T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE'DE BULUNAN BAZI KEDİ IRKLARININ D-LOOP POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI

Elif YILMAZ ŞAHİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Vahdettin ALTUNOK

KONYA-2010

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE'DE BULUNAN BAZI KEDİ IRKLARININ D-LOOP POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI

Elif YILMAZ ŞAHİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Vahdettin ALTUNOK

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 09202020 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2010

ii. ÖNSÖZ

Günümüzde mitokondrial DNA (mtDNA) evrimsel çalışmalarda omurgalılarda kullanılan en önemli moleküler markerdan birisi olmuştur. Bunun sebepleri arasında mtDNA'nın sıkı bir gen yapısına sahip olması, yüksek evrimleşme oranına ve annesel (maternal) kalıtımla nesillere aktarılması ve rekombinasyon özelliğinin olmamasıdır. Bireyler annesel ataları takip edilerek farklılaşmaları kaydedilebilir. Aynı zamanda oluştukları, farklılaştıkları ve göç ettikleri coğrafyalar hakkında detaylı bilgi verebilir. Hayvanların hangisinin daha önce oluştuğu da mtDNA analizleri sonucu tespit edilebilir.

Kediler hayatımızda önemli bir yeri olan, yeri geldiğimi ailemizin bir bireyi gibi gördüğümüz, sevimli evcil hayvanlardır. Bu canayakın canlıların genetik yapısı incelendiğinde 200'den fazla hastalığın insanlarla benzer olduğu gözlenmiş, bu saptama insanların dostluk haricinde de kedilere olan ilgisini artırmıştır. Yapılan çalışmalar kedinin genomun daha sıkı ve değişmeye korunumlu olduğunu göstermiştir. Bu bilgi, hastalıklara neden olan genlerin tespitini kolaylaştırabilir.

Ayrıca Türkiye eski yerleşim yerlerinden biridir ve göç yolları üzerine kurulmuştur. Bu oluşum genetik çeşitliliğin Anadolu'da ne kadar geniş olduğunu göstermektedir. Evcilleştirme merkezlerine yakın olması hayvanların evcilleştirilmesi çalışmalarında ve evrimsel çalışmalarda bize değerli bilgiler kazandırabilir.

Bu çalışmada, Türkiye'de bulunan bazı kedi ırklarının mtDNA D-Loop bölgesinin bir kısmının dizi anlizi yapıldı, kediler arasındaki farklılıklar tespit edildi. Tespit edilen farklılıklar Dünya'nın farklı yerlerinde yapılan çalışmalarla karşılaştırıldı. Diğer çalışmalardan Türkiye'de bulunan ırkların genetik farklılıkları tespit edildi.

iii. İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ 1

1.1. Mitokondrial DNA'nın Yapısal Özellikleri 1

1.2. Kontrol Bölgesi (D-Loop) 4

1.3. Model Organizma Olarak Kediler. 6

1.4. Kedilerde Nüklear Mitokondrial DNA Dizileri 7

1.5. Kedinin Kökeni 7

1.6. Gen Kaynaklarının Korunması 9

1.7. Kedilerin Genel Özelliklei 10

1.8. Araştırmada Kullanılan Evcil Kediler 11

1.8.1. Van Kedisi 11

1.8.2. İran Kedisi 12

1.8.3. Ankara Kedisi 13

1.8.4. Siyam Kedisi 14

1.8.5. Tekir Kedisi 15

1.9. Kediler ile Yapılan diğer Çalışmalar 16

2. GEREÇ VE YÖNTEM 19

2.1. Hayvan Materyali 19

2.2. Kandan DNA İzolasyonu 19

2.3. İzole Edilen DNA'nın Kalitesinin Ölçülmesi 20

2.4. Normal PZR'nin Hazırlanması 20

2.5. PZR Ürünlerinin Temizlenmesi 21

2.6. DNA Dizi Analizi 21

2.7. Stop Solüsyonu ile Reaksiyonun Durdurulması 21

2.8. İstatistiksel Analiz 22

3. BULGULAR 23

3.1. PZR Reaksiyonu 23

3.2. Kapiller Elektroforezde Dizi Analizi 24

3.3. D-Loop (Kontrol Bölgesi) Dizi Analizi Sonuçları 26

3.3.1. Materyal Olarak Kullanılan Kedilerin Karşılaştırılması 26

3.3.2. Van Kedilerinin Kendi Arasında Karşılaştırılması 31

3.3.3. Haplogrupların Kendi İçinde Karşılaştırılması 34

3.3.4. Haplogruplar ve Çalışılan Tüm Kedilerin Karşılaştırılması 35

4. TARTIŞMA 39

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 44

6. ÖZET 45

7. SUMMARY 46

8. KAYNAKLAR 47

9. ÖZGEÇMİŞ 51

iv. SİMGELER VE KISALTMALAR

CR: Kontrol bölgesi

ddH_2O : Bi distile su

D-loop : Yer Değişim Halkası (*displacement loop*,)

DNA : Deoksiribonükleik asit

DnaSP : DNA Sequence Polymorphism Programı

dNTP : Deoksibonükleotid trifosfat

EDTA : Etilen Diamine Tetra Asetik asit

EtOH : Etanol

FAO : Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization of the

H : Haplotip çeşitliliği

K_3EDTA : Potasyum EDTA

Kb : Kilobaz

l : Litre

µl: Mikrolitre

µM : Mikromolar

M : Molar

MEGA : Molecular Evolutionary Genetics Analysis programı

mg : Miligram

$MgCl_2$: Magnezyum Klorid

ml : Mililitre

mM : Milimolar

mtDNA : Mitokondrial DNA

NaAc : Sodyum Asetat

ng : Nanogram

NJ : Neighbor Joining

π: Nükleotit çeşitliliği, *Pi*

PCR/PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

pH : Asitlik/bazlık ölçütü (Hidrojenin Gücü; Power of Hydrogen)

pMol : Pikomol

RNA: Ribonükleik asit

Taq : *Thermus aquaticus*

TBE: Tris-Borik Asit-EDTA

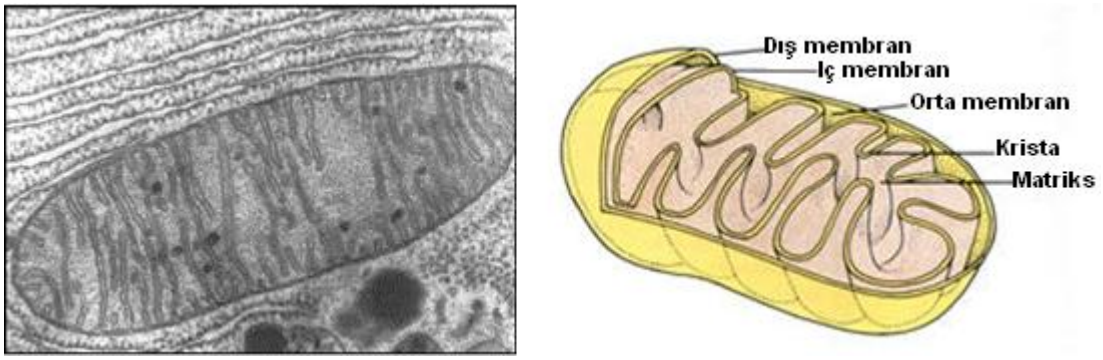
tRNA: Transfer Ribonukleik Asit

V: Volt

1.GİRİŞ

1.1 Mitokondrial DNA'nın Yapısal Özellikler:

Çok hücreli organizmaların biyolojisinde merkezi bir göreve sahip olan mitokondri, hücre içerisinde birden fazla sayıda bulunur. Yapısal olarak dört bölümden oluşur: dış membran, proteince zengin iç membran, dış ve iç membran arasında orta bir membran ve membranların içinde matriks vardır (Khan ve ark 2007). İç membran krista adı verilen kıvrımlı bir yapı oluşturur. Bu kıvrımlar arasında ETS (Elektron Taşıma Sistemi) enzimleri vardır. Hücrenin ATP ihtiyacı ETS enzim sistemi tarafından 0_2'li solunum ile karşılanır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Mitokondrinin yapısı (Sezgin 2010).

Günümüzde birçok hayvanın mitokondrial DNA'sının dizi analizi yapılmıştır. Hayvanların mitokondrial DNA'sı 15-20 kb uzunluğunda ve 13 protein geni, 22 transfer RNA, 2 ribozomal RNA (Anderson ve ark 1981, Wilkinson ve Chapman 1991) ve omurgasızlarda kontrol bölgesi, omurgalılarda ise yerdeğişim düğümü (displacement loop veya D-loop) olarak bilinen düzenleyici bir bölgeden oluşmaktadır (Wilkinson ve Chapman 1991). Diziler ardışık ve intronsuzdur (Fernandez-Silva ve ark 2003). D-Loop bölgesi fenilalanin tRNA ve prolin tRNA arasında konumlanmıştır.

Son yıllarda mitokondrial DNA (mtDNA) omurgalılarda en çok kullanılan moleküler markerlardan birisi olmuştur. Korunmuş gen bölgelerinin bulunması, sıkı bir yapıya sahip olması, yüksek evrimleşme oranı, zorunlu maternal (anasal) kalıtım,

rekombinasyon özelliğinin olmaması gibi birçok özelliği mtDNA'nın yaygın olarak kullanılmasını sağlamıştır (Lopez ve ark 1994, Jae-Heup ve ark 2001).

Mikrosatellit DNA kullanılarak türleri tanımlamak mümkündür, fakat mikrosatellit DNA'da oluşan herhangi bir mutasyon için yanlış bilgi verebilir. Hücre içinde kopya sayısı fazla olduğu için genelde mtDNA tercih edilir (Mills ve ark 2000, Nauta ve Weissing 1996). mtDNA'nın sıkı yapısı, hücre içerisinde çoklu kopyasının bulunması, hızlı evrim oranı ve rekombinasyonun görülmemesi, mtDNA'yı evrim, genetik farklılık ve türlerin saptanması için yaygın olarak kullanılan markerlar haline getirir (Zhu ve Yue 2008).

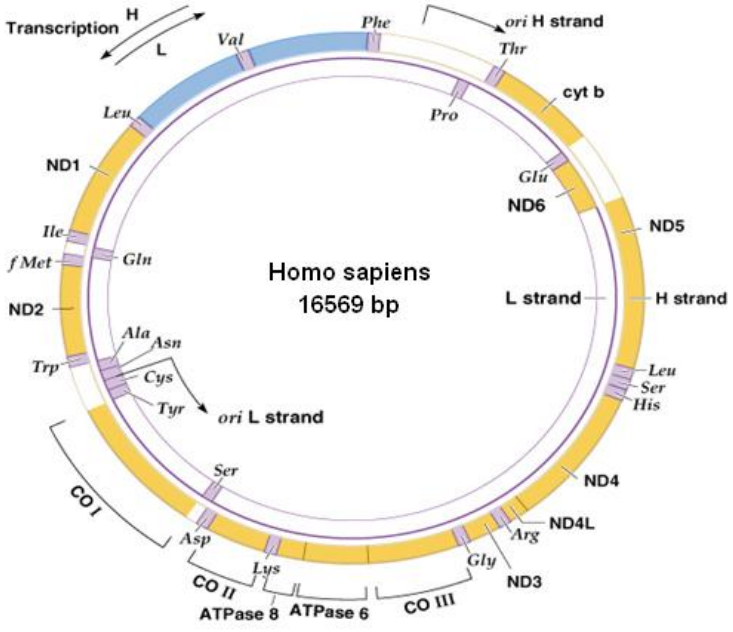
Nüklear genoma göre mitokondrial genomun evrimleşme oranı daha hızlıdır. Bunun nedeni mtDNA'nın proteinler tarafından daha az korunması ve iç membranında üretilen hasar verici reaktif oksijen türü ile ilgilidir. Ayrıca nükleusa göre daha az etkili tamir mekanizması vardır. Yüksek mutasyon oranı ve maternal kalıtım göstermesi, evrim çalışmalarında ve insan populasyon genetiği çalışmalarında DNA dizi analizi tekniğini ilgi çekici bir araç haline getirmiştir (Fernandez-Silva ve ark 2003).

Populasyon ve türler arasında mtDNA'nın bir bölümünün karşılaştırılması, filogenetik akrabalıkların anlaşılmasında önemlidir (Janczewski ve ark 1995, Wei ve ark 2008). Bu nedenle tüm hayvan mtDNA dizilerinin karşılaştırılması, genom evrimi için bir modeldir ve filogenetik yapı belirlenmesi için şimdilerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Wei ve ark 2008). Tüm mtDNA dizi bilgisi türlerin moleküler hareketliliği, orjini ve evriminin çalışılması için kullanışlı bir araçtır (Wu ve ark 2007). İnsan mitokondrial genomunun dizi analizi yapıldıktan sonra 500'den fazla omurgalının tüm mtDNA genomunun dizi analizi tanımlanmıştır (Anderson ve ark 1981, Wu ve ark 2007).

Hücrenin ATP üretiminden sorumlu olan mitokondrial DNA oksidatif fosforilasyon sisteminin az fakat önemli sayıda polipeptidini kodlar. Memeli mitokondrial genomu sıkı bir gen organizasyonu gösterir. Memeliler arasında mitokondrial DNA'nın yapısı, genetik içeriği ve organizasyonu güçlü bir şekilde korunmaktadır, bundan dolayı insan mtDNA'sı model olarak dikkate alınmaktadır. İnsan mtDNA'sı çift sarmallı, yaklaşık 10 milyon Da molekül ağırlığına tekabül

eden, 16.6 kb büyüklüğünde kapalı dairesel bir moleküldür (Anderson ve ark 1981, Fernandez-Silva ve ark 2003) ve birçok hücrede toplam DNA içeriğinin yaklaşık % 0.5-1'ı kadardır (Fernandez-Silva ve ark 2003).

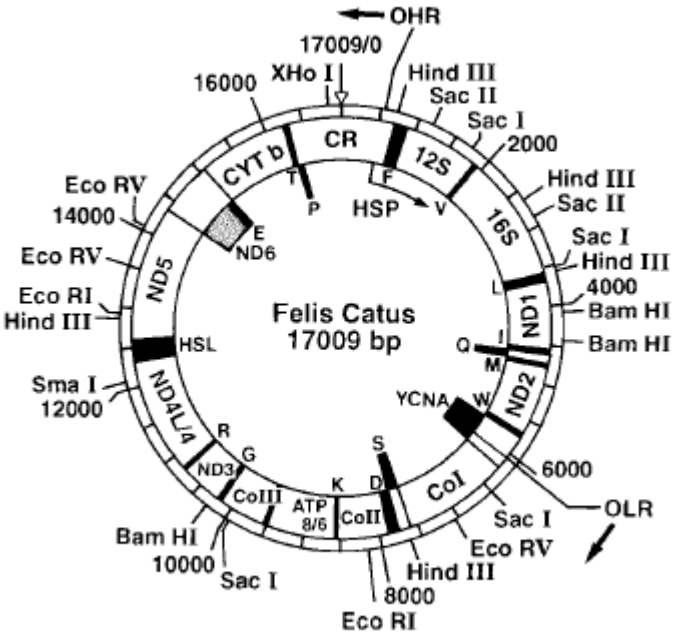
Diğer memelilerde olduğu gibi insan mitokondrial DNA'sı intron içermez ve 37 genden oluşmaktadır (Wallace ve ark 2005). Bunların 24'ü mtDNA'nın translasyon mekanizmasınındaki genleri kodlamaktadır (22'si tRNA ve 2'si ribozomal RNA'dır). Mitokondrial genetik kod (m), nüklear genetik kodla (n) benzerdir fakat aynı değildir. Farklı olan 4 kodon vardır. Bunlar AUA=Ile (nüklear), Met (mitokondri); UGA= Stop (nüklear), Trp (mitokondri); AGA, AGG=Arg (nüklear), Stop (mitokondri)'dir. Kalan 13 gen karbonhidrat ve yağların oksitlenmesiyle karbondioksit, su ve ATP oluşmasını sağlayan elektron transport sisteminin alt ünitesi için kodlanmaktadır. Aslında mitokondrinin başlıca görevi ökaryotik organizmalara ATP üretmektir (Khan ve ark 2007). İnsan mtDNA'sı (Şekil 1.2) 16569 bç uzunluğundadır (Tatar ve ark 2006).



Şekil 1.2. İnsan mitokondrial DNA'sının şematik gösterimi (Sezgin 2010).

Kedi (*Felis catus*) mtDNA'sı 17,009 bç uzunluğundadır. Kedi mtDNA'sı (Şekil 1.3) insan mtDNA'sından 440 bç daha uzundur. Bunun nedeninin tekrar bölgelerinin fazlalığından veya kedi mtDNA'sının daha sıkı ve korunmuş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Lopez ve ark 1996). Korunmuş olması

geriye yönelik evrimsel çalışmalarda ve yapı çalışmalarında zaman içinde hangi bölgelerin değiştiği hakkında aydınlatıcı bilgiler verebilir.



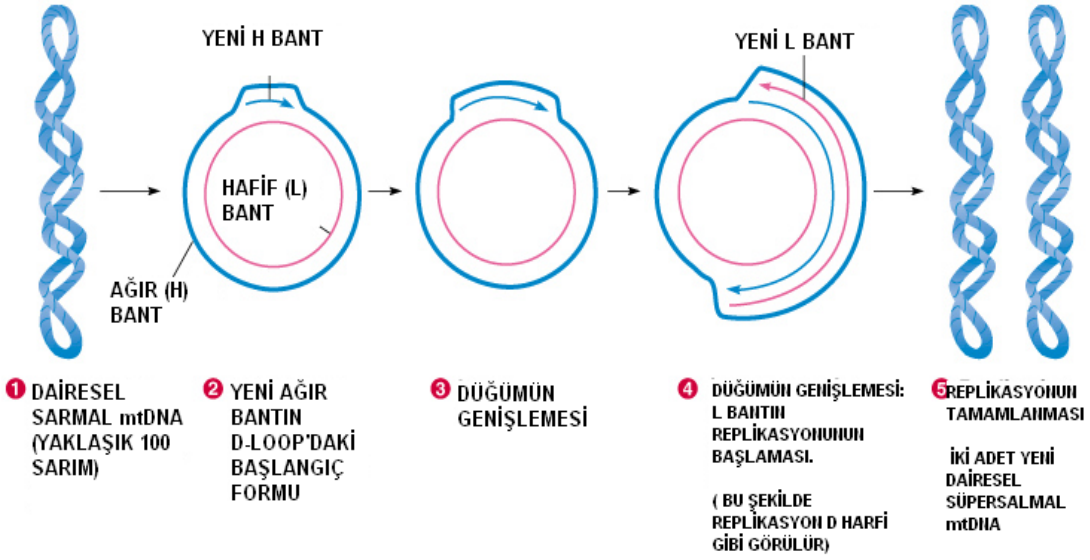
Şekil 1.3. Kedi mtDNA'sındaki başlıca enzim kesim yerleri ve kodlanan genlerin fiziksel haritası (Lopez ve ark 1996).

1.2 Kontrol Bölgesi (D-Loop)

Kontrol bölgesi (CR) mtDNA molekülünün en hızlı evrimleşen bölgesidir (Lopez ve ark 1997). Memelilerin kontrol bölgesi tRNAProlin ve tRNAFenil alanin arasında bulunur. Yapısal gen taşımaz ve transkripsiyon ve replikasyon için düzenleyici diziler ve promotor içerir. Bu bölgede genelde tekrarlayan diziler görülür (Wu ve ark 2007).

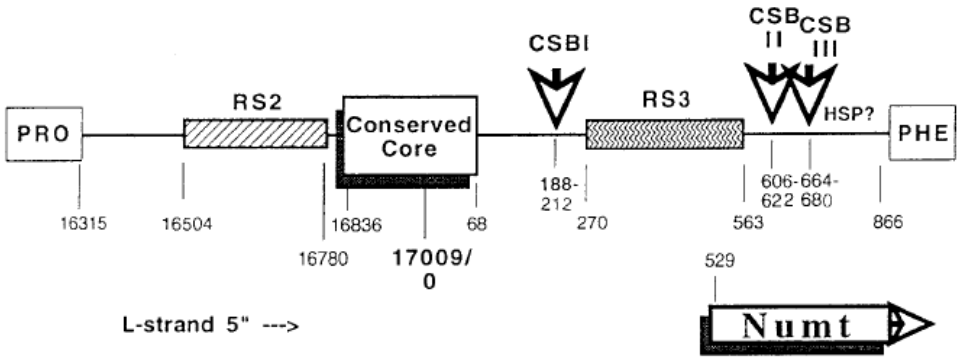
Kontrol bölgesi olarak da bilinen mtDNA D-Loop dizisi, mtDNA'nın diğer bölgelerinden daha değişkendir. Bu da onu türlerin orijini ile ilgili çalışmalarda en kullanışlı araç haline getirmiştir (Jia ve ark 2007).

Mitokondrial DNA'nın iki ipliği vardır. Bu iplikler ağır (H) ve hafif (L) olarak adlandırılırlar (Şekil 1.4). Ağır iplik transkripsiyonu saat yönünde, hafif iplik transkripsiyonu saat yönünün tersine ilerler. Transkripsiyon başlangıç bölgesi mtDNA'nın Displacement Loop (D-Loop) denilen kontrol bölgesidir (Ayhan ve ark 2004).



Şekil 1.4. mtDNA H ve L bant (Sezgin 2010).

Kedi kontrol bölgesi yaklaşık olarak 1560 bç uzunluğundadır. tRNA-Thr ve tRNA-Phe arasında yer alan bu bölge CSBI, CSBII, CSBIII, RS2 ve RS3 bölgelerinden oluşmaktadır. İyi korunmuş bölge olan CSBI bölgesinin bir tarafında RS2 ve diğer tarafında RS3 tekrar bölgeleri uzanmaktadır. CSBI bölgesi korunmuş bölge ve RS3 tekrar bölgesi arasında bulunmaktadır (Şekil 1.5). CSBI bölgesi çok iyi korunur ve memelilerin çoğunda aynı dizilime sahip olmasına rağmen *Felis catus* ve insan gibi bazı memelilerde nükleotid diziliminde bazı değişikliler olduğu bilinmektedir. RS2 ve RS3 tekrar dizileri nadir görülen bir özelliktir ve bu özellik insan ve Felis gibi bazı canlılarda görülmektedir (Lopez ve ark 1996, Wilkinson ve Chapman 1991). Kontrol bölgesi mtDNA'nın en hızlı evrimleşen bölgesidir. Yakın türler ve alt türler arasındaki evrimsel yakınlığı tanımlamada yaygın olarak kullanılan bölgedir (Lopez ve ark 1997, Jae-Heup ve ark 2006).



Şekil 1.5. Kedigiller kontrol bölgesinin şematik diagramı (Lopez ve ark 1996).

1.3. Model Organizma Olarak Kediler

Uluslar Arası İnsan Genom Araştırma Enstitüsü (NHGRI), 2005 yılında evcil kedi *Felis catus*'u da içine alan 26 memeli için kapsamlı (2x) tüm genom dizi analizini gerçekleştirmeyi planlamıştır. Kediler, köpekler gibi kapsamlı bir şekilde veteriner hekimler gözetiminde incelenmesi sonucunda, insan hastalıklarıyla analog 200 hastalık tanımlanmıştır (O'Brien ve ark 2002, Pontius ve ark 2007). Örneğin hastalıklardan viral olanlar; felin bağışıklık yetersizliği (immunodeficiency) virusu (FIV) - insanda AIDS ile, felin corona virüsü (FeCoV) - insanda SARS ve kuş gribi ile, canine distemper virusü- insanda neurotropic virusu ile felin lösemi ve sarcoma virusleri (FeLV, FeSV) - insanda lösemi ve sarcoma virusleri ile (bu virüsler onkogen araştırmaları için alt yapı oluştururlar) analog olarak görülmüştür (O'Brien ve ark 2002).

Felidae familyası Dünya üzerinde yürüyen, ve şimdilerde tehdit altında bulunan yırtıcı türleri içermektedir. Evcil kediler Felidae familyasının evcilleştirilmiş temsilcileridir. (O'Brien ve Johnson 2005, Pontius ve ark 2007). Kedi hastalıkları ile ilgili geniş patoloji literatürü bilgisi, sanat ve tarih içinde insanların kedilere karşı ilgisi, buna ilave olarak atasal gen düzenlerinin çok fazla korunmuş olması, diğer araştırmaları tamamlayan, aydınlatıcı bilgiler sunması, kedi genomunu diğer çalışmalar için kullanılan yardımcı bir kaynak haline getirmiştir (Johnson ve ark 2006, Pontius ve ark 2007).

1.4. Kedilerde Nüklear Mitkondrial DNA Dizileri (Numt)

Ökaryotik genomlar, geçmiş zamanlarda atalarının kromozomlarından mitokondriyal genomlarına geçmiş dizilerin kalıntılarını muhafaza etmektedirler. (Richly ve Leister 2004, Pontius ve ark 2007). Bu kalıntıları Lopez ve ark (1994) Numt (Nüklear mitokondrial DNA) olarak isimlendirmişlerdir.

Kedi ailesinde çok iyi karakterize edilmiş iki numt bölgesi vardır: Bunlardan ilki evcil kedide lopez-numt bölgesidir. Bu bölge kromozom D2 üzerinde bulunur 10bç'lık delesyonla ayırt edilir, 38-76 kez tekrar eden mtDNA nükleotid kopyasından oluşur. Bu kopyalar CR-12S-16S-ND1-ND2-CO1-CO2 arasında uzanır ve 7.9 kb'dan meydana gelir (Lopez ve ark 1994, Lopez ve ark 1996, Pointeus ve ark 2007). İkincisi ise büyük kedilerin en yaygın atası olan *Pantera* genusunda F2 kromozomunda son olarak bulunan 12.5 kb'lık yerdeğişimdir (transposition) (Kim ve ark 2006, Pontius ve ark 2007).

Felis catus Numt DNA dizileri 7946 bç uzunluğundadır ve tahminen 38-76 kopyadan oluşan tek bir monomerden türemiş tekrarlayan kromozomal dizilerden meydana gelmektedir. Sitoplazmik mtDNA ve numt arasında eşleşen bölge RS3 tekrarı içinde 529. nükleotidden başlamakta, COII'nın %80'ını de içine alan 8453. nükleotide kadar uzanmaktadır (Lopez ve ark 1994, Lopez ve ark 1996).

1.5. Kedinin Kökeni

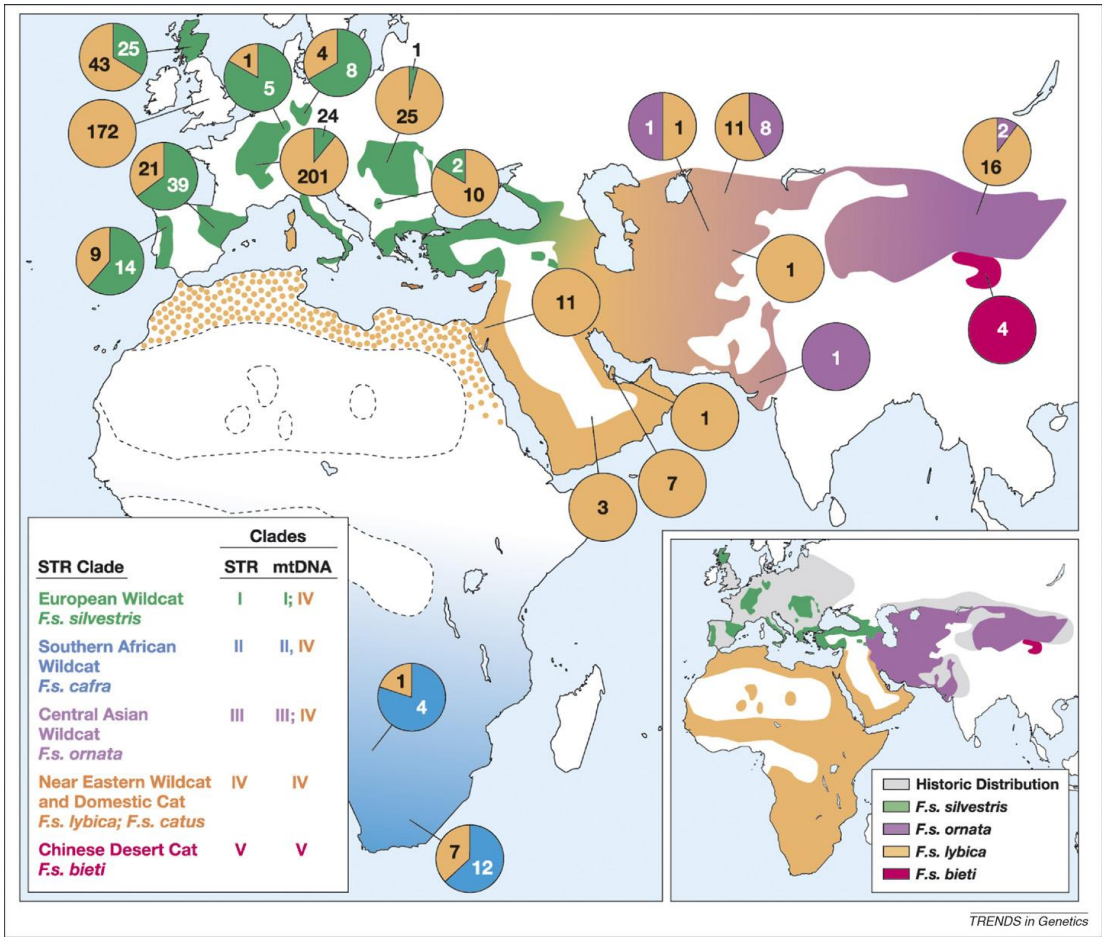
Kediler ve bunların vahşi soyları uzun yıllardır Dünya üzerinde yaşamaktadır. Fosil kayıtları ilk kez 35 milyon yıl önce görüldüğünü ileri sürmektedir. Uzun zaman önce büyük kılıç dişli kaplanın soyu tükenmiş olsa da, modern kedilerin 10-11 milyon yıl önce yaşamış, orta boy bir kedinin soyundan meydana geldiği bilinmektedir (O'Brien ve Johnson 2005, O'Brien ve ark 2008). Kediler Felidae ailesinin yaşayan, evcilleştirilmiş en başarılı temsilcileridir, ancak aynı zamanda günümüzde Dünya üzerindeki kemiricilerin en fazla tehdit altında olanlarıdır (O'Brien ve Johnson 2005).

İnsan yerleşimi yaklaşık 10.000 yıl önce Güneybatı Asya'da gözlenmiştir. O dönemlerde Akdeniz havzasının derin ormanlarında başa çıkması zor ufak kedi

türleri birbirleri ile karışmışlardır. Bu karışan türlerin orman kedisi, çöl kedisi ve sık rastlanan bir vahşi kedi olan *Felis silvestris* olduğu bilinmektedir.

Felis silvestris'in 3 alt türden geldiği kabul edilir. Bunlar *F. silvestris silvestris* (Avrupa vahşi kedisi), *F.s. ornata* (Ortadoğu vahşi kedileri) ve *F.s. lybica* (Asya ve Yakındoğu vahşi kedileri). Bu soylardan herhangi biri belkide kedinin evcilleştirilmesinde başarılı bir örnektir (O'Brien ve ark. 2008).

Son zamanlarda yapılan filocografik çalışmalarda, üç kıtada, evcil kedi (N=979) ve vahşi kedi ile 36 STR bölgesi ve 2604 bç mitokondrial DNA kullanılarak *F. silvestris*'ın alt tür yapısı ve onun evcil kedilerle akrabalık bağı çözümlenmiştir ve alttürlere özgü nüklear ve mtDNA soyları her bir populasyon içinde net bir şekilde ilk defa tanımlanmıştır. Örneğin, Afrikada Sahara Çölünün Güney kısmına ait iki çeşit mtDNA genotipi oldukça belirgin bir şekilde bulunmuştur (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Evcil ve Afrika vahşi kedisi, sırasıyla bej ve mavi daire grafiği. (Driscoll ve ark 2007, O'Brien ve ark 2008)

Dünya üzerinde çok sayıda süslü kedinin (112 süslü kedi türünü içerir) genotipi tanımlamıştır. Fakat yakındoğu alt türü olan *F.s.lybica* tarafından oluşturulan gruplar ayırt edilememiştir. Ayrıca genetik yapı temelli analizler yakındoğu'daki (İsrail, Birleşik Arap Emirliği ve Suudi Arabistan v.b) vahşi kedilerin farklı bir populasyon oluşturduklarını göstermektedir. Bu populasyon Dünya evcil kedilerinin kurucu ata populasyonlarını yansıtıyor olabileceği düşünülmektedir.

Arkeolojik kazılarda, bilinen en eski kedi ve insan kalıntıları birlikte 9500 yıl önce Kıbrıs'ta ortaya çıkmıştır (sciencedaily.com 2010). Bazı araştırmacılara göre ise 5000-6000'li yıllarda Eski Mısır uygarlığı kurulmadan önce, bu bölgede evcilleştirmenin olduğu ileri sürülmektedir (Serpell 2000). Buna alternatif olarak arkeolojik ve genomik bilgi beraber değerlendirildiğinde, (yaklaşık 10000 yıl önce verimli yarımayda) ilk tarım köyünün kurulmasıyla hemen hemen aynı zamanda yakın doğuda bir evcilleştirme alanının varlığı işaret edilmektedir. Belki de vahşi kediler ilk tarım ambarlarında hareket eden kemirgenlere karşı, ilk çifçiler tarafından avcı olarak kullanılmışlardır. Evcilleştirmenin yakın doğu orijininden, daha sonra aşamalı bir şekilde, kedilerin insan dostları tarafından tüm Dünyaya yayılmaları gerçekleşmiştir (O'Brien ve ark 2008).

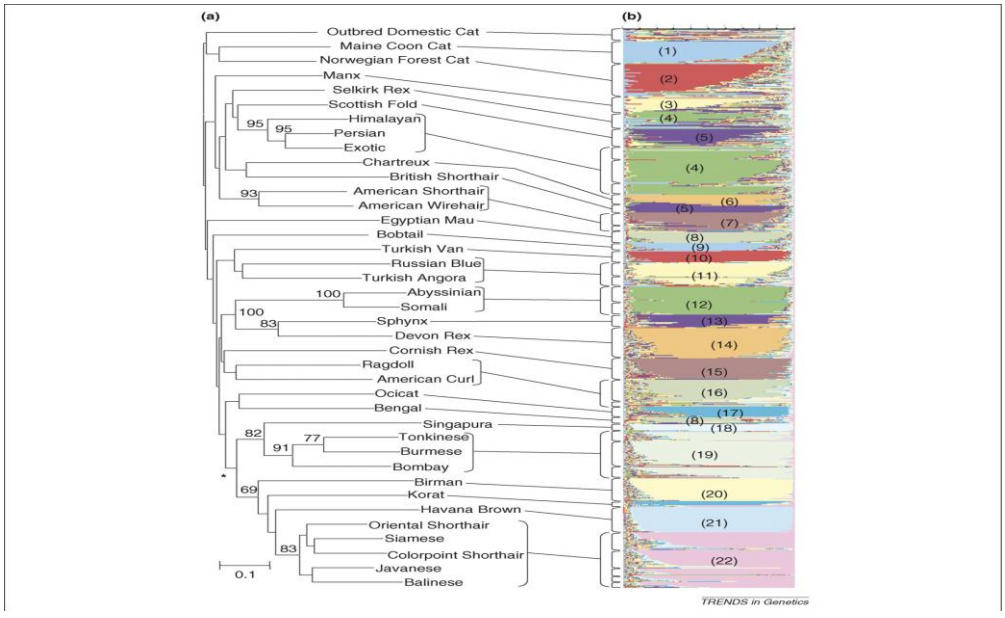
1.6. Gen Kaynaklarının Korunması

Genetik çeşitlilik belirli bir bölgede yaşayan, o bölge şartlarına adapte olmuş canlıların kalıtsal bilgilerinin çeşitliliğini gösterir. Bu canlılar ve ırkları kendi içlerine oluşturdukları genotipler ile gen havuzları oluştururlar (Mercan ve Okumuş 2010). Türkiye Dünya'nın en önemli bir gen merkezidir (Ertuğrul ve ark 2009). Türkiye evcilleştirme merkezlerine çok yakın bir konumdadır ve eski göç yolları Türkiye'den geçmektedir. Bu nedenle genetik çeşitlilik çok fazladır. Bu kaynakların korunması geçmişe yönelik evrimsel çalışmaların yapılması, zaman içinde genomdaki değişimlerin takibi ve saf ırkların tespiti, genetik zenginliğinin korunması için önemlidir.

1.7. Kedilerin Genel Özellikleri

Vücutları genelde ince ve uzun, boyunları kısa ve başları yuvarlaktır. Aslanlar hariç eşeysel dimorfizm göstermezler. Erkek bireyler biraz daha iridir. Gözleri büyük, önde, pupilleri çubuk şeklindedir. Bu diğer hayvanlarda yuvarlaktır. Kulakları orta büyüklüktedir. Bacakları orta ile uzun, kuyrukları kısa ile uzun arasında değişir. Ağız ve burun kısımları çıkıktır. Tırnakları keskindir ve geriye çekebilirler. Karınlarında 4, bazen göğüslerinde buna ilave 2 meme uçları vardır. Tüm kedilerde 37 çift kromozom bulunur. Üst dudaklarındaki dokunma kılları yön bulmada ve nesneleri tanımada rol oynar. Yırtıcı hayvanlardan biridir. Evcil kediler hemen hemen insanların yedikleri herşeyi yerler. Çok iyi görürler ve sesleri çok iyi algılarlar. Kulaklarını sesin geldiği yöne çevirirler. Karanlığa gözün uyumu insanlara göre daha hızlıdır. Geceleri ışık düşünce gözlerinin parlamasının sebebi Tapetum lucidum tabakasından dolayıdır. Denge organları ve denge duygusu gelişmiştir. Bu nedenle genelde dört ayaklarının üzerine düşerler. Kediler genelde 1-2 kez doğum yaparlar. Evcil kedilerde gebelik 65 gündür. Bir batında 1-6 yavru doğururlar, yavrular 85-110 gr arasında doğarlar (Demirsoy 2003).

Felidae ailesinin 37 kedi türü genellikle içlerinde panther, ocelot (benekli yaban kedisi) ve evcil kedi türü olarak ayrılır (Şekil 1.7) (Janczewski ve ark 1995).



Şekil 1.7. Kedi ırklarının filogenetik ağacı (Driscoll ve ark 2007, O'Brien ve ark 2008).

1.8. Araştırmada Kullanılan Evcil Kediler

1.8.1. Van Kedisi



Resim 1.1 Van Kedisi (internetveteriner.com 2010)

Van kedileri Van yöresinde yaşayan, kedi cinsleri arasında yüzmeyi tek seven, asil bir kedi ırkıdır. Van kedilerinin saf beyaz renk uzun tüyleri vardır. Bu uzun tüyler diplere doğru ipeksi bir dokunum kazanırlar. Van kedisinin göz rengi üç gruba ayrılır. Her iki gözü mavi (daima turkuaz mavisi), her iki gözü kehribar (Sarı renk ve tonları, çok nadiren kahverengi) ve tek-göz (Diskromatopsi; yani bir gözü mavi diğer gözü kehribar renkte olanlar) diye gruplandırılır. Mavi renk, daima turkuaz mavisi özelliğinde olurken, kehribar rengi farklı tonlarda görülebilir. Bununla birlikte, mavi gözlü Van kedileri de kendi arasında mavi gözlü kısa, kadife kürklü ve mavi gözlü-uzun ipek kürklü kediler olarak ikiye ayrılır. Gözlerinin kenarları, burunları, patileri ve kulak içleri pembedir. Suyla oynamayı ve yüzmeyi çok severler (Akay 1994).

Arkeolojik çalışmalar Van kedisi 7000 yıllık bir geçmişi olduğunu gösterir. Hacılar bölgesinde kedilerle oynayan kadınların topraktan yapılmış heykelciklerine rastlanmıştır (Somer 2010).

1.8.2. İran Kedisi



Resim 1.2 İran Kedisi (evcilkediler.com 2010)

İran kedileri vücutları kürklü, asil duruşlu hayvanlardır. Kendilerine de bu şekilde davranılmasını beklerler. Tüyleri uzun olduğu için her gün fırçalanmak ve taranmak isterler. Rahatına düşkün sakin hayvanlardır. Vücutları yapılı ve kaslıdır. (Akay 1994). Soyları ilk kez İran'da ortaya çıktığı için bu ismi alırlar. Fakat hiyorografi kaynakları M.Ö. 1684 yılında bu kedilerin var olduğunu göstermektedir (Pollard 2010).

1.8.3. Ankara Kedisi



Resim 1.3.Ankara Kedisi (freewebs.com 2010 b)

Her zaman uzun, ipek gibi tüyleri vardır. Beyaz olabildikleri gibi faklı renkli olanları da bulunmaktadır. Beyaz olan kediler korunmaya alınmıştır ve ülkemizde yetiştirilmektedir. Bu kedilerin farklı bir özelliği uzun tüylü kuyruklarını vücutlarının üstünde yatay olarak taşırlar ve çoğunlukla kuyrukları başlarına değer (Akay 1994).

Anatomik yapı olarak Ankara kedileri, orta büyüklükte bir kafa şekline, üçgenimsi uzun bir burun yapısına sahiptir. Kulaklar uzun, dik ve birbirine yakın, başın üst kısmındadır. Kulak uçları tüylüdür. Gözler iri ve yuvarlak, göz bebekleri dikey badem şeklindedir. Ankara kedilerinin en önemli özellikleri doğuştan sağır olmalarıdır. Fakat bazı bireylerde görülmeyebilir (evcilkediler.com 2010a).

1.8.4. Siyam Kedisi



Resim 1.4. Siyam Kedisi (kitten-stork.com 2010)

Genişten başlayarak aşağı doğru incelen takoz biçimli kafası orta boydadır ve beden ölçülerine uyumludur. Kafa burundan başlayarak kulaklara doğru tam bir üçgen oluşturur. Bıyık bölgesi fazla çıkıntılı değildir fakat erkek kedilerin çeneleri daha belirgindir. Boyunları zarif, ağız kısımları narin, uzun ve üçgendir.

Sivri uçlu kulakların alt kısmı geniştir ve birbirlerinden ayrıktır. İnce kemikli orta boy gövdesi sıkı kaslıdır. Vücut hatlarında hep kalından inceye doğru şekil almaktadır. Omuzları ve kalçaları göğüs kafesiyle aynı kalınlıktadır. Bedenine doğru yatık duran tüyleri ince, parlak ve kısadır (evcilkedi.com, 2010).Klasik beyaz-kahve olmasının dışında faklı tüy renkleri de vardır. Parlak mavi gözleri ve güçlü bir duruşları vardır (Akay 1994).

1.8.5. Tekir Kedisi



Resim 1.5. Tekir Kedisi (evcilkediler.com 2010c)

Tekir kedi melez bir ırktır. Karakter olarak tüm kedi ırklarının özelliklerini hemen hemen gösterir. Genel olarak post renklerinden dolayı bu ismi almışlardır.

Bugünkü post renkleri incelendiğinde çizgili desenler çok bariz ve canlı görülmektedir. Arkeologların mağara resimlerinden yaptıkları incelemelerde, bundan yaklaşık üç dört bin yıl önce Mısır kedilerinde post desenleri çok soluk ve kırık hatlar şeklinde olduğu gözlemlenmiş, aynı izlenim Avrupa kedilerinden de elde edilmiştir. Zaman içerisinde Mısır ve Avrupa kedi türleri birleştirilip melez ırklar geliştirildikçe desenlerin daha bariz ve canlı bir hal aldığı görülmüştür. Sonuçta bugünkü cazip renkli tekir postu ortaya çıkmıştır (evcilkediler.com, 2010c).

1.9. Kediler ile Yapılan diğer Çalışmalar

Kedi genom projesi kapsamında memeliler arasındaki genom organizasyonunun araştırılması ve evcil kedileri de içine alan genom dizisinin ve gen haritalanmasının düzenlenmesi gerektiği belirtilmiştir. Bu genom projesinde kedi genomunun tamamen çözümleneceği, biyolojik amplifikasyonlarının ortaya koyulacağı ve genom karşılaştırmalarının ve hastalık modellerinin tanımlanacağı ifade edilmiştir (O'Brien ve ark 2002).

Yapılan bir çalışmada (Masuda ve ark 1994), Iromata kedilerinin (*Felis iriomtensis*) moleküler genetik yapıları, mitokondrial 12S ribozomal RNA geninin parsial dizileri ve sitokrom b geni, PZR ve direkt dizi analizi tekniği ile belirlenmiş ve diğer 7 kedi türleriyle karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada incelenen 6 Iriomoto kedisinin her iki kontrol bölgesi içinde intraspesifik varyasyon göstermediği tespit edilmiştir. DNA dizilimleri benzerlikleri ve moleküler filogenetik ağaçları Iriomota kedilerinin leopar kedilerle (*Felis bangelensis*) çok yakın ilişki içinde olduğunu ortaya koymuştur.

Tamada ve ark (2005) Tsushima adalarından elde edilen 50 evcil kedinin (*Felis catus*) mtDNA dizilerini belirlemiş ve genetik farklılıklarını analiz etmişlerdir. Kedilerde tüm sitokrom b dizilerinin 6 haplotipi ve parsial kontrol bölge dizilerinin 10 haplotipi ortaya çıkarılmıştır. Her bölgeden elde edilen haplotipler Tsushima'daki evcil kedilerin en az 11 maternal bağlantısının varlığını göstermişlerdir. Kontrol bölgesindeki polimorfik bölge sayılarının ortalama değerleri ve dizi farklılıklarının sırasıyla sitokrom b genindekinden 2.4 ve 1.8 kez daha büyük olduğunu belirlenmiştir.

Wu ve ark (2007) tarafından *Neofelis nebuloas*'nın 16844 bç'lık mitokondrial DNA'sının tamamının dizi analizi yapılmış ve sonuçları *Felis catus* ve *Acinonyx jubatusu*'un mitokondrial DNA'ları ile karşılaştırılmıştır. *N. nebulasa*'nın baz kompozisyonu A (%31.7); C (%26.4); G (%14.8) ve T (%27.1) olarak bulunmuştur. Genom komplementi ve gen düzeninin diğer memelilerle benzer olacağı düşünülmüştür. Fakat *N. nebulasa*'nın birçok nadir özelliği bulunmuştur. Bunlardan birincisi protein kodlayan bölgede AT çaprazlaması diğer memelilerde kodonun üç pozisyonunda iken, *Neofelis nebulosa*'da kodonun ikinci pozisyonunda yer

almaktadır. İkincisi ise DHU kolundan yoksun olan $tRNA^{ser}$ (AGY), yonca yaprağı yapısı bulunamamıştır. Üçüncü olarak kontrol bölgesinde tekrarlayan diziler (RS-2) bulunamamıştır. Halbuki birçok kedide kontrol bölgesinde RS-2 tekrarlayan diziler genellikle görülmektedir. Buna ilaveten, kontrol bölgesinin CSB-3 bölgesinde 4 değişik alan bulunmuştur. Dördüncü olarak *N. nebulosa*'ın mtDNA kontrol bölgesinin diğer bölgelerden daha kısa olduğu bulunmuştur.

Eizirik ve ark (1998) ocelot (*Leopardus pardalis*) ve margay (*L. wiedii*) türlerinin 3-5 milyon yıl önce Panamian boğazından geçip Güney Amerika'ya göç eden bir soydan gelişen neotropikal kedilerin kardeş türlerinden olduklarını ileri sürmektedir. Her türün populasyon örneğindeki genetik uzaklığı, bireysel mtDNA kontrol bölgesinin genetik analizi yapılarak taxaların karşılıklı dağılımı çalışılmıştır. Çok hareketli çeşitlilik ve dikkat çekici uyumlu filogenetik parçalar her iki tür için tanımlanmıştır. Buna ilaveten, mtDNA kontrol bölgesinin dizi analizlerine bakıldığında moleküler evrimde kedilerle yakın akrabalık sağladığı gözlenmiştir.

Wei ve ark (2008) *Pantera uncia*'nın tüm mtDNA genomunu dizayn ettikleri 30 primer ile PZR tekniğini kullanarak çoğaltmışlardır. mtDNA'nın tüm dizisi 16773 bç uzunluğunda ve baz kompozisyonu A (%31.9); C (%26.5); G (%14,5) ve T (%27,1) oranlarında hesaplanmıştır. *P. uncia* mitokodrial genomunun karakteristik yapısı *F catus, Acinonyx jubatus, N nebulosa* ve diğer memelilerle oldukça benzer olarak bulunmuştur. Bunun dışında *P. uncia*'nın mitokondrial genomunun birçok karakteristik özelliğini bulmuşlardır. İlk olarak *F catus, A jubatus, N nebulosa'*dan farklı olarak, COIII'nın terminasyon kodonu TAA'dır. İkinci olarak; DHU kolu bulunmayan $tRNA^{ser}$ (AGY) tipik yonca yaprağı yapısında bulunamamıştır. Üçücü olarak kontrol bölgesinde, RS-2 bölgesinde uzun tekrarlayan diziler RS-3 bölgesindeki 15 tekrarla birlikte bulunan bir kısa tekrar segmenti (9 bç) olduğunda 2 tekrar şeklinde gözlenmiştir.

Jae-Heup ve ark (2001) mikondrial DNA kontrol bölgesinin yapısını ve çeşitliliklerini *Pantera* genusunun 5 türü içinde tanımlamışlardır. Karşılaştırmalı analiz ile iki hypervariable segment, merkezi bir korunan bölge, uzunluk farklılığı ve dizilim heteroplazmisi olayını açıklamışlardır. Evcil kedilerde gözlenen fakat diğer memelilerde gözlenmeyen, iki tekrardan oluşan dizi düzenini (80 bç şeklinde R2 ve 6-10 bç şeklinde RS-3) tanımlamışlardır.

Mills ve ark (2000) tarafından Kanada lynx'lerinin dağılımını belirlemek için kıl kullanarak bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmayı karşılaştırabilmek için Kuzey Amerikanın kuzeyine özel 4 kedi türünü (lynx (*Lynx canadensis*), bobcat (*Lynx rufus*), cougar (*Felis concolor*) ve evcil kedi (*Felis catus*)) içine alan bir protokol geliştirilmiştir. Mikrosatellit DNA kullanımının türleri tanımlamada yetersiz kalacağı düşünülerek ve mtDNA'nın hücre içinde kopya sayısı fazla olduğu için bu çalışmada mtDNA tercih edilmiştir. Aynı zamanda bireylerdeki farklı dokular arasında yüksek derecede korunan ve saçtan çoğaltılması oldukça kolay olan mtDNA tercih sebebi olmuştur. PZR ile mtDNA'dan iki bölge çoğaltılmıştır. Bölgelerden biri olan kontrol bölgesi, evrensel primer olan L16007 ve H16498 kullanılarak çoğaltılmıştır.

Türkiye'deki bazı kedi ırklarının genetik yapılarının mikrosatellitlerle incelenmesi başlıklı tezde (Eroğlu 2007) 5 kedi ırkı (Van kedisi, Ankara kedisi, Siyam kedisi, İran kedisi, Tekir kedisi) ait 10 farklı mikrosatellit markeri (FCA069, FCA075, FCA105, FCA149, FCA220, FCA229, FCA240, FCA310, FCA441 ve FCA678) ile genetik karakterizasyon çalışması yapılmıştır. Sonuçta toplam 274 farklı allel gözlenmiş ve her lokus için tespit edilen ortalama allel sayısının 8.3 (Van kedisi) ile 3,7 (Siyam kedisi) arasında değiştiği belirlenmiştir. Bireylerin genetik olarak birbirlerine ne derece benzediklerini FCA (allel paylaşım uzaklığı) metodu kullanılarak analiz edilmiştir. Bu analize göre İran, Siyam, Ankara ve Van kedileri birbirlerinden ayrı bölgelerde yoğunlaşmışlardır. Fakat Van, Ankara ve Tekir birbirine daha yakın bir konum almışken, Siyam ve İran kedilerinin daha uzak bir konumda toplandıkları gözlenmiştir.

Altunok ve ark (2010) tarafından yapılan Van kedilerinde enzim elektroforezi analiz sonuçlarına göre, Van kedilerinde polimorfizmin yüksek olduğu ve elde edilen sonuçlarla göz renkleri arasında bir ilişki tespit edilemediği bildirilmektedir.

Bu tez çalışmasında, Van kedileri ile diğer bazı kedi ırklarındaki mtDNA polimorfizmini ortaya koymak amaçlanmıştır. Ayrıca Van kedilerinde elde edilen mtDNA analiz sonuçları ile göz renkleri arasında herhangi bir ilişkinin olup olmadığı da değerlendirilmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu'nun 27.03.2008 tarih ve 2008-021 sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir.

2.1.Hayvan Materyali

Materyal olarak 35 Van Kedisi, 5 İran Kedisi, 10 Tekir Kedisi, 9 Siyam Kedisi ve 6 Ankara Kedisi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan 35 adet Van Kedisinin kan örnekleri Yüzüncü Yıl Üniversitesi Van Kedi Evinde yetiştirilen kedilerden, diğer ırk kedilerin kan örnekleri ise özel ve tüzel kişilerin elinde bulunan kedilerden temin edilmiştir. Toplam 65 kediden kan örnekleri Vena cephalica antebrachii'den antikuagulantlı (K_3EDTA) tüplere alınmıştır ve analize kadar -20^{0}C'de saklanmıştır. Kedilerden alınan 65 adet kan örneklerinin hepsinin çalışılmasına rağmen, bölgenin çok polimorfik olması nedeniyle 39 kedi örneğinden kaliteli analiz sonucu elde edilmiştir. Çok farklı analiz yöntemleri denenmesine rağmen ve bu alanda yeterli literatür veri olmaması nedeniyle diğer örneklerin analizlerinden sağlıklı sonuçlar elde edilememiştir. Bu nedenle çalışmada 39 adet kedinin (25 Van kedisi, 3 İran kedisi, 3 Tekir kedisi, 7 Siyam kedisi ve 1 Ankara kedisi) analiz sonuçları sunulmuştur.

2.2.Kandan DNA İzolasyonu

Standart fenol/kloroform yöntemi kullanılarak kandan DNA izolasyonu yapıldı. 400 µl kan örneği alınarak 2 ml'lik eppendorf tüpe konuldu ve üzerine 20µl 0,5 molar EDTA (pH 8,0) eklendi. Bu karışım 2X lysis buffer ile 2 ml'ye tamamlandı. 10 dakika boyunca tüpler alt üst edilerek karıştırıldı ve 30 dakika buz içinde beklemeye bırakıldı. Buzdan alınan örnekler 3000 rpm'de +4^{0}C de santrifüj edildi. Santrifüjden çıkan örneklerin süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Kalan pelet üzerine 240 µl salt/EDTA eklenerek vortexlendi. Üzerlerine 24 µl %10'luk sds, 12µl proteinaz K (10 mg/ml) eklenerek 55 ^{0}C de 3 saat etüvde bekletildi. Bu süre sonunda 240 µl fenol (pH 8,0) eklendi, tüpler 5 dakika ters yüz edilerek karıştırıldı. İyice karıştırılan örnekler 3000 rpm de +4^{0}C de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı tüplere alındı. 240 µl fenol: kloroform: izoamil alkol (25:24:1) eklendi, tüpler 5 dakika ters yüz edilerek karıştırıldı. 3000 rpm de +4^{0}C de 10 dakika santrifüj edilen örneklerin süpernatant kısmı yeni tüplere alındı. Alınan

süpernatantlar üzerine 1/10 kadar 3 M NaAc (pH 5.2) eklendi, üzerlerine alınan süpernant kısmının 2,5 katı kadar -20^{0}C de soğutulmuş %95'lik etanol eklendi. Tüpler sert bir şekilde sallandı. Alkol otomatik pipet ile ortamdan uzaklaştırıldı. Kalan alkol ise etüvde buharlaştırılarak uzaklaştırıldı. Kuruyan pelet 200 µl ddMQ ile sulandırıldı.

2.3. İzole Edilen DNA'nın Kalitesinin Ölçülmesi

İzole edilen DNA'lar Thermo Scientific Nanodrop ND-1000 ile ölçüldü. ng/µl değeri ile DNA'nın yoğunluğuna, 260/280 dalga boyunda absorbans değerleri belirlendi.

2.4. Normal PZR'ın Hazırlanması

Her bir örnek için 40µl TP (150 µl Taq Buffer, 90 µl $MgCl_2$, 3 µl her bir dNTP, 748 µl MQ, 37,5 ünite DNA Taq polimeraz (Fermantas)) 0,8 µl primer, 8 µl DNA ve 11,2 µl MQ olmak üzere 60 µl karışım hazırlandı ve PZR Termocycler cihazı (MJ Research PTC-200) ile 95^{o}C 4dk denatürasyon, 16 siklus 94^{o}C 30 sn, 60-52 ^{o}C 30 sn, 72^{0}C 2 dk ve 30 siklus 94^{o}C 30 dk, 52^{o}C 30 dk, 72^{o}C 2dk annealing ve 72^{o}C 10 dk zincir uzatmasından sonra 4^{o}C 'de bekletilerek DNA çoğaltıldı. Çalışmada kullanılmak üzere çeşitli makalelerden 15 primer seçildi fakat bu çalışmada istenilen bölgeyi en iyi çoğaltan 6 primer tercih edildi **(**Tablo1.1**)**.

Tablo1.1. Çalışmada Kullanılan Primerler

Primer	F/R	Dizi 5'→3'	Referans
Primer 1	F	ATGAATCGGTGGCCAACCTGT	Tamada ve ark 2005
	R	TGCATGACACCACAGTTATGTG	
Primer 2	F	CCCTCCCTAAGACTTCAAGGAAGA	Randi ve ark. 2001
	R	GGGGTGAGTTGGTGGTTAATAGAG	
Primer 3	F	CACGCGAACGCTTTAATTTAA	Wojciech ve ark. 2006
	R	TAGGCATTTTCAGTGCCTTGC	
Primer 4	F	TACACACGTATACACGCGAACGCT	Bu çalışma
	R_1	GGCCAGGACCAAACCTTTGTGTTT	
	R_2	GGTGGCTGGCACGAAATTTACCAA	
Primer 5	F	TAGCCCCACCATCAGCACCCAAAGC	Zhang ve ark. 2006
	R	AATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGTA	
Seq.Primer	F	GAAGCAACAGCCCCACTATC	Tamada ve ark. 2005
Primer 6	F	AACATCCGTTCATCACCATCGGGC	Randi ve ark. 2001
	R	CGCACAGACAGTCAGGGTGCTATTC	
JHmt	F_3	GATAGTGCTTAATCGTGC	Grahn ve ark. 2010
	R_3	GTCCTGTGGAACAATAGG	

2.5. PZR Ürünlerinin Temizlenmesi

60 µl hazırlanan PZR ürünlerinden 10 µl'si agaroz jelde yürütüldü ve görüntülendi. Jelde iyi görünen ve primer dimer yapmayan ürünler seçildi ve genomik DNA'dan mtDNA temizlendi. Temizleme için Gene Clean Turbo Kit kullanıldı (MP Biomedicals, LLC).

PZR sonrası elde edilen 50 µl PZR ürünü 0.5 µl'lik eppendorf tüplere aktarıldı. Bu örneklerin üzerine 250 µl (5 kat) PZR Salt Solution eklendi ve iyice pipetlenen ürünler filtreli kolon takılı olan tüplere aktarıldı. 14000 rpm altında 5 sn santrifüj edildi. Kolonun üzerine 500 µl Gene Clean Wash solüsyonu eklendi ve 14000 rpm altında 5 sn santrifüj edilerek yıkandı. Santrifüj sonrası kolonun altındaki sıvı boşaltıldı ve 4 dk tekrar santrifüj edildi. Kolonlar yeni ependorf tüplerine yerleştirildi. Üzerlerine 30 µl elution solution (saf su)'dan eklendi. Kolonlar 5 dk oda ısısında bekletildi ve 14000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Santrifüj sonrası Nanodropta ölçümleri yapıldı.

2.6. DNA Dizi Analizi

Dizi analizi PZR'ı için DTCS (GenomeLab^{TM} Quick Start Beckman Coulter) kiti kullanıldı. Bu kitin protokolüne göre 4µl DTCS miksi, 1µl DNA (~50 fg), 1µl (3,2 pmol) primer ve 4 µl MQ koyularak 10 µl PZR karışımı oluşturuldu. Hazırlanan PZR karışımları 94^{o}C' de 3dk denatürasyon, 30 siklus 96^{o}C 20 sn, 50^{o}C 20 sn, 60^{o}C 4 dk ile DNA dizi analizi gerçekleştirildi.

2.7. Stop Solüsyonu ile Reaksiyonun Durdurulması

mtDNA dizi analizi için yapılan PZR'dan çıkan örnekler etanol presipitasyonu (etanolle çöktürme) işlemine tabi tutuldu. 2 µl 3 M NaAc (pH 5,2), 2µl 100mM Na_2EDTA (pH 8,0), 1µl Glikojen (20 ng/µl) olmak üzere toplam 5 µl stop solüsyonu (her bir örnek için) hazırlandı.

PZR ürününün üzerine 10 µl ddMQ, 5 µl hazırlanan stop solüsyonundan eklendi. Karışımın üzerine 60 µl %95'lik etanol ilave edildi. 14000 rpm'de 15 dakika santrifüj sonrası ürünlerin alkolü döküldü ve peçete üzerinde emdirilerek kalan alkolde ortamdan uzaklaştırıldı. Üzerine 200 ul % 70'lik alkol koyuldu ve tekrar 14000 rpm'de 2-3 dakika santrifüj edildi. Alkol tekrar dökülerek uzaklaştırıldıktan

sonra etüve koyularak tamamen kuruması sağlandı. Kuruyan ürünler 25 µl SLS (Sample Loading Solution) ile sulandırıldı. Sulandırılan ürünler Beckman Coulter CEQ-8000 Genetik Analizör sistemine yüklenerek kapiller elektroforez işlemi uygulandı.

2.8. İstatistiksel analiz

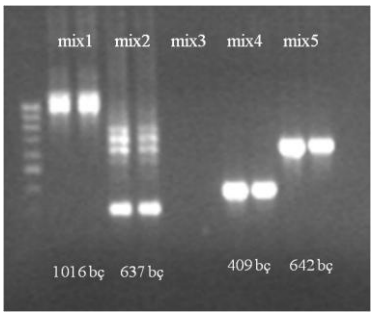
Bu çalışmada U20753 giriş numaralı referans dizi kullanıldı. 25 Van kedisi, 7 Siyam kedisi, 3 İran kedisi ve 3 Tekir kedisi, 1 Ankara kedisi'den elde edilen mtDNA dizi analizi sonuçlarının karşılaştırmalı istatistiği yapılabilmesi için, 10 farklı *Felis catus* haplotipine ait 50 bireyin bilgileri Tamada ve ark (2005) tarafından yapılan çalışmadan, bu isimlere ait dizi analiz sonuçları da NCBI veri bankasında, (www.ncbi.nlm.nih.gov) da belirtilen ve AB194819-AB194828 kodlu giriş numaralı verilerden elde edildi.

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi MEGA 4, (Kumar ve ark 2007), BIOEDIT (Hall 1999), ve DnaSP (Librado ve Rozas 2007) paket programları kullanıldı. DNA diziler BIOEDIT (Hall 1999) programı ile düzenlendi ve hizalandı. DnaSP (Librado ve Rozas 2007) programı ile genetik varyasyon, haplotip frekansı, nükleotid farklılaşması, nükleotid farklılaşmasının ortalaması, haplotiplerin farklılaşması hesaplandı. MEGA 4 (Kumar ve ark 2007) ise transisyon ve transversiyon farklılaşmasına dayanan Kimura-2 parametresi kullanılarak filogenetik ağaç çizimi için kullanıldı. Sonuçlar 10000 tekrarlı permutasyon ile kontrol edildi.

3. BULGULAR

3.1 PZR Reaksiyonu

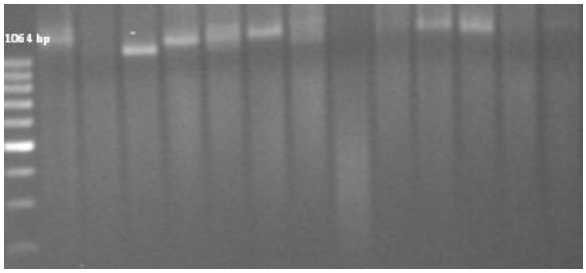
Çalışmada kullanılmak üzere çeşitli makalelerden 15 primer markeri seçildi fakat bu çalışmada istenilen bölgeyi en iyi çoğaltan 6 primer markeri tercih edildi. Kullanılan primerlerin Tm (bağlanma ısısı) değerleri farklı olduğu için geniş aralıklı ısı değerine sahip olan Touchdown PZR protokolü kullanıldı. Yükseltgenen PZR ürünleri % 1,5 Agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Primer dimer olmayan, istenilen ladder seviyesinde bant veren örnekler DNA dizi analizi için kullanıldı.



Resim 3. 1. Denenen primer çiftlerinden başarılı olanlarından bazıları.

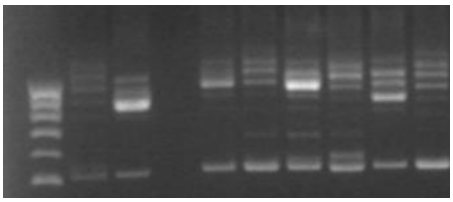
Resim 3.1.'de gösterilen jel görüntüsünde Mix1 (1F-1R) primer çifti yaygın olarak kullanılan primerlerdir. Mix2 (5F-5R) primer çiftinde istenilen bölgenin dışında net bant alınmıştır. Mix3 (3F-3R) primer çifti çalışmamıştır. Mix4 (4F-$4R_1$) primer çifti bu çalışma için tasarlanmıştır. Ve çok iyi çalışmasına rağmen bu bölge içinde Numt dizileri yaygın olduğu için bir risk oluşturmaktadır. Bu nedenle tercih edilmemiştir. Mix5 (4F-$4R_2$) primer çifti de tasarlanan primer çiftlerinden biri olmasına rağmen Numt dizilerinden dolayı kullanılmamıştır. Yapılan PZR çalışmasında birçok farklı kombinasyonlarda primer çiftleri denenmiş ve aralarından en uygun olanı seçilmiştir.

Aynı ırkta aynı primerler kullanılmasına rağmen bazı örneklerde primerlerin çalışmadığı veya çalışan örneklerde oluşan PZR ürünlerinde nükleotid sayılarının farklı olduğu gözlendi (Resim 3.2).



Resim 3.2 Farklı birey Van kedilerinde primer 1F-1R kullanılarak elde edilen sonuçlar.

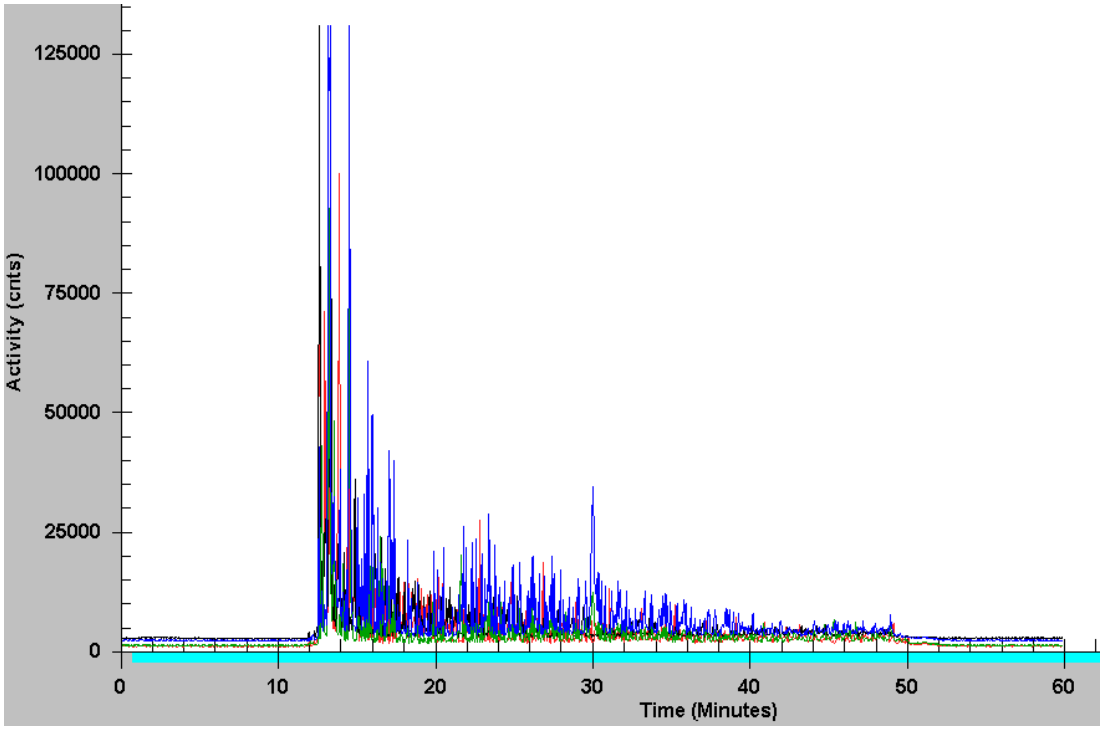
Irklarda aynı primerler özellikle 2F-1R primer kullanıldığın da nonspesifik bantlar gözlendi. Özellikle 500 bç'de net bantlar olduğu görüldü. Bu da bu bölgede polimorfizm fazlalığının bir göstergesi olabilir. Resim 3.3 de gözlendiği gibi ladder gibi düzenli nonspesifik bantlar görülmektedir.



Resim 3.3 Van kedilerinde 2F-1R primer ile gözlenen anspesifik bantlar

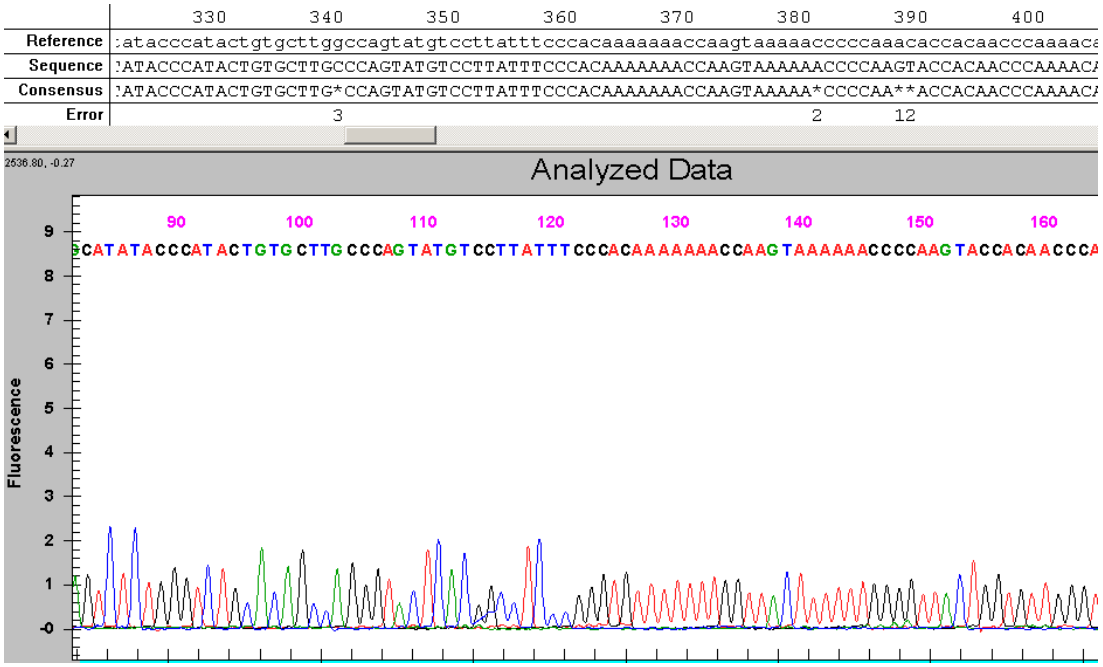
3.2. Kapiller Elektroforezde Dizi Analizi

Yükseltgenen PZR ürünleri jelde görüntülendikten sonra kit (Gene turbo purificasyon) yardımı ile mtDNA tuz ve diğer kimyasallardan ayrılarak saflaştırıldı. Elde edilen saf mtDNA dizi analizi istenilen dizi aralığının çoğaltılması için tekrar PZR ile tekrar yükseltgenildi ve dizi analizi cihazına yüklendi. Oluşturulan ham veriler analiz edildi (Grafik 3.1).



Grafik 3.1 SeqF primer kullanılarak elde edilmiş DNA dizi analizi ham verisi.

Analiz edilen dizi, referans bir dizi ile karşılaştırılarak eşleştirmenin gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edildi (Grafik 3.2).



Grafik 3.2. DNA dizi analizi elektroferogramı

3.3. D-Loop (Kontrol Bölgesi) Dizi Analizi Sonuçları

3.3.1. Materyal Olarak Kullanılan Kedilerin Karşılaştırılması

Çalışılan kedilerden 16396-16494 bç aralığındaki 99 bç nükleotid dizisi, Lopez ve ark (1996) tarafından sunulan U20753 referans dizisinin ilgili bölgesinde belirtilen değerler ile karşılaştırıldı. Elde edilen veriler Tablo 3.1'de gösterildi.

Tablo 3.1. D-loop bölgesinin 99bç'lik bölgesinin referans ile karşılaştırılması.

```
#REF    TTTCCCACAA AAAAACCAAG TAAAAACCCC CAAACACCAC -AACCCAAAA CACACAATGT AAAATCA-CT CTATTAA-CC AC-CAACTC- ACCCC-AGG
#I1SF   .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.....- .....-..T
#I3SF   .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.....- .....-..T
#I4SF   .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.....- .....-..T
#S1SF   .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#S2SF   .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#S42F   .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.....- .....-..T
#S55F   .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.....- .....-..T
#S6SF   .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.A.. .......-.. ..-......C .....-..T
#S8SF   .......... .......... .....C.... ...GT..... -......... .......... .....T.A.. .......-.. ..-.....- .....-..T
#S9SF   .......... .......... ......A... ...GT.....  ......... .......... ....... .. ....... .. ..  A...C.  ..... ..T
#T1SF   .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .......-.. .......A.. ..-A...C.- .....-..T
#T2SF   .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..CAC....- .....-..T|
#T3?F   .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.....- .....-..T
#A1-    .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.....- .....-..T
#V3SF   .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..A....C.- .....-..T
#V4SF   .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.....- .....-..T
#V5SF   .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V6SF   .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.....- .....-..T
#V7SF   .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V9SF   .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..I
#V10SF  .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V12SF  .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V13SF  .......... .......... .......... ...GT.....  ......... .......... .....T. .. ....... .. ..  ......  ..... ..T
#V14SF  .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.....- .....-..T
#V15SF  .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.....- .....-..T
#V16SF  .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V17SF  .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V18SF2 .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V19SF  .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V20SF2 .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V21SF3 .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.....- .....-..T
#V22SF  .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V23SF  .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.....- .....-..I
#V24SF3 .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. ......C-.. ..-....C.- .....-..T
#V25SF  .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.....- .....-..T
#V26SF  .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V28?F  .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.....- .....-..T
#V30?F  .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V31?F  .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.....- .....-..T
```

Analizi yapılan kedilerde, 10 polimorfik bölge belirlendi. Bu bölgenin 6 tanesi singletondur (16421, 16429, 16430, 16472, 16479 ve 16494). Sunulan çalışmaya göre kediler 8 haplotipten oluşmaktadır. Bu haplotiplerin farklılaşması 0.651 ± 0.048 olarak hesaplandı. Nükleotid farklılaşması Pi: 0,02519 ve nükleotid farklılaşmasının ortalaması k: 2.342 olarak bulundu. Tajima's D değeri -0.01100, Fu ve Li D istatistiği -2,008729, Fu's Fs değeri -0,230 olarak hesaplanmıştır.Çalışmada

kullanılan kediler kendi arasında gruplandırıldı, BİOEDİT paket programı (Hall 1999) ile yapılan hizalama ile kendi içlerindeki farklılıklar gösterildi.

Referans mtDNA dizisi ile çalışmaya konu olan kedilerin mtDNA dizisi karşılaştırıldığında, 16463. bç'de S6SF ve S8SF kedilerinde A, 16473. bç'de T1SF kedisinde A, 16478. bç'de T2SF kedisinde C ve V3SF kedisinde A, 16484. bç'de S6SF kedisinde C insersiyonlarının, 16472. bç'de V24SF kedisinde C, 16421. bç'de S8SF kedisinde C, 16480. bç'de T2SF C polimorfizminin varlığı belirlendi ve bu bulguların diğer kedilerden farklı olduğu gözlendi.

Dizi analiz sonuçlarına göre elde edilen genetik mesafeler (P>0.05) Tablo 3.2'de sunuldu.

Tablo 3.2 Eşitsizlik endeks analizi ile elde edilen genetik mesafeler (alt diyagonal) ve standart hataları (üst diyagonal)

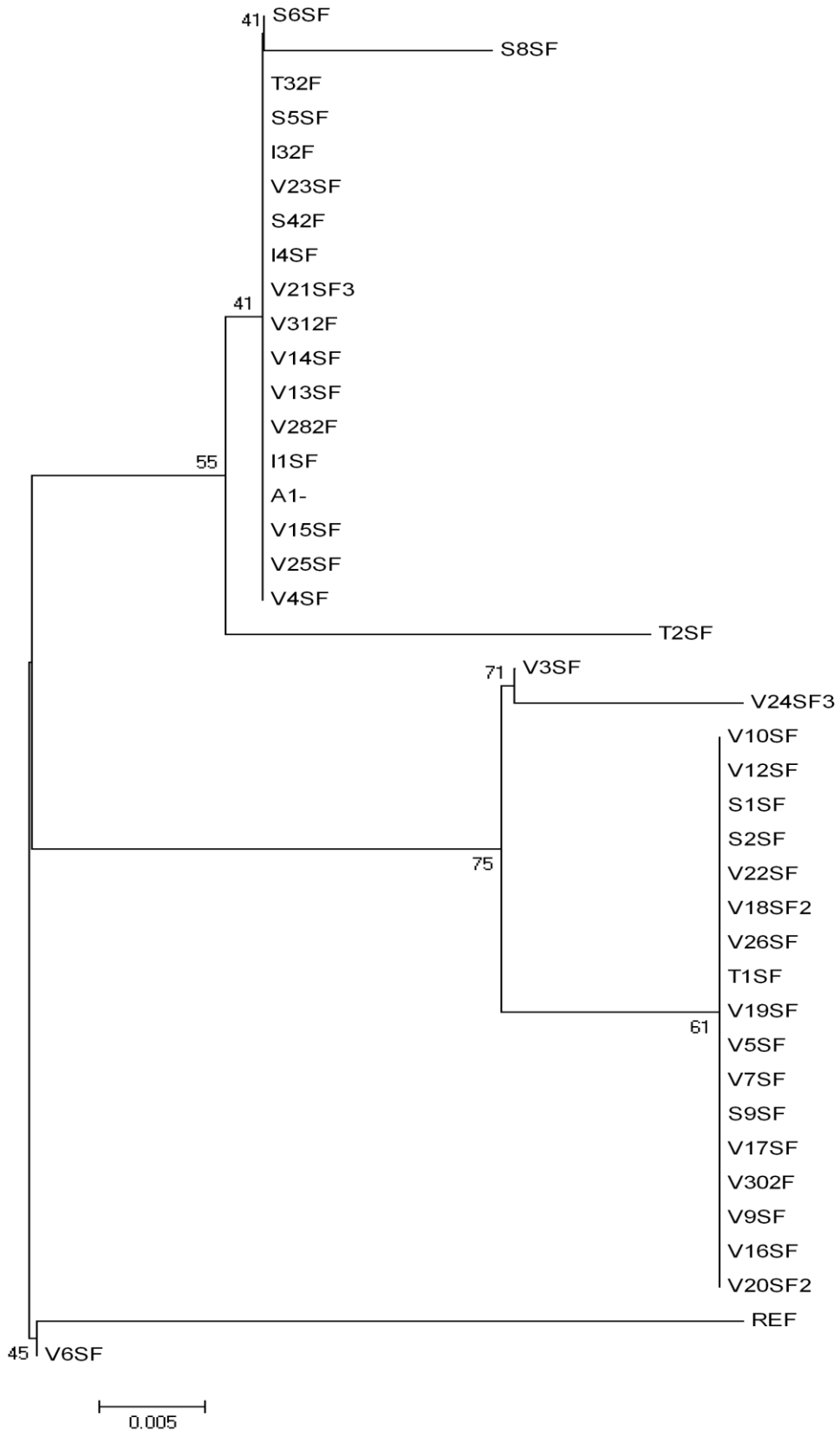
hayvan	REF	I1SF	I32F	I4SF	S1SF	S2SF	S42F	S5SF	S6SF	S8SF	S9SF	T1SF	T2SF	T32F	A1-	V3SF	V4SF	V5SF	V6SF	V7SF
REF		0,032	0,032	0,032	0,000	0,000	0,032	0,032	0,032	0,022	0,000	0,000	0,011	0,032	0,032	0,000	0,032	0,000	0,000	0,000
I1SF	0,220		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
I32F	0,242	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
I4SF	0,249	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S1SF	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S2SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S42F	0,219	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S5SF	0,219	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S6SF	0,238	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S8SF	0,336	1,000	1,000	1,000	0,308	0,316	1,000	1,000	1,000		0,022	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,022
S9SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,293		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
T1SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,329	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
T2SF	0,386	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
T32F	0,240	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
A1-	0,231	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V3SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000
V4SF	0,256	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000
V5SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,337	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000
V6SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000
V7SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,294	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
V9SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,315	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
V10SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,316	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
V12SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,324	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
V13SF	0,222	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
V14SF	0,216	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
V15SF	0,223	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
V16SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,311	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
V17SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,354	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
V18SF2	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,351	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
V19SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,327	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
V20SF2	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,377	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
V21SF3	0,228	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
V22SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,327	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
V23SF	0,247	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
V24SF3	1,000	1,000	1,000	1,000	0,175	0,179	1,000	1,000	1,000	1,000	0,153	0,160	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,162	1,000	0,192
V25SF	0,228	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
V26SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,335	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
V282F	0,253	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
V302F	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,332	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
V312F	0,218	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

P>0.05.

Tablo 3.2 Eşitsizlik endeks analizi ile elde edilen genetik mesafeler (alt diyagonal) ve standart hataları (üst diyagonal)

hayvan	V9SF	V10SF	V12SF	V13SF	V14SF	V15SF	V16SF	V17SF	V18SF2	V19SF	V20SF2	V21SF3	V22SF	V23SF	V24SF3	V25SF	V26SF	V282F	V302F	V312F
REF	0,000	0,000	0,000	0,032	0,032	0,032	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,032	0,000	0,032	0,000	0,032	0,000	0,032	0,000	0,032
I1SF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
I32F	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
I4SF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S1SF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S2SF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S42F	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S5SF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S6SF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S8SF	0,022	0,022	0,022	0,000	0,000	0,000	0,022	0,022	0,022	0,022	0,022	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,022	0,000
S9SF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
T1SF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
T2SF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
T32F	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
A1-	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V3SF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V4SF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V5SF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V6SF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V7SF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V9SF		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V10SF	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V12SF	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V13SF	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V14SF	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V15SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V16SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V17SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V18SF2	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V19SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V20SF2	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V21SF3	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V22SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V23SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V24SF3	0,164	0,142	0,153	1,000	1,000	1,000	0,197	0,153	0,182	0,163	0,159	1,000	0,158	1,000		0,000	0,022	0,000	0,022	0,000
V25SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000
V26SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,154	1,000		0,000	0,000	0,000
V282F	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000
V302F	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,148	1,000	1,000	1,000		0,000
V312F	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	

P>0.05



Şekil 3.1. Kedilerin filogenetik karşılaştırılmasını gösteren ağaç (Nei-Joining) (Kimura 2007).

Kedi ırkları arasındaki genetik ilişki ağacı (Nei-Joining) verilerine göre referansın üst kısmında olmak üzere Van kedilerinin ağırlıklı olarak 2 grupta toplandığı görülmektedir. Referansa göre en üst kısımda toplanan Van Kedileri 1. Grup ve bu grubun altındaki diğer Van Kedileri ise 2. Grup olarak değerlendirilip, her bir Van Kedisinin tek gözlülük/çift gözlülük durumlarına göre tablo yapıldığında aşağıdaki tablo elde edilmektedir (Tablo 3.3)

Tablo.3.3.Van kedilerinde tek gözlülük/ çift gözlülük tablosu.

	Tek göz (Mavi-Sarı, Sarı-Mavi)	**Çift göz (Mavi- Mavi, Sarı- Sarı)**	**Tek göz %**
1. Grup	3	6	33,33
2. Grup	12	3	80,00

Gruplardaki kedilerin tek gözlülük ve çift gözlülük durumlarına göre χ^2 testi yapıldı:

Tablo 3.4. Tek gözlülük, çift gözlülük durumları

	Tek göz	**Çift göz**	**Toplam**
1. Grup	3 ***5,63***	6 ***3,37***	9
2. Grup	12 ***9,37***	3 ***5,63***	15
Toplam	15	9	24

Chi-Sq = 1,225 + 2,042 + 0.735 + 1,225 = 5,227

DF = 1, P-Value = 0,022

Yapılan χ^2 testi sonucuna göre gruplar arasında istatistiki fark (P<0,022) tespit edildi.

3.3.2. Van Kedilerinin Kendi Arasında Karşılaştırılması:

Van kedileri kendi arasında gruplandırıldı, BİOEDİT (Hall 1999) paket programı ile yapılan hizalama ile kendi içlerindeki farklılıklar gösterildi. Bu farklılıkların hangi nükleotidlerde olduğunu belirlemek için Tablo 3.5 hazırlandı.

Tablo 3.5 Van Kedilerinin kendi aralarında karşılaştırılmasının dizilimi

```
#REF    TTTCCCACAA AAAAACCAAG TAAAAACCCC CAAACACCAC -AACCCAAAA CACACAATGT AAAATCA-CT CTATTAA-CC AC-CAACTC- ACCCC-AGG
#V3SF   .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .......-.. .......-.. ..A....C.- .....-..T
#V4SF   .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-......- .....-..T
#V5SF   .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V6SF   .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .......-.. .......-.. ..-......- .....-..T
#V7SF   .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V9SF   .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V10SF  .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V12SF  .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V13SF  .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-......- .....-..T
#V14SF  .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-......- .....-..T
#V15SF  .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-......- .....-..T
#V16SF  .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V17SF  .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V18SF2 .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V19SF  .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V20SF2 .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V21SF3 .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-......- .....-..T
#V22SF  .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V23SF  .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-......- .....-..T
#V24SF3 .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .......-.. ......C-.. ..-....C.- .....-..T
#V25SF  .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-......- .....-..T
#V26SF  .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V282F  .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-......- .....-..T
#V302F  .......... .......... ......A... ...GT..... -......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#V312F  .......... .......... .......... ...GT..... -......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-......- .....-..T
```

Van kedileri kendi aralarında ve referans dizi ile karşılaştırılması sonucu tek polimorfizm V24SF3 kedisinde (V24SF3, 16472. bç C nükleotidi olarak tespit edildi diğer kedilerde A nükleotidi olarak belirlendi). Tek farklı insersiyon V3SF kedisinde 16478. Bç noktasında A nükleotidi olarak tespit edildi.

DNA dizi analizleri ile toplam 25 Van kedisinde 8 polimorfik alan belirlendi. Bu bölgenin 4 tanesi singletondır (164429, 16430, 16472 ve 16494). 6 haplotip oluşturdu. Bu haplotiplerin farklılaşması 0.649 ± 0.067 olarak hesaplandı. Nükleotid farklılaşması Pi(π) 0,02488 ve nükleotid farklılaşmasının ortalaması (k) 2,314 olarak tespit edildi. Tajima's D değeri 0,32602, Fu ve Li D istatistiği -1,11002, Fu's Fs değeri 0,611 olarak hesaplandı. Van kedilerinde eşitsizlik endeks analizi ile elde edilen genetik mesafeler ve standart hataları Tablo 3.6 da sunulmuştur.

Tablo 3.6 Eşitsizlik endeks analizi ile elde edilen genetik mesafeler (alt diyagonal) ve standart hataları (üst diyagonal)

hayvan	ref	V3SF	V4SF	V5SF	V6SF	V7SF	V9SF	V10SF	V12SF	V13SF	V14SF	V15SF	V16SF	V17SF	V18SF2	V19SF	V20SF2	V21SF3	V22SF	V23SF	V24SF3	V25SF	V26SF	V282F	V302F	V312F
REF		0,000	0,032	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,032	0,032	0,032	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,032	0,000	0,032	0,000	0,032	0,000	0,032	0,000	0,032
V3SF	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V4SF	0,220	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V5SF	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V6SF	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V7SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V9SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V10SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V12SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V13SF	0,242	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V14SF	0,249	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V15SF	0,219	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V16SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V17SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V18SF2	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V19SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V20SF2	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V21SF3	0,219	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V22SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V23SF	0,238	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V24SF3	1,000	1,000	1,000	0,166	1,000	0,168	0,167	0,167	0,162	1,000	1,000	1,000	0,177	0,197	0,191	0,180	0,164	1,000	0,162	1,000		0,000	0,022	0,000	0,022	0,000
V25SF	0,236	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000
V26SF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,176	1,000		0,000	0,000	0,000
V282F	0,216	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000
V302F	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,162	1,000	1,000	1,000		0,000
V312F	0,213	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	

P>0.05.

3.3.3. Haplogrupların Kendi İçinde Karşılaştırılması

Karşılaştırmalı istatistik yapılabilmesi için 10 farklı *Felis catus* haplotipine ait 50 kediye ait (Tamada ve ark 2005) 99 bç'lik bölgenin DNA dizileri kullanıldı. Burada sunulan 50 kedinin, yapılan çalışmada kullanılan kedi materyalleri ile karşılaştırılabilmesi, aralarındaki farklılıkların ve benzerliklerin daha iyi tespit edebilmesi için istatistiki değerleri hesaplanmıştır. Hizalama sonucu elde edilen veriler Tablo 3.7 sunulmuştur.

Tablo 3.7. D-loop bölgesinin haplogruplarda 99bç'lik bölgesinin referans ile karşılaştırılması.

```
#REF  TTTCCCACAA AAAAACCAAG TAAAAACCCC CAAACACCAC -AACCCAAAA CACACAATGT AAAATCA-CT CTATTAA-CC AC-CAACTC- ACCCC-AGG
#X1A  .......... .......... .......... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#Y6A  .......... .......... .......... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#Y7A  .......... .......... .......... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#Y11A .......... .......... .......... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#Y15A .......... .......... .......... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#Y22A .......... .......... .......... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#X2B  .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#X5B  .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#Y10B .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#Y16B .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#Y25B .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#X4C  .......... .......... .......... ...GT..... -.......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#X6C  .......... .......... .......... ...GT..... -.......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#X8C  .......... .......... .......... ...GT..... -.......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#X9C  .......... .......... .......... ...GT..... -.......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#X10C .......... .......... .......... ...GT..... -.......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#X14C .......... .......... .......... ...GT..... -.......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#X16C .......... .......... .......... ...GT..... -.......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#X7D  .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#X11D .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#X12D .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#X13D .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#Y1D  .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#Y3D  .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#Y4D  .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#Y5D  .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#Y9D  .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#Y14D .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#Y17D .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#Y18D .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#Y19D .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#Y33D .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#X15E .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#Y12E .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#Y35E .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#Y2F  .......... .......... .......... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#Z1F  .......... .......... .......... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#Y8G  .......... .......... .......... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#Y21G .......... .......... .......... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#Y26G .......... .......... .......... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#Y28G .......... .......... .......... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#Y34G .......... .......... .......... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#Y13H .......... .......... .......... ...GT..... -.......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#Y20I .......... .......... .......... ...GT..... -.......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#Y23I .......... .......... .......... ...GT..... -.......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#Y24I .......... .......... .......... ...GT..... -.......... .......... .....T.-.. .......-.. ..-.......- .....-..T
#Y29J .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#Y30J .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#Y31J .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
#Y32J .......... .......... ......A... ...GT..... -.......... .......... .......-.. .......-.. ..-A...C.- .....-..T
```

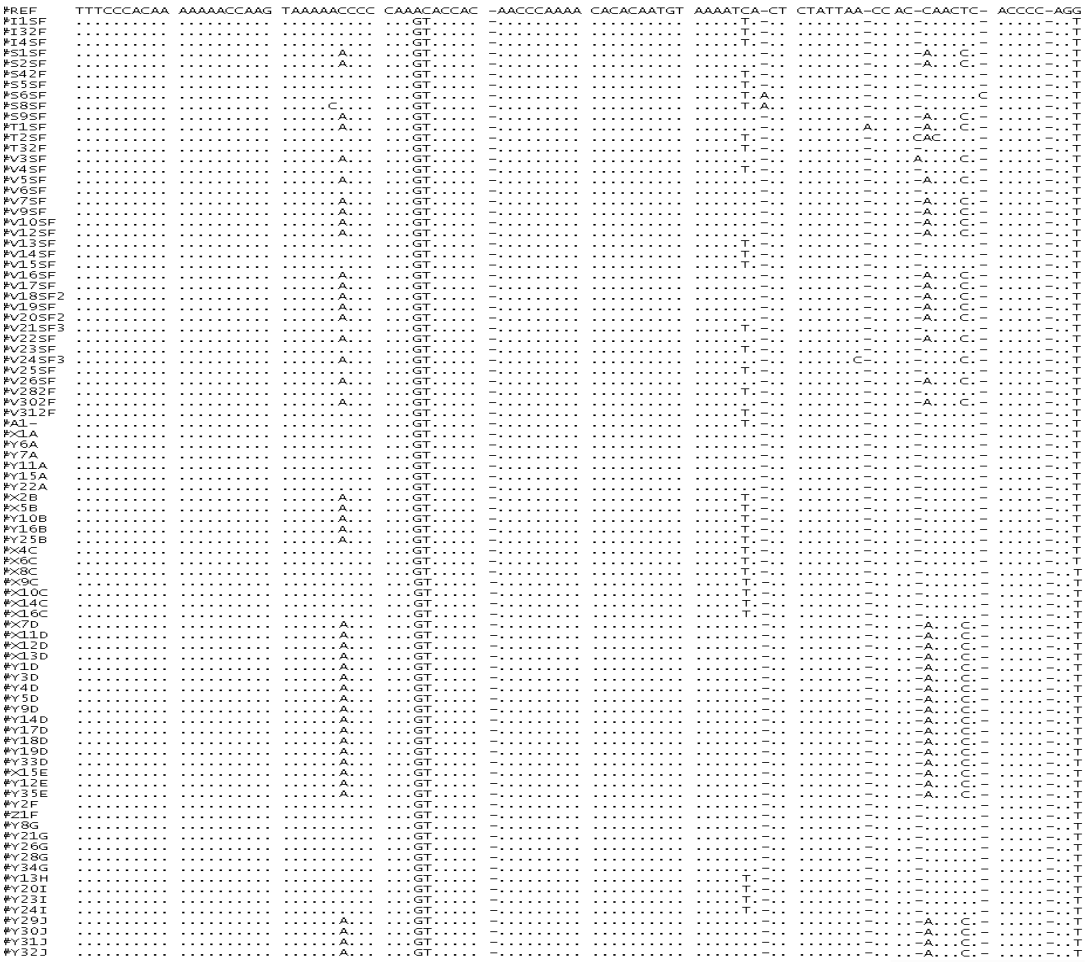
Toplam polimorfik bölge sayısı 7, tekli (Singleton: 16429, 16430, 16494) alan sayısı 3 olarak bulundu. Haplotip sayısı h:5, haplotip farklılaşması Hd:0,723 ± 0.034 olarak tespit edildi. Nükleotid farklılaşması (π) 0.02210, nükleotid farklılaşmasının ortalama sayısı (k) 2.055 olarak hesaplandı.

Fu ve Li'nin D test istatistiği -1.10452, Fu ve Li'nin F test istatistiği -0.56432 ve Fu'nun Fs istatisitiği 2.223 olarak bulundu. Tajima's D değeri: 0.854540 olarak hesaplanmıştır.

3.3.4. Haplogruplar ve Çalışılan Tüm Kedilerin Karşılaştırılması (50+39 Kedi)

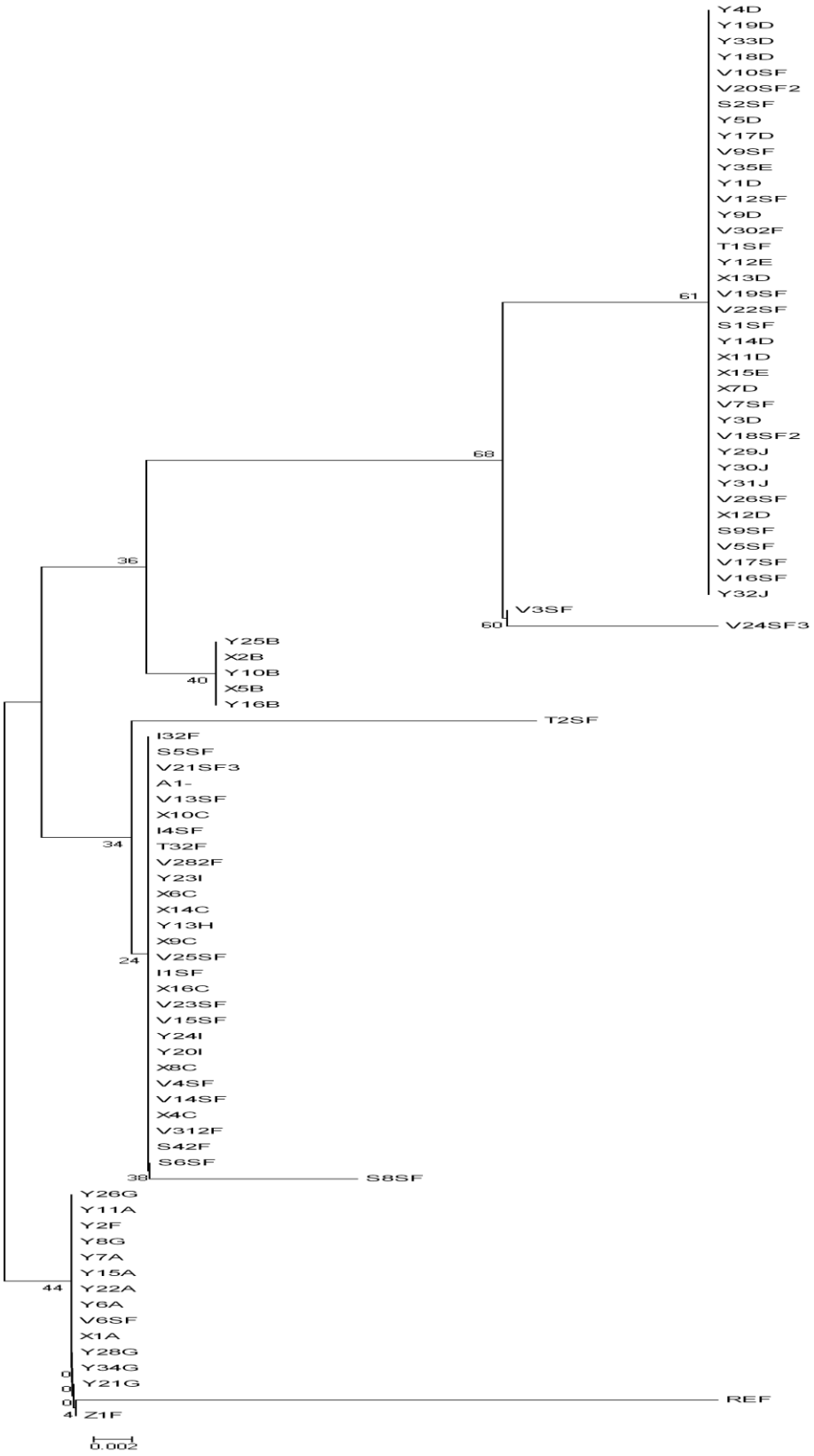
Haplogruplar ve çalışılan kedilerin karşılaştırılarak daha iyi yorumlanabilmesi için BIOEDIT programı ile hizalanan diziler Tablo 3.8' de sunulmuştur.

Tablo 3.8 D-loop bölgesinin tüm kedi ırklarında 99bç'lik bölgesinin referans ile karşılaştırılması.

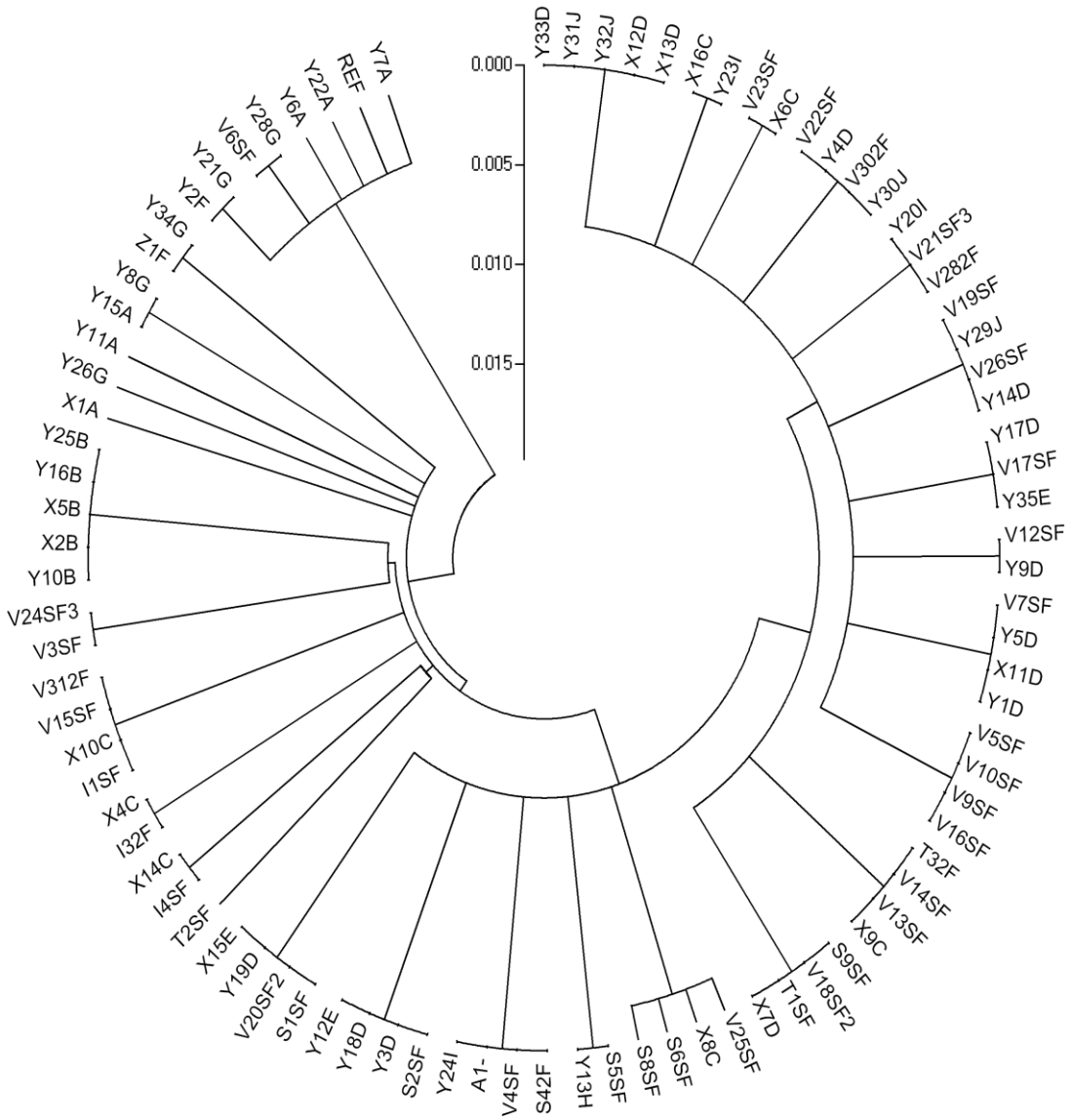


Toplam polimorfik bölge sayısı 10, tekli (Singleton: 16421, 16429, 164430 , 16472, 16479 ve 16494) alan sayısı 6 olarak bulundu. Haplotip sayısı (h) 9, haplotip farklılaşması (Hd) 0.705 ± 0.029 olarak tespit edildi. Nükleotid farklılaşması (π) 0.02275, nükleotid farklılaşmasının ortalama sayısı (k) 2,116 olarak bulundu. Fu ve Li'nin D test istatistiği -2,76761, ve Fu'nun Fs istatisitği -0,068 olarak bulundu. Tajima's D değeri: -0,18930 olarak hesaplandı.

Çalışılan tüm hayvanların ve haplogrupların bulunduğu Nei-Joining ağacı incelendiğinde S6SF, S8SF, T2SF, V3SF, V24SF bireylerinin ayrı birer dal oluşturduğu, diğer kedilerin ise Tsushima adasındaki kedilerle benzer haplogruplara sahip oldukları gözlendi (Şekil 3.2 ve 3.3).



Şekil 3.2 Kedi bireylerin ve haplogrupların karşılaştırılmasını gösteren ağaç (Nei-Joining) (Kimura 2007)



Şekil 3.3 Çalışılan tüm kedilerin ve haplogrupların karşılaştırılmasını gösteren dairesel ağaç (Nei-Joining)(Kimura 2007).

4.TARTIŞMA

mtDNA 16396-16494 aralığındaki 99 bç nükleotid dizisi kullanılarak çalışılan kedi ırklarından elde edilen sonuçlar, Lopez ve ark (1996) tarafından sunulan U20753 giriş numaralı referans dizisinin ilgili bölgesinde belirtilen değerler ile karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma sonucunda, 16463. dizide S6SF ve S8SF kedilerinde A, 16473. dizide T1SF kedisinde A, 16478. dizide T2SF kedisinde C ve V3SF kedisinde A, 16484. dizide S6SF kedisinde C insersiyonlarının, 16472. nükleotid V24SF kedisinde C, 16421. dizide S8SF kedisinde C, 16479. dizide T2SF C polimorfizmin varlığı tespit edildi. Bu bulguların Lopez ve ark (1996) bulgularından farklı, bununla birlikte Tamada ve ark (2005) tarafından belirlenen 50 kedi verileri açısından 7 nükleotidde farklı, 7 nükleotidde benzer olduğu belirlendi. Lopez ve ark (1996)nın verilerinin tek bir kediden, bu çalışma verileri ile Tamada ve ark (2005)'nın verilerinin birden fazla sayıda kediden elde edildiği göz önüne alındığında, belirlenen farklılıklar olasıdır. Ancak, çalışılan 99 bç aralığı açısından değerlendirildiğinde, bu çalışmadaki kedilerde Tamada ve ark (2005)'nın verilerinde bulunmayan insersiyonların tespit edilmesi önemli bir bulgu olarak değerlendirilebilir.

Polimorfik bölge sayıları, haplotip sayıları ve frekansları DnaSP (Librado ve Rozas 2007) paket programı ile analiz edildi. Van kedisi dizileri incelendiğinde toplam 8 polimorfik bölge belirlendi. Diğer oluşturulan gruplara bakıldığında kullanılan diğer kedi ırklarında (siyam, iran, ankara ve tekir) 9 polimorfik bölge, haplogruplarda 7 polimorfik bölge belirlendi. Gözlenen polimorfik bölgelerde Van Kedilerinde 4 tanesi singletondu. Bu singletonlar Van Kedilerinde 16429, 16430, 16472 ve 16494 nükleotidlerde bulunurken, bu değerler diğer kedi ırklarında 16421, 16429, 16430, 16472, 16479 nükleotidlerde, haplogrup oluşturan Tsushima adası *Felis catus* cinslerinde ise 16429, 16430, 16494 nükleotidlerde bulundu. 16429, 16430, 16494 nükleotidlerinde görülen farklılığın, şimdiye kadar çalışılan kedilerde ve bu çalışmadaki kedilerde ortak değer görülmesi, genel olarak kedilerin ortak atasal verisi olabilir mi sorusunu akla getirmektedir. Bunun ortaya konulabilmesi için daha fazla örnek ile çalışılması gerekmektedir.

Çalışılan 25 Van kedisi örneğinde belirlenen bu 8 polimorfik bölge 6 (h) haplotipi oluşturdu. Haplotip farklılaşması 0.649 ± 0.067 olarak belirlendi. Bu

değerlere diğer gruplarda bakıldığı zaman Türkiye'de bulunan 3 İran, 7 Siyam, 3 Tekir ve 1 Ankara'dan oluşan grupta 9 polimorfik alanda 5 haplotip oluşturdu, haplotip farklılaşmaları 0,676±0.105 bulundu. Tsushima adası kedilerinde 7 polimorfik alanda 5 haplotip oluştu, haplotip farklılaşması 0.723±0.034 bulundu. Van kedilerinde belirlenen yükek polimorfizm, Altunok ve ark (2010) nın yaptıkları enzim elektroforezi çalışması sonucunda Van kedilerinde belirledikleri yüksek polimorfizm sonuçlarına benzerlik göstermektedir.

Ortalama nükleotid farklılaşması değerleri ise Van Kedilerinde 2,314 ve diğer kedi ırklarında 2,457, Tsushima kedilerinde ise 2,055 olarak hesaplandı. Değerlerin bu çalışmada çalışılan Van kedileri ile diğer kedi ırklarında birbirine yakın, Tsushima kedilerinden ise biraz daha uzak olduğu gözlendi.

Tajima's D değeri Van kedilerinde 0,32602 (P> 0.10) olarak belirlendi. Bu değerler diğer kedi ırklarında -0,42099, Tsushima evcil kedilerinde 0.854540 olarak bulundu. Tajima's D değerinin negatif olması populasyonun geçmişinde seçici süpürme (selective sweep) yada populasyon genişlemesi (population expansion) geçirmiş olabileceğini varsaymaktadır (Jobling ve ark 2004). Diğer kediler için yapılan analizlerde Tajima's D değeri negatif çıksa da bu değer (P>0.10) istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Fu ve Li D istatistiki değeri Van kedilerinde -1,11002, diğer kedi ırklarında -0.95488, Tsushima evcil kedilerinde ise -1,10452 olarak hesaplandı. Bu değerin negatif olması yine populasyonun geçmişte bir populasyon genişlemesi (population expansion) yada arkaplan seçilimine (background selection) maruz kalmış olabileceğini göstermektedir (Jobling ve ark 2004). Yapılan analizlerde Fu ve Li D istatistiği için P>0.05 olarak belirlendi.

Yapılan analizlerde pozitif (0,611) Fu's Fs değeri tespit edildi. Diğer kedi ırklarında 0.733, Tsushima evcil kedilerinde 2.223 olarak bulundu. Bu değerin kedilerde negatif olması populasyonun geçmişte bir populasyon genişlemesi (population expansion) yada genetik otostop (genetic hitchhiking) geçirmiş olabileceğini göstermektedir (Jobling ve ark 2004). Fakat elimizdeki verilere göre değerlerin önemli olmaması ve büyük çoğunluğunun populasyon genişlemesini işaret etmemesi bu kedilerin geçmişte bir populasyon genişlemesi geçirmediğini

gösteriyor. Değerlerin önemli olmaması datanın küçük olmasından da kaynaklanıyor olabilir.

Evcil kedilerler ile Tsushima leopar kedilerini aralarında yakınlık ve crossbreed olup olmadığının tespiti amacıyla, Tamada ve ark (2005) Tsushima adasında 3 köyden aldıkları 50 evcil kedi örneği ile adada bulunan Tsushima leopar kedilerini stokrom b ve Kontrol bölgesi dizilerini karşılaştıştırmışlar ve bir yakınlık bulamamışlardır. Sunulan çalışmada, Tamada ve ark (2005)'nın Gen Bankasında bulunan 10 haplotipini temsil eden toplam 50 birey kediye ait 99bç'lik bölüm kullanıldı. Bu kedilerin (Tamada ve ark 2005) ırkları belirtilmediği için bilinmemektedir. Genel bir değerlendirme yapılacak olursa, bu çalışma ile elde edilen benzerlikler göz önüne alınacak olursa, hem Tamada ve ark (2005) tarafından belirlenen Tsushima adasındaki kedilerin Tsushima leopar kedileri ile crossbreed olmadığı soncunu doğrulamakta hem de bu çalışmada materyal olarak kullanılan Van kedilerinin de büyük kedilerle crossbreed olmadığı yönünde ipuçları vermektedir.

Lopez ve arkadaşları (1996)'nın yaptıkları çalışmada tüm *Felis catus* mtDNA'nın dizi analizini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışma ile A-C zengin, 80-82 bç uzunlukta ve üçe kadar tekrar sayısı değişebilen RS2 adını verdikleri tekrar bölgesini belirlemişlerdir. Daha sonra yapılan bir çalışmada da (Mills ve ark 2000) Kuzey Amerika kedileri ve vaşakta aynı tekrar bölgesinin varlığını, bu tekrar bölgesinin ve uzunluklarının bireyden bireye değiştiğini ve bunun Lopez ve ark (1996) tarafından belirtilen RS2 (80-82 bç'lik alan) tekrar bölgesi olduğunu tespit etmişlerdir. Sunulan bu çalışmada da tekrar bölgesi ve bireyden bireye farklı uzunlukta PCR ürünlerinin tespit edilmesi, uygulanan metodun doğruluğunu destekler niteliktedir.

Türkiye'deki bazı kedi ırklarının (Van, Siyam, Ankara, İran ve Tekir) mikrosatellit lokusları ile yapılan çalışmada (Eroğlu 2007), ırklar arası spesifik kimlik belirleme aracı olan özgün alleller belirlenmiştir. Çalışmaya göre Van kedilerinde daha fazla özel alelin varlığı tespit edilmiştir. Sunulan bu çalışmada da Van kedilerinde diğer kedilerden farklı polimorfizm ve insersiyonlar bulunmuştur. Her iki çalışmada da Van kedilerinde farklılığın fazla olması bu ırkın diğer ırklardan ayırd edilebilir özellikleri olduğunu göstermektedir. Fakat daha fazla örnek ile bu bulguların desteklenmesi gerekmektedir.

Kedi ırkları arasındaki genetik ilişkiye göre çizilen ağaç (Nei-Joining) verilerine göre Van kedilerinin ağırlıklı olarak 2 grupta toplandığı görülmektedir. Gruplardaki Van Kedilerinin her biri kendi grubu içerisinde tek gözlülük/çift gözlülük durumlarına değerlendirilip, yapılan χ^2testi sonucuna göre gruplar arasında istatistiki fark ($P<0,022$) tespit edilmiştir. Elde edilen bu dizi analiz verilerine bakılarak Van kedilerinde % 80,00 oranıyla tek gözlülük söylenebilir. Çalışmada mtDNA dizi analizinden seçilen 99 bç lik dar bir bölgenin değerlendirilmesine ve az sayıda örneğe rağmen, elde edilen istatistiksel anlamlı fark, bundan sonra bu alanda yapılacak çalışmalara için önemli bir kaynak teşkil edeceği düşünülebilir. Ayrıca Altunok ve ark (2007)'nın yaptıkları bir çalışmada Van kedilerinin bazı kan serum elementlerininin (Ag, Al, As, B, Ba, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, Li, Mn, Ni, Pb, S, Se, Sr, V ve Zn) ölçümleri yapılmıştır. Bu analizlerden aldıkları sonuçları Van Kedilerinde görülen farklı göz rengi grupları ile karşılaştırdıklarında, Alüminyum, Bakır, Strontium, Çinko ve Mangan değerleri açısından mavi-mavi göz renkli kedilerin diğer göz renkli (mavi-sarı, sarı-mavi, sarı-sarı) kedilerden istatistiksel olarak farklı olduklarını ve Lityum değeri açısından da mavi-mavi göz renkli kedilerin mavi-sarı göz renkli kedilerden istatistiksel olarak farklı olduklarını tespit etmişlerdir. Bu çalışma, Van kedilerinde göz rengi farklılıkları ile biyokimyasal parametreler arasındaki önemli istatistiksel farklılığın ortaya konulduğu ilk çalışma özelliğindedir. Dolayısı ile Van kedilerinde değişik göz rengine sahip gruplarda farklılık olduğu konusunda her iki çalışmanın birbirini destekler nitelikte olduğunu göstermektedir. Fakat daha fazla örnek ile ve daha fazla çalışma ile bu bilgiler genişletilmelidir.

Ayrıca, çalışılan Van kedilerinin mtDNA dizisi analizi verileri değerlendirildiğinde, sadece bir Van kedisinde (V3SF) A insersiyonu ilk kez ortaya konulmuştur. Bu kedinin göz rengine bakıldığında, Yeşil-Mavi gözlü olduğu belirlenmiştir. Van kedilerinde çift gözlülük sarı-sarı veya mavi-mavi, tek gözlülük ise sarı-mavi veya mavi-sarı şeklinde görülmektedir. A insersiyonu görülen Van kedisi, analizi yapılan kediler içerisinde tek Yeşil-Mavi gözlü kedidir. Van kedilerinde çok nadir olarak rastlanan Yeşil-Mavi göz rengine sahip Van kedisinde belirlenen A insersiyonu oldukça dikkat çekici bir veridir. Bu verinin kayda değer olup olmadığı daha fazla sayıda bu göz renkli Van kedilerinde çalışılarak ortaya konulması ile mümkün olabilir. Bu anlamda gerek yukarıda belirtilen farklılıkların ve

gerekse dikkat çekici bu verinin ortaya konulması için daha geniş mtDNA alanında ve daha fazla örnek ile çalışılmasının yararlı olacağı bir gerçektir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak; Van kedileri ile diğer bazı kedi ırklarındaki (Siyam, İran, Ankara, Tekir) mtDNA D-Loop bölgesinin dizi analizi yapılmıştır. Yapılan çalışma ile kedi ırkları karşılaştırılmış ve Van kedilerinde yüksek polimorfizm tespit edilmiştir. Yine bir Van kedisinde A insersiyonu ilk kez ortaya konulmuştur. Ayrıca elde edilen mtDNA D-Loop bölgesinin dizi analiz verileri ile Van kedilerinin göz renkleri arasında anlamlı bir ilişkinin varlığı belirlenmiştir.

Türkiye'ye ait olan bu genetik zenginliğin korunması ve göz renkleri ile genetik yapısı arasındaki ilişkilerin detaylı bir şekilde ortaya konulması için, daha fazla sayıda kedi materyali kullanılarak ve mtDNA'da daha geniş bir alanda çalışmaların yapılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

6.ÖZET

T.C
SELÇUK ÜNİVERİSTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Türkiye'de Bulunan Bazı Kedi Irklarının D-Loop Polimorfizminin Araştırılması

Elif YILMAZ ŞAHİN

Biyokimya (VET) Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ/ KONYA-2010

Bu çalışmada bazı kedi ırklarının mtDNA D-Loop bölgesinde bulunan polimorfizmlerin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla 25 Van kedisi, 3 Tekir kedisi, 3 İran kedisi, 1 Ankara kedisi ve 7 Siyam kedisi kullanılmıştır.

Bu amaçla, Türkiye'de bulunan bazı kedi ırklarının D-Loop bölgesinin 99 bç'lik alanının dizi analizi yapılmıştır. Yapılan analiz sonucu haplotip sayısı tüm kedilerde 10, Türkiye'de yaşayan diğer kediler (Siyam, İran, Ankara ve Tekir) arasında 9, Van kedileri arasında 8 olarak bulunmuştur. Haplotip farklılaşmaları Tsushima adası kedilerinde 0,723±0,034, diğer kedilerde 0.675±0.105, Van kedilerinde ise 0.649±0.067 olarak hesaplanmıştır. Nükleotit farklılaşması Tsushima adası kedilerinde 0,02210, diğer kedilerde 0,02642, Van kedislerinde 0,02564 olarak gözlenmiştir. Nükleotit farklılaşmasının ortalamaları incelendiğinde Tsushima adası kedilerinde 2,055, diğer kedilerde 2,457, Van kedilerinde 2.314 olarak bulunmuştur. Belirtilen değerler incelendiğinde değerlerin birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. Türkiye'de yaşayan ırkların birbirine daha yakın olduğu belirlenmiştir.

Çalışmadaki polimorfizm görülen bölgeler değerlendirildiğinde, 16429. nükleotidi görülen A nükleotidi çalışmada G, 16430. nükleotidi görülen C nükleotidi T, 16489. nükleotidi görülen G nükleotidi T olarak gözlenmiştir. Bu veriler Tsushima adasındaki kedilerinin çalışması ile karşılaştırdığında onların haplogruplarında da çalışmada gözlenenlere benzer olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan tüm istatistikler değerlendirildiğinde Van kedilerinde yüksek polimorfizm gözlenmiş, tek gözlülük/ çift gözlülük durumlarına göre yapılan χ^2testi sonucunda yüksek istatistiki farklılık ($P<0,022$) tespit edilmiştir. Yeşil-Mavi gözlü bir kedide A insersiyonu ilk kez belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler:mtDNA, *Felis catus*, D-Loop, polimorfizm

7. SUMMARY

Investigation of Genetic Structure of Various Cat Breds By Using D-Loop Polimorphism in Turkey

Objective of this study was to investigate mtDNA D-Loop polymorphism of some cat breeds. Animal material included 25 Van cats, 3 Mullet cats, 3 Persian cats, 8 Siamese cats and a Ankara cat.

Fort his purpose, a 99 bp part of the mtDNA D-loop region was sequenced for some cat breeds in Turkey. Total haplotype number was obtained as 10 in all studied cats. Haplotype numbers were 9 for Siamese, Persian, Angora and Mullet cats and 8 for Van cats

Haplotype variations were observed as 0,723±0,034 in the Tsushima Island cats, 0.649±0.067 in the Van cats and 0.675±0.105 in the other cat breeds.. Nucleotide differentation values were determined as 0,02210, 0,02588 and 0,02642 for Tsushima Island cats, Van cats and the other studied cats, respectively. Average number of nucleotide differentations were calculated for Tsushima Island cats, Van cats and the other studied cats, 2,055, 2.314 and 2,457, respectively. These values were found to be generally close to each other. However, these values were more closer between the local cat breeds of Turkey.

Polymorphism in the regions of the study were evaluated and A at the 16429 bp were G, C at the 16430 bp was T and G at the 16489 was nucleotide T. These findings were similar to the hablogrops of Tsushima Island cats.

When resuls of statistical analyses were evaluated higher polymorphism was observed in Van cats. In order to test one or two eye color, X^2 test was accomplished to and higher statistical difference (P<0,022) was observed. This is the first time an A insertion was observed in a cat with green-blue eye color.

Key words: mtDNA, *Felis catus*, D-Loop, polymorphism

KAYNAKLAR

1. Akay M. Kedi Bakımı. Özgür Yayın Dağıtım Ltd. Şti. 1994 İstanbul.

2. Altunok, V, Yazar E, Yüksek N. Selected blood serum element in Van (Turkey) cats. Acta vet. Brno 2007**;**76:171-177.

3. Altunok V, Yüksek N, Berkman CC, Agaoglu ZT, Togan I. Genetic Structure and Variation of Van Cats. Biochemical Genetics, 2010 (Basımda).

4. Anderson S, Bankier AT, Barrel BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IJ, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature, 1981; Vol.290: 457-465.

5. Antunes A, Pontunes M, Ramos M J, Q'Brien S J And Warren E. Mitochondrial Introgressions in to the Nuclear Genome of the Domestic Cat. Journal of Heredity, 2000; 98: 5: 414-420.

6. Ayhan AG, Özkan A , Fışkın K. Mitokondrial DNA ve kanser. Türk Hematoloji ve Onkoloji Dergisi, 2004; Vol.14: No. 4: 232-240.

7. American association for the advancement of science. oldest known evidence of cat taming found in cyprus. Science Daily. April 2004. Erişim http://www.sciencedaily.com/eleases/2004/04/040409092827.htm. 17.09.2010.

8. Branicki W, Olszankan A, Konopinski MK. Sequence variation in the control region of mitochondrial DNA within a population sample of domestic cats *Felis catus* linnaeus-implications for domestic and wild cats differentiation. Problems of Forensic Science, 2006; LXVII, 279-288.

9. Demirsoy A. Türkiye omurgalıları. Meteksan Yayın Evi. 2003, Ankara.

10. Driscol CA, Menotti-Raymond M, Roca AL, Hupe K, Johnson WE, Geffen E, Delibes M, Pontier D, Kitchener AC, Yamaguchi N, O'Brien SJ, Macdonald DW. The near eastern origin of cat domestication. Science, 2007; Vol. 317: 519 – 523.

11. Eizirik E, Bonatto SJ, Jhonson W E,Crawshaw Jr. PG, Vie JC, Brousset MD, O'Brien SJ, Salzano MF. Phylogeographic patterns and evolution of the mitochondrial dna control region in two neotropical cats (mammalia, felidae). J. Mol. Evol., 1998; 47: 613- 624.

12. Eroğlu T. Türkiyedeki bazı kedi ırklarının genetik yapılarının mikrosatellitlerle incelenmesi. Selçuk Üniversitesi.Yüksek Lisans Tezi. 2007. KONYA.

13. Ertuğrul M, Dellal G, Soysal İ, Elmacı C, Akın O, Arat S, Barıtçı İ, Pehlivan E, Yılmaz O. Türkiye yerli koyun ırklarının korunması. U. Ü. Ziraat Fakültesi dergisi, 2009; Cilt 23; Sayı 2: 97-119.

14. Evcilkedi.com. Siyam kedisi . Erişim: http://www.evcilkedi.com/?İ=96 . Erişim tarihi: 02.09.2010.

15. Evcilkediler.com İran kedisi. Erişim: http://www.evcilkediler.com/kedi-resimleri/iran-kedisi-persian. Erişim tarihi:02.09.2010.

16. Evcilkediler.com. Ankara kedisi. Erişim: http://www.evcilkediler.com/kedi-irklari/ankara-kedisi-angora. Erişim tarihi: 02.09.2010 b.

17. Evcilkediler.com. Tekir kedi. Erişim: http://www.evcilkediler.com/kedi-irklari/tekir-kedi. Erişim tarihi: 02.09.2010 c.

18. Fernandez-Silva P, Enriquez JA, Montoya J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. Exp Physiol., 2003; 88: 1: 41-5.

19. Freewebs.com. Ankara kedisi. Erişim http://www.freewebs.com/moonstarsgraphics/turkish angora.jpg. Erişim tarihi: 02.09.2010 a.

20. Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser.,1999; 41: 95-98.

21. İnternetveteriner.com. Van kedisi. Erişim http://www.internetveteriner.com/wp-content/uploads/ 2009/06/Van-kedisi-ve-yavrusu.jpg. Erişim tarihi: 02.09.2010.

22. Jae-Heup K, Eizirik E, O'Brien SJ, Johnson WE. Structure and patterns of sequence variation in the mitochondrial DNA control region of the great cats. Mitochondrion, 2001; 14: 279-292.

23. Janczewski DN, Modi WS, Stephens JC, O'Brien SJ. Molecular evolution of mitochondrial 12S RNA and cytochrome b sequences in the Pantherine lineage of Felidae. Mol Biol Evol, 1995; 12: 690-707.

24. Jia S, Chen H, Zhang G, Wang Z, Lei C, Yao R, Han X. Genetic variation of mitochondrial D-Loop region and evolution analysis in some chinese cattle breeds. J Genet Genomics, 2007; 34: 6: 510-518.

25. Jobling MA, Tyler-Smith C, Hurles M. Human evolutionary genetics: origins, peoples and disease. Garland Sci, 2004.

26. Johnson WE, Eizirik E, Pecon-Slattery J, Murphy WJ, Antunes A, Teeling E, O'Brien S J. The late miocen radiaion of modern felidae: a genetic assessment. Science, 2006; 311: 73-77.

27. Kim JH, Antunes A, Luo SJ, Menninger J, Nash WG, O'Brien SJ, Johnson WE. Evolutionaly analysis of a large mtDNA translocation (numt) into the nuclear genome of the *Panthera* genus species. Gene, 2006; Feb 1: 366(2):292-302.

28. Kitten-stork.com. Siyam kedisi Erişim:http://www.kitten-stork.com/images/traditional-siamese-cat.jpg. Erişim tarihi: 02.09.2010.

29. Khan SM, Smigrodzki RM, Swerdlow RH. Cell and animal model of mtDNA biology: progress and prospects. Am J Physiol Cell Physiol., 2007; 292: 658-669.

30. Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablance FX, Wilson AC. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplication and sequencing with conserved primers. Proc. Of the Nat. Acad. Of Sci., 1989; 86: 6196-6200, USA.

31. Librado P and Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 2007; 25: 1451-1452.

32. Lopez JV, Yuhki N, Masuda, R Modi, W, O'Brien SJ. Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. J. Mol. Evol.,1994; 39: 174-190.

33. Lopez J. V, Cevario S, O'Brien SJ. Complete nucleotid sequences of the domestic cat (*Felis catus*) mitochondrial genome and a transposed mtDNA tandem repeat (Numt) in the nuclear genome. Genomics, 1996; 33: 229-246.

34. Lopez JV, Culver M, Stephens JC, Johnson WE, O'Brien, SJ. Rates of nuclear and cytoplasmic mitochondrial DNA sequences divergence in mammals. Mol.Biol.Evol., 1997; 14: 277-286.

35. Masuda R Y MC, Shinyashiki F, Bando G. Molecular Phylogenetic Status of the Iriomote Cat Felis Iriomotensis, Inferred from Mitochondrial DNA sequence Analysis. Zoology Science , 1994; 11: 4: 597- 604.

36. Mercan L, Okumuş A. Hayvancılıkta genetik çeşitlilik ve DAD-IS. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü, Biyometri- Genetik ABD. Samsun. Erişim: http://4uzbk.sdu.edu.tr/4UZBK/BGB/4UZBK_091.pdf 20.10.2010.

37. Mills LS, Pilgrim KL, Schwatz MK, McKelvey K. İdentifiying lynx and other north ameriacan felids based on mtDNA analysis. Conservation genetics, 2000; 1: 285-288.

38. Nauta MJ, Weissing FJ. Constraints of allele size at microsatellite loci: implications for genetic differentiation. Genetic, 1996; 143: 1021-1032.

39. O'Brien SJ, Menotti-Raymond M, Murphy WJ, Yuhki N. The feline genome project. Annu. Rev. Genet., 2002; 36: 657-686.

40. O'Brien SJ, and Johnson WE. Big cat genomic. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet., 2005; 6: 407-429.

41. O'Brien SJ. Johnson W, Driscoll C, Pontius J, Pecon-Slattery J, Menotti-Raymond M, State of cat genomics. Trends Genet, 2008; Vol.24: 6: 268-279.

42. Pollard M. The encyclopedia of cats. the cat fanciers, ACFA web siteleri. Çeviri: Bekoğlu AC. Erişim http://www.kedigen.com/konu/25/332 .Erişim tarihi 02.09.2010.

43. Pontius JU, Mullikin JC, Smith DR, Agencourt Sequencing Team, Lindblad-Toh K, Gnerre S, Clamp M, Chang J, Stephens R, Neelam B, Volfovsky N, Schaffer AA, Agarwala R, Narfström K, Murphy WJ, Giger U, Roca AL, Antunes A, Menotti-Raymond M, Yuhki N, Pecon-Slattery J, Johnson WE, Bourque G, Tesler G, NISC Comparative Sequencing Program, O'Brien SJ. Initial sequence and comparative analysis of the cat genome. Genome Res, 2007; 17: 1675-1689.

44. Randi E, Pierpaoli M, Beaumont M, Ragni B, Sforzi A. Genetic ıdentification of wild and domestic cats (*Felis silvestris*) and their hybrids using bayesian clustering methods. Mol Biol and Evol, 2001; 18: 9: 1679- 1693.

45. Richly E, Leister D. NUMTs in sequenced eukaryotic genomes. Mol. Biol. Evol, 2004; 21 (6): 1081-1084.

46. Serpell JA. The domestic cat: the biology of its behavier. Cambridge University Press, 2000. Sezgin İ. Erişim:http://tipedu.cumhuriyet.edu.tr/Donem1/DonemI20052006/2006IV/ilhanSezgin/index.htm. 02.09.2010.

47. Somer S. Yurdumuzun gözdeleri. Erişim: http://www.pet.gen.tr/2002/ayin_ gozdesi. phtml ?id=11. Erişim tarihi:02.09.2010.

48. Tamada T, Kurose N, Masuda R. Genetic divercity in domestic cat *Felis* catus of the Tsushima Island, based on mitochondrial DNA cytochrome b and control region nucleotide sequences. Zoological sci., 2005; 22: 627-633.

49. Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. *MEGA4*: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol and Evol 2007; 24: 1596-1599.

50. Tatar A, Öztaş S, Batat İ. Türk toplumunda sağlıklı bireylerde mitokondrial DNA polimorfizminin PCR-RFLP yöntemi ile değerlendirilmesi. MJAU, 2006; 38: 39-43.

51. Veterinerara.com. Kedinin genel anatomisi. Erişim: http://www.veterinerara.com/wp-content/uploads/2009/08/general-anatomy-of-a-cat-640x423.png. Erişim tarihi: 02.09.2010.

52. Wallace DC. The mitochondrial genome in human adaptive radiation and disease: on the road to therapeutics and performance enhancement. Gene, 2005; 354: 169-180.

53. Wei L, Wu X, Jiang Z. The complete mitochondrial genome structure of snow leopard Panthera uncia. Mol. Biol. Rep, 2008; DOI 10.1007/s11033-008-9257-9.

54. Wilkinson GS, Chapman AM. Length and sequence variation in evening bat D-Loop mtDNA. Genetics ,1991; 128: 607-617.

55. Wu X, Zheng T, Jiang Z, Wei L. The mitochondrial genome structure of the clouded leopard (Neofelis nebulosa). Genome, 2007; 50: 252-257.

56. Zhu ZY, Yue GH. The complete mitochondrial genome of red grouper *Plectropomus leopardus* and its applications in identification of grouper species. Aquaculture, 2008; 276: 44-49.

9. ÖZGEÇMİŞ

26.01.1983 yılında Düzce İlinde doğdu. İlköğrenimini Düzce Merkez Yenimahalle İlkokulu'nda, orta öğrenimini Düzce Merkez Anadolu İmam Hatip Lisesi'nde, lise öğrenimini ise Düzce Merkez Anadolu Öğretmen Lisesi'nde tamamladı. 2002 yılında girdiği Selçuk Üniversitesi Biyoloji Öğretmenliği bölümünden 2007 yılında mezun oldu. Eylül 2007 tarihinde Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Vet.) Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.