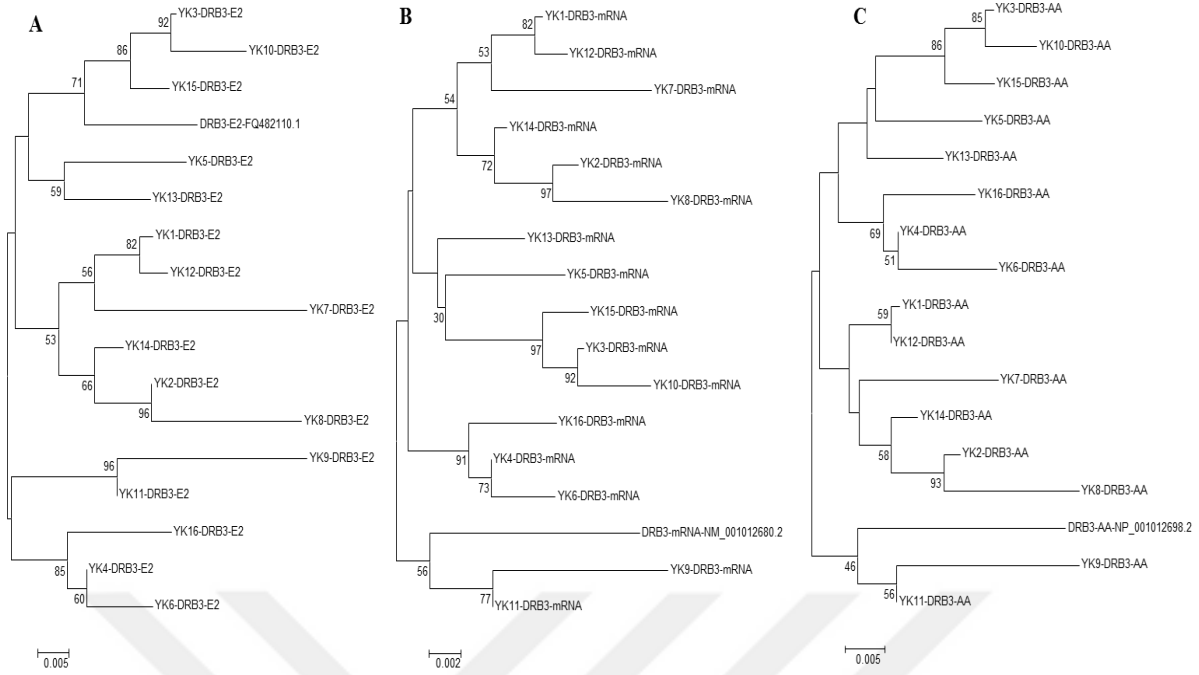
4.6.3.3. DRB3-E2 bölgesinin filogenetik analizi

Yapılan çalışma ile yerli kara sığır ırkındaki BoLA-DRB3-E2 bölgesine ait nükleotid dizileri ortaya çıkartılmıştır. Bu diziler kullanılarak NCBI ve IPD'deki daha önceden belirlenen *Bos indicus* ve *Bos taurus* DRB3 allelleri ile beraber filogenetik analiz yapılmıştır. Yerli kara sığırının DRB3-E2 bölgesinin dizi bilgileri analiz edilerek, DNA polimorfizm özellikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.23). Yerli karada toplam 275 farklı bölge belirlenirken, bu bölgelerin 60 tanesini polimorfik olduğu ve haplotip sayısının 129 olduğu tespit edilmiştir. Yerli kara sığırlarında en yüksek haplotip farklılığı DRB3-E2 bölgesinde $1,000 \pm 0,0010$ olarak hesaplanırken, nükleotid farklılığı $0,05199 \pm 0,00147$ olarak hesaplanmıştır. Yerli karalardaki haplotipler arasındaki genetik uzaklıklar 0,0032-0,1125 (ortalaması: 0,0543) arasında bulunmuştur.

Çizelge 4.23. DRB3-E2 bölgesinin dizisine göre DNA polimorfizm özellikleri

Özellikler	Genel
Toplam Bölge Sayısı	275
G+C	61,39
Polimorfik Bölge Sayısı (s)	60
Haplotip Sayısı (h)	129
Haplotip Farklılığı (Hd)	$1,000 \pm 0,0010$
Nükleotid Farklılığı (Pi)	$0,05199 \pm 0,00147$

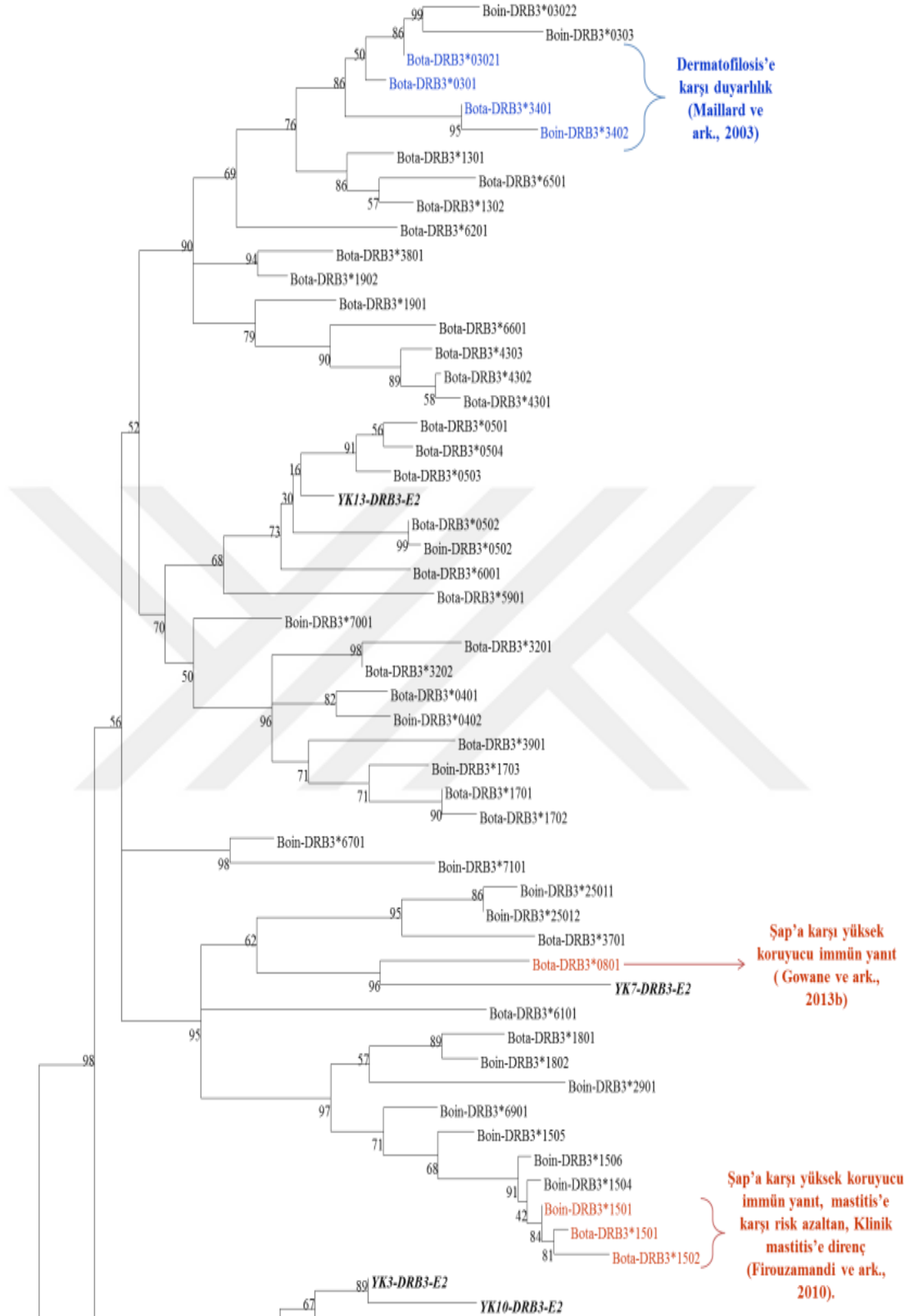
Yerli kara DRB3 konsensüs dizileri filogenetik ilişkileri bakımından referans diziye göre (nükleotid için FQ482110.1, mRNA için NM_001012680.2 ve aa için NP_001012698.2) nükleotid ve amino asit dizisi ayrımındaki bootstrap test değeri %50 hesaplanırken mRNA dizisi %20 şeklinde belirlenmiştir (Şekil 4.64 A, B ve C).



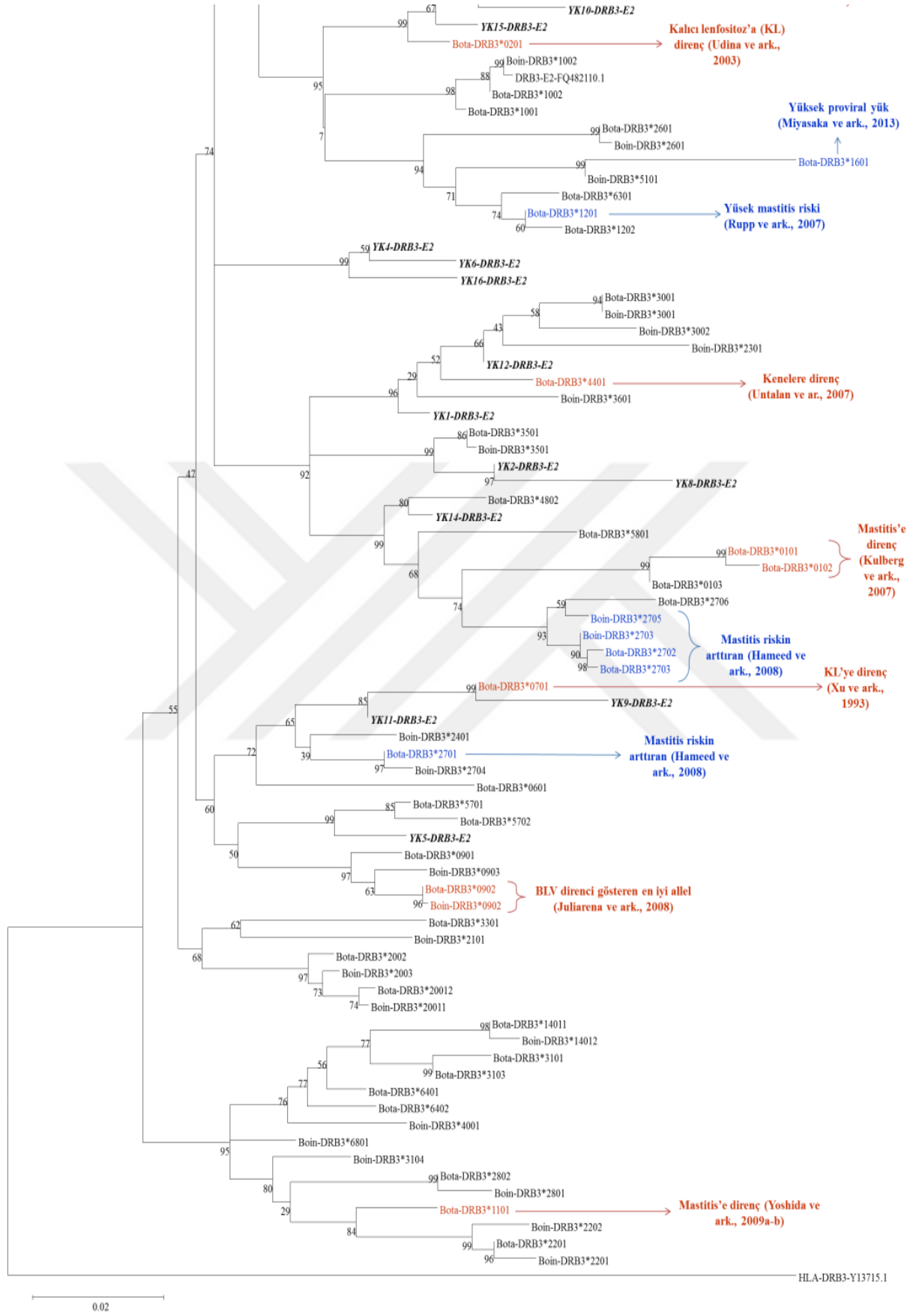
Şekil 4.64. BoLA-DRB3 konsensüs dizilerinin filogenetik ağaçları. Yerli kara BoLA-DRB3 allelerinin 414 bç'lik nükleotid dizilerinden oluşturulmuş komşu birleştirme (Neighbor-joining) ağacı (A), 801 bazlık mRNA dizilerinden oluşturulmuş Neighbor-joining ağacı (B) ve 266 amino asit uzunluğundaki dizilerden oluşturulmuş Neighbor-joining ağacı (C).

IPD'de bulunan DRB3.2 alleleri ve yerli kara sığırından elde edilen konsensüs dizilerinin, dizi verileri ve filogenetik analizleri bize, DRB3 allelerinin farklı ırklardaki formlarının geniş bir polimorfizm sergilediğini ve ırklar arasında belirgin farklılıkların bulunduğunu göstermektedir. Bu sonuç daha önceki çalışmalarla tutarlıdır (Takeshima ve ark., 2003; 2006). Yerli kara sığırındaki DRB3 dizileri bugüne kadar belirlenen hastalıklara direnç ve duyarlılıkla ilişkilendirilen DRB3 alleleri arasındaki yerinin belirlenmesinde kullanılan filogenetik ağacın topolojisine bakıldığında, ilk olarak iki ana kola ayrıldığı görülmektedir. Bu koldan ilkinin ağacın köklenmesi için kullanılan HLA-DRB3 alleli oluştururken, diğer kolu IPD'deki DRB3 alleleri oluşturmaktadır. Dikkat çekici nokta yerli kara DRB3 allelerinin bu ağacı oluşturan alt dallara dağılmış olmasıdır. Aslında bu şaşırtıcı değildir, Afrika bufalolarında yapılan bir çalışmada popülasyonun darboğazlılığa maruz kaldığı bilinmesine rağmen MHC-DRB3 genleri yüksek seviyede alellik çeşitlilik sergilediği gözlemlenmiştir (Wenink ve ark., 1998). Bu sonuç paralel olarak sayısı her geçen gün azalan ve yerini kültür ırklarının aldığı yerli kara sığır ırkımızın da bir popülasyon darboğazına mazur kalmaktadır. Ancak buna rağmen tıpkı Afrika bufalolarında olduğu gibi yüksek seviyede DRB3 geni allel çeşitliğine sahip olduğu açıkça görülmektedir (Şekil 4.65). Verim yönü düşük bu ırkın bağışıklık seviyesinin yüksek olması beklenen bir durumdur.

Filogenetik ağaç üzerindeki yerli kara allelleri incelendiğinde, YK7-DRB3-E2 allenin, Şap hastalığına karşı yüksek koruyucu immün yanıtla ilişkili olan Bota-DRB3*0801 alleli ile %96 benzerlik gösterdiği, bu allenin bağlanma ceplerindeki spesifik kalıntıların FMD aşısına karşı immün yanıt için çok önemli olduğunun belirlenmiş olması, YK7-DRB3-E2 allelenin yerli kara için benzersiz yapmaktadır (Gowane ve ark., 2013). Ayrıca YK-DRB3-E2 alleli mastitis riskini azaltan ve klinik mastitise direnç ile bağlantılı Bota-DRB3*1501-1502 allerin bulunduğu dalda bulunmuştur. Bu sonuç YK7-DRB3-E2 konsensüs dizisinin oluşturduğu alleli bu hastalıklara karşı dirençli bir allel yapmaz, ancak bu allelerin özelliklerini de barındırmadığı anlamına gelmez, bunu için daha fazla popülasyonda daha fazla örnek ile çalışma yapılmalıdır. Bununla birlikte YK3-, YK10- ve YK15-DRB3-E2 alleleri kalıcı lenfositoz (KL) direnç sağlayan Bota-DRB3*0201 alleleline %99 benzemektedir (Udina ve ark., 2003). Sığırlardaki kene enfestasyonlarına duyarlılığın kalıtsal bir bileşene sahip olduğu tahmin edilmektedir, bunun en önemli sebebi doğaları gereği farklı sığır ırklarının diğerlerine göre daha dirençli olduğu bilinmektedir, fakat neden olan genetik unsurlar hala tam olarak bilinmemektedir (Untalan ve ark., 2007). Sığır sürülerinde yapılan bir çalışmada kene direncini belirlemek için, BoLA-DRB3 geninin ikinci ekzonun ile gerçekleştirilen analiz çalışmalarında, DRB3*4401 allelinin kenelere direnç sağlayan bir fenotipe sahip olduğunu belirlemişlerdir (Untalan ve ark., 2007). İşte bu allel ile YK1-DRB3-E2 ve YK12-DRB3-E2 alleleri aynı dalda bulunmuştur. Yerli kara sığırının zor şartlara adaptasyonu ve mera hayvancılığına uygun bir yapıda bulunması bu allel yönünden veya daha güçlü alleleri barındırması hiç şaşırtıcı değildir. YK3-DRB3-E2 ve YK8-DRB2-E2 alleleri henüz bir fonksiyonu belirlenmemiş Bota-DRB3*3501 alleli ile %99 benzerlik göstermektedir. YK9-DRB3-E2 alleli ise KL'ye direnç ile ilişkili Bota-DRB3*0701 alleli ile %99 benzerlik göstermektedir (Xu ve ark., 1993). Ayrıca YK4-, YK6- ve YK16-DRB3-E2 alleleri IPD'deki DRB3 allelerinden farklı birer allel olduğu yorumu yapılmıştır.



Şekil 4.65. Yerli kara (YK) ve IPD'de bulunan *Bos indicus* (Boin-DRB3) ve *Bos taurus* (Bota-DRB3), DRB3 allellerinin filogenetik ağacı. Bu çalışmada elde edilen alleller koyu siyah, herhangi bir hastalığa duyarlı olanlar mavi ve dirençli olanlar kırmızı renkle gösterilmiştir.



Şekil 4.65. Devamı.

Hayvancılıktaki üretim özelliklerinin seleksiyonu nihai sonucu olarak doğal seleksiyonu geçersiz kılabilir ve MHC çeşitliliğini kaybettirebilir. Yoğun seleksiyon, hızlı genetik iyileşmeye neden olabilir, ancak etkin popülasyon boyutunu azaltabilir, bu da bir popülasyonun genetik sağlığına yönelik tehditleri değerlendirmek için önemli bir parametre olarak değerlendirilebilir. Süt sığırcılığında, sığır yetiştiriciliği programları az sayıda elit boğa dayanmaktadır. Örneğin, Holstein cinsinde yapılan böyle bir seleksiyon çalışmasında, 150'den daha az hayvanda, etkili popülasyon büyüklüğüne, dolayısıyla akrabalı yetiştirme ve genetik varyasyonda genel bir düşüşe neden olabilecek bir sonuç doğurmuştur (Hayes ve ark., 2003). Aynı endişe, kullanılan seleksiyon yönteminin BoLA çeşitliliğini düşürebilir ve yanlışlıkla hastalığa yatkınlığı artırabilir. Örneğin, süt sığırlarında artan süt verimi ile mastitisi duyarlılığının artışı arasında, önemli bir korelasyon vardır ve bazı MHC allelleri mastitise direnç ile ilişkilendirilmiştir (Sharif ve ark., 1998; Heringstad ve ark., 2000). Dolayısıyla, geliştirilmek istenen süt verimi için kasıtlı yapılan seleksiyon, hastalığa yatkınlığı artıran daha fazla MHC alleleline yol açabilir. Yerli ve yabani sığır ırklarının popülasyon yapıları ve seleksiyon mekanizmaları genellikle tam olarak bilinmemektedir. Son yıllarda Kanada da yapılan bir çalışmada, holstein süt boğalarındaki MHC sınıf I bölgesinin genetik çeşitliliğinin kapsamı araştırılmış ve sütçül sığırlarda BoLA çeşitliliğinin etkileyen seleksiyon kuvvetleri tanımlanmıştır (Codner ve ark., 2012). Bu çalışmada dört nesil boyunca belirli BoLA haplotiplerinin frekansı önemli ölçüde değişmesine rağmen farklılık arz eden allelerin sayısının önemli ölçüde azaltılmadığı görülmüştür. Genel olarak sonuçlar, bu popülasyonda BoLA çeşitliliğinin korunmasında yer alan seleksiyon güçlerinin, hastalık ve doğurganlık kadar üretim özelliklerini de içerdiğini ve seleksiyonu dengelemek için bir rol oynadığını göstermektedir. Bu nedenle, yerli sığır popülasyonlarındaki işlevsel olarak önemli gen varyantlarının ve haplotiplerinin aranması çok önemlidir.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre yerli kara'da BoLA-DRB3 lokusunun polimorfik olduğunu ve bazı hastalıklara dirençle alleli ile ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte, yerli kara'daki polimorfizmlerin kapsamını daha belirgin bir şekilde tanımlamak için daha ileri çalışmalar yapılmalıdır. Ayrıca yerli kara'daki BoLA-DRB3 allelleri ile hastalık direnci özellikleri arasındaki ilişki daha ayrıntılı araştırılmalıdır. Türkiye'deki yerli sığır ırklarındaki (yerli kara) BoLA genleri ile ilgili ilk rapordur ve gelecekteki bağışıklık genleri ile ilgili daha ileri çalışmalar için temel veriler içermektedir. Daha önceki çalışmalarda da bildirildiği üzere, mastitis direncine ile ilişkili olarak ortak bir BoLA-DRB3 alleli henüz belirlenmemiştir. Dolayısıyla, BoLA-DRB3 allellerinin mastitise duyarlılığı veya direnci ile

olan ilişkisini daha da netleştirmek için, ineklerin mastitis patojenlerine (*Streptococci*, koagülaz negatif *Staphylococci*, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*) karşı bağışıklık tepkilerini araştırmak gereklidir. Ayrıca, her BoLA-DRB3 allelinin amino asit motifinin özelliklerini açıklığa kavuşturmak ve her BoLA-DRB3 alleli ve mastitis patojenik bakterilerin antijen bağlama oluşu ve cepleri arasındaki ilişkiyi araştırmak gereklidir. Bu açıdan düşünüldüğünde yerli sığır ırklarımız bulunmaz birer hazine niteliğindedir.

4.7. BoLA-DYA ve –DYB Gen Bölgelerinin Karakterizasyonu

4.7.1. BoLA-DYA gen bölgesi ve yerli kara sığırında DYB bölgesinin nükleotid dizilenmesi

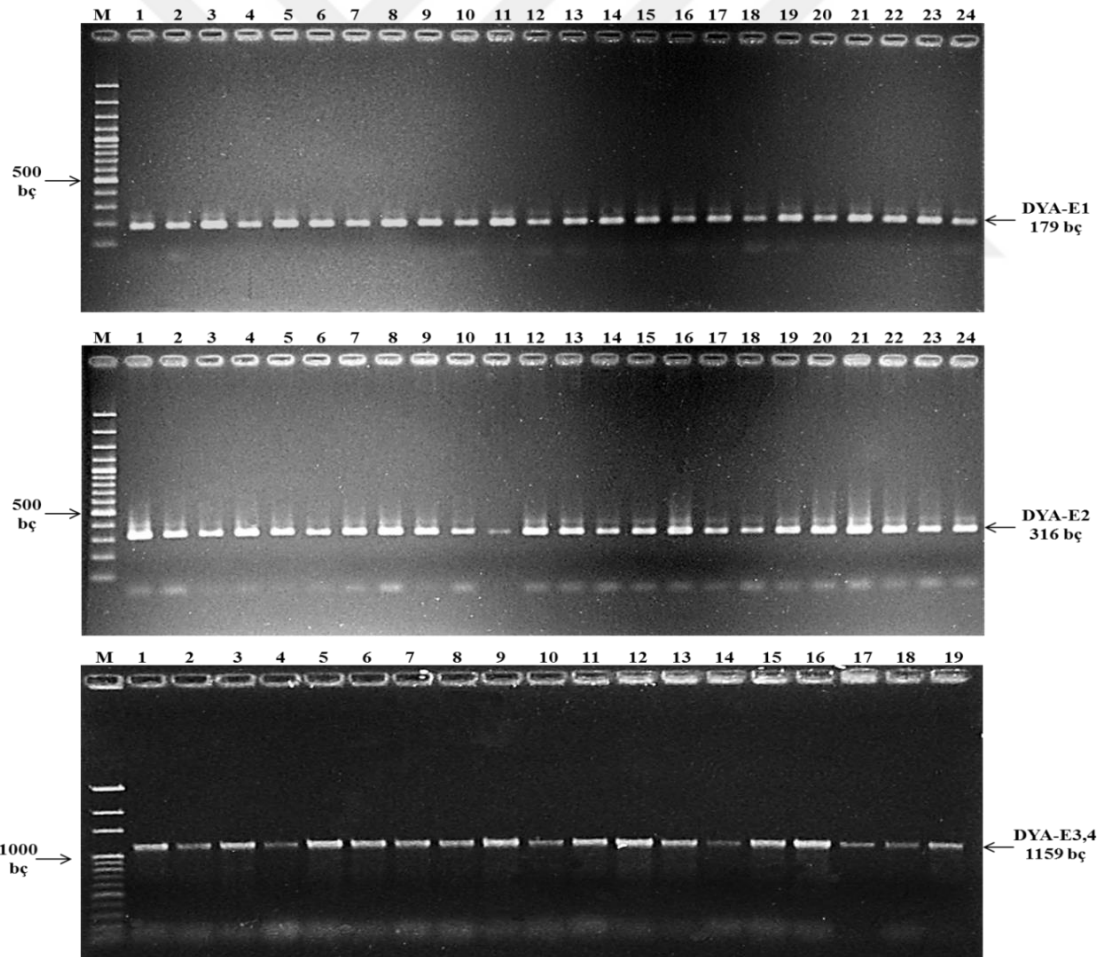
BoLA sınıf II histokompatibilite molekülü, heterodimer alfa zinciri veya kısaca BoLA-DYA geni, ruminantlara özgün bir gen bölgesidir. Sınıf IIa genlerinin aksine, DYB genleri sadece geviş getiren hayvanlarda bulunur, düşük seviyede polimorfizm sergilerler ve dendritik hücredeki sınırlı dağılımları ile transkripsiyon edilirler. DY polipeptitlerinin sığır, insan ve farede MHC alfa ve beta zincirlerinin sekanslarının karşılaştırılarak yapılan analizde varsayılan peptit bağlanma bölgelerinde benzersiz 16 amino asit tespit edilmiştir. Bunlara rağmen hala DYB ve DYB genlerinin işlevi bilinmemektedir (Ballingall ve McKeever, 2005). DYB genleri koyun ve sığırlarda (yaklaşık 20 milyon yıl önce birbirinden ayrıldığı iki tür) karşılaştırıldıklarında pseudogenlerden ziyade fonksiyonel genler gibi daha çok korunmuşlardır. Korunma seviyeleri promotorda % 97, kodlanan bölgede % 94 ve intronik bölgede % 91 şeklindedir, bu oranlar fonksiyonel MHC genleriyle karşılaştırıldıklarında elde edilen sonuçlardır. Bu sınıf II MHC genleri arasındaki koruma derecesi evrim ile tutarlıdır, bu genler ruminatlarda bu özellikleriyle benzersiz bir fonksiyonu barındırmaktadır (Behl ve ark., 2012).

Sığırlardaki DYB gen bölgesi, 23. Kromozomun (AC_000180.1) 23q12-q13 bölgesinde, yaklaşık uzunluğu 5887 bp (7011862..7017749) olan linear bir gen bölgesidir. BoLA-DYA bölgesi 4 ekzondan oluşan yaklaşık 759 baz uzunlukta olgunlaşmış bir mRNA'dan 253 amino asitlik, moleküler ağırlığı 28391,76 Da ve pI değeri 5,43 olan bir proteindir. İlk 21 amino asit sinyal peptit bölgesini geriye kalan 232 aa olgunlaşmış polipeptidi oluştururken, 29→108 aa alfa domainini, 110→203 immünoglobulin ve 201→252 C-terminal domainini oluşturmaktadır (Childers ve ark., 2006; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd>; <http://web.expasy.org>; www.uniprot.org). Ayrıca BoLA-DYA gen bölgesinde 196-217 arasında hidrofobik transmembran bölgesi

bulunurken, 227-230 pozisyonlarında dört arginin bulunduğu eşsiz bir sitoplazmik kuyruk bölgesi bulunmaktadır (Ballingall ve ar., 2004). Bahsi geçen gen bölgesinin yerli kara sığır ırkındaki moleküler özelliklerinin belirlenmesi için tüm örneklerde PZR kullanılarak tarama gerçekleştirilmiştir.

4.7.1.1. DYA geninin PZR amplifikasyonu sonucu

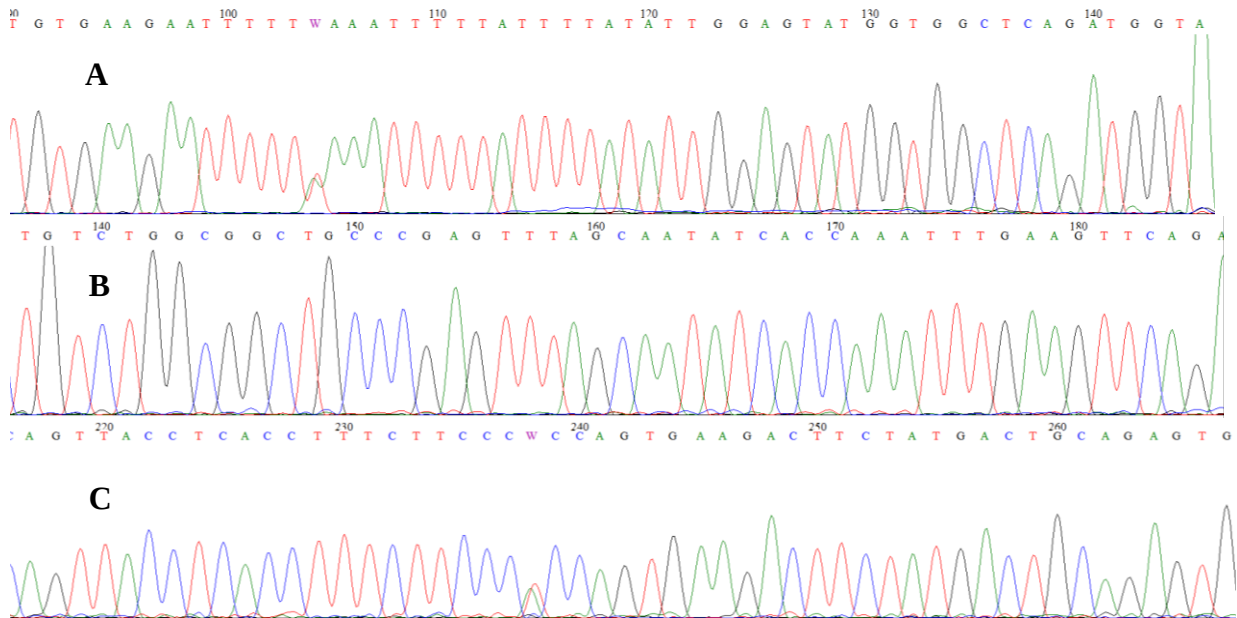
Yerli kara sığır örneklerindeki BoLA-DYA gen bölgesini oluşturan ekzon I, II, III ve IV için 3.4.1’de bahsedilen şekilde dizayn edilen primerler kullanılarak (Çizelge 3.1) PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonu, 3.4.2’de detaylandırılan PZR şartları kullanılarak yapılmış ve çoğaltılan bölge % 1,5’lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.66). Hedef bölgeler, ekzon I için yaklaşık 179 bç (ekzon uzunluğu; 76 bç), ekzon II için yaklaşık 316 bç (ekzon uzunluğu; 249 bç) ve ekzon III ve IV için yaklaşık 1159 bç (ekzon uzunlukları; 282-155 bç) uzunluğunda lineer gen bölgeleridir.



Şekil 4.66. YK1- 24. örneklerinde DYA-E1 ve DYA-E2 bölgelerinin, YK1-19. Örneklerinde DYA-E3,4 bölgelerinin PZR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı.

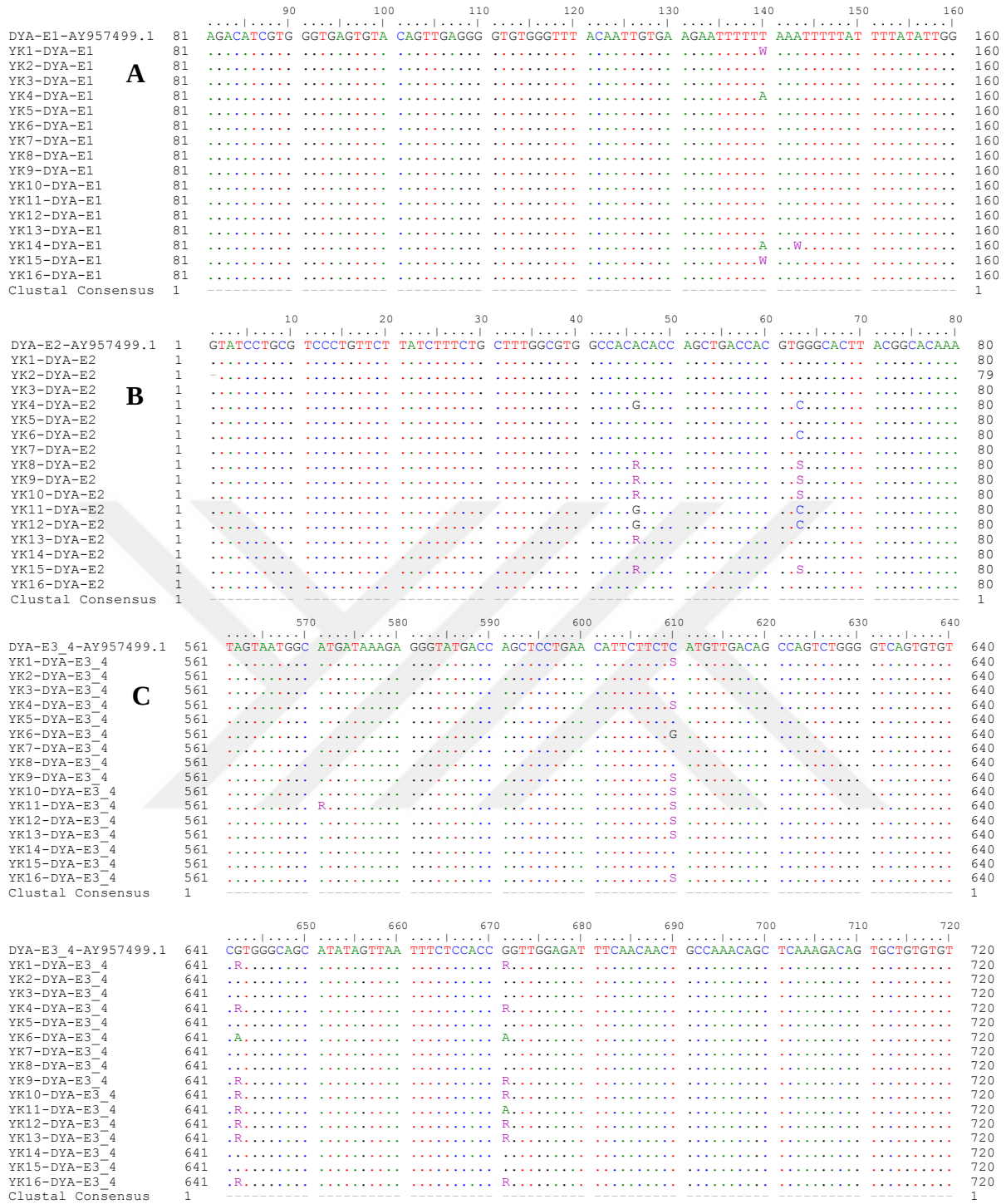
4.7.1.2. DYA nükleotid dizilenmesi ve amino asit dizi analizi

YK-DYA-E1 (179 bç), YK-DYA-E2 (316 bç) ve YK-DYA-E3,4 (1159 bç) bölgelerinin her iki zincirinden ileri ve geri primerleri kullanılarak nükleotid dizisi belirlenmiştir. Tüm örneklerden elde edilen dizi bilgileri farklı formatlarda kaydedilmiştir. 3.6’da ayrıntılı bir şekilde bahsedildiği gibi hedef bölge için farklı olarak düşünülen örneklerin kromatogramlarına bakılarak YK1-16-DYA-E1,-DYA-E2 ve -DYA-E3,4 şeklinde konsensüs dizileri belirlenmiştir (Şekil 4.67). Yerli kara ekzon dizileri birleştirilerek DYA gen bölgesinin tam dizisi elde edilmiştir. Daha sonra bu diziden yola çıkılarak yerli kara DYA gen bölgesinin amino asit dizileri ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen konsensüslerin hem nükleotid dizileri hem de amino asit dizileri ek çizelge C.9’da ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 4.67. YK-DYA-E1 (A), YK-DYA-E2 (B) ve YK-DYA-E3,4 (C) bölgesinin ileri primer ile elde edilen nükleotid dizisine ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir.

Konsensüs dizileri ve referans gen bölgesi öncelikle ClustalX programı yardımı ile Fasta, Phylip, Nexus ve Clustal formatlarında kaydedilmiştir. Daha sonrasında Bioedit ve Clustal Omega programı kullanılarak hizalanmış ve farklılıkları belirlenmiştir (Şekil 4.68). Bu işlemler sırasıyla DYA-E1, DYA-E2 ve DYA-E3,4’e uygulanmıştır.



Şekil 4.68. Referans BoLA-DYA geni (AY957499.1) ve YK-DYA-E1 (A), YK-DYA-E2 (B) ve YK-DYA-E3,4 (C) bölgesinin konsensüs dizilerinin hizalanmasının bir kısmı.

Kümeleme işlemi sonunda YK-DYA-E1 bölgesini yönünden, konsensüs dizilerinde, YK1-DYA-E1 dizisinde 13. ve 140. pozisyonlarda (W: A veya T), YK14-DYA-E1 dizisinde 143. pozisyonlarda (W: A veya T) ve YK15-DYA-E1 dizisinde de 140. pozisyonlarda (W: A veya T) heterozigot noktaları belirlenmiştir. Bu sonuçlar çizelgede 4.24’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.24. YK-DYA-E1 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.

Nükleotid Pozisyonları	13	140	143	Toplam Farklılık
Konsensüs	A	T	A	
DYA-E1- AY957499.1	.	.	.	0
YK1-DYA-E1	W*	W	.	2
YK2-DYA-E1	.	.	.	0
YK3-DYA-E1	.	.	.	0
YK4-DYA-E1	.	A	.	1
YK5-DYA-E1	.	.	.	0
YK6-DYA-E1	.	.	.	0
YK7-DYA-E1	.	.	.	0
YK8-DYA-E1	.	.	.	0
YK9-DYA-E1	.	.	.	0
YK10-DYA-E1	.	.	.	0
YK11-DYA-E1	.	.	.	0
YK12-DYA-E1	.	.	.	0
YK13-DYA-E1	.	.	.	0
YK14-DYA-E1	.	A	W	2
YK15-DYA-E1	.	W	.	1
YK16-DYA-E1	.	.	.	0
Özet	1W	2A,2W	1W	6

*W: A veya T.

YK-DYA-E2 nükleotid dizilerinin kümelenmesi sonucunda, en fazla farklılık YK4, YK9, YK10 ve YK12-DYA-E2 konsensüs dizilerinde (5 nükleotid farklılık) gözlemlenirken, en az farklılık (3 nükleotid farklılık) ise YK1, YK8, YK11 ve YK15-DYA-E2 konsensüs dizilerinde gözlemlenmiştir. Buradaki dikkat çeken nokta 46, 63, 100, 184 ve 207 pozisyonadaki nükleotidlerin heterozigot oluşlarıdır. Bu sonuçlar çizelge 4.25’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.25. YK-DYA-E2 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.

Nükleotid Pozisyonları	46	63	100	184	207	Toplam Farklılık
Konsensüs	A	G	G	C	A	
DYA-E2- AY957499.1	.	.	.	.	.	0
YK1-DYA-E2	.	.	R	Y	R	3
YK2-DYA-E2	.	.	.	.	.	0
YK3-DYA-E2	.	.	.	.	.	0
YK4-DYA-E2	G	C	R	Y	G	5
YK5-DYA-E2	.	.	.	.	.	0
YK6-DYA-E2	.	C	R	Y	G	4
YK7-DYA-E2	.	.	.	.	.	0
YK8-DYA-E2	R*	S	.	.	R	3

Çizelge 4.25. Devamı.

Nükleotid Pozisyonları	46	63	100	184	207	Toplam Farklılık
YK9-DYA-E2	R	S	R	Y	R	5
YK10-DYA-E2	R	S	R	Y	R	5
YK11-DYA-E2	G	C	.	.	G	3
YK12-DYA-E2	G	C	A	T	G	5
YK13-DYA-E2	R	.	R	Y	R	4
YK14-DYA-E2	.	.	.	.	.	0
YK15-DYA-E2	R	S	.	.	R	3
YK16-DYA-E2	.	.	.	.	.	0
Özet	3G,5R	4C,4S	1A,6R	1T,6Y	4G,6R	40

*R: G veya A, S: G veya C, Y: T veya C.

YK-DYA gen bölgesini oluşturan diğer ekzon bölgelerinin (3,4) kümelenmesi sonucunda en fazla farklılık YK1-DYA-E3,4 konsensüs dizisinde (14 nükleotid farklılık) belirlenirken, en az farklılık ise YK5-DYA-E3,4 konsensüs dizisinde (2 nükleotid farklılık) gözlemlenmiştir. Bu bölgelerdeki farklılıklarda tıpkı diğer DY A ekzonlarında olduğu gibi yaygın heterozigotluk göstermişlerdir. Bu sonuçlar çizelgede 4.26’da özetlenmiştir.

Çizelge 4.26. YK-DYA-E3,4 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.

Nükleotid Pozisyonları	61	86	110	111	112	115	116	156	170	171	198	200	217	219	264	345	375	470
Konsensüs	A	C	C	C	T	T	C	A	C	G	G	G	A	A	T	C	C	C
DYA-E3,4- AY957499.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK1-DYA-E3,4	G	Y*	.	A	A	A	A	.	Y	.	.	.	.	.	W	.	.	.
YK2-DYA-E3,4	.	.	.	.	.	.	.	W	.	R	K	S	W	.	.	.	T	.
YK3-DYA-E3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK4-DYA-E3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	W	T	.	Y
YK5-DYA-E3,4	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK6-DYA-E3,4	.	Y	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	A	.	.	.
YK7-DYA-E3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	Y	.
YK8-DYA-E3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK9-DYA-E3,4	.	.	A	.	A	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	W	.	.	.
YK10-DYA-E3,4	.	Y	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	W	.	.	.
YK11-DYA-E3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	W	.	.	.
YK12-DYA-E3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	W	.	.	.
YK13-DYA-E3,4	.	Y	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	W	.	.	.
YK14-DYA-E3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK15-DYA-E3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
YK16-DYA-E3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	W	.	.	.
Özet	1G	4Y	1A	1A	3A	1A	1A	1W	1T,8Y	1R	1K	1S	1W	1R	1A,8W	1T	1T,1Y	1Y

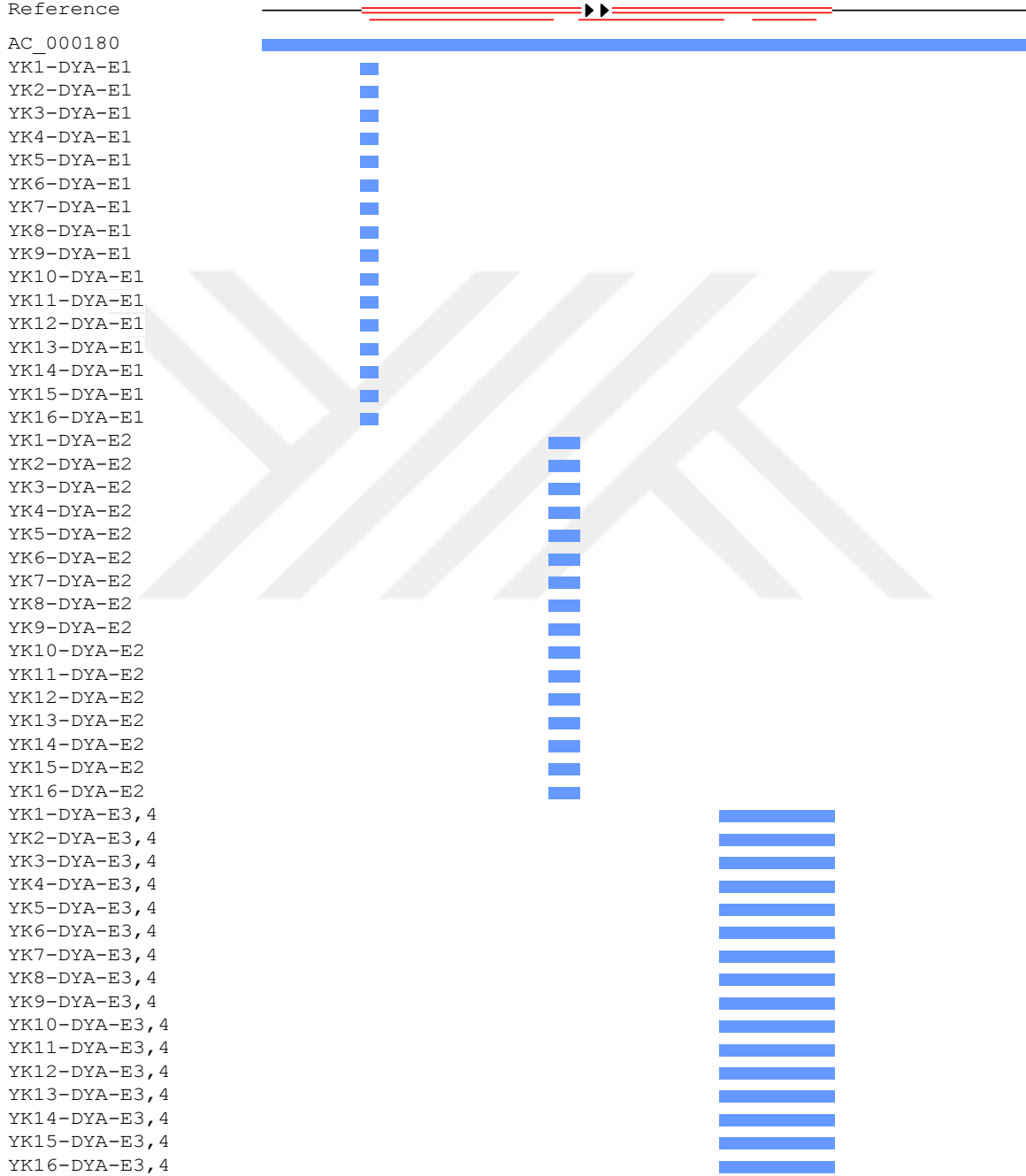
*W: A veya T, K: G veya T, R: G veya A, S: G veya C, Y: T veya C.

Çizelge 4.26. Devamı.

Nükleotid Pozisyonları	513	571	610	642	671	730	783	825	854	892	948	1048	1050	Toplam Farklılık
Konsensüs	C	A	C	G	G	C	T	G	C	C	T	G	G	
DYA-E3,4- AY957499.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK1-DYA-E3,4	.	.	S*	R	R	.	Y	.	Y	.	Y	.	.	14
YK2-DYA-E3,4	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	7
YK3-DYA-E3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK4-DYA-E3,4	.	.	S	R	R	.	Y	.	Y	.	Y	.	.	10
YK5-DYA-E3,4	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	2
YK6-DYA-E3,4	.	.	G	A	A	.	C	.	T	.	C	.	.	9
YK7-DYA-E3,4	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	3
YK8-DYA-E3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK9-DYA-E3,4	.	.	S	R	R	.	Y	.	Y	.	Y	R	.	11
YK10-DYA-E3,4	.	.	S	R	R	.	Y	.	Y	.	Y	.	.	9
YK11-DYA-E3,4	Y	R	S	R	A	Y	C	.	T	Y	Y	.	R	13
YK12-DYA-E3,4	.	.	S	R	R	.	.	.	Y	.	Y	.	.	7
YK13-DYA-E3,4	.	.	S	R	R	.	.	.	Y	.	Y	.	.	8
YK14-DYA-E3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK15-DYA-E3,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK16-DYA-E3,4	.	.	S	R	R	.	Y	.	Y	.	Y	.	.	8
Özet	1Y	1R	1G,8S	1A,8R	2A,7R	1Y	2C,5Y	3R	2T,7Y	1Y	1C,8Y	1R	1R	101

*W: A veya T, K: G veya T, R: G veya A, S: G veya C, Y: T veya C.

DYA-E1, DYA-E2 ve DYA-E3,4 konsensüs dizilerindeki farklılıkların protein yapısında ne gibi değişiklikler yaptığını ve yerli kara sığırında ilk defa tanımlanan bu gen bölgesinin tam nükleotid dizisini belirlemek için clone manager programı kullanılarak, intron bölgeleri uzaklaştırılarak, ekzon bölgeleri birleştirilmiş ve amino asit dizileri belirlenmiştir (Şekil 4.69).



Şekil 4.69. Nükleotid konsensüs dizilerinden mRNA bölgesinin elde edilmesi ve aa dizilerinin belirlenmesi (Referans: Bos_taurus_UMD_3.1.1 genomu, Ac. No. AC_000180.1,YK1-16 konsensüs dizileri, mavi bölgeler ortak noktaları göstermektedir).

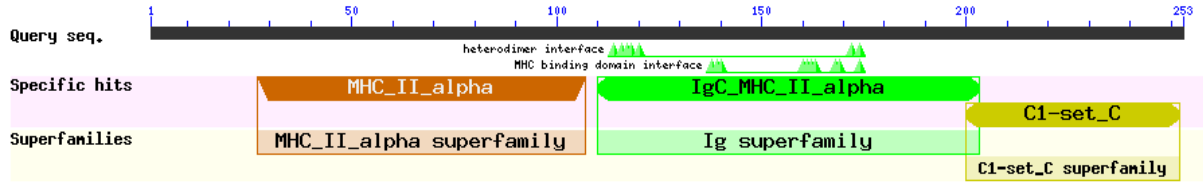
Yerli kara DYA nükleotid konsensüs dizileri kullanılarak elde edilen DYA-mRNA (762 bp uzunluğunda) dizilerinden yola çıkılarak 14 farklı haplotip belirlenmiştir. Belirlenen haplotiplere bakılarak bu gen bölgesi yönünden yerli kara konsensüs dizilerin oluşturulduğu popülasyonlardaki bireylerde heterozigotluğun yaygın olarak görüldüğü belirlenmiştir. Dikkat çeken nokta ise 77. pozisyonadaki C yerine tüm yerli kara sığırlarında G nükleotidinin gelmesidir (Çizelge 4.27).

Çizelge 4.27. DYA bölgesinden transkripte olan mRNA nükleotid dizisi.

Nükleotid Pozisyonları	77	87	124	208	231	335	360	384	385	386	389	390	430	444	445	472	474	491	493	538	675	677	Toplam Farklılık
Konsensüs	G	G	G	C	A	A	C	C	C	T	T	C	A	C	G	G	G	A	A	T	G	G	
DYA-mRNA-NM_001012678.1	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
YK1-DYA-mRNA	.	.	R	Y	R	G	Y	.	A	A	A	A	.	Y	.	.	.	.	.	W	.	.	11
YK2-DYA-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	W	.	R	K	S	W	.	.	.	.	5
YK3-DYA-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK4-DYA-mRNA	.	C	R	Y	G	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	W	.	.	6
YK5-DYA-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
YK6-DYA-mRNA	.	C	R	Y	G	.	Y	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	A	.	.	7
YK7-DYA-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	1
YK8-DYA-mRNA	.	S	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2
YK9-DYA-mRNA	.	S	R	Y	R	.	.	A	.	A	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	W	R	.	9
YK10-DYA-mRNA	.	S	R	Y	R	.	Y	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	W	.	.	7
YK11-DYA-mRNA	.	C	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	W	.	R	5
YK12-DYA-mRNA	.	C	A	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	W	.	.	6
YK13-DYA-mRNA	.	.	R	Y	R	.	Y	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	W	.	.	6
YK14-DYA-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK15-DYA-mRNA	.	S	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2
YK16-DYA-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	W	.	.	2
Özet	1 C	4 , 4 S	1 C R	1 T Y	4 G R	1 G	4 Y	1 A	1 A	3 A	1 A	1 A	1 W	1 T , 8 Y	1 R	1 K	1 S	1 W	1 R	1 A , 8 W	1 R	1 R	71

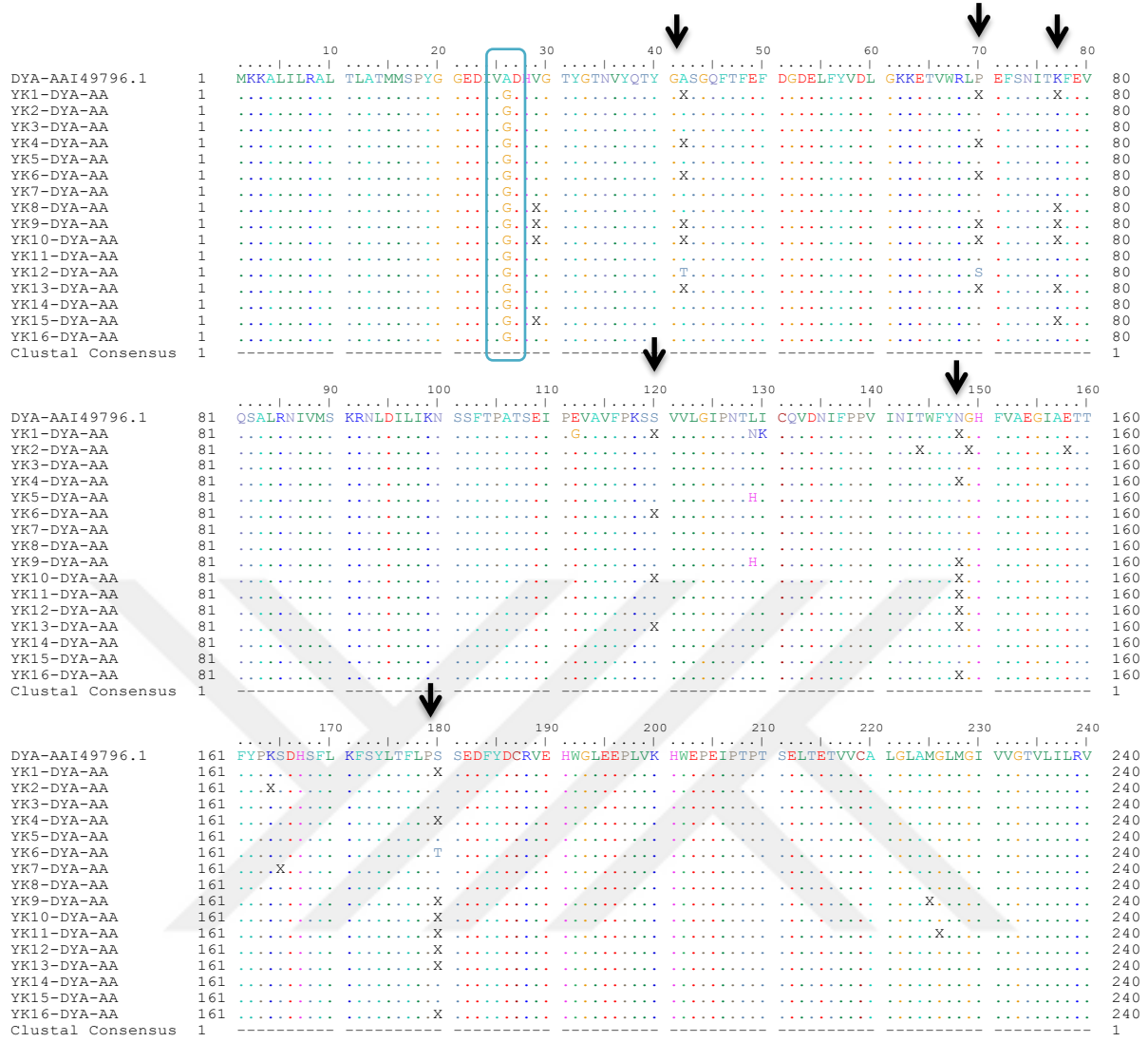
*W: A veya T, K: G veya T, R: G veya A, S: G veya C, Y: T veya C.

Elde edilen amino asit dizileri (253 aa uzunlukta) NCBI'da Blast yapılarak hedef bölge olduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.70). İlk 21 asit signal peptit bölgesini, 29→108 aa alfa domainin, 110→203 immünoglobulin ve 201→252 C-terminal domainini oluşturmaktadır (Childers ve ark., 2006 ; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd>).



Şekil 4.70. YK1-DYA-PR'nin sahip olduğu, alfa, immunoglobülin ve C-terminal domainleri.

Belirlenen YK-DYA haplotiplerinin oluşturduğu proteinlerin NCBI Blast sonuçlarına göre; *Bos taurus*'dan eksprese olan MHC sınıf II DQA1 alfa zincirine (Ac. No: AAI49796.1) benzerlik oranı YK1 ve YK9 için %96, YK10 ve YK13 için %97, YK2, 4, 6, 11 ve 12 için %98 ve YK3, 5, 7, 8, 14, 15 ve 16 için %99 olarak bulunmuştur. *Bos taurus*'dan eksprese olan MHC sınıf II DYA alfa zincirinin (Ac. No: AAI49796.1), moleküler ağırlığı 28350,71 Da ve pI değeri 5,43'dür. YK1-16 DYA proteini için moleküler ağırlık 28226,97-28432,23 Da arasında hesaplanırken pI değerleri 5,29-5,58 olarak belirlenmiştir. Yerli kara sığır ırkının DYA geni yönünde amino asit pozisyonları dikkate alındığında, oluşturulan tüm konsensüs dizilerinde 26. pozisyonundaki alaninin (A) gilisinine (G) dönüştüğü ve bu değişikliğin tüm yerli kara örneklerinde korunduğu belirlenmiştir. Ayrıca 42. pozisyonundaki alaninin (A) → X'e (herhangi bir amino asit), 70. pozisyonundaki prolinin (P) → X'e (herhangi bir amino asit), 77. pozisyonundaki lizin (K) → X'e (herhangi bir amino asit), 148. pozisyonundaki asparajininin (N) → X'e (herhangi bir amino asit) ve 180. pozisyonundaki serinin (S) → X'e (herhangi bir amino asit) dönüştüğü belirlenmiştir. Bu noktalar arasındaki en dikkat çekici olanlar, YK1, YK4, YK6, YK9, YK10 ve YK13 DYA-mRNA dizilerindeki R nükleotidinin (G veya A) tıpkı YK12-DYA-mRNA da adenin şeklinde ifade edildiğinde treonin amino asitinin sentezlenmesidir. Yani YK1, YK6, YK9, YK10 ve YK13 DYA amino asit dizilerindeki X bölgesi treonin şeklinde ekspresyonu gerçekleştirilebilir şekilde yorumlanmıştır. Benzer bir durum da, 70. pozisyonundaki prolinin yerine yerli karalarda serin amino asidinin ekspres gerçekleşebileceği ihtimalidir. Diğer taraftan, *Bos taurus*'da 180. pozisyonundaki prolinin yerini, YK1, 4, 9, 10, 11, 12, 13 ve 16'da serin amino asitinin alma ihtimalidir (Şekil 4.71).



Şekil 4.71. BoLA-DYA alleli tarafından kodlanan alfa bölgelerinin tahmini amino asit dizilerinin hizalanması (↓: Amino asit değişikliğinin olduğu bölgeleri, mavi kutular tüm örneklerde korunan bölgeleri göstermektedir).

Ruminantlarda MHC sınıf II bölgesinin üç ayırt edici özelliği belirlenmiştir, bunlardan ilki insanlarda görülen DP gen bölgesinin bir izotipinin ruminatlarda olmayışı, ikinci olarak ise haplotiplerde görülen DQ gen sayısındaki değişiklik, üçüncü ve son olarak ise ruminantlara özgün olduğu düşünülen DYA ve DYB genlerinin varlığıdır (Wright ve ark., 1994). Bu açıdan düşünüldüğünde DYA gen bölgesindeki özgünlüğün ve bu özelliğin yerli kara sığır ırkındaki durumunu açıklamak için, NCBI’da bulunan diğer DYA genleri ile kıyaslaması gerçekleştirilmiştir.

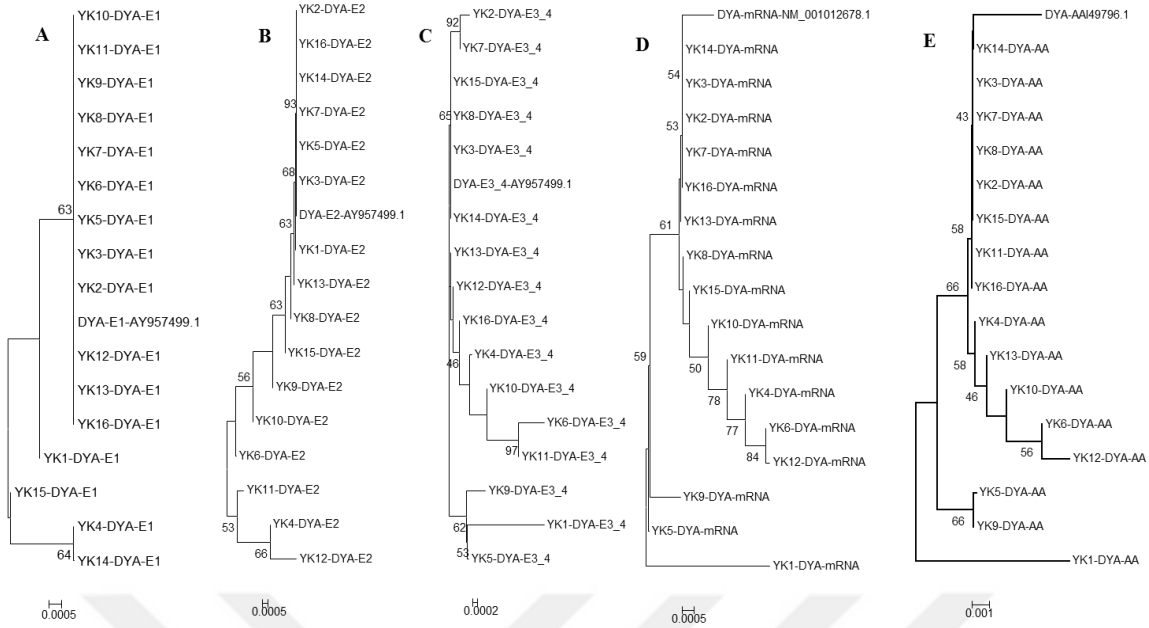
4.7.1.3. DYA bölgesinin filogenetik analizi

Çalışmanın bu kısmında yerli kara sığır ırkındaki BoLA-DYA gen bölgesinin ait sekanslar ortaya çıkartılmıştır. Bu diziler kullanılarak NCBI’da daha önceden belirlenen BoLA-DYA ve diğer türlerdeki benzer gen bölgeleri ile beraber filogenetik analiz yapılmıştır. Yerli kara sığırının DYA-E1, DYA-E2 ve DYA-E3,4 bölgelerinin dizi bilgileri analiz edilerek, DNA polimorfizm özellikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.28). Yerli karada DYA-E1, DYA-E2 ve DYA-E3,4 bölgeleri için sırasıyla toplam 6, 40 ve 101 farklı bölge belirlenirken, bu bölgelerin 3, 5 ve 19 tanesini polimorfik olduğu ve haplotip sayılarının 5, 32 ve 42 olduğu tespit edilmiştir. Yerli kara sığırlarında, haplotip farklılığı DYA-E1 için $0,538 \pm 0,114$, DYA-E2 için $0,969 \pm 0,005$ ve DYA-E3,4 için ise $0,989 \pm 0,009$ olarak hesaplanırken, nükleotid farklılığı ise DYA-E1, DYA-E2 ve DYA-E3,4 bölgeleri için sırasıyla $0,00392 \pm 0,00100$, $0,00783 \pm 0,00011$ ve $0,00549 \pm 0,00029$ olarak hesaplanmıştır. Yerli karalardaki haplotipler arasındaki genetik uzaklıklar ise DYA-E1 için 0,0056-0,0169 (ortalama: 0,0039), DYA-E2 için 0,0032-0,0160 (ortalama: 0,0078) ve DYA-E3,4 için ise 0,0009-0,0122 (ortalama: 0,0055) arasında bulunmuştur.

Çizelge 4.28. DYA bölgesinin dizisine göre DNA polimorfizm özellikleri

Özellikler	Genel (DYA-E1)	Genel (DYA-E2)	Genel (DYA-E3,4)
Toplam Bölge Sayısı	6	40	101
G+C	45	49,21	51,37
Polimorfik Bölge Sayısı (s)	3	5	19
Haplotip Sayısı (h)	5	32	42
Haplotip Farklılığı (Hd)	$0,538 \pm 0,114$	$0,969 \pm 0,005$	$0,989 \pm 0,009$
Nükleotid Farklılığı (Pi)	$0,00392 \pm 0,00100$	$0,00783 \pm 0,00011$	$0,00549 \pm 0,00029$

Yerli kara sığır ırkı için oluşturulan filogenetik ağaçlar Neighbor-Joining (NJ) yöntemi, Jukes-Cantor modeli ve Bootstrap metoduna (1000) dayanmaktadır. Konsensüs dizileri filogenetik ilişkileri bakımından referans diziye göre (nükleotid dizileri için Ac. No. AY957499.1) YK-DYA-E1 nükleotid dizisi ayrımı %50, YK-DYA-E2 nükleotid dizisi ayrımı %50 ve YK-DYA-E3,4 nükleotid dizisi ayrımı %20, mRNA dizisi (mRNA dizileri için Ac. No. NM_001012678.1) %50 şeklinde hesaplanırken amino asit dizisi (amino asit dizileri için Ac. No. AAI49796.1) ayrımı %10 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.72).



Şekil 4.72. BoLA-DYA konsensüs dizilerinin filogenetik ağaçları. Yerli kara BoLA-DYA-E1, -E2 ve E3,4 allellerinin sırasıyla 179, 316 ve 1159 bp'lik nükleotid dizilerinden oluşturulmuş komşu birleştirme (Neighbor-joining) ağaçları (A, B ve C), 762 bazlık mRNA dizilerinden oluşturulmuş Neighbor-joining ağacı (D) ve 253amino asit uzunluğundaki dizilerden oluşturulmuş Neighbor-joining ağacı (E).

BoLA-DYA tanımlanmasından buyana sadece 4 DYA-E2 alleli belirlenmiştir (Anderson ve Rask, 1988; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=BoLA-DYA>). Bu allerdeki farklılıklar bir veya iki nükleotid farklılıkta ileri gelmektedir. Bu açıdan düşünüldüğünde yerli kara sığır ırkının mRNA dizisinde belirlenen guanin farklılığının, yerli karalara özgün olduğunu belirlemek için, NCBI'da bulunan, BOLA-DYA-mRNA (Ac. No. NM_001012678.1) ve OLA-DYA-mRNA (Ac. No. NM_001123398.2) insanlarda karşılığı olmasada en çok benzeyen gen olan DQA geninin [HLA-DQA1-mRNA (Ac. No. NM_002122.3) ve SLA-DQA-mRNA (Ac. No. NM_001130224.1)] mRNA dizilimleri kullanılarak karşılaştırılmış ve bu nükleotid farklılığının yerli karaya özgün olduğu ortaya çıkarılmıştır (Şekil 4.73 A). Daha da önemlisi bu nükleotid farklılığın YK-DYA geninden eksprese olan proteinin amino asit dizilimine yaptırdığı değişikliktir (alanin→glisine) (Şekil 4.73 B). NJ ağacının sonuçlarına göre DYA-E2 alleleri iki farklı ana kola (clade) ayrılmıştır. İlk dallanma yerli kara alleleri kendi arasında iki alt dala ayrılırken, diğer dallanma ise Bibo-DYA-E2*0101 (Bison bonasus), Boja-DYA-E2*0101 (Bos javanicus) ve Boga-DYA-E2*0101 (Bos gaurus) allerinden oluşmuştur (Şekil 4.73 C). Amino asit dizileri kullanılarak inşa edilen filogenetik ağaçta ise yerli kara DYA amino asit dizlerinin tamamı farklı bir dalda toplanmıştır. Bu da belirlenen dizilerin yeni alleler olabileceğini ve yerli karalara özgün

olabilirliğini ortaya çıkarmaktadır (Şekil 4.73 D). DYA gen bölgesinin henüz fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte, ruminantlara özgün bir gen bölgesi olması, sığır ırklarının ayırımında kullanılma potansiyeli yanında hastalıklara dirençli bireylerin ayırımında diğer immün genlerle birlikte kullanılabilir bir marker olma özelliğine sahiptir. Daha önceki yayınlarda BoLA-DYA gen bölgesinin nükleotid dizisinin yanında fonksiyonel özelliklerini belirlemek için yapılan çalışmalar olmasına rağmen hala tam olarak anlaşılmamış olması önemli bir problemdir. Farklı sığır ırklarında bulunan DYA genleri daha fazla tanımlanmalı ve moleküler analizler ile MHC genlerine etkisi açıklanmalıdır. Bu açıdan bakıldığında BoLA-DYA geni üzerinde düşünülmesi gereken aday bir genidir.

DYA ve DYB genlerinin insan ve farelerde hiçbir belirgin ortologu bulunmadığı gösterilmiştir. Bunun aksine koyun, keçi ve sığırdaki belirlenen bu genler sadece ruminantlar ile sınırlandırılmış olabilir (Mann ve ark., 1993; Stone ve ark., 1993; Wright ve ark., 1994).

Dendritik hücreler (DH) yabancı antijenlere karşı T hücrel yanıtını başlatan ve geri çağıran, bağışıklık sistemindeki en etkili immün hücre popülasyonunu oluşturanlardan birisidir. DYA genlerinin bu hücrelerde ekspresyon gerçekleştirdiği keşfedilmiştir. Bu da immün sistem için önemli olduklarının en açık göstergesidir (Ballingall ve ark.,2004). Şimdiye kadar DY genleri üzerinde yapılan çalışmalarda, sığır, insan ve farelerde sınıf II MHC α ve β polipeptid zincirinde benzersiz 16 amino asit dizisi olduğu ortaya çıkartılmıştır (Ballingall ve McKeever, 2005). Yerli kara sığındaki belirlenen amino asit dizisinin 17 olduğu açıkça ortadadır. Sığır ve koyunlardaki DYA ve DYB genlerinin aralarında karşılaştırılması sonucunda %96 oranında benzerlik gösterdikleri bulunmuştur (Wright ve ark., 1994). Bununla birlikte sığır DYA geni, insanlardaki en yakın ilişki MHC geni olan DQA1'e sadece %8 oranında benzemektedir (Childers ve ark., 2006). Ayrıca DY genleri, DQ genlerine kıyasla daha düşük nükleotid değiştirme oranlarına ve daha küçük genetik mesafeye sahiptir (Ballingall ve ark.,2005).

Sonuç olarak, insan, sığır, domuz ve koyunlardaki sınıf II MHC moleküllerin BoLA-DYA polipeptid zincirlerin arasındaki ilişkiyi belirlemek için NJ ağacı oluşturulmuştur. Ağacın topolojisi incelendiğinde daha önceki çalışmalarda belirlenen sonuçlarla paralellik göstermektedir (Stone ve Muggli-Cockett, 1990; Poel ve ark., 1990; Wright et al. 1994). DY genleri, ruminantların kemirgen ve primatlardan ayrılmadan önce ortaya çıktığını, kemirgen ve primatlarda bulunmayışının da muhtemelen ruminantların evrim sürecinde ortaya çıktıktan sonra silinmiş olabileceği bu yüzden ruminantlar için eşsiz bir fonksiyona sahip olması muhtemel görülmektedir (Ballingall ve ark.,2004). YK-DYA amino asit dizilerinin sığır, insan, domuz, koyun ve bizonda kıyaslanması, yerli kara sığır ırkı için benzersiz olan tek amino asit pozisyonunu (glisin) tanımlamamızı sağlamıştır. Bu bölge tüm yerli kara DYA konsensüs dizilerinin tamamında %100 korunmuştur. Türler arasında korunan amino asitler genellikle genin yapısı veya fonksiyonunu korumak için gerekli noktaları işaret eder. Ayrıca fonksiyonel genler sessiz genlerden daha yüksek nükleotid koruma seviyesi göstermektedirler. Bu açıdan bakıldığında yerli karadaki DYA genin ekspresyonu seviyesi ve protein yapısı daha sonraki çalışmalarda ayrıntılı olarak çalışılacaktır.

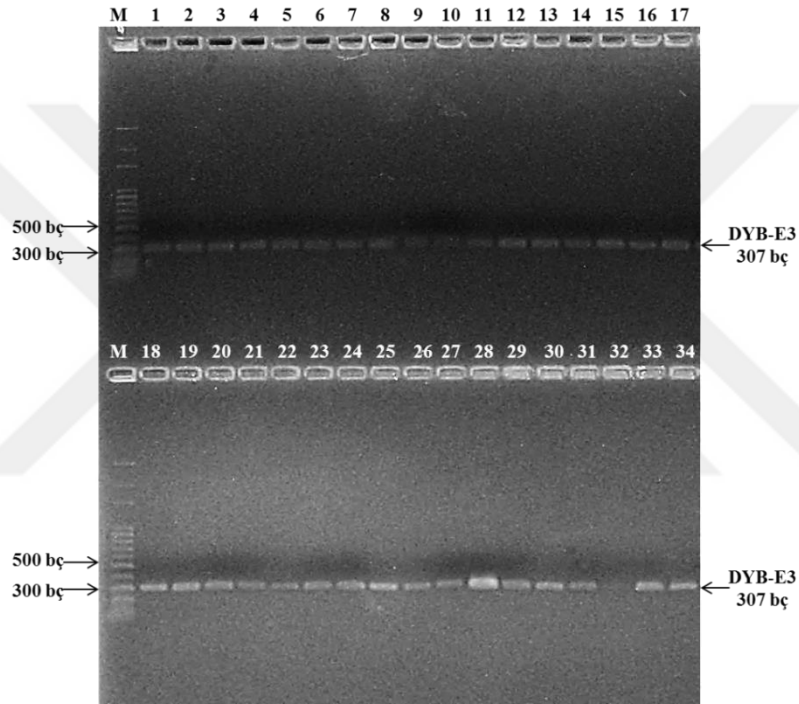
4.7.2. BoLA-DYB gen bölgesi ve yerli kara sığırında DYB bölgesinin nükleotid dizilenmesi

BoLA sınıf II histokompatibilite molekülü veya heterodimer beta zinciri öncü molekülü veya kısaca BoLA-DYB geni, bu gen bölgesi tıpkı BoLA-DYA gibi insanlarda gözlenmeyen ruminantlara özgün bir gen bölgesidir. Sınıf IIa genlerinin aksine, DY genleri sadece geniş getiren hayvanlarda bulunur, düşük seviyede polimorfizm sergilerler ve dendritik hücredeki sınırlı dağılımları ile transkripte edilirler. Başlangıçta BoLA-DIB şeklinde adlandırılan bu gen bölgesi, kabul gören nomenklatüre göre ve sınıf II MHC moleküllerinin bir çift halinde bulunduğu (alfa ve beta) belirlenmesiyle, BoLA-DYB şeklinde yeniden adlandırılmıştır (Stone ve Muggli-Cockett, 1990; Ballingall ve ark., 2004). Sığırlardaki DYB gen bölgesi, 23. Kromozomun (AC_000180.1) 23q12-q13 bölgesinde, yaklaşık uzunluğu 8436 bp (7036910..7045346) olan, selektif ekspresyona sahip, monomorfik linear bir gen bölgesidir. BoLA-DYB bölgesi 5 ekzondan oluşan yaklaşık 780 baz uzunlukta olgunlaşmış bir mRNA'dan 259 amino asitlik, moleküler ağırlığı 29439,68 Da ve pI değeri 7,14 olan bir proteindir. İlk 30 amino asit signal peptit bölgesini geriye kalan 229 aa olgunlaşmış polipeptidi oluştururken, 43→114 aa beta domainini ve 127→220 immünoglobulin domainini oluşturmaktadır (Stone ve Muggli-Cockett, 1990; Ballingall ve ark., 2004; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd>; <http://web.expasy.org>; www.uniprot.org). Bahsi

geçen gen bölgesinin yerli kara sığır ırkındaki moleküler özelliklerinin belirlenmesi için tüm örneklerde PZR kullanılarak tarama gerçekleştirilmiştir.

4.7.2.1. DYB geninin PZR amplifikasyonu sonucu

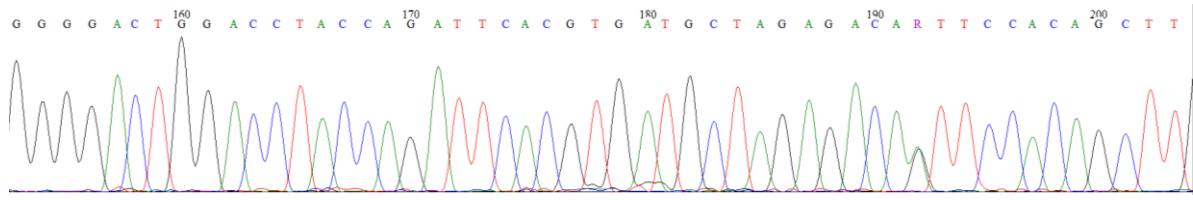
Yerli kara sığır örneklerindeki BoLA-DYB gen bölgesini oluşturan ekzon III için 3.4.1’de bahsedilen şekilde dizayn edilen primerler kullanılarak (Çizelge 3.1) PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonu, 3.4.2’de detaylandırılan PZR şartları kullanılarak yapılmış ve çoğaltılan bölge % 1,5’lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.74). Hedef bölge yaklaşık 307 bç (ekzon uzunluğu; 282 bç) uzunluğunda lineer bir bölgedir.



Şekil 4.74. YK1- 34. örneklerinde DYB-E3 bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı.

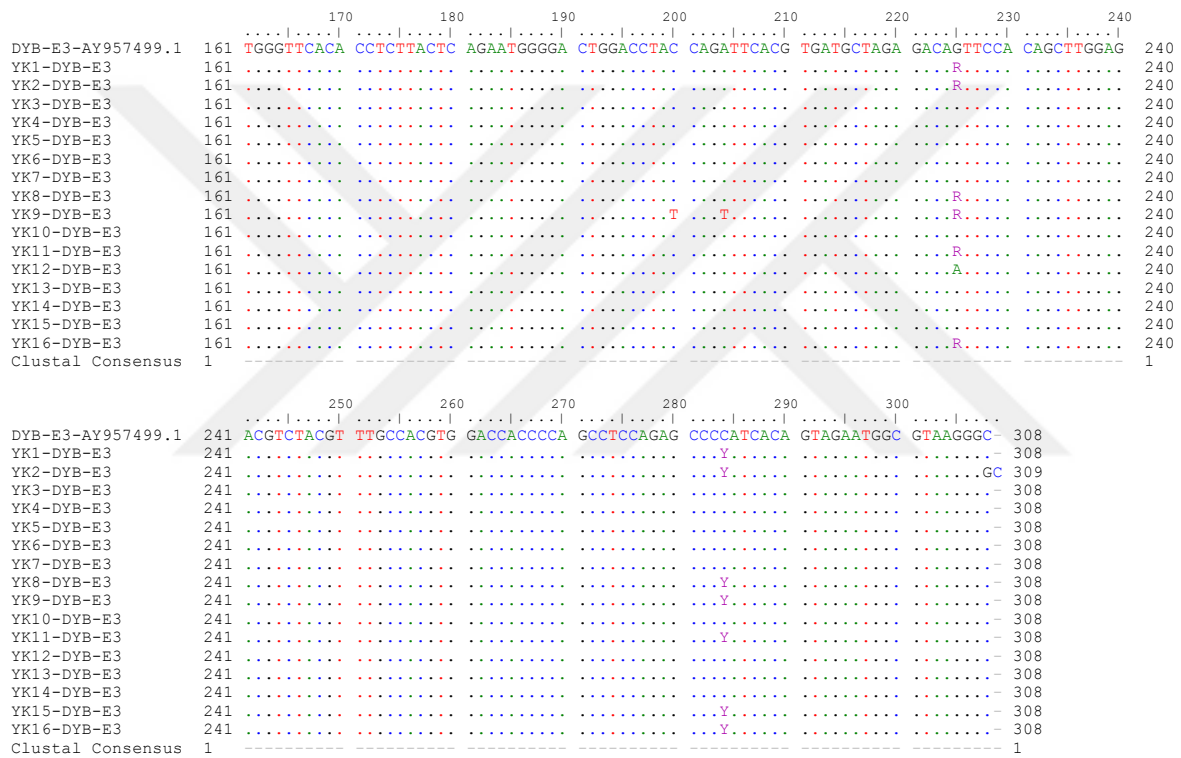
4.7.2.2. DYB-E3 nükleotid dizilenmesi ve amino asit dizi analizi

YK-DYB-E3 bölgesinin her iki zincirinde ileri ve geri primerleri kullanılarak nükleotid dizisi belirlenmiştir (307 bç). Tüm örneklerden elde edilen dizi bilgileri farklı formatlarda kaydedilmiştir. 3.6’da ayrıntılı bir şekilde bahsedildiği gibi hedef bölge için farklı olarak düşünülen örneklerin kromatogramlarına bakılarak YK1-16-DYB-E3 şeklinde konsensüs dizileri belirlenmiştir (Şekil 4.75). Gen bölgesinin tam dizisi kullanılarak amino asit dizileri elde edilmiştir. Kümeleme işlemi ve nükleotid dizilerinin kromatogram pik yükseklikleri incelenerek elde edilen konsensüslerin nükleotid dizileri ek çizelge C.10’da ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 4.75. YK-DYB-E3 bölgesinin ileri primer ile elde edilen nükleotid dizisine ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir.

Konsensüs dizileri ve referans gen bölgesi öncelikle ClustalX programı yardımı ile Fasta, Phylip, Nexus ve Clustal formatlarında kaydedilmiştir. Daha sonrasında Bioedit ve Clustal Omega programı kullanılarak hizalanmış ve farklılıkları belirlenmiştir (Şekil 4.76).



Şekil 4.76. Referans DYB-E3 (AY957499.1) ve YK-DYB-E3 bölgesinin konsensüs dizilerinin hizalanmasının bir kısmı.

Hizalama işlemi sonunda intron bölgelerinin de içerisinde bulunduğu konsensüs dizilerinde en fazla farklılık YK-9-DYB-E3 nolu konsensüs dizisinde (5 nükleotid), en az farklılık ise YK-12 ve YK15-DYB-E3 nolu konsensüs dizilerinde (1 nükleotid) gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar aşağıdaki 4.29 nolu çizelgede özetlenmiştir. Çizelge incelendiğinde YK-DYB-E3 bölgesinde genetik polimorfizmi ve alelik varyasyona sahip 7 polimorfik nükleotid farklılığının bulunduğu görülmüştür.

Çizelge 4.29. YK-DYB-E3 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.

Pozisyon	61	64	71	201	205	226	285	309	Toplam Farklılık
Konsensüs	T	A	-	C	A	G	C	C	
DYB-E3-AY957499.1	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK1-DYB-E3	Y	.	.	.	.	R	Y	.	3
YK2-DYB-E3	Y	.	.	.	.	R	Y	G	4
YK3-DYB-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK4-DYB-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK5-DYB-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK6-DYB-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK7-DYB-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK8-DYB-E3	.	.	.	.	.	R	Y	.	2
YK9-DYB-E3	Y	.	.	T	T	R	Y	.	5
YK10-DYB-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK11-DYB-E3	Y	.	.	.	.	R	Y	.	3
YK12-DYB-E3	.	.	.	.	.	A	.	.	1
YK13-DYB-E3	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK14-DYB-E3	.	-	A	.	.	.	.	.	2
YK15-DYB-E3	.	.	.	.	.	.	Y	.	1
YK16-DYB-E3	.	.	.	.	.	R	Y	.	2
Özet	4Y	1-	1A	1T	1T	1A,6R	7Y	1G	23

*R: G veya A, Y: T veya C.

DYB-E3 için belirlenen konsensüs dizilerinde intron bölgelerinin uzaklaştırılması yapılmamıştır. Çünkü bu bölge için tasarlanan primer çifti hedef bölgedeki ekzon için spesifiktir. Daha sonrasında hedef bölgeden sentezlenen protein dizisindeki farklılıkları belirlemek için clone manager programında karşılaştırılarak amino asit dizileri belirlenmiştir (Şekil 4.77).



Şekil 4.77. Nükleotid konsensüs dizilerinden mRNA bölgesinin elde edilmesi ve aa dizilerinin belirlenmesi (Referans: mRNA-DYB, Ac. No. NM_001012679.1, YK1-16 konsensüs dizileri, mavi bölgeler ortak noktaları göstermektedir).

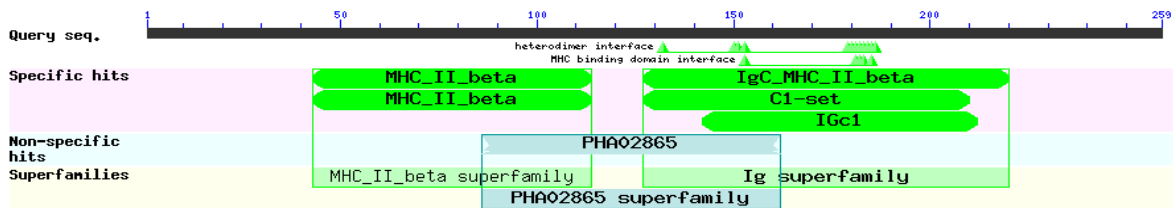
DYB-E3 nükleotid konsensüs dizileri kullanılarak elde edilen DYB-mRNA (780 bp uzunluğunda) dizilerinden yola çıkılarak 6 farklı haplotip belirlenmiştir (in silico). Belirlenen haplotiplere bakılarak bu gen bölgesi yönünden YK1, 2, 8, 11 ve 16 nolu konsensüs dizilerin oluşturulduğu popülasyonlardaki bireylerde heterozigotluğun yaygın olarak görüldüğü belirlenmiştir (Çizelge 4.30).

Çizelge 4.30. DYB bölgesinden transkripte olan mRNA nükleotid dizisi.

Nükleotid Pozisyonları	416	419	421	422	424	555	559	580	639	Toplam Farklılık
Konsensüs	T	A	C	A	C	C	A	G	C	
DYB-mRNA-NM_001012679.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK1-DYB-mRNA	Y	.	.	.	.	.	.	R	Y	3
YK2-DYB-mRNA	Y	.	.	.	.	.	.	R	Y	3
YK3-DYB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK4-DYB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK5-DYB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK6-DYB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK7-DYB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK8-DYB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	R	Y	2
YK9-DYB-mRNA	Y	.	.	.	.	T	T	R	Y	5
YK10-DYB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK11-DYB-mRNA	Y	.	.	.	.	.	.	R	Y	3
YK12-DYB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	A	.	1
YK13-DYB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK14-DYB-mRNA	.	C	A	C	A	.	.	.	.	4
YK15-DYB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	1
YK16-DYB-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	R	Y	2
Özet	4Y	1C	1A	1C	1A	1T	1T	1A,6R	7Y	24

*R: G veya A, Y: T veya C.

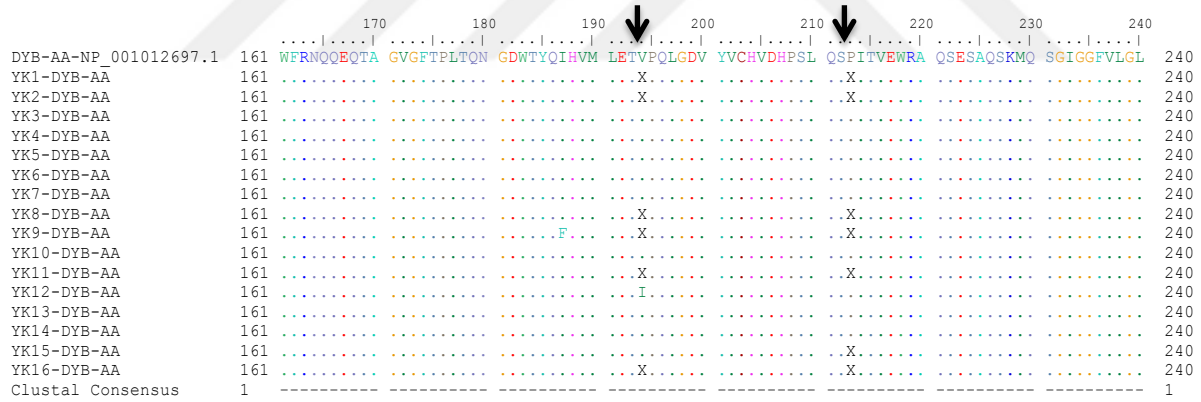
Elde edilen amino asit dizileri (259 aa uzunlukta) NCBI’da Blast yapılarak hedef bölge olduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.78). İlk 30 asit signal peptit bölgesini, 43→114 aa beta domainin ve 127→220 immünoglobulin domaini oluşturmaktadır. Ayrıca, 132,150, 151,153 ve 179..186 pozisyonundaki amino asitler heterodimer arayüzeyi polipeptid bağlanma noktalarını oluştururken, 153,181, 182, 183 ve 185 pozisyonundaki amino asitler ise MHC bağlanma domaini arayüzeyi polipeptid bağlanma noktalarını oluşturmaktadır (Stone ve Muggli-Cockett, 1990; Ballingall ve ark., 2004; Zimin ve ark., 2009; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd>).



Şekil 4.78. YK1-DYB-PR’nin sahip olduğu, beta ve immunoglobülin domainleri.

Belirlenen YK-DYB haplotiplerinin oluşturduğu proteinlerin NCBI Blast sonuçlarına göre; *Bos taurus*’dan eksprese olan MHC sınıf II DYB beta zincirine (Ac. No: NP_001012697.1) benzerlik oranları %98-99 arasında bulunmuştur. *Bos taurus*’dan eksprese olan MHC sınıf II DYB beta zincirinin (Ac. No: NP_001012697.1), moleküler ağırlığı

29439,68 Da ve pI değeri 7,14'dür. YK1-16 DYB proteini için moleküler ağırlık 29367,61-29498,28 Da arasında hesaplanırken pI değerleri 7,08-7,14 olarak belirlenmiştir. Yerli kara sığır ırkının DYB geni yönünde amino asit pozisyonları dikkate alındığında, 139. pozisyonundaki lösin (L) → X'e (herhangi bir amino asit), 194. Pozisyonundaki valin (V) → X'e (herhangi bir amino asit) ve 213. pozisyonundaki prolinin (P) → X'e (herhangi bir amino asit) dönüştüğü belirlenmiştir. Buradaki heterozigot nükleotid farklılığın sonucunda meydana gelen bu amino asit değişiklikler incelendiğinde, YK1, YK2, YK9 ve YK10 DYB-mRNA dizilerindeki 416. pozisyonundaki Y nükleotidi (T veya C) timin olduğunda lösin şeklinde ifade edilirken sitozin olduğunda ise prolin şeklinde ifade edilmiştir [CTG (L)→CCG (P)]. Benzer durum YK1, YK2, YK8, YK9, YK11 ve YK16 DYB-mRNA dizilerindeki 580. pozisyonundaki R nükleotidi (G veya A) guanin olduğunda valin şeklinde ifade edilirken adenin olduğunda ise izolosin şeklinde ifade edilmiştir [GTT (V)→ATT (I)]. Yani 139 ve 194 amino asit dizilerindeki X bölgeleri prolin ve izolosin şeklinde ekspresyonu gerçekleşebilir şeklinde yorumlanmıştır. Ancak aynı durumdaki YK1, YK2, YK8, YK9, YK11, YK15 ve YK16 DYB-mRNA dizilerindeki 639. pozisyonundaki Y nükleotidindeki (T veya C) bir değişiklik hiçbir amino asit değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 4.79).



Şekil 4.79. BoLA-DYB alleli tarafından kodlanan alfa bölgelerinin tahmini amino asit dizilerinin hizalanması (↓: Amino asit değişikliğinin olduğu bölgeleri göstermektedir).

4.7.2.3. DYB-E3 bölgesinin filogenetik analizi

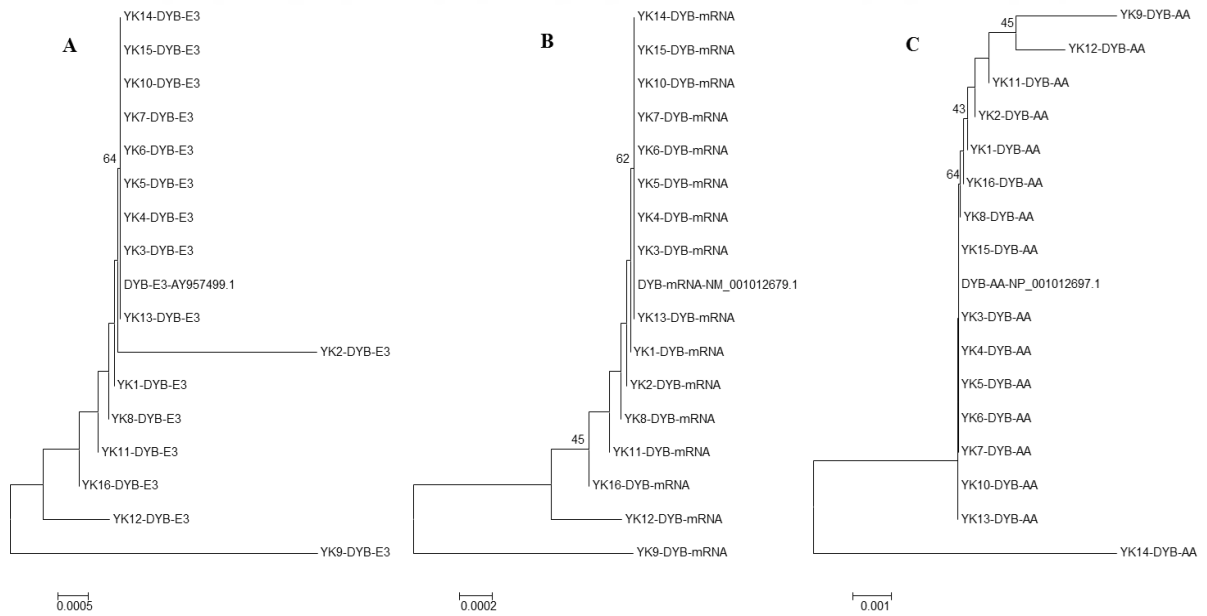
Çalışmanın bu kısmında yerli kara sığır ırkındaki BoLA-DYB-E3 bölgesinin nükleotid dizileri belirlenmiştir. Bu diziler kullanılarak NCBI'da daha önceden belirlenen BoLA-DYB gen bölgeleri ile beraber filogenetik analiz yapılmıştır. Yerli kara sığırının DYB-E3 bölgesinin dizi bilgileri analiz edilerek, DNA polimorfizm özellikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.31). Yerli karada toplam 23 farklı bölge belirlenirken, bu bölgelerin 10 tanesini polimorfik olduğu ve haplotip sayısının 25 olduğu tespit edilmiştir. Yerli kara sığırlarındaki haplotip

farklılığı DYB-E3 bölgesinde $0,925 \pm 0,025$ olarak hesaplanırken, nükleotid farklılığı $0,00777 \pm 0,00070$ olarak hesaplanmıştır. Yerli karalardaki haplotipler arasındaki genetik uzaklıklar $0,0032-0,0298$ (ortalaması: $0,0078$) arasında bulunmuştur.

Çizelge 4.31. DYB-E3 bölgesinin dizisine göre DNA polimorfizm özellikleri

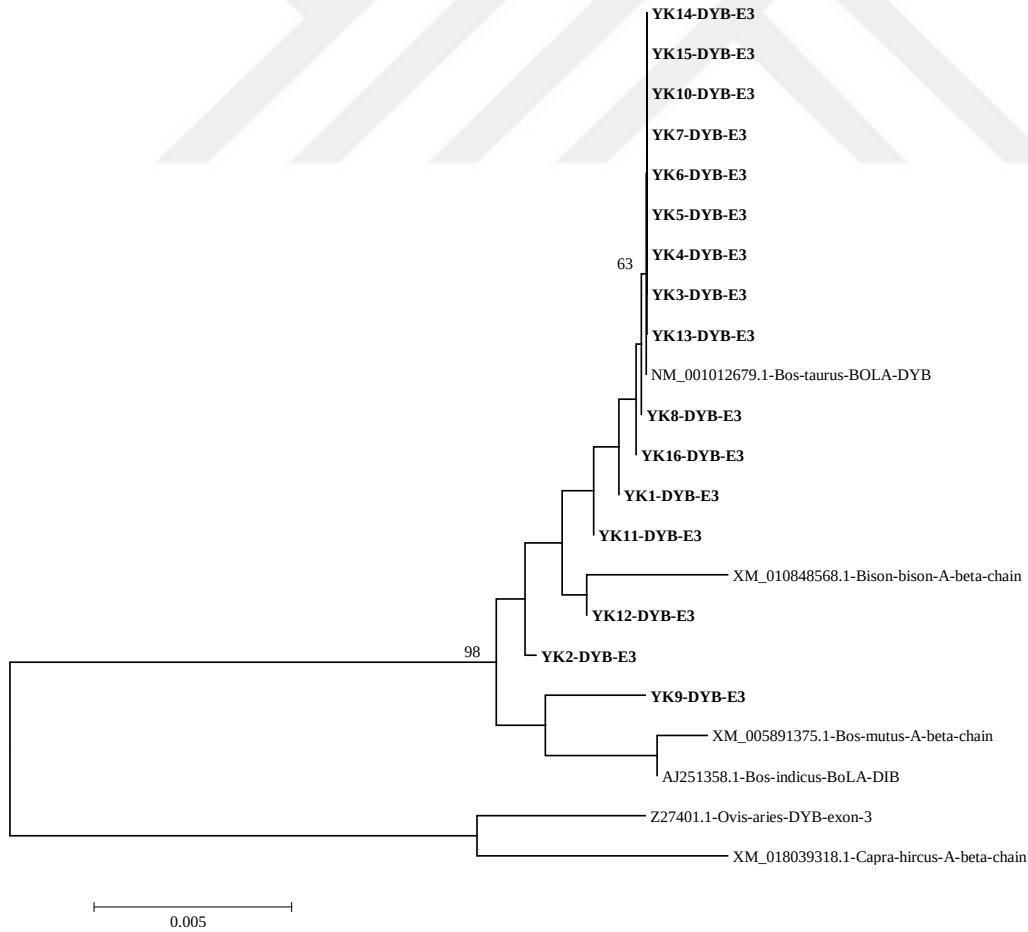
Özellikler	Genel
Toplam Bölge Sayısı	23
G+C	52,59
Polimorfik Bölge Sayısı (s)	10
Haplotip Sayısı (h)	25
Haplotip Farklılığı (Hd)	$0,925 \pm 0,025$
Nükleotid Farklılığı (Pi)	$0,00777 \pm 0,00070$

Yerli kara sığır ırkı için oluşturulan filogenetik ağaçlar Neighbor-Joining (NJ) yöntemi, Jukes–Cantor modeli ve Bootstrap metoduna (1000) dayanmaktadır. Konsensüs dizileri filogenetik ilişkileri bakımından referans diziye göre (nükleotid için AY957499.1, mRNA için NM_001012679.1 ve aa için NM_001012679.1) nükleotid dizisi ayrımındaki bootstrap test değeri %50, mRNA dizisi %20 ve amino asit dizisi %10 şeklinde belirlenmiştir (Şekil 4.80 A, B ve C).



Şekil 4.80. BoLA-DYB konsensüs dizilerinin filogenetik ağaçları. Yerli kara BoLA-DYB allelerinin sırasıyla 307 bç'lik nükleotid dizileri, 780 bç'lik mRNA dizleri ve 259 amino asit uzunluğundaki dizilerin oluşturduğu Neighbor-joining ağaçları (A, B ve C).

BoLA-DYB-E3 dizileri yerli kara sığırında ilk tanımlama olduğundan, NCBI'daki Bovidae ailesi üyelerinde belirlenmiş DYB nükleotid dizleri arasındaki genetik ilişki filogenetik ağaç ile araştırılmıştır. NJ ağacının yerli kara sığırlarındaki DYB-E3 ekzonu ile *Bos taurus* (Ac. No: NM_001012679.1), *Bos indicus* (Ac. No: AJ251358.1), *Bos mutus* (Ac. No: XM_005891375.1), *Bison bison* (Ac. No: XM_010848568.1), *Ovis aries* (Ac. No: Z27401.1) ve *Capra hircus* (Ac. No: XM_018039318.1) arasındaki ilişkiyi teyit etmek için inşa edilmiştir (Şekil 4.81). Ağaç topolojisi incelendiğinde, sığır ve koyun DYB genleri arasındaki karşılaştırma % 96'lık bir orana sahip olduğu daha önceki çalışmalarda belirlenmiştir (Wright ve ark., 1994). Sığır DYB genleri daha düşük nükleotid değiştirme oranları ve daha küçük genetik mesafeler göstermiştir. Fonksiyonel sınıf II MHC molekülleri α/β zincirli heterodimer yapıdadır ve zincirler arasındaki etkileşim benzer türler arasında oldukça korunmuştur (Cosson ve Bonifacino, 1992). Bu açıdan düşünüldüğünde yerli kara sığırlarında DYB geninin korunmuş olması şaşırtıcı değildir ve bu gen bölgesinin güçlü bir pozitif seçime maruz kaldığı açıkça görülmektedir.



Şekil 4.81. Yerli kara ve diğer Bovidae ailesi türlerindeki DYB-E3 bölgelerinin filogenetik ağacı.

4.8. BoLA-LMP2 ve –LMP7 Gen Bölgelerinin Karakterizasyonu

4.8.1. BoLA-LMP2 ve –LMP7 gen bölgeleri ve yerli kara sığırında LMP2 ve LMP7 genlerinin taranması

BoLA- LMP2 veya PSMP9 (büyük çok fonksiyonlu proteaz: **L**arge **M**ultifunctional **P**rotease veya proteazom beta altbirimi: **P**roteasome **S**ubunit **B**eta) ve LMP7 veya PSM8 genleri sınıf II bölgesinde bulunan, sitozolik proteinlerin bozunmasına katılan proteazom kompleksinin iki alt birimini kodlayan ve antijenik peptitlerin üretilmesinde görevli iki gendir (Camarena ve ark., 2010). Bu gen bölgeleri memelilerde sınıf II bölgesinde bulunurken, memeli olmayanlardaki bu gen bölgelerinin homologları sınıf I bölgesinde konumlandırılmıştır (Ohta ve ark., 2002).

LMP2 ve LMP7 genleri ve Sınıf I moleküllerinin ekspresyonu sitokin interferon gama tarafından artırılır. Proteazomdan elde edilen peptitler dimerik bir protein (MHC Sınıf II bölgesinden kodlanan taşıyıcı protein: TAP) yardımıyla endoplazmik retikulum (ER) zarına taşınmaktadır. ER’de, Sınıf I molekülleri peptid ve β 2-mikroglobulin ile bir kompleks oluşturur, daha sonra hücre yüzeyine taşınırlar. Sitotoksik T hücreleri, T hücre reseptörlerinin yardımıyla vücutta sürekli gözetleme yaparlar. Herhangi bir enfeksiyonun yokluğunda, sınıf I molekülü kendi peptitlerine bağlı bulunur. Bir virüs ya da başka bir hücre içi parazitli enfeksiyon sırasında, kendinden olmayan veya yabancı peptitler proteazom tarafından bazı proteinler yıkılır. Sitotoksik T hücreleri MHC I ve yabancı peptidin oluşturduğu kompleksle karşılaştıklarında sitotoksik reaksiyon ile enfekte olmuş hücreyi öldürürler. Sitotoksik T hücreleri sadece kendi MHC sınıf I ile bağlanmış yabancı peptitleri tanıyabilir, MHC I sitotoksik T hücrelerin sınırlayıcısı olarak bilinir (Zinkernagel ve Doherty, 1974).

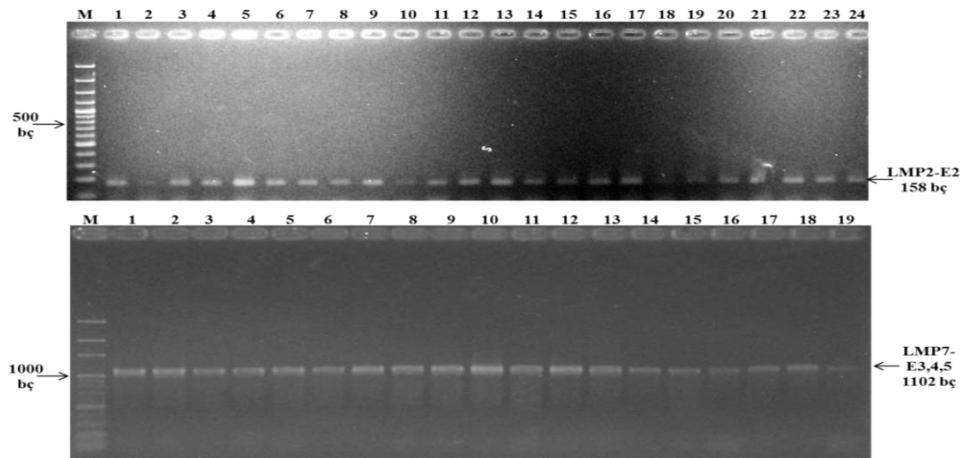
LMP2 ve LMP7 bölgeleri hem insanlarda hem de sığırlarda 6 ekzondan oluşmaktadır. BoLA-LMP2 gen bölgesi 660 bç uzunluğunda olgunlaşmış bir mRNA’dan 219 amino asitlik bir protein iken, BoLA-LMP7 ise 780 bç uzunluğunda 259 amino asitlik bir proteindir. LMP2 insanlardaki homologuna %95 oranında benzerken, LMP7 %96 oranında benzemektedir (Childers ve ark., 2006). Her iki gen bölgesi de 23. kromozomun (AC_000180.1) 23q12-q13 bölgesinde konumlandırılmışken, LMP2 ve LMP7’nin yaklaşık uzunlukları sırasıyla 6917 bç (7126695..7133612) ve 4018 bç (7113298..7117316) olan, linear gen bölgeleridir. BoLA-LMP2 gen bölgesinden, moleküler ağırlığı yaklaşık 23404,47 Da ve pI değeri 5,07 olan bir protein kodlanmaktadır. İlk 20 amino asitlik bölge propeptit bölgesini oluştururken, 21-219 proteazom beta altbirimi oluşturmaktadır. BoLA-LMP7 gen bölgesinden, moleküler ağırlığı yaklaşık 28647,94 Da ve pI değeri 9,47 olan bir protein

kodlanmaktadır. İlk 72 amino asitlik bölge propeptit bölgesini oluştururken, 73-276 proteazom beta altbirimi oluşturmaktadır (Camarena ve ark., 2010; <http://www.uniprot.org>; <http://www.genecards.org>; <http://web.expasy.org>).

Son yıllarda insanlardaki bazı otoimmün hastalıklardaki rolleri, virüslere bağlı nöroinflamasyon, T hücrelerin genişlemesi ve farklılaşması gibi özellikleri belirlenmesine rağmen hala sığırlardaki LMP2 ve LMP7 genlerinin kromozom üzerindeki konumları dışında herhangi bir rapor bildirilmemiştir (Basler ve ark., 2013). Ayrıca bu gen bölgelerinin polimorfizmleri hakkında da yeterli bilgi mevcut değildir. Birçok MHC molekülünün polimorfizminin antijenik peptitlerin sunumu üzerindeki etkisi düşüldüğünde sığırlardaki bu bölgedeki polimorfik bölgelerin belirlenmesi son derece önem arz etmektedir. Bu açıdan düşünüldüğünde yerli sığır ırklarımız bu gen bölgesi yönünden bulunmaz kaynaklar içermektedir. Çalışmanın bu kısmında, yukarıda bahsedilen gen bölgelerinin moleküler özelliklerinin belirlenmesi için tüm örnekler PZR işlemi ile taranmıştır.

4.8.1.1. LMP2 ve LMP7 genlerinin pzs amplifikasyon sonucu

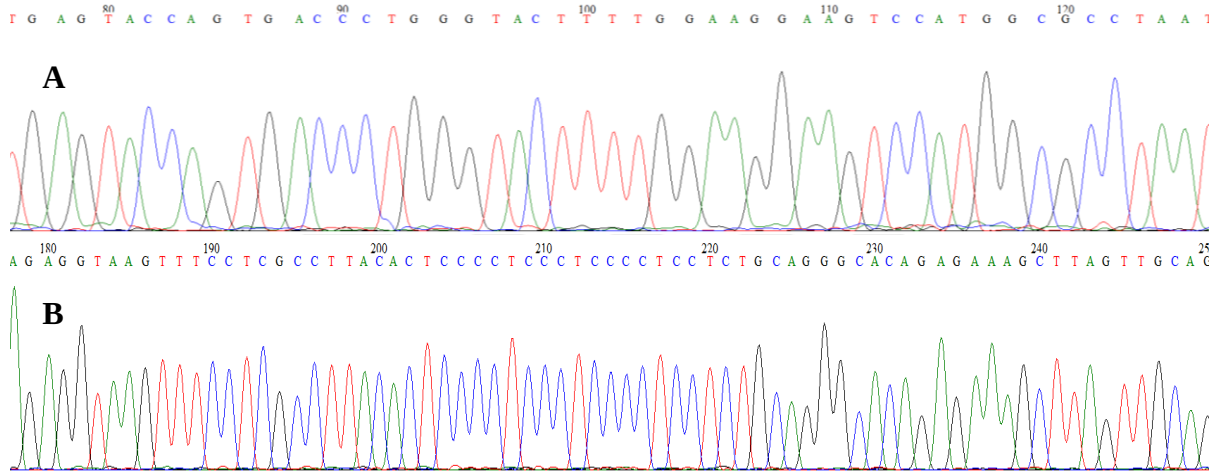
Yerli kara sığır örneklerindeki BoLA-LMP2 gen bölgesini oluşturan ekzon II ve BoLA-LMP7 gen bölgesini oluşturan ekzon III, IV ve V 3.4.1’de bahsedilen şekilde dizayn edilen primerler kullanılarak (Çizelge 3.1) PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonu, 3.4.2’de detaylandırılan PZR şartları kullanılarak yapılmış ve çoğaltılan bölgeler % 1,5’lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.82). Hedef bölgeleri sırasıyla, yaklaşık 158 bç (II. ekzon uzunlukları; 68 bç) ve 1102 bç (III, IV ve V. Ekzon uzunlukları; 130, 205 ve 89 bç) uzunluğunda linear gen bölgeleridir.



Şekil 4.82. YK1-24 nolu örneklerinde LMP2-E2 bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü ve YK1-19 nolu örneklerinde LMP7-E3, 4, 5 bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü, M: 100 bç DNA standardı.

4.8.1.2. LMP2-E2 ve LMP7-E3, 4, 5'in nükleotid ve amino asit dizileri

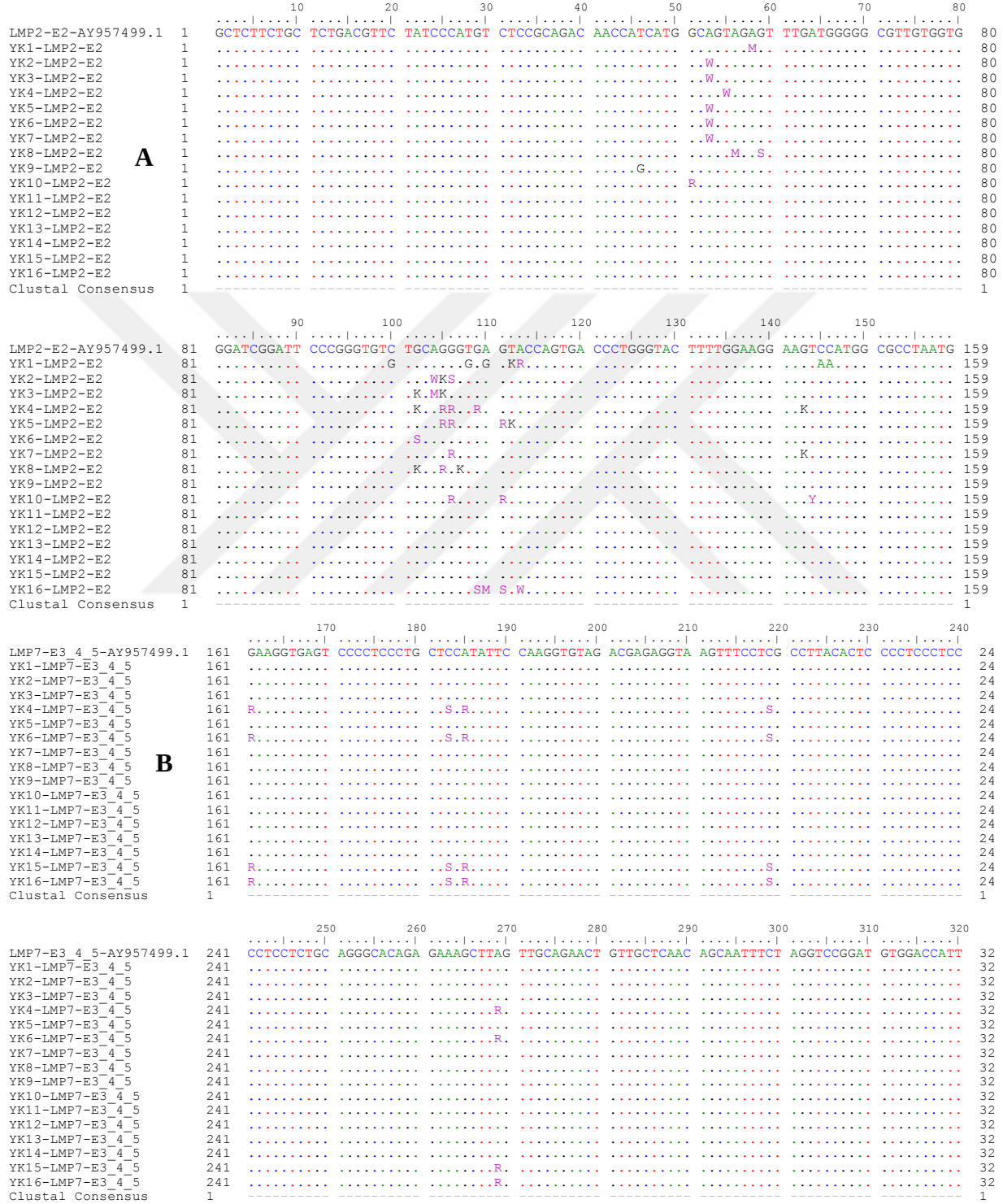
YK-LMP2-E2 (158 bç) ve YK-LMP7-E3,4,5 (1102 bç) bölgelerinin her iki zincirinden ileri ve geri primerleri kullanılarak nükleotid dizisi belirlenmiştir. Tüm örneklerden elde edilen dizi bilgileri farklı formatlarda kaydedilmiştir. 3.6'da ayrıntılı bir şekilde bahsedildiği gibi hedef bölge için farklı olarak düşünülen örneklerin kromatogramlarına bakılarak YK1-16-LMP2ve –LMP7-E3,4,5 şeklinde konsensüs dizileri belirlenmiştir (Şekil 4.83). Gen bölgesinin tam dizisi kullanılarak amino asit dizileri elde edilmiştir. Kümeleme işlemi ve nükleotid dizilerinin kromatogram pik yükseklikleri incelenerek elde edilen konsensüslerin nükleotid dizileri ek çizelge C.11.1 ve C.11.2'de ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 4.83. YK-LMP2-E2 (A) ve YK-LMP7-E3,4,5 (B) bölgelerinin ileri primer ile elde edilen nükleotid dizisine ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir.

Konsensüs dizileri ve referans gen bölgesi öncelikle ClustalX programı yardımı ile Fasta, Philip, Nexus ve Clustal formatlarında kaydedilmiştir. Daha sonrasında Bioedit ve Clustal Omega programı kullanılarak hizalanmış ve farklılıkları belirlenmiştir (Şekil 4.84). Bu işlemler sırasıyla LMP2-E2 ve LMP7-E3,4,5'e uygulanmıştır. Hizalama işlemi sonunda, LMP2-E2 ekzon bölgesine ait polimorfik bölgelerinin bir kısmı intron bölgesinde bir kısmında ekzon 2 bölgesi içerisinde olduğu görülmüştür. Referans dizi ve elde edilen konsensüs dizileri kıyaslandığında yerli karadaki LMP2-E2 bölgesinin en az 1 adet, en fazla 8 adet nükleotid farklılık içerdiği görülmüştür. Bu polimorfik noktaların sonuçları aşağıdaki 4.23 nolu çizelgede özetlenmiştir. Çizelge 4.32 incelendiğinde yerli kara LMP2-E2 bölgesinde 46-146. nükleotid pozisyonları arasında toplam 23 polimorfik nokta belirlenmiştir. Bu bölgeler incelendiğinde 46-105 arasındaki 11 nükleotid farklılığın ekzon 2 bölgesinde bulunurken, diğer nükleotid farklılıkların intron bölgesinde olduğu belirlenmiştir. YK1-

LMP2-E2 nolu konsensüs dizisinde 100. pozisyondaki sitozin guanine (C→G) dönüşürken, YK9-LMP2-E2'deki 46. Pozisyondaki timin guanine (T→G) dönüştüğü görülürken bunların dışındaki 9 nükleotid varyasyonun heterozigot özellik sergilediği bulunmuştur. Bu sonuç 4.13.3'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.84. Referans BoLA-LMP2 ve BoLA-LMP7 (AY957499.1) ile birlikte YK-LMP2-E2 (A) ve YK-LMP7-E3,4,5 (B) bölgeleri konsensüs dizilerinin hizalanmasının bir kısmı.

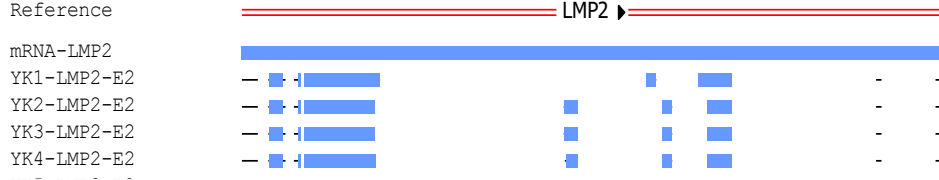
Çizelge 4.32. LMP2-E2 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.

Nükleotid Pozisyonları	46**	51	53	55	56	58	59	100	102	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	143	144	145	146	Toplam Farklılık
Konsensüs	T	G	A	T	A	A	G	C	G	A	G	G	G	T	G	A	G	T	A	G	T	C	C	
LMP2-E2-AY957499.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK1-LMP2-E2	.	.	.	.	.	M	.	G	.	.	.	.	.	G	.	G	.	K	R	.	.	A	A	8
YK2-LMP2-E2	.	.	W	.	.	.	.	.	.	W	K	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4
YK3-LMP2-E2	.	.	W	.	.	.	.	.	K	M	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4
YK4-LMP2-E2	.	.	.	W	.	.	.	.	K	.	R	R	.	.	R	.	.	.	.	K	.	.	.	6
YK5-LMP2-E2	.	.	W	.	.	.	.	.	.	.	R	R	.	.	.	.	R	K	.	.	.	.	.	5
YK6-LMP2-E2	.	.	W	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2
YK7-LMP2-E2	.	.	W	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	.	3
YK8-LMP2-E2	.	.	.	.	M	.	S	.	K	.	R	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	5
YK9-LMP2-E2	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
YK10-LMP2-E2	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	R	.	.	.	Y	.	.	4
YK11-LMP2-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK12-LMP2-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK13-LMP2-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK14-LMP2-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK15-LMP2-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK16-LMP2-E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	M	S	.	W	.	.	.	.	4
Özet	1G	1R	5W	1W	1M	1M	1S	1G	3K, 1S	1M, 1W	3R, 2K	4R, 1S	1K	1G	1R, 1S	1G, 1M	2R, 1S	2K	1R, 1W	2K	1Y	1A	1A	46

*R: G veya A, Y: T veya C, S: G veya C, M: A veya C, W: A veya T, K: G veya T.

**İşaretlenmiş bölgeler, ekzon dizileri içerisindeki farklılıkları göstermektedir.

LMP2-E2 için belirlenen konsensüs dizilerinde intron bölgelerinin uzaklaştırılmıştır. Daha sonrasında hedef bölgeden sentezlenen protein dizisindeki farklılıkları belirlemek için clone manager programında karşılaştırılarak amino asit dizileri belirlenmiştir (Şekil 4.85).



Şekil 4.85. Nükleotid konsensüs dizilerinden mRNA bölgesinin elde edilmesi ve aa dizilerinin belirlenmesi (Referans: mRNA-LMP2-Ac. No. NM_001034388.2, YK1-16 konsensüs dizileri, mavi bölgeler ortak noktaları göstermektedir).

LMP2-E2 nükleotid konsensüs dizileri kullanılarak elde edilen YK-LMP2-mRNA (660 bç) dizilerinden yola çıkılarak 8 farklı haplotip belirlenmiştir (in silico). YK11-16 ve YK2, 5, 7 nolu konsensüs dizileri aynı haplotiplere sahipken, YK3, YK4, YK6, YK8, YK9 ve YK10 farklı haplotip özelliği göstermişlerdir (Çizelge 4.33).

Çizelge 4.33. LMP2 bölgesinden transkripte olan mRNA nükleotid dizisi.

Nükleotid Pozisyonları	68	73	75	77	78	80	81	122	124	128	Toplam Farklılık
Konsensüs	T	G	A	T	A	A	G	C	G	G	
LMP2-mRNA-NM_001034388.2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK1-LMP2-mRNA	.	.	.	.	.	M	.	G	.	.	2
YK2-LMP2-mRNA	.	.	W	.	.	.	.	.	.	.	1
YK3-LMP2-mRNA	.	.	W	.	.	.	.	.	K	.	2
YK4-LMP2-mRNA	.	.	.	W	.	.	.	.	K	.	2
YK5-LMP2-mRNA	.	.	W	.	.	.	.	.	.	.	1
YK6-LMP2-mRNA	.	.	W	.	.	.	.	.	S	.	2
YK7-LMP2-mRNA	.	.	W	.	.	.	.	.	.	.	1
YK8-LMP2-mRNA	.	.	.	.	M	.	S	.	K	.	3
YK9-LMP2-mRNA	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
YK10-LMP2-mRNA	.	R	.	.	.	.	.	.	.	R	2
YK11-LMP2-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK12-LMP2-mRNA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
Özet	1G	1R	5W	1W	1M	1M	1S	1G	3K,1S	1R	17

*R: G veya A, S: G veya C, M: A veya C, W: A veya T, K: G veya T.

Diğer bir hizalama işlemi sonunda ise, LMP7-E3, 4 ve 5 ekzonlarını kapsayan bölgedeki polimorfik bölgelerinin bir kısmı intron bölgesinde bir kısmında ekzon 3, 4 ve 5 bölgeleri içerisinde dağıldığı görülmüştür. Referans dizi ve elde edilen konsensüs dizileri kıyaslandığında yerli karadaki LMP7-E3, 4 ve 5 bölgesinin en az 1 adet, en fazla 20 adet nükleotid farklılık içerdiği görülmüştür. Bu polimorfik noktaların sonuçları aşağıdaki 4.34 nolu çizelgede özetlenmiştir.

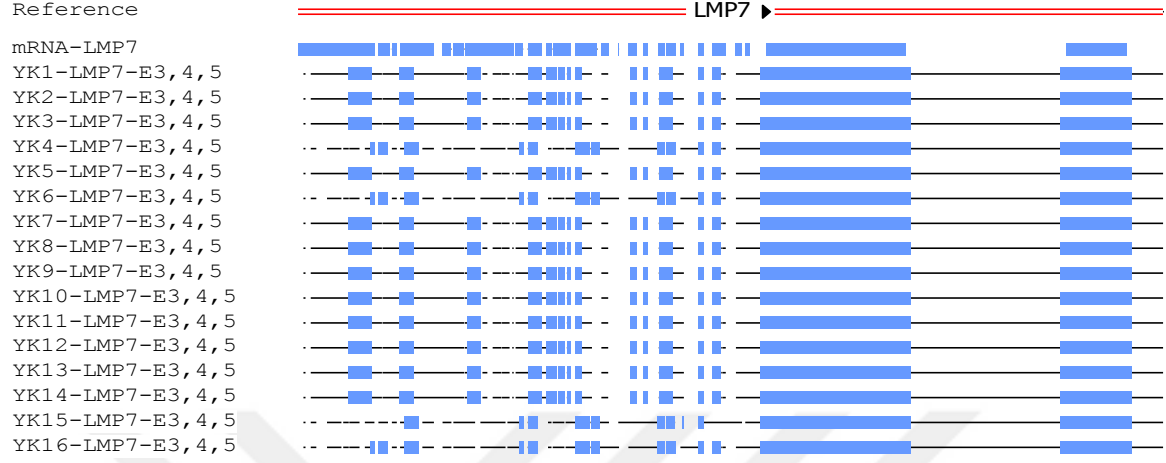
Çizelge 4.34. LMP7-E3,4,5 konsensüs dizilerindeki nükleotid farklılıklar.

Nükleotid Pozisyonları	68**	161	183	185	219	269	351	359	430	473	539	544	546	766	821	827	861	881	889	902	938	948	957	Toplam Farklılık
Konsensüs	C	G	C	A	C	A	G	C	A	T	G	G	A	A	T	A	A	T	T	T	T	C	G	
LMP7-E3,4,5-AY957499.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK1-LMP7-E3,4,5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK2-LMP7-E3,4,5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK3-LMP7-E3,4,5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK4-LMP7-E3,4,5	.	R	S	R	S	R	.	.	.	.	.	S	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	7
YK5-LMP7-E3,4,5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK6-LMP7-E3,4,5	.	R	S	R	S	R	.	.	.	.	R	S	R	.	Y	.	W	Y	K	Y	Y	.	R	15
YK7-LMP7-E3,4,5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK8-LMP7-E3,4,5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK9-LMP7-E3,4,5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	1
YK10-LMP7-E3,4,5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK11-LMP7-E3,4,5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK12-LMP7-E3,4,5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK13-LMP7-E3,4,5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK14-LMP7-E3,4,5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
YK15-LMP7-E3,4,5	Y	R	S	R	S	R	R	Y	R	W	R	S	R	R	Y	R	W	.	K	Y	.	Y	.	20
YK16-LMP7-E3,4,5	.	R	S	R	S	R	.	.	.	.	R	S	R	.	Y	.	W	Y	K	Y	Y	.	R	15
Özet	1Y	4R	4S	4R	4S	4R	1R	1Y	1R	1W	3R	4S	1G,3R	1R	3Y	1R	3W	2Y	3K	3Y	2Y	2Y	2R	58

*R: G veya A, S: G veya C, M: A veya C, W: A veya T, K: G veya T, Y: T veya C.

**İşaretlenmiş bölgeler, ekzon dizileri içerisindeki farklılıkları göstermektedir.

LMP7-E3,4,5 için belirlenen konsensüs dizilerindeki intron bölgelerinin uzaklaştırılması ve hedef bölgeden sentezlenen protein dizisindeki farklılıkları belirlemek için clone manager programında karşılaştırılarak amino asit dizileri belirlenmiştir (Şekil 4.86).



Şekil 4.86. Nükleotid konsensüs dizilerinden mRNA bölgesinin elde edilmesi ve aa dizilerinin belirlenmesi (Referans: mRNA-LMP7-Ac. No. XM_005223195.3, YK1-16 konsensüs dizileri, mavi bölgeler ortak noktaları göstermektedir).

LMP7-E3,4,5 nükleotid konsensüs dizileri kullanılarak elde edilen YK-LMP7-mRNA (780 bç) dizileri dikkate alınarak 4 farklı haplotip belirlenmiştir. Belirlenen varyasyonlardaki sayısal azalma ekzon 5 bölgesinin LMP7 geni yönünden ta olarak korunmasından kaynaklanmaktadır. Bu bölgede hiçbir farklılık gözlenmemiştir. Ayrıca YK4, 6, 15 ve 16 nolu örneklerde dikkat çeken nokta R, R, S, R (483, 508, 513 ve 515. nükleotid farklılıklar) varyasyonlarının ortak olmasıdır. Bu sonuçlar çizelge 4.35’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.35. LMP7 bölgesinden transkripte olan mRNA nükleotid dizisi

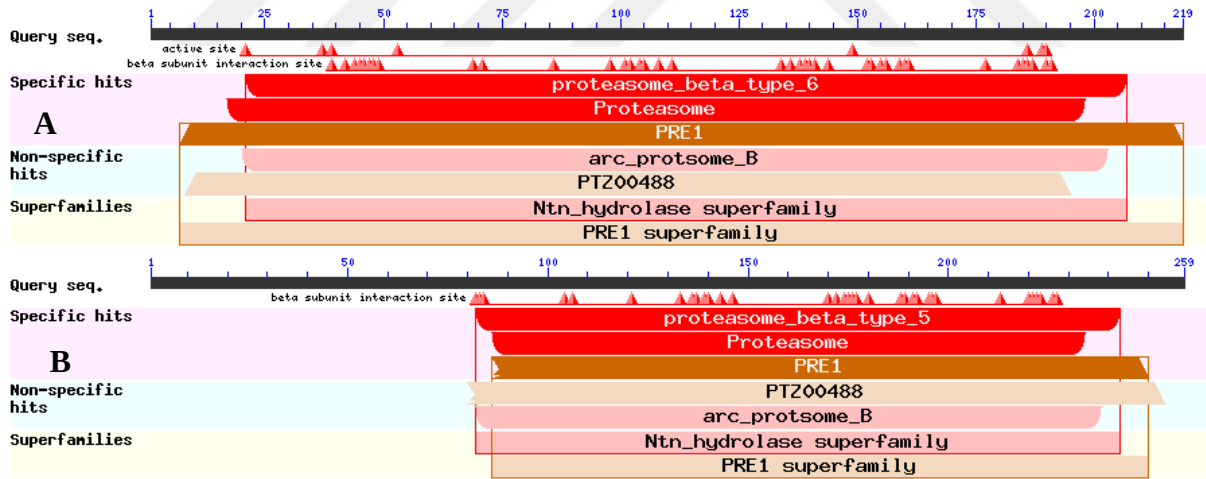
Nükleotid Pozisyonları	390	483	508	513	515	Toplam Farklılık
Konsensüs	C	G	G	G	A	
LMP7-mRNA-XM_005223195.3	.	.	.	.	.	0
YK1-LMP7-mRNA	.	.	.	.	.	0
YK2-LMP7-mRNA	.	.	.	.	.	0
YK3-LMP7-mRNA	.	.	.	.	.	0
YK4-LMP7-mRNA	.	R	.	S	G	3
YK5-LMP7-mRNA	.	.	.	.	.	0
YK6-LMP7-mRNA	.	R	R	S	R	4
YK7-LMP7-mRNA	.	.	.	.	.	0
YK8-LMP7-mRNA	.	.	.	.	.	0
YK9-LMP7-mRNA	.	.	.	.	.	0
YK10-LMP7-mRNA	.	.	.	.	.	0

Çizelge 4.35. Devamı.

Nükleotid Pozisyonları	390	483	508	513	515	Toplam Farklılık
Konsensüs	C	G	G	G	A	
LMP7-mRNA-XM_005223195.3	.	.	.	.	.	0
YK11-LMP7-mRNA	.	.	.	.	.	0
YK12-LMP7-mRNA	.	.	.	.	.	0
YK13-LMP7-mRNA	.	.	.	.	.	0
YK14-LMP7-mRNA	.	.	.	.	.	0
YK15-LMP7-mRNA	Y	R	R	S	R	5
YK16-LMP7-mRNA	.	R	R	S	R	4
Özet	1Y	4R	3R	4S	1G,3R	16

*R: G veya A, S: G veya C, Y: T veya C.

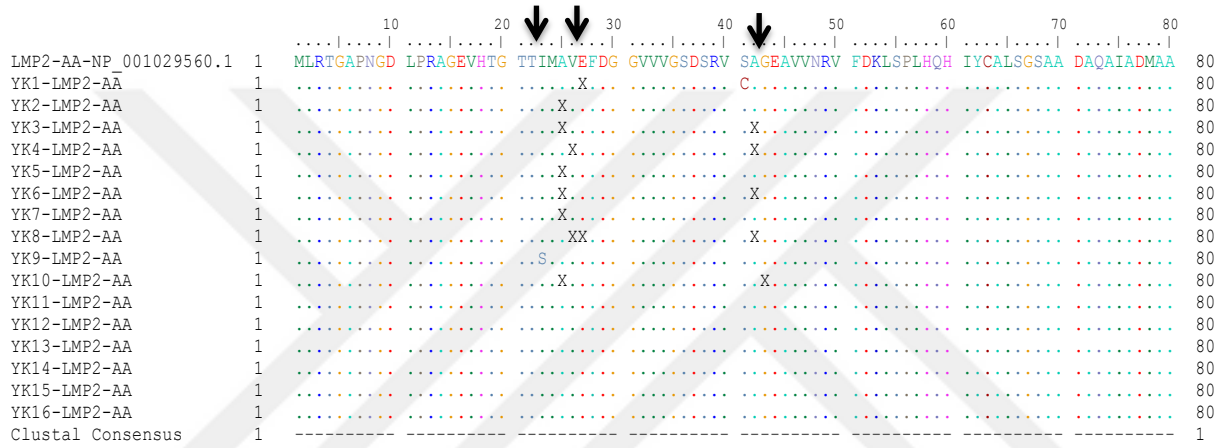
Elde edilen LMP2 ve LMP7 amino asit dizileri (219 aa ve 259 aa uzunlukta) NCBI'da Blast yapılarak hedef bölge olduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.87 A ve B). Proteazom altbirimleri sekans benzerliklerine dayanarak iki gruba, alfa (A) ve beta (B) olarak sınıflandırılabilir. Proteazom, alfa / beta / beta / alfa alt birimlerinden oluşan dört istiflenmiş halkadan oluşur. Yedi farklı alfa alt birim ve yedi farklı beta altbirimi bulunmaktadır (Groll ve ark., 1997). LMP2 yani PSMB9 geninin en önemli paralogu PSMB6 iken, LMP7'nin en önemli paralogu PSMB5'dir (<http://www.genecards.org>).



Şekil 4.87. YK1-LMP2-PR (A) ve YK1-LMP7-PR'nin (B) sahip olduğu domain, kırmızı renkle gösterilen proteazom beta domainlerini göstermektedir.

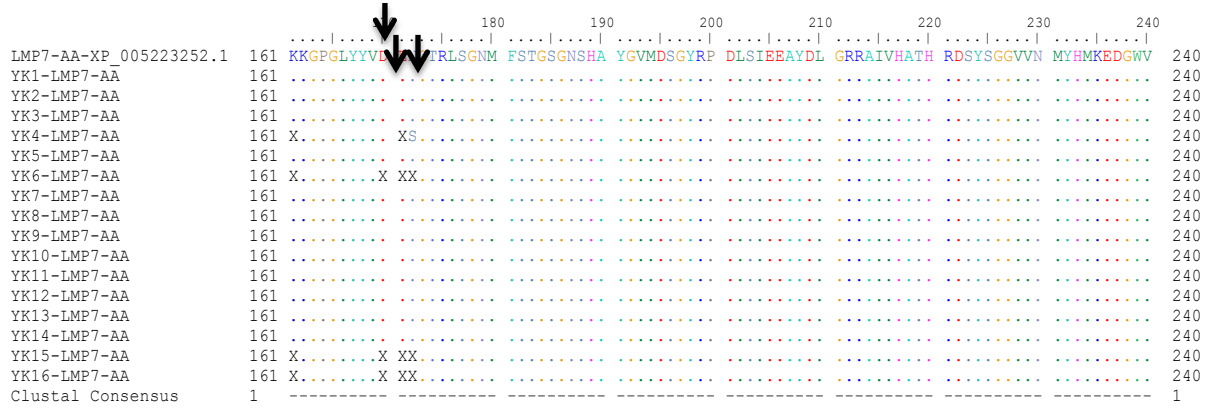
Belirlenen YK-LMP2 haplotiplerinin oluşturduğu proteinlerinin NCBI Blast sonuçlarına göre; *Bos taurus*'dan eksprese olan MHC sınıf II LMP2 genine (Ac. No: NP_001029560.1) benzerlik oranı %99 olarak bulunmuştur. YK1-16 LMP2 aa konsensüs dizilerinin moleküler ağırlığı 23402,74-23499,00 Da olarak hesaplanırken pI değerleri 5,07-5,18 olarak belirlenmiştir. LMP2 gen bölgesi amino asit pozisyonlarına göre değerlendirildiğinde; 75. Pozisyonadaki heterozigot (W: A veya T) nükleotid her iki durumda

da alanin sentezlenmesine neden olmuştur. Bu yüzden bu pozisyonadaki farklılık önemsiz olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan YK9'da belirlenen 68. Pozisyonadaki nükleotid (T→G) değişikliği, izolösini serin amino asidine dönüşmesini sağlamıştır. Benzer durum 77. Pozisyonadaki (W: A veya T) nükleotid (T→A) değişiklik , valinin amino asitinin glutamik asit'e dönüştürürken, 80. Pozisyonadaki (M: A veya C) nükleotid değişiklik ise glutamik asiti alanine dönüştürmüştür. Dikkat çekici nokta ise 124. Pozisyonadaki nükleotid farklılığın (K: G veya T ve S: G veya C) 3 farklı nükleotid içermesidir, bu durumda bu bölgedeki nükleotid guanin olduğunda amino asit alanin, timin olduğunda serin ve sitozin olduğunda prolin şeklinde olduğu görülmüştür (Şekil 4.88)



Şekil 4.88. BoLA-LMP2 alleleri tarafından kodlanan bölgelerin tahmini amino asit dizilerinin hizalanması. (↓: Amino asit değişikliğinin olduğu bölgeleri göstermektedir).

Belirlenen YK-LMP7 haplotiplerinin oluşturduğu proteinlerinin NCBI Blast sonuçlarına göre; *Bos taurus*'dan eksprese olan MHC sınıf II LMP7 genine (Ac. No: XP_005223252.1) benzerlik oranı %98-99 olarak bulunmuştur. YK1-16 LMP2 aa konsensüs dizilerinin moleküler ağırlığı 28586,29-28631.04 Da olarak hesaplanırken pI değerleri 9,49-9,57 olarak belirlenmiştir. LMP7 gen bölgesi amino asit pozisyonlarına göre değerlendirildiğinde; 390. pozisyonadaki (Y: T veya C) ve 483. pozisyonada (R: G veya A) belirlenen heterozigot nükleotidlerin, hiçbir amino asit değişikliğe sebep olmadı görülmüştür. Bu yüzden bu varyasyonlar önemsizdir. Diğer taraftan 508. Pozisyonadaki (R: G veya A) nükleotid değişiklik (G→A) aspartik asit (D) asparajine (N), 513. Pozisyonadaki (G→C) glutamik asit (E) aspartik asitte ve 515. Pozisyonadaki nükleotid değişikliğinin ise (A→G) asparajin (N) serinine (S) dönüşmesini sağlamıştır (Şekil 4.89).



Şekil 4.89. BoLA-LMP7 alleleri tarafından kodlanan bölgelerin tahmini amino asit dizilerinin hizalanması. (↓: Amino asit değişikliğinin olduğu bölgeleri göstermektedir).

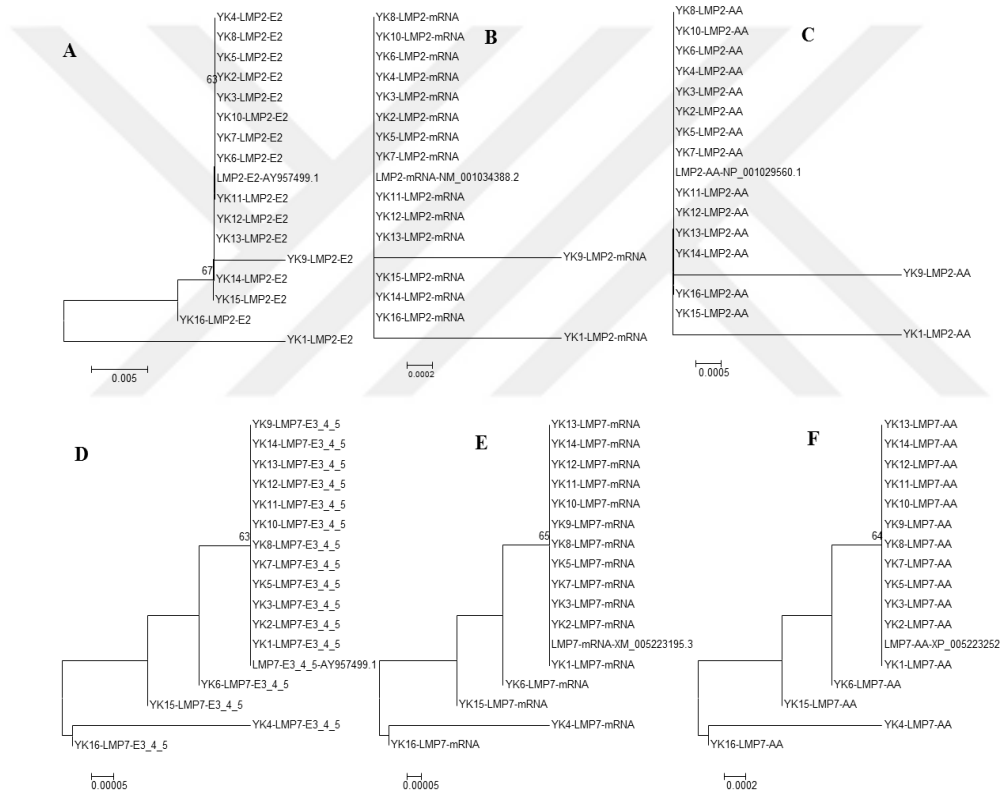
4.8.1.3. LMP2-E2 ve LMP7-E3, 4, 5 bölgelerinin filogenetik analizi

Yapılan çalışma ile yerli kara sığır ırkındaki BoLA-LMP2-E2 (YK-PSMB9-E2) ve BoLA-LMP7-E3,4,5 (YK-PSMB8-E3,4,5) bölgelerinin intron ve ekzon bölgelerine nükleotid dizileri belirlenmiştir. Bu diziler kullanılarak NCBI’da daha önceden belirlenen farklı türlere ait LMP2 ve LMP7 gen bölgeleri ile beraber filogenetik analiz yapılmıştır. Yerli kara sığırının LMP2-E2 ve LMP7-E3, 4, 5 bölgelerinin dizi bilgileri analiz edilerek, DNA polimorfizm özellikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.36). Yerli karada LMP2-E2 ve LMP7-E3, 4, 5 bölgeleri için sırasıyla toplam 46 ve 58 farklı bölge belirlenirken, bu bölgelerin 23 ve 22 tanesini polimorfik olduğu ve haplotip sayılarının 185 ve 21 olduğu tespit edilmiştir. Yerli kara sığırlarında, haplotip farklılığı LMP2-E2 için $0,9948 \pm 0,0021$ ve LMP7-E3, 4, 5 için ise $0,867 \pm 0,060$ olarak hesaplanırken, nükleotid farklılığı ise LMP2-E2 ve LMP7-E3, 4, 5 bölgeleri için sırasıyla $0,02630 \pm 0,00098$ ve $0,00358 \pm 0,00063$ olarak hesaplanmıştır. Yerli karalardaki haplotipler arasındaki genetik uzaklıklar ise LMP2-E2 için 0,0063-0,0937 (ortalama: 0,0269) ve LMP7-E3, 4, 5 için ise 0,0009-0,0202 (ortalama: 0,0036) arasında bulunmuştur.

Çizelge 4.36. LMP2-E2 ve LMP7-E3, 4, 5 bölgelerinin dizisine göre DNA polimorfizm özellikleri

Özellikler	Genel (LMP2-E2)	Genel (LMP7-E3, 4, 5)
Toplam Bölge Sayısı	46	58
G+C	56,60	54,94
Polimorfik Bölge Sayısı (s)	23	22
Haplotip Sayısı (h)	185	21
Haplotip Farklılığı (Hd)	$0,9948 \pm 0,0021$	$0,867 \pm 0,060$
Nükleotid Farklılığı (Pi)	$0,02630 \pm 0,00098$	$0,00358 \pm 0,00063$

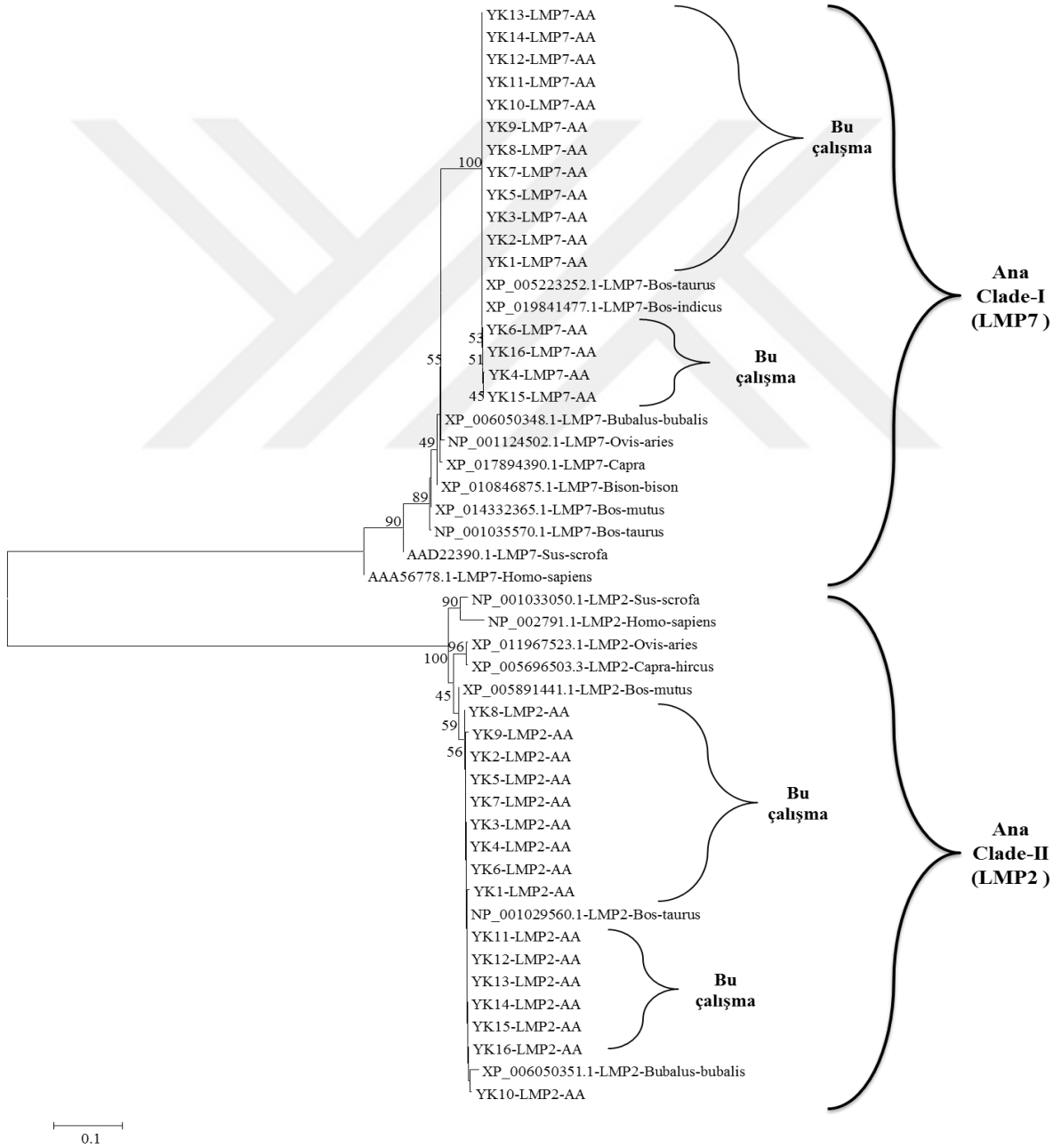
Yerli kara sığır ırkı için oluşturulan filogenetik ağaçlar Neighbor-Joining (NJ) yöntemi, Jukes–Cantor modeli ve Bootstrap metoduna (1000) dayanmaktadır. Dallar üzerinde gösterilen değerler bootstrap değerleridir (orijinal yorumu destekleyen simülasyon yüzdesi). Konsensüs dizileri filogenetik ilişkileri bakımından referans diziye göre (LMP2 ve LMP7 genlerinde nükleotid için AY957499.1, LMP2 mRNA için NM_001034388.2, LMP7 mRNA için XM_005223195.3 ve LMP2 aa için NP_001029560.1, LMP7 aa için XP_005223252.1), LMP2 için nükleotid ve amino asit dizisi ayrımındaki bootstrap test değeri %50 hesaplanırken mRNA dizisi %20 şeklinde, LMP7 için ise nükleotid ve mRNA dizisi ayrımındaki bootstrap test değeri %50 hesaplanırken aa dizisi %20 şeklinde belirlenmiştir (Şekil 4.90).



Şekil 4.90. BoLA-LMP2 ve BoLA-LMP7 konsensüs dizilerinin filogenetik ağaçları. Yerli kara LMP2-E2 ve LMP7-E3,4,5 allelerinin 158 bç'lık ve 1102 bç'lık nükleotid dizilerinden oluşturulmuş komşu birleştirme (Neighbor-joining) ağacı (A ve D), 660 ve 780 bazlık mRNA dizilerinden oluşturulmuş Neighbor-joining ağacı (B ve E) ve 219 ve 259 amino asit uzunluğundaki dizilerden oluşturulmuş Neighbor-joining ağacı (C ve F).

BoLA-LMP2 ve LMP7 dizileri yerli kara sığırdaki ilk tanımlamalar olduklarından, NCBI'daki Bovidae ailesi üyeleri ile birlikte insan ve domuz LMP2 ve LMP7 nükleotid dizileri arasındaki genetik ilişkiyi göstermek için filogenetik ağaç kullanılmıştır. NJ ağacının topolojisi incelendiğinde iki ana dala ayrıldığı görülür ve bu dalların her birinin LMP2 ve

LMP7'yi temsil ettiği açıkça görülmektedir (Şekil 4.91). Kendi arasında küçük farklılıklar barındıran YK-LMP2 ve LMP7 genleri, diğer türlerle kıyaslandığında *Bos taurus*'daki homologlarına çok benzer olduğu ve bu bölgelerin evrimsel süreçte yerli kara sığır ırkında korunduğu ve birbirleriyle yakın ilişkili oldukları açıkça görülmektedir. Ayrıca LMP içeren immünoproteazomlar, yapısal proteazomlardan daha fazla ve daha iyi peptid üretirler (Fellerhoff ve ark., 2011). Sığırlardaki antijen işleme genlerini kodlayan bölgelerin farklı ırklardaki karakterizasyonu, BoLA'nın gelişimini ve sığırlardaki immün yanıtta genetiksel rolünü daha iyi anlamamıza katkı sağlayacaktır (Shalhevet ve ark., 1995).



Şekil 4.91. Yerli kara ve diğer türlerdeki LMP2 ve LMP7 bölgelerinin filogenetik ağaç.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

BoLA genetik çeşitliliği virüsler, bakteriler, mayalar, protozoan ve bağırsak solucanları dahil olmak üzere birçok enfeksiyon hastalıklarının direnç ve duyarlılığını etkilediği bilinmektedir. BoLA genlerinin genetik polimorfizmi ile ilgili birçok bilgi vardır ve bu araştırmaların birçoğu kültür ırkları üzerinde yapılmıştır. Sığır, domuz, koyun ve keçi ırklarında yapılan moleküler çalışmalar bu türlerin Anadolu üzerinden Avrupa'ya yayıldığını göstermektedir. Evciltme tarihinde önemli bir yeri olan Türkiye'deki yerli hayvan ırklarının ki bunların başında sığır ırkları gelmektedir, immün sistemlerini oluşturan gen ve gen bölgeleri hakkında yeterli ve açıklayıcı çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada yerli sığır ırklarımızdan olan Yerli Kara ırkının bağışıklık kapasitesi ve bu özellikleri yönünden diğer ırklara benzerlik ve farklılıklarını belirlemeye, sığırlarda Büyük Doku Uygunluk Kompleksi (BoLA) lokusunu oluşturan BoLA-DMA, BoLA-DMB, BoLA-DQA, BoLA-DQB, BoLA-DRA, BoLA-DRB2, BoLA-DRB3, BoLA-DYA, BoLA-DYB, LMP2, LMP7 gen bölgeleri incelenmiş ve genetik olarak birbirleriyle ilişkilendirilmeye çalışılmıştır. Ayrıca bu gen bölgelerinin farklı ekzonlarının nükleotid dizi analizi gerçekleştirilerek, Yerli Kara sığır ırkının doğal bağışıklık sisteminin temelini oluşturan bu gen bölgeleri ile ilişkili referans veriler elde edilmiştir.

Çalışmada kullanılan hayvan materyali, Amasya-Merzifon (İnalanı, Derealan ve Aşağıbük köyleri) ve Kars-Sarıkamış (Karaköse köyü) bölgelerinden toplanan 67 kan (29, ♂ - 38, ♀) örneği oluşturmaktadır. Toplanan tüm kan örneklerinden manuel ve ticari kit yardımıyla genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Yerli kara sığır örneklerinde BoLA-DMA-E2,3,4, -DMB-E2, -DQA1-E2, -DQA2-E3, -DQA5-E2, -DQB-E2, -DRA-E2, -DRB2-E2, -DRB3-E2, -DYA-E1, -DYA-E2, -DYA-E3,4, -DYB-E3, LMP2-E2 ve LMP7-E3,4,5 bölgelerini çoğaltmak için gerekli ileri ve geri primerler tasarlanmıştır. PZR ile amplifikasyon yapılan örnekler nükleotid dizi analiz cihazı ile ekzon dizi bilgileri elde edilmiştir. Direk dizilenemeyen bölgeler veya bu bölgelerin başlangıç ve sonlarındaki hatalı okumalardan kaynaklanan yanlışlıkların düzeltilmesi ve tam doğru nükleotid dizilerinin ortaya çıkartılması için vektöre klonlanarak, universal primerler ile nükleotid dizileri belirlenmiştir. Nükleotid dizi bilgilerine göre her bölge için 16 konsensüs oluşturulmuştur. Her örnek için ileri ve geri primerler ile elde edilen nükleotid dizi kromatogramlarını bakılarak heterozigot bölgeler belirlenmiştir. Jukes-Cantor veya Kimura-2 parametrisi ile istatistiksel metod olarak ise NJ veya UPGMA metodları kullanılarak, filogenetik test metodu olarak Bootstrap (1000 tekrar) ile dendrogramları elde

edilmiştir. Elde edilen nükleotid diziler NCBI'ya girilerek uluslararası bir boyut kazandırılmıştır. Ayrıca muhtemel protein dizileri incelenerek referans veriler elde edilmiştir. Son olarak önceki çalışmalarda elde edilen allel bilgilerinden faydalanılarak, hastalıklara direnç özellikleri incelenmiş ve tür içindeki bireyler arasındaki varyasyonun derecesi araştırılmıştır.

DMA-E2,3,4 bölgesinde genetik polimorfizme ve allelik varyasyona sahip 91 polimorfik nükleotid farklılığın bulunduğu görülmüştür. Nükleotid dizisinde belirlenen 91 polimorfik nükleotid bölgesinin 22 tanesinin ekzon bölgelerindeki polimorfizmden kaynaklandığı ve bu bölgelerin amino asit dizisinde yaptığı değişikliklerin daha önceki çalışmalarda belirlenenlerden farklı olduğu gözlemlenmiştir. Bu değişiklikler bölüm 4.4.1.2'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir. DMA-mRNA (783 bç uzunluğunda) dizilerinden yola çıkılarak 6 farklı haplotip belirlenmiştir (in silico). Bu gen bölgesi yönünden yerli kara sığırlarında, haplotip farklılığı $0,998 \pm 0,007$ olarak, nükleotid farklılığı $0,00822 \pm 0,0000012$ olarak hesaplanmıştır. Yerli karalardaki haplotipler arasındaki genetik uzaklıklar 0,0010-0,0331 (ortalaması: 0,0083) arasında ve oldukça düşük değerlerde bulunmuştur. Konsensüs dizileri filogenetik ilişkileri bakımından referans diziye göre (nükleotid için AY957499.1, mRNA için NM_001012674.2 ve aa için NP_001012692.2) nükleotid ve amino asit dizisi ayrımı %20 hesaplanırken mRNA dizisi %50 şeklinde belirlenmiştir.

DMB-E2 bölgesinde genetik polimorfizmi ve allelik varyasyona sahip 13 polimorfik nükleotid farklılığın bulunduğu görülmüştür. Yerli karalarda DMB-E2 bölgesi yönünden haplotip farklılığı $0,653 \pm 0,122$ olarak, nükleotid farklılığı $0,00478 \pm 0,0000029$ olarak hesaplanmıştır. Yerli karalardaki haplotipler arasındaki genetik uzaklıklar 0,0033-0,0373 (ortalaması: 0,0080) arasında ve oldukça düşük değerlerde bulunmuştur. DMB-E2 nükleotid konsensüs dizileri kullanılarak elde edilen DMB-mRNA (789 bç uzunluğunda) dizilerinden yola çıkılarak 9 farklı haplotip belirlenmiştir (in silico). Belirlenen haplotiplere bakılarak bu gen bölgesi yönünden YK9,14 ve 15 nolu konsensüs dizilerin oluşturulduğu popülasyonlardaki bireylerde heterozigotluğun yaygın olarak görüldüğü tespit edilmiştir. Yerli kara sığır ırkındaki DMB-E2 bölgesinin amino asit pozisyonlarına bakıldığında, 17. ve 18. pozisyonlarda bulunan apolar bir amino asit olan alalin yerine, porlin (17. pozisyon için) ve polar bir amino asit olan treonin (18. pozisyon için) gelmesidir. Bu bölge sinyal peptid bölgesi içerisindedir (Niimi ve ark., 1995). Sinyal peptid bölgesindeki bu farklılığın herhangi bir değişikliğe sebep olduğunu belirlemek için SignalP

4.1 online (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) programından yararlanılmış ve bu bölgede bir değişikliğe sebep olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.20). Sinyal peptid bölgesi yeni sentezlenen bir proteinin doğru yere veya hücresel bölüme yönlendiren 15-30 amino asit uzunlukta bir bölgedir. Ayrıca bu bölge proteinin endoplazmik retikulum transferi ve olgun protein oluşurken, uygun bölgeden sinyal peptidaz tarafından kesilmesini sağlamaktadır (Heijne ve Gavel, 1988; Käll ve ark., 2004). Konsensüs dizileri filogenetik ilişkileri bakımından referans diziye göre (nükleotid için AY957499.1, mRNA için NM_001040481.3 ve aa için NP_001035571.1) nükleotid ve amino asit dizisi ayrımı %10 hesaplanırken mRNA dizisi %20 şeklinde belirlenmiştir.

YK-DQA1-E2 (310 bç), YK-DQA2-E3 (389 bç) ve YK-DQA5-E2 (338 bç) bölgelerinin her iki zincirinden ileri ve geri primerleri kullanılarak nükleotid dizisi belirlenmiştir. Yerli karadaki DQA1-E2 bölgesinin en az 28 en fazla 37 adet nükleotid farklılık içerdiği ve 51-294. nükleotid pozisyonları arasında toplam 500 polimorfik nokta tespit edilmiştir. DQA2-E3 bölgesinin polimorfik bölgeleri belirlenmiştir. Diğer bölgelerden farklı olarak DQA2-E3 bölgesinde 103-105. pozisyonunda üç nükleotidden oluşan bir insersiyon gözlemlenmiştir. Bu tüm yerli kara sığır örneklerinden oluşturulan konsensüs dizilerin tamamında görülmesi, bu bölgenin yerli karalara özgü bir değişim olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Yerli kara DQA2-E3 bölgesinde 26-395. nükleotid pozisyonları arasında toplam 489 polimorfik nokta belirlenmiştir. Diğer taraftan YK-DQA5-E2 bölgesinde genetik polimorfizmi ve allelik varyasyona sahip toplam 308 polimorfik nükleotid farklılığın bulunduğu görülmüştür. DQA1-E2, DQA2-E3 ve DQA5-E2 nükleotid konsensüs dizileri kullanılarak elde edilen DQA1, DQA2 ve DQA5-mRNA (768, 765 ve 768 bç uzunluğunda) dizilerinden yola çıkılarak, DQA1 için 12 adet farklı haplotip, DQA2 için 13 adet farklı haplotip ve DQA5 için ise 7 adet farklı haplotip belirlenmiştir. Yerli kara sığır ırkının DQA1 geni yönünde amino asit pozisyonları dikkate alındığında, oluşturulan tüm konsensüs dizilerinde 36., 37. ve 38. pozisyonundaki alanin, aspartik asit ve fenilalanin (A,D,F) üçlü amino asit dizisi yerine treonin, glutamik asit ve izolösin'den (T,E,I) oluşan bir üçlü amino asit dizisi belirlenmiştir. DQA2 gen bölgesi yönünden ise yerli kara sığır ırkında 138. amino asit pozisyonunda izolösin (I) amino asidinin eklenmiş olmasıdır. Yerli kara sığır ırkıımızdaki DQA1, DQA2 ve DQA5 genleri yönündeki farklılıklar son derece önemlidir. DQA geni İmmün Polimorfizm Veritabanına (IPD) girilen üç genden (DQA, DQB ve DRB3) bir tanesidir. Bu veri tabanında *Bos indicus* (5 allel), *Bos taurus* (56 allel) ve *Bubalus bubalis* (8 allel) ırklarına ait allellerin

veri tabanı oluşturulmuştur (IPD-<http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/group/BoLA>; Robinson ve ark., 2012). Farklılıkların alfa ve immünoglobulin domainlerinde görülmesi bu bölgelerin yerli karanın bağışıklık sistemine önemli katkısı olduğu düşünülmüştür. Yerli kara DQA1 konsensüs dizileri filogenetik ilişkileri bakımından referans diziye göre (nükleotid için FQ482091.6, mRNA için NM_001013601.3 ve aa için NP_001013619.3) nükleotid ve amino asit dizisi ayırımındaki bootstrap test değeri %10 hesaplanırken mRNA dizisi %50 şeklinde belirlenirken, yerli kara DQA2 konsensüs dizileri filogenetik ilişkileri bakımından referans diziye göre (nükleotid için FQ482109.2, mRNA için XM_015468906.1 ve aa için XP_015315336.1) nükleotid dizisi ayırımındaki bootstrap test değeri %50 hesaplanırken mRNA ve amino asit dizisi %20 şeklinde belirlenmiştir. Ayrıca yerli kara DQA5 konsensüs dizileri filogenetik ilişkileri bakımından referans diziye göre (nükleotid için FQ482109.2, mRNA için NM_001012675.2 ve aa için NP_001012693.2) nükleotid dizisi ayırımındaki bootstrap test değeri %20 olarak hesaplanırken, mRNA dizisi %50 ve amino asit dizisi %10 şeklinde hesaplanmıştır. Yerli kara sığırlarında, haplotip farklılığı DQA1-E2 için $0,972 \pm 0,020$, DQA2-E3 için $0,975 \pm 0,014$ ve DQA5-E2 için ise $0,949 \pm 0,031$ olarak hesaplanırken, nükleotid farklılığı ise DQA1-E2, DQA2-E3 ve DQA5-E2 bölgeleri için sırasıyla $0,01375 \pm 0,0000015$, $0,02070 \pm 0,0000209$ ve $0,0534 \pm 0,0003318$ olarak hesaplanmıştır. Yerli karalardaki haplotipler arasındaki genetik uzaklıklar ise DQA1-E2 için $0,0032-0,0362$ (ortalama: $0,0139$), DQA2-E3 için $0,0025-0,0805$ (ortalama: $0,0211$) ve DQA5-E2 için ise $0,0029-0,2197$ (ortalama: $0,0595$) arasında bulunmuştur.

YK-DQB-E2 bölgesinin her iki zinciride ileri ve geri primerleri kullanılarak nükleotid dizisi belirlenmiştir (374 bç). Referans dizi ve elde edilen konsensüs dizileri kıyaslandığında yerli karadaki DQB-E2 bölgesinin en az 2 en fazla 7 adet nükleotid farklılık içerdiği görülmüştür. Yerli kara sığır ırkındaki DQB-E2 bölgesindeki 77. pozisyonundaki G→T, 129. pozisyonundaki T→A ve 166. pozisyonundaki T→C dönüşümü ve 77. ve 166. nükleotidlerin yerli kara DQB konsensüs dizilerinin tamamında korunduğu belirlenmiştir. DQB-E2 nükleotid konsensüs dizileri kullanılarak elde edilen DQB-mRNA (786 bç uzunluğunda) dizilerinden yola çıkılarak 8 farklı haplotip belirlenmiştir (in silico). Nükleotid dizisinde belirlenen 62 polimorfik nükleotid bölgesinin 57 adetti ekzon bölgesi içeresindedir. Buda geniş bir amino asit çeşitliliği sağlamaktadır. Amino asit pozisyonlarına bakıldığında; YK16 dışındaki tüm konsensüslerde 45. pozisyonundaki sistein→glisine dönüşürken, YK2, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 13 ve 14 konsensüslerinde 62.

pozisyonundaki tirozin→fenilalanine dönüşmüştür. Sonuç olarak, bu çalışmada, MHC sınıf II DQB geninin ekson 2 izole edilmiş ve ilk defa yerli kara sığırında karakterize edilmiştir. Yerli kara 8 yeni allel tespit edilmiştir. Ancak dikkat çeken nokta YK2, 4, 5, 9, 11, 12, 13 ve 14 konsensüz dizilerini oluşturan allelin korunuyor olmasıdır. Bu da yerli kara ırkında bu allelin güçlü bir pozitif seçimi olduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca DQB-E2 bölgesi yönünden haplotip farklılığı $0,907 \pm 0,044$ olarak, nükleotid farklılığı $0,00654 \pm 0,000089$ olarak hesaplanmıştır. Yerli karalardaki haplotipler arasındaki genetik uzaklıklar 0,0027-0,0216 (ortalaması: 0,0066) arasında bulunmuştur.

YK-DRA-E2 bölgesinin her iki zincirinde ileri ve geri primerleri kullanılarak nükleotid dizisi belirlenmiştir (305 bç). Hizalama işlemi sonunda intron bölgelerinin de içerisinde bulunduğu konsensüs dizilerinde en fazla farklılık YK-2-DRA-E2 nolu konsensüs dizisinde (2 nükleotid) gözlemlenirken, diğer dizilerde sadece 1 nükleotid farklılık belirlenmiştir. DRA-E2 nükleotid konsensüs dizileri kullanılarak elde edilen DRA-mRNA (762 bç uzunluğunda) dizilerinden yola çıkılarak 4 farklı haplotip belirlenmiştir (in silico). Belirlenen haplotiplere bakılarak bu gen bölgesi yönünden YK2,7 ve 10 nolu konsensüs dizilerin oluşturulduğu popülasyonlardaki bireylerde heterozigotluğun yaygın olarak görüldüğü belirlenmiştir. Amino asit pozisyonlarına bakıldığında; YK1-16 konsensüz dizilerinde belirlenen nükleotid farklılıklar hiçbir amino asit değişikliğine neden olmamıştır. Kısaca özetlemek gerekirse yerli kara sığır ırkından DRA geni ilk kez karakterize edilmiştir. YK-DRA'nın, özellikle memelilerin çoğunda olduğu gibi, ekzon 2'nin oldukça korunmuş olduğunu gözlemlenmiştir. DRA-E2 bölgesi yönünden haplotip farklılığı $0,586 \pm 0,079$ olarak, nükleotid farklılığı $0,00221 \pm 0,00040$ olarak hesaplanmıştır. Yerli karalardaki haplotipler arasındaki genetik uzaklıklar 0,0033-0,0066 (ortalaması: 0,0022) arasında bulunmuştur.

YK-DRB2-E2 bölgesinin her iki zincirinde ileri ve geri primerleri kullanılarak nükleotid dizisi belirlenmiştir (394 bç). YK-DRB2-E2 bölgesinde genetik polimorfizmi ve alelik varyasyona sahip 11 polimorfik nükleotid farklılığın bulunduğu görülmüştür. Ayrıca 107, 159 ve 270 nükleotid pozisyonlarda heterozigotluğun yaygın olduğu gözlemlenmiştir. YK-DRB2-E2 nükleotid konsensüs dizileri kullanılarak elde edilen DRB2-mRNA (964 bç uzunluğunda) dizilerinden yola çıkılarak 10 farklı haplotip belirlenmiştir (in silico). Ayrıca yerli kara sığır ırkındaki DRB2-E2 bölgesinde (YK3-16) üçlü nükleotid dizisi olan A,C ve G (pozisyon 259, 260 ve 262)'nin bir çok örnekte korunmuş olduğu görülmüştür. Yerli kara sığırındaki (87 ve 88 pozisyonundaki amino asitler) Treonin-Alanin bölgesi beta 1

bölgesinin (10-90 aa'lık ilk bölge) bitiş bölgesinde bulunurken, Glisin bölgesinin de beta 2 bölgesinin bitiş bölgesinde (100-180 aa'lık ikinci bölge) bulunması, DRB2 molekülünü oluşturan proteinin katlanmasında bir değişikliğe sebep olabileceği ön görülmüştür. Yerli kara sığır ırkımızdaki BoLA-DRB2-E2 bölgesinin ait sekans ortaya çıkartılmıştır. Bu diziler kullanılarak NCBI'da daha önceden belirlenen BoLA-DRB2 gen bölgeleri ile beraber filogenetik analiz yapılmıştır. Yerli kara sığır ırkı için oluşturulan filogenetik ağaçlar Neighbor-Joining (NJ) yöntemi, Jukes-Cantor modeli ve Bootstrap metoduna (1000) dayanmaktadır. Konsensüs dizileri filogenetik ilişkileri bakımından referans diziye göre (nükleotid için FQ482091.6, mRNA için XM_015468908.1 ve aa için XP_010816599.2) nükleotid ve amino asit dizisi ayrımındaki bootstrap test değeri %50 hesaplanırken mRNA dizisi %10 şeklinde belirlenmiştir. Yerli kara sığırlarında, DRB2-E2 bölgesi yönünden haplotip farklılığı $0,931 \pm 0,013$ olarak, nükleotid farklılığı $0,00595 \pm 0,00036$ olarak hesaplanmıştır. Yerli karalardaki haplotipler arasındaki genetik uzaklıklar 0,0025-0,0197 (ortalaması: 0,0060) arasında bulunmuştur.

YK-DRB3-E2 bölgesinin her iki zincirinde ileri ve geri primerleri kullanılarak nükleotid dizisi belirlenmiştir (414 bç). Hizalama işlemi sonunda, polimorfik bölgelerin tamamı ekzon 2 bölgesi içerisinde olduğu görülmüştür. Referans dizi ve elde edilen konsensüs dizileri kıyaslandığında yerli karadaki DRB3-E2 bölgesinin en az 9 (YK6-DRB3-E2) en fazla 26 (YK12-DRB3-E2) adet nükleotid farklılık içerdiği görülmüştür. Yerli kara sığır ırkındaki DRB3-E2 bölgesindeki 89. pozisyondaki C→T, 105. pozisyondaki A→T, 135. pozisyondaki A→T, 159. pozisyondaki A→G, 162. pozisyondaki G→C, 165. pozisyondaki T→A, 173. pozisyondaki T→C, 178. pozisyondaki C→G, 193 ve 194. pozisyondaki CT→GA, 203-207. pozisyondaki CGGGC→SRSAR ve 252. pozisyondaki G→T, nükleotidlerin yerli kara DRB3 konsensüs dizilerinin tamamında korunduğu belirlenmiştir. Buna göre elde edilen yerli kara konsensüs dizilerinin her biri birbirinden farklı birer alleli temsil ettiği sonucuna varılmıştır. DRB3-E2 nükleotid konsensüs dizileri kullanılarak elde edilen DMA-mRNA (801 bç uzunluğunda) dizilerinden yola çıkılarak 16 farklı haplotip belirlenmiştir. Ayrıca YK-DRB3-E2 bölgesinde 46-295. nükleotidleri arasında 65 farklı polimorfik nokta belirlenmiştir. Burada dikkat çeken nokta ise nükleotid dizisinde belirlenen 275 polimorfik nükleotid bölgesinin neredeyse tamamı yaklaşık 273 nükleotid farklılığın korunuyor olmasıdır. Yerli kara sığır ırkının DRB3 geni yönünde amino asit pozisyonları dikkate alındığında referans *Bos taurus* DRB3 (Ac. No. NP_001012698.2) proteinine göre, oluşturulan tüm konsensüs

dizilerinde 42. pozisyonundaki nötür bir amino asit olan glisin yerine kuvvetli bazik bir amino asit olan arjinine (G→R) ve 124. pozisyonundaki apolar bir amino asit olan valin (hidropati indeksi; 4,2) yerine yine apolar amino asit olan glisin'e (hidropati indeksi; -4) (V→G) dönüştüğü ve popülasyonlarda korunduğu belirlenmiştir. Diğer amino asit değişiklikler bölüm 4.6.3.2'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Yerli kara sığır ırkımızdaki DRB3 geninde ilk defa belirlenen farklılıklar son derece önemlidir. DRB3 geni  mm n Polimorfizm Veritabanına (IPD) girilen    genden (DQA, DQB ve DRB3) bir tanesi ve en önemlisidir. Bu veri tabanında *Bos indicus* (42 allel) ve *Bos taurus* (69 allel) ırklarına ait allellerin veri tabanı oluşturulmuştur (IPD-<http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/group/BoLA>; Robinson ve ark., 2012). Farklılıkların tamamı beta domaininde (42→116) görülmesi bu bölgelerin yerli karanın bağışıklık sistemine önemli katkısı olduğu düşülmüştür. Yerli kara DRB3 konsensüs dizileri filogenetik ilişkileri bakımından referans diziye göre (nükleotid için FQ482110.1, mRNA için NM_001012680.2 ve aa için NP_001012698.2) nükleotid ve amino asit dizisi ayırımındaki bootstrap test değeri %50 hesaplanırken mRNA dizisi %20 şeklinde belirlenmiştir. Filogenetik ağaç üzerindeki yerli kara allelleri incelendiğinde, YK7-DRB3-E2 allenin, şap hastalığına karşı yüksek koruyucu immün yanıtla ilişkili olan Bota-DRB3*0801 alleli ile %96 benzerlik gösterdiği, bu allenin bağlanma ceplerindeki spesifik kalıntıların FMD aşısına karşı immün yanıt için çok önemli olduğunun belirlenmiş olması, YK7-DRB3-E2 allelenin yerli kara için benzersiz yapmaktadır (Gowane ve ark., 2013). Ayrıca YK-DRB3-E2 alleli mastitis riskini azaltan ve klinik mastitise direnç ile bağlantılı Bota-DRB3*1501-1502 allerin bulduğu dalda bulunmuştur. Bu sonuç YK7-DRB3-E2 konsensüs dizisinin oluşturduğu alleli bu hastalıklara karşı dirençli bir allel yapmaz, ancak bu allelerin özelliklerini de barındırmadığı anlamına gelmez, bunu için daha fazla popülasyonda daha fazla örnek ile çalışma yapılmalıdır. Bununla birlikte YK3-, YK10- ve YK15-DRB3-E2 alleleri kalıcı lenfositoz (KL) direnç sağlayan Bota-DRB3*0201 alleleline %99 benzemektedir (Udina ve ark., 2003). Sığırlardaki kene enfestasyonlarına duyarlılığın kalıtsal bir bileşene sahip olduğu tahmin edilmektedir, bunun en önemli sebebi doğaları gereği farklı sığır ırklarının diğerlerine göre daha dirençli olduğu bilinmektedir, fakat neden olan genetik unsurlar hala tam olarak bilinmemektedir (Untalan ve ark., 2007). Sığır sürülerinde yapılan bir çalışmada kene direncini belirlemek için, BoLA-DRB3 geninin ikinci ekzonun ile gerçekleştirilen analiz çalışmalarında, DRB3*4401 allelinin kenelere direnç sağlayan bir fenotipe sahip olduğunu belirlemişlerdir (Untalan ve ark., 2007).  şte bu allel ile YK1-DRB3-E2 ve YK12-DRB3-E2 alleleri aynı dalda bulunmuştur. Yerli kara sığırının zor şartlara adaptasyonu ve mera hayvancılığına

uygun bir yapıda bulunması bu allel yönünden veya daha güçlü alleleri barındırması hiç şaşırtıcı değildir. YK3-DRB3-E2 ve YK8-DRB2-E2 alleleri henüz bir fonksiyonu belirlenmemiş Bota-DRB3*3501 alleli ile %99 benzerlik göstermektedir. YK9-DRB3-E2 alleli ise KL'ye direnç ile ilişkili Bota-DRB3*0701 alleli ile %99 benzerlik göstermektedir (Xu ve ark., 1993). Ayrıca YK4-, YK6- ve YK16-DRB3-E2 alleleri IPD'deki DRB3 allelerinden farklı birer allel olduğu yorumu yapılmıştır. Ayrıca yerli kara sığırlarında en yüksek haplotip farklılığı DRB3-E2 bölgesinde $1,000 \pm 0,0010$ olarak hesaplanırken, nükleotid farklılığı $0,05199 \pm 0,00147$ olarak hesaplanmıştır. Yerli karalardaki haplotipler arasındaki genetik uzaklıklar 0,0032-0,1125 (ortalaması: 0,0543) arasında bulunmuştur.

YK-DYA-E1 (179 bç), YK-DYA-E2 (316 bç) ve YK-DYA-E3,4 (1159 bç) bölgelerinin her iki zincirinden ileri ve geri primerleri kullanılarak nükleotid dizisi belirlenmiştir. Kümeleme işlemi sonunda YK-DYA-E1 bölgesini yönünden, konsensüz dizilerinde, YK1-DYA-E1 dizisinde 13. ve 140. pozisyonlarda (W: A veya T), YK14-DYA-E1 dizisinde 143. pozisyonlarda (W: A veya T) ve YK15-DYA-E1 dizisinde de 140. pozisyonlarda (W: A veya T) heterozigot noktaları belirlenmiştir. YK-DYA-E2 nükleotid dizilerinin kümelenmesi sonucunda, en fazla farklılık 5 nükleotid iken, en az farklılık 3 nükleotid olarak gözlemlenmiştir. Buradaki dikkat çeken nokta 46, 63, 100, 184 ve 207 pozisyonlarındaki nükleotidlerin heterozigot oluşlarıdır. YK-DYA gen bölgesini oluşturan diğer ekzon bölgelerinin (E3 ve E4) kümelenmesi sonucunda en fazla farklılık 14 nükleotid iken, en az farklılık ise 2 nükleotid olarak gözlemlenmiştir. Bu bölgelerdeki farklılıklarda tıpkı diğer DYA ekzonlarında olduğu gibi yaygın heterozigotluk göstermişlerdir. Yerli kara DYA nükleotid konsensüs dizileri kullanılarak elde edilen DYA-mRNA (762 bç uzunluğunda) dizilerinden yola çıkılarak 14 farklı haplotip belirlenmiştir. Belirlenen haplotiplere bakılarak bu gen bölgesi yönünden yerli kara konsensüs dizilerin oluşturulduğu popülasyonlardaki bireylerde heterozigotluğun yaygın olarak görüldüğü belirlenmiştir. Dikkat çeken nokta ise 77. pozisyonlarındaki C yerine tüm yerli kara sığırlarında G nükleotidinin gelmesidir. Yerli kara sığır ırkının DYA geni yönünde amino asit pozisyonları dikkate alındığında, oluşturulan tüm konsensüs dizilerinde 26. pozisyonundaki alaninin (A) gilisinine (G) dönüştüğü ve bu değişikliğin tüm yerli kara örneklerinde korunduğu belirlenmiştir. Ayrıca 42. pozisyonundaki alaninin (A)→X'e (herhangi bir amino asit), 70. pozisyonundaki prolinin (P) →X'e (herhangi bir amino asit), 77. pozisyonundaki lizinin (K)→ X'e (herhangi bir amino asit), 148. pozisyonundaki asparajininin (N)→X'e (herhangi bir amino asit) ve 180. pozisyonundaki serinin (S)→X'e

(herhangi bir amino asit) dönüştüğü belirlenmiştir. Yerli kara sığır ırkı için oluşturulan filogenetik ağaçlar Neighbor-Joining (NJ) yöntemi, Jukes–Cantor modeli ve Bootstrap metoduna (1000) dayanmaktadır. Konsensüs dizileri filogenetik ilişkileri bakımından referans diziye göre (nükleotid dizileri için Ac. No. AY957499.1) YK-DYA-E1 nükleotid dizisi ayrımı %50, YK-DYA-E2 nükleotid dizisi ayrımı %50 ve YK-DYA-E3,4 nükleotid dizisi ayrımı %20, mRNA dizisi (mRNA dizileri için Ac. No. NM_001012678.1) %50 şeklinde hesaplanırken amino asit dizisi (amino asit dizileri için Ac. No. AAI49796.1) ayrımı %10 olarak belirlenmiştir. Yerli kara sığırlarında, haplotip farklılığı DYB-E1 için $0,538 \pm 0,114$, DYB-E2 için $0,969 \pm 0,005$ ve DYB-E3,4 için ise $0,989 \pm 0,009$ olarak hesaplanırken, nükleotid farklılığı ise DYB-E1, DYB-E2 ve DYB-E3,4 bölgeleri için sırasıyla $0,00392 \pm 0,00100$, $0,00783 \pm 0,00011$ ve $0,00549 \pm 0,00029$ olarak hesaplanmıştır. Yerli karalardaki haplotipler arasındaki genetik uzaklıklar ise DYB-E1 için 0,0056-0,0169 (ortalama: 0,0039), DYB-E2 için 0,0032-0,0160 (ortalama: 0,0078) ve DYB-E3,4 için ise 0,0009-0,0122 (ortalama: 0,0055) arasında bulunmuştur. YK-DYA amino asit dizilerinin sığır, insan, domuz, koyun ve bizonda kıyaslanması, yerli kara sığır ırkı için benzersiz olan tek amino asit pozisyonunu (glisin) tanımlamamızı sağlamıştır. Bu bölge tüm yerli kara DYB konsensüs dizilerinin tamamında %100 korunmuştur. Türler arasında korunan amino asitler genellikle genin yapısı veya fonksiyonunu korumak için gerekli noktaları işaret eder. Ayrıca fonksiyonel genler psödogenlerden daha yüksek nükleotid koruma seviyesi göstermektedirler. Bu açıdan bakıldığında yerli karadaki DYB genin ekspresyonu seviyesi ve protein yapısı daha sonraki çalışmalarda ayrıntılı olarak çalışılacaktır.

YK-DYB-E3 bölgesinin her iki zincirinde ileri ve geri primerleri kullanılarak nükleotid dizisi belirlenmiştir (307 bp). Toplamda 23 polimorfik nokta belirlenirken, YK-DYB-E3 bölgesinde genetik polimorfizmi ve alelik varyasyona sahip 7 polimorfik nükleotid farklılığın bulunduğu görülmüştür. DYB-E3 nükleotid konsensüs dizileri kullanılarak elde edilen DYB-mRNA (780 bp uzunluğunda) dizilerinden yola çıkılarak 6 farklı haplotip belirlenmiştir (in silico). Yerli kara sığır ırkının DYB geni yönünde amino asit pozisyonları dikkate alındığında, 139. pozisyondaki lösin (L) → X'e (herhangi bir amino asit), 194. Pozisyondaki valin (V) → X'e (herhangi bir amino asit) ve 213. pozisyondaki prolinin (P) → X'e (herhangi bir amino asit) dönüştüğü belirlenmiştir. Diğer amino asit değişiklikler ayrıntılı olarak bölüm 4.7.2.2'de anlatılmıştır. Yerli kara sığırlarındaki haplotip farklılığı DYB-E3 bölgesinde $0,925 \pm 0,025$ olarak hesaplanırken,

nükleotid farklılığı $0,00777 \pm 0,00070$ olarak hesaplanmıştır. Yerli karalardaki haplotipler arasındaki genetik uzaklıklar 0,0032-0,0298 (ortalaması: 0,0078) arasında bulunmuştur. Konsensüs dizileri filogenetik ilişkileri bakımından referans diziye göre (nükleotid için AY957499.1, mRNA için NM_001012679.1 ve aa için NM_001012679.1) nükleotid dizisi ayırımındaki bootstrap test değeri %50, mRNA dizisi %20 ve amino asit dizisi %10 şeklinde belirlenmiştir. Ağaç topolojisi incelendiğinde, sığır ve koyun DYB genleri arasındaki karşılaştırma % 96'lık bir orana sahip olduğu daha önceki çalışmalarda belirlenmiştir (Wright ve ark., 1994).

YK-LMP2-E2 (158 bç) ve YK-LMP7-E3,4,5 (1102 bç) bölgelerinin her iki zincirinden ileri ve geri primerleri kullanılarak nükleotid dizisi belirlenmiştir. Referans dizi ve elde edilen konsensüs dizileri kıyaslandığında yerli karadaki LMP2-E2 bölgesinin en az 1 adet, en fazla 8 adet nükleotid farklılık içerdiği görülmüştür. Yerli kara LMP2-E2 bölgesinde 46-146. nükleotid pozisyonları arasında toplam 23 polimorfik nokta belirlenmiştir. Bu bölgeler incelendiğinde 46-105 arasındaki 11 nükleotid farklılığın ekzon 2 bölgesinde bulunurken, diğer nükleotid farklılıkların intron bölgesinde olduğu belirlenmiştir. LMP2-E2 nükleotid konsensüs dizileri kullanılarak elde edilen YK-LMP2-mRNA (660 bç) dizilerinden yola çıkılarak 8 farklı haplotip belirlenmiştir (in silico). LMP7-E3, 4 ve 5 ekzonlarını kapsayan bölgedeki polimorfik bölgelerinin bir kısmı intron bölgesinde bir kısmında ekzon 3, 4 ve 5 bölgeleri içerisinde dağıldığı görülmüştür. LMP7-E3,4,5 nükleotid konsensüs dizileri kullanılarak elde edilen YK-LMP7-mRNA (780 bç) dizileri dikkate alınarak 4 farklı haplotip belirlenmiştir. Yerli kara sığırlarında, haplotip farklılığı LMP2-E2 için $0,9948 \pm 0,0021$ ve LMP7-E3, 4, 5 için ise $0,867 \pm 0,060$ olarak hesaplanırken, nükleotid farklılığı ise LMP2-E2 ve LMP7-E3, 4, 5 bölgeleri için sırasıyla $0,02630 \pm 0,00098$ ve $0,00358 \pm 0,00063$ olarak hesaplanmıştır. Yerli karalardaki haplotipler arasındaki genetik uzaklıklar ise LMP2-E2 için 0,0063-0,0937 (ortalama: 0,0269) ve LMP7-E3, 4, 5 için ise 0,0009-0,0202 (ortalama: 0,0036) arasında bulunmuştur. Konsensüs dizileri filogenetik ilişkileri bakımından referans diziye göre (LMP2 ve LMP7 genlerinde nükleotid için AY957499.1, LMP2 mRNA için NM_001034388.2, LMP7 mRNA için XM_005223195.3 ve LMP2 aa için NP_001029560.1, LMP7 aa için XP_005223252.1), LMP2 için nükleotid ve amino asit dizisi ayırımındaki bootstrap test değeri %50 hesaplanırken mRNA dizisi %20 şeklinde, LMP7 için ise nükleotid ve mRNA dizisi ayırımındaki bootstrap test değeri %50 hesaplanırken aa dizisi %20 şeklinde belirlenmiştir.

Hayvancılıkta popülasyondaki immün cevabın doğal genetik varyasyonunu anlamak hastalıkları önleme stratejilerini tasarlamak için önemli bir yöntem olabilir. MHC sığırlardaki adı ile BOLA immün cevabı başlatarak antijenlerin kaderini belirlemede rol alır, bu yüzden konakçı patojen ilişkisini inceleyen araştırmaların yoğunlaştırılması, immün cevabı oluşturan genlerin allel varyasyonlarının belirlenmesi, BOLA ile hastalık kontrol stratejilerine destek olacaktır. Farklı aleller tarafından kodlanan BOLA molekülleri immün sistemine farklı peptit setlerini bağlar ve sunarlar. BoLA allellerinin antijen bağlanma farklılığı anlamamız, BOLA polimorfizmlerinin evrimini ve BOLA-bağımlı dirençin immünolojik temelini açıklanmasına yardımcı olabilir. Ayrıca bu edindiğimiz bilgilerle birlikte coğrafik bölge, parazit epidemiyolojisi ve konakçıdaki dağılımının moleküler seviyesi gibi bilgileri birleştirerek hastalık yayılması öngörü modellerinin geliştirmek için bize yardım sağlayacağı aşıkârdır.

Sonuç olarak, bu çalışma yerli kara sığırı için elde edilen bilgiler gelecekteki BoLA hastalık ilişkisi çalışmalarına bilgi sağlayacağı düşünülmektedir. Belirlenen BoLA haplotiplerinin çoğunluğu yerli kara sığır ırkına özgüdür ve ortak haplotiplerin çok azı farklı sığır ırklarında gözlemlenmiştir. Sığırlarda görülen kompleks hastalıklar, genom boyunca birden fazla loci yanı sıra birçok farklı çevresel faktörlerin etkileşimi ile ilişkilidirler. Diğer önemli bağışıklık sistemi genleri varyantları ile BoLA haplotipinin bütünleştirilmesi, özellikle sığırlardaki hastalıklara duyarlılık ve dirençin genetik temelini tam olarak anlaşılmasına olanak verecektir. Bu açıdan yerli sığır ırklarımızdaki BoLA bölgesi tamamen aydınlatılmayı beklemektedir. Hayvancılık araştırmalarında moleküler, biyokimyasal, immünolojik ve genomik disiplinler arası araştırmaların en önemli hedefleri MHC polimorfizminin hastalık direnci ve duyarlılığa nasıl katkı sağladığını anlamaya yönelik olmalıdır. Moleküler analiz ve hastalık ilişkili haritalama muhtemelen önümüzdeki uzun yıllar hayvan genetiği ve veteriner hekimlikte önemli bir rol oynayacaktır. Antibiyotik ve diğer ilaçların patojenik mikroorganizmaların artan direnci ve bulaşıcı hastalıklara karşı direnç altında yatan moleküler genetik temellerini anlamanın önemini vurgulamaktadır. Gelecekte spesifik hastalıklara direnç için markör-destekli seleksiyon kombinasyonu ve peptid aşılar için bağlanma motifleri hakkında bilgi kullanımı hayvan sağlığı için önemli katkılar sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Aarestrup, F. M., Jensen, N. E., Østergård, H., 1995. Analysis of associations between major histocompatibility complex (BoLA) class I haplotypes and subclinical mastitis of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 78(8), 1684-1692.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S., 2012. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. Elsevier Health Sciences.
- Abi-Rached, L., Gilles, A., Shiina, T., Pontarotti, P., Inoko, H., 2002. Evidence of en bloc duplication in vertebrate genomes. *Nature Genetics*, 31(1), 100-105.
- Aguado, B. M. C. M., Milner, C. M., Campbell, R. D., 1996. Genes of the MHC class III region and the functions of the proteins they encode. HLA and MHC: genes, molecules and function. Eds: Browning M, McMichael A, BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, 39-75.
- Aida, Y., Kohda, C., Morooka, A., Nakai, Y., Ogimoto, K., Urao, T., Asahina, M., 1994. Cloning of cDNAs and the molecular evolution of a bovine MHC class II DRA gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 204(1), 195-202.
- Aida, Y., Niimi, M., Asahina, M., Okada, K., Nakai, Y., Ogimoto, K., 1995. Identification of a new bovine MHC class II DRB allele by nucleotide sequencing and an analysis of phylogenetic relationships. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 209(3), 981-988.
- Aida, Y., Takeshima, S., Nagaoka, Y., Ikegami, M., Gotoh-Inabe, K., Kabeya, H., Okada, K., 2000, March. The relationship between polymorphism of the MHC class II DR gene and resistance and susceptibility to bovine leukemia virus-induced lymphoma. In *Proceedings of the International Veterinary Cytokine and Vaccine Conference* (Vol. 1617, pp. 159-162).
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402.
- Álvaro-Benito, M., Wieczorek, M., Sticht, J., Kipar, C., Freund, C., 2015. HLA-DMA polymorphisms differentially affect MHC class II peptide loading. *The Journal of Immunology*, 194(2), 803-816.
- Ambagala, A. P., Feng, Z., Barletta, R. G., Srikumaran, S., 2002. Molecular cloning, sequencing, and characterization of bovine transporter associated with antigen processing 2 (BoTAP2). *Immunogenetics*, 54(1), 30-38.
- Amills, M., Ramiya, V., Norimine, J., Lewin, H. A., 1998. The major histocompatibility complex of ruminants. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 17(1), 108-120.
- Amorena, B., Stone, W. H., 1978. Serologically defined (SD) locus in cattle. *Science*, 201(4351), 159-160.

- Anders, A. K., Call, M. J., Schulze, M. S. E., Fowler, K. D., Schubert, D. A., Seth, N. P., Wucherpennig, K. W., 2011. HLA-DM captures partially empty HLA-DR molecules for catalyzed removal of peptide. *Nature Immunology*, 12(1), 54-61.
- Andersson, L., 1996. Major histocompatibility complex evolution. *The major histocompatibility complex region of domestic animal species*. Editörler: Schook L.B., Lamont S.J.). CRC Press: Boca Raton, USA-Florida, 1-15.
- Andersson, L., and Mikko, S., 1995. Generation of MHC Class II Diversity by Intra-and Intergenic Recombination. *Immunological Reviews*, 143(1), 5-12.
- Andersson, L., and Rask, L., 1988. Characterization of the MHC class II region in cattle. The number of DQ genes varies between haplotypes. *Immunogenetics*, 27(2), 110-120.
- Andersson, L., Bohme, J., Peterson, P. A., ve Rask, L., 1986a. Genomic hybridization of bovine class II major histocompatibility genes: 2. Polymorphism of DR genes and linkage disequilibrium in the DQ-DR region. *Animal Genetics*, 17(2), 295-304.
- Andersson, L., Lundén, A., Sigurdardottir, S., Davies, C. J., Rask, L., 1988. Linkage relationships in the bovine MHC region. High recombination frequency between class II subregions. *Immunogenetics*, 27(4), 273-280.
- Andersson, L., Sigurdardóttir, S., Borsch, C., Gustafsson, K., 1991. Evolution of MHC polymorphism: Extensive sharing of polymorphic sequence motifs between human and bovine DRB alleles. *Immunogenetics*, 33(3), 188-193.
- Ando, A., Kawai, J., Maeda, M., Tsuji, K., Trowsdale, J., Inoko, H., 1989 . Mapping and nucleotide sequence of a new HLA class II light chain gene, DQB3. *Immunogenetics*, 30(4), 243-249.
- Anonim, 2017. http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/mhc/view_nomenclature.cgi?bola.drb3
Son erişim tarihi: 10 Ocak 2017.
- Anziani, O. S., Guglielmone, A. A., Zimmermann, G., Vazquez, R., Suarez, V., 2001. Avermectin resistance in *Cooperia pectinata* in cattle in Argentina. *Veterinary Record*, 149(2), 58-59.
- Arnold, A., Horst, S. A., Gardella, T. J., Baba, H., Levine, M. A., Kronenberg, H. M. 1990. Mutation of the signal peptide-encoding region of the preproparathyroid hormone gene in familial isolated hypoparathyroidism. *Journal of Clinical Investigation*, 86(4), 1084.
- Auffray, C., 1985. Molecular models of the interaction between T4 antigen and HLA class II antigens or the LAV virus. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*, 302(8), 287-292.
- Awad, W. S., Nadra-Elwgoud, M. I., El-Sayed, A. A., 2008. Diagnosis and treatment of bovine, ovine and equine dermatophilosis. *Journal of Applied Sciences Research*, 4(4), 367-374.

- Babiuk, S., Horseman, B., Zhang, C., Bickis, M., Kusalik, A., Schook, L. B., Pontarollo, R., 2007. BoLA class I allele diversity and polymorphism in a herd of cattle. *Immunogenetics*, 59(2), 167-176.
- Bahram, S., Bresnahan, M., Geraghty, D. E., Spies, T., 1994. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(14), 6259-6263.
- Baker, C. S., Vant, M. D., Dalebout, M. L., Lento, G. M., O'Brien, S. J., Yuhki, N., 2006. Diversity and duplication of DQB and DRB-like genes of the MHC in baleen whales (suborder: Mysticeti). *Immunogenetics*, 58(4), 283-296.
- Bakır, G., ve Kaygısız, A., 2003. Esmer Irk Sığırlarda Süt Verim Özelliklerine İlişkin Genetik Yönelim Unsurlarının ve Genetik Korelasyonun Tahmini/Estimates of Trend Components and Genetic Correlation of Milk Yield Traits In Brown Swiss Cattle. *Journal of the Faculty of Agriculture*, 34(4).
- Ballingall, K. T., Ellis, S. A., MacHugh, N. D., Archibald, S. D., McKeever, D. J., 2004a. The DY genes of the cattle MHC: expression and comparative analysis of an unusual class II MHC gene pair. *Immunogenetics*, 55(11), 748-755.
- Ballingall, K. T., Luyai, A., McKeever, D. J., 1997. Analysis of genetic diversity at the DQA loci in African cattle: evidence for a BoLA-DQA3 locus. *Immunogenetics*, 46(3), 237-244.
- Ballingall, K. T., Luyai, A., Rowlands, G. J., Sales, J., Musoke, A. J., Morzaria, S. P., McKeever, D. J., 2004b. Bovine leukocyte antigen major histocompatibility complex class II DRB3* 2703 and DRB3* 1501 alleles are associated with variation in levels of protection against *Theileria parva* challenge following immunization with the sporozoite p67 antigen. *Infection and Immunity*, 72(5), 2738-2741.
- Ballingall, K. T., Marasa, B. S., Luyai, A., McKeever, D. J., 1998. Identification of diverse BoLA DQA3 genes consistent with non-allelic sequences. *Animal Genetics*, 29(2), 123-129.
- Ballingall, K. T., McKeever, D. J., 2005. Conservation of promoter, coding and intronic regions of the non-classical MHC class II DYA gene suggests evolution under functional constraints. *Animal Genetics*, 36(3), 237-239.
- Ballingall, K. T., Rocchi, M. S., McKeever, D. J., Wright, F., 2010. Trans-species polymorphism and selection in the MHC class II DRA genes of domestic sheep. *PloS One*, 5(6), e11402.
- Barendse, W., Armitage, S. M., Kossarek, L. M., Shalom, A., Kirkpatrick, B. W., Ryan, A. M., Grosse, W. M., 1994. A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics*, 6(3), 227-235.
- Baschal, E. E., Aly, T. A., Jasinski, J. M., Steck, A. K., Johnson, K. N., Noble, J. A., Eisenbarth, G. S., 2009. The frequent and conserved DR3-B8-A1 extended haplotype confers less diabetes risk than other DR3 haplotypes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 11(s1), 25-30.

- Basler, M., Kirk, C. J., Groettrup, M., 2013. The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Current Opinion in Immunology*, 25(1), 74-80.
- Batu, S., 1962. Türkiye Sığır Irkları ve Sığır Yetiştirme Bilgisi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları*, 41.
- Bauer, K. H., 1927. Homoiotransplantation von Epidermis bei eineiigen Zwillingen. *Beitrag zur Klinischen Chirurgie*, 141(Sept), 442-447.
- Baxter, R., Craigmiles, S. C., Haley, C., Douglas, A. J., Williams, J. L., Glass, E. J., 2009. BoLA-DR peptide binding pockets are fundamental for foot-and-mouth disease virus vaccine design in cattle. *Vaccine*, 28(1), 28-37.
- Baxter, R., Hastings, N., Law, A., Glass, E. J., 2008. A rapid and robust sequence-based genotyping method for BoLA-DRB3 alleles in large numbers of heterozygous cattle. *Animal Genetics*, 39(5), 561-563.
- Becker, J. W., Reeke, G. N., 1985. Three-dimensional structure of beta 2-microglobulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(12), 4225-4229.
- Behl, J. D., Gupta, M., Behl, R., Verma, N. K., 2009b. Genetic polymorphism in the major histocompatibility complex class II DRB3 exon 2 locus in Bos indicus Tharparkar breed of cattle. *Indian Journal of Dairy Science*, 62(3), 196-202.
- Behl, J. D., Verma, N. K., Behl, R., Mukesh, M., Ahlawat, S. P. S., 2007. Characterization of genetic polymorphism of the bovine lymphocyte antigen DRB3. 2 locus in Kankrej cattle (Bos indicus). *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2997-3001.
- Behl, J. D., Verma, N. K., Behl, R., Sodhi, M., 2009a. Genetic variation of the major histocompatibility complex DRB3. 2 locus in the native Bos indicus cattle breeds. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22(11), 1487-1494.
- Behl, J. D., Verma, N. K., Tyagi, N., Mishra, P., Behl, R., Joshi, B. K., 2012. The major histocompatibility complex in bovines: a review. *International Scholarly Research Notices Veterinary Science*, 2012.
- Beja-Pereira, A., Caramelli, D., Lalueza-Fox, C., Vernesi, C., Ferrand, N., Casoli, A., Martini, A., 2006. The origin of European cattle: evidence from modern and ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(21), 8113-8118.
- Belov, K., Deakin, J. E., Papenfuss, A. T., Baker, M. L., Melman, S. D., Siddle, H. V., Wakefield, M. J., 2006. Reconstructing an ancestral mammalian immune supercomplex from a marsupial major histocompatibility complex. *PLoS Biology*, 4(3), e46.
- Benacerraf, B., 1981. Role of MHC gene products in immune regulation. *Science*, 212(4500), 1229-1238.
- Benacerraf, B., McDevitt, H. O., 1972. Histocompatibility-linked immune response genes. *Science*, 175(4019), 273-279.

- Bensaid, A., Young, J. R., Kaushal, A., Teale, A. J., 1991. Pulsed-field gel electrophoresis and its application in the physical analysis of the bovine major histocompatibility complex. *Gene-Mapping Techniques and Applications*. Lawrence B. Schook, CRC Press, ISBN-10: 0824785355.
- Betts, M. J., Russell, R. B., 2003. Amino acid properties and consequences of substitutions. *Bioinformatics for Geneticists*, 317, 289.
- Biek R., Real L.A., 2010. The landscape genetics of infectious disease emergence and spread. *Molecular Ecology*, 19(17): 3513-3531.
- Bishop, M. D., Kappes, S. M., Keele, J. W., Stone, R. T., Sunden, S. L., Hawkins, G. A., Yoo, J., 1994. A genetic linkage map for cattle. *Genetics*, 136(2), 619-639.
- Bjorkman, P. J., Parham, P., 1990. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annual Review Of Biochemistry*, 59(1), 253-288.
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., Wiley, D. C., 1987a. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*, 329(6139), 512-518.
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., Wiley, D. C., 1987b. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, 329, 506-512.
- Bodmer, W. F., 1987. The HLA system: structure and function. *Journal Of Clinical Pathology*, 40(9), 948-958.
- Boettcher, P. J., Hansen, L. B., Ernst, C. A., 1992. Genetic evaluation of Holstein bulls for somatic cells in milk of daughters. *Journal of Dairy Science*, 75(4), 1127-1137.
- Bonner, J. J., 1985. Major histocompatibility complex influences reproductive efficiency: evolutionary implications. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology*. Supplement, 2, 5-11.
- Bovine HapMap Consortium., 2009. Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. *Science*, 324(5926), 528-532.
- Bradley, D. G., MacHugh, D. E., Cunningham, P., Loftus, R. T., 1996. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(10), 5131-5135.
- Braud, V. M., Allan, D. S., O'Callaghan, C. A., Söderström, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., Lanier, L. L., 1998. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*, 391(6669), 795-799.
- Brinkmeyer-Langford, C. L., Childers, C. P., Fritz, K. L., Gustafson-Seabury, A. L., Cothran, M., Raudsepp, T., Skow, L. C., 2009. A high resolution RH map of the bovine major histocompatibility complex. *BioMed Central Genomics*, 10(1), 182.

- Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L., Wiley, D. C., 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*, 364(6432), 33-39.
- Brown, W. C., Brayton, K. A., Styer, C. M., Palmer, G. H., 2003. The hypervariable region of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 (MSP2) contains multiple immunodominant CD4⁺ T lymphocyte epitopes that elicit variant-specific proliferative and IFN- γ responses in MSP2 vaccinates. *The Journal of Immunology*, 170(7), 3790-3798.
- Buitkamp, J., Epplen, J. T., 1996. Modern genome research and DNA diagnostics in domestic animals in the light of classical breeding techniques. *Electrophoresis*, 17(1), 1-11.
- Burke, M. G., Stone, R. T., Muggli-Cockett, N. E., 1991. Nucleotide sequence and Northern analysis of a bovine major histocompatibility class II DR β -like cDNA. *Animal Genetics*, 22(4), 343-352.
- Camarena, Á., Aquino-Galvez, A., Falfán-Valencia, R., Sánchez, G., Montaña, M., Ramos, C., Selman, M., 2010. PSMB8 (LMP7) but not PSMB9 (LMP2) gene polymorphisms are associated to pigeon breeder's hypersensitivity pneumonitis. *Respiratory Medicine*, 104(6), 889-894.
- Cannon, M. J., Pate, J. L., 2003. Expression and regulation of interferon γ -inducible proteasomal subunits LMP7 and LMP10 in the bovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*, 68(4), 1447-1454.
- Cao, K., Hollenbach, J., Shi, X., Shi, W., Chopek, M., Fernández-Viña, M. A., 2001. Analysis of the frequencies of HLA-A, B, and C alleles and haplotypes in the five major ethnic groups of the United States reveals high levels of diversity in these loci and contrasting distribution patterns in these populations. *Human immunology*, 62(9), 1009-1030.
- Carroll, M. C., Duncan Campbell, R., Bentley, D. R., Porter, R. R., 1984. A molecular map of the human major histocompatibility complex class III region linking complement genes C4, C2 and factor B. *Nature*, 307(5948), 237-241.
- Castro, L. F. C., Furlong, R. F., Holland, P. W., 2004. An antecedent of the MHC-linked genomic region in amphioxus. *Immunogenetics*, 55(11), 782-784.
- Chalmers, D. G., Coombs, R. R. A., Gurner, B. W., Dausset, J. (1959). The Mixed Antiglobulin Reaction in the Detection of Human Iso-Antibodies against Leucocytes, Platelets and HeLa Cells. *British Journal of Haematology*, 5(3), 225-231.
- Chaplin, D. D., 2010. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S3-S23.
- Childers, C. P., Newkirk, H. L., Honeycutt, D. A., Ramlachan, N., Muzney, D. M., Sodergren, E., Skow, L. C., 2006. Comparative analysis of the bovine MHC class IIb sequence¹ identifies inversion breakpoints and three unexpected genes. *Animal Genetics*, 37(2), 121-129.

- Childerstone, A. J., Cedillo-Baron, L., Foster-Cuevas, M., Parkhouse, R. M., 1999. Demonstration of bovine CD8⁺ T-cell responses to foot-and-mouth disease virus. *Journal of General Virology*, 80(3), 663-669.
- Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N., Bobryshev, Y. V., 2016. Immune-inflammatory responses in atherosclerosis: Role of an adaptive immunity mainly driven by T and B cells. *Immunobiology*.
- Chu, M. X., Ye, S. C., Qiao, L., Wang, J. X., Feng, T., Huang, D. W., Chen, G. H., 2012. Polymorphism of exon 2 of BoLA-DRB3 gene and its relationship with somatic cell score in Beijing Holstein cows. *Molecular Biology Reports*, 39(3), 2909-2914.
- Codner, G. F., Stear, M. J., Reeve, R., Matthews, L., Ellis, S. A., 2012. Selective forces shaping diversity in the class I region of the major histocompatibility complex in dairy cattle. *Animal Genetics*, 43(3), 239-249.
- Cosson, P., and Bonifacino, J. S., 1992. Role of transmembrane domain interactions in the assembly of class II MHC molecules. *Science*, 258, 659-662.
- Cruvinel, W. D. M., Mesquita Júnior, D., Araújo, J. A. P., Catelan, T. T. T., Souza, A. W. S. D., Silva, N. P. D., Andrade, L. E. C., 2010. Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 50(4), 434-447.
- Cunningham, B. A., and Berggard, I., 1975. Partial amino acid sequence of rabbit beta2-microglobulin. *Science*, 187(4181), 1079-1080.
- Daar, A. S., Fuggle, S. V., Fabre, J. W., Ting, A., Morris, P. J., 1984. The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs. *Transplantation*, 38(3), 287-292.
- Danchin, E., Vitiello, V., Vienne, A., Richard, O., Gouret, P., McDermott, M. F., Pontarotti, P., 2004. The major histocompatibility complex origin. *Immunological Reviews*, 198(1), 216-232.
- Das, D. N., Sri Hari, V. G., Hatkar, D. N., Rengarajan, K., Saravanan, R., Suryanarayana, V. V. S., Murthy, L. K., 2012. Genetic diversity and population genetic analysis of bovine MHC class II DRB3. 2 locus in three Bos indicus cattle breeds of Southern India. *International Journal Of Immunogenetics*, 39(6), 508-519.
- Dausset, J., 1958. Iso-leuko-antibodies. *Acta Haematologica Journal*, 20, 156-166.
- Dausset, J., Nenna, A., Brecy, H., 1954. Leukoagglutinins in chronic idiopathic or symptomatic pancytopenia and in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 9, 696.
- Davies, C. J., Andersson, L., Joosten, I., Mariani, P., Gasbarre, L. C., Hensen, E. J. 1992. Characterization of bovine MHC class II polymorphism using three typing methods: serology, RFLP and IEF. *International Journal of Immunogenetics*, 19(5), 253-262.

- Davies, C. J., Andersson, L., Mikko, S., Ellis, S. A., Hensen, E. J., Lewin, H. A., Russell, G. C., 1997. Nomenclature for factors of the BoLA system, 1996: report of the ISAG BoLA Nomenclature Committee. *Animal Genetics*, 28(3), 159-168.
- Davies, C. J., Andersson, L., Mikko, S., Ellis, S. A., Hensen, E. J., Lewin, H. A., Russell, G. C., 1997. Nomenclature for factors of the BoLA system, 1996: report of the ISAG BoLA Nomenclature Committee. *Animal Genetics*, 28(3), 159-168.
- Davies, C. J., Joosten, I., Andersson, L., Arriens, M. A., Bernoco, D., Bissumbhar, B., Mikko, S., 1994. Polymorphism of bovine MHC class II genes. Joint report of the fifth international bovine lymphocyte antigen (BoLA) Workshop, Interlaken, Switzerland, 1 August 1992. *International Journal of Immunogenetics*, 21(4), 259-289.
- Davies, C. J., Van Der Poel, J. J., Groenen, M. A. M., ve Giphart, M. J., 1992. Identification of really interesting new genes (RING) in the bovine lymphocyte antigen complex. In Proc. 23rd Int. Conf. *Animal Genetics* (p. 31).
- Davis, M. M., Bjorkman, P. J., 1989. A model for T cell receptor and MHC/peptide interaction. In *Mechanisms of Lymphocyte Activation and Immune Regulation II* (pp. 13-16). Springer US.
- De, S., Singh, R. K., and Butchiah, G., 2002. MHC-DRB exon 2 allele polymorphism in Indian river buffalo (*Bubalus bubalis*). *Animal Genetics*, 33(3), 215-219.
- Deakin, J. E., Siddle, H. V., Cross, J. G. R., Belov, K., Graves, J. A. M., 2007. Class I genes have split from the MHC in the tammar wallaby. *Cytogenetic and Genome Research*, 116(3), 205-211.
- DeGaris, P. J., Lean, I. J., 2008. Milk fever in dairy cows: A review of pathophysiology and control principles. *The Veterinary Journal*, 176(1), 58-69.
- Delbecq, S., Hadj-Kaddour, K., Randazzo, S., Kleuskens, J., Schetters, T., Gorenflot, A., ve Précigout, E., 2006. Hydrophobic moieties in recombinant proteins are crucial to generate efficient saponin-based vaccine against Apicomplexan *Babesia divergens*. *Vaccine*, 24(5), 613-621.
- Deng, L. Mariuzza, R. A. (2006, June). Structural basis for recognition of MHC and MHC-like ligands by natural killer cell receptors. In *Seminars in Immunology* (Vol. 18, No. 3, pp. 159-166). Academic Press.
- Dietz, A. B., Cohen, N. D., Timms, L., ve Kehrli, M. E., 1997b. Bovine Lymphocyte Antigen Class II Alleles as Risk Factors for High Somatic Cell Counts in Milk of Lactating Dairy Cows¹. *Journal of Dairy Science*, 80(2), 406-412.
- Dietz, A. B., Dettileux, J. C., Freeman, A. E., Kelley, D. H., Stabel, J. R., ve Kehrli, M. E., 1997a. Genetic Association of Bovine Lymphocyte Antigen DRB3 Alleles with Immunological Traits of Holstein Cattle¹. *Journal of Dairy Science*, 80(2), 400-405.
- Dikiniene, N., Aida, Y., 1995. Cattle cDNA clones encoding MHC class II DQB1 and DQB2 genes. *Immunogenetics*, 42(1), 75-75.

- Doherty, P. C., Zinkernagel, R. M., 1975b. H-2 compatibility is required for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *The Journal Of Experimental Medicine*, 141(2), 502-507.
- Donaldson, P. T. (2004). Genetics of liver disease: immunogenetics and disease pathogenesis. *Gut*, 53(4), 599-608.
- Donia, M., Harbst, K., Van Buuren, M., Kvistborg, P., Lindberg, M. F., Andersen, R., ... & Fagone, P., 2017. Acquired Immune Resistance Follows Complete Tumor Regression without Loss of Target Antigens or IFN γ Signaling. *Cancer Research*, 77(17), 4562-4566.
- Downey, E., Schnabel, R. D., Taylor, J. F., ve Skow, L. C., 2014, August. Identification and mapping of a Bovine MHC classical class I locus missing from the reference assembly. In 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Asas.
- Duan, J., Wainwright, M. S., Comeron, J. M., Saitou, N., Sanders, A. R., Gelernter, J., ve Gejman, P. V., 2003. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Human molecular genetics*, 12(3), 205-216.
- Duangjinda, M., Buayai, D., Pattarajinda, V., Phasuk, Y., Katawatin, S., Vongpralub, T., ve Chaiyotvittayakul, A., 2009. Detection of bovine leukocyte antigen DRB3 alleles as candidate markers for clinical mastitis resistance in Holstein x Zebu. *Journal of Animal Science*, 87(2), 469-476.
- Duangjinda, M., Jindatajak, Y., Tipvong, W., Sriwarothai, J., Pattarajinda, V., Katawatin, S., ve Boonkum, W., 2013. Association of BoLA-DRB3 alleles with tick-borne disease tolerance in dairy cattle in a tropical environment. *Veterinary Parasitology*, 196(3), 314-320.
- Duff, G. C., ve Galyean, M. L., 2007. Board-invited review: recent advances in management of highly stressed, newly received feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, 85(3), 823-840.
- Dustin J. P., 2002. Major Histocompatibility Complex, Encyclopedia of Life Sciences, Macmillan publishers LTD, Nature Publishing Group, University of Utah, Salt Lake City, Utah, USA, Pp. 1-7.
- Edwards, S. V., ve Hedrick, P. W., 1998. Evolution and ecology of MHC molecules: from genomics to sexual selection. *Trends in Ecology ve Evolution*, 13(8), 305-311.
- Eijk, M. V., Beever, J. E., Da, Y., Stewart, J. A., Nicholaides, G. E., Green, C. A., ve Lewin, H. A., 1995. Genetic mapping of BoLA-A, CYP21, DRB3, DYA, and PRL on BTA23. *Mammalian Genome*, 6(2), 151-152.
- Eijk, M. V., Russ, I., ve Lewin, H. A., 1993. Order of bovine DRB3, DYA, and PRL determined by sperm typing. *Mammalian Genome*, 4(2), 113-118.
- Eleuteri, A. M., Kohanski, R. A., Cardozo, C., ve Orlowski, M., 1997. Bovine Spleen Multicatalytic Proteinase Complex (Proteasome) Replacement of X, Y, and Z

- subunits by LMP7, LMP2, and MECL1 and changes in properties and specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 272(18), 11824-11831.
- Ellis, S. A., Bontrop, R. E., Antczak, D. F., Ballingall, K., Davies, C. J., Kaufman, J., Stet, R. J., 2006. ISAG/IUIS-VIC comparative MHC nomenclature committee report, 2005. *Immunogenetics*, 57(12), 953-958.
- Ellis, S. A., Holmes, E. C., Staines, K. A., Smith, K. B., Stear, M. J., McKeever, D. J., Morrison, W. I., 1999. Variation in the number of expressed MHC genes in different cattle class I haplotypes. *Immunogenetics*, 50(5-6), 319-328.
- Ellis, S. A., ve Hammond, J. A., 2014. The functional significance of cattle major histocompatibility complex class I genetic diversity. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2(1), 285-306.
- Elsik, C. G., Tellam, R. L., ve Worley, K. C., 2009. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science*, 324(5926), 522-528.
- Fadista, J., Thomsen, B., Holm, L. E., ve Bendixen, C., 2010. Copy number variation in the bovine genome. *BioMed Central Genomics*, 11(1), 1.
- Feder, J. N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D. A., Basava, A., Hinton, L. M., 1996. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary. *Nature Genetics*, 13, 399-408.
- Fellerhoff, B., Gu, S., Laumbacher, B., Nerlich, A. G., Weiss, E. H., Glas, J., Wank, R., 2011. The LMP7-K allele of the immunoproteasome exhibits reduced transcript stability and predicts high risk of colon cancer. *Cancer Research*, 71(23), 7145-7154.
- Firouzmandi, M., Shoja, J., Barzegari, A., Roshani, E., 2010. Study on the association of BoLA-DRB3. 2 alleles with clinical mastitis in Iranian Holstein and Sarabi (Iranian native) cattle. *African Journal of Biotechnology*, 9(15), 2224-2228.
- Fisher, M. W., Mellor, D. J., 2008. Developing a systematic strategy incorporating ethical, animal welfare and practical principles to guide the genetic improvement of dairy cattle. *New Zealand Veterinary Journal*, 56(3), 100-106.
- Flutter, B., Gao, B., 2004. MHC class I antigen presentation-recently trimmed and well presented. *Cellular and Molecular Immunology Review*, 1(1), 22-30.
- Fogg, M. H., Parsons, K. R., Thomas, L. H., Taylor, G., 2001. Identification of CD4+ T cell epitopes on the fusion (F) and attachment (G) proteins of bovine respiratory syncytial virus (BRSV). *Vaccine*, 19(23), 3226-3240.
- Fraser, D. G., Bailey, E., 1998. Polymorphism and multiple loci for the horse DQA gene. *Immunogenetics*, 47(6), 487-490.
- Freeman, A. R., Meghen, C. M., Machugh, D. E., Loftus, R. T., Achukwi, M. D., Bado, A., Bradley, D. G., 2004. Admixture and diversity in West African cattle populations. *Molecular Ecology*, 13(11), 3477-3487.

- Fries, R., Eggen, A., Womack, J. E., 1993. The bovine genome map. *Mammalian Genome*, 4(8), 405-428.
- Frisch, J. E., 1981. Changes occurring in cattle as a consequence of selection for growth rate in a stressful environment. *The Journal of Agricultural Science*, 96(01), 23-38.
- Gaddum, R. M., Cook, R. S., Furze, J. M., Ellis, S. A., Taylor, G., 2003. Recognition of bovine respiratory syncytial virus proteins by bovine CD8⁺T lymphocytes. *Immunology*, 108(2), 220-229.
- Gaddum, R. M., Cook, R. S., Thomas, L. H., Taylor, G., 1996. Primary cytotoxic T-cell responses to bovine respiratory syncytial virus in calves. *Immunology*, 88(3), 421-427.
- Garcia-Briones, M. M., Russell, G. C., Oliver, R. A., Tami, C., Taboga, O., Carrillo, E., Glass, E. J., 2000. Association of bovine DRB3 alleles with immune response to FMDV peptides and protection against viral challenge. *Vaccine*, 19(9), 1167-1171.
- Garrett, T. P. J., Saper, M. A., Bjorkman, P. J., Strominger, J., Wiley, D. C. 1989. Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature*, 342(6250), 692-696.
- Garrick, D., Ruvinsky, A. (Editörler), 2014. The genetics of cattle. CABI.
- Garrido, F., Romero, I., Aptsiauri, N., Garcia-Lora, A. M., 2016. Generation of MHC class I diversity in primary tumors and selection of the malignant phenotype. *International Journal of Cancer*, 138(2), 271-280.
- Gelhaus, A., Forster, B., 2001. Cattle MHC genes DOA and DOB: sequence polymorphisms and assignments to the class IIb region. *European Journal of Immunogenetics*, 28(3), 429-433.
- Gelhaus, A., Forster, B., Horstmann, R. D., 1999a. Evidence for an additional cattle DQB locus. *Immunogenetics*, 49(10), 879-885.
- Gelhaus, A., Forster, B., Wipperf, C., ve Horstmann, R. D., 1999b. Evidence for an additional cattle DQA locus, BoLA-DQA5. *Immunogenetics*, 49(4), 321-327.
- Geraghty, D. E., Pei, J., Lipsky, B., Hansen, J. A., Taillon-Miller, P., Bronson, S. K., Chaplin, D. D., 1992. Cloning and physical mapping of the HLA class I region spanning the HLA-E-to-HLA-F interval by using yeast artificial chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(7), 2669-2673.
- Geraghty, D. E., Wei, X. H., Orr, H. T., Koller, B. H., 1990. Human leukocyte antigen F (HLA-F). An expressed HLA gene composed of a class I coding sequence linked to a novel transcribed repetitive element. *The Journal of Experimental Medicine*, 171(1), 1-18.
- Gerner, W., Hammer, S. E., Wiesmüller, K. H., Saalmüller, A., 2009. Identification of major histocompatibility complex restriction and anchor residues of foot-and-

- mouth disease virus-derived bovine T-cell epitopes. *Journal of Virology*, 83(9), 4039-4050.
- Gilliespie, B. E., Jayarao, B. M., Dowlen, H. H., Oliver, S. P., 1999. Analysis and frequency of bovine lymphocyte antigen DRB3. 2 alleles in Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, 82(9), 2049-2053.
- Giovambattista, G., Golijow, C. D., Dulout, F. N., Lojo, M. M., 1996. Gene frequencies of DRB3. 2 locus of Argentine Creole cattle. *Animal Genetics*, 27(1), 55-56.
- Giovambattista, G., Takeshima, S. N., Ripoli, M. V., Matsumoto, Y., Franco, L. A. A., Saito, H., Aida, Y., 2013. Characterization of bovine MHC DRB3 diversity in Latin American Creole cattle breeds. *Gene*, 519(1), 150-158.
- Glass, E. J., 2004. Genetic variation and responses to vaccines. *Animal Health Research Reviews*, 5(02), 197-208.
- Glass, E. J., Oliver, R. A., Collen, T., Doel, T. R., Dimarchi, R., Spooner, R. L., 1991. MHC class II restricted recognition of FMDV peptides by bovine T cells. *Immunology*, 74(4), 594.
- Glass, E. J., Oliver, R. A., Russell, G. C., 2000. Duplicated DQ haplotypes increase the complexity of restriction element usage in cattle. *The Journal of Immunology*, 165(1), 134-138.
- Golijow, C. D., 1996. Estudio de la reducción de la variabilidad genética por acción de la selección artificial en poblaciones de Bos taurus. Doktora Tezi. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Spanish.
- Goodfellow, P. N., Jones, E. A., Van Heyningen, V., Solomon, E., Bobrow, M., Miggiano, V., Bodmer, W. F. 1975. The β 2-microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HL-A region. *Nature*, 254(5497), 267-269.
- Gorer, P. A., 1936. The detection of a hereditary antigenic difference in the blood of mice by means of human group A serum. *Journal of Genetics*, 32(1), 17-31.
- Gorer, P. A., Lyman, S., Snell, G. D., 1948. Studies on the genetic and antigenic basis of tumour transplantation. Linkage between a histocompatibility gene and 'fused' in mice. Proceedings of the Royal Society of London B: *Biological Sciences*, 135(881), 499-505.
- Gowane, G. R., Sharma, A. K., Sankar, M., Narayanan, K., Das, B., Subramaniam, S., Pattnaik, B., 2013a. Association of BoLA DRB3 alleles with variability in immune response among the crossbred cattle vaccinated for foot-and-mouth disease (FMD). *Research in Veterinary Science*, 95(1), 156-163.
- Gowane, G. R., Vandre, R. K., Nangre, M., ve Sharma, A., 2013b. Major histocompatibility complex (MHC) of bovines: an insight into infectious disease resistance. *Livestock Research International*, 1(2), 46-57.
- Götherström, A., Anderung, C., Hellborg, L., Elburg, R., Smith, C., Bradley, D. G., Ellegren, H., 2005. Cattle domestication in the Near East was followed by

- hybridization with aurochs bulls in Europe. Proceedings of the Royal Society of London B: *Biological Sciences*, 272(1579), 2345-2351.
- Graham, R. R., Ortmann, W., Rodine, P., Espe, K., Langefeld, C., Lange, E., Gaffney, P. 2007. Specific combinations of HLA-DR2 and DR3 class II haplotypes contribute graded risk for disease susceptibility and autoantibodies in human SLE. *European Journal of Human Genetics*, 15(8), 823-830.
- Green M.R., Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, vol. 1. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
- Groenen, M. A. M., Poel, J. J., Dijkhof, R. J. M., Giphart, M. J., 1989. Cloning of the bovine major histocompatibility complex class II genes. *Animal Genetics*, 20(4), 267-278.
- Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D., Huber, R., 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, 386 (6624), 463.
- Guce, A. I., Mortimer, S. E., Yoon, T., Painter, C. A., Jiang, W., Mellins, E. D., Stern, L. J., 2013. HLA-DO acts as a substrate mimic to inhibit HLA-DM by a competitive mechanism. *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(1), 90-98.
- Guzman, E., Taylor, G., Charleston, B., Skinner, M. A., Ellis, S. A., 2008. An MHC-restricted CD8⁺ T-cell response is induced in cattle by foot-and-mouth disease virus (FMDV) infection and also following vaccination with inactivated FMDV. *Journal of General Virology*, 89(3), 667-675.
- Hall, T., 1997. BioEdit 4.8.
- Hameed K., Sender G., Korwin-Kossakowska A., 2008. An association of BoLA alleles DRB3. 2* 16 and DRB3. 2* 23 with occurrence of mastitis caused by different bacterial species in two herds of dairy cows. *Animal Science Papers and Reports*, 26, 37- 48
- Hassanin, A., Douzery, E. J., 1999. The tribal radiation of the family Bovidae (Artiodactyla) and the evolution of the mitochondrial cytochrome b gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13(2), 227-243.
- Hauptmann, G., Bahram, S., 2004. Genetics of the central MHC. *Current Opinion in Immunology*, 16(5), 668-672.
- Hayes, B. J., Visscher, P. M., McPartlan, H. C., Goddard, M. E., 2003. Novel multilocus measure of linkage disequilibrium to estimate past effective population size. *Genome Research*, 13(4), 635-643.
- He, Y., Xi, D., Leng, J., Qian, T., Jin, D., Chen, T., Deng, W., 2014. Genetic variability of MHC class II DQB exon 2 alleles in yak (*Bos grunniens*). *Molecular Biology Reports*, 41(4), 2199-2206.

- Hedrick, P. W., Parker, K. M., Gutiérrez-Espeleta, G. A., Rattink, A., Lievers, K., 2000. Major histocompatibility complex variation in the Arabian oryx. *Evolution*, 54(6), 2145-2151.
- Heijne, G., Gavel, Y., 1988. Topogenic signals in integral membrane proteins. *European Journal of Biochemistry*, 174(4), 671-678.
- Herberg, J. A., Beck, S., Trowsdale, J., 1998. TAPASIN, DAXX, RGL2, HKE2 and four new genes (BING 1, 3 to 5) form a dense cluster at the centromeric end of the MHC. *Journal of Molecular Biology*, 277(4), 839-857.
- Heringstad, B., Klemetsdal, G., ve Ruane, J., 2000. Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livestock Production Science*, 64(2), 95-106.
- Hess, M., Goldammer, T., Gelhaus, A., Ried, K., Rappold, G., Eggen, A., Horstmann, R. D., 1999. Physical assignment of the bovine MHC class IIa and class IIb genes. *Cytogenetic and Genome Research*, 85(3-4), 244-247.
- Hill, A. V., 1998. The immunogenetics of human infectious diseases. *Annual Review of Immunology*, 16(1), 593-617.
- Hirsch, F., Germana, S., Gustafsson, K., Pratt, K., Sachs, D. H., Leguern, C., 1992. Structure and expression of class II alpha genes in miniature swine. *The Journal of Immunology*, 149(3), 841-846.
- Hoang-Xuan, M., Charron, D., Zilber, M. T., Levy, D., 1982a. Biochemical characterization of class II bovine major histocompatibility complex antigens using cross-species reactive antibodies. *Immunogenetics*, 15(6), 621-624.
- Hoang-Xuan, M., Leveziel, H., Zilber, M. T., Parodi, A. L., Lévy, D., 1982b. Immunochemical characterization of major histocompatibility antigens in cattle. *Immunogenetics*, 15(2), 207-211.
- Hoffmann, G., Horchner, F., Schein, E., Gerber, H. G., 1971. Saisonales Auftreten von Zecken und Piroplasmen bei Haustieren in den asiatischen Provinzen der Türkei. *Berliner Munchener Tierarztl Wochenschr.*
- Holland, B. P., Burciaga-Robles L. O., 2010. Effect of bovine respiratory disease during preconditioning on subsequent feedlot performance, carcass characteristics, and beef attributes. *Journal of Animal Science*, 88(7): 2486-2499.
- Holmes, E. C., Roberts, A. F., Staines, K. A., Ellis, S. A., 2003. Evolution of major histocompatibility complex class I genes in Cetartiodactyls. *Immunogenetics*, 55(4), 193-202.
- Horton, R., Gibson, R., Coghill, P., Miretti, M., Allcock, R. J., Almeida, J., Hart, E., 2008. Variation analysis and gene annotation of eight MHC haplotypes: the MHC Haplotype Project. *Immunogenetics*, 60(1), 1-18.

<http://pfam.sanger.ac.uk>

<http://services.uniprot.org/blast/blast-20100729-0748405592>

http://web.expasy.org/protparam/?_ga=1.123696777.343084052.1490646496

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>

<http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/BoLA/>

<http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/group/BoLA>

<http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/group/BoLA>, 10 Şubat 2017

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Chromosome?r=6

http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html

<http://www.tuik.gov.tr/>

<https://biruni.tuik.gov.tr/hayvancilikapp/hayvancilik.zul>

<https://www.idtdna.com/calc/analyser>.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=BoLA-DMA-RefSeq>

Hughes, A. L., 1995. Origin and evolution of HLA class I pseudogenes. *Molecular Biology and Evolution*, 12(2), 247-258.

Hughes, A. L., Nei, M., 1990. Evolutionary relationships of class II major-histocompatibility-complex genes in mammals. *Molecular Biology and Evolution*, 7(6), 491-514.

Hume, D. M., Merrill, J. P., Miller, B. F., Thorn, G. W., 1955. Experiences with renal homotransplantation in the human: report of nine cases. *Journal of Clinical Investigation*, 34(2), 327.

Hurt, P., Walter, L., Sudbrak, R., Klages, S., Müller, I., Shiina, T., Himmelbauer, H., 2004. The genomic sequence and comparative analysis of the rat major histocompatibility complex. *Genome Research*, 14(4), 631-639.

Huson, D. H., Bryant, D., 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23(2), 254-267.

Immuno Polymorphism Database-<http://www.ebi.ac.uk/ipd/>.

Jakobsen, J. H., Madsen, P., Jensen, J., Pedersen, J., Christensen, L. G., Sorensen, D. A., 2002. Genetic parameters for milk production and persistency for Danish Holsteins estimated in random regression models using REML. *Journal of Dairy Science*, 85(6), 1607-1616.

Janeway Jr, C. A., Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20(1), 197-216.

- Janeway, C., Murphy, K. P., Travers, P., Walport, M., 2008. Janeway's immunobiology. Garland Science. *New York and London*, 144.
- Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A., Amigorena, S., 2012. Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*, 12(8), 557-569.
- Jovanovic S., Savic M., Zivkovic D., 2009. Genetic Variation In Disease Resistance Among Farm Animals, Serbia, *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25 (5-6), p 339-347.
- Juliarena, M. A., Poli, M., Ceriani, C., Sala, L., Rodríguez, E., Gutierrez, S., Esteban, E. N., 2009. Antibody response against three widespread bovine viruses is not impaired in Holstein cattle carrying bovine leukocyte antigen DRB3. 2 alleles associated with bovine leukemia virus resistance. *Journal of Dairy Science*, 92(1), 375-381.
- Juliarena, M. A., Poli, M., Sala, L., Ceriani, C., Gutierrez, S., Dolcini, G., Esteban, E. N., 2008. Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3. 2 gene. *Animal Genetics*, 39(4), 432-438.
- Käll, L., Krogh, A., ve Sonnhammer, E. L., 2004. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *Journal of Molecular Biology*, 338(5), 1027-1036.
- Kappes, D., Strominger, J. L., 1988. Human class II major histocompatibility complex genes and proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 57(1), 991-1028.
- Karimuribo, E. D., Morrison, L. J., Black, A., Turner, C. M. R., Kambarage, D. M., Ballingall, K. T., 2011. Analysis of host genetic factors influencing African trypanosome species infection in a cohort of Tanzanian *Bos indicus* cattle. *Veterinary Parasitology*, 179(1), 35-42.
- Kaufman, J., Milne, S., Göbel, T. W., Walker, B. A., Jacob, J. P., Auffray, C., Beck, S., 1999. The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. *Nature*, 401(6756), 923-925.
- Kaushansky, N., Altmann, D. M., Ascough, S., David, C. S., Lassmann, H., Ben-Nun, A., 2009. HLA-DQB1* 0602 determines disease susceptibility in a new “humanized” multiple sclerosis model in HLA-DR15 (DRB1* 1501; DQB1* 0602) transgenic mice. *The Journal of Immunology*, 183(5), 3531-3541.
- Kelley, J., de Bono, B., ve Trowsdale, J., 2005. IRIS: a database surveying known human immune system genes. *Genomics*, 85(4), 503-511.
- Kelm, S. C., Dettilleux, J. C., Freeman, A. E., Kehrli, M. E., Dietz, A. B., Fox, L. K., Kelley, D. H., 1997. Genetic Association Between Parameters of Innate Immunity and Measures of Mastitis in Periparturient Holstein Cattle¹. *Journal of Dairy Science*, 80(8), 1767-1775.
- Kinseth, M. A., Jia, Z., Rahmatpanah, F., Sawyers, A., Sutton, M., Wang-Rodriguez, J., McGuire, K. L., 2014. Expression differences between African American and

- Caucasian prostate cancer tissue reveals that stroma is the site of aggressive changes. *International Journal of Cancer*, 134(1), 81-91.
- Klein, J., 1977. Evolution and function of the major histocompatibility system: Facts and speculations. In *The major histocompatibility system in man and animals* (pp. 339-378). Springer Berlin Heidelberg.
- Klein, J., 1986. Natural history of the major histocompatibility complex. Wiley.
- Klein, J., ve Sato, A., 1998. Birth of the major histocompatibility complex. *Scandinavian Journal of Immunology*, 47(3), 199.
- Koller, B. H., Geraghty, D. E., Shimizu, Y. O. J. I., DeMars, R. O. B. E. R. T., ve Orr, H. T., 1988. HLA-E. A novel HLA class I gene expressed in resting T lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 141(3), 897-904.
- Konnai, S., Usui, T., Ikeda, M., Kohara, J., Hirata, T. I., Okada, K., Onuma, M., 2006. Tumor necrosis factor-alpha genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection. *Microbes and Infection*, 8(8), 2163-2171.
- Kulberg, S., Heringstad, B., Guttersrud, O. A., Olsaker, I., 2007. Study on the association of BoLA-DRB3. 2 alleles with clinical mastitis in Norwegian Red cows. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 124(4), 201-207.
- Kumánovics, A., Takada, T., Lindahl, K. F., 2003. Genomic organization of the mammalian MHC. *Annual Review of Immunology*, 21(1), 629-657.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B., Nei, M., 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, 17(12), 1244-1245.
- Kumlu S. Hayvan ıslahı. Türkiye Damızlık Sığır Yetiştiriciliği Merkez Birliği Yayınları, Ankara, 2003.
- Kuttler, K. L., 1988. World-wide impact of babesiosis. *Babesiosis of Domestic Animals and Man*, 1-22.
- Kyte, J., Doolittle, R. F., 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105-132.
- Ledwidge, S. A., Mallard, B. A., Gibson, J. P., Jansen, G. B., Jiang, Z. H., 2001. Multi-primer target PCR for rapid identification of bovine DRB3 alleles. *Animal Genetics*, 32(4), 219-221.
- Lee, B. Y., Hur, T. Y., Jung, Y. H., Kim, H., 2012. Identification of BoLA-DRB3. 2 alleles in Korean native cattle (Hanwoo) and Holstein populations using a next generation sequencer. *Animal Genetics*, 43(4), 438-441.
- Lei, W., Liang, Q., Jing, L., Wang, C., Wu, X., He, H., 2012. BoLA-DRB3 gene polymorphism and FMD resistance or susceptibility in Wanbei cattle. *Molecular Biology Reports*, 39(9), 9203-9209.

- Lewin, H. A., 1996. Genetic organization, polymorphism, and function of the bovine major histocompatibility complex. *The Major Histocompatibility Complex Region of Domestic Animal Species*, 65-98.
- Lewin, H. A., Bernoco, D., 1986. Evidence for BoLA-linked resistance and susceptibility to subclinical progression of bovine leukaemia virus infection. *Animal Genetics*, 17(3), 197-207.
- Lewin, H. A., Russell, G. C., Glass, E. J., 1999. Comparative organization and function of the major histocompatibility complex of domesticated cattle. *Immunological Reviews*, 167(1), 145-158.
- Li, A. Y., Davey, R. B., Miller, R. J., George, J. E., 2005. Mode of inheritance of amitraz resistance in a Brazilian strain of the southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental ve Applied Acarology*, 37(3-4), 183-198.
- Liljedahl, M., Kuwana, T., Fung-Leung, W. P., Jackson, M. R., Peterson, P. A., Karlsson, L., 1996. HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *The EMBO Journal*, 15(18), 4817.
- Lindberg, P. G., Andersson, L., 1988. Close association between DNA polymorphism of bovine major histocompatibility complex class I genes and serological BoLA-A specificities. *Animal Genetics*, 19(3), 245-255.
- Little, C. C., Tyzzer, E. E., 1916. Further experimental studies on the inheritance of susceptibility to a transplantable tumor, carcinoma (JWA) of the Japanese waltzing mouse. *The Journal of Medical Research*, 33(3), 393.
- Loftus, R. T., MacHugh, D. E., Bradley, D. G., Sharp, P. M., Cunningham, P., 1994. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(7), 2757-2761.
- Lund, T., Miglior, F., Dekkers, J. C. M., Burnside, E. B., 1994. Genetic relationships between clinical mastitis, somatic cell count, and udder conformation in Danish Holsteins. *Livestock Production Science*, 39(3), 243-251.
- Luttinen, A., Juga, J., 1997. Genetic relationships between milk yield, somatic cell count, mastitis, milkability and leakage in Finnish dairy cattle population. *Interbull Bulletin*, (15), 78.
- Lützelshwab, C. M., Forletti, A., Cepeda, R., Esteban, E. N., Confalonieri, O., Gutiérrez, S. E., 2016. Co-infection with *Mycobacterium bovis* does not alter the response to bovine leukemia virus in BoLA DRB3* 0902, genetically resistant cattle. *Research in Veterinary Science*, 109, 10-16.
- Machado, M. A., Nascimento, C. S., Martinez, M. L., Silva, M. V. G. B., Campos, A. L., Teodoro, R. L., Guimarães, S. E. F., 2005. Association of BoLA-DRB3. 2 locus with bovine milk production in Gir breed. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57(3), 380-389.

- MacHugh, D. E., Loftus, R. T., Cunningham, P., ve Bradley, D. G., 1998. Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. *Animal Genetics*, 29(5), 333-340.
- Maillard, J. C., Berthier, D., Chantal, I., Thevenon, S., Sidibé, I., Stachurski, F., Elsen, J. M., 2003. Selection assisted by a BoLA-DR/DQ haplotype against susceptibility to bovine dermatophilosis. *Genetics Selection Evolution*, 35, S193-S200.
- Maillard, J. C., Chantal, I., Berthier, D., 2001. Sequencing of four new BoLA-DRB3 and six new BoLA-DQB alleles. *Animal Genetics*, 32(1), 44-46.
- Maillard, J. C., Martinez, D., Bensaid, A., 1996. An Amino Acid Sequence Coded by the Exon 2 of the BoLA DRB3 Gene Associated with a BoLA Class I Specificity Constitutes a Likely Genetic Marker of Resistance to Dermatophilosis in Brahman Zebu Cattle of Martinique (FWI) a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 791(1), 185-197.
- Maillard, J. C., Renard, C., Chardon, P., Bensaid, A., 1999. Characterization of 18 new BoLA-DRB3 alleles. *Animal Genetics*, 30(3), 200-203.
- Mallard, B. A., Leslie, K. E., Dekkers, J. C. M., Hedge, R., Bauman, M., Stear, M. J., 1995. Differences in bovine lymphocyte antigen associations between immune responsiveness and risk of disease following intramammary infection with *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Science*, 78(9), 1937-1944.
- Mann, A. J., Abraham, L. J., Cameron, P. U., Robinson, W., Giphart, M. J., Dawkins, R. L., 1993. The caprine MHC contains DYA genes. *Immunogenetics*, 37(4), 292-295.
- Mannen, H., Kohno, M., Nagata, Y., Tsuji, S., Bradley, D. G., Yeo, J. S., Amano, T., 2004. Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in North Eastern Asian cattle. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32(2), 539-544.
- Marello, K. L., Gallagher, A., McKeever, D. J., Spooner, R. L., Russel, G. C., 1995. Expression of multiple DQB genes in *Bos indicus* cattle. *Animal Genetics*, 26(5), 345-349.
- Marello, K. L., Gallagher, A., McKeever, D. J., Spooner, R. L., Russel, G. C., 1995. Expression of multiple DQB genes in *Bos indicus* cattle. *Animal Genetics*, 26(5), 345-349.
- Mason, I. L., 1969. A world dictionary of livestock breeds, types and varieties. Technical Communications. *Commonwealth Bureau of Animal Breeding and Genetics*, (8).
- Matzaraki, V., Kumar, V., Wijmenga, C., Zhernakova, A. (2017). The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases. *Genome Biology*, 18(1), 76.
- Mazerolles, F., Amblard, F., Lumbroso, C., Lecomte, O., van de Moortele, P. F., Barbat, C., Fischer, A., 1990. Regulation of T helper-B lymphocyte adhesion through CD4-HLA class II interaction. *European Journal of Immunology*, 20(3), 637-644.

- McKeever, D. J., Taracha, E. L. N., Morrison, W. I., Musoke, A. J., Morzaria, S. P., 1999. Protective immune mechanisms against *Theileria parva*: evolution of vaccine development strategies. *Parasitology Today*, 15(7), 263-267.
- McMaster, M. T., Librach, C. L., Zhou, Y., Lim, K. H., Janatpour, M. J., DeMars, R., Fisher, S. J., 1995. Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *The Journal of Immunology*, 154(8), 3771-3778.
- Mehra, N. K., Kaur, G., 2003. MHC-based vaccination approaches: progress and perspectives. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 5(07), 1-17.
- Mejdell, C. M., Lie, O., Solbu, H., Arnet, E. F., Spooner, R. L., 1994. Association of major histocompatibility complex antigens (BOLA-A) with AI bull progeny test results for mastitis, ketosis and fertility in Norwegian Cattle. *Animal Genetics*, 25(2), 99-104.
- Miltiadou, D., Law, A. S., Russell, G. C., 2003. Establishment of a sequence-based typing system for BoLA-DRB3 exon 2. *Tissue Antigens*, 62(1), 55-65.
- Miretti, M. M., Ferro, J. A., Lara, M. A., Contel, E. P. B., 2001. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) in exon 2 of the BoLA-DRB3 gene in South American cattle. *Biochemical Genetics*, 39(9), 311-324.
- Miyasaka, T., Takeshima, S. N., Jimba, M., Matsumoto, Y., Kobayashi, N., Matsuhashi, T., Aida, Y., 2013. Identification of bovine leukocyte antigen class II haplotypes associated with variations in bovine leukemia virus proviral load in Japanese Black cattle. *Tissue Antigens*, 81(2), 72-82.
- Miyasaka, T., Takeshima, S. N., Matsumoto, Y., Kobayashi, N., Matsuhashi, T., Miyazaki, Y., Aida, Y., 2011. The diversity of bovine MHC class II DRB3 and DQA1 alleles in different herds of Japanese Black and Holstein cattle in Japan. *Gene*, 472(1), 42-49.
- Miyasaka, T., Takeshima, S. N., Sentsui, H., Aida, Y., 2012. Identification and diversity of bovine major histocompatibility complex class II haplotypes in Japanese Black and Holstein cattle in Japan. *Journal of Dairy Science*, 95(1), 420-431.
- Miyauchi, T., Kanekura, T., Yamaoka, A., Ozawa, M., Miyazawa, S., Muramatsu, T., 1990. Basigin, a new, broadly distributed member of the immunoglobulin superfamily, has strong homology with both the immunoglobulin V domain and the β -chain of major histocompatibility complex class II antigen. *Journal of Biochemistry*, 107(2), 316-323.
- Mohammadi, A., Nassiry, M. R., Mosafer, J., Mohammadabadi, M. R., ve Sulimova, G. E., 2009. Distribution of BoLA-DRB3 allelic frequencies and identification of a new allele in the Iranian cattle breed Sistani (*Bos indicus*). *Russian Journal of Genetics*, 45(2), 198-202.
- Morooka, A., Asahina, M., Kohda, C., Tajima, S., Niimi, M., Nishino, Y., ... ve Aida, Y., 1995. Nucleotide sequence and the molecular evolution of a new A2 gene in the DQ subregion of the bovine major histocompatibility complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 212(1), 110-117.

- Mosafer, J., Nassiry, M. R., 2005. Identification of bovine lymphocyte antigen DRB3. 2 alleles in Iranian Golpayegani cattle by DNA test. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 18(12), 1691.
- Muggli-Cockett, N. E., Stone, R. T., 1989. Partial nucleotide sequence of a bovine major histocompatibility class II DR β -like gene. *Animal Genetics*, 20(s1), 361-370.
- Muggli-Cockett, N. E., Stone, R., 1991. Restriction fragment length polymorphisms in bovine major histocompatibility complex class II β -chain genes using bovine exon-containing hybridization probes. *Animal Genetics*, 22(2), 123-136.
- Mullen, G. R., Durden, L. A. (Editörler.) , 2009. Medical and veterinary entomology. Academic press.
- Mungall, A. J., Palmer, S. A., Sims, S. K., Edwards, C. A., Ashurst, J. L., Wilming, L., Gilbert, J. G. R., 2003. The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature*, 425(6960), 805-811.
- Murphy, K., Weaver, C., 2016. Janeway's immunobiology. Garland Science.
- 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), 975-981.
- Nassiry, M. R., Shahroodi, F. E., Mosafer, J., Mohammadi, A., Manshad, E., Ghazanfari, S., Sulimova, G. E., 2005. Analysis and frequency of bovine lymphocyte antigen (BoLA-DRB3) alleles in Iranian Holstein cattle. *Russian Journal of Genetics*, 41(6), 664-668.
- Nelsen Jr, D. A., 2002. Gluten-sensitive enteropathy (celiac disease): more common than you think. *American Family Physician*, 66(12), 2259-2266.
- Newman, M. J., Truax, R. E., French, D. D., Dietrich, M. A., Franke, D., ve Stear, M. J., 1996. Evidence for genetic control of vaccine-induced antibody responses in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 50(1-2), 43-54.
- Niimi, M., Nakai, Y., ve Aida, Y., 1995. Nucleotide sequences and the molecular evolution of the DMA and DMB genes of the bovine major histocompatibility complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 217(2), 522-528.
- Nishino, Y., Tajima, S., Aida, Y., 1995. Cattle cDNA clone encoding a new allele of the MHC class II DQA1 gene. *Immunogenetics*, 42(4), 306-307.
- Norimine, J., Brown, W. C., 2005. Intrahaplotype and interhaplotype pairing of bovine leukocyte antigen DQA and DQB molecules generate functional DQ molecules important for priming CD4⁺ T-lymphocyte responses. *Immunogenetics*, 57(10), 750-762.
- Norimine, J., Mosqueda, J., Palmer, G. H., Lewin, H. A., Brown, W. C., 2004. Conservation of Babesia bovis small heat shock protein (Hsp20) among strains and definition of T helper cell epitopes recognized by cattle with diverse major

- histocompatibility complex class II haplotypes. *Infection and Immunity*, 72(2), 1096-1106.
- O'Connor, S. L., Blasky, A. J., Pendley, C. J., Becker, E. A., Wiseman, R. W., Karl, J. A., O'Connor, D. H., 2007. Comprehensive characterization of MHC class II haplotypes in Mauritian cynomolgus macaques. *Immunogenetics*, 59(6), 449-462.
- Obexer-Ruff, G., Joosten, I., Schwaiger, F. W., 1996. The caprine major histocompatibility complex. *The Major Histocompatibility Complex Region of Domestic Animal Species*, 99-120.
- O'Callaghan, C. A., Bell, J. I., 1998. Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. *Immunological Reviews*, 163(1), 129-138.
- Ohta, Y., McKinney, E. C., Criscitiello, M. F., Flajnik, M. F., 2002. Proteasome, transporter associated with antigen processing, and class I genes in the nurse shark *Ginglymostoma cirratum*: evidence for a stable class I region and MHC haplotype lineages. *The Journal of Immunology*, 168(2), 771-781.
- Oprzadek, J., Sender, G., Pawlik, A., Lukaszewicz, M., 2015. Locus BoLA-DRB3 is just an ordinary site of the polygene when explaining genetic variance of somatic cell count and milk yield. *Journal of Dairy Research*, 82(04), 449-452.
- Oprządek, J., Urtnowski, G. S., 2012. Frequency of BoLA-DRB3 alleles in Polish Holstein-Friesian cattle. *Animal Science Papers and Reports*, 30(2), 91-101.
- Oprzadek, J., Urtnowski, G. S., Sender, G., Pawlik, A., Łukaszewicz, M., 2012. Frequency of BoLA-DRB3 alleles in Polish Holstein-Friesian cattle. *Animal Science Papers and Reports*, 30(2), 91-101.
- Ovsyannikova, I. G., Pankratz, V. S., Vierkant, R. A., Jacobson, R. M., Poland, G. A., 2006. Human leukocyte antigen haplotypes in the genetic control of immune response to measles-mumps-rubella vaccine. *Journal of Infectious Diseases*, 193(5), 655-663.
- Özhan, M., Tüzemen, N., ve Yanar, M., 2001. Büyükbaş Hayvan Yetiştirme. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Ders notu Yayın, (134).
- Painter, C. A., Negroni, M. P., Kellersberger, K. A., Zavala-Ruiz, Z., Evans, J. E., Stern, L. J., 2011. Conformational lability in the class II MHC 310 helix and adjacent extended strand dictate HLA-DM susceptibility and peptide exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(48), 19329-19334.
- Park, C., Frank, M. T., Lewin, H. A., 1999. Fine-mapping of a region of variation in recombination rate on BTA23 to the D23S22–D23S23 interval using sperm typing and meiotic breakpoint analysis. *Genomics*, 59(2), 143-149.
- Park, C., Russ, I., Da, Y., Lewin, H. A., 1995. Genetic mapping of F13A to BTA23 by sperm typing: difference in recombination rate between bulls in the DYA-PRL interval. *Genomics*, 27(1), 113-118.

- Park, Y. H., Joo, Y. S., Park, J. Y., San Moon, J., Kim, S. H., Kwon, N. H., Davies, C. J., 2004. Characterization of lymphocyte subpopulations and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis-resistant and susceptible cows. *Journal of Veterinary Science*, 5(1), 29-39.
- Pashmi, M., Qanbari, S., Ghorashi, S. A., Sharifi, A. R., Simianer, H., 2009. Analysis of relationship between bovine lymphocyte antigen DRB3. 2 alleles, somatic cell count and milk traits in Iranian Holstein population. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 126(4), 296-303.
- Paswan, C., Bhushan, B., Patra, B. N., Kumar, P., Sharma, A., Dandapat, S., Dutt, T., 2005. Characterization of MHC DRB3. 2 alleles of crossbred cattle by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 18, 1226-1230.
- Pendell, D. L., Schroeder, T. C., Leatherman, J., Alward, G. S., 2007. Summary of a regional economic impact of a hypothetical foot-and-mouth disease outbreak in southwestern Kansas, pp. In *Livestock and Wildlife Disease Report*, edited by D. O. A. A. R. ECONOMICS. Colorado State University, Fort Collins, CO.
- Penn, D. J., Potts, W. K., 1999. The evolution of mating preferences and major histocompatibility complex genes. *The American Naturalist*, 153(2), 145-164.
- Pilgrim, G. E., 1947. The evolution of the buffaloes, oxen, sheep and goats. *Journal of the Linnean Society of London, Zoology*, 41(279), 272-286.
- Poel, J. J., Groenen, M. A., Dijkhof, R. J., Ruyter, D., Giphart, M. J., 1990. The nucleotide sequence of the bovine MHC class II alpha genes: DRA, DQA, and DYA. *Immunogenetics*, 31(1), 29-36.
- Pos, W., Sethi, D. K., Call, M. J., Schulze, M. S. E., Anders, A. K., Pyrdol, J., Wucherpfennig, K. W., 2012. Crystal structure of the HLA-DM-HLA-DR1 complex defines mechanisms for rapid peptide selection. *Cell*, 151(7), 1557-1568.
- Ramírez, N. F., Montoya, A., Cerón-Muñoz, M. F., Villar, D., Palacio, L. G., 2014. Association of BoLA-DRB3 and TLR4 alleles with subclinical mastitis in cattle from Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 27(1), 18-28.
- Rastislav, M., Mangesh, B., 2012. BoLA-DRB3 exon 2 mutations associated with paratuberculosis in cattle. *The Veterinary Journal*, 192(3), 517-519.
- Ratcliffe, M. J. (2016). *Encyclopedia of Immunobiology*. Academic Press.
- Rhodes, D. A., Stammers, M., Malcherek, G., Beck, S., ve Trowsdale, J., 2001. The cluster of BTN genes in the extended major histocompatibility complex. *Genomics*, 71(3), 351-362.
- Rhodes, D. A., Trowsdale, J., 1998. Genetics and molecular genetics of the MHC. *Reviews in Immunogenetics*, 1(1), 21-31.

- Ripoli, M. V., Liron, J. P., De Luca, J. C., Rojas, F., Dulout, F. N., Giovambattista, G., 2004b. Gene frequency distribution of the BoLA-DRB3 locus in Saavedreno Creole dairy cattle. *Biochemical Genetics*, 42(7-8), 231-240.
- Ripoli, M. V., Peral-García, P., Dulout, F. N., Giovambattista, G., 2004a. Polymorphism in the bovine BOLA-DRB3 upstream regulatory regions detected through PCR-SSCP and DNA sequencing. *Gene*, 339, 71-78.
- Rivett, A. J., 1993. Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochemical Journal*, 291(Pt 1), 1.
- Robin, E. D., Wong, R., 1988. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *Journal of Cellular Physiology*, 136(3), 507-513.
- Robinson, J., Halliwell, J. A., McWilliam, H., Lopez, R., Marsh, S. G., 2012. IPD—the immuno polymorphism database. *Nucleic Acids Research*, gks1140.
- Robinson, J., Halliwell, J. A., McWilliam, H., Lopez, R., Parham, P., Marsh, S. G., 2013. The imgt/hla database. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D1222-D1227.
- Robinson, J., Waller, M. J., Parham, P., de Groot, N., Bontrop, R., Kennedy, L. J., Marsh, S. G., 2003. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Research*, 31(1), 311-314.
- Rogers, G. W., Banos, G., Nielsen, U. S., Philipsson, J., 1998. Genetic correlations among somatic cell scores, productive life, and type traits from the United States and udder health measures from Denmark and Sweden. *Journal of Dairy Science*, 81(5), 1445-1453.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X., Rozas, R., 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19(18), 2496-2497.
- Ruff, J. S., Nelson, A. C., Kubinak, J. L., Potts, W. K., 2012. MHC signaling during social communication. *In Self and nonself*, (pp. 290-313). Springer US.
- Rupp, R., Hernandez, A., Mallard, B. A., 2007. Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3. 2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 90(2), 1029-1038.
- Russel, G. C., Mareello, K. L., Gallagher, A., McKeever, D. J., Spooner, R. L., 1994. Amplification and sequencing of expressed DRB second exons from *Bos indicus*. *Immunogenetics*, 39(6), 432-436.
- Russell, G. C., 2000. Sequence duplication at the 3' end of BoLA-DQB genes suggests multiple allelic lineages. *Immunogenetics*, 52(1-2), 101-106.
- Russell, G. C., Davies, C. J., Andersson, L., Mikko, S., Ellis, S. A., Hensen, E. J., Van der Poel, J. J., 1997. BoLA class II nucleotide sequences, 1996: report of the ISAG BoLA Nomenclature Committee. *Animal Genetics*, 28(3), 169-180.

- Russell, G. C., Gallagher, A., Craigmile, S., Glass, E. J., 1997. Characterization of cattle cDNA sequences from two DQA loci. *Immunogenetics*, 45(6), 455-458.
- Ruzina, M. N., Shtyfurko, T. A., Mohammadabadi, M. R., Gendzhieva, O. B., Tsedev, T., Sulimova, G. E., 2010. Polymorphism of the BoLA-DRB3 gene in the Mongolian, Kalmyk, and Yakut cattle breeds. *Russian Journal of Genetics*, 46(4), 456-463.
- Sá, A. L. A., Leal, V. S. G., Schneider, M. P. C., Ohashi, O. M., Santos, E. J. M., Riggs, P. K., Skow, L. C., 2015. Description of bovine major histocompatibility complex class IIa haplotypes using parthenogenetic embryo-derived cells. *Animal Genetics*, 46(3), 325-328.
- Salak-Johnson, J. L., McGlone, J. J., 2007. Making sense of apparently conflicting data: Stress and immunity in swine and cattle. *Journal of Animal Science*, 85(13_suppl), E81-E88.
- Saper, M. A., Bjorkman, P., Wiley, D. C., 1991. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 219(2), 277-319.
- Sato, A., Figueroa, F., Murray, B. W., Málaga-Trillo, E., Zaleska-Rutczynska, Z., Sülthmann, H., Klein, J., 2000. Nonlinkage of major histocompatibility complex class I and class II loci in bony fishes. *Immunogenetics*, 51(2), 108-116.
- Scherf, B., 2000. World Watch List of Domestic Animal Diversity (No. Ed. 3). Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO), Rome.
- Schmidt, S. V., Nino-Castro, A. C., Schultze, J. L. (2012). Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation. *Frontiers in immunology*, 3.
- Schneider, P. M., Carroll, M. C., Alper, C. A., Rittner, C., Whitehead, A. S., Yunis, E. J., Colten, H. R., 1986. Polymorphism of the human complement C4 and steroid 21-hydroxylase genes. Restriction fragment length polymorphisms revealing structural deletions, homoduplications, and size variants. *Journal of Clinical Investigation*, 78(3), 650.
- Schrider, D. R., Hahn, M. W., 2010. Gene copy-number polymorphism in nature. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 277(1698), 3213-3221.
- Schwab, A. E., Geary, T. G., Baillargeon, P., Schwab, A. J., Fecteau, G., 2009. Association of BoLA DRB3 and DQA1 alleles with susceptibility to *Neospora caninum* and reproductive outcome in Quebec Holstein cattle. *Veterinary Parasitology*, 165(1), 136-140.
- Schwaiger, F. W., Epplen, J. T., 1995. Exonic MHC-DRB Polymorphisms and Intronic Simple Repeat Sequences: Janus' Faces of DNA Sequence Evolution. *Immunological Reviews*, 143(1), 199-224.
- Schwaiger, F. W., Maddox, J., Ballingall, K., Buitkamp, J., Crawford, A. M., Dutia, B. M., Rhind, S. M., 1996. The ovine major histocompatibility complex. *The Major Histocompatibility Complex Region of Domestic Animal Species*, 121-176.

- Schwaiger, F. W., Weyers, E., Buitkamp, J., Ede, A. J., Crawford, A., Epplen, J. T., 1994. Interdependent MHC-DRB exon-plus-intron evolution in artiodactyls. *Molecular Biology and Evolution*, 11(2), 239-249.
- Scott, P. C., Choi, C. L., Brandon, M. R., 1987. Genetic organization of the ovine MHC class II region. *Immunogenetics*, 25(2), 116-122.
- Scott, P. C., Gogolin-Ewens, K. J., Adams, T. E., Brandon, M. R., 1991. Nucleotide sequence, polymorphism, and evolution of ovine MHC class II DQA genes. *Immunogenetics*, 34(2), 69-79.
- Sena, L., Schneider, M. P. C., Brenig, B. B., Honeycutt, R. L., Honeycutt, D. A., Womack, J. E., Skow, L. C., 2011. Polymorphism and gene organization of water buffalo MHC-DQB genes show homology to the BoLA DQB region. *Animal Genetics*, 42(4), 378-385.
- Sena, L., Schneider, M. P. C., Brenig, B., Honeycutt, R. L., Womack, J. E., Skow, L. C., 2003. Polymorphisms in MHC-DRA and-DRB alleles of water buffalo (*Bubalus bubalis*) reveal different features from cattle DR alleles. *Animal Genetics*, 34(1), 1-10.
- Shalhevet, D., Da, Y., Beever, J. E., Eijk, M. J., Ma, R., Lewin, H. A., Gaskins, H. R., 1995. Genetic mapping of the LMP2 proteasome subunit gene to the BoLA class IIb region. *Immunogenetics*, 41(1), 44-46.
- Sharif, S., Mallard, B. A., Sargeant, J. M., 2000. Presence of glutamine at position 74 of pocket 4 in the BoLA-DR antigen binding groove is associated with occurrence of clinical mastitis caused by *Staphylococcus* species. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 76(3), 231-238.
- Sharif, S., Mallard, B. A., Sargeant, J. M., 2000. Presence of glutamine at position 74 of pocket 4 in the BoLA-DR antigen binding groove is associated with occurrence of clinical mastitis caused by *Staphylococcus* species. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 76(3), 231-238.
- Sharif, S., Mallard, B. A., Wilkie, B. N., Sargeant, J. M., Scott, H. M., Dekkers, J. C. M., Leslie, K. E., 1998. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Animal Genetics*, 29(3), 185-193.
- Shiina, T., Inoko, H., Kulski, J. K., 2004. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens*, 64(6), 631-649.
- Shiina, T., Tamiya, G., Oka, A., Takishima, N., Yamagata, T., Kikkawa, E., Watanabe, K., 1999. Molecular dynamics of MHC genesis unraveled by sequence analysis of the 1,796,938-bp HLA class I region. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(23), 13282-13287.
- Shook, G. E., 2006. Major advances in determining appropriate selection goals. *Journal of Dairy Science*, 89(4), 1349-1361.

- Sigurdardottir, S., Borsch, C., Gustafsson, K., Andersson, L., 1991. Cloning and sequence analysis of 14 DRB alleles of the bovine major histocompatibility complex by using the polymerase chain reaction. *Animal Genetics*, 22(3), 199-209.
- Sigurdardóttir, S., Borsch, C., Gustafsson, K., Andersson, L., 1992. Gene duplications and sequence polymorphism of bovine class II DQB genes. *Immunogenetics*, 35(3), 205-213.
- Sitte, K., Brinkworth, R., East, I. J., Jazwinska, E. C., 2002. A single amino acid deletion in the antigen binding site of BoLA-DRB3 is predicted to affect peptide binding. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 85(3), 129-135.
- Sivori, S., Vitale, M., Bottino, C., Marcenaro, E., Sanseverino, L., Parolini, S., Moretta, A., 1996. CD94 functions as a natural killer cell inhibitory receptor for different HLA class I alleles: identification of the inhibitory form of CD94 by the use of novel monoclonal antibodies. *European Journal of Immunology*, 26(10), 2487-2492.
- Sloan, V. S., Cameron, P., Porter, G., Gammon, M., Amaya, M., Mellins, E., Zaller, D. M. (1995). Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature*, 375(6534), 802-806.
- Smith, T. P., Rohrer, G. A., Alexander, L. J., Troyer, D. L., Kirby-Dobbels, K. R., Janzen, M. A., Beattie, C. W., 1995. Directed integration of the physical and genetic linkage maps of swine chromosome 7 reveals that the SLA spans the centromere. *Genome Research*, 5(3), 259-271.
- Snell, G. D., 1948. Methods for the study of histocompatibility genes. *Journal of Genetics*, 49(2), 87-108.
- Snell, G. D., Higgins, G. F., 1951. Alleles at the histocompatibility-2 locus in the mouse as determined by tumor transplantation. *Genetics*, 36(3), 306.
- Spooner, R. L., Leveziel, H., Grosclaude, F., Oliver, R. A., Vaiman, M., 1978. Evidence for a possible major histocompatibility complex (BLA) in cattle. *International Journal of Immunogenetics*, 5(5), 335-346.
- Spooner, R. L., Millar, P., Oliver, R. A., 1979. The production and analysis of antilymphocyte sera following pregnancy and skin grafting of cattle. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics*, 10(2), 99-105.
- Starkenbourg, R. J., Hansen, L. B., Kehrli, M. E., Chester-Jones, H., 1997. Frequencies and Effects of Alternative DRB3. 2 Alleles of Bovine Lymphocyte Antigen for Holsteins in Milk Selection and Control Lines1. *Journal of Dairy Science*, 80(12), 3411-3419.
- Stear, M. J., Hetzel, D. J. S., Brown, S. C., Gershwin, L. J., Mackinnon, M. J., Nicholas, F. W., 1990. The relationships among ecto-and endoparasite levels, class I antigens of the bovine major histocompatibility system, immunoglobulin E levels and weight gain. *Veterinary Parasitology*, 34(4), 303-321.

- Stear, M. J., Newman, M. J., Nicholas, F. W., Brown, S. C., Holroyd, R. G., 1984. Tick Resistance And The Major Histocompatibility System. *Australian Journal of Experimental Biology ve Medical Science*, 62(1).
- Stephens, R., Horton, R., Humphray, S., Rowen, L., Trowsdale, J., Beck, S., 1999. Gene organisation, sequence variation and isochore structure at the centromeric boundary of the human MHC. *Journal of Molecular Biology*, 291(4), 789-799.
- Stern, L. J., Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Urban, R. G., Strominger, J. L., Wiley, D. C. 1994. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*, 368(6468), 215-221.
- Stewart, C. A., Horton, R., Allcock, R. J., Ashurst, J. L., Atrazhev, A. M., Coggill, P., Humphray, S. J., 2004. Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping. *Genome Research*, 14(6), 1176-1187.
- Stocki, P., Dickinson, A. M., 2012. The immunosuppressive activity of heat shock protein 70. *Autoimmune Diseases*, 2012.
- Stone, R. T., Muggli-Cockett, N. E., 1990. Partial nucleotide sequence of a novel bovine major histocompatibility complex class II β -chain gene, BoLA-DIB. *Animal Genetics*, 21(4), 353-360.
- Stone, R. T., Muggli-Cockett, N. E., 1993. BoLA-DIB: species distribution, linkage with DOB, and Northern analysis. *Animal Genetics*, 24(1), 41-45.
- Subramanian, S., Yim, Y. S., Liu, K., Tus, K., Zhou, X. J., Wakeland, E. K., 2005. Epistatic suppression of systemic lupus erythematosus: fine mapping of Sles1 to less than 1 mb. *The Journal of Immunology*, 175(2), 1062-1072.
- Sulimova, G. E., Udina, I. G., Shaïkhaev, G. O., Zakharov, I. A., 1995. DNA polymorphism of the BoLA-DRB3 gene in cattle in connection with resistance and susceptibility to leukemia. *Genetika*, 31(9), 1294-1299.
- Sun, L., Song, Y., Riaz, H., Yang, L., 2013. Effect of BoLA-DRB3 exon2 polymorphisms on lameness of Chinese Holstein cows. *Molecular Biology Reports*, 40(2), 1081-1086.
- Swierkosz, J. E., Rock, K., Marrack, P. H. I. L. I. P. P. A., Kappler, J. W., 1978. The role of H-2 linked genes in helper T-cell function. II. Isolation on antigen-pulsed macrophages of two separate populations of F1 helper T cells each specific for antigen and one set of parental H-2 products. *The Journal of Experimental Medicine*, 147(2), 554-570.
- TAGEM, (2009). Türkiye Evcil Hayvan Genetik Kaynakları Tanıtım Kataloğu. Ankara: Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü.
- Takahashi, K., Rooney, A. P., Nei, M., 2000. Origins and divergence times of mammalian class II MHC gene clusters. *Journal of Heredity*, 91(3), 198-204.

- Takeshima, S. N., Aida, Y., 2006. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Animal Science Journal*, 77(2), 138-150.
- Takeshima, S. N., Giovambattista, G., Okimoto, N., Matsumoto, Y., Rogberg-Muñoz, A., Acosta, T. J., Aida, Y., 2015. Characterization of bovine MHC class II DRB3 diversity in South American Holstein cattle populations. *Tissue Antigens*, 86(6), 419-430.
- Takeshima, S. N., Ikegami, M., Morita, M., Nakai, Y., Aida, Y., 2001. Identification of new cattle BoLA-DRB3 alleles by sequence-based typing. *Immunogenetics*, 53(1), 74-81.
- Takeshima, S., Chen, S., Miki, M., Kado, M., Aida, Y., 2008a. Distribution and origin of bovine major histocompatibility complex class II DQA1 genes in Japan. *Tissue Antigens*, 72(3), 195-205.
- Takeshima, S., Matsumoto, Y., Chen, J., Yoshida, T., Mukoyama, H., Aida, Y., 2008b. Evidence for cattle major histocompatibility complex (BoLA) class II DQA1 gene heterozygote advantage against clinical mastitis caused by Streptococci and Escherichia species. *Tissue Antigens*, 72(6), 525-531.
- Takeshima, S., Miki, A., Kado, M., Aida, Y., 2007. Establishment of a sequence-based typing system for BoLA-DQA1 exon 2. *Tissue Antigens*, 69(2), 189-199.
- Takeshima, S., Nakai, Y., Ohta, M., Aida, Y., 2002. Short communication: characterization of DRB3 alleles in the MHC of Japanese shorthorn cattle by polymerase chain reaction-sequence-based typing. *Journal of Dairy Science*, 85(6), 1630-1632.
- Takeshima, S., Saitou, N., Morita, M., Inoko, H., Aida, Y., 2003. The diversity of bovine MHC class II DRB3 genes in Japanese Black, Japanese Shorthorn, Jersey and Holstein cattle in Japan. *Gene*, 316, 111-118.
- Taylor, G., Thomas, L. H., Wyld, S. G., Furze, J., Sopp, P., Howard, C. J., 1995. Role of T-lymphocyte subsets in recovery from respiratory syncytial virus infection in calves. *Journal of Virology*, 69(11), 6658-6664.
- Teale, A. J., Morrison, W. I., Goddeeris, B. M., Groocock, C. M., Stagg, D. A., Spooner, R. L., 1985. Bovine alloreactive cytotoxic cells generated in vitro: target specificity in relation to BoLA phenotype. *Immunology*, 55(2), 355.
- Tellam, R. L., Lemay, D. G., Van Tassell, C. P., Lewin, H. A., Worley, K. C., Elsik, C. G., 2009. Unlocking the bovine genome. *BioMed Central Genomics*, 10(1), 193.
- Terasaki, P., 1991. History of Transplantation: Thirty-Five Recollections. Los Angeles: *UCLA Tissue Typing Laboratory*.
- Teuber, M., 2001. Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 4(5), 493-499.

- Teutsch, M. R., Beever, J. E., Stewart, J. A., Schook, L. B., Lewin, H. A., 1989. Linkage of complement factor B gene to the bovine major histocompatibility complex. *Animal Genetics*, 20(s1), 427-427.
- Thompson, D., Muriel, P., Russell, D., Osborne, P., Bromley, A., Rowland, M., Brown, C., 2002. Economic costs of the foot and mouth disease outbreak in the United Kingdom in 2001. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 21(3), 675-685.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876-4882.
- Tizard, I. R., 2004. Acquired immunity: antigen-presenting receptors. *Veterinary Immunology: An Introduction*. Elsevier, Philadelphia, PA, USA, 153, 67-77.
- Todd, J. A., Acha-Orbea, H., Bell, J. I., Chao, N., Fronek, Z., Jacob, C. O., Steinman, L., 1988. A molecular basis for MHC class II-associated auto immunity. *Science*, 240(4855), 1003-1009.
- Townsend, A. R., Gotch, F. M., Davey, J., 1985. Cytotoxic T cells recognize fragments of the influenza nucleoprotein. *Cell*, 42(2), 457-467.
- Trachtulec, Z., Forejt, J., 2001. Synteny of orthologous genes conserved in mammals, snake, fly, nematode, and fission yeast. *Mammalian Genome*, 12(3), 227-231.
- Traherne, J. A., 2008. Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies. *International Journal of Immunogenetics*, 35(3), 179-192.
- Traul, D. L., Bhushan, B., Eldridge, J. A., Crawford, T. B., Li, H., Davies, C. J., 2005. Characterization of Bison bison major histocompatibility complex class IIa haplotypes. *Immunogenetics*, 57(11), 845-854.
- Trowsdale, J., 2001. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. *Immunity*, 15(3), 363-374.
- Trowsdale, J., Knight, J. C. (2013). Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 14, 301-323.
- Troy, C. S., MacHugh, D. E., Bailey, J. F., Magee, D. A., Loftus, R. T., Cunningham, P., Bradley, D. G., 2001. Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature*, 410(6832), 1088-1091.
- Udina, I. G., Karamysheva, E. E., Sulimova, G. E., Pavlenko, S. P., Turkova, S. O., Orlova, A. R., Ernst, L. K., 1998. Comparative analysis of Ayrshire and Black Pied cattle breeds by histocompatibility markers. *Genetika*, 34(12), 1668-1674.
- Udina, I. G., Karamysheva, E. E., Turkova, S. O., Orlova, A. R., Sulimova, G. E., 2003. Genetic mechanisms of resistance and susceptibility to leukemia in Ayrshire and black pied cattle breeds determined by allelic distribution of gene Bola-DRB3. *Russian Journal of Genetics*, 39(3), 306-317.

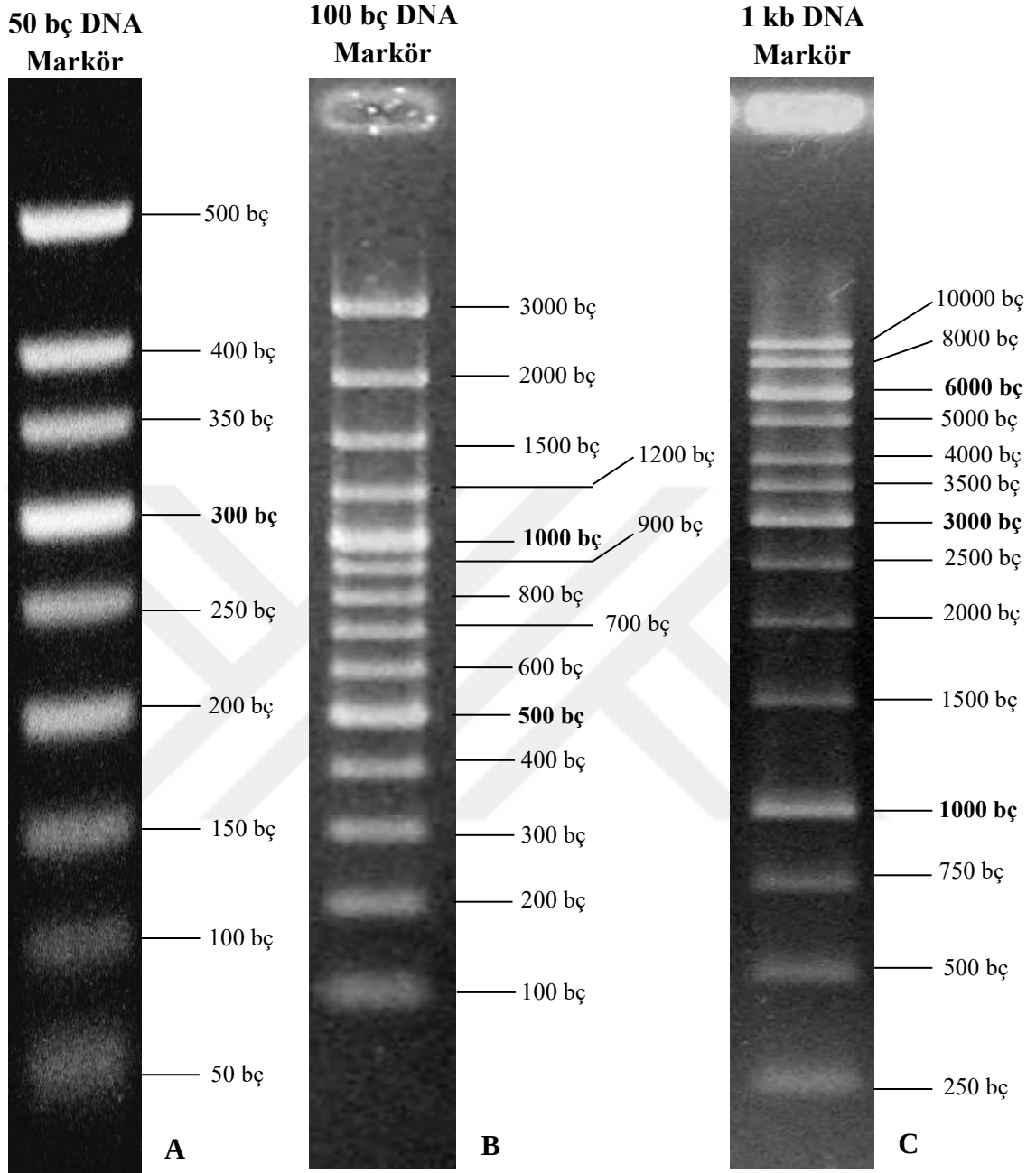
- Untalan, P. M., Pruett, J. H., Steelman, C. D., 2007. Association of the bovine leukocyte antigen major histocompatibility complex class II DRB3* 4401 allele with host resistance to the Lone Star tick, *Amblyomma americanum*. *Veterinary Parasitology*, 145(1), 190-195.
- Usinger, W. R., Curie-Cohen, M., Benforado, K., Pringnitz, D., Rowe, R., Splitter, G. A., Stone, W. H., 1981. The bovine major histocompatibility complex (BoLA): close linkage of the genes controlling serologically defined antigens and mixed lymphocyte reactivity. *Immunogenetics*, 14(5), 423-428.
- Ün C., Oztabak K., Özdemir N., Tesfaye D., Mengi A., Schellander K., 2008. Detection of bovine Spongiform Encephalopathy related prion protein gene promoter polymorphisms in local Turkish cattle. *Biochemical Genetics*, 46, 820-827.
- Van der Poel, J. J., Groenen, M. A., Dijkhof, R. J., Ruyter, D., Giphart, M. J., 1990. The nucleotide sequence of the bovine MHC class II alpha genes: DRA, DQA, andDYA. *Immunogenetics*, 31(1), 29-36.
- Van Rood, J. J., Van Leeuwen, A., Schippers, A., Balner, H., 1968. Human histocompatibility antigens in normal and neoplastic tissues. *Cancer Research*, 28(7), 1415-1422.
- Vienne, A., Shiina, T., Abi-Rached, L., Danchin, E., Vitiello, V., Cartault, F., Pontarotti, P., 2003. Evolution of the proto-MHC ancestral region: more evidence for the plesiomorphic organisation of human chromosome 9q34 region. *Immunogenetics*, 55(7), 429-436.
- Villadangos, J. A., 2001. Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Molecular Immunology*, 38(5), 329-346.
- Vogt, A. B., Kropshofer, H., Hämmerling, G. J., 1997. How HLA-DM affects the peptide repertoire bound to HLA-DR molecules. *Human Immunology*, 54(2), 170-179.
- Vranova, M., Alloggio, I., Qablan, M., Vyskocil, M., Baumeisterova, A., Sloboda, M., Horin, P., 2011. Genetic diversity of the class II major histocompatibility DRA locus in European, Asiatic and African domestic donkeys. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(5), 1136-1141.
- Wan, Q. H., Zeng, C. J., Ni, X. W., Pan, H. J., Fang, S. G., 2009. Giant panda genomic data provide insight into the birth-and-death process of mammalian major histocompatibility complex class II genes. *PLoS One*, 4(1), e4147.
- Wang, K., Sun, D. X., Zhang, Y., 2007. Identification of genetic variations of exon 2 of BoLA-DQB gene in five Chinese yellow cattle breeds. *International Journal of Immunogenetics*, 34(2), 115-118.
- Wang, K., Sun, D., Xu, R., Zhang, Y., 2005. Identification of 19 new BoLA-DQB alleles. *Animal Genetics*, 36(2), 166-167.
- Wang, K., Sun, D., Zhang, Y., 2008. Sequencing of 15 new BoLA-DRB3 alleles. *International Journal of Immunogenetics*, 35(4-5), 331-332.

- Wang, X., Lu, X. J., Sun, B., 2017. The pros and cons of dying tumour cells in adaptive immune responses. *Nature reviews Immunology*, 17(9), 591.
- Weber, D. A., Evavold, B. D., Jensen, P. E., 1996. Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM. *Science*, 274(5287), 618.
- Weigel, K. A., Freeman, A. E., Kehrli, M. E., Stear, M. J., Kelley, D. H., 1990. Association of class I bovine lymphocyte antigen complex alleles with health and production traits in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 73(9), 2538-2546.
- Wenink, P. W., Groen, A. F., Roelke-Parker, M. E., Prins, H. H. T., 1998. African buffalo maintain high genetic diversity in the major histocompatibility complex in spite of historically known population bottlenecks. *Molecular Ecology*, 7(10), 1315-1322.
- Williams, A. P., Peh, C. A., Purcell, A. W., McCluskey, J., Elliott, T., 2002. Optimization of the MHC class I peptide cargo is dependent on tapasin. *Immunity*, 16(4), 509-520.
- Wright, H., Ballingall, K. T., Redmond, J., 1994. The DY sub-region of the sheep MHC contains an A/B gene pair. *Immunogenetics*, 40(3), 230-234.
- Wu, X. X., Yang, Z. P., Wang, X. L., Mao, Y. J., Li, S. C., Shi, X. K., Chen, Y., 2010. Restriction fragment length polymorphism in the exon 2 of the BoLA-DRB3 gene in Chinese Holstein of the south China. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 3(2), 221.
- www.ncbi.nlm.nih.gov
- www.usda.gov/topics/animal-products/cattle-beef
- Xi, D., Hao, T., He, Y., Leng, J., Sun, Y., Yang, Y., Deng, W., 2014. Nucleotide sequence and polymorphism of MHC class II DQB exon 2 alleles in Chinese yakow (*Bos grunniens* × *Bos taurus*). *International Journal of Immunogenetics*, 41(3), 269-275.
- Xie, T., Rowen, L., Aguado, B., Ahearn, M. E., Madan, A., Qin, S., Hood, L., 2003. Analysis of the gene-dense major histocompatibility complex class III region and its comparison to mouse. *Genome Research*, 13(12), 2621-2636.
- Xu, A., Park, C., Lewin, H. A., 1994. Both DQB genes are expressed in BoLA haplotypes carrying a duplicated DQ region. *Immunogenetics*, 39(5), 316-321.
- Xu, A., Van Eijk, M. J., Park, C., Lewin, H. A., 1993. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *The Journal of Immunology*, 151(12), 6977-6985.
- Yang, Y., Chung, E. K., Wu, Y. L., Savelli, S. L., Nagaraja, H. N., Zhou, B., Blanchong, C. A., 2007. Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus (SLE): low copy number is a risk factor for and high copy number is a protective factor against SLE susceptibility in European Americans. *The American Journal of Human Genetics*, 80(6), 1037-1054.

- Yatim, N., Cullen, S., Albert, M. L., 2017. Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 17(4), 262-275.
- Yonow, T., 1995. The life-cycle of *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae): a literature synthesis with a view to modelling. *International Journal for Parasitology*, 25(9), 1023-1060.
- Yoshida, T., Furuta, H., Kondo, Y., Mukoyama, H., 2012. Association of BoLA-DRB3 alleles with mastitis resistance and susceptibility in Japanese Holstein cows. *Animal Science Journal*, 83(5), 359-366.
- Yoshida, T., Mukoyama, H., Furuta, H., Holmes, C. W., Kosugiyama, M., Tomogane, H., 2008. Allelic frequency of PCR-RFLP type of the BoLA-DRB3 in Japanese Holstein herds and the relation to mastitis. *Animal Science Journal*, 79(4), 409-416.
- Yoshida, T., Mukoyama, H., Furuta, H., Kondo, Y., Takeshima, S. N., Aida, Y., Tomogane, H., 2009a. Association of the amino acid motifs of BoLA-DRB3 alleles with mastitis pathogens in Japanese Holstein cows. *Animal Science Journal*, 80(5), 510-519.
- Yoshida, T., Mukoyama, H., Furuta, H., Kondo, Y., Takeshima, S. N., Aida, Y., Tomogane, H., 2009b. Association of BoLA-DRB3 alleles identified by a sequence-based typing method with mastitis pathogens in Japanese Holstein cows. *Animal Science Journal*, 80(5), 498-509.
- Yu, C. Y., Yang, Z., Blanchong, C. A., Miller, W., 2000. The human and mouse MHC class III region: a parade of 21 genes at the centromeric segment. *Immunology Today*, 21(7), 320-328.
- Yuhki, N., Beck, T., Stephens, R., Neelam, B., O'Brien, S. J., 2007. Comparative genomic structure of human, dog, and cat MHC: HLA, DLA, and FLA. *Journal of Heredity*, 98(5), 390-399.
- Yuhki, N., Mullikin, J. C., Beck, T., Stephens, R., O'Brien, S. J., 2008. Sequences, annotation and single nucleotide polymorphism of the major histocompatibility complex in the domestic cat. *PLoS One*, 3(7), e2674.
- Yuhki, N., O'Brien, S. J., 1990. DNA variation of the mammalian major histocompatibility complex reflects genomic diversity and population history. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(2), 836-840.
- Zai, G., Bezchlibnyk, Y. B., Richter, M. A., Arnold, P., Burroughs, E., Barr, C. L., Kennedy, J. L., 2004. Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) gene is associated with obsessive-compulsive disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 129(1), 64-68.
- Zajonc, D. M., Cantu, C., Mattner, J., Zhou, D., Savage, P. B., Bendelac, A., Teyton, L., 2005. Structure and function of a potent agonist for the semi-invariant natural killer T cell receptor. *Nature Immunology*, 6(8), 810-818.

- Zanotti, M., Poli, G., Ponti, W., Polli, M., Rocchi, M., Bolzani, E., Van Eijk, M. J. T., 1996. Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukaemia. *Animal Genetics*, 27, 337-341.
- Zhou, H., Hickford, J. G. H., Fang, Q., ve Byun, S. O., 2007. Short communication: identification of allelic variation at the bovine DRA locus by polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism. *Journal of Dairy Science*, 90(4), 1943-1946.
- Zimin, A. V., Delcher, A. L., Florea, L., Kelley, D. R., Schatz, M. C., Puiu, D., Marçais, G., 2009. A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biology*, 10(4), R42.
- Zinkernagel, R. M., Doherty, P. C., 1974. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytes choriomeningitis. *Nature*, 251, 547-548.
- Zinkernagel, R. M., Doherty, P. C., 1975. H-2 compatability requirement for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Different cytotoxic T-cell specificities are associated with structures coded for in H-2K or H-2D;. *The Journal of Experimental Medicine*, 141(6), 1427-1436.
- Zinkernagel, R. M., Doherty, P. C., 1997. The discovery of MHC restriction. *Immunology Today*, 18(1), 14-17.
- Zwart, W., Griekspoor, A., Kuijl, C., Marsman, M., van Rheenen, J., Janssen, H., Jalink, K., 2005. Spatial separation of HLA-DM/HLA-DR interactions within MIIC and phagosome-induced immune escape. *Immunity*, 22(2), 221-233.

7. EKLER



Ek şekil C.1. Agaroz jelde kullanılan DNA standartları (% 1,5 agaroz jelde). A: 50 bç DNA ladder (Favorgen) 50 – 500 bç arasında değişen lineer çift zincirli DNA parçasından oluşur. 300 bç büyüklüğündeki bantlar diğer bantlardan daha yoğun görülmektedir. B: 100 bç DNA ladder (Thermo Scientific, Amerika) 100 – 3000 bç arasında değişen 14 adet lineer çift zincirli DNA parçasından oluşur. 500 ve 1000 bç büyüklüğündeki bantlar diğer bantlardan daha yoğun görülmektedir. C: 1 kb DNA standardı (Thermo Scientific, Amerika) 250 – 10000 bç arasında değişen 14 adet lineer çift zincirli DNA parçası içermektedir. 1, 3 ve 6 kb büyüklüğündeki bantlar diğer bantlardan daha yoğun görülmektedir.

Ek Çizelge A.1. Yerli Kara sığır ırkının genel özellikleri (Resmi Gazete-2004)

Resmi Gazete Tarihi: 12.12.2004		Resmi Gazete Sayısı: 25668	
YERLİ HAYVAN IRK VE HATLARININ TESCİLİ HAKKINDA TEBLİĞ TEBLİĞ NO: 2004/39			
Türü	Sığır (<i>Bos taurus</i>).		
İrki	Yerli Kara.		
Uluslararası Adı	Anatolian Black.		
Yerel Adı/Adlan	Yerli Kara, Kara Sığır.		
Yayılma Alanı	Orta Anadolu.		
Verim Yönü	Et ve süt.		
MORFOLOJİK ÖZELLİKLERİ			
Vücut Yapısı Genel Tanımı	Yükseklik ve ağırlık itibariyle küçük yapılı, kısa boynuzlu sığır ırklarındandır. Boyun genellikle orta uzunlukta, ince kıvrımlar mevcut olup, kasları az gelişmiştir. Boyunda genellikle ince kıvrımlar mevcuttur. Gerdan az gelişmiştir. Boğalarda ise boyun oldukça kısa, kaslı ve sağlam yapılıdır. Gerdan orta derecede gelişmiştir. Vücut uzuncadır. Göğüs orta derecede derindir. Yalnız kaburgaların kısa olması neticesinde göğüs, omuzlar arkasında çok dardır. Omuz genellikle dar ve uzun olup meyillidir. Sağrı sivri, meyillidir ve cidagoya nazaran daha yüksektir. Sırt çizgisi cidagonun yaptığı kabartı hariç tutulursa şakrama kadar düzdür. Arka kısım daha geniş ve yüksektir. Genellikle derisi serttir. İnce kemik yapılıdır. Bacaklar kısa, tırnaklar sağlamdır. Bilhassa kötü beslenme şartları altında yetişen yerli karalarda incik bölgesi gelişmez. Arka bacaklarda kılıç bacaklılığı çok rastlanır. X bacaklılıkta görülebilir.		
RENK	Deri Rengi	Deri ve merme siyahtır.	
	Kıl Rengi	Kuzguni siyahtır. Kıllar yazın kondisyonu iyi hayvanlarda kısa, ince ve parlaktır. Kışın genellikle uzun ve kabadır.	
	Tırnak Rengi	Siyahdır.	
	Boynuz Rengi	Siyahdır.	
	Buzağı Rengi	Kuzguni siyahtır.	
BAŞ ÖZELLİKLERİ	Baş Yapısı	Baş buruna doğru incelir. Göz çukurları belirgindir. Boğalarda baş büyükçedir, profili hafif dışbükeydir. İneklerde baş dar ve küçük, yüz uzun ve burun ucunda dışbükeylik bulunmaz.	
	Boynuz Yapısı	Ay biçiminde ve ufaktır. Boynuz genellikle ince yapılıdır. İyi oluşmamış, gayri muntazam şekilli boynuz yapısı sıkça görülmektedir. Boğalarda boynuz kısa, boynuz dibi ineklere oranla daha kalın ve genellikle yana doğru uzamıştır. İneklerde boynuzun yönü yana, yukarı ve öne doğru yönelmiştir. Çok kısa boynuzlar yana sonra hafifçe yukarı doğrudur	
	Kulak Yapısı	Genellikle yatay vaziyette durur ve orta kalınlıktadır. Kulağın iç yüzeyi sık kalın kıllarla örtülüdür.	
	Göz Rengi	Siyaha yakın koyu kahverengidir	

Ek Çizelge A.1. Devamı.

ÜREME ÖZELLİKLERİ VE YAŞAMA GÜCÜ						
	Min.		Mak.		Ort.	
İlkin Doğurma Yaşı, ay					27-36	
Doğum Kolaylığı	Yardımsız doğum yaparlar.					
Doğum Aralığı, ay					12-13.5	
Yaşama Gücü (Altı aya kadar), %	75.0		100.0		91.55	
VERİM ÖZELLİKLERİ						
Laktasyon Süresi, gün	164.0		306.0		257.45	
Laktasyon Dönemi Süt Verimi, kg	242.5		1508.5		1061.61	
Süt Yağı, %	3.79		5.43		4.55	
305 Günlük Süt Verimi, kg					1314.63	
BÜYÜME ÖZELLİKLERİ						
	Erkek			Dişi		
	Min.	Max.	Ort.	Min.	Max.	Ort.
Doğum Ağırlığı, kg	10.0	30.0	18.75	10.0	24.0	17.74
6 Aylık Canlı Ağırlık, kg	65.0	183.0	100.2	67.0	130.0	95.02
12 Aylık Canlı Ağırlık, kg	147.0	311.0	185.84	96.0	218.0	156.08
DAVRANIŞ ÖZELLİKLERİ						
Analık İç Güdüsü	Çok iyidir.					
Sagılabilme Yeteneği	Ortadır.					
Sevk ve İdare Kolaylığı (Mizaç)	Ortadır.					
IRKA ÖZGÜ AYIRICI ÖZELLİKLERİ						
İrkin Özel Yetenekleri (Hastalıklara direnç, çevre şartlarına dayanıklılık)	Yetersiz koşullara oldukça dayanıldı, hastalık ve zararlılara karşı direnci yüksektir.					
Yetiştirme Koşullarının Özel Karakteristiği	Ekstansif koşullarda, ilkel bakım, besleme ve barındırma koşullarında yetiştirilir.					
GENETİK ÖZELLİKLERİ						
Gen çeşitliliği 0.78 dir. Her bir lokustaki ortalama alel sayısı 8.23, Zebu sığırı ile genetik (gen) benzerlik %30,6 ve Zebu sığırı alellerinin ise %17.2'sini taşımaktadır.						

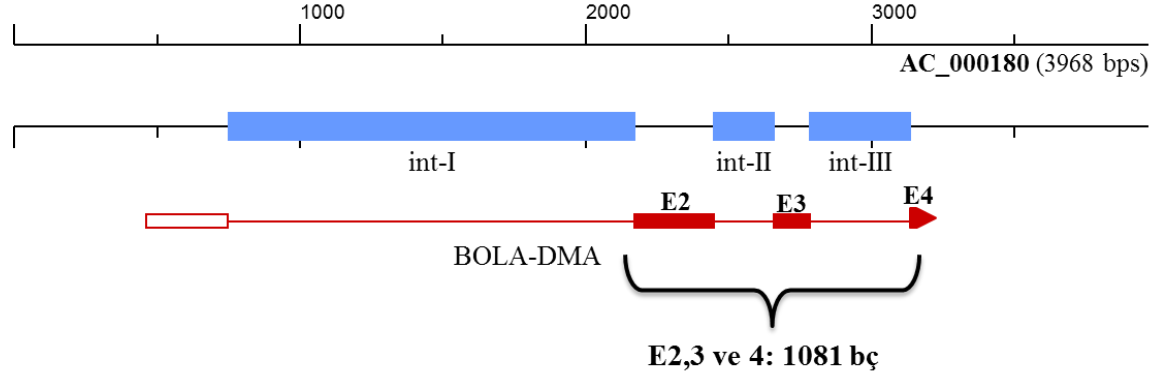
Ek Çizelge C.1. Yerli Kara sığır örneklerine verilen kodlar ve bazı özellikleri.

İrki	Küpe No	Cinsiyeti	Şehir	İlçe	Köy
YKÖ-1	804614	♂	Amasya	Merzifon	İnalan
YKÖ-2	851251	♂	Amasya	Merzifon	İnalan
YKÖ-3	855210	♂	Amasya	Merzifon	İnalan
YKÖ-4	153746	♀	Amasya	Merzifon	Derealan
YKÖ-5	153752	♀	Amasya	Merzifon	Derealan
YKÖ-6	153759	♀	Amasya	Merzifon	Derealan
YKÖ-7	154323	♀	Amasya	Merzifon	Derealan
YKÖ-8	154325	♀	Amasya	Merzifon	Derealan
YKÖ-9	409211	♀	Amasya	Merzifon	Derealan
YKÖ-10	858031	♂	Amasya	Merzifon	İnalan
YKÖ-11	858033	♂	Amasya	Merzifon	İnalan
YKÖ-12	409212	♀	Amasya	Merzifon	Derealan
YKÖ-13	409213	♀	Amasya	Merzifon	Derealan
YKÖ-14	409214	♀	Amasya	Merzifon	Derealan
YKÖ-15	962418	♂	Amasya	Merzifon	İnalan
YKÖ-16	409218	♀	Amasya	Merzifon	Derealan
YKÖ-17	963478	♂	Amasya	Merzifon	İnalan
YKÖ-18	963480	♂	Amasya	Merzifon	İnalan
YKÖ-19	409398	♀	Amasya	Merzifon	Derealan
YKÖ-20	994623	♂	Amasya	Merzifon	İnalan
YKÖ-21	994625	♂	Amasya	Merzifon	İnalan
YKÖ-22	413225	♀	Amasya	Merzifon	Derealan
YKÖ-23	492899	♀	Amasya	Merzifon	Derealan
YKÖ-24	492900	♀	Amasya	Merzifon	Derealan
YKÖ-25	994631	♂	Amasya	Merzifon	İnalan
YKÖ-26	504453	♀	Amasya	Merzifon	Derealan
YKÖ-27	994635	♂	Amasya	Merzifon	İnalan
YKÖ-28	535388	♀	Amasya	Merzifon	Derealan
YKÖ-29	535390	♀	Amasya	Merzifon	Derealan
YKÖ-30	684900	♀	Amasya	Merzifon	Derealan
YKÖ-31	994639	♂	Amasya	Merzifon	İnalan
YKÖ-32	913582	♀	Amasya	Merzifon	Derealan
YKÖ-33	670413	♀	Amasya	Merzifon	Aşağıbük
YKÖ-34	913584	♂	Amasya	Merzifon	Derealan
YKÖ-35	696291	♀	Amasya	Merzifon	Aşağıbük
YKÖ-36	703805	♀	Amasya	Merzifon	Aşağıbük
YKÖ-37	994900	♀	Amasya	Merzifon	Aşağıbük
YKÖ-38	1852084	♂	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-39	94501	♂	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-40	2095638	♂	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-41	2467349	♂	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-42	1976034	♂	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-43	2467350	♂	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-44	1770617	♂	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-45	2095677	♂	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-46	1577464	♂	Kars	Sarıkamış	Karaköse

Ek Çizelge C.1. Devamı.

İrki	Küpe No	Cinsiyeti	Şehir	İlçe	Köy
YKÖ-47	2336417	♂	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-48	1770624	♂	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-49	1770621	♂	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-50	1975898	♂	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-51	2095681	♂	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-52	2336477	♂	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-53	1852091	♀	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-54	1577480	♀	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-55	2099006	♀	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-56	1975833	♀	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-57	1738189	♀	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-58	1818690	♀	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-59	1577481	♀	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-60	1738191	♀	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-61	1852072	♀	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-62	1732742	♀	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-63	2037660	♀	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-64	1732741	♀	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-65	1852061	♀	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-66	1852057	♀	Kars	Sarıkamış	Karaköse
YKÖ-67	1577473	♀	Kars	Sarıkamış	Karaköse

Ek Çizelge C.2. BoLA-DMA-E2,3,4 Nükleotid konsensüs dizileri (1081 bç), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.



YK16	-----GGGTCCCCATCGTTC
YK8	-----GGGTCCCCATCGTTC
YK4	-----GGGTCCCCATCGTTC
YK12	-----GGGTCCCCATCGTTC
YK7	-----GGGTCCCCATCGTTC
YK15	-----GGGTCCCCATCGTTC
YK9	-----GGGATTCCCATCGTTC
YK14	-----GGGTCCCCATCGTTC
YK5	-----GGGTCCCCATCGTTC
YK1	-----GGGTCCCCATCGTTC
YK2	-----GGGTCCCCATCGTTC
YK13	-----GGGTCCCCATCGTTC
YK3	-----GGGTCCCCATCGTTC
YK11	-----GGGTCCCCATCGTTC
YK6	-----GGGTCCCCATCGTTC
Ref-DMA-E2, 3, 4	GGTCCCATCTGAGCTTCCTTCCCTCACGCCTCAATCCCCCACAGGGTTCCCCATCGTTC
YK10	-----GGGTCCCCATCGTTC

* * * * *

YK16	AGGTGTTTCACTGAAGCCCCTGGAGTTTGGCAAGCCCAACACGCTGGTCTGTTTCATCA
YK8	AGGTGTTTCACTGAAGCCCCTGGAGTTTGGCAAGCCCAACACGCTGGTCTGTTTCATCA
YK4	AGGTGTTTCACTGAAGCCCCTGGAGTTTGGCAAGCCCAACACGCTGGTCTGTTTCATCA
YK12	AGGTGTTTCACTGAAGCCCCTGGAGTTTGGCAAGCCCAACACGCTGGTCTGTTTCATCA
YK7	AGGTGTTTCACTGAAGCCCCTGGAGTTTGGCAAGCCCAACACGCTGGTCTGTTTCATCA
YK15	AGGTGTTTCACTGAAGCCCCTGGAGTTTGGCAAGCCCAACACGCTGGTCTGTTTCATCA
YK9	AGGTGTTTCACTGAAGCCCCTGGAGTTTGGCAAGCCCAACACGCTGGTCTGTTTCATCA
YK14	AGGTGTTTCACTGAAGCCCCTGGAGTTTGGCAAGCCCAACACGCTGGTCTGTTTCATCA
YK5	AGGTGTTTCACTGAAGCCCCTGGAGTTTGGCAAGCCCAACACGCTGGTCTGTTTCATCA
YK1	AGGTGTTTCACTGAAGCCCCTGGAGTTTGGCAAGCCCAACACGCTGGTCTGTTTCATCA
YK2	AGGTGTTTCACTGAAGCCCCTGGAGTTTGGCAAGCCCAACACGCTGGTCTGTTTCATCA
YK13	AGGTGTTTCACTGAAGCCCCTGGAGTTTGGCAAGCCCAACACGCTGGTCTGTTTCATCA
YK3	AGGTGTTTCACTGAAGCCCCTGGAGTTTGGCAAGCCCAACACGCTGGTCTGTTTCATCA
YK11	AGGTGTTTCACTGAAGCCCCTGGAGTTTGGCAAGCCCAACACGCTGGTCTGTTTCATCA
YK6	AGGTGTTTCACTGAAGCCCCTGGAGTTTGGCAAGCCCAACACGCTGGTCTGTTTCATCA
Ref-DMA-E2, 3, 4	AGGTGTTTCACTGAAGCCCCTGGAGTTTGGCAAGCCCAACACGCTGGTCTGTTTCATCA
YK10	AGGTGTTTCACTGAAGCCCCTGGAGTTTGGCAAGCCCAACACGCTGGTCTGTTTCATCA

YK16	GTAATCTCTTTCCACCCACACTGACCGTGAAGTGGCAGCATCAGTCGGCACCTGTGGAAG
YK8	GTAATCTCTTTCCACCCACACTGACCGTGAAGTGGCAGCATCAGTCGGCACCTGTGGAAG
YK4	GKAATCTCTTTCCACCCACACTGACCGTGAAGTGGCAGCATCAGTCGGCACCTGTGGAAG
YK12	GTAATCTCTTTCCACCCACACTGACCGTGAAGTGGCAGCATCAGTCGGCACCTGTGGAAG
YK7	GTAATCTCTTTCCACCCACACTGACCGTGAAGTGGCAGCATCAGTCGGCACCTGTGGAAG
YK15	GTAATCTCTTTCCACCCACACTGACCGTGAAGTGGCAGCATCAGTCGGCACCTGTGGAAG
YK9	GTAATCTCTTTCCACCCACACTGACCGTGAAGTGGCAGCATCAGTCGGCACCTGTGGAAG
YK14	GTAATCTCTTTCCACCCACACTGACCGTGAAGTGGCAGCATCAGTCGGCACCTGTGGAAG
YK5	GTAATCTCTTTCCACCCACACTGACCGTGAAGTGGCAGCATCAGTCGGCACCTGTGGAAG
YK1	GTAATCTCTTTCCACCCACACTGACCGTGAAGTGGCAGCATCAGTCGGCACCTGTGGAAG
YK2	GTAATCTCTTTCCACCCACACTGACCGTGAAGTGGCAGCATCAGTCGGCACCTGTGGAAG

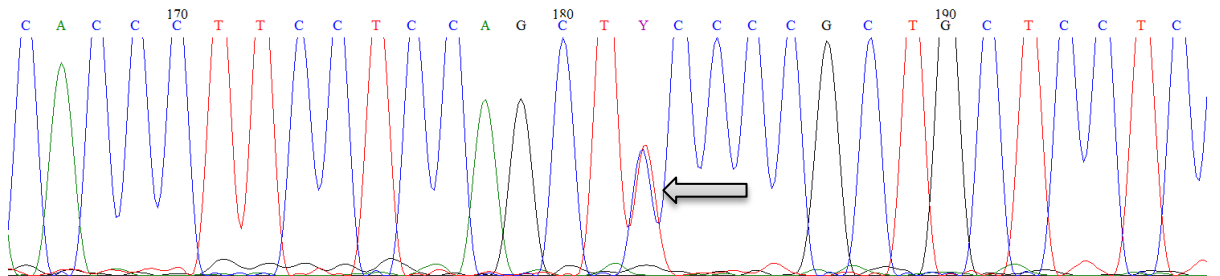
YK13	GTAATCTCTTTCCACCCACACTGACCGTGAAGTGGCAGCATCAGTCGGCACCTGTGGAAG
YK3	GTAATCTCTTTCCACCCACACTGACCGTGAAGTGGCAGCATCAGTCGGCACCTGTGGAAG
YK11	GTAATCTCTTTCCACCCACACTGACCGTGAAGTGGCAGCATCAGTCGGCACCTGTGGAAG
YK6	GTAATCTCTTTCCACCCACACTGACCGTGAAGTGGCAGCATCAGTCGGCACCTGTGGAAG
REF-DMA-E2, 3, 4	GTAATCTCTTTCCACCCACACTGACCGTGAAGTGGCAGCATCAGTCGGCACCTGTGGAAG
YK10	GTAATCTCTTTCCACCCACACTGACCGTGAAGTGGCAGCATCAGTCGGCACCTGTGGAAG
	* *****
YK16	GAGCCGGGCCCACCTTTTGTCTCCGCGGTTGATGGACTCACCTTCCAGGCCTTTTCCTACT
YK8	GAGCCGGGCCCACCTTTTGTCTCCGCGGTTGATGGACTCACCTTCCAGGCCTTTTCCTACT
YK4	GAGCCGGGCCCACCTTTTGTCTCCGCGGTTGATGGACTCACCTTCCAGGCCTTTTCCTACT
YK12	GAGCCGGGCCCACCTTTTGTCTCCGCGGTTGATGGACTCACCTTCCAGGCCTTTTCCTACT
YK7	GAGCCGGGCCCACCTTTTGTCTCCGCGGTTGATGGACTCACCTTCCAGGCCTTTTCCTACT
YK15	GAGCCGGGCCCACCTTTTGTCTCCGCGGTTGATGGACTCACCTTCCAGGCCTTTTCCTACT
YK9	GAGCCGGGCCCACCTTTTGTCTCCGCGGTTGATGGACTCACCTTCCAGGCCTTTTCCTACT
YK14	GAGCCGGGCCCACCTTTTGTCTCCGCGGTTGATGGACTCACCTTCCAGGCCTTTTCCTACT
YK5	GAGCCGGGCCCACCTTTTGTCTCCGCGGTTGATGGACTCACCTTCCAGGCCTTTTCCTACT
YK1	GAGCCGGGCCCACCTTTTGTCTCCGCGGTTGATGGACTCACCTTCCAGGCCTTTTCCTACT
YK2	GAGCCGGGCCCACCTTTTGTCTCCGCGGTTGATGGACTCACCTTCCAGGCCTTTTCCTACT
YK13	GAGCCGGGCCCACCTTTTGTCTCCGCGGTTGATGGACTCACCTTCCAGGCCTTTTCCTACT
YK3	GAGCCTGGCCACCTTTTGTCTCCGCGGTTGATGGACTCACCTTCCAGGCCTTTTCCTACT
YK11	GAGCCGGGCCCACCTTTTGTCTCCGCGGTTGATGGACTCACCTTCCAGGCCTTTTCCTACT
YK6	GAGCCGGGCCCACCTTTTGTCTCCGCGGTTGATGGACTCACCTTCCAGGCCTTTTCCTACT
REF-DMA-E2, 3, 4	GAGCCGGGCCCACCTTTTGTCTCCGCGGTTGATGGACTCACCTTCCAGGCCTTTTCCTACT
YK10	GAGCCGGGCCCACCTTTTGTCTCCGCGGTTGATGGACTCACCTTCCAGGCCTTTTCCTACT
	***** *****
YK16	TAAACGTACACCAGCACCTCTGATCTTTTCTCTTGCATCGTGACTCATGAGATCGATG
YK8	TAAACGTACACCAGCACCTCTGATCTTTTCTCTTGCATCGTGACTCATGAGATCGATG
YK4	TAAAGTACACCAGCACCTCTGATCTTTTCTCTTGCATCGTGACTCATGAGATCGATG
YK12	TAAACGTACACCAGCACCTCTGATCTTTTCTCTTGCATCGTGACTCATGAGATCGATG
YK7	TAAACGTACACCAGCACCTCTGATCTTTTCTCTTGCATCGTGACTCATGAGATCGATG
YK15	TAAACGTACACCAGCACCTCTGATCTTTTCTCTTGCATCGTGACTCATGAGATCGATG
YK9	TAAACGTACACCAGCACCTCTGATCTTTTCTCTTGCATCGTGACTCATGAGATCGATG
YK14	TAAACGTACACCAGCACCTCTGATCTTTTCTCTTGCATCGTGACTCATGAGATCGATG
YK5	TAAACGTACACCAGCACCTCTGATCTTTTCTCTTGCATCGTGACTCATGAGATCGATG
YK1	TAAACGTACACCAGCACCTCTGATCTTTTCTCTTGCATCGTGACTCATGAGATCGATG
YK2	TAAACGTACACCAGCACCTCTGATCTTTTCTCTTGCATCGTGACTCATGAGATCGATG
YK13	TAAACGTACACCAGCACCTCTGATCTTTTCTCTTGCATCGTGACTCATGAGATCGATG
YK3	TAAACGTACACCAGCACCTCTGATCTTTTCTCTTGCATCGTGACTCATGAGATCGATG
YK11	TAAACGTACACCAGCACCTCTGATCTTTTCTCTTGCATCGTGACTCATGAGATCGATG
YK6	TAAAGTACACCAGCACCTCTGATCTTTTCTCTTGCATCGTGACTCATGAGATCGATG
REF-DMA-E2, 3, 4	TAAACGTACACCAGCACCTCTGATCTTTTCTCTTGCATCGTGACTCATGAGATCGATG
YK10	TAAACGTACACCAGCACCTCTGATCTTTTCTCTTGCATCGTGACTCATGAGATCGATG
	***** *****
YK16	GGGGCTGAAGAGAGGTGGACCCATGGGAGGGCTTGTTCCTCCACCTGGCCTTGTTTCAGGC
YK8	GGGGCTGAAGAGAGGTGGACCCATGGGAGGGCTTGTTCCTCCACCTGGCCTTGTTTCAGGC
YK4	GGGGCTGAAGAGAGGTGGACCCATGGGAGGGCTTGTTCCTCCACCTGGCCTTGTTTCAGGC
YK12	GGGGCTGAAGAGAGGTGGACCCATGGGAGGGCTTGTTCCTCCACCTGGCCTTGTTTCAGGC
YK7	GGGGCTGAAGAGAGGTGGACCCATGGGAGGGCTTGTTCCTCCACCTGGCCTTGTTTCAGGC
YK15	GGGGCTGAAAAAAGGTGGACCCATGGGAGGGCTTGTTCCTCCACCTGGCCTTGTTTCAGGC
YK9	GGGGCTGAAGAGAGGTGGACCCATGGGAGGGCTTGTTCCTCCACCTGGCCTTGTTTCAGGC
YK14	GGGGCTGAAGAGAGGTGGACCCATGGGAGGGCTTGTTCCTCCACCTGGCCTTGTTTCAGGC
YK5	GGGGCTGAAGAGAGGTGGACCCATGGGAGGGCTTGTTCCTCCACCTGGCCTTGTTTCAGGC
YK1	GGGGCTGAAGAGAGGTGGACCCATGGGAGGGCTTGTTCCTCCACCTGGCCTTGTTTCAGGC
YK2	GGGGCTGAAGAGAGGTGGACCCATGGGAGGGCTTGTTCCTCCACCTGGCCTTGTTTCAGGC
YK13	GGGGCTGAAGAGAGGTGGACCCATGGGAGGGCTTGTTCCTCCACCTGGCCTTGTTTCAGGC
YK3	GGGGCTGAAGAGAGGTGGACCCATGGGAGGGCTTGTTCCTCCACCTGGCCTTGTTTCAGGC
YK11	GGGGCTGAAGAGAGGTGGACCCATGGGAGGGCTTGTTCCTCCACCTGGCCTTGTTTCAGGC
YK6	GGGGCTGAAGAGAGGTGGACCCATGGGAGGGCTTGTTCCTCCACCTGGCCTTGTTTCAGGC
REF-DMA-E2, 3, 4	GGGGCTGAAGAGAGGTGGACCCATGGGAGGGCTTGTTCCTCCACCTGGCCTTGTTTCAGGC
YK10	GGGGCTGAAGAGAGGTGGACCCATGGGAGGGCTTGTTCCTCCACCTGGCCTTGTTTCAGGC
	***** * *****
YK16	CATTCCCGCTCTGTGCCGAGCTCAGTATTCAGTCTCGGGGTCTGCCTGTCTATAGACA
YK8	CATTCCCGCTCTGTGCCGAGCTCAGTATTCAGTCTCGGGGTCTGCCTGTCTATAGACA
YK4	CATTCCCGCTCTGTGCCGAGCTCAGTATTCAGTCTCGGGGTCTGCCTGTCTATAGACA

YK6	GTAGGTCGGGGCGTCTGGAGGGGGCGGGAGAGCCAGACACAGTGGCGCACATGTGAGTTT
REF-DMA-E2, 3, 4	GTAGGTCGGGGCGTCTGGAGGGGGCGGGAGAGCCAGACACAGTGGCGCACATGTGAGTTT
YK10	GTAGGTCGGGGCGTCTGGAGGGGGCGGGAGAGCCAGACACAGTGGCGCACATGTGAGTTT *** *****
YK16	GCCAGGACCGTCTTTTGACCCAGGGAGCAGCCAGTGGCCCTTGGGTGGGCAGGCCCTGTAT
YK8	GCCAGGACCGTCTTTTGACCCAGGGAGCAGCCAGTGGCCCTTGGGTGGGCAGGCCCTGTAT
YK4	GCCAGGACCGTCTTTTGACCCAGGGAGCAGCCAGTGGCCCTTGGGTGGGCAGGCCCTGTAT
YK12	GCCAGGACCGTCTTTTGACCCAGGGAGCAGCCAGTGGCCCTTGGGTGGGCAGGCCCTGTAT
YK7	GCCAGGACCGTCTTTTGACCCAGGGAGCAGCCAGTGGCCCTTGGGTGGGCAGGCCCTGTAT
YK15	GCCAGGACCGTCTTTTGACCCAGGGAGCAGCCAGTGGCCCTTGGGTGGGCAGGCCCTGTAT
YK9	GCCAGGACCGTCTTTTGACCCAGGGAGCAGCCAGTGGCCCTTGGGTGGGCAGGCCCTGTAT
YK14	GCCAGGACCGTCTTTTGACCCAGGGAGCAGCCAGTGGCCCTTGGGTGGGCAGGCCCTGTAT
YK5	GCCAGGACCGTCTTTTGACCCAGGGAGCAGCCAGTGGCCCTTGGGTGGGCAGGCCCTGTAT
YK1	GCCAGGACCGTCTTTTGACCCAGGGAGCAGCCAGTGGCCCTTGGGTGGGCAGGCCCTGTAT
YK2	GCCAGGACCGTCTTTTGACCCAGGGAGCAGCCAGTGGCCCTTGGGTGGGCAGGCCCTGTAT
YK13	GCCAGGACCGTCTTTTGACCCAGGGAGCAGCCAGTGGCCCTTGGGTGGGCAGGCCCTGTAT
YK3	GCCAGGACCGTCTTTTGACCCAGGGAGCAGCCAGTGGCCCTTGGGTGGGCAGGCCCTGTAT
YK11	GCCAGGACCGTCTTTTGACCCAGGGAGCAGCCAGTGGCCCTTGGGTGGGCAGGCCCTGTAT
YK6	GCCAGGACCGTCTTTTGACCCAGGGAGCAGCCAGTGGCCCTTGGGTGGGCAGGCCCTGTAT
REF-DMA-E2, 3, 4	GCCAGGACCGTCTTTTGACCCAGGGAGCAGCCAGTGGCCCTTGGGTGGGCAGGCCCTGTAT
YK10	GCCAGGACCGTCTTTTGACCCAGGGAGCAGCCAGTGGCCCTTGGGTGGGCAGGCCCTGTAT *** *****
YK16	CTGCCCCCCCCACCTCCTGGTTGAGGCCCGGGTGCACACCAGCAGTACCAGGTCGGGAG
YK8	CTGACACCCATCCTCCTGGTTGAGGCCCGGGTGCACACATGCAGTTACAGGTCGGGAG
YK4	CTGACACCCATCCTCCTGGTTGAGGCCCGGGTGCACACATGCAGTTACAGGTCGGGAG
YK12	CTGCCCCACCATCCTCCTGGGTGAGGCCCGGGTGCACACATGCAGTACCAGGTCGGGAG
YK7	CTGACACCCATCCTCCTGGTTGAGGCCCGGGTGCACACATGCAGTTACAGGTCGGGAG
YK15	CTGACACCCATCCTCCTGGTTGAGGCCCGGGTGCACACATGCAGTTACAGGTCGGGAG
YK9	CTGACACCCATCCTCCTGGTTGAGGCCCGGGTGCACACATGCAGTTACAGGTCGGGAG
YK14	CTGACACCCATCCTCCTGGTTGAGGCCCGGGTGCACACATGCAGTTACAGGTCGGGAG
YK5	CTGACACCCATCCTCCTGGTTGAGGCCCGGGTGCACACATGCAGTTACAGGTCGGGAG
YK1	CTGACACCCATCCTCCTGGTTGAGGCCCGGGTGCACACATGCAGTTACAGGTCGGGAG
YK2	CTGACACCCATCCTCCTGGTTGAGGCCCGGGTGCACACATGCAGTTACAGGTCGGGAG
YK13	CTGACACCCATCCTCCTGGTTGAGGCCCGGGTGCACACATGCAGTTACAGGTCGGGAG
YK3	CTGACACCCATCCTCCTGGTTGAGGCCCGGGTGCACACATGCAGTTACAGGTCGGGAG
YK11	CTGACACCCATCCTCCTGGTTGAGGCCCGGGTGCACACATGCAGTTACAGGTCGGGAG
YK6	CTGACACCCATCCTCCTGGTTGAGGCCCGGGTGCACACATGCAGTTACAGGTCGGGAG
REF-DMA-E2, 3, 4	CTGACACCCATCCTCCTGGTTGAGGCCCGGGTGCACACATGCAGTTACAGGTCGGGAG
YK10	CTGACACCCATCCTCCTGGTTGAGGCCCGGGTGCACACATGCAGTTACAGGTCGGGAG **** * *****
YK16	GATGTCTTTGCGTGGGGGAGGAGCAGCGGGGAAGCTGGAGGAAGGGTGTTTGGAGATGAT
YK8	GATGTCTTTGCGTGGGGGAGGAGCAGCGGGGAAGCTGGAGGAAGGGTGTTTGGAGATGAT
YK4	GATGTCTTTGCGTGGGGGAGGAGCAGCGGGGAAGCTGGAGGAAGGGTGTTTGGAGATGAT
YK12	GATGTCTTTGCGTGGGGGAGGAGCAGCGGGGAAGCTGGAGGAAGGGTGTTTGGAGATGAT
YK7	GATGTCTTTGCGTGGGGGAGGAGCAGCGGGGAAGCTGGAGGAAGGGTGTTTGGAGATGAT
YK15	GATGTCTTTGCGTGGGGGAGGAGCAGCGGGGAAGCTGGAGGAAGGGTGTTTGGAGATGAT
YK9	GATGTCTTTGCGTGGGGGAGGAGCAGCGGGGAAGCTGGAGGAAGGGTGTTTGGAGATGAT
YK14	GATGTCTTTGCGTGGGGGAGGAGCAGCGGGGAAGCTGGAGGAAGGGTGTTTGGAGATGAT
YK5	GATGTCTTTGCGTGGGGGAGGAGCAGCGGGGAAGCTGGAGGAAGGGTGTTTGGAGATGAT
YK1	GATGTCTTTGCGTGGGGGAGGAGCAGCGGGGAAGCTGGAGGAAGGGTGTTTGGAGATGAT
YK2	GATGTCTTTGCGTGGGGGAGGAGCAGCGGGGAAGCTGGAGGAAGGGTGTTTGGAGATGAT
YK13	GATGTCTTTGCGTGGGGGAGGAGCAGCGGGGAAGCTGGAGGAAGGGTGTTTGGAGATGAT
YK3	GATGTCTTTGCGTGGGGGAGGAGCAGCGGGGAAGCTGGAGGAAGGGTGTTTGGAGATGAT
YK11	GATGTCTTTGCGTGGGGGAGGAGCAGCGGGGAAGCTGGAGGAAGGGTGTTTGGAGATGAT
YK6	GATGTCTTTGCGTGGGGGAGGAGCAGCGGGGAAGCTGGAGGAAGGGTGTTTGGAGATGAT
REF-DMA-E2, 3, 4	GATGTCTTTGCGTGGGGGAGGAGCAGCGGGGAAGCTGGAGGAAGGGTGTTTGGAGATGAT
YK10	GATGTCTTTGCGTGGGGGAGGAGCAGCGGGGAAGCTGGAGGAAGGGTGTTTGGAGATGAT *****
YK16	CTGGAGACAAGGAGAGAGCAACTTCTGGCTGGTGTGTTGCTGGTGGGGAAGGCCCTTTGG
YK8	CTGGAGACAAGGAGAGAGCAACTTCTGGCTGGTGTGTTGCTGGTGGGGAAGGCCCTTTGG
YK4	CTGGAGACAAGGAGAGAGCAACTTCTGGCTGGTGTGTTGCTGGTGGGGAAGGCCCTTTGG
YK12	CTGGAGACAAGGAGAGAGCAACTTCTGGCTGGTGTGTTGCTGGTGGGGAAGGCCCTTTGG
YK7	CTGGAGACAAGGAGAGAGCAACTTCTGGCTGGTGTGTTGCTGGTGGGGAAGGCCCTTTGG
YK15	CTGGAGACAAGGAGAGAGCAACTTCTGGCTGGTGTGTTGCTGGTGGGGAAGGCCCTTTGG

YK9 CTGGAGACAAGGAGAGAGCAACTTCTGGCTGGTGTGTTGCTGGTGGGGAAGGCCCTTTGG
YK14 CTGGAGACAAGGAGAGAGCAACTTCTGGCTGGTGTGTTGCTGGTGGGGAAGGCCCTTTGG
YK5 CTGGAGACAAGGAGAGAGCAACTTCTGGCTGGTGTGTTGCTGGTGGGGAAGGCCCTTTGG
YK1 CTGGAGACAAGGAGAGAGCAACTTCTGGCTGGTGTGTTGCTGGTGGGGAAGGCCCTTTGG
YK2 CTGGAGACAAGGAGAGAGCAACTTCTGGCTGGTGTGTTGCTGGTGGGGAAGGCCCTTTGG
YK13 CTGGAGACAAGGAGAGAGCAACTTCTGGCTGGTGTGTTGCTGGTGGGGAAGGCCCTTTGG
YK3 CTGGAGACAAGGAGAGAGCAACTTCTGGCTGGTGTGTTGCTGGTGGGGAAGGCCCTTTGG
YK11 CTGGAGACAAGGAGAGAGCAACTTCTGGCTGGTGTGTTGCTGGTGGGGAAGGCCCTTTGG
YK6 CTGGAGACAAGGAGAGAGCAACTTCTGGCTGGTGTGTTGCTGGTGGGGAAGGCCCTTTGG
REF-DMA-E2, 3, 4 CTGGAGACAAGGAGAGAGCAACTTCTGGCTGGTGTGTTGCTGGTGGGGAAGGCCCTTTGG
YK10 CTGGAGACAAGGAGAGAGCAACTTCTGGCTGGTGTGTTGCTGGTGGGGAAGGCCCTTTGG

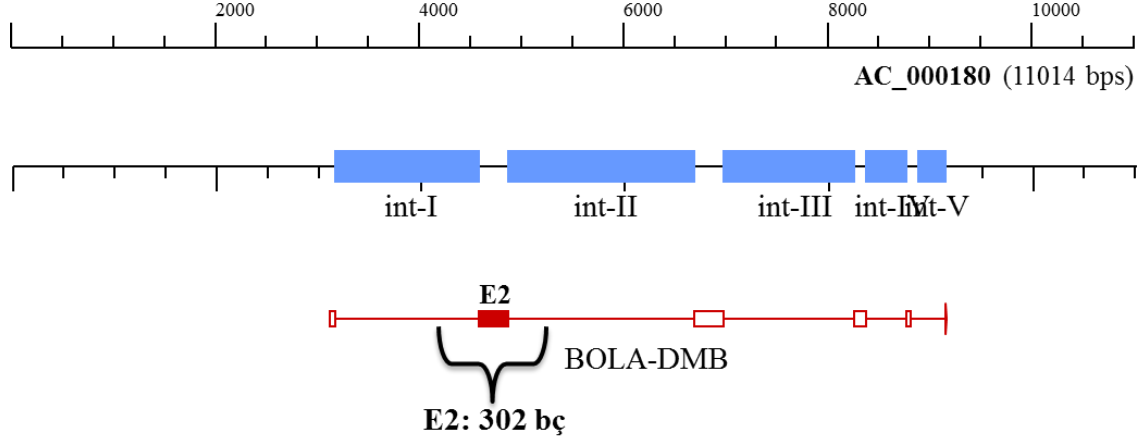
YK16 GGATGAGAAGGACCCCCCGATGTATTTTCTCCATCCTTTCTTCTCCTCAGGCTGACTCT
YK8 GGATGAGAAGGACCCCCCGATGTATTTTCTCCCTCCATCTCTCTCCTCAGGCTGACTCT
YK4 GGATGAGAAGGACCCCCCGATGTATTTTCTCCATCCTTCTTTCTCCTCAGGCTGACTCT
YK12 GGATGAGAAGGACCCCCCGATGTATTTTCTCCATCCTTCTTTCTCCTCAGGCTGACTCT
YK7 GGATGAGAAGGACCCCCCGATGTATTTTCTCCATCCATCTCGCTCCTCAGGCTGACTCT
YK15 GGATGAGAAGGACCCCCCGATGTATTTTCTCCATCCTTCTTTCTCCTCAGGCTGACTCT
YK9 GGATGAGAAGGACCCCCCGATGTATTTTCTCCATCCTTCTTTCTCCTCAGGCTGACTCT
YK14 GGATGAGAAGGACCCCCCGATGTATTTTCTCCATCCTTCTTTCTCCTCAGGCTGACTCT
YK5 GGATGAGAAGGACCCCCCGATGTATTTTCTCCATCCTTCTTTCTCCTCAGGCTGACTCT
YK1 GGATGAGAAGGACCCCCCGATGTATTTTCTCCATCCTTCTTTCTCCTCAGGCTGACTCT
YK2 GGATGAGAAGGACCCCCCGATGTATTTTCTCCATCCTTCTTTCTCCTCAGGCTGACTCT
YK13 GGATGAGAAGGACCCCCCGATGTATTTTCTCCATCCTTCTTTCTCCTCAGGCTGACTCT
YK3 GGATGAGAAGGACCCCCCGATGTATTTTCTCCATCCTTCTTTCTCCTCAGGCTGACTCT
YK11 GGATGAGAAGGACCCCCCGATGTATTTTCTCCATCCTTCTTTCTCCTCAGGCTGACTCT
YK6 GGATGAGAAGGACCCCCCGATGTATTTTCTCCATCCTTCTTTCTCCTCAGGCTGACTCT
REF-DMA-E2, 3, 4 GGATGAGAAGGACCCCCCGATGTATTTTCTCCATCCTTCTTTCTCCTCAGGCTGACTCT
YK10 GGATGAGAAGGACCCCCCGATGTATTTTCTCCATCCTTCTTTCTCCTCAGGCTGACT--

YK16 CCCTGACCAGAGTCTGATGC-----
YK8 TCCTGACCAGAGT-----
YK4 TCCTGACCAGAGTC-----
YK12 TCCTGACCAGAGTCTGATGCCAACAGCTGC-----
YK7 TCCTGACCAGAGTCTGATGCCAACAGCTGC-----
YK15 TCCTGACCAGAGTCTGATGGCAA-----
YK9 TCCT-----
YK14 TCCTGA-----
YK5 TCCTGACCAGAGTCTG-----
YK1 TCCTGACCAGAGTCTGATGGCAA-----
YK2 TCCTGACCAGAGTCTGATGCCAAC-----
YK13 TCCTGACCAGAGT-----
YK3 TCCTGACCAGAGTCT-----
YK11 TCCTGAC-----
YK6 TCCTGACCAGAGTCTGATGCCAACAGCTGCAGCCATCCAA-----
REF-DMA-E2, 3, 4 TCCTGACCAGAGTCTGATGCCAACAGCTGCACATCCAAGCAGGAGGTGTTTCAGGTTCTCA
YK10 -----



*Mavi bölgeler intronları, kırmızılar ekzonları, yeşil renkli bölgeler heterozigot bölgeleri, gri renkle işaretli nükleotidler ileri primerleri ve sarı renkli olanlar geri primerler bölgelerini göstermektedir.

Ek Çizelge C.3. BoLA-DMB-E2 Nükleotid konsensüs dizileri (302 bç), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.



YK7	CCTACAGGTGGTTTTGTGGCACACGTGGAAAGCACCTGTGTGTTGGACGATGATGGGGGA
YK4	CCTACAGGTGGTTTTGTGGCACACGTGGAAAGCACCTGTGTGTTGGACGATGATGGGGAT
YK13	-CTACAGGTGGTTTTGTGGCACACGTGGAAAGCACCTGTGTGTTGGACGATGATGGGGAT
YK5	CCTACAGGTGGTTTTGTGGCACACGTGGAAAGCACCTGTGTGTTGGACGATGATGGGGAT
YK2	CCTACAGGTGGTTTTGTGGCACACGTGGAAAGCACCTGTGTGTTGGACGATGATGGGGAT
YK15	CCTACAGGTGGTTTTGTGGCACACG GG AAAGCACCTGTGTGTTGGACGATGATGGGGAT
YK14	CCTACAGGTGGTTTTGTGGCACACGTGGAAAGCACCTGTGTGTTGGACGATGATGGGGAT
YK9	CCTACAGGTGGTTTTGTGGCACACGTGGAAAGCACCTGTGTGTTGGACGATGATGGGGAT
YK3	CCTACAGGTGGTTTTGTGGCACACGTGGAAAGCACCTGTGTGTTGGACGATGATGGGGAT
REF-DMB-E2	CCTACAGGTGGTTTTGTGGCACACGTGGAAAGCACCTGTGTGTTGGACGATGATGGGGAT
YK1	CCTACAGGTGGTTTTGTGGCACACGTGGAAAGCACCTGTGTGTTGGACGATGATGGGGAT
YK6	CCTACAGGTGGTTTTGTGGCACACGTGGAAAGCACCTGTGTGTTGGACGATGATGGGGAT
YK8	CCTACAGGTGGTTTTGTGGCACACGTGGAAAGCACCTGTGTGTTGGACGATGATGGGGAT
YK10	CCTACAGGTGGTTTTGTGGCACACGTGGAAAGCACCTGTGTGTTGGACGATGATGGGGAT
YK11	CCTACAGGTGGTTTTGTGGCACACGTGGAAAGCACCTGTGTGTTGGACGATGATGGGGAT
YK12	CCTACAGGTGGTTTTGTGGCACACGTGGAAAGCACCTGTGTGTTGGACGATGATGGGGAT
YK16	CCTACAGGTGGTTTTGTGGCACACGTGGAAAGCACCTGTGTGTTGGACGATGATGGGGAT

YK7	TCCGAAGACTTCTCGTATTGCATCTCCTTCAACAAGGATTGCTGACCTGCTGGGATCCC
YK4	CCGAAAGACTTCTCGTATTGCATCTCCTTCAACAAGGATTGCTGACCTGCTGGGATCCC
YK13	CCGAAAGACTTCTCGTATTGCATCTCCTTCAACAAGGATTGCTGACCTGCTGGGATCCC
YK5	CCGAAAGACTTCTCGTATTGCATCTCCTTCAACAAGGATTGCTGACCTGCTGGGATCCC
YK2	CCGAAAGACTTCTCGTATTGCATCTCCTTCAACAAGGATTGCTGACCTGCTGGGATCCC
YK15	CCGAAAGACTTCTCGTATTGCATCTCCTTCAACAAGGATTGCTGACCTGCTGGGATCCC
YK14	CCGAAAGACTTCTCGTATTGCATCTCCTTCAACAAGGATTGCTGACCTGCTGGGATCCC
YK9	CCGAAAGACTTCTCGTATTGCATCTCCTTCAACAAGGATTGCTGACCTGCTGGGATCCC
YK3	CCGAAAGACTTCTCGTATTGCATCTCCTTCAACAAGGATTGCTGACCTGCTGGGATCCC
REF-DMB-E2	CCGAAAGACTTCTCGTATTGCATCTCCTTCAACAAGGATTGCTGACCTGCTGGGATCCC
YK1	CCGAAAGACTTCTCGTATTGCATCTCCTTCAACAAGGATTGCTGACCTGCTGGGATCCC
YK6	CCGAAAGACTTCTCGTATTGCATCTCCTTCAACAAGGATTGCTGACCTGCTGGGATCCC
YK8	CCGAAAGACTTCTCGTATTGCATCTCCTTCAACAAGGATTGCTGACCTGCTGGGATCCC
YK10	CCGAAAGACTTCTCGTATTGCATCTCCTTCAACAAGGATTGCTGACCTGCTGGGATCCC
YK11	CCGAAAGACTTCTCGTATTGCATCTCCTTCAACAAGGATTGCTGACCTGCTGGGATCCC
YK12	CCGAAAGACTTCTCGTATTGCATCTCCTTCAACAAGGATTGCTGACCTGCTGGGATCCC
YK16	CCGAAAGACTTCTCGTATTGCATCTCCTTCAACAAGGATTGCTGACCTGCTGGGATCCC

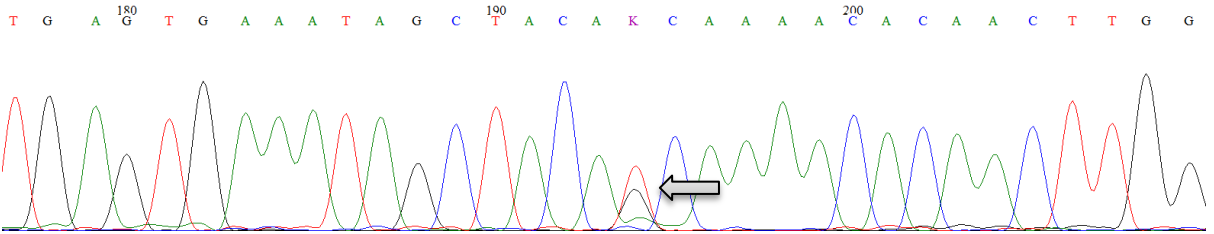
* *****

YK7	CTGCAGGCCAGTATGATTCCCTCGTGAATTTGGGGTGCTGAACGGCTTGGCCCCGTACCTC
YK4	CTGCAGGCCAGTATGATTCCCTCGTGAATTTGGGGTGCTGAACGGCTTGGCCCCGTACCTC
YK13	CTGCAGGCCAGTATGATTCCCTCGTGAATTTGGGGTGCTGAACGGCTTGGCCCCGTACCTC
YK5	CTGCAGGCCAGTATGATTCCCTCGTGAATTTGGGGTGCTGAACGGCTTGGCCCCGTACCTC
YK2	CTGCAGGCCAGTATGATTCCCTCGTGAATTTGGGGTGCTGAACGGCTTGGCCCCGTACCTC
YK15	CTGCAGGCCAGTATGATTCCCTCGTGAATTTGGGGTGCTGAACGGCTTGGCCCCGTACCTC
YK14	CTGCAGGCCAGTATGATTCCCTCGTGAATTTGGGGTGCTGAACGGCTTGGCCCCGTACCTC
YK9	CTGCAGGCCAGTATGATTCCCTCGTGAATTTGGGGTGCTGAACGGCTTGGCCCCGTACCTC

YK3 CTGCAGGCCAGTATGATTCCCTCGTGAATTGGGGTGCTGAACGGCTTGGCCCGGTACCTC
 REF-DMB-E2 CTGCAGGCCAGTATGATTCCCTCGTGAATTGGGGTGCTGAACGGCTTGGCCCGGTACCTC
 YK1 CTGCAGGCCAGTATGATTCCCTCGTGAATTGGGGTGCTGAACGGCTTGGCCCGGTACCTC
 YK6 CTGCAGGCCAGTATGATTCCCTCGTGAATTGGGGTGCTGAACGGCTTGGCCCGGTACCTC
 YK8 CTGCAGGCCAGTATGATTCCCTCGTGAATTGGGGTGCTGAACGGCTTGGCCCGGTACCTC
 YK10 CTGCAGGCCAGTATGATTCCCTCGTGAATTGGGGTGCTGAACGGCTTGGCCCGGTACCTC
 YK11 CTGCAGGCCAGTATGATTCCCTCGTGAATTGGGGTGCTGAACGGCTTGGCCCGGTACCTC
 YK12 CTGCAGGCCAGTATGATTCCCTCGTGAATTGGGGTGCTGAACGGCTTGGCCCGGTACCTC
 YK16 CTGCAGGCCAGTATGATTCCCTCGTGAATTGGGGTGCTGAACGGCTTGGCCCGGTACCTC

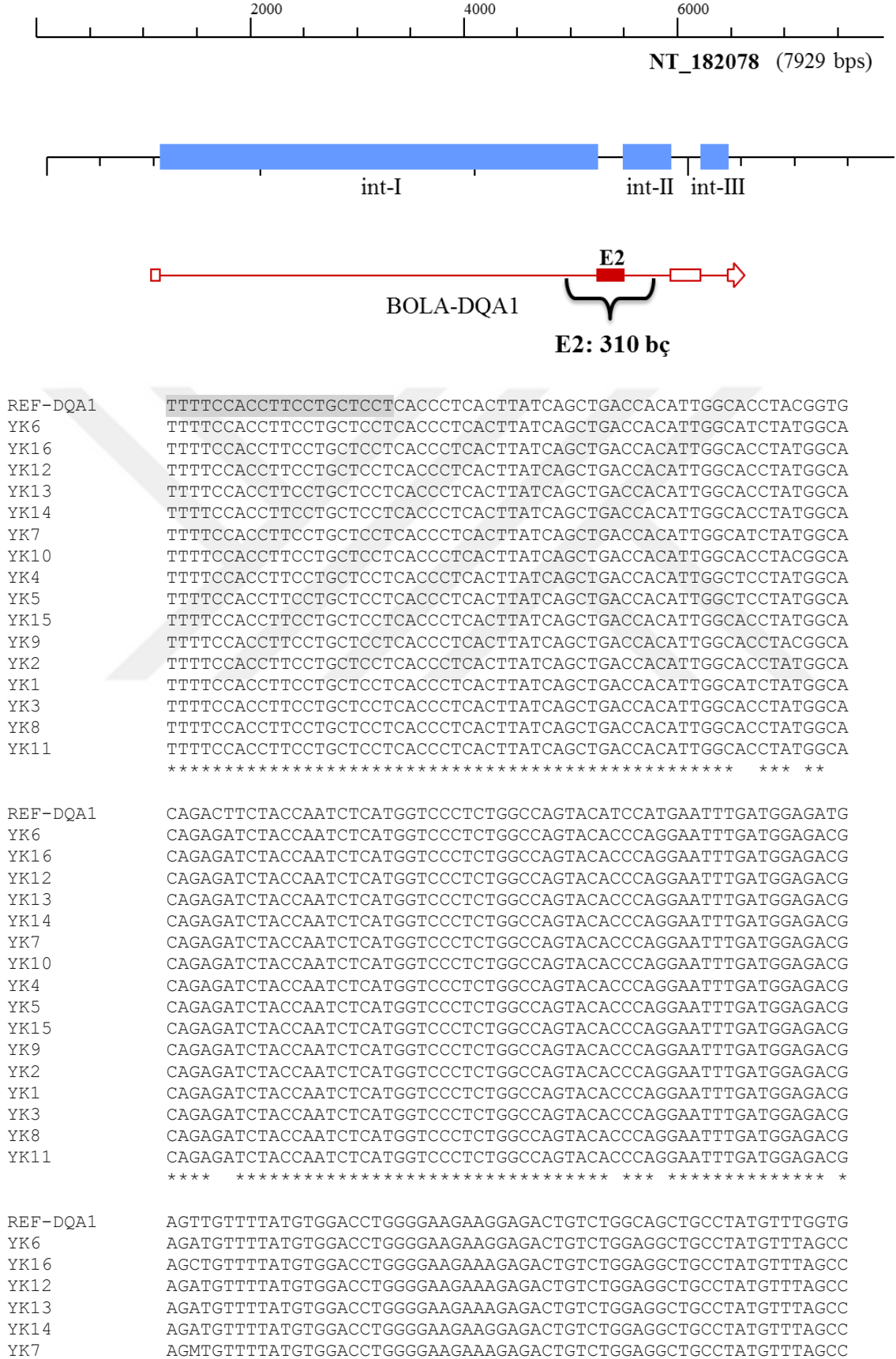
YK7 TCACAGTTCCTCAACAATAATAGTTACCTGATCCAGCGCTTGTCGAATGGTCTGCAGAAC
 YK4 TCACAGTTCCTCAACAATAATAGTTACCTGATCCAGCGCTTGTCGAATGGTCTGCAGAAC
 YK13 TCACAGTTCCTCAACAATAATAGTTACCTGATCCAGCGCTTGTCGAATGGTCTGCAGAAC
 YK5 TCACAGTTCCTCAACAATAATAGTTACCTGATCCAGCGCTTGTCGAATGGTCTGCAGAAC
 YK2 TCACAGTTCCTCAACAATAATAGTTACCTGATCCAGCGCTTGTCGAATGGTCTGCAGAAC
 YK15 TCACAGTTCCTCAACAATAATAGTTACCTGATCCAGCGCTTGTCGAATGGTCTGCAGAAC
 YK14 TCACAGTTCCTCAACAATAATAGTTACCTGATCCAGCGCTTGTCGAATGGTCTGCAGAAC
 YK9 TCACAGTTCCTCAACAATAATAGTTACCTGATCCAGCGCTTGTCGAATGGTCTGCAGAAC
 YK3 TCACAGTTCCTCAACAATAATAGTTACCTGATCCAGCGCTTGTCGAATGGTCTGCAGAAC
 REF-DMB-E2 TCACAGTTCCTCAACAATAATAGTTACCTGATCCAGCGCTTGTCGAATGGTCTGCAGAAC
 YK1 TCACAGTTCCTCAACAATAATAGTTACCTGATCCAGCGCTTGTCGAATGGTCTGCAGAAC
 YK6 TCACAGTTCCTCAACAATAATAGTTACCTGATCCAGCGCTTGTCGAATGGTCTGCAGAAC
 YK8 TCACAGTTCCTCAACAATAATAGTTACCTGATCCAGCGCTTGTCGAATGGTCTGCAGAAC
 YK10 TCACAGTTCCTCAACAATAATAGTTACCTGATCCAGCGCTTGTCGAATGGTCTGCAGAAC
 YK11 TCACAGTTCCTCAACAATAATAGTTACCTGATCCAGCGCTTGTCGAATGGTCTGCAGAAC
 YK12 TCACAGTTCCTCAACAATAATAGTTACCTGATCCAGCGCTTGTCGAATGGTCTGCAGAAC
 YK16 TCACAGTTCCTCAACAATAATAGTTACCTGATCCAGCGCTTGTCGAATGGTCTGCAGAAC

YK7 TGTGCCGCGCACACCCAGCCCTTCTGGAGCTCTCTGACCCACAGGACACGTAAGGAGAGA
 YK4 TGTGCCGCGCACACCCAGCCATTGTGGAGCTCTCTGACCCACAGGACACGTAAGGAGAGA
 YK13 TGTGCCGCGCACACCCAGCCCTTCTGGAGCTCTCTGACCCACAGGACACGTAAGGAGAGA
 YK5 TGTGCCGCGCACACCCAGCCCTTCTGGAGCTCTCTGACCCACAGGACACGTAAGGAGAGA
 YK2 TGTGCCGCGCACACCCAGCCCTTCTGGAGCTCTCTGACCCACAGGACACGTAAGGAGAGA
 YK15 TGTGCCGCGCACACCCAGCCCTTCTGGAGCTCTCTGACCCACAGGACACGTAAGGAGAGA
 YK14 TGTGCCGCGCACACCCAGCCCTTCTGGAGCTCTCTGACCCACAGGACACGTAAGGAGAGA
 YK9 TGTGCCGCGCACACCCAGCCCTTCTGGAGCTCTCTGACCCACAGGACACGTAAGGAGAGA
 YK3 TGTGCCGCGCACACCCAGCCCTTCTGGAGCTCTCTGACCCACAGGACACGTAAGGAGAGA
 REF-DMB-E2 TGTGCCGCGCACACCCAGCCCTTCTGGAGCTCTCTGACCCACAGGACACGTAAGGAGAGA
 YK1 TGTGCCGCGCACACCCAGCCCTTCTGGAGCTCTCTGACCCACAGGACACGTAAGGAGAGA
 YK6 TGTGCCGCGCACACCCAGCCCTTCTGGAGCTCTCTGACCCACAGGACACGTAAGGAGAGA
 YK8 TGTGCCGCGCACACCCAGCCCTTCTGGAGCTCTCTGACCCACAGGACACGTAAGGAGAGA
 YK10 TGTGCCGCGCACACCCAGCCCTTCTGGAGCTCTCTGACCCACAGGACACGTAAGGAGAGA
 YK11 TGTGCCGCGCACACCCAGCCCTTCTGGAGCTCTCTGACCCACAGGACACGTAAGGAGAGA
 YK12 TGTGCCGCGCACACCCAGCCCTTCTGGAGCTCTCTGACCCACAGGACACGTAAGGAGAGA
 YK16 TGTGCCGCGCACACCCAGCCCTTCTGGAGCTCTCTGACCCACAGGACACGTAAGGAGAGA



*Mavi bölgeler intronları, kırmızılar ekzonları, yeşil renkli bölgeler heterozigot bölgeleri, gri renkle işaretli nükleotidler ileri primerleri ve sarı renkli olanlar geri primerler bölgelerini göstermektedir.

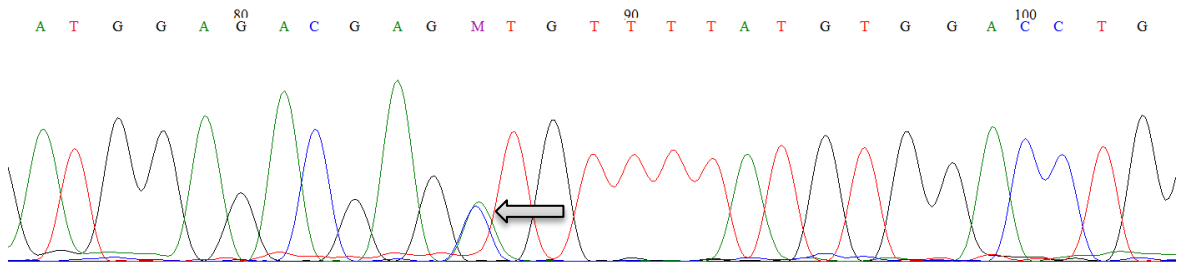
Ek Çizelge C.4.1. BoLA-DQA1-E2 Nükleotid konsensüs dizileri (310 bç), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.



YK10 AGATGTTTTATGTGGACCTGGGGAAGAAGGAGACTGTCTGGAGGCTGCCTATGTTTAGCC
 YK4 AGATGTTTTATGTGGACCTGGGGAAGAAGGAGACTGTCTGGAGGCTGCCTATGTTTAGCC
 YK5 AGATGTTTTATGTGGACCTGGGGAAGAAGGAGACTGTCTGGAGGCTGCCTATGTTTAGCC
 YK15 AGATGTTTTATGTGGACCTGGGGAAGAAGGAGACTGTCTGGAGGCTGCCTATGTTTAGCC
 YK9 AGATGTTTTATGTGGACCTGGGGAAGAAGGAGACTGTCTGGAGGCTGCCTATGTTTAGCC
 YK2 AGATGTTTTATGTGGACCTGGGGAAGAAGGAGACTGTCTGGAGGCTGCCTATGTTTAGCC
 YK1 AGATGTTTTATGTGGACCTGGGGAAGAAGGAGACTGTCTGGAGGCTGCCTATGTTTAGCC
 YK3 AGATGTTTTATGTGGACCTGGGGAAGAAGGAGACTGTCTGGAGGCTGCCTATGTTTAGCC
 YK8 AGATGTTTTATGTGGACCTGGGGAAGAAGGAGACTGTCTGGAGGCTGCCTATGTTTAGCC
 YK11 AGATGTTTTATGTGGACCTGGGGAAGAAGGAGACTGTCTGGAGGCTGCCTATGTTTAGCC
 ** *****

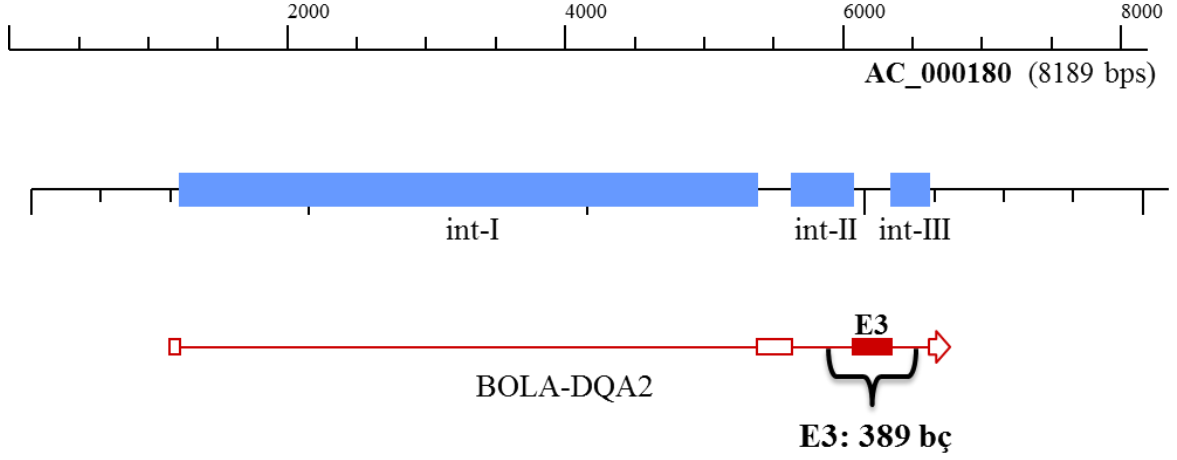
REF-DQA1 AATTAACAAGTTTTGAAGCACAAGATGCGCTGAATGAAATAGCTAAAGCAAAACACACCT
 YK6 AGTTTGCAGGTTTTGACCCACAGGTTGCACTGAGTGAAATAGCTACA CAAAATTCAACT
 YK16 AGTTTGCAGGTTTTGACCCACAGGCTGCACTGAGTGAAATAGCTACAGCAAAACACAACCT
 YK12 AGTTTGCAGGTTTTGACCCACAGGCTGCACTGAGTGAAATAGCTACAGCAAAACACAACCT
 YK13 AGTTTGCAGGTTTTGACCCACAGGCTGCACTGAGTGAAATAGCTACAGCAAAACACAACCT
 YK14 AGTTTGCAGGTTTTGACCCACAGGCTGCACTGAGTGAAATAGCTACAGCAAAACACAACCT
 YK7 AGTTTGCAGGTTTTGACCCACAGGCTGCACTGAGTGAAATAGCTACAGCAAAACACAACCT
 YK10 AGTTTGCATTTTTTACCCACAGGCTGCACTGAGTGAAATAGCTACATCAAAACACAACCT
 YK4 AGTTTGCAGGTTTTGACCCACAGGCTGCACTGAGTGAAATAGCTACA CAAAACACAACCT
 YK5 AGTTTGCAGGTTTTGACCCACAGGCTGCACTGAGTGAAATAGCTACATCAAAACACAACCT
 YK15 AGTTTGCAGGTTTTGACCCACAGGCTGCACTGAGTGAAATAGCTACATCAAAACACAACCT
 YK9 AGTTTGCAGGTTTTGACCCACAGGCTGCACTGAGTGAAATAGCTACATCAAAACACAACCT
 YK2 AGTTTGCAGGTTTTGACCCACAGGCTGCACTGAGTGAAATAGCTACA CAAAACACAACCT
 YK1 AGTTTGCAGGTTTTGACCCACAGGCTGCACTGAGTGAAATAGCTACATCAAAACACAACCT
 YK3 AGTTTGCAGGTTTTGACCCACAGGCTGCACTGAGTGAAATAGCTACATCAAAACACAACCT
 YK8 AGTTTGCAGGTTTTGACCCACAGGCTGCACTGAGTGAAATAGCTACATCAAAACACAACCT
 YK11 AGTTTGCAGGTTTTGACCCACAGGCTGCACTGAGTGAAATAGCTACATCAAAACACAACCT
 * ** ** *****

REF-DQA1 TGGATGTCCTGACTAAACGCTCCTGTTATCAATGGTAAGTGTCCACCATTCTACTTCTCT
 YK6 TGGATGTCCTGACTAAACGCTCCTGTTATCAATGGTAAGTGTCCACCATTCTACTTCTCT
 YK16 TGGATGTCCTGACTAAACGCTCCTGTTATCAATGGTAAGTGTCCACCATTCTACTTCTCT
 YK12 TGGATGTCCTGACTAAACGCTCCTGTTATCAATGGTAAGTGTCCACCATTCTACTTCTCT
 YK13 TGGATGTCCTGACTAAACGCTCCTGTTATCAATGGTAAGTGTCCACCATTCTACTTCTCT
 YK14 TGGATGTCCTGACTAAACGCTCCTGTTATCAATGGTAAGTGTCCACCATTCTACTTCTCT
 YK7 TGGATGTCCTGACTAAACGCTCCTGTTATCAATGGTAAGTGTCCACCATTCTACTTCTCT
 YK10 TGGATGTCCTGACTAAACGCTCCTGTTATCAATGGTAAGTGTCCACCATTCTACTTCTCT
 YK4 TGGATGTCCTGACTAAACGCTCCTGTTATCAATGGTAAGTGTCCACCATTCTACTTCTCT
 YK5 TGGATGTCCTGACTAAACGCTCCTGTTATCAATGGTAAGTGTCCACCATTCTACTTCTCT
 YK15 TGGATGTCCTGACTAAACGCTCCTGTTATCAATGGTAAGTGTCCACCATTCTACTTCTCT
 YK9 TGGATGTCCTGACTAAACGCTCCTGTTATCAATGGTAAGTGTCCACCATTCTACTTCTCT
 YK2 TGGATGTCCTGACTAAACGCTCCTGTTATCAATGGTAAGTGTCCACCATTCTACTTCTCT
 YK1 TGGATGTCCTGACTAAACGCTCCTGTTATCAATGGTAAGTGTCCACCATTCTACTTCTCT
 YK3 TGGATGTCCTGACTAAACGCTCCTGTTATCAATGGTAAGTGTCCACCATTCTACTTCTCT
 YK8 TGGATGTCCTGACTAAACGCTCCTGTTATCAATGGTAAGTGTCCACCATTCTACTTCTCT
 YK11 TGGATGTCCTGACTAAACGCTCCTGTTATCAATGGTAAGTGTCCACCATTCTACTTCTCT



*Mavi bölgeler intronları, kırmızılar ekzonları, yeşil renkli bölgeler heterozigot bölgeleri, gri renkle işaretli nükleotidler ileri primerleri ve sarı renkli olanlar geri primerler bölgelerini göstermektedir.

Ek Çizelge C.4.2. BoLA-DQA2-E3 Nükleotid konsensüs dizileri (389 bp), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.



YK2	-TCTGTGCTGTTTCCTCACCATAGAGGTTCCAGAGGTGACTGTGTTTTCCAAGTCTCCCG
YK14	-TCTGTGCTGTTTCCTCACCATAGAGGTTCCAGAGGTGACTGTGTTTTCCAAGTCTCCCG
YK12	-TCTGTGCTGTTTCCTCACCATAGAAGTTCTGAAGTGACTGTGTTTTCCAAGTCTCCCA
YK6	-TCTGTGCTGTTTCCTCACCATAGAGGTTCCAGAGGTGACTGTGTTTTCCAAGTCTCCCG
YK8	TTCTGTGCTGTTTCCTCACCATAGAGGTTCCAGAGGTGACTGTGTTTTCCAAGTCTCCCG
YK9	TTCTGTGCTGTTTCCTCACCATAGAGGTTCCAGAGGTGACTGTGTTTTCCAAGTCTCCCG
YK1	-TCTGTGCTGTTTCCTCACCATAGAGGTTCCAGAGGTGACTGTGTTTTCCAAGTCTCCCG
YK7	-TCTGTGCTGTTTCCTCACCATAGAGGTTCCAGAGGTGACTGTGTTTTCCAAGTCTCCCG
YK11	-TCTGTGCTGTTTCCTCACCATAGAGGTTCCAGAGGTGACTGTGTTTTCCAAGTCTCCCG
YK16	-TCTGTGCTGTTTCCTCACCATAGAGGTTCCAGAGGTGACTGTGTTTTCCAAGTCTCCCG
YK4	--CTGTGCTGTTTCCTCACCATAGAGGTTCCAGAGGTGACTGTGTTTTCCAAGTCTCCCG
YK10	-TCTGTGCTGTTTCCTCACCATAGAGGTTCCAGAGGTGACTGTGTTTTCCAAGTCTCCCG
YK3	-TCTGTGCTGTTTCCTCACCATAGAAGTTCTGAAGTGACTGTGTTTTCCAAGTCTCCCA
YK5	TTCTGTGCTGTTTCCTCACCATAGAAGTTCTGAAGTGACTGTGTTTTCCAAGTCTCCCA
YK13	-TCTGTGCTGTTTCCTCACCATAGAAGTTCTGAAGTGACTGTGTTTTCCAAGTCTCCCA
REF-DQA2-E3	-TCTGTGCTGTTTCCTCACCATAGAAGTTCTGAAGTGACTGTGTTTTCCAAGTCTCCCA
YK15	-TCTGTGCTGTTTCCTCACCATAGAAGTTCTGAAGTGACTGTGTTTTCCAAGTCTCCCA

YK2	TGATGCTGGGTCAGCCCAACACCCCTCATCTGTCACGTGGACAACATTTTTCCCCCTGTGA
YK14	TGATGCTGGGTCAGCCCAACACCCCTCATCTGTCACGTGGACAACATTTTTCCCCCTGTGA
YK12	TGATCCTGAGTCAGCCCAACACCCCTCATCTGTCACGTGGACAACATTTTTCCCCCTGTGA
YK6	TGATGCTGGGTCAGCCCAACACCCCTCATCTGTCACGTGGACAACATTTTTCCCCCTGTGA
YK8	TGATGCTGGGTCAGCCCAACACCCCTCATCTGTCACGTGGACAACATTTTTCCCCCTGTGA
YK9	TGATGCTGGGTCAGCCCAACACCCCTCATCTGTCACGTGGACAACATTTTTCCCCCTGTGA
YK1	TGATGCTGGGTCAGCCCAACACCCCTCATCTGTCACGTGGACAACATTTTTCCCCCTGTGA
YK7	TGATGCTGGGTCAGCCCAACACCCCTCATCTGTCACGTGGACAACATTTTTCCCCCTGTGA
YK11	TGATGCTGGGTCAGCCCAACACCCCTCATCTGTCACGTGGACAACATTTTTCCCCCTGTGA
YK16	TGATGCTGGGTCAGCCCAACACCCCTCATCTGTCACGTGGACAACATTTTTCCCCCTGTGA
YK4	TGATGCTGGGTCAGCCCAACACCCCTCATCTGTCACGTGGACAACATTTTTCCCCCTGTGA
YK10	TGATGCTGGGTCAGCCCAACACCCCTCATCTGTCACGTGGACAACATTTTTCCCCCTGTGA
YK3	TGGTGCTGGGTCAGCCCAACACCCCTCATCTGTCACATGGACAACATTTTTCCCCCTGTGA
YK5	TGGTGCTGGGTCAGCCCAACACCCCTCATCTGTCACATGGACAACATTTTTCCCCCTGTGA
YK13	TGGTGCTGGGCCAGCCCAATACTCTCATCTGTCACATGGACAACATTTATCCCCCTGTGA
REF-DQA2-E3	TGGTGCTGGGCCAGCCCAATACTCTCATCTGTCACATGGACAA---TTTCCCCCTGTAA
YK15	TGGTGCTGGGCCAGCCCAATACTCTCATCTGTCACATGGACAACATTTTTCCCCCTGTGA

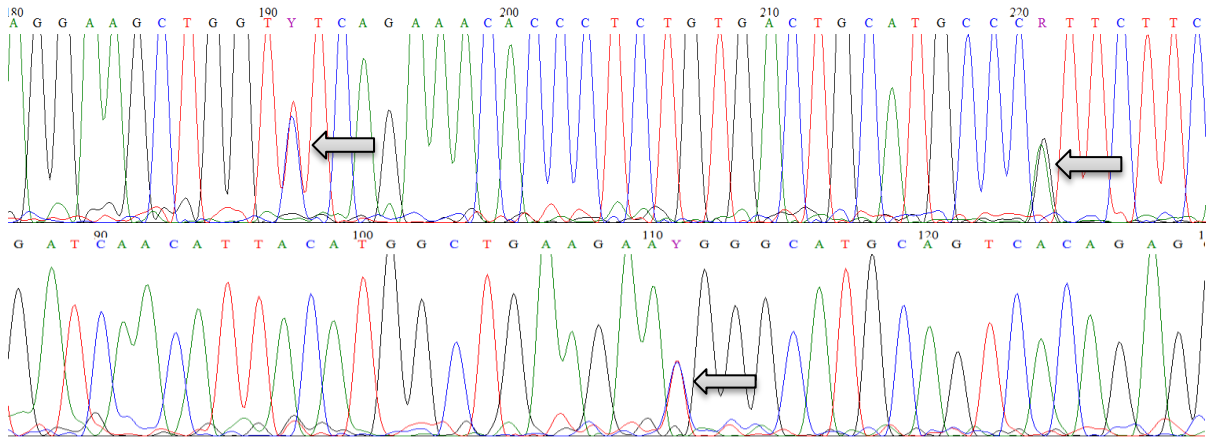
** * * * *

YK2	TCAACATTACATGGCTGAAGAAAGGGCATGCAGTCACAGAGGGTGTTTCTGAGACCAGCT
YK14	TCAACATTACATGGCTGAAGAAATGGGCATGCAGTCACAGAGGGTGTTTCTGAAACCAGCT
YK12	TCAACATTACATGGCTGAAGAAATGGGCATGCAGTCACAGAGGGTGTTTCTGAGACCAGCT
YK6	TCAACATTACATGGCTGAAGAAAGGGCATGCAGTCACAGAGGGTGTTTCTGAGACCAGCT
YK8	TCAACATTACATGGCTGAAGAAATGGGCATGCAGTCACAGAGGGTGTTTCTGAAACCAGCT
YK9	TCAACATTACATGGCTGAAGAAATGGGCATGCAGTCACAGAGGGTGTTTCTGAGACCAGCT
YK1	TCAACATTACATGGCTGAAGAAATGGGCATGCAGTCACAGAGGGTGTTTCTGAAACCAGCT
YK7	TCAACATTACATGGCTGAAGAAATGGGCATGCAGTCACAGAGGGTGTTTCTGAGACCAGCT

YK11 TCAACATTACATGGCTGAAGAACGGGCATGCAGTCACAGAGGGTGTCTCTGAGACCAGCT
YK16 TCAACATTACATGGCTGAAGAACGGGCATGCAGTCACAGAGGGTGTCTCTGAGACCAGCT
YK4 TCAACATTACATGGCTGAAGAAAGGGCATGCAGTCACAGAGGGTGTCTCTGAGACCAGCT
YK10 TCAACATTACATGGCTGAAGAAAGGGCATGCAGTCACAGAGGGTGTCTCTGAGACCAGCT
YK3 TCAACATTACATGGCTGAAGAACGGACATGCAGTCACAGAGGGTGTCTCTGAGACCCGCT
YK5 TCAACATTACATGGCTGAAGAACGGACATGCAGTCACAGAGGGTGTCTCTGAGACCCGCT
YK13 TCAACATTACATGGCTGAAGAACGGACATGCAGTCACAGAGGGTGTCTCTGAGACCCGCT
REF-DQA2-E3 TCAACATTACATGGCTGAAGAACGGACATGCAGTCACAGAGGGTGTCTCTGAGACCAGCT
YK15 TCAACATTACATGGCTGAAGAACGGACATGCAGTCACAGAGGGTGTCTCTGAGACCAGCT

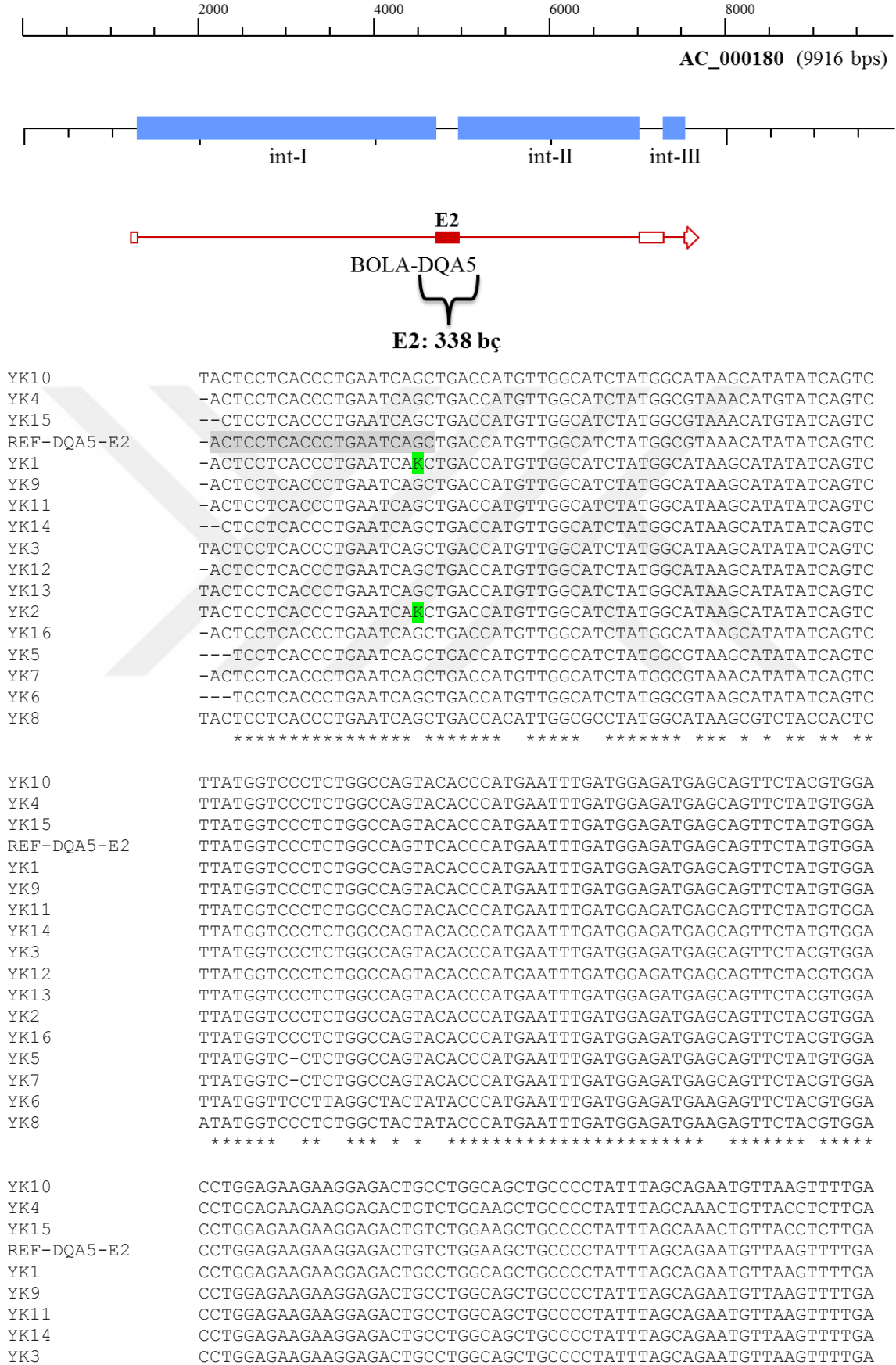
YK2 ACTGGGGTATGTACAGTTCCACCCCTTTAGGTACTCTCTCTTTTCTACCAAGCACAAA
YK14 ACTGGGGTATGTACAAGTTCCACCCCTTTAGGTACTCTCTCTTTTCTACCAAGCACAAA
YK12 ACTGGGGTATGTACAAGTTCCACCCCTTTAGGTACTCTCTCTTTTCTACCCAATACAAA
YK6 ACTGGGGTATGTACAAGTTCCACCCCTTTAGGTACTCTCTCTTTTCTACCAATACAAA
YK8 ACTGGGGTATGTACAAGTTCCACCCCTTTTGGTACTCTCTCTTTTCTACCCAATACAAA
YK9 ACTGGGGTATGTACAAGTTCCACCCCTTTAGGTACTCTCTCTTTTCTACCCAATACAAA
YK1 ACTGGGGTATGTACAAGTTCCACCCCTTTAGGTACTCTCTCTTTTCTACCCAATACAAA
YK7 ACTGGGGTATGTACAAGTTCCACCCCTTTAGGTACTCTCTCTTTTCTACCCAATACAAA
YK11 ACTGGGGTATGTACGAGTTCCACCCCTTTAGGTACTCTCTCTTTTCTACCCAATACAAA
YK16 ACTGGGGTATGTACGAGTTCCACCCCTTTAGGTACTCTCTCTTTTCTACCCAATACAAA
YK4 ACTGGGGTATGTACAGTTCCACCCCTTTAGGTACTCTCTCTTTTCTACCCAATACAAA
YK10 ACTGGGGTATGTACAGTTCCACCCCTTTAGGTACTCTCTCTTTTCTACCCAATACAAA
YK3 ACTAGGGCATGTACGAGTTCCACCCCTTTTGGTACTCTCTCTTTTCTACCAAGAACAAA
YK5 ACTAGGGCATGTACGAGTTCCACCCCTTTTGGTACTCTCTCTTTTCTACCAAGAACAAA
YK13 ACTAGGGTATGTACGAGTTCCACCCCTTTTGGTACTCTCTCTTTTCTACCAAGAACAAA
REF-DQA2-E3 ACTGGGGTATGTACGAGTTCCACCCCTTTTGGTACTCTCTCTTTTCTACCAAGCACAAA
YK15 ACTGGGGTATGTACGAGTTCCACCCCTTTTGGTACTCTCTCTTTTCTACCAAGCACAAA
*** **

YK2 ACACTCTGAGTTTGGTCCCTCAGTCTCACAGTC-
YK14 ACACTCTGAGTTTGGTCCCTCAGTCTCACAGTC-
YK12 ACACTCTGAGTTTGGTCCCTCAGTCTCACAGTC-
YK6 ACACTCTGAGTTTGGTCCCTCAGTCTCACAGTCA
YK8 ACACTCTGAGTTTGGTCCCTCAGTCTCACAGTCA
YK9 ACACTCTGAGTTTGGTCCCTCAGTCTCAC-----
YK1 ACACTCTGAGTTTGGTCCCTCAGTCTCACAGTCC
YK7 ACACTCTGAGTTTGGTCCCTCAGTCTCAC-----
YK11 ACACTCTGAGTTTGGTCCCTCAGTCTCACAGTC-
YK16 ACACTCTGAGTTTGGTCCCTCAGTCTCACAGTCA
YK4 ACACTCTGAGTTTGGTCCCTCAGTCTCACAGTC-
YK10 ACACTCTGAGTTTGGTCCCTCAGTCTCACAGTC-
YK3 ACACTCTGAGTTTGGTCCCTCAGTCTCACAGT--
YK5 ACACTCTGAGTTTGGTCCCTCAGTCTC-----
YK13 ACACTCTGAGTTTGGTCCCTCAGTCTCACAGTC-
REF-DQA2-E3 ACACTCTGAGTTTGGTCCCTCAGTCTCACAGTC-
YK15 ACACTCTGAGTTTGGTCCCTCAGTCTCACAGTC-



*Mavi bölgeler intronları, kırmızılar ekzonları, yeşil renkli bölgeler heterozigot bölgeleri, gri renkle işaretli nükleotidler ileri primerleri ve sarı renkli olanlar geri primerler bölgelerini göstermektedir.

Ek Çizelge C.4.3. BoLA-DQA5-E2 Nükleotid konsensüs dizileri (338 bç), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.



YK12 CCTGGAGAAGAAGGAGACTGCCTGGCAGCTGCCCCTATTTAGCAGAATGTTAAGTTTGA
YK13 CCTGGAGAAGAAGGAGACTGCCTGGCAGCTGCCCCTATTTAGCAGAATGTTAAGTTTGA
YK2 CCTGGAGAAGAAGGAGACTGCCTGGCAGCTGCCCCTATTTAGCAGAATGTTAAGTTTGA
YK16 CCTGGAGAAGAAGGAGACTGCCTGGCAGCTGCCCCTATTTAGCAGAATGTTAAGTTTGA
YK5 CCTGGAGAAGAAGGAGACTGCCTGGCAGCTGCCCCTATTTAGCAGAATGTTAAGTTTGA
YK7 CCTGGAGAAGAAGGAGACTGCCTGGCAGCTGCCCCTATTTAGCAGAATGTTAAGTTTGA
YK6 CCTGGAAAAGAGGGAGACTGTCTGGCATCTGCCTGTGTTTAGTAAATTTGCACCTTTTGA
YK8 CCTGGAAAAGAGGGAGACTGTCTGGAGTCTGCCTGTGTTTAGTAAATTTGGAAGTTTGA
***** **

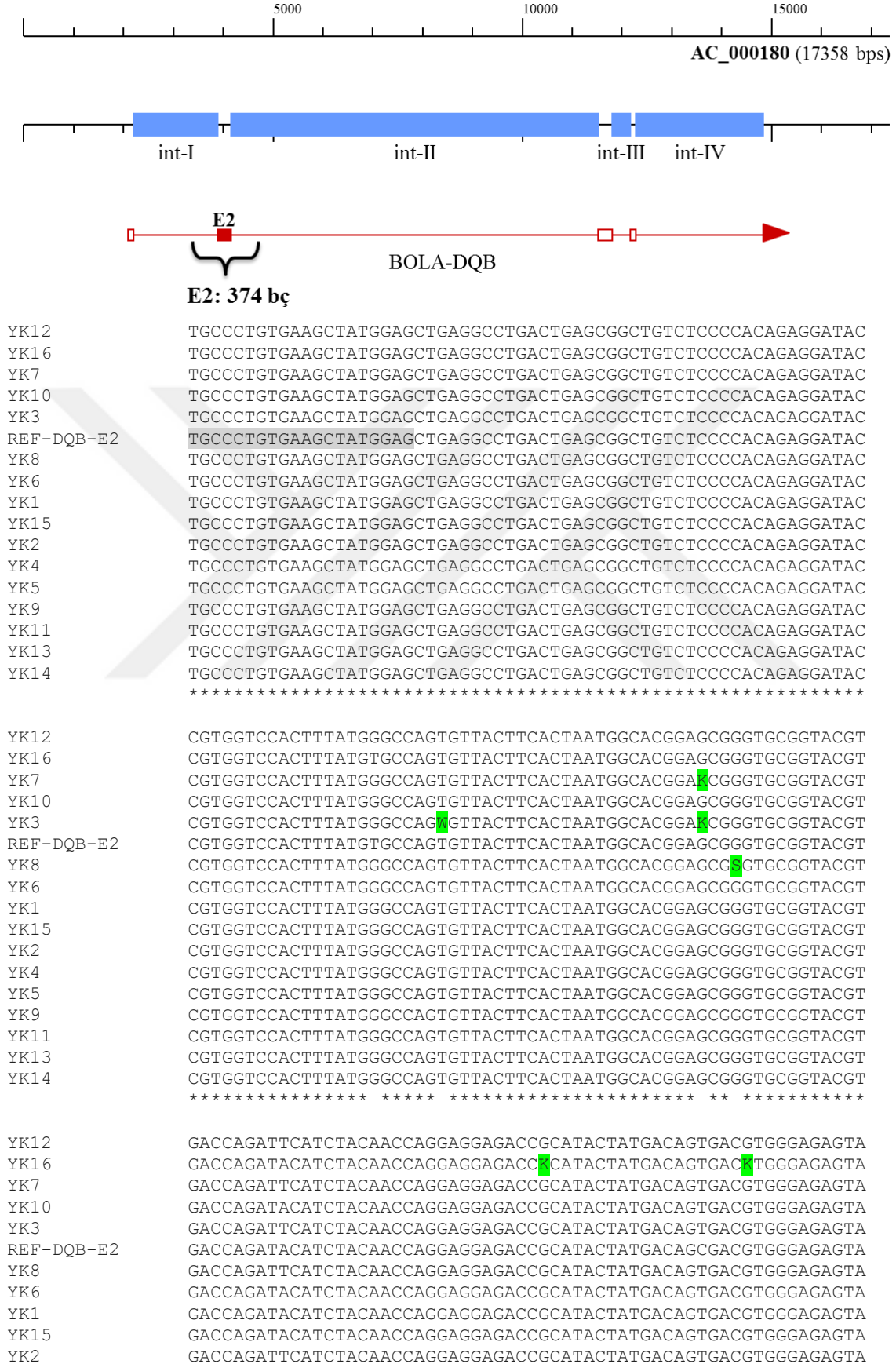
YK10 CCCACAGTTAGCACTGAGAAACATAGCTATCATGAAACTTCATGTGGACTTCCTGACTAA
YK4 CCCACAGTTTGCCTGAGAAACATAGCTATCATGAAACTTCACGTGGACTTCCTGACTAA
YK15 CCCACAGTTTGCCTGAGAAACATAGCTATCATGAAACTTCACGTGGACTTCCTGACTAA
REF-DQA5-E2 CCCACAGTTTGCCTGAGAAACATAGCTATCATGAAACTTCACGTGGACTTCCTGACTAA
YK1 CCCACAGTTAGCACTGAGAAACATAGCTATCATGAAACTTCATGTGGACTTCCTGACTAA
YK9 CCCACAGTTAGCACTGAGAAACATAGCTATCATGAAACTTCATGTGGACTTCCTGACTAA
YK11 CCCACAGTTAGCACTGAGAAACATAGCTATCATGAAACTTCATGTGGACTTCCTGACTAA
YK14 CCCACAGTTAGCACTGAGAAACATAGCTATCATGAAACTTCATGTGGACTTCCTGACTAA
YK3 CCCACAGTTAGCACTGAGAAACATAGCTATCATGAAACTTCATGTGGACTTCCTGACTAA
YK12 CCCACAGTTAGCACTGAGAAACATAGCTATCATGAAACTTCATGTGGACTTCCTGACTAA
YK13 CCCACAGTTAGCACTGAGAAACATAGCTATCATGAAACTTCATGTGGACTTCCTGACTAA
YK2 CCCACAGTTAGCACTGAGAAACATAGCTATCATGAAACTTCATGTGGACTTCCTGACTAA
YK16 CCCACAGTTAGCACTGAGAAACATAGCTATCATGAAACTTCATGTGGACTTCCTGACTAA
YK5 CCCACAGTTAGCACTGAGAAACATAGCTATCATGAAACTTCATGTGGACTTCCTGACTAA
YK7 CCCACAGTTAGCACTGAGAAACATAGCTATCATGAAACTTCATGTGGACTTCCTGACTAA
YK6 CCCTCAGGGTGCCTGAGAAACATAGCTACGACGAAGCACAATTTGGAGATCATGATGCA
YK8 CCCTCAGGGTGCCTGAGAAACATAGCTACGACGAAGCACAATCTGGAGATCGTGATCCA
*** **

YK10 ATTCTCCAACCTCTACTGCTGCTACCAATAGTACGTGTTACCATTCTGCCCTCTTTGTGT
YK4 ATTCTCCAACCTCTACTGCTGCTACCAATAGTACGTGTTACCATTCTGCCCTCTTTGTGT
YK15 ATTCTCCAACCTCTACTGCTGCTACCAATAGTACGTGTTACCATTCTGCCCTCTTTGTGT
REF-DQA5-E2 ATTCTCCAACCTCTACTGCTGCTACCAATAGTACGTGTTACCATTCTGCCCTCTTTGTGT
YK1 ATTCTCCAACCTCTACTGCTGCTACCAATAGTACGTGTTACCATTCTGCCCTCTTTGTGT
YK9 ATTCTCCAACCTCTACTGCTGCTACCAATAGTACGTGTTACCATTCTGCCCTCTTTGTGT
YK11 ATTCTCCAACCTCTACTGCTGCTACCAATAGTACGTGTTACCATTCTGCCCTCTTTGTGT
YK14 ATTCTCCAACCTCTACTGCTGCTACCAATAGTACGTGTTACCATTCTGCCCTCTTTGTGT
YK3 ATTCTCCAACCTCTACTGCTGCTACCAATAGTACGTGTTACCATTCTGCCCTCTTTGTGT
YK12 ATTCTCCAACCTCTACTGCTGCTACCAATAGTACGTGTTACCATTCTGCCCTCTTTGTGT
YK13 ATTCTCCAACCTCTACTGCTGCTACCAATAGTACGTGTTACCATTCTGCCCTCTTTGTGT
YK2 ATTCTCCAACCTCTACTGCTGCTACCAATAGTACGTGTTACCATTCTGCCCTCTTTGTGT
YK16 ATTCTCCAACCTCTACTGCTGCTACCAATAGTACGTGTTACCATTCTGCCCTCTTTGTGT
YK5 ATTCTCCAACCTCTACTGCTGCTACCAATAGTACGTGTTACCATTCTGCCCTCTTTGTGT
YK7 ATTCTCCAACCTCTACTGCTGCTACCAATAGTACGTGTTACCATTCTGCCCTCTTTGTGT
YK6 AAGGTCCAACCTCTACTGCTGCTACCAACAGTATGTGTCCCCACTCTGCCTCTCTTTA-TT
YK8 AAGGTCCAACCTCTACTGCTGCTACCAACAGTATGTGTCCCCRCTCTGCCTCTCTTTA-TT
* ****

YK10 CT---ACACTTTATATCAGGCCTCACTCCCTTCTTCCTT-
YK4 GATCTACCACTTTATATCAGGCCTCACTCCCTTCTTCCTA-
YK15 GATCTACCACTTTATATCAGGACTCACTCCCTTCTTCCTA-
REF-DQA5-E2 GATCTACCACTTTATATCAGGCTCACTCCCTTCTTCCTT-
YK1 GATCTACCACTTTATATCAGACCTCACTCCCTTCTTCCT--
YK9 GATCTACCACTTTATATCAGACCTCACTCCCTTCTTCCTAG
YK11 GATCTACCACTTTATATCAGACCTCACTCCCTTCTTCCTA-
YK14 GATCTACCACTTTATATCAGACCTCACTCCCTTCTTCCTA-
YK3 GATCTACCACTTTATATCAGGCCTCACTCCCTTCTTCCTA-
YK12 GATCTACCACTTTATATCAGACCTCACTCCCTTCTTCCTA-
YK13 GATCTACCACTTTATATCAGACCTCACTCCCTTCTTCCTA-
YK2 GATCTACCACTTTATATCAGACCTCACTCCCTTCTTCCTA-
YK16 GATCTACCACTTTATATCAGACCTCACTCCCTTCTTCCTA-
YK5 GATCTACCACTTTATATCAGGCCTCACTCCCTTCTTCCTA-
YK7 GATCTACCACTTTATATCAGACCTCACTCCCTTCTTCCTA-
YK6 A-ATCTACCCTTCATACCAGGCCTCACTCCCTTCTTCCTA-
YK8 A-ATCTACCCTTCATACCAGGCCTCACTCCCTTCTTCCTA-
* * * * *

*Mavi bölgeler intronları, kırmızılar ekzonları, yeşil renkli bölgeler heterozigot bölgeleri, gri renkle işaretli nükleotidler ileri primerleri ve sarı renkli olanlar geri primerler bölgelerini göstermektedir.

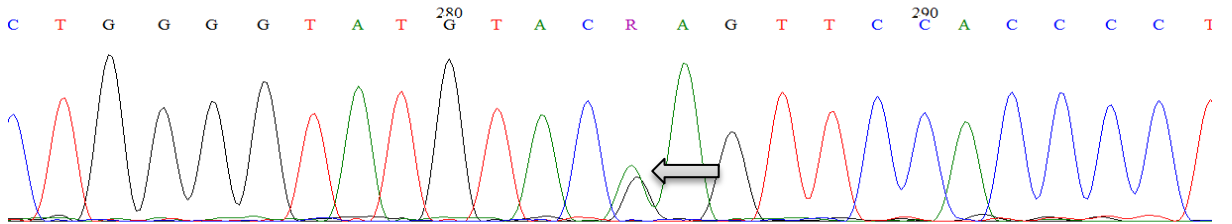
Ek Çizelge C.5. BoLA-DQB-E2 Nükleotid konsensüs dizileri (374 bç), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.



YK4 GACCAGATTCATCTACAACCAGGAGGAGACCGCATACTATGACAGTGACGTGGGAGAGTA
 YK5 GACCAGATTCATCTACAACCAGGAGGAGACCGCATACTATGACAGTGACGTGGGAGAGTA
 YK9 GACCAGATTCATCTACAACCAGGAGGAGACCGCATACTATGACAGTGACGTGGGAGAGTA
 YK11 GACCAGATTCATCTACAACCAGGAGGAGACCGCATACTATGACAGTGACGTGGGAGAGTA
 YK13 GACCAGATTCATCTACAACCAGGAGGAGACCGCATACTATGACAGTGACGTGGGAGAGTA
 YK14 GACCAGATTCATCTACAACCAGGAGGAGACCGCATACTATGACAGTGACGTGGGAGAGTA

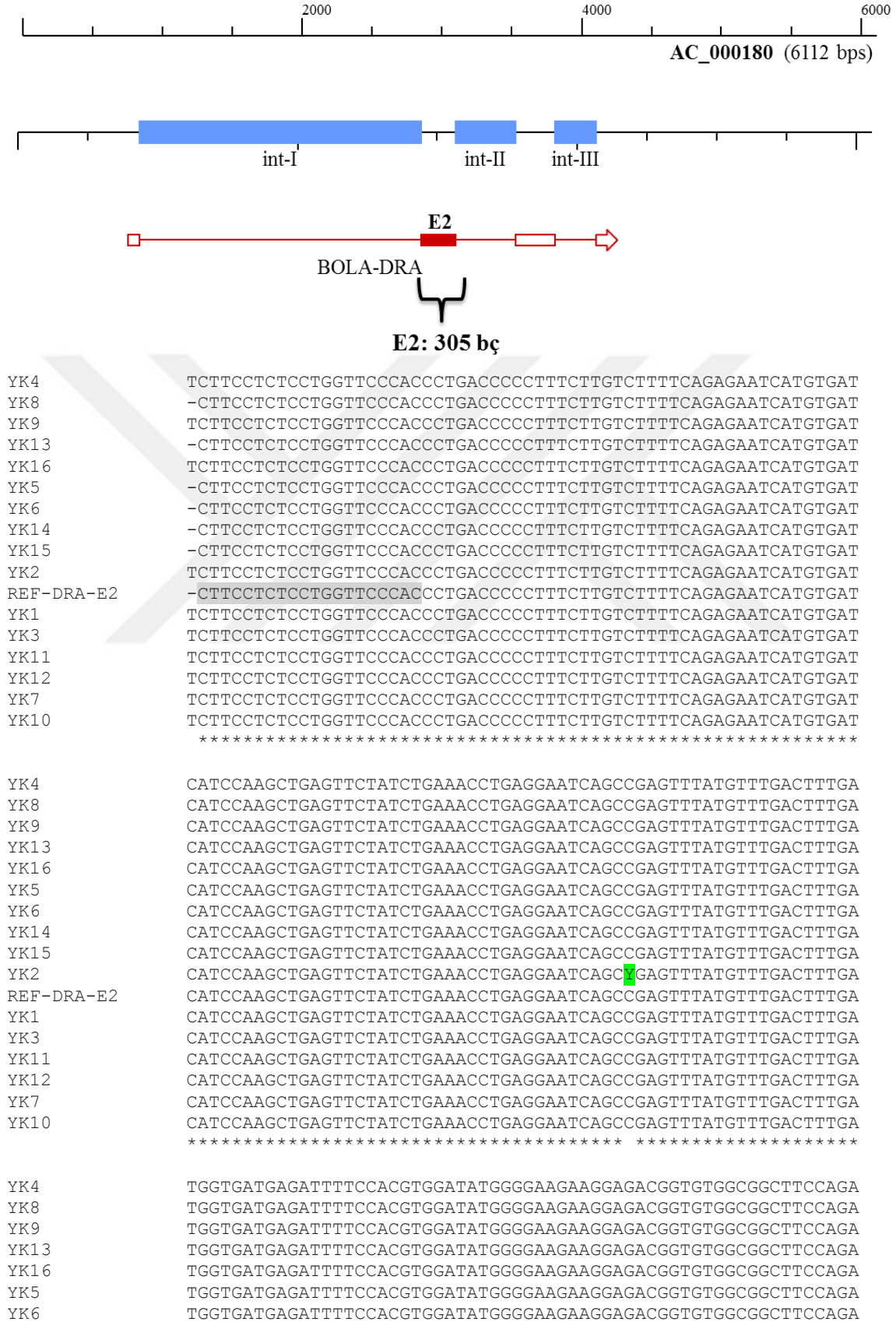
YK12 CCTGGAGCAGACACGGGCGGAGCTGGACACGGTGTGCAGACACAATTACCAGCTGGAGGT
 YK16 CCTGGAGCAGACACGGGCGGAGCTGGACACGGTGTGCAGACACAATTACCAGCTGGAGGT
 YK7 CCTGGAGCAGACACGGGCGGAGCTGGACACGGTGTGCAGACACAATTACCAGCTGGAGGT
 YK10 CCTGGAGCAGACACGGGCGGAGCTGGACACGGTGTGCAGACACAATTACCAGCTGGAGGT
 YK3 CCTGGAGCAGACACGGGCGGAGCTGGACACGGTGTGCAGACACAATTACCAGCTGGAGGT
 REF-DQB-E2 CCTGGAGCAGACACGGGCGGAGCTGGACACGGTGTGCAGACACAATTACCAGCTGGAGGT
 YK8 CCTGGAGCAGACACGGGCGGAGCTGGACACGGTGTGCAGACACAATTACCAGCTGGAGGT
 YK6 CCTGGAGCAGACACGGGCGGAGCTGGACACGGTGTGCAACACAATTACCAGCTGGAGGT
 YK1 CCTGGAGCAGACACGGGCGGAGCTGGACACGGTGTGCAGACACAATTACCAGCTGGAGGT
 YK15 CCTGGAGCAGACACGGGCGGAGCTGGACACGGTGTGCAGACACAATTACCAGCTGGAGGT
 YK2 CCTGGAGCAGACACGGGCGGAGCTGGACACGGTGTGCAGACACAATTACCAGCTGGAGGT
 YK4 CCTGGAGCAGACACGGGCGGAGCTGGACACGGTGTGCAGACACAATTACCAGCTGGAGGT
 YK5 CCTGGAGCAGACACGGGCGGAGCTGGACACGGTGTGCAGACACAATTACCAGCTGGAGGT
 YK9 CCTGGAGCAGACACGGGCGGAGCTGGACACGGTGTGCAGACACAATTACCAGCTGGAGGT
 YK11 CCTGGAGCAGACACGGGCGGAGCTGGACACGGTGTGCAGACACAATTACCAGCTGGAGGT
 YK13 CCTGGAGCAGACACGGGCGGAGCTGGACACGGTGTGCAGACACAATTACCAGCTGGAGGT
 YK14 CCTGGAGCAGACACGGGCGGAGCTGGACACGGTGTGCAGACACAATTACCAGCTGGAGGT

YK12 CATCACGTCCTTGACGCGCCAAGGTGAGTGCCTGCCCGGCCCTCCACCCAGATTCCGAG
 YK16 CATCACGTCCTTGACGCGCCAAGGTGAGTGCCTGCCCGGCCCTCCACCCAGATTCCGAG
 YK7 CATCACGTCCTTGACGCGCCAAGGTGAGTGCCTGCCCGGCCCTCCACCCAGATTCCGAG
 YK10 CATCACGTCCTTGACGCGCCAAGGTGAGTGCCTGCCCGGCCCTCCACCCAGATTCCGAG
 YK3 CATCACGTCCTTGACGCGCCAAGGTGAGTGCCTGCCCGGCCCTCCACCCAGATTCCGAG
 REF-DQB-E2 CATCACGTCCTTGACGCGCCAAGGTGAGTGCCTGCCCGGCCCTCCACCCAGATTCCGAG
 YK8 CATCACGTCCTTGACGCGCCAAGGTGAGTGCCTGCCCGGCCCTCCACCCAGATTCCGAG
 YK6 CATCACGTCCTTGACGCGCCAAGGTGAGTGCCTGCCCGGCCCTCCACCCAGATTCCGAG
 YK1 CATCACGTCCTTGACGCGCCAAGGTGAGTGCCTGCCCGGCCCTCCACCCAGATTCCGAG
 YK15 CATCACGTCCTTGACGCGCCAAGGTGAGTGCCTGCCCGGCCCTCCACCCAGATTCCGAG
 YK2 CATCACGTCCTTGACGCGCCAAGGTGAGTGCCTGCCCGGCCCTCCACCCAGATTCCGAG
 YK4 CATCACGTCCTTGACGCGCCAAGGTGAGTGCCTGCCCGGCCCTCCACCCAGATTCCGAG
 YK5 CATCACGTCCTTGACGCGCCAAGGTGAGTGCCTGCCCGGCCCTCCACCCAGATTCCGAG
 YK9 CATCACGTCCTTGACGCGCCAAGGTGAGTGCCTGCCCGGCCCTCCACCCAGATTCCGAG
 YK11 CATCACGTCCTTGACGCGCCAAGGTGAGTGCCTGCCCGGCCCTCCACCCAGATTCCGAG
 YK13 CATCACGTCCTTGACGCGCCAAGGTGAGTGCCTGCCCGGCCCTCCACCCAGATTCCGAG
 YK14 CATCACGTCCTTGACGCGCCAAGGTGAGTGCCTGCCCGGCCCTCCACCCAGATTCCGAG



*Mavi bölgeler intronları, kırmızılar ekzonları, yeşil renkli bölgeler heterozigot bölgeleri, gri renkle işaretli nükleotidler ileri primerleri ve sarı renkli olanlar geri primerler bölgelerini göstermektedir.

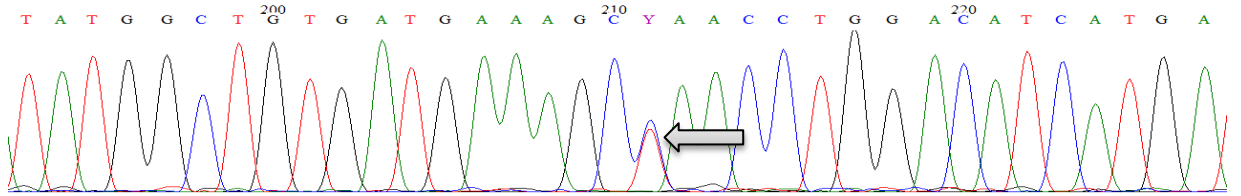
Ek Çizelge C.6. BoLA-DRA-E2 Nükleotid konsensüs dizileri (305 bç), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.



YK14 TGGTGATGAGATTTTCCACGTGGATATGGGGAAGAAGGAGACGGTGTGGCGGCTTCCAGA
 YK15 TGGTGATGAGATTTTCCACGTGGATATGGGGAAGAAGGAGACGGTGTGGCGGCTTCCAGA
 YK2 TGGTGATGAGATTTTCCACGTGGATATGGGGAAGAAGGAGACGGTGTGGCGGCTTCCAGA
 REF-DRA-E2 TGGTGATGAGATTTTCCACGTGGATATGGGGAAGAAGGAGACGGTGTGGCGGCTTCCAGA
 YK1 TGGTGATGAGATTTTCCACGTGGATATGGGGAAGAAGGAGACGGTGTGGCGGCTTCCAGA
 YK3 TGGTGATGAGATTTTCCACGTGGATATGGGGAAGAAGGAGACGGTGTGGCGGCTTCCAGA
 YK11 TGGTGATGAGATTTTCCACGTGGATATGGGGAAGAAGGAGACGGTGTGGCGGCTTCCAGA
 YK12 TGGTGATGAGATTTTCCACGTGGATATGGGGAAGAAGGAGACGGTGTGGCGGCTTCCAGA
 YK7 TGGTGATGAGATTTTCCACGTGGATATGGGGAAGAAGGAGACGGTGTGGCGGCTTCCAGA
 YK10 TGGTGATGAGATTTTCCACGTGGATATGGGGAAGAAGGAGACGGTGTGGCGGCTTCCAGA

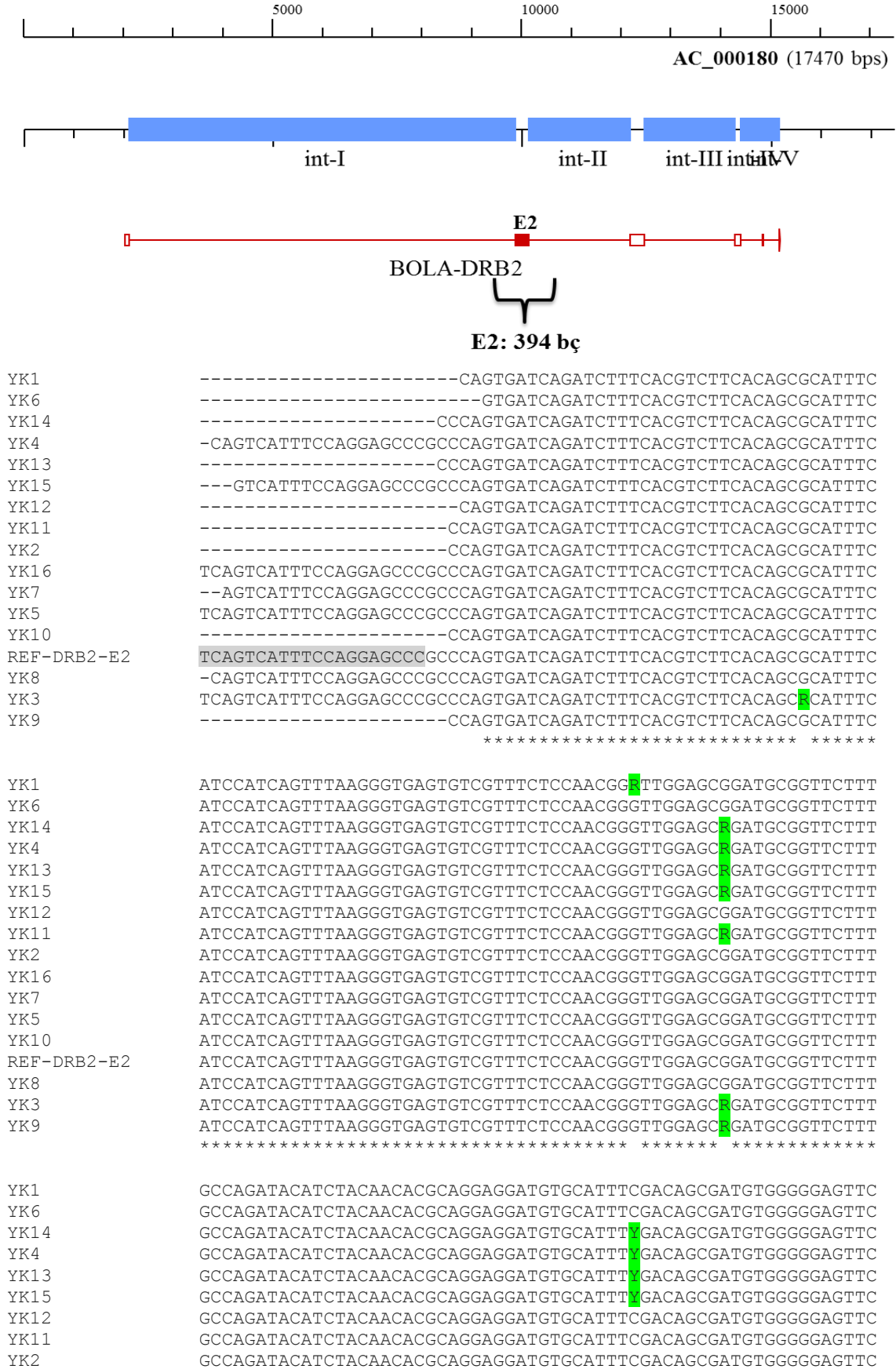
YK4 ATTTGGACATTTTGCCAGCTTTGAGGCTCAGGGTGCCCTGGCCAATATGGCTGTGATGAA
 YK8 ATTTGGACATTTTGCCAGCTTTGAGGCTCAGGGTGCCCTGGCCAATATGGCTGTGATGAA
 YK9 ATTTGGACATTTTGCCAGCTTTGAGGCTCAGGGTGCCCTGGCCAATATGGCTGTGATGAA
 YK13 ATTTGGACATTTTGCCAGCTTTGAGGCTCAGGGTGCCCTGGCCAATATGGCTGTGATGAA
 YK16 ATTTGGACATTTTGCCAGCTTTGAGGCTCAGGGTGCCCTGGCCAATATGGCTGTGATGAA
 YK5 ATTTGGACATTTTGCCAGCTTTGAGGCTCAGGGTGCCCTGGCCAATATGGCTGTGATGAA
 YK6 ATTTGGACATTTTGCCAGCTTTGAGGCTCAGGGTGCCCTGGCCAATATGGCTGTGATGAA
 YK14 ATTTGGACATTTTGCCAGCTTTGAGGCTCAGGGTGCCCTGGCCAATATGGCTGTGATGAA
 YK15 ATTTGGACATTTTGCCAGCTTTGAGGCTCAGGGTGCCCTGGCCAATATGGCTGTGATGAA
 YK2 ATTTGGACATTTTGCCAGCTTTGAGGCTCAGGGTGCCCTGGCCAATATGGCTGTGATGAA
 REF-DRA-E2 ATTTGGACATTTTGCCAGCTTTGAGGCTCAGGGTGCCCTGGCCAATATGGCTGTGATGAA
 YK1 ATTTGGACATTTTGCCAGCTTTGAGGCTCAGGGTGCCCTGGCCAATATGGCTGTGATGAA
 YK3 ATTTGGACATTTTGCCAGCTTTGAGGCTCAGGGTGCCCTGGCCAATATGGCTGTGATGAA
 YK11 ATTTGGACATTTTGCCAGCTTTGAGGCTCAGGGTGCCCTGGCCAATATGGCTGTGATGAA
 YK12 ATTTGGACATTTTGCCAGCTTTGAGGCTCAGGGTGCCCTGGCCAATATGGCTGTGATGAA
 YK7 ATTTGGACATTTTGCCAGCTTTGAGGCTCAGGGTGCCCTGGCCAATATGGCTGTGATGAA
 YK10 ATTTGGACATTTTGCCAGCTTTGAGGCTCAGGGTGCCCTGGCCAATATGGCTGTGATGAA

YK4 AGCCAACCTGGACATCATGATAAAGCGCTCCAACAACACCCCAAACACCAATGGTACCTC
 YK8 AGCCAACCTGGACATCATGATAAAGCGCTCCAACAACACCCCAAACACCAATGGTACCTC
 YK9 AGCCAACCTGGACATCATGATAAAGCGCTCCAACAACACCCCAAACACCAATGGTACCTC
 YK13 AGCCAACCTGGACATCATGATAAAGCGCTCCAACAACACCCCAAACACCAATGGTACCTC
 YK16 AGCCAACCTGGACATCATGATAAAGCGCTCCAACAACACCCCAAACACCAATGGTACCTC
 YK5 AGCCAACCTGGACATCATGATAAAGCGCTCCAACAACACCCCAAACACCAATGGTACCTC
 YK6 AGCCAACCTGGACATCATGATAAAGCGCTCCAACAACACCCCAAACACCAATGGTACCTC
 YK14 AGCCAACCTGGACATCATGATAAAGCGCTCCAACAACACCCCAAACACCAATGGTACCTC
 YK15 AGCCAACCTGGACATCATGATAAAGCGCTCCAACAACACCCCAAACACCAATGGTACCTC
 YK2 AGC AACCTGGACATCATGATAAAGCGCTCCAACAACACCCCAAACACCAATGGTACCTC
 REF-DRA-E2 AGCTAACCTGGACATCATGATAAAGCGCTCCCCCAAACA CCAATGGTACCTCTGCTCCA
 YK1 AGCTAACCTGGACATCATGATAAAGCGCTCCAACAACACCCCAAACACCAATGGTACCTC
 YK3 AGCTAACCTGGACATCATGATAAAGCGCTCCAACAACACCCCAAACACCAATGGTACCTC
 YK11 AGCTAACCTGGACATCATGATAAAGCGCTCCAACAACACCCCAAACACCAATGGTACCTC
 YK12 AGCTAACCTGGACATCATGATAAAGCGCTCCAACAACACCCCAAACACCAATGGTACCTC
 YK7 AGC AACCTGGACATCATGATAAAGCGCTCCAACAACACCCCAAACACCAATGGTACCTC
 YK10 AGC AACCTGGACATCATGATAAAGCGCTCCAACAACACCCCAAACACCAATGGTACCTC
 *** *****

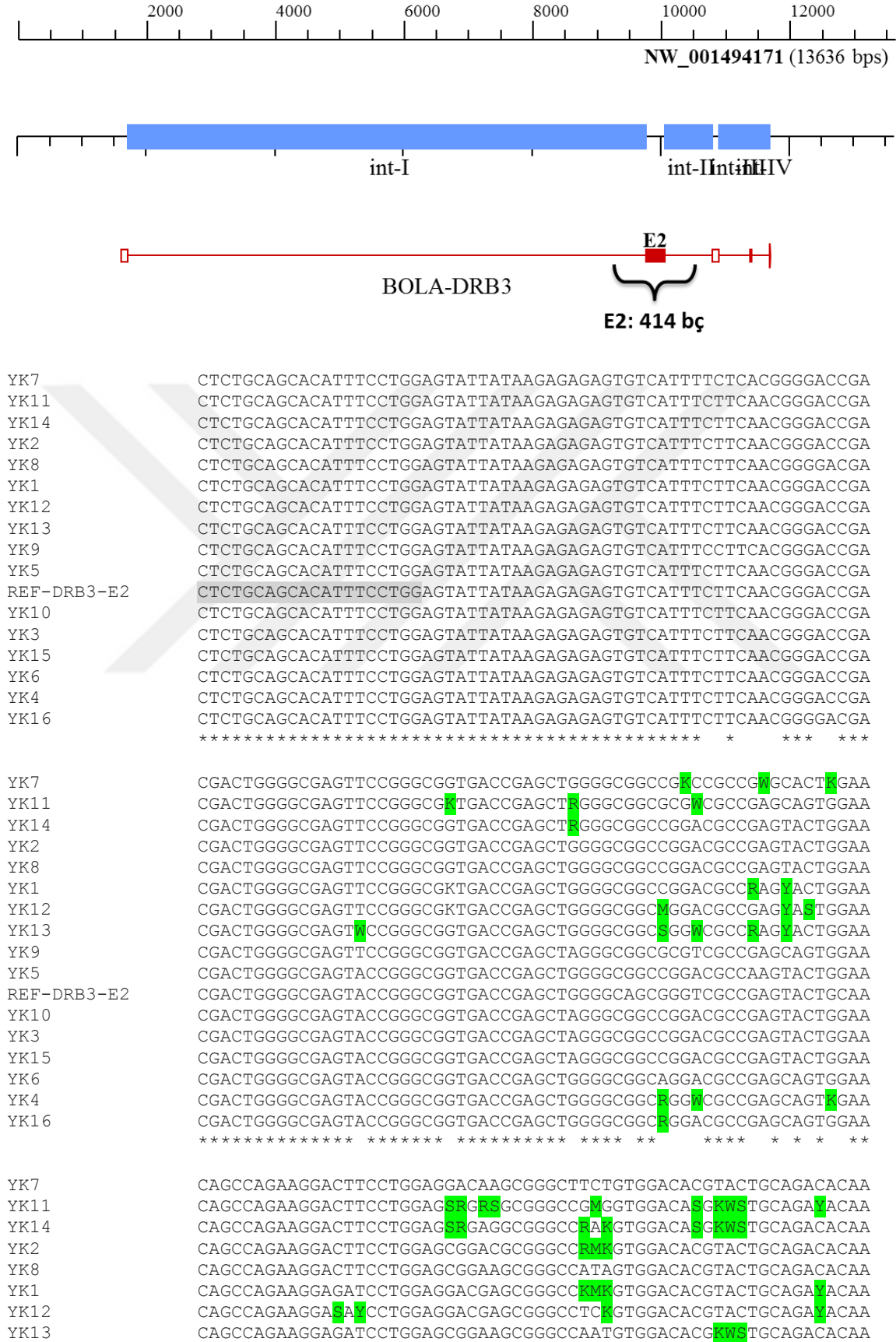


*Mavi bölgeler intronları, kırmızılar ekzonları, yeşil renkli bölgeler heterozigot bölgeleri, giri renkle işaretli nükleotidler ileri primerleri ve sarı renkli olanlar geri primerler bölgelerini göstermektedir.

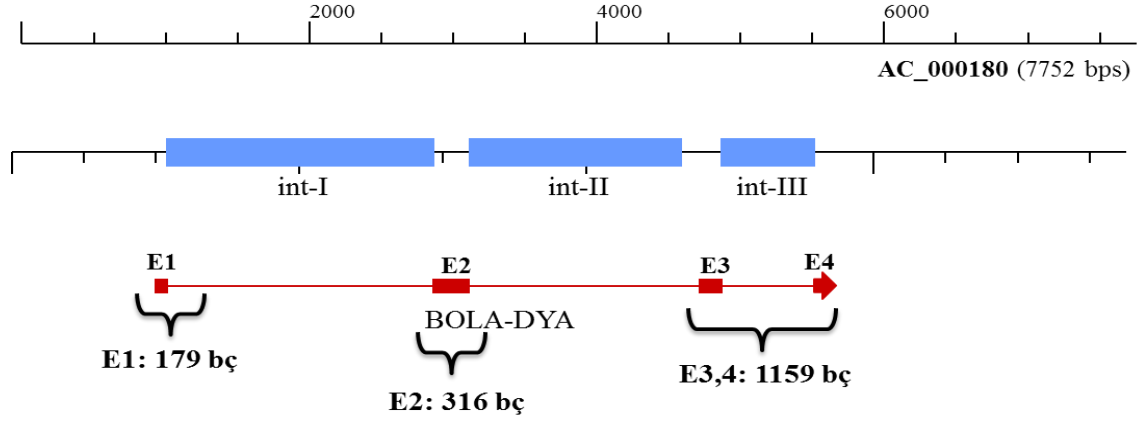
Ek Çizelge C.7. BoLA-DRB2-E2 Nükleotid konsensüs dizileri (394 bç), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.



Ek Çizelge C.8. BoLA-DRB3-E2 Nükleotid konsensüs dizileri (414 bç), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.



Ek Çizelge C.9. BoLA-DYA-E1, E2 ve E3,4 Nükleotid konsensüs dizileri (E1:179 bç, E2: 316 bç, E3,4: 1159 bç), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.



BoLA-DYA-E1 için

YK14	TGGAGGAGGAGGAGGATGAAGAAAGCTCTGATTCTGAGGGCTCTCACTCTGGCCACCATG
YK1	TGGAGGAGGAGGAGGATGAAGAAAGCTCTGATTCTGAGGGCTCTCACTCTGGCCACCATG
REF-DYA-E1	TGGAGGAGGAGGAGGATGAAGAAAGCTCTGATTCTGAGGGCTCTCACTCTGGCCACCATG
YK2	TGGAGGAGGAGGAGGATGAAGAAAGCTCTGATTCTGAGGGCTCTCACTCTGGCCACCATG
YK3	TGGAGGAGGAGGAGGATGAAGAAAGCTCTGATTCTGAGGGCTCTCACTCTGGCCACCATG
YK5	TGGAGGAGGAGGAGGATGAAGAAAGCTCTGATTCTGAGGGCTCTCACTCTGGCCACCATG
YK6	TGGAGGAGGAGGAGGATGAAGAAAGCTCTGATTCTGAGGGCTCTCACTCTGGCCACCATG
YK7	TGGAGGAGGAGGAGGATGAAGAAAGCTCTGATTCTGAGGGCTCTCACTCTGGCCACCATG
YK8	TGGAGGAGGAGGAGGATGAAGAAAGCTCTGATTCTGAGGGCTCTCACTCTGGCCACCATG
YK9	TGGAGGAGGAGGAGGATGAAGAAAGCTCTGATTCTGAGGGCTCTCACTCTGGCCACCATG
YK10	TGGAGGAGGAGGAGGATGAAGAAAGCTCTGATTCTGAGGGCTCTCACTCTGGCCACCATG
YK11	TGGAGGAGGAGGAGGATGAAGAAAGCTCTGATTCTGAGGGCTCTCACTCTGGCCACCATG
YK12	TGGAGGAGGAGGAGGATGAAGAAAGCTCTGATTCTGAGGGCTCTCACTCTGGCCACCATG
YK13	TGGAGGAGGAGGAGGATGAAGAAAGCTCTGATTCTGAGGGCTCTCACTCTGGCCACCATG
YK16	TGGAGGAGGAGGAGGATGAAGAAAGCTCTGATTCTGAGGGCTCTCACTCTGGCCACCATG
YK4	TGGAGGAGGAGGAGGATGAAGAAAGCTCTGATTCTGAGGGCTCTCACTCTGGCCACCATG
YK15	TGGAGGAGGAGGAGGATGAAGAAAGCTCTGATTCTGAGGGCTCTCACTCTGGCCACCATG

YK14	ACAATTGTGAAGAATTTTTAAATTTTTATTTTATATTGGAGTATGGTGGCTCAGATGGT
YK1	ACAATTGTGAAGAATTTTTAAATTTTTATTTTATATTGGAGTATGGTGGCTCAGATGGT
REF-DYA-E1	ACAATTGTGAAGAATTTTTAAATTTTTATTTTATATTGGAGTATGGTGGCTCAGATGGT
YK2	ACAATTGTGAAGAATTTTTAAATTTTTATTTTATATTGGAGTATGGTGGCTCAGATGGT
YK3	ACAATTGTGAAGAATTTTTAAATTTTTATTTTATATTGGAGTATGGTGGCTCAGATGGT
YK5	ACAATTGTGAAGAATTTTTAAATTTTTATTTTATATTGGAGTATGGTGGCTCAGATGGT
YK6	ACAATTGTGAAGAATTTTTAAATTTTTATTTTATATTGGAGTATGGTGGCTCAGATGGT
YK7	ACAATTGTGAAGAATTTTTAAATTTTTATTTTATATTGGAGTATGGTGGCTCAGATGGT
YK8	ACAATTGTGAAGAATTTTTAAATTTTTATTTTATATTGGAGTATGGTGGCTCAGATGGT
YK9	ACAATTGTGAAGAATTTTTAAATTTTTATTTTATATTGGAGTATGGTGGCTCAGATGGT
YK10	ACAATTGTGAAGAATTTTTAAATTTTTATTTTATATTGGAGTATGGTGGCTCAGATGGT
YK11	ACAATTGTGAAGAATTTTTAAATTTTTATTTTATATTGGAGTATGGTGGCTCAGATGGT
YK12	ACAATTGTGAAGAATTTTTAAATTTTTATTTTATATTGGAGTATGGTGGCTCAGATGGT
YK13	ACAATTGTGAAGAATTTTTAAATTTTTATTTTATATTGGAGTATGGTGGCTCAGATGGT
YK16	ACAATTGTGAAGAATTTTTAAATTTTTATTTTATATTGGAGTATGGTGGCTCAGATGGT
YK4	ACAATTGTGAAGAATTTTTAAATTTTTATTTTATATTGGAGTATGGTGGCTCAGATGGT
YK15	ACAATTGTGAAGAATTTTTAAATTTTTATTTTATATTGGAGTATGGTGGCTCAGATGGT

BoLA-DYA-E2 için

YK12	GTATCCTGCGTCCCTGTTCTTATCTTTCTGCTTTGGCGTGGCCACGACACCAGCTGACCAC
YK11	GTATCCTGCGTCCCTGTTCTTATCTTTCTGCTTTGGCGTGGCCACGACACCAGCTGACCAC
YK4	GTATCCTGCGTCCCTGTTCTTATCTTTCTGCTTTGGCGTGGCCACGACACCAGCTGACCAC
YK6	GTATCCTGCGTCCCTGTTCTTATCTTTCTGCTTTGGCGTGGCCACGACACCAGCTGACCAC
REF-DYA-E2	GTATCCTGCGTCCCTGTTCTTATCTTTCTGCTTTGGCGTGGCCACGACACCAGCTGACCAC
YK2	-TATCCTGCGTCCCTGTTCTTATCTTTCTGCTTTGGCGTGGCCACGACACCAGCTGACCAC
YK3	GTATCCTGCGTCCCTGTTCTTATCTTTCTGCTTTGGCGTGGCCACGACACCAGCTGACCAC

BoLA-DYA-E3,4 için

YK2 CAGAAGGCACAGTTGTCAGAAATTCCAATCCATCTTTGGTCTTCATTGTAGAAATCCCTG
REF-DYA-E3, 4 CAGAAGGCACAGTTGTCAGAAATTCCAATCCATCTTTGGTCTTCATTGTAGAAATCCCTG
YK3 CAGAAGGCACAGTTGTCAGAAATTCCAATCCATCTTTGGTCTTCATTGTAGAAATCCCTG
YK8 CAGAAGGCACAGTTGTCAGAAATTCCAATCCATCTTTGGTCTTCATTGTAGAAATCCCTG
YK14 CAGAAGGCACAGTTGTCAGAAATTCCAATCCATCTTTGGTCTTCATTGTAGAAATCCCTG
YK15 CAGAAGGCACAGTTGTCAGAAATTCCAATCCATCTTTGGTCTTCATTGTAGAAATCCCTG
YK5 CAGAAGGCACAGTTGTCAGAAATTCCAATCCATCTTTGGTCTTCATTGTAGAAATCCCTG
YK7 CAGAAGGCACAGTTGTCAGAAATTCCAATCCATCTTTGGTCTTCATTGTAGAAATCCCTG
YK11 CAGAAGGCACAGTTGTCAGAAATTCCAATCCATCTTTGGTCTTCATTGTAGAAATCCCTG
YK6 CAGAAGGCACAGTTGTCAGAAATTCCAATCCATCTTTGGTCTTCATTGTAGAAATCCCTG
YK1 CAGAAGGCACAGTTGTCAGAAATTCCAATCCATCTTTGGTCTTCATTGTAGAAATCCCTG
YK9 CAGAAGGCACAGTTGTCAGAAATTCCAATCCATCTTTGGTCTTCATTGTAGAAATCCCTG
YK4 CAGAAGGCACAGTTGTCAGAAATTCCAATCCATCTTTGGTCTTCATTGTAGAAATCCCTG
YK16 CAGAAGGCACAGTTGTCAGAAATTCCAATCCATCTTTGGTCTTCATTGTAGAAATCCCTG
YK12 CAGAAGGCACAGTTGTCAGAAATTCCAATCCATCTTTGGTCTTCATTGTAGAAATCCCTG
YK10 CAGAAGGCACAGTTGTCAGAAATTCCAATCCATCTTTGGTCTTCATTGTAGAAATCCCTG
YK13 CAGAAGGCACAGTTGTCAGAAATTCCAATCCATCTTTGGTCTTCATTGTAGAAATCCCTG

YK2 AAGTGGCTGTGTTTCCCAAATCCTCCGTGGTCTCGGGGATTCCCAATACCCTCATCTGTC
REF-DYA-E3, 4 AAGTGGCTGTGTTTCCCAAATCCTCCGTGGTCTCGGGGATTCCCAATACCCTCATCTGTC
YK3 AAGTGGCTGTGTTTCCCAAATCCTCCGTGGTCTCGGGGATTCCCAATACCCTCATCTGTC
YK8 AAGTGGCTGTGTTTCCCAAATCCTCCGTGGTCTCGGGGATTCCCAATACCCTCATCTGTC
YK14 AAGTGGCTGTGTTTCCCAAATCCTCCGTGGTCTCGGGGATTCCCAATACCCTCATCTGTC
YK15 AAGTGGCTGTGTTTCCCAAATCCTCCGTGGTCTCGGGGATTCCCAATACCCTCATCTGTC
YK5 AAGTGGCTGTGTTTCCCAAATCCTCCGTGGTCTCGGGGATTCCCAATACCCTCATCTGTC
YK7 AAGTGGCTGTGTTTCCCAAATCCTCCGTGGTCTCGGGGATTCCCAATACCCTCATCTGTC
YK11 AAGTGGCTGTGTTTCCCAAATCCTCCGTGGTCTCGGGGATTCCCAATACCCTCATCTGTC
YK6 AAGTGGCTGTGTTTCCCAAATCCTCYGTGGTCTCGGGGATTCCCAATACCCTCATCTGTC
YK1 GAGTGGCTGTGTTTCCCAAATCCTCYGTGGTCTCGGGGATTCCCAATACCCTCATCTGTC
YK9 AAGTGGCTGTGTTTCCCAAATCCTCCGTGGTCTCGGGGATTCCCAATACCCTCATCTGTC
YK4 AAGTGGCTGTGTTTCCCAAATCCTCCGTGGTCTCGGGGATTCCCAATACCCTCATCTGTC
YK16 AAGTGGCTGTGTTTCCCAAATCCTCCGTGGTCTCGGGGATTCCCAATACCCTCATCTGTC
YK12 AAGTGGCTGTGTTTCCCAAATCCTCCGTGGTCTCGGGGATTCCCAATACCCTCATCTGTC
YK10 AAGTGGCTGTGTTTCCCAAATCCTCYGTGGTCTCGGGGATTCCCAATACCCTCATCTGTC
YK13 AAGTGGCTGTGTTTCCCAAATCCTCYGTGGTCTCGGGGATTCCCAATACCCTCATCTGTC
***** ** ****

YK2 AAGTGGACAACATCTTTCCTCCTGTGATCAACATCWCCTTGGTTTTACAACGACACTTTG
REF-DYA-E3, 4 AAGTGGACAACATCTTTCCTCCTGTGATCAACATCACTTGGTTTTACAACGGACACTTTG
YK3 AAGTGGACAACATCTTTCCTCCTGTGATCAACATCACTTGGTTTTACAACGGACACTTTG
YK8 AAGTGGACAACATCTTTCCTCCTGTGATCAACATCACTTGGTTTTACAACGGACACTTTG
YK14 AAGTGGACAACATCTTTCCTCCTGTGATCAACATCACTTGGTTTTACAACGGACACTTTG
YK15 AAGTGGACAACATCTTTCCTCCTGTGATCAACATCACTTGGTTTTACAACGGACACTTTG
YK5 AAGTGGACAACATCTTTCCTCCTGTGATCAACATCACTTGGTTTTACAACGGACACTTTG
YK7 AAGTGGACAACATCTTTCCTCCTGTGATCAACATCACTTGGTTTTACAACGGACACTTTG
YK11 AAGTGGACAACATCTTTCCTCCTGTGATCAACATCACTTGGTTTTACAAYGGACACTTTG
YK6 AAGTGGACAACATCTTTCCTCCTGTGATCAACATCACTTGGTTTTACAATGGACACTTTG
YK1 AAGTGGACAACATCTTTCCTCCTGTGATCAACATCACTTGGTTTTACAAYGGACACTTTG
YK9 AAGTGGACAACATCTTTCCTCCTGTGATCAACATCACTTGGTTTTACAAYGGACACTTTG
YK4 AAGTGGACAACATCTTTCCTCCTGTGATCAACATCACTTGGTTTTACAAYGGACACTTTG
YK16 AAGTGGACAACATCTTTCCTCCTGTGATCAACATCACTTGGTTTTACAAYGGACACTTTG
YK12 AAGTGGACAACATCTTTCCTCCTGTGATCAACATCACTTGGTTTTACAAYGGACACTTTG
YK10 AAGTGGACAACATCTTTCCTCCTGTGATCAACATCACTTGGTTTTACAAYGGACACTTTG
YK13 AAGTGGACAACATCTTTCCTCCTGTGATCAACATCACTTGGTTTTACAAYGGACACTTTG

YK2 TTGCAGAAGGGATCGCTGAACCACCTTCTACCCCAAGAGTGACCACTCTTTCCTCAAGT
REF-DYA-E3, 4 TTGCAGAAGGGATCGCTGAGACCACCTTCTACCCCAAGAGTGACCACTCTTTCCTCAAGT
YK3 TTGCAGAAGGGATCGCTGAGACCACCTTCTACCCCAAGAGTGACCACTCTTTCCTCAAGT
YK8 TTGCAGAAGGGATCGCTGAGACCACCTTCTACCCCAAGAGTGACCACTCTTTCCTCAAGT
YK14 TTGCAGAAGGGATCGCTGAGACCACCTTCTACCCCAAGAGTGACCACTCTTTCCTCAAGT
YK15 TTGCAGAAGGGATCGCTGAGACCACCTTCTACCCCAAGAGTGACCACTCTTTCCTCAAGT
YK5 TTGCAGAAGGGATCGCTGAGACCACCTTCTACCCCAAGAGTGACCACTCTTTCCTCAAGT
YK7 TTGCAGAAGGGATCGCTGAGACCACCTTCTACCCCAAGAGTGACCACTCTTTCCTCAAGT
YK11 TTGCAGAAGGGATCGCTGAGACCACCTTCTACCCCAAGAGTGACCACTCTTTCCTCAAGT

YK6	TTGCAGAAGGGATCGCTGAGACCACCTTCTACCCCAAGAGTGACCACTCTTTCTCAAGT
YK1	TTGCAGAAGGGATCGCTGAGACCACCTTCTACCCCAAGAGTGACCACTCTTTCTCAAGT
YK9	TTGCAGAAGGGATCGCTGAGACCACCTTCTACCCCAAGAGTGACCACTCTTTCTCAAGT
YK4	TTGCAGAAGGGATCGCTGAGACCACCTTCTACCCCAAGAGTGACCACTCTTTCTCAAGT
YK16	TTGCAGAAGGGATCGCTGAGACCACCTTCTACCCCAAGAGTGACCACTCTTTCTCAAGT
YK12	TTGCAGAAGGGATCGCTGAGACCACCTTCTACCCCAAGAGTGACCACTCTTTCTCAAGT
YK10	TTGCAGAAGGGATCGCTGAGACCACCTTCTACCCCAAGAGTGACCACTCTTTCTCAAGT
YK13	TTGCAGAAGGGATCGCTGAGACCACCTTCTACCCCAAGAGTGACCACTCTTTCTCAAGT
	***** * *****
YK2	TCAGTTACCTCACCTTTCTTCCCTCCAGTGAAGACTTCTATGACTGCAGAGTGGAGCACT
REF-DYA-E3, 4	TCAGTTACCTCACCTTTCTTCCCTCCAGTGAAGACTTCTATGACTGCAGAGTGGAGCACT
YK3	TCAGTTACCTCACCTTTCTTCCCTCCAGTGAAGACTTCTATGACTGCAGAGTGGAGCACT
YK8	TCAGTTACCTCACCTTTCTTCCCTCCAGTGAAGACTTCTATGACTGCAGAGTGGAGCACT
YK14	TCAGTTACCTCACCTTTCTTCCCTCCAGTGAAGACTTCTATGACTGCAGAGTGGAGCACT
YK15	TCAGTTACCTCACCTTTCTTCCCTCCAGTGAAGACTTCTATGACTGCAGAGTGGAGCACT
YK5	TCAGTTACCTCACCTTTCTTCCCTCCAGTGAAGACTTCTATGACTGCAGAGTGGAGCACT
YK7	TCAGTTACCTCACCTTTCTTCCCTCCAGTGAAGACTTCTATGACTGCAGAGTGGAGCACT
YK11	TCAGTTACCTCACCTTTCTTCCCTCCAGTGAAGACTTCTATGACTGCAGAGTGGAGCACT
YK6	TCAGTTACCTCACCTTTCTTCCCTCCAGTGAAGACTTCTATGACTGCAGAGTGGAGCACT
YK1	TCAGTTACCTCACCTTTCTTCCCTCCAGTGAAGACTTCTATGACTGCAGAGTGGAGCACT
YK9	TCAGTTACCTCACCTTTCTTCCCTCCAGTGAAGACTTCTATGACTGCAGAGTGGAGCACT
YK4	TCAGTTACCTCACCTTTCTTCCCTCCAGTGAAGACTTCTATGACTGCAGAGTGGAGCACT
YK16	TCAGTTACCTCACCTTTCTTCCCTCCAGTGAAGACTTCTATGACTGCAGAGTGGAGCACT
YK12	TCAGTTACCTCACCTTTCTTCCCTCCAGTGAAGACTTCTATGACTGCAGAGTGGAGCACT
YK10	TCAGTTACCTCACCTTTCTTCCCTCCAGTGAAGACTTCTATGACTGCAGAGTGGAGCACT
YK13	TCAGTTACCTCACCTTTCTTCCCTCCAGTGAAGACTTCTATGACTGCAGAGTGGAGCACT
	***** *****
YK2	TCTCCACATCCAATTCACCTGCAGACAGTGTCTTCCGAATCCGGCTCCGGACTCTGAG
REF-DYA-E3, 4	TCTCCACATCCAATCCACCTGCAGACAGTGTCTTCCGAATCCGGCTCCGGACTCTGAG
YK3	TCTCCACATCCAATCCACCTGCAGACAGTGTCTTCCGAATCCGGCTCCGGACTCTGAG
YK8	TCTCCACATCCAATCCACCTGCAGACAGTGTCTTCCGAATCCGGCTCCGGACTCTGAG
YK14	TCTCCACATCCAATCCACCTGCAGACAGTGTCTTCCGAATCCGGCTCCGGACTCTGAG
YK15	TCTCCACATCCAATCCACCTGCAGACAGTGTCTTCCGAATCCGGCTCCGGACTCTGAG
YK5	TCTCCACATCCAATCCACCTGCAGACAGTGTCTTCCGAATCCGGCTCCGGACTCTGAG
YK7	TCTCCACATCCAATCCACCTGCAGACAGTGTCTTCCGAATCCGGCTCCGGACTCTGAG
YK11	TCTCCACATCCAATCCACCTGCAGACAGTGTCTTCCGAATCCGGCTCCGGACTCTGAG
YK6	TCTCCACATCCAATCCACCTGCAGACAGTGTCTTCCGAATCCGGCTCCGGACTCTGAG
YK1	TCTCCACATCCAATCCACCTGCAGACAGTGTCTTCCGAATCCGGCTCCGGACTCTGAG
YK9	TCTCCACATCCAATCCACCTGCAGACAGTGTCTTCCGAATCCGGCTCCGGACTCTGAG
YK4	TCTCCACATCCAATCCACCTGCAGACAGTGTCTTCCGAATCCGGCTCCGGACTCTGAG
YK16	TCTCCACATCCAATCCACCTGCAGACAGTGTCTTCCGAATCCGGCTCCGGACTCTGAG
YK12	TCTCCACATCCAATCCACCTGCAGACAGTGTCTTCCGAATCCGGCTCCGGACTCTGAG
YK10	TCTCCACATCCAATCCACCTGCAGACAGTGTCTTCCGAATCCGGCTCCGGACTCTGAG
YK13	TCTCCACATCCAATCCACCTGCAGACAGTGTCTTCCGAATCCGGCTCCGGACTCTGAG
	***** *****
YK2	ACTGAATCAAATCCTGGAGACAGGGTTTTGGGTGAAGTAGAAAGAACAGCTTTATTTCTT
REF-DYA-E3, 4	ACTGAATCAAATCCTGGAGACAGGGTTTTGGGTGAAGTAGAAAGAACAGCTTTATTTCTT
YK3	ACTGAATCAAATCCTGGAGACAGGGTTTTGGGTGAAGTAGAAAGAACAGCTTTATTTCTT
YK8	ACTGAATCAAATCCTGGAGACAGGGTTTTGGGTGAAGTAGAAAGAACAGCTTTATTTCTT
YK14	ACTGAATCAAATCCTGGAGACAGGGTTTTGGGTGAAGTAGAAAGAACAGCTTTATTTCTT
YK15	ACTGAATCAAATCCTGGAGACAGGGTTTTGGGTGAAGTAGAAAGAACAGCTTTATTTCTT
YK5	ACTGAATCAAATCCTGGAGACAGGGTTTTGGGTGAAGTAGAAAGAACAGCTTTATTTCTT
YK7	ACTGAATCAAATCCTGGAGACAGGGTTTTGGGTGAAGTAGAAAGAACAGCTTTATTTCTT
YK11	ACTGAATCAAATCCTGGAGACAGGGTTTTGGGTGAAGTAGAAAGAACAGCTTTATTTCTT
YK6	ACTGAATCAAATCCTGGAGACAGGGTTTTGGGTGAAGTAGAAAGAACAGCTTTATTTCTT
YK1	ACTGAATCAAATCCTGGAGACAGGGTTTTGGGTGAAGTAGAAAGAACAGCTTTATTTCTT
YK9	ACTGAATCAAATCCTGGAGACAGGGTTTTGGGTGAAGTAGAAAGAACAGCTTTATTTCTT
YK4	ACTGAATCAAATCCTGGAGACAGGGTTTTGGGTGAAGTAGAAAGAACAGCTTTATTTCTT
YK16	ACTGAATCAAATCCTGGAGACAGGGTTTTGGGTGAAGTAGAAAGAACAGCTTTATTTCTT
YK12	ACTGAATCAAATCCTGGAGACAGGGTTTTGGGTGAAGTAGAAAGAACAGCTTTATTTCTT
YK10	ACTGAATCAAATCCTGGAGACAGGGTTTTGGGTGAAGTAGAAAGAACAGCTTTATTTCTT
YK13	ACTGAATCAAATCCTGGAGACAGGGTTTTGGGTGAAGTAGAAAGAACAGCTTTATTTCTT
	***** *****
YK2	TGCCAGGCAAAGGGGGCCCCAGTGGACTACAGCTCTCAAAACTGTGTGTCCCCACCCGGA

REF-DYA-E3, 4	TGCCAGGCAAAGGGGGCCCCAGTGGACTACAGCTCTCAAAACTGTGTGTCCCCACCCGGA
YK3	TGCCAGGCAAAGGGGGCCCCAGTGGACTACAGCTCTCAAAACTGTGTGTCCCCACCCGGA
YK8	TGCCAGGCAAAGGGGGCCCCAGTGGACTACAGCTCTCAAAACTGTGTGTCCCCACCCGGA
YK14	TGCCAGGCAAAGGGGGCCCCAGTGGACTACAGCTCTCAAAACTGTGTGTCCCCACCCGGA
YK15	TGCCAGGCAAAGGGGGCCCCAGTGGACTACAGCTCTCAAAACTGTGTGTCCCCACCCGGA
YK5	TGCCAGGCAAAGGGGGCCCCAGTGGACTACAGCTCTCAAAACTGTGTGTCCCCACCCGGA
YK7	TGCCAGGCAAAGGGGGCCCCAGTGGACTACAGCTCTCAAAACTGTGTGTCCCCACCCGGA
YK11	TGCCAGGCAAAGGGGGCCCCAGTGGACTACAGCTCTCAAAACTGTGTGTCCCCACCCGGA
YK6	TGCCAGGCAAAGGGGGCCCCAGTGGACTACAGCTCTCAAAACTGTGTGTCCCCACCCGGA
YK1	TGCCAGGCAAAGGGGGCCCCAGTGGACTACAGCTCTCAAAACTGTGTGTCCCCACCCGGA
YK9	TGCCAGGCAAAGGGGGCCCCAGTGGACTACAGCTCTCAAAACTGTGTGTCCCCACCCGGA
YK4	TGCCAGGCAAAGGGGGCCCCAGTGGACTACAGCTCTCAAAACTGTGTGTCCCCACCCGGA
YK16	TGCCAGGCAAAGGGGGCCCCAGTGGACTACAGCTCTCAAAACTGTGTGTCCCCACCCGGA
YK12	TGCCAGGCAAAGGGGGCCCCAGTGGACTACAGCTCTCAAAACTGTGTGTCCCCACCCGGA
YK10	TGCCAGGCAAAGGGGGCCCCAGTGGACTACAGCTCTCAAAACTGTGTGTCCCCACCCGGA
YK13	TGCCAGGCAAAGGGGGCCCCAGTGGACTACAGCTCTCAAAACTGTGTGTCCCCACCCGGA

```

YK2      TTTCTCCACCGGTTGGAGATTTCAACAACAGCTCAAAGACAGTGCTGTGTGT
REF-DYA-E3,4 TTTCTCCACCGGTTGGAGATTTCAACAACAGCTCAAAGACAGTGCTGTGTGT
YK3      TTTCTCCACCGGTTGGAGATTTCAACAACAGCTCAAAGACAGTGCTGTGTGT
YK8      TTTCTCCACCGGTTGGAGATTTCAACAACAGCTCAAAGACAGTGCTGTGTGT
YK14     TTTCTCCACCGGTTGGAGATTTCAACAACAGCTCAAAGACAGTGCTGTGTGT
YK15     TTTCTCCACCGGTTGGAGATTTCAACAACAGCTCAAAGACAGTGCTGTGTGT
YK5      TTTCTCCACCGGTTGGAGATTTCAACAACAGCTCAAAGACAGTGCTGTGTGT
YK7      TTTCTCCACCGGTTGGAGATTTCAACAACAGCTCAAAGACAGTGCTGTGTGT
YK11     TTTCTCCACCGGTTGGAGATTTCAACAACAGCTCAAAGACAGTGCTGTGTGT
YK6      TTTCTCCACCGGTTGGAGATTTCAACAACAGCTCAAAGACAGTGCTGTGTGT
YK1      TTTCTCCACCGGTTGGAGATTTCAACAACAGCTCAAAGACAGTGCTGTGTGT
YK9      TTTCTCCACCGGTTGGAGATTTCAACAACAGCTCAAAGACAGTGCTGTGTGT
YK4      TTTCTCCACCGGTTGGAGATTTCAACAACAGCTCAAAGACAGTGCTGTGTGT
YK16     TTTCTCCACCGGTTGGAGATTTCAACAACAGCTCAAAGACAGTGCTGTGTGT
YK12     TTTCTCCACCGGTTGGAGATTTCAACAACAGCTCAAAGACAGTGCTGTGTGT
YK10     TTTCTCCACCGGTTGGAGATTTCAACAACAGCTCAAAGACAGTGCTGTGTGT
YK13     TTTCTCCACCGGTTGGAGATTTCAACAACAGCTCAAAGACAGTGCTGTGTGT
*****

```


YK4	ATCCCTTGACGGGGAACCAGGACCCTGCCCCAAGACCACTACAGTTTCTTAAGTCTCCT
YK16	ATCCCTTGACGGGGAACCAGGACCCTGCCCCAAGACCACTACAGTTTCTTAAGTCTCCT
YK12	ATCCCTTGACGGGGAACCAGGACCCTGCCCCAAGACCACTACAGTTTCTTAAGTCTCCT
YK10	ATCCCTTGACGGGGAACCAGGACCCTGCCCCAAGACCACTACAGTTTCTTAAGTCTCCT
YK13	ATCCCTTGACGGGGAACCAGGACCCTGCCCCAAGACCACTACAGTTTCTTAAGTCTCCT

YK2	CCTGTGTCTCCACATCCCCTCCCTTCCCTGAATAACATCTGTTT
REF-DYA-E3, 4	CCTGTGTCTCCACATCCCCTCCCTTCCCTGAATAACATCTGTTT
YK3	CCTGTGTCTCCACATCCCCTCCCTTCCCTGAATAACATCTGTTT
YK8	CCTGTGTCTCCACATCCCCTCCCTTCCCTGAATAACATCTGTTT
YK14	CCTGTGTCTCCACATCCCCTCCCTTCCCTGAATAACATCTGTTT
YK15	CCTGTGTCTCCACATCCCCTCCCTTCCCTGAATAACATCTGTTT
YK5	CCTGTGTCTCCACATCCCCTCCCTTCCCTGAATAACATCTGTTT
YK7	CCTGTGTCTCCACATCCCCTCCCTTCCCTGAATAACATCTGTTT
YK11	CCCGTGTCTCCACATCCCCTCCCTTCCCTGAATAACATCTGTTT
YK6	CCCGTGTCTCCACATCCCCTCCCTTCCCTGAATAACATCTGTTT
YK1	CCCGTGTCTCCACATCCCCTCCCTTCCCTGAATAACATCTGTTT
YK9	CCCGTGTCTCCACATCCCCTCCCTTCCCTGAATAACATCTGTTT
YK4	CCCGTGTCTCCACATCCCCTCCCTTCCCTGAATAACATCTGTTT
YK16	CCCGTGTCTCCACATCCCCTCCCTTCCCTGAATAACATCTGTTT
YK12	CCTGTGTCTCCACATCCCCTCCCTTCCCTGAATAACATCTGTTT
YK10	CCTGTGTCTCCACATCCCCTCCCTTCCCTGAATAACATCTGTTT
YK13	CCTGTGTCTCCACATCCCCTCCCTTCCCTGAATAACATCTGTTT
	** *****
YK2	CTCAGAGAGGTCACGGAGGCTGAATGAAGCCCGTTTCCTGCAACAAGAAACGGGGAGAC
REF-DYA-E3, 4	CTCAGAGAGGTCACGGAGGCTGAATGAAGCCCGTTTCCTGCAACAAGAAACGGGGAGAC
YK3	CTCAGAGAGGTCACGGAGGCTGAATGAAGCCCGTTTCCTGCAACAAGAAACGGGGAGAC
YK8	CTCAGAGAGGTCACGGAGGCTGAATGAAGCCCGTTTCCTGCAACAAGAAACGGGGAGAC
YK14	CTCAGAGAGGTCACGGAGGCTGAATGAAGCCCGTTTCCTGCAACAAGAAACGGGGAGAC
YK15	CTCAGAGAGGTCACGGAGGCTGAATGAAGCCCGTTTCCTGCAACAAGAAACGGGGAGAC
YK5	CTCAGAGAGGTCACGGAGGCTGAATGAAGCCCGTTTCCTGCAACAAGAAACGGGGAGAC
YK7	CTCAGAGAGGTCACGGAGGCTGAATGAAGCCCGTTTCCTGCAACAAGAAACGGGGAGAC
YK11	CTCAGAGAGGTCATGGAGGCTGAATGAAGCCCGTTTCCTGCAACAAGAAACGGGGAGAC
YK6	CTCAGAGAGGTCATGGAGGCTGAATGAAGCCCGTTTCCTGCAACAAGAAACGGGGAGAC
YK1	CTCAGAGAGGTCATGGAGGCTGAATGAAGCCCGTTTCCTGCAACAAGAAACGGGGAGAC
YK9	CTCAGAGAGGTCATGGAGGCTGAATGAAGCCCGTTTCCTGCAACAAGAAACGGGGAGAC
YK4	CTCAGAGAGGTCATGGAGGCTGAATGAAGCCCGTTTCCTGCAACAAGAAACGGGGAGAC
YK16	CTCAGAGAGGTCATGGAGGCTGAATGAAGCCCGTTTCCTGCAACAAGAAACGGGGAGAC
YK12	CTCAGAGAGGTCATGGAGGCTGAATGAAGCCCGTTTCCTGCAACAAGAAACGGGGAGAC
YK10	CTCAGAGAGGTCATGGAGGCTGAATGAAGCCCGTTTCCTGCAACAAGAAACGGGGAGAC
YK13	CTCAGAGAGGTCATGGAGGCTGAATGAAGCCCGTTTCCTGCAACAAGAAACGGGGAGAC

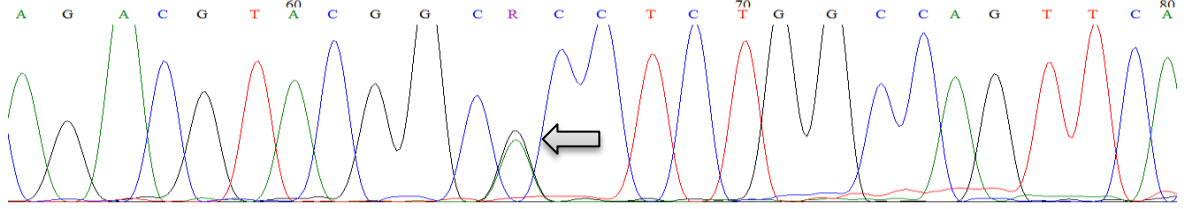
YK2	ACAAAAAGGCTTTTGTGCACAGGAGCATCACAAGACCCTGCTCAGTATCACTTTGACCCT
REF-DYA-E3, 4	ACAAAAAGGCTTTTGTGCACAGGAGCATCACAAGACCCTGCTCAGTATCACTTTGACCCT
YK3	ACAAAAAGGCTTTTGTGCACAGGAGCATCACAAGACCCTGCTCAGTATCACTTTGACCCT
YK8	ACAAAAAGGCTTTTGTGCACAGGAGCATCACAAGACCCTGCTCAGTATCACTTTGACCCT
YK14	ACAAAAAGGCTTTTGTGCACAGGAGCATCACAAGACCCTGCTCAGTATCACTTTGACCCT
YK15	ACAAAAAGGCTTTTGTGCACAGGAGCATCACAAGACCCTGCTCAGTATCACTTTGACCCT
YK5	ACAAAAAGGCTTTTGTGCACAGGAGCATCACAAGACCCTGCTCAGTATCACTTTGACCCT
YK7	ACAAAAAGGCTTTTGTGCACAGGAGCATCACAAGACCCTGCTCAGTATCACTTTGACCCT
YK11	ACAAAAAGGCTTTTGTGCACAGGAGCATCACAAGACCCTGCTCAGTATCACTTTGACCCT
YK6	ACAAAAAGGCTTTTGTGCACAGGAGCATCACAAGACCCTGCTCAGTATCACTTTGACCCT
YK1	ACAAAAAGGCTTTTGTGCACAGGAGCATCACAAGACCCTGCTCAGTATCACTTTGACCCT
YK9	ACAAAAAGGCTTTTGTGCACAGGAGCATCACAAGACCCTGCTCAGTATCACTTTGACCCT
YK4	ACAAAAAGGCTTTTGTGCACAGGAGCATCACAAGACCCTGCTCAGTATCACTTTGACCCT
YK16	ACAAAAAGGCTTTTGTGCACAGGAGCATCACAAGACCCTGCTCAGTATCACTTTGACCCT
YK12	ACAAAAAGGCTTTTGTGCACAGGAGCATCACAAGACCCTGCTCAGTATCACTTTGACCCT
YK10	ACAAAAAGGCTTTTGTGCACAGGAGCATCACAAGACCCTGCTCAGTATCACTTTGACCCT
YK13	ACAAAAAGGCTTTTGTGCACAGGAGCATCACAAGACCCTGCTCAGTATCACTTTGACCCT

YK2	TGTGGTCTGTGCCCTGGGGCTGGCCATGGGCCTCATGGGCATCGTGGTGGGCACTGTCTT
REF-DYA-E3, 4	TGTGGTCTGTGCCCTGGGGCTGGCCATGGGCCTCATGGGCATCGTGGTGGGCACTGTCTT
YK3	TGTGGTCTGTGCCCTGGGGCTGGCCATGGGCCTCATGGGCATCGTGGTGGGCACTGTCTT
YK8	TGTGGTCTGTGCCCTGGGGCTGGCCATGGGCCTCATGGGCATCGTGGTGGGCACTGTCTT

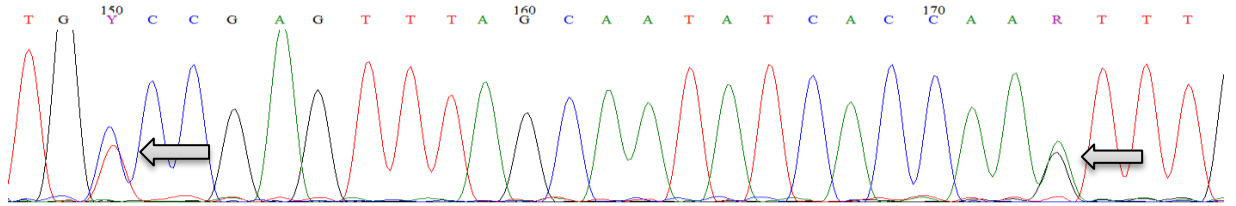
YK14 TGTGGTCTGTGCCCTGGGGCTGGCCATGGGCCTCATGGGCATCGTGGTGGGCACTGTCCT
YK15 TGTGGTCTGTGCCCTGGGGCTGGCCATGGGCCTCATGGGCATCGTGGTGGGCACTGTCCT
YK5 TGTGGTCTGTGCCCTGGGGCTGGCCATGGGCCTCATGGGCATCGTGGTGGGCACTGTCCT
YK7 TGTGGTCTGTGCCCTGGGGCTGGCCATGGGCCTCATGGGCATCGTGGTGGGCACTGTCCT
YK11 TGTGGTCTGTGCCCTGGGGCTGGCCATGGGCCTCATGGGCATCGTGGTGGGCACTGTCCT
YK6 TGTGGTCTGTGCCCTGGGGCTGGCCATGGGCCTCATGGGCATCGTGGTGGGCACTGTCCT
YK1 TGTGGTCTGTGCCCTGGGGCTGGCCATGGGCCTCATGGGCATCGTGGTGGGCACTGTCCT
YK9 TGTGGTCTGTGCCCTGGGGCTGGCCATGGGCCTCATGGGCATCGTGGTGGGCACTGTCCT
YK4 TGTGGTCTGTGCCCTGGGGCTGGCCATGGGCCTCATGGGCATCGTGGTGGGCACTGTCCT
YK16 TGTGGTCTGTGCCCTGGGGCTGGCCATGGGCCTCATGGGCATCGTGGTGGGCACTGTCCT
YK12 TGTGGTCTGTGCCCTGGGGCTGGCCATGGGCCTCATGGGCATCGTGGTGGGCACTGTCCT
YK10 TGTGGTCTGTGCCCTGGGGCTGGCCATGGGCCTCATGGGCATCGTGGTGGGCACTGTCCT
YK13 TGTGGTCTGTGCCCTGGGGCTGGCCATGGGCCTCATGGGCATCGTGGTGGGCACTGTCCT

YK2 GGCCTGAAAGATGGGAAGGT
REF-DYA-E3, 4 **GGCCTGAAAGATGGGAAGGT**
YK3 GGCCTGAAAGATGGGAAGGT
YK8 GGCCTGAAAGATGGGAAGGT
YK14 GGCCTGAAAGATGGGAAGGT
YK15 GGCCTGAAAGATGGGAAGGT
YK5 GGCCTGAAAGATGGGAAGGT
YK7 GGCCTGAAAGATGGGAAGGT
YK11 GGCCTGAAAGATGGGAAGGT
YK6 GGCCTGAAAGATGGGAAGGT
YK1 GGCCTGAAAGATGGGAAGGT
YK9 GGCCTGAAAGATGGGAAGGT
YK4 GGCCTGAAAGATGGGAAGGT
YK16 GGCCTGAAAGATGGGAAGGT
YK12 GGCCTGAAAGATGGGAAGGT
YK10 GGCCTGAAAGATGGGAAGGT
YK13 GGCCTGAAAGATGGGAAGGT

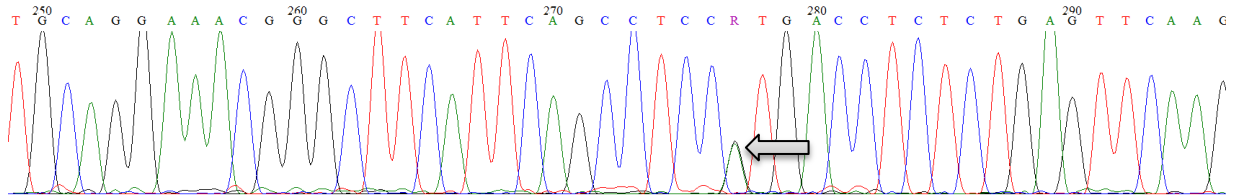
DYA-E1



DYA-E2

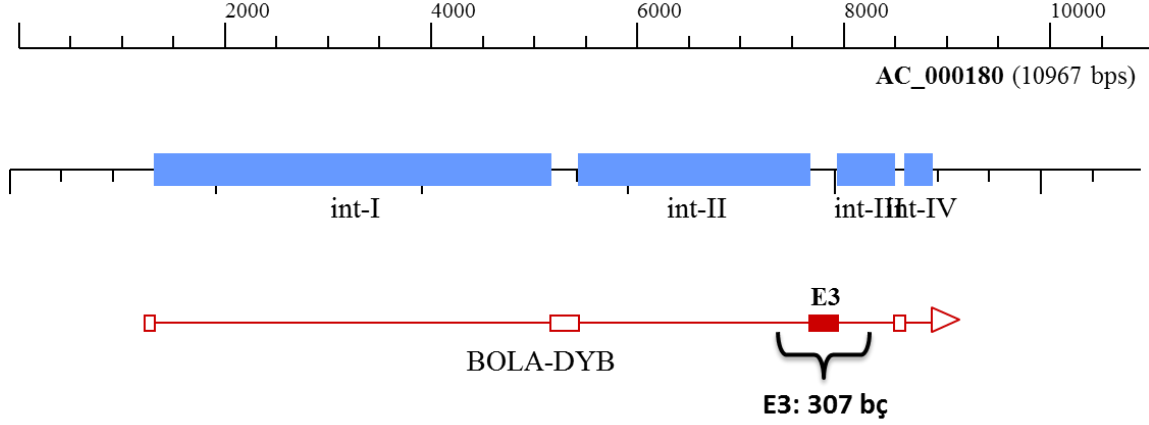


DYA-E3,4



*Mavi bölgeler intronları, kırmızılar ekzonları, yeşil renkli bölgeler heterozigot bölgeleri, gri renkle işaretli nükleotidler ileri primerleri ve sarı renkli olanlar geri primerler bölgelerini göstermektedir.

Ek Çizelge C.10. BoLA-DYB-E3 Nükleotid konsensüs dizileri (307 bç), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.



YK14	TGCTCTCGTTTCCTCCTAGTGGAGCCTACAGTGACTGTCTCTCCAGCCAGTACAGAGGCC
YK9	TGCTCTCGTTTCCTCCTAGTGGAGCCTACAGTGACTGTCTCTCCAGCCAGTACAGAGGCC
YK8	TGCTCTCGTTTCCTCCTAGTGGAGCCTACAGTGACTGTCTCTCCAGCCAGTACAGAGGCC
YK16	TGCTCTCGTTTCCTCCTAGTGGAGCCTACAGTGACTGTCTCTCCAGCCAGTACAGAGGCC
YK1	TGCTCTCGTTTCCTCCTAGTGGAGCCTACAGTGACTGTCTCTCCAGCCAGTACAGAGGCC
YK11	TGCTCTCGTTTCCTCCTAGTGGAGCCTACAGTGACTGTCTCTCCAGCCAGTACAGAGGCC
YK2	TGCTCTCGTTTCCTCCTAGTGGAGCCTACAGTGACTGTCTCTCCAGCCAGTACAGAGGCC
YK15	TGCTCTCGTTTCCTCCTAGTGGAGCCTACAGTGACTGTCTCTCCAGCCAGTACAGAGGCC
REF-DYB-E3	TGCTCTCGTTTCCTCCTAGTGGAGCCTACAGTGACTGTCTCTCCAGCCAGTACAGAGGCC
YK3	TGCTCTCGTTTCCTCCTAGTGGAGCCTACAGTGACTGTCTCTCCAGCCAGTACAGAGGCC
YK4	TGCTCTCGTTTCCTCCTAGTGGAGCCTACAGTGACTGTCTCTCCAGCCAGTACAGAGGCC
YK5	TGCTCTCGTTTCCTCCTAGTGGAGCCTACAGTGACTGTCTCTCCAGCCAGTACAGAGGCC
YK6	TGCTCTCGTTTCCTCCTAGTGGAGCCTACAGTGACTGTCTCTCCAGCCAGTACAGAGGCC
YK7	TGCTCTCGTTTCCTCCTAGTGGAGCCTACAGTGACTGTCTCTCCAGCCAGTACAGAGGCC
YK10	TGCTCTCGTTTCCTCCTAGTGGAGCCTACAGTGACTGTCTCTCCAGCCAGTACAGAGGCC
YK13	TGCTCTCGTTTCCTCCTAGTGGAGCCTACAGTGACTGTCTCTCCAGCCAGTACAGAGGCC
YK12	TGCTCTCGTTTCCTCCTAGTGGAGCCTACAGTGACTGTCTCTCCAGCCAGTACAGAGGCC

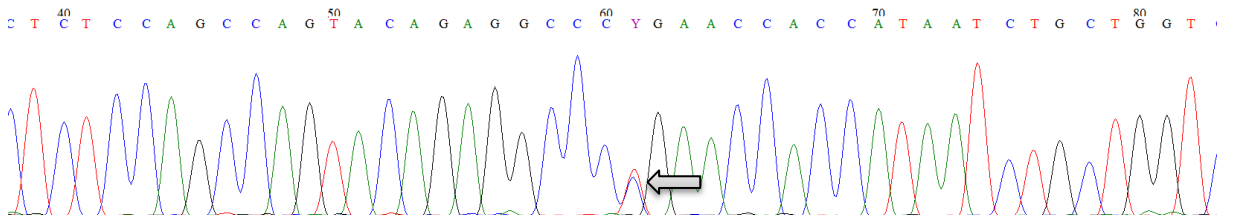
YK14	TGAACCAATAATCTGCTGGTCTGTTTCAGTGACAGATTTCTACCTCGCCAAGTTAAAG
YK9	TGAACCAATAATCTGCTGGTCTGTTTCAGTGACAGATTTCTACCTCGCCAAGTTAAAG
YK8	TGAACCAATAATCTGCTGGTCTGTTTCAGTGACAGATTTCTACCTCGCCAAGTTAAAG
YK16	TGAACCAATAATCTGCTGGTCTGTTTCAGTGACAGATTTCTACCTCGCCAAGTTAAAG
YK1	TGAACCAATAATCTGCTGGTCTGTTTCAGTGACAGATTTCTACCTCGCCAAGTTAAAG
YK11	TGAACCAATAATCTGCTGGTCTGTTTCAGTGACAGATTTCTACCTCGCCAAGTTAAAG
YK2	TGAACCAATAATCTGCTGGTCTGTTTCAGTGACAGATTTCTACCTCGCCAAGTTAAAG
YK15	TGAACCAATAATCTGCTGGTCTGTTTCAGTGACAGATTTCTACCTCGCCAAGTTAAAG
REF-DYB-E3	TGAACCAATAATCTGCTGGTCTGTTTCAGTGACAGATTTCTACCTCGCCAAGTTAAAG
YK3	TGAACCAATAATCTGCTGGTCTGTTTCAGTGACAGATTTCTACCTCGCCAAGTTAAAG
YK4	TGAACCAATAATCTGCTGGTCTGTTTCAGTGACAGATTTCTACCTCGCCAAGTTAAAG
YK5	TGAACCAATAATCTGCTGGTCTGTTTCAGTGACAGATTTCTACCTCGCCAAGTTAAAG
YK6	TGAACCAATAATCTGCTGGTCTGTTTCAGTGACAGATTTCTACCTCGCCAAGTTAAAG
YK7	TGAACCAATAATCTGCTGGTCTGTTTCAGTGACAGATTTCTACCTCGCCAAGTTAAAG
YK10	TGAACCAATAATCTGCTGGTCTGTTTCAGTGACAGATTTCTACCTCGCCAAGTTAAAG
YK13	TGAACCAATAATCTGCTGGTCTGTTTCAGTGACAGATTTCTACCTCGCCAAGTTAAAG
YK12	TGAACCAATAATCTGCTGGTCTGTTTCAGTGACAGATTTCTACCTCGCCAAGTTAAAG

YK14	TCAAATGGTTCCGGAATCAACAGGAGCAGACAGCTGGAGTTGGGTTACACCTCTTACTC
YK9	TCAAATGGTTCCGGAATCAACAGGAGCAGACAGCTGGAGTTGGGTTACACCTCTTACTC
YK8	TCAAATGGTTCCGGAATCAACAGGAGCAGACAGCTGGAGTTGGGTTACACCTCTTACTC
YK16	TCAAATGGTTCCGGAATCAACAGGAGCAGACAGCTGGAGTTGGGTTACACCTCTTACTC
YK1	TCAAATGGTTCCGGAATCAACAGGAGCAGACAGCTGGAGTTGGGTTACACCTCTTACTC
YK11	TCAAATGGTTCCGGAATCAACAGGAGCAGACAGCTGGAGTTGGGTTACACCTCTTACTC
YK2	TCAAATGGTTCCGGAATCAACAGGAGCAGACAGCTGGAGTTGGGTTACACCTCTTACTC
YK15	TCAAATGGTTCCGGAATCAACAGGAGCAGACAGCTGGAGTTGGGTTACACCTCTTACTC
REF-DYB-E3	TCAAATGGTTCCGGAATCAACAGGAGCAGACAGCTGGAGTTGGGTTACACCTCTTACTC

YK3 TCAAATGGTTCCGGAATCAACAGGAGCAGACAGCTGGAGTTGGGTTACACCTCTTACTC
 YK4 TCAAATGGTTCCGGAATCAACAGGAGCAGACAGCTGGAGTTGGGTTACACCTCTTACTC
 YK5 TCAAATGGTTCCGGAATCAACAGGAGCAGACAGCTGGAGTTGGGTTACACCTCTTACTC
 YK6 TCAAATGGTTCCGGAATCAACAGGAGCAGACAGCTGGAGTTGGGTTACACCTCTTACTC
 YK7 TCAAATGGTTCCGGAATCAACAGGAGCAGACAGCTGGAGTTGGGTTACACCTCTTACTC
 YK10 TCAAATGGTTCCGGAATCAACAGGAGCAGACAGCTGGAGTTGGGTTACACCTCTTACTC
 YK13 TCAAATGGTTCCGGAATCAACAGGAGCAGACAGCTGGAGTTGGGTTACACCTCTTACTC
 YK12 TCAAATGGTTCCGGAATCAACAGGAGCAGACAGCTGGAGTTGGGTTACACCTCTTACTC

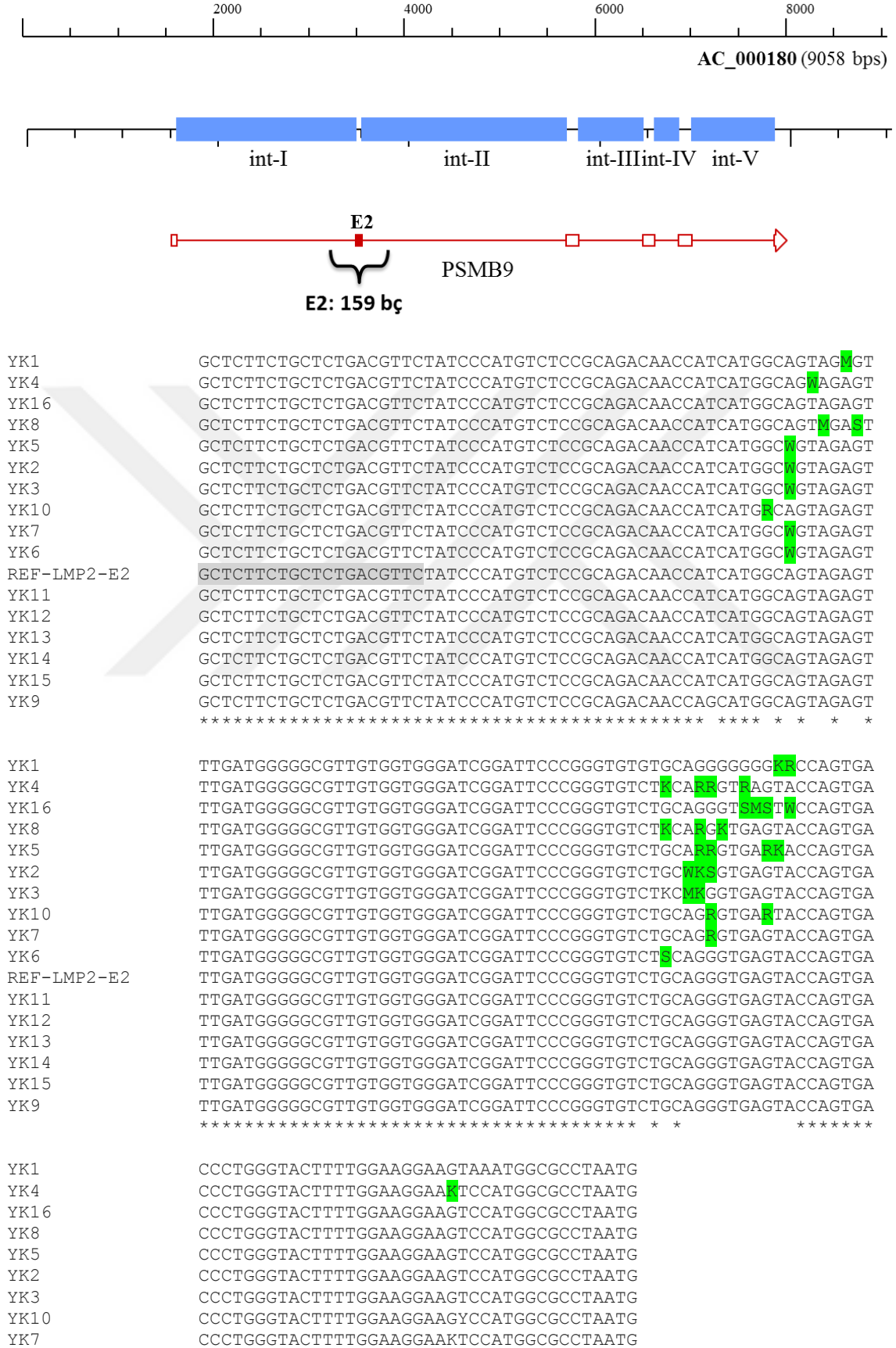
YK14 AGAATGGGGACTGGACCTACCAGATTCACGTGATGCTAGAGACAGTTCCACAGCTTGGAG
 YK9 AGAATGGGGACTGGACCTATCAGTTTCACGTGATGCTAGAGACAGTTCCACAGCTTGGAG
 YK8 AGAATGGGGACTGGACCTACCAGATTCACGTGATGCTAGAGACAGTTCCACAGCTTGGAG
 YK16 AGAATGGGGACTGGACCTACCAGATTCACGTGATGCTAGAGACAGTTCCACAGCTTGGAG
 YK1 AGAATGGGGACTGGACCTACCAGATTCACGTGATGCTAGAGACAGTTCCACAGCTTGGAG
 YK11 AGAATGGGGACTGGACCTACCAGATTCACGTGATGCTAGAGACAGTTCCACAGCTTGGAG
 YK2 AGAATGGGGACTGGACCTACCAGATTCACGTGATGCTAGAGACAGTTCCACAGCTTGGAG
 YK15 AGAATGGGGACTGGACCTACCAGATTCACGTGATGCTAGAGACAGTTCCACAGCTTGGAG
 REF-DYB-E3 AGAATGGGGACTGGACCTACCAGATTCACGTGATGCTAGAGACAGTTCCACAGCTTGGAG
 YK3 AGAATGGGGACTGGACCTACCAGATTCACGTGATGCTAGAGACAGTTCCACAGCTTGGAG
 YK4 AGAATGGGGACTGGACCTACCAGATTCACGTGATGCTAGAGACAGTTCCACAGCTTGGAG
 YK5 AGAATGGGGACTGGACCTACCAGATTCACGTGATGCTAGAGACAGTTCCACAGCTTGGAG
 YK6 AGAATGGGGACTGGACCTACCAGATTCACGTGATGCTAGAGACAGTTCCACAGCTTGGAG
 YK7 AGAATGGGGACTGGACCTACCAGATTCACGTGATGCTAGAGACAGTTCCACAGCTTGGAG
 YK10 AGAATGGGGACTGGACCTACCAGATTCACGTGATGCTAGAGACAGTTCCACAGCTTGGAG
 YK13 AGAATGGGGACTGGACCTACCAGATTCACGTGATGCTAGAGACAGTTCCACAGCTTGGAG
 YK12 AGAATGGGGACTGGACCTACCAGATTCACGTGATGCTAGAGACAGTTCCACAGCTTGGAG

YK14 AC**GTCTACGT**TTGCCACGTGGACCACCCAGCCTCCAGAGCCCCATCACAGTAGAATGGC
 YK9 ACTTGCCACGTGGACCACCCAGCCTCCAGAGCCCCATCACAGTAGAATGGCGTAAGGGC
 YK8 ACTTGCCACGTGGACCACCCAGCCTCCAGAGCCCCATCACAGTAGAATGGCGTAAGGGC
 YK16 ACTTGCCACGTGGACCACCCAGCCTCCAGAGCCCCATCACAGTAGAATGGCGTAAGGGC
 YK1 ACTTGCCACGTGGACCACCCAGCCTCCAGAGCCCCATCACAGTAGAATGGCGTAAGGGC
 YK11 ACTTGCCACGTGGACCACCCAGCCTCCAGAGCCCCATCACAGTAGAATGGCGTAAGGGC
 YK2 ACTTGCCACGTGGACCACCCAGCCTCCAGAGCCCCATCACAGTAGAATGGCGTAAGGGC
 YK15 ACTTGCCACGTGGACCACCCAGCCTCCAGAGCCCCATCACAGTAGAATGGCGTAAGGGC
 REF-DYB-E3 ACTTGCCACGTGGACCACCCAGCCTCCAGAGCCCCATCA**CAGTAGAATGGCGTAAGGGC**
 YK3 ACTTGCCACGTGGACCACCCAGCCTCCAGAGCCCCATCACAGTAGAATGGCGTAAGGGC
 YK4 ACTTGCCACGTGGACCACCCAGCCTCCAGAGCCCCATCACAGTAGAATGGCGTAAGGGC
 YK5 ACTTGCCACGTGGACCACCCAGCCTCCAGAGCCCCATCACAGTAGAATGGCGTAAGGGC
 YK6 ACTTGCCACGTGGACCACCCAGCCTCCAGAGCCCCATCACAGTAGAATGGCGTAAGGGC
 YK7 ACTTGCCACGTGGACCACCCAGCCTCCAGAGCCCCATCACAGTAGAATGGCGTAAGGGC
 YK10 ACTTGCCACGTGGACCACCCAGCCTCCAGAGCCCCATCACAGTAGAATGGCGTAAGGGC
 YK13 ACTTGCCACGTGGACCACCCAGCCTCCAGAGCCCCATCACAGTAGAATGGCGTAAGGGC
 YK12 ACTTGCCACGTGGACCACCCAGCCTCCAGAGCCCCATCACAGTAGAATGGCGTAAGGGC

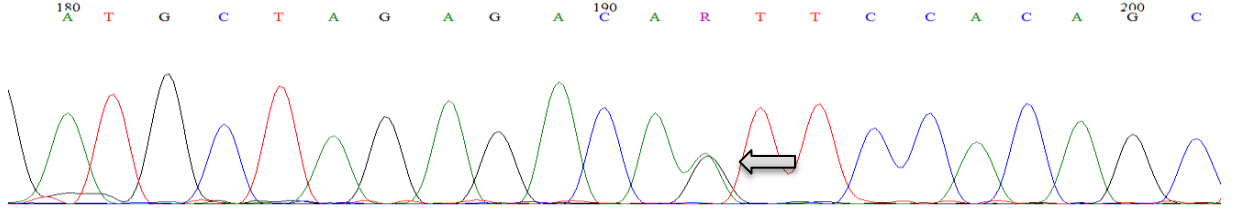


*Mavi bölgeler intronları, kırmızılar ekzonları, yeşil renkli bölgeler heterozigot bölgeleri, gri renkle işaretli nükleotidler ileri primerleri ve sarı renkli olanlar geri primerler bölgelerini göstermektedir.

Ek Çizelge C.11.1. BoLA-LMP2-E2 Nükleotid konsensüs dizileri (159 bp), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.

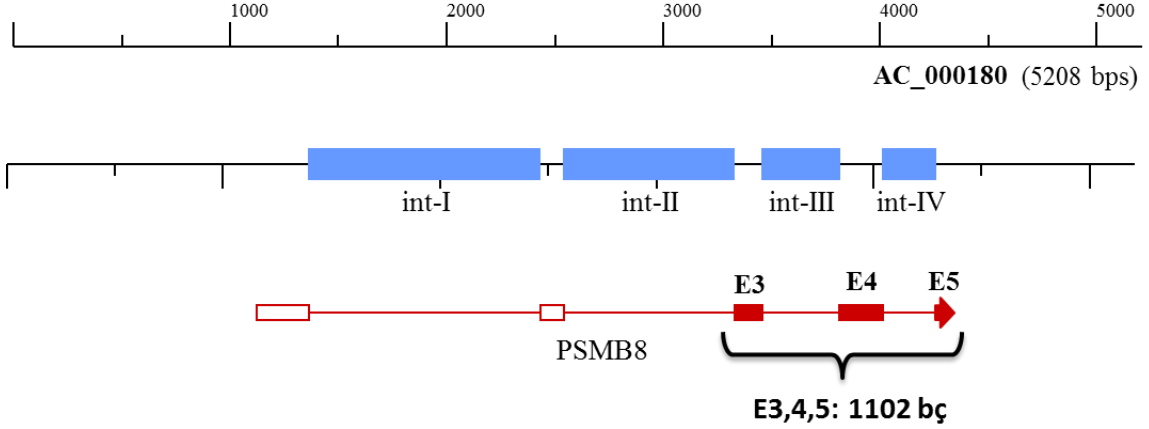


YK6	CCCTGGGTACTTTTGAAGGAAGTCCATGGCGCCTAATG
REF-LMP2-E2	CCCTGGGTACTTTTGAAGGAAGTCCATGGCGCCTAATG
YK11	CCCTGGGTACTTTTGAAGGAAGTCCATGGCGCCTAATG
YK12	CCCTGGGTACTTTTGAAGGAAGTCCATGGCGCCTAATG
YK13	CCCTGGGTACTTTTGAAGGAAGTCCATGGCGCCTAATG
YK14	CCCTGGGTACTTTTGAAGGAAGTCCATGGCGCCTAATG
YK15	CCCTGGGTACTTTTGAAGGAAGTCCATGGCGCCTAATG
YK9	CCCTGGGTACTTTTGAAGGAAGTCCATGGCGCCTAATG



*Mavi bölgeler intronları, kırmızılar ekzonları, yeşil renkli bölgeler heterozigot bölgeleri, gri renkle işaretli nükleotidler ileri primerleri ve sarı renkli olanlar geri primerler bölgelerini göstermektedir.

Ek Çizelge C.11.2. BoLA-LMP7-E3,4,5 Nükleotid konsensüs dizileri (1102 bç), gen bölgesinin genel görüntüsü, hedef ekzon dizileri, primer bölgeleri ve heterozigot allellerin kromatogram görüntüsü.



YK15	AACTCTCTCCCTGGACTGTCCGGTCCTCACCAGGCTGTACTATCTGCGGAATGGGGAGC
YK6	AACTCTCTCCCTGGACTGTCCGGTCCTCACCAGGCTGTACTATCTGCGGAATGGGGAGC
YK16	AACTCTCTCCCTGGACTGTCCGGTCCTCACCAGGCTGTACTATCTGCGGAATGGGGAGC
YK4	AACTCTCTCCCTGGACTGTCCGGTCCTCACCAGGCTGTACTATCTGCGGAATGGGGAGC
REF-LMP7-E3, 4, 5	AACTCTCTCCCTGGACTGTCCGGTCCTCACCAGGCTGTACTATCTGCGGAATGGGGAGC
YK1	AACTCTCTCCCTGGACTGTCCGGTCCTCACCAGGCTGTACTATCTGCGGAATGGGGAGC
YK2	AACTCTCTCCCTGGACTGTCCGGTCCTCACCAGGCTGTACTATCTGCGGAATGGGGAGC
YK3	AACTCTCTCCCTGGACTGTCCGGTCCTCACCAGGCTGTACTATCTGCGGAATGGGGAGC
YK5	AACTCTCTCCCTGGACTGTCCGGTCCTCACCAGGCTGTACTATCTGCGGAATGGGGAGC
YK7	AACTCTCTCCCTGGACTGTCCGGTCCTCACCAGGCTGTACTATCTGCGGAATGGGGAGC
YK8	AACTCTCTCCCTGGACTGTCCGGTCCTCACCAGGCTGTACTATCTGCGGAATGGGGAGC
YK10	AACTCTCTCCCTGGACTGTCCGGTCCTCACCAGGCTGTACTATCTGCGGAATGGGGAGC
YK11	AACTCTCTCCCTGGACTGTCCGGTCCTCACCAGGCTGTACTATCTGCGGAATGGGGAGC
YK12	AACTCTCTCCCTGGACTGTCCGGTCCTCACCAGGCTGTACTATCTGCGGAATGGGGAGC
YK13	AACTCTCTCCCTGGACTGTCCGGTCCTCACCAGGCTGTACTATCTGCGGAATGGGGAGC
YK14	AACTCTCTCCCTGGACTGTCCGGTCCTCACCAGGCTGTACTATCTGCGGAATGGGGAGC
YK9	AACTCTCTCCCTGGACTGTCCGGTCCTCACCAGGCTGTACTATCTGCGGAATGGGGAGC

YK15	GTATCTC GTGTCGGCCGCTCCAAGCTGCTCTCCAACATGATGTGCCAGTACCGGGGCA
YK6	GTATCTCCGTGTGTCGGCCGCTCCAAGCTGCTCTCCAACATGATGTGCCAGTACCGGGGCA
YK16	GTATCTCCGTGTGTCGGCCGCTCCAAGCTGCTCTCCAACATGATGTGCCAGTACCGGGGCA
YK4	GTATCTCCGTGTGTCGGCCGCTCCAAGCTGCTCTCCAACATGATGTGCCAGTACCGGGGCA
REF-LMP7-E3, 4, 5	GTATCTCCGTGTGTCGGCCGCTCCAAGCTGCTCTCCAACATGATGTGCCAGTACCGGGGCA
YK1	GTATCTCCGTGTGTCGGCCGCTCCAAGCTGCTCTCCAACATGATGTGCCAGTACCGGGGCA
YK2	GTATCTCCGTGTGTCGGCCGCTCCAAGCTGCTCTCCAACATGATGTGCCAGTACCGGGGCA
YK3	GTATCTCCGTGTGTCGGCCGCTCCAAGCTGCTCTCCAACATGATGTGCCAGTACCGGGGCA
YK5	GTATCTCCGTGTGTCGGCCGCTCCAAGCTGCTCTCCAACATGATGTGCCAGTACCGGGGCA
YK7	GTATCTCCGTGTGTCGGCCGCTCCAAGCTGCTCTCCAACATGATGTGCCAGTACCGGGGCA
YK8	GTATCTCCGTGTGTCGGCCGCTCCAAGCTGCTCTCCAACATGATGTGCCAGTACCGGGGCA
YK10	GTATCTCCGTGTGTCGGCCGCTCCAAGCTGCTCTCCAACATGATGTGCCAGTACCGGGGCA
YK11	GTATCTCCGTGTGTCGGCCGCTCCAAGCTGCTCTCCAACATGATGTGCCAGTACCGGGGCA
YK12	GTATCTCCGTGTGTCGGCCGCTCCAAGCTGCTCTCCAACATGATGTGCCAGTACCGGGGCA
YK13	GTATCTCCGTGTGTCGGCCGCTCCAAGCTGCTCTCCAACATGATGTGCCAGTACCGGGGCA
YK14	GTATCTCCGTGTGTCGGCCGCTCCAAGCTGCTCTCCAACATGATGTGCCAGTACCGGGGCA
YK9	GTATCTCCGTGTGTCGGCCGCTCCAAGCTGCTCTCCAACATGATGTGCCAGTACCGGGGCA

YK15	TGGGCCTCTCCATGGGCAGCATGATCTGTGGCTGGGACAA AAGGTGAGTCCCTCCCTG
YK6	TGGGCCTCTCCATGGGCAGCATGATCTGTGGCTGGGACAA AAGGTGAGTCCCTCCCTG
YK16	TGGGCCTCTCCATGGGCAGCATGATCTGTGGCTGGGACAA AAGGTGAGTCCCTCCCTG
YK4	TGGGCCTCTCCATGGGCAGCATGATCTGTGGCTGGGACAA AAGGTGAGTCCCTCCCTG
REF-LMP7-E3, 4, 5	TGGGCCTCTCCATGGGCAGCATGATCTGTGGCTGGGACAA AAGGTGAGTCCCTCCCTG
YK1	TGGGCCTCTCCATGGGCAGCATGATCTGTGGCTGGGACAA AAGGTGAGTCCCTCCCTG
YK2	TGGGCCTCTCCATGGGCAGCATGATCTGTGGCTGGGACAA AAGGTGAGTCCCTCCCTG
YK3	TGGGCCTCTCCATGGGCAGCATGATCTGTGGCTGGGACAA AAGGTGAGTCCCTCCCTG
YK5	TGGGCCTCTCCATGGGCAGCATGATCTGTGGCTGGGACAA AAGGTGAGTCCCTCCCTG

YK7 TGGGCCTCTCCATGGGCAGCATGATCTGTGGCTGGGACAAGAAGGTGAGTCCCTCCCTG
YK8 TGGGCCTCTCCATGGGCAGCATGATCTGTGGCTGGGACAAGAAGGTGAGTCCCTCCCTG
YK10 TGGGCCTCTCCATGGGCAGCATGATCTGTGGCTGGGACAAGAAGGTGAGTCCCTCCCTG
YK11 TGGGCCTCTCCATGGGCAGCATGATCTGTGGCTGGGACAAGAAGGTGAGTCCCTCCCTG
YK12 TGGGCCTCTCCATGGGCAGCATGATCTGTGGCTGGGACAAGAAGGTGAGTCCCTCCCTG
YK13 TGGGCCTCTCCATGGGCAGCATGATCTGTGGCTGGGACAAGAAGGTGAGTCCCTCCCTG
YK14 TGGGCCTCTCCATGGGCAGCATGATCTGTGGCTGGGACAAGAAGGTGAGTCCCTCCCTG
YK9 TGGGCCTCTCCATGGGCAGCATGATCTGTGGCTGGGACAAGAAGGTGAGTCCCTCCCTG

YK15 CTSCRTATTCCAAGGTGTAGACGAGAGGTAAGTTTCCTSGCCTTACACTCCCTCCCTCC
YK6 CTSCRTATTCCAAGGTGTAGACGAGAGGTAAGTTTCCTSGCCTTACACTCCCTCCCTCC
YK16 CTSCRTATTCCAAGGTGTAGACGAGAGGTAAGTTTCCTSGCCTTACACTCCCTCCCTCC
YK4 CTSCRTATTCCAAGGTGTAGACGAGAGGTAAGTTTCCTSGCCTTACACTCCCTCCCTCC
REF-LMP7-E3, 4, 5 CTCCATATTCCAAGGTGTAGACGAGAGGTAAGTTTCCTCGCCTTACACTCCCTCCCTCC
YK1 CTCCATATTCCAAGGTGTAGACGAGAGGTAAGTTTCCTCGCCTTACACTCCCTCCCTCC
YK2 CTCCATATTCCAAGGTGTAGACGAGAGGTAAGTTTCCTCGCCTTACACTCCCTCCCTCC
YK3 CTCCATATTCCAAGGTGTAGACGAGAGGTAAGTTTCCTCGCCTTACACTCCCTCCCTCC
YK5 CTCCATATTCCAAGGTGTAGACGAGAGGTAAGTTTCCTCGCCTTACACTCCCTCCCTCC
YK7 CTCCATATTCCAAGGTGTAGACGAGAGGTAAGTTTCCTCGCCTTACACTCCCTCCCTCC
YK8 CTCCATATTCCAAGGTGTAGACGAGAGGTAAGTTTCCTCGCCTTACACTCCCTCCCTCC
YK10 CTCCATATTCCAAGGTGTAGACGAGAGGTAAGTTTCCTCGCCTTACACTCCCTCCCTCC
YK11 CTCCATATTCCAAGGTGTAGACGAGAGGTAAGTTTCCTCGCCTTACACTCCCTCCCTCC
YK12 CTCCATATTCCAAGGTGTAGACGAGAGGTAAGTTTCCTCGCCTTACACTCCCTCCCTCC
YK13 CTCCATATTCCAAGGTGTAGACGAGAGGTAAGTTTCCTCGCCTTACACTCCCTCCCTCC
YK14 CTCCATATTCCAAGGTGTAGACGAGAGGTAAGTTTCCTCGCCTTACACTCCCTCCCTCC
YK9 CTCCATATTCCAAGGTGTAGACGAGAGGTAAGTTTCCTCGCCTTACACTCCCTCCCTCC
** * *****

YK15 CCTCCTCTGCAGGGCACAGAGAAAGCTTGGTTGCAGAACTGTTGCTCAACAGCAATTTCT
YK6 CCTCCTCTGCAGGGCACAGAGAAAGCTTGGTTGCAGAACTGTTGCTCAACAGCAATTTCT
YK16 CCTCCTCTGCAGGGCACAGAGAAAGCTTGGTTGCAGAACTGTTGCTCAACAGCAATTTCT
YK4 CCTCCTCTGCAGGGCACAGAGAAAGCTTGGTTGCAGAACTGTTGCTCAACAGCAATTTCT
REF-LMP7-E3, 4, 5 CCTCCTCTGCAGGGCACAGAGAAAGCTTAGTTGCAGAACTGTTGCTCAACAGCAATTTCT
YK1 CCTCCTCTGCAGGGCACAGAGAAAGCTTAGTTGCAGAACTGTTGCTCAACAGCAATTTCT
YK2 CCTCCTCTGCAGGGCACAGAGAAAGCTTAGTTGCAGAACTGTTGCTCAACAGCAATTTCT
YK3 CCTCCTCTGCAGGGCACAGAGAAAGCTTAGTTGCAGAACTGTTGCTCAACAGCAATTTCT
YK5 CCTCCTCTGCAGGGCACAGAGAAAGCTTAGTTGCAGAACTGTTGCTCAACAGCAATTTCT
YK7 CCTCCTCTGCAGGGCACAGAGAAAGCTTAGTTGCAGAACTGTTGCTCAACAGCAATTTCT
YK8 CCTCCTCTGCAGGGCACAGAGAAAGCTTAGTTGCAGAACTGTTGCTCAACAGCAATTTCT
YK10 CCTCCTCTGCAGGGCACAGAGAAAGCTTAGTTGCAGAACTGTTGCTCAACAGCAATTTCT
YK11 CCTCCTCTGCAGGGCACAGAGAAAGCTTAGTTGCAGAACTGTTGCTCAACAGCAATTTCT
YK12 CCTCCTCTGCAGGGCACAGAGAAAGCTTAGTTGCAGAACTGTTGCTCAACAGCAATTTCT
YK13 CCTCCTCTGCAGGGCACAGAGAAAGCTTAGTTGCAGAACTGTTGCTCAACAGCAATTTCT
YK14 CCTCCTCTGCAGGGCACAGAGAAAGCTTAGTTGCAGAACTGTTGCTCAACAGCAATTTCT
YK9 CCTCCTCTGCAGGGCACAGAGAAAGCTTAGTTGCAGAACTGTTGCTCAACAGCAATTTCT

YK15 AGGTCCGGATGTGGACCATTGTTTCATAAGCTTGTCCCTTTGGATCAAATGCTGATTGC
YK6 AGGTCCGGATGTGGACCATTGTTTCATAAGCTTGTCCCTTTGGATCAAATGGCTGATTCC
YK16 AGGTCCGGATGTGGACCATTGTTTCATAAGCTTGTCCCTTTGGATCAAATGGCTGATTCC
YK4 AGGTCCGGATGTGGACCATTGTTTCATAAGCTTGTCCCTTTGGATCAAATGGCTGATTCC
REF-LMP7-E3, 4, 5 AGGTCCGGATGTGGACCATTGTTTCATAAGCTTGTCCCTTTGGATCAAATGGCTGATTCC
YK1 AGGTCCGGATGTGGACCATTGTTTCATAAGCTTGTCCCTTTGGATCAAATGGCTGATTCC
YK2 AGGTCCGGATGTGGACCATTGTTTCATAAGCTTGTCCCTTTGGATCAAATGGCTGATTCC
YK3 AGGTCCGGATGTGGACCATTGTTTCATAAGCTTGTCCCTTTGGATCAAATGGCTGATTCC
YK5 AGGTCCGGATGTGGACCATTGTTTCATAAGCTTGTCCCTTTGGATCAAATGGCTGATTCC
YK7 AGGTCCGGATGTGGACCATTGTTTCATAAGCTTGTCCCTTTGGATCAAATGGCTGATTCC
YK8 AGGTCCGGATGTGGACCATTGTTTCATAAGCTTGTCCCTTTGGATCAAATGGCTGATTCC
YK10 AGGTCCGGATGTGGACCATTGTTTCATAAGCTTGTCCCTTTGGATCAAATGGCTGATTCC
YK11 AGGTCCGGATGTGGACCATTGTTTCATAAGCTTGTCCCTTTGGATCAAATGGCTGATTCC
YK12 AGGTCCGGATGTGGACCATTGTTTCATAAGCTTGTCCCTTTGGATCAAATGGCTGATTCC
YK13 AGGTCCGGATGTGGACCATTGTTTCATAAGCTTGTCCCTTTGGATCAAATGGCTGATTCC
YK14 AGGTCCGGATGTGGACCATTGTTTCATAAGCTTGTCCCTTTGGATCAAATGGCTGATTCC
YK9 AGGTCCGGATGTGGACCATTGTTTCATAAGCTTGTCCCTTTGGATCAAATGGCTGATTCC

YK15	TGTTCCCTGGCTCATCTGTA	CTCTGGTCCACTTCTTGTGGCTCACACTTGGCTATCTGGG
YK6	TGTTCCCTGGACTCATCTGTA	CTCTGGTCCACTTCTTGTGGCTCACACTTGTATCTGGG
YK16	TGTTCCCTGGACTCATCTGTA	CTCTGGTCCACTTCTTGTGGCTCACACTTGTATCTGGG
YK4	TGTTCCCTGGACTCATCTGTA	CTCTGGTCCACTTCTTGTGGCTCACACTTGTATCTGGG
REF-LMP7-E3,4,5	TGTTCCCTGGACTCATCTGTA	CTCTGGTCCACTTCTTGTGGCTCACACTTGTATCTGGG
YK1	TGTTCCCTGGACTCATCTGTA	CTCTGGTCCACTTCTTGTGGCTCACACTTGTATCTGGG
YK2	TGTTCCCTGGACTCATCTGTA	CTCTGGTCCACTTCTTGTGGCTCACACTTGTATCTGGG
YK3	TGTTCCCTGGACTCATCTGTA	CTCTGGTCCACTTCTTGTGGCTCACACTTGTATCTGGG
YK5	TGTTCCCTGGACTCATCTGTA	CTCTGGTCCACTTCTTGTGGCTCACACTTGTATCTGGG
YK7	TGTTCCCTGGACTCATCTGTA	CTCTGGTCCACTTCTTGTGGCTCACACTTGTATCTGGG
YK8	TGTTCCCTGGACTCATCTGTA	CTCTGGTCCACTTCTTGTGGCTCACACTTGTATCTGGG
YK10	TGTTCCCTGGACTCATCTGTA	CTCTGGTCCACTTCTTGTGGCTCACACTTGTATCTGGG
YK11	TGTTCCCTGGACTCATCTGTA	CTCTGGTCCACTTCTTGTGGCTCACACTTGTATCTGGG
YK12	TGTTCCCTGGACTCATCTGTA	CTCTGGTCCACTTCTTGTGGCTCACACTTGTATCTGGG
YK13	TGTTCCCTGGACTCATCTGTA	CTCTGGTCCACTTCTTGTGGCTCACACTTGTATCTGGG
YK14	TGTTCCCTGGACTCATCTGTA	CTCTGGTCCACTTCTTGTGGCTCACACTTGTATCTGGG
YK9	TGTTCCCTGGACTCATCTGTA	CTCTGGTCCACTTCTTGTGGCTCACACTTGTATCTGGG

YK15 TGASARTGGGACTCGACTCTCGGGAAATATGTTCTCCACCGGTAGTGGGAAC TCCCATGC
YK6 TGASARTGGGACTCGACTCTCGGGAAATATGTTCTCCACCGGTAGTGGGAAC TCCCATGC
YK16 TGASARTGGGACTCGACTCTCGGGAAATATGTTCTCCACCGGTAGTGGGAAC TCCCATGC
YK4 TGASAGTGGGACTCGACTCTCGGGAAATATGTTCTCCACCGGTAGTGGGAAC TCCCATGC
REF-LMP7-E3, 4, 5 TGAGAATGGGACTCGACTCTCGGGAAATATGTTCTCCACCGGTAGTGGGAAC TCCCATGC
YK1 TGAGAATGGGACTCGACTCTCGGGAAATATGTTCTCCACCGGTAGTGGGAAC TCCCATGC
YK2 TGAGAATGGGACTCGACTCTCGGGAAATATGTTCTCCACCGGTAGTGGGAAC TCCCATGC
YK3 TGAGAATGGGACTCGACTCTCGGGAAATATGTTCTCCACCGGTAGTGGGAAC TCCCATGC
YK5 TGAGAATGGGACTCGACTCTCGGGAAATATGTTCTCCACCGGTAGTGGGAAC TCCCATGC
YK7 TGAGAATGGGACTCGACTCTCGGGAAATATGTTCTCCACCGGTAGTGGGAAC TCCCATGC
YK8 TGAGAATGGGACTCGACTCTCGGGAAATATGTTCTCCACCGGTAGTGGGAAC TCCCATGC
YK10 TGAGAATGGGACTCGACTCTCGGGAAATATGTTCTCCACCGGTAGTGGGAAC TCCCATGC
YK11 TGAGAATGGGACTCGACTCTCGGGAAATATGTTCTCCACCGGTAGTGGGAAC TCCCATGC
YK12 TGAGAATGGGACTCGACTCTCGGGAAATATGTTCTCCACCGGTAGTGGGAAC TCCCATGC
YK13 TGAGAATGGGACTCGACTCTCGGGAAATATGTTCTCCACCGGTAGTGGGAAC TCCCATGC
YK14 TGAGAATGGGACTCGACTCTCGGGAAATATGTTCTCCACCGGTAGTGGGAAC TCCCATGC
YK9 TGAGAATGGGACTCGACTCTCGGGAAATATGTTCTCCACCGGTAGTGGGAAC TCCCATGC
*** * ****

YK10 CTATGGGGTCATGGATAGTGGCTATCGACCTGACCTTAGTATTGAAGAGGCCTATGACCT
YK11 CTATGGGGTCATGGATAGTGGCTATCGACCTGACCTTAGTATTGAAGAGGCCTATGACCT
YK12 CTATGGGGTCATGGATAGTGGCTATCGACCTGACCTTAGTATTGAAGAGGCCTATGACCT
YK13 CTATGGGGTCATGGATAGTGGCTATCGACCTGACCTTAGTATTGAAGAGGCCTATGACCT
YK14 CTATGGGGTCATGGATAGTGGCTATCGACCTGACCTTAGTATTGAAGAGGCCTATGACCT
YK9 CTATGGGGTCATGGATAGTGGCTATCGACCTGACCTTAGTATTGAAGAGGCCTATGACCT

YK15 TAGTAAGAGATCAAAGTGCCCCCTCTGTCCCTGGGGTGGGGGCAAGGGGTTGAGATTG
YK6 TAGTAAGAGATCAAAGTGCCCCCTCTGTCCCTGGGGTGGGGGCAAGGGGTTGAGATTG
YK16 TAGTAAGAGATCAAAGTGCCCCCTCTGTCCCTGGGGTGGGGGCAAGGGGTTGAGATTG
YK4 TAGTAAGAGATCAAAGTGCCCCCTCTGTCCCTGGGGTGGGGGCAAGGGGTTGAGATTG
REF-LMP7-E3, 4, 5 TAGTAAGAGATCAAAGTGCCCCCTCTGTCCCTGGGGTGGGGGCAAGGGGTTGAGATTG
YK1 TAGTAAGAGATCAAAGTGCCCCCTCTGTCCCTGGGGTGGGGGCAAGGGGTTGAGATTG
YK2 TAGTAAGAGATCAAAGTGCCCCCTCTGTCCCTGGGGTGGGGGCAAGGGGTTGAGATTG
YK3 TAGTAAGAGATCAAAGTGCCCCCTCTGTCCCTGGGGTGGGGGCAAGGGGTTGAGATTG
YK5 TAGTAAGAGATCAAAGTGCCCCCTCTGTCCCTGGGGTGGGGGCAAGGGGTTGAGATTG
YK7 TAGTAAGAGATCAAAGTGCCCCCTCTGTCCCTGGGGTGGGGGCAAGGGGTTGAGATTG
YK8 TAGTAAGAGATCAAAGTGCCCCCTCTGTCCCTGGGGTGGGGGCAAGGGGTTGAGATTG
YK10 TAGTAAGAGATCAAAGTGCCCCCTCTGTCCCTGGGGTGGGGGCAAGGGGTTGAGATTG
YK11 TAGTAAGAGATCAAAGTGCCCCCTCTGTCCCTGGGGTGGGGGCAAGGGGTTGAGATTG
YK12 TAGTAAGAGATCAAAGTGCCCCCTCTGTCCCTGGGGTGGGGGCAAGGGGTTGAGATTG
YK13 TAGTAAGAGATCAAAGTGCCCCCTCTGTCCCTGGGGTGGGGGCAAGGGGTTGAGATTG
YK14 TAGTAAGAGATCAAAGTGCCCCCTCTGTCCCTGGGGTGGGGGCAAGGGGTTGAGATTG
YK9 TAGTAAGAGATCAAAGTGCCCCCTCTGTCCCTGGGGTGGGGGCAAGGGGTTGAGATTG

YK15 GGAGGTATGGGGAGGCAGGGTGGCAGAGAGCAGGTTTTCTGAGCCGAAGAGGGGCACT
YK6 GGAGGTATGGGGAGGCAGGGTGGCAGAGAGCAGGTTTTCTGAGCCAGAAGAGGGGCACT
YK16 GGAGGTATGGGGAGGCAGGGTGGCAGAGAGCAGGTTTTCTGAGCCAGAAGAGGGGCACT
YK4 GGAGGTATGGGGAGGCAGGGTGGCAGAGAGCAGGTTTTCTGAGCCAGAAGAGGGGCACT
REF-LMP7-E3, 4, 5 GGAGGTATGGGGAGGCAGGGTGGCAGAGAGCAGGTTTTCTGAGCCAGAAGAGGGGCACT
YK1 GGAGGTATGGGGAGGCAGGGTGGCAGAGAGCAGGTTTTCTGAGCCAGAAGAGGGGCACT
YK2 GGAGGTATGGGGAGGCAGGGTGGCAGAGAGCAGGTTTTCTGAGCCAGAAGAGGGGCACT
YK3 GGAGGTATGGGGAGGCAGGGTGGCAGAGAGCAGGTTTTCTGAGCCAGAAGAGGGGCACT
YK5 GGAGGTATGGGGAGGCAGGGTGGCAGAGAGCAGGTTTTCTGAGCCAGAAGAGGGGCACT
YK7 GGAGGTATGGGGAGGCAGGGTGGCAGAGAGCAGGTTTTCTGAGCCAGAAGAGGGGCACT
YK8 GGAGGTATGGGGAGGCAGGGTGGCAGAGAGCAGGTTTTCTGAGCCAGAAGAGGGGCACT
YK10 GGAGGTATGGGGAGGCAGGGTGGCAGAGAGCAGGTTTTCTGAGCCAGAAGAGGGGCACT
YK11 GGAGGTATGGGGAGGCAGGGTGGCAGAGAGCAGGTTTTCTGAGCCAGAAGAGGGGCACT
YK12 GGAGGTATGGGGAGGCAGGGTGGCAGAGAGCAGGTTTTCTGAGCCAGAAGAGGGGCACT
YK13 GGAGGTATGGGGAGGCAGGGTGGCAGAGAGCAGGTTTTCTGAGCCAGAAGAGGGGCACT
YK14 GGAGGTATGGGGAGGCAGGGTGGCAGAGAGCAGGTTTTCTGAGCCAGAAGAGGGGCACT
YK9 GGAGGTATGGGGAGGCAGGGTGGCAGAGAGCAGGTTTTCTGAGCCAGAAGAGGGGCACT

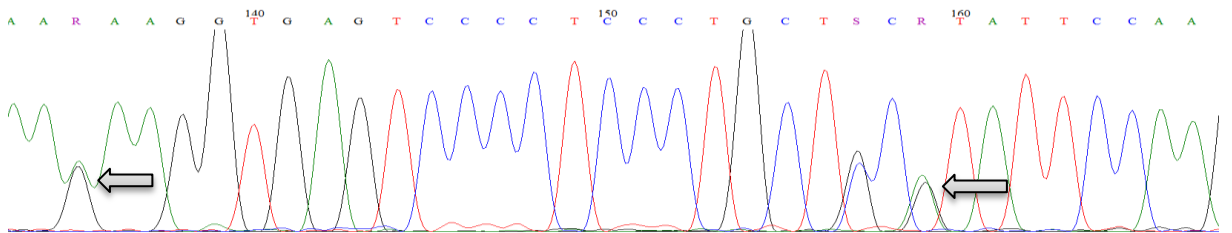
YK15 GAAGCCCCGTGCACAAGGGCATTGAGAGCGTGTGCTGCTGTTGTCGCCTTTGATGTAACA
YK6 GAAGCCCCGTGCACAAGGGCATTGAGAGCGTGTGCTGCTGTTGTCGCCTTTGATGTAACA
YK16 GAAGCCCCGTGCACAAGGGCATTGAGAGCGTGTGCTGCTGTTGTCGCCTTTGATGTAACA
YK4 GAAGCCCCGTGCACAAGGGCATTGAGAGCGTGTGCTGCTGTTGTCGCCTTTGATGTAACA
REF-LMP7-E3, 4, 5 GAAGCCCCGTGCACAAGGGCATTGAGAGCGTGTGCTGCTGTTGTCGCCTTTGATGTAACA
YK1 GAAGCCCCGTGCACAAGGGCATTGAGAGCGTGTGCTGCTGTTGTCGCCTTTGATGTAACA
YK2 GAAGCCCCGTGCACAAGGGCATTGAGAGCGTGTGCTGCTGTTGTCGCCTTTGATGTAACA
YK3 GAAGCCCCGTGCACAAGGGCATTGAGAGCGTGTGCTGCTGTTGTCGCCTTTGATGTAACA
YK5 GAAGCCCCGTGCACAAGGGCATTGAGAGCGTGTGCTGCTGTTGTCGCCTTTGATGTAACA
YK7 GAAGCCCCGTGCACAAGGGCATTGAGAGCGTGTGCTGCTGTTGTCGCCTTTGATGTAACA
YK8 GAAGCCCCGTGCACAAGGGCATTGAGAGCGTGTGCTGCTGTTGTCGCCTTTGATGTAACA
YK10 GAAGCCCCGTGCACAAGGGCATTGAGAGCGTGTGCTGCTGTTGTCGCCTTTGATGTAACA
YK11 GAAGCCCCGTGCACAAGGGCATTGAGAGCGTGTGCTGCTGTTGTCGCCTTTGATGTAACA
YK12 GAAGCCCCGTGCACAAGGGCATTGAGAGCGTGTGCTGCTGTTGTCGCCTTTGATGTAACA
YK13 GAAGCCCCGTGCACAAGGGCATTGAGAGCGTGTGCTGCTGTTGTCGCCTTTGATGTAACA
YK14 GAAGCCCCGTGCACAAGGGCATTGAGAGCGTGTGCTGCTGTTGTCGCCTTTGATGTAACA
YK9 GAAGCCCCGTGCACAAGGGCATTGAGAGCGTGTGCTGCTGTTGTCGCCTTTGATGTAACA

YK15 GYGTACAGCAGGACCTCGCCGAGGGGACCATGACTCCATGCTCTTTCCYGTCTGCCTGCAG
YK6 GYGTACAGCAGGACCTCGCCGAGGGGACCATGACTCCAYGCTCTTTCCCGTCTGCCTGCAG
YK16 GYGTACAGCAGGACCTCGCCGAGGGGACCATGACTCCAYGCTCTTTCCCGTCTGCCTGCAG

YK4 GTGTCAGCAGGACCTCGCCGAGGGGACCATGACTCCATGCTCTTTCCCGTCTGCCTGCAG
 REF-LMP7-E3, 4, 5 GTGTCAGCAGGACCTCGCCGAGGGGACCATGACTCCATGCTCTTTCCCGTCTGCCTGCAG
 YK1 GTGTCAGCAGGACCTCGCCGAGGGGACCATGACTCCATGCTCTTTCCCGTCTGCCTGCAG
 YK2 GTGTCAGCAGGACCTCGCCGAGGGGACCATGACTCCATGCTCTTTCCCGTCTGCCTGCAG
 YK3 GTGTCAGCAGGACCTCGCCGAGGGGACCATGACTCCATGCTCTTTCCCGTCTGCCTGCAG
 YK5 GTGTCAGCAGGACCTCGCCGAGGGGACCATGACTCCATGCTCTTTCCCGTCTGCCTGCAG
 YK7 GTGTCAGCAGGACCTCGCCGAGGGGACCATGACTCCATGCTCTTTCCCGTCTGCCTGCAG
 YK8 GTGTCAGCAGGACCTCGCCGAGGGGACCATGACTCCATGCTCTTTCCCGTCTGCCTGCAG
 YK10 GTGTCAGCAGGACCTCGCCGAGGGGACCATGACTCCATGCTCTTTCCCGTCTGCCTGCAG
 YK11 GTGTCAGCAGGACCTCGCCGAGGGGACCATGACTCCATGCTCTTTCCCGTCTGCCTGCAG
 YK12 GTGTCAGCAGGACCTCGCCGAGGGGACCATGACTCCATGCTCTTTCCCGTCTGCCTGCAG
 YK13 GTGTCAGCAGGACCTCGCCGAGGGGACCATGACTCCATGCTCTTTCCCGTCTGCCTGCAG
 YK14 GTGTCAGCAGGACCTCGCCGAGGGGACCATGACTCCATGCTCTTTCCCGTCTGCCTGCAG
 YK9 GTGTCAGCAGGACCTCGCCGAGGGGACCATGACTCCATGCTCTTTCCCGTCTGCCTGCAG
 * * * * *

YK15 TGTACCACATGAAGGAGGACGGCTGGGTGAAAGTGAAAGTACAGACGTCAGTGACCTGA
 YK6 TGTACCACATGAAGGAGGACGGCTGGGTGAAAGTGAAAGTACAGACGTCAGTGACCTGA
 YK16 TGTACCACATGAAGGAGGACGGCTGGGTGAAAGTGAAAGTACAGACGTCAGTGACCTGA
 YK4 TGTACCACATGAAGGAGGACGGCTGGGTGAAAGTGAAAGTACAGACGTCAGTGACCTGA
 REF-LMP7-E3, 4, 5 TGTACCACATGAAGGAGGACGGCTGGGTGAAAGTGAAAGTACAGACGTCAGTGACCTGA
 YK1 TGTACCACATGAAGGAGGACGGCTGGGTGAAAGTGAAAGTACAGACGTCAGTGACCTGA
 YK2 TGTACCACATGAAGGAGGACGGCTGGGTGAAAGTGAAAGTACAGACGTCAGTGACCTGA
 YK3 TGTACCACATGAAGGAGGACGGCTGGGTGAAAGTGAAAGTACAGACGTCAGTGACCTGA
 YK5 TGTACCACATGAAGGAGGACGGCTGGGTGAAAGTGAAAGTACAGACGTCAGTGACCTGA
 YK7 TGTACCACATGAAGGAGGACGGCTGGGTGAAAGTGAAAGTACAGACGTCAGTGACCTGA
 YK8 TGTACCACATGAAGGAGGACGGCTGGGTGAAAGTGAAAGTACAGACGTCAGTGACCTGA
 YK10 TGTACCACATGAAGGAGGACGGCTGGGTGAAAGTGAAAGTACAGACGTCAGTGACCTGA
 YK11 TGTACCACATGAAGGAGGACGGCTGGGTGAAAGTGAAAGTACAGACGTCAGTGACCTGA
 YK12 TGTACCACATGAAGGAGGACGGCTGGGTGAAAGTGAAAGTACAGACGTCAGTGACCTGA
 YK13 TGTACCACATGAAGGAGGACGGCTGGGTGAAAGTGAAAGTACAGACGTCAGTGACCTGA
 YK14 TGTACCACATGAAGGAGGACGGCTGGGTGAAAGTGAAAGTACAGACGTCAGTGACCTGA
 YK9 TGTACCACATGAAGGAGGACGGCTGGGTGAAAGTGAAAGTACAGACGTCAGTGACCTGA
 * * * * *

YK15 GAAGCCTGGCTGACTCAGGGACC
 YK6 GAAGCCTGGCTGACTCAGGGACC
 YK16 GAAGCCTGGCTGACTCAGGGACC
 YK4 GAAGCCTGGCTGACTCAGGGACC
 REF-LMP7-E3, 4, 5 GAAGCCTGGCTGACTCAGGGACC
 YK1 GAAGCCTGGCTGACTCAGGGACC
 YK2 GAAGCCTGGCTGACTCAGGGACC
 YK3 GAAGCCTGGCTGACTCAGGGACC
 YK5 GAAGCCTGGCTGACTCAGGGACC
 YK7 GAAGCCTGGCTGACTCAGGGACC
 YK8 GAAGCCTGGCTGACTCAGGGACC
 YK10 GAAGCCTGGCTGACTCAGGGACC
 YK11 GAAGCCTGGCTGACTCAGGGACC
 YK12 GAAGCCTGGCTGACTCAGGGACC
 YK13 GAAGCCTGGCTGACTCAGGGACC
 YK14 GAAGCCTGGCTGACTCAGGGACC
 YK9 GAAGCCTGGCTGACTCAGGGACC
 * * * * *



*Mavi bölgeler intronları, kırmızılar ekzonları, yeşil renkli bölgeler heterozigot bölgeleri, gri renkle işaretli nükleotidler ileri primerleri ve sarı renkli olanlar geri primerler bölgelerini göstermektedir.

8. ÖZGEÇMİŞ

1. Genel

Adı-Soyadı: Ferit Can YAZDIÇ
Doğum Yeri ve Tarihi: Gaziantep / 07.01.1986
Yabancı Dil: İngilizce, Almanca (Başlangıç).
e-mail: fcyazdic@gmail.com,

2. Eğitim Durumu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji Bölümü.	Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi	2004-2008
Yüksek Lisans	Ziraat Fakültesi; Zootečni Anabilim Dalı.	Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi	2008-2011
Doktora/ S.Yeterlik/Tıpta Uzmanlık	Ziraat Fakültesi; Zootečni Anabilim Dalı.	Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi	2011-2017

3. İş ve Akademik Tecrübeleri

Görev	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Arş. Gör.	Ziraat Fakültesi; Zootečni Anabilim Dalı	Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi	2011-2017

4. Bilimsel Çalışmalar

4.1. Yayınlar

4.1.1.Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI & SSCI & Arts and Humanities)

1. U. Comlekcioglu, E. Ozkose, **F. C. Yazdic**, I. Akyol and M. S. Ekinci, Polysaccharidase and Glycosidase Production of Avicel Grown Rumen Fungus *Orpinomyces* sp. GMLF5. Acta Biologica Hungarica 61(3), pp. 333–343 (2010)
2. Çömlekçioglu, U., Özköse, E., Akyol, I., **Yazdic, F. C.**, & Ekinci, M. S. (2011). Expression of β -(1, 3-1, 4)-glucanase gene of *Orpinomyces* sp. GMLF18 in *Escherichia coli* EC1000 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. Turk J Biol, 35, 405-414.
3. Comlekcioglu, U., Aygan A., **Yazdic, F.C.** and Ozkose, E., 2011. Effects of various agro-wastes on xylanase and b-xylosidase production of anaerobic ruminal fungi. Journal of Scientific& Industrial Research Vol.70, pp.293-299, April 2011.
4. U. Cömlekcioglu, **F.C. Yazdic**, S. Keser, B.M. Kelleci, G. Battaloğlu, E. Özköse, “*Neocallimastix* sp. ve *Orpinomyces* sp.’nin Enzim Üretimleri Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi”, Kafkas Univ Vet Fak Derg (ISI) 18(5), 799-806 pp., 2012

4.1.2. Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. M.S. EKİNCİ, İ. AKYOL, A. K. RAMADAN, F. C. YAZDIÇ, E. ÖZKÖSE, “Geleneksel Yöntemlerle Yapılmış Peynirlerden Süt Ürünlerinden *Leuconostoc* sp ve *Pediococcus* sp.’lerin İzolasyonu, Moleküler Tanımlanması ve Kısmi Karakterizasyonu”, KSÜ Doğa Bil. Derg., 20(4), 160-167, Kabul (Accepted): 04.03.2017.

4.1.3. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Özeti Basılan Bildiriler

1. Ahmed Raisan Mohammed Ali, Ferit Can Yazdıç, Emin Özköse, “Investigation of Genes Associated With Ovulation Rate in Turkish Awassi Sheep”, 2nd International Conference on Sustainable Agriculture and Environment (2nd ICSAE), Proceedings and Book of Abstracts, 253 pp., September 30 – October 3, 2015, Selcuk University Campus, Konya, Turkey.
2. İbrahim Seyfettin Çelik, Ramazan Güneşçar, Fatma İnanc Tolun, Buket Tuğan Yıldız, Bekir Mehmet Kelleci, Ferit Can Yazdıç, Deniz Tuncel, Muhammet Üremiş, “Investigation of the correlation between serum leptin levels and leptin gene -2548 G>A polymorphism in patients with Alzheimer’s disease”, 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (IICHC 2017), “From Molecules to Diseases”, ABSTRACT BOOK, 489 pp., May 18 - 21, 2017, Kervansaray Lara Hotel, Antalya, Turkey.

4.1.4. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. Çömlekçioglu, U., Gezginç, Y., Kar, B., Yazdıç, F.C., Akyol, İ., Ekinci, M.S., Özköse, E., 2009. Laktik Asit Bakterilerine Ksilanolitik Özellik Kazandırılması. 6. Ulusal Zootečni Bilim Kongresi, Bildiri Kitabı, S: 85-89, Erzurum.

4.1.5. Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Özeti Basılan Bildiriler

1. Çömlekçioglu, U., Kar, B., Yazdıç, F.C., Ekinci, M.S., Özköse, E., 2008. Rumen funguslarının izolasyonu, tanımlanması ve ksilanaz aktivitelerinin belirlenmesi. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi Bildiri Özetleri Kitabı, S: 266, Trabzon.
2. F.C.YAZDIÇ., 2008. “*E.coli*’nin β -Lactam Grubu Antibiyotiklere Karşı Kazandığı Direncin Araştırılması”, XV. Ulusal Biyoloji Kongresi (Gaziantep).
3. F.C.YAZDIÇ., 2008. “Bazı *Bacillus* Suşları Tarafından Üretilen Metabolitlerin Biyolojik Ölçüm Yöntemiyle Belirlenmesi”XV. Ulusal Biyoloji Kongresi (Gaziantep).
4. Ferit Can YAZDIÇ, İsmail AKYOL, Emin ÖZKÖSE, M. Sait EKİNCİ, 2011. “*Trigonella* sp.’nin Anaerobik Fungusların Selülaz ve Ksilanaz Üretimleri Üzerine Etkisi” 7. Ulusal Zootečni Kongresi (ADANA).
5. F.C. Yazdıç, F. Topçal, E. Köksalan, T. Turgut, M.S. Ekinci, “Anaerobik Fungus *Orpinomyces* sp.’ye Ait Selülaz Geninin Klonlanması, Karakterizasyonu Ve Enzim

Aktivitesinin Belirlenmesi”, 21. Ulusal Biyoloji Bilim Kongresi, Bildiri Kitabı, 1415-1416 pp., İzmir, Türkiye, Eylül 2012.

6. F. Topçal, **F.C. Yazdıç**, E. Köksalan, “Doğal *Streptococcus thermophilus* İzolatlarının Plazmit Desenlerinin İçeriklerinin Belirlenmesi” 21. Ulusal Biyoloji Bilim Kongresi, Bildiri Kitabı, 1408 pp., İzmir, Türkiye, Eylül 2012.

7. E. Köksalan, **F.C. Yazdıç**, F. Topçal, “Çayır Silajından İzole edilen Laktik Asit Bakterilerinin Moleküler Tanımlanması ve Metabolit Üretimlerinin İncelenmesi” 21. Ulusal Biyoloji Bilim Kongresi, Bildiri Kitabı, 1377-1378 pp., İzmir, Türkiye, Eylül 2012.

8. M. Kuş, **F.C. Yazdıç**, “Japon Bildircinlarında (*Coturnix Coturnix*) Mitokondrial Dna Analizi”, 9. Ulusal Zootečni Öğrenci Kongresi, Bildiri Kitabı, Erzurum, Türkiye, 23-25 Mayıs 2013. (Poster Birincilik Ödülü).

9. **Ferit Can YAZDIÇ**, Emin ÖZKÖSE, İsmail AKYOL, Elif KÖKSALAN, Mehmet Sait EKİNCİ, “Sığırlarda GH (Growth Hormone) Geninin Önemi ve Yerli Gen Kaynaklarımızın Konumu”, 10. Ulusal Zootečni Öğrenci Kongresi, Bildiri Kitabı, Kayseri, Türkiye, 23-24 Nisan 2014

10. Altuğ KARAMAN, Emin ÖZKÖSE, Mehmet Sait EKİNCİ, **Ferit Can YAZDIÇ**, Elif KÖKSALAN, İsmail AKYOL “Doğal *Streptococcus thermophilus* İzolatlarında Horizontal Konjugasyonun İncelenmesi”, 10. Ulusal Zootečni Öğrenci Kongresi, Bildiri Kitabı, Kayseri, Türkiye, 23-24 Nisan 2014.

11. **Ferit Can YAZDIÇ**, Mehmet Sait EKİNCİ, İsmail AKYOL, Elif KÖKSALAN ve Emin ÖZKÖSE, “Anaerobik Fungusların Ayrımında rDNA Bölgesi”, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Bildiri Kitabı, Eskişehir, 23-27 Haziran 2014.

12. **Ferit Can YAZDIÇ**, Mehmet Sait EKİNCİ, İsmail AKYOL, Emin ÖZKÖSE, “Sığırlarda İmmünolojik Gen Bölgesi; BoLA”, 9. Ulusal Zootečni Kongresi, Bildiri Kitabı, 936 pp., Konya, Türkiye, 3-5 Eylül 2015.

13. **Ferit Can YAZDIÇ**, Mehmet Sait EKİNCİ, Emin ÖZKÖSE, İsmail AKYOL, Altuğ KARAMAN, “Rumen Mikrobiyal Ekosisteminin Belirlenmesinde Kullanılan Moleküler İdentifikasyon Yöntemleri”, 9. Ulusal Zootečni Kongresi, Bildiri Kitabı, 937 pp., Konya, Türkiye, 3-5 Eylül 2015.

14. Tuğçe TURGUT, Emin ÖZKÖSE, Mehmet Sait EKİNCİ, İsmail AKYOL, **Ferit Can YAZDIÇ**, “Selülitik Rumen Bakterilerinin Moleküler Tanımlanması”, 9. Ulusal Zootečni Kongresi, Bildiri Kitabı, 935 pp., Konya, Türkiye, 3-5 Eylül 2015.

15. **Ferit Can Yazdıç**, Sahdi Mahdi Taha Zebari, Altug Karaman, Emin Özköse, “Irak Yerel Tavuklarında D-loop ve 12S Mitokondrial DNA Bölgeleri Dizi Analizi”, 12. Ulusal Zootečni Öğrenci Kongresi, Bildiri Kitabı, 112 pp., Isparta, Türkiye, 9-11 Mayıs 2016.

16. Cennet Hasgül, **Ferit Can Yazdıç**, Mehmet Sait Ekinci “Anaerobik Fungus *Neocallimastix* sp. ve *Orpinomyces* sp.’ye Ait Fibrolitik Enzimlerinin Kısmi Karakterizasyonu”, 12. Ulusal Zootečni Öğrenci Kongresi, Bildiri Kitabı, 112 pp., Isparta, Türkiye, 9-11 Mayıs 2016. (Sözlü Bildiri).

17. Tugçe Turgut, **Ferit Can Yazdıç**, Emin Özköse, “Rumen Funguslarının Morfolojik Özellikleri ve Tasonomik Pozisyonları”, 12. Ulusal Zootečni Öğrenci Kongresi, Bildiri Kitabı, 112 pp., Isparta, Türkiye, 9-11 Mayıs 2016.

18. Yazdıç, F., **Yazdıç, F.C.**, Akyol, İ., 2016. Geleneksel Yöntemle Üretilen Yoğurttan İzole Edilen *Lactobacillus bulgaricus* (BioLb89) İzolatı Plazmitinin Nükleotit Dizisinin Belirlenmesi. 23. Ulusal Biyoloji Kongresi (Sözlü sunum).

4.2. Katıldığı Kurslar

1. **Deney Hayvanları Kullanımı**, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, 07-21 Temmuz 2008.

2. **Ölçüm Belirsizliği Hesaplanması Kursu** (17-18 Ağustos, 2010), Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

3. **Metod Validasyonu Kursu** (23-25 Ağustos, 2010), Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

4. **TS EN ISO/IEC 17025 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği için Teknik Şartlar Kursu** (16 Ağustos, 2010), Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi.

5. **2237 Proje Eğitim Etkinliklerini Destekleme Programı** (Teorik 25-28 Haziran 2013+ Uygulama Eğitimi 10-12 Temmuz 2013).

6. **ABI 3130 Genetik Analyzer cihazı kullanım kursu**, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, ÜSKİM, 2016.

4.3. Çalıştığı Projeler

1. Anaerobik rumen funguslarının izolasyonu, bu funguslara ait ksilanaz genlerinin klonlanması, karakterizasyonu, enzim aktivitelerinin belirlenmesi ve kağıt hamuru endüstrisinde kullanım olanaklarının belirlenmesi. TÜBİTAK, TOVAG 109O720, Bursiyer (Tamamlandı).

2. Yoğurt Üretiminde Kullanılan Doğal *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Starter Kültürlerin İzolasyonu, Moleküler Tanımlanması ve Ürün Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi, KSÜ Araştırma Projeleri Yönetim Birimi, 2012/ 4-12M, Yardımcı Araştırmacı. (Tamamlandı).