

## Veteriner Hekimlikte Kalıtsal Bozuklukların Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Bilal AKYÜZ<sup>1</sup>, Okan ERTU RUL<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRK YE

<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Ankara-TÜRK YE

**Özet:** Çiftlik hayvanları yeti tiricili inde, yüksek verimli erkek damızlıklardan suni tohumlama yöntemi sayesinde çok sayıda yavru elde edilmektedir. Bu nedenle damızlık hayvanların kalıtsal bozukluk ta imamaları gereklidir. Kalıtsal bozukluklar ço unlukla çekinik otozomal kalıtım ekli gösterirler ve fenotipik olarak bir bozukluk göstermeyen heterozigot bireyler sayesinde popülasyonda varlıklarını sürdürürler. Bu nedenle çiftlik hayvanlarında kalıtsal bozuklukların belirlenmesi için moleküler genetik çalı maları tüm dünyada kullanılmaktadır. Bu derleme, Veteriner Hekimlikte kalıtsal bozuklukların belirlenmesi hakkında bilgi vermeyi amaçlamı tır.

**Anahtar Kelimeler:** Genotip, heterozigot, kalıtsal bozukluk.

### The Methods Used for Detection of Some Hereditary Disorder in Veterinary Medicine

**Summary:** In farm animal practices, many offspring calves are born via artificial insemination from high productive males. This requires that the breeding animals should not carry any inherited defects. Inherited disorders mainly caused by recessive autosomal gene. Therefore, affected individuals with disorder have normal phenotype. As a result of this, these disorders can continue as a heterozygote states. On the other hand, some molecular genetic methods made possible to identify the presence of some heterozygote recessive genes. This review article addresses the modern techniques that used for detection of hereditary disorders.

**Key Words:** Genotype, hereditary disorder, heterozygote.

### Giri

Ana-babadan yavruya geçen ve sonraki soya aktarılabilen, anomaliler ve hastalıklar, kalıtsal bozukluk olarak adlandırılabilir. Tıbbın kurucusu Hipokrat'tan çok daha önceleri bile insanlar otozomal dominant kalıtım ekli gösteren polidaktili ve X kromozomuna ba lı çekinik kalıtım ekli gösteren hemofili hastalı nın belli bir kural içinde ebeveyn den yavruya aktarıldı nı bilmekteydiler. nsanlar yüzyıllarca "Niçin yavrular ana-babaya benzerler?", "Nasıl oluyor da farklı ailelerde farklı hastalıklar görülebiliyor?" gibi soruları kendilerine sormu lardır. Mendel'in bezelyeleri kullanarak yaptı ı ve kalıtım kurallarını açıklı a kavu turdu u çalı -malara kadar yavruların özelliklerinin ebeveynin sahip oldu u özelliklerin ortalaması oldu unu söyleyen karı m teorisine inanılıyordu (8). Son yıllarda özellikle geli mi ve geli mekte olan ülkelerdeki sosyo-ekonomik iyile me ve hekimlik alanında elde edilen geli meler bula ıcı hastalıkları kontrol altına alırken, genetik hastalıkları daha fazla önem verilmesini sa lamı tır (4).

Modern yeti tiricilikte üstün verimli erkek damızlıklardan suni tohumlama ile çok sayıda yavru elde

edilebilmesi, damızlık adaylarının bilinen ve verimli olumsuz yönde etkileyen kalıtsal bozukluklar yönünden homozigot negatif olduklarının belirlenmesi zorunlulu unu do urmu tur (12). Çünkü kalıtsal bozukluklara neden olan genler ço unlukla çekinik otozomal kalıtım ekli gösterdikleri için fenotipik olarak bir bozukluk göstermeyen heterozigot bireyler sayesinde popülasyonda varlıklarını sürdürürler. Bu nedenle zararlı genleri ta ıyan bireyler belirlenerek sürüden ayıklanmalıdırlar (2).

nsanlarda tek bir genin neden oldu u 500'den fazla kalıtsal bozukluk tanımlanmı tır. Hayvanlarda ise genetik temeli bilinen kalıtsal bozukluk sayısı çok daha azdır (12). Kalıtsal bir bozukluk yönünden ta ıyıcı oldu u belirlenmemi bir bo anın, suni tohumlamada kullanılması sonucu, kalıtsal bozukluk bir çok ülkeye ve binlerce yavruya bula abilir. Bu nedenle gerek yeni kalıtsal kusurları, gerekse bilinen kalıtsal kusurları ta ıyan damızlıklar belirlenerek yeti tirmeden uzakla tırılması önemlidir.

**Kalıtsal Kusurların Belirlenmesinde Kullanılan Metotlar:** kalıtsal kusurların belirlenmesinde kullanılan metotla dört ana ba lık altında incelenir.

**1- Pedigri analizi:** Pedigri bilgisi bir bireyin, istenmeyen bir özelli i ta ıyıp ta ımadı nı ve bu özelli in kalıtım eklinin belirlenmesine yardım edebilir. Pedigri analizi, kullanılabilir pedigri bilgileri bulunan sürülerde yapılabilir. Fakat, yakın akraba birle tir

meleri yapıldı ında ve birle tirilen ailelerin çok oldu u durumlarda, pedigrı bilgilerini yorumlamak zordur (13).

**2- Test birle tirmeleri:** Özellikle süt sı ırcılı ında kullanılır ve 3 farklı ekilde yapılır.

**I- Çekinik homozigot bireylerle birle tirme:** Test edilecek bo a ele alınan karakter bakımından homozigot çekinik di ilerle birle tirilir. Bo a çekinik geni ta ıyorsa birle tirme sonunda do an yavruların yarısı heterozigot normal, yarısı hasta olur. Test edilen bo anın normal görünü lü iki yavrusu elde edilirse, babanın belirlenemeyen ta ıycılık olasılı ı 0,25'tir. statistik olarak bo anın ta ıycı olmadı ını kabul etmek için 0,05 güven e i inde 5; 0,01 güven e i i için ise 7 normal yavru elde edilmesi gereklidir (2,13).

**II- Heterozigot di ilerle birle tirme:** Bo a aday heterozigot oldu u bilinen di ilerle çiftle tirilir. E er bo a aday istenmeyen geni ta ıyor ise do acak yavrularının normal olma olasılı ı % 75' dir. Bo a adayının homozigot normal oldu unu söylemek için istatistik olarak 0,05 güven e i inde 11; 0,01 güven e i i için ise 16 normal yavru elde edilmesi gereklidir (2).

**III- Olası ebeveyni yavrularıyla birle tirme:** Test edilecek bo a adayları incelenecek karakter bakımından normal di ilerle çiftle tirilir. Do an normal görünü lü di i yavrular babayla tekrar birle tirilir. Bu çiftle tirme sonunda erkek damızlık adayının ta ıycı olması durumunda 3 normal, 1 kusurlu yavru do ması beklenir. Bu yöntemde bo a adayının homozigot normal oldu unu söylemek için istatistik olarak 0,05 e i inde 23; 0,01 güven e i i için ise 35 normal yavru elde edilmesi gereklidir (2).

Test birle tirmeleri yönteminin bazı dezavantajları vardır. Bunlar; 1- Uzun bir zaman gerektirir. Bir bo anın yakla ık 2 ya ında ilk kez damızlıkta kullanıldı ı, sı ırlarda gebeli in 282 ( $\pm$  10) gün sürdü ü ve di ilerın ilk tohumlama ya ının 18 ay oldu u göz önünde bulunduruldu unda yöntemin ne kadar uzun zaman gerektirdi i daha iyi anılır. Bu yöntem ile sonuç alınca kadar geçen süre sonunda bo alar ya lanır (2). 2- Masraflıdır, test a amasında bo anın bakım-beslenmesi ve alınan spermaların saklanması gerekir. Deneme sonunda bo anın heterozigotlu u tespit edilirse, bu süreye kadar yapılan masraflar bo a gitmi olur. 3- Test birle tirmeleri sonucunda damızlık bo a adayının homozigot oldu u asla ispat edilemez. statistik olarak normal oldu u kabul edilen bireylerde bile, dü ük seviyede de olsa tespit edilememi ta ıycı olma olasılı ı daima vardır (13).

**3- Biyokimyasal tanı:** Kalıtsal bozukluk canlıda herhangi bir proteinin eksikli ine neden olur ve bu proteinin ne oldu u bilinip, proteinin miktarı veya aktivitesi dokularda ölçülebilir ise biyokimyasal tanı sadece hasta ve normal bireylerin belirlenmesinde kullanılır. Ta ıycılar bu yöntemle belirlenemez. Çünkü çe itli genetik olmayan faktörler ve farklı lokuslardaki genlerden dolayı bireyler arasındaki enzim seviyesinde önemli varyasyonlar vardır. Dolayısıyla ta ıycı ve normal bireyleri ayırt etmeye yarayacak kesin bir rakam yoktur (13). Bu nedenle biyokimyasal tanı ile ta ıycılar ço unlukla belirlenemez.

**4- Moleküler tanı:** Evcil hayvanlardaki kalıtsal bozuklukların moleküler düzeyde belirlenmesi çalı malarında 1980'lerden itibaren önemli geli meler sa lanmı tır (14). Moleküler tanı teknikleri, kalıtsal hastalıktan sorumlu genin kendisinin ya da yerinin belirlenmesi esasına dayalı yöntemlerdir (21). Genomik DNA, RNA, mitokondriyal DNA ve protein kullanılarak yapılan moleküler tanıda, iki genel tanı tekni i vardır. Birincisi genetik bozuklu un do rudan tanısı, ikincisi bozuk genin içine veya sonuna eklenen DNA i aret genlerinin kullanılmasıyla yapılan dolaylı tanıdır (7). Kalıtsal bozukluk ço u durumda önceden tanımlanmı bir hastalık olabilir. Bununla birlikte moleküler yöntemler moleküler temeli henüz açıklanmamı olan bozuklukların belirlenmesine de olanak sa lar.

**I- Bozuklu a neden olan genlerin do rudan tanımlanması:** Bu testler çok güçlü ve yüksek duyarlılı a sahiptirler (21).

**A- Restriksiyon enzim analizleri:** Restriksiyon enzimleri, genomik DNA'yı kendileri için özel olan bölgelerden keserek farklı büyüklükte DNA parçacıkları olu tururlar. Tür içindeki bireylerin DNA'ları aynı restriksiyon enzimleri ile kesildi inde aynı büyüklükte parçacıklar verirler (21). Enzimin tanıdı ı bölge mutasyon ile de i ir ise, enzim DNA'yı bu bölgeden kesemez ve beklenenden farklı büyüklükte parçacıklar elde edilir (1, 5, 7, 21). Elde edilen bu parçacıklar, bir membrana transfer edilerek yapılan southern blot tekni i veya parçacıkları büyüklüklerine göre ayırım için restriksiyon parçacık uzunluk polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism, RFLP) homozigot +/+, heterozigot +/- ve homozigot -/- bireylerin belirlenmesinde kullanılır.

Sı ırlarda görülen lökosit ba lanma noksanlı ı (bovine leukocyte adhesion deficiency, BLAD) (1, 5, 18), üridin monofosfat sentez noksanlı ı (deficiency of uridine monophosphate synthase, DUMPS) (16), sitrulinemia (9), kedi ve köpeklerde görülen seroid lipofuskinozis (11), köpeklerde gö-

rülen hip displazi (20), hemofili A (6), Doberman köpeklerinde görülen von Willebrand hastalığı (10), bakır zehirlenmesi sonucu Bedlington Terrier köpek ırkında kalıtsal olarak karaciğer hücrelerinde azalma ile sonuçlanan kalıtsal bozukluk (15), RFLP ile belirlenebilmektedir.

**B- Allel spesifik oligonükleotidler (ASO):** Eritrositlerdeki enzim mutasyon bölgesini çevreleyen nükleotid sırası biliniyor ise kalıtsal bozukluk ASO hibridizasyon problemleri kullanılarak saptanabilir (3). Restriksiyon enzimlerinin tanıma bölgelerini belirlemeyen baz değişimleri, 1 ila 4 baz çifti uzunluğundaki kopmalar veya eklemeler, özel ASO ile belirlenebilir (21).

Bu yöntem ilk olarak insanlardaki alfa talassaemianın tanısında kullanılmıştır. At yetiştiriciliğinde, Arap taylarında iddetli kombine immün yetmezlik hastalığının (severe combined immunodeficiency, SCID) tanısı da Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile elde edilen ürünler SCID'li ve normal hayvanlar için hazırlanan problemlerle hibridize edilerek yapılmaktadır (17).

**II- Bozuklukun neden olan genin dolaylı tanısı:** Kalıtsal bozuklukların büyük çoğunluğunda, bozuklukta sorumlu gen bilinmediği için dolaylı tanı teknikleri kullanılır.

**İlişkisel analiz:** İlişkisel analizi ilk kez 1979'da orak hücreli anemi tanısında kullanılmıştır (5). Kromozom boyunca dağılımı kısa baz çifti tekrar bölgeleri mikrosatellit veya işaret genler olarak adlandırılır. Nükleotid sırası değişimi bir genin yanında bulunan işaret geni, bozuk genle birlikte nesiller boyunca aynı kalıtım yolunu izler. Bu nedenle işaret genin belirlenmesi, bozuk genin tespitiyle aynı anlama gelir (3, 7). İlişkisel analizi, hastalık geninin işaret genine yakın olduğu ve krossingover'de hastalık geni ile işaret geninin ayrılmayacağı esasına dayanır. DNA işaretleyicilerinin kullanımı iki aşamada yapılır; önce işaretleyici gen belirlenir, sonra incelenen ailenin en az iki jenerasyon boyunca tüm bireylerinden DNA alınarak, kalıtsal hastalığın neden olan lokusa sahip fertler belirlenir (13).

## Sonuç

Hayvan yetiştiriciliğinde verim özelliklerinin kalıcı olarak iyileştirilmesi amacıyla yapılan seleksiyonun başarısı, hayvanların üstün verim özelliklerinin yanı sıra herhangi bir kalıtsal kusura neden olan mutant allele sahip olmamalarını da gerektirir. Hayvansal üretimde suni tohumlama tekniğinin yaygın kullanılmasıyla tek bir boğa bile her yıl hem lokal hem de bir çok ülkede yetiştirilen yaklaşık 100 000 inek tohumlanabilir (19). Bu da, damızlık

bir boğanın herhangi bir kalıtsal bozukluk yönünden heterozigot olup olmadığının kesin ve mümkün olduğu kadar kısa sürede belirlenmesinin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir.

Veteriner Hekimlikte kalıtsal bozuklukların tanısında moleküler teknikler, zaman ve para kaybına neden olan ve tanıyııcılarında kesin olarak belirlenemediği klasik tekniklerin yerini almıştır. DNA'nın tek bir kıl kökü, bir damla kan, dışkı veya ağızdan alınan svab örnekleri gibi çok küçük miktarlarda materyalden bile kolayca elde edilmesi ve koryonik villus veya amniyotik sıvının fetal tanıya olanak vermesi moleküler genetik yöntemlerin diğer üstünlükleridir. Ayrıca gelişen teknoloji ve bilimsel ilerlemeler sayesinde yakın gelecekte moleküler genetik yöntemler yeri belirlenmiş kalıtsal bozuklukların gen düzeyinde giderilmesine olanak verebilir.

## Kaynaklar

- 1- Akyüz B, 2004. Türkiye'deki Hol tayn sınırlarında sınırlı lökosit bağlanma yetmezliği (bovine leukocyte adhesion deficiency, BLAD) restriksiyon parçacık uzunluk polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism, RFLP) ile belirlenmesi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sıvık Bilimleri Enstitüsü, Zooteknik Programı. Ankara.
- 2- Alpan O, Akcan A, Poyraz Ö, 1990. *Temel Genetik*. Ankara: Ankara Üniv Yayınları, s. 126-135.
- 3- Arda M, 1995. *Biyoteknoloji*. Ankara: Kükem Derneği Bilimsel Yayınları, s. 211, 358-368.
- 4- Baran N, 1996. *Tıbbi Genetik*. İstanbul: Bilim Teknik Yayınevi, s. 1-3.
- 5- Boehm CD, 1989. Use of polymerase chain reaction for diagnosis of inherited disorders. *Clin Chem*, 35: 1843-1848.
- 6- Clark P, Bowden DK, Parry BW, 1997. Studies to detect carriers of haemophilia A in German Shepherd Dogs using diagnostic DNA polymorphism in the human factor VIII gene. *Vet J*, 153: 71-74.
- 7- Dawson DB, 1990. Use of nucleic acid probes in genetic test. *Clin Chem*, 23: 279-285.
- 8- Griffiths AJF, Gerbart WM, Miller JH, Lewontin RC, 1999. *Modern Genetics Analysis*. First Printing. New York: WF Freeman and Company, p. 2.

- 9- Healy PJ, Dennis JA, Moules JF, 1995. Use of hair roots as a source of DNA for the detection of heterozygotes for recessive defects in cattle. *Aust Vet J*, 72: 392.
- 10- Holmes NG, Shaw SC, Dickens HF, Coombes LM, Ryder EJ, Littlewood JD, Binns MM, 1996. Von Willebrand's diseases in UK Dobermans: Possible correlation of a polymorphic DNA marker with diseases status. *J Small Anim Pract*, 37: 307-308.
- 11- Jolly RD, Sutton RH, Smith RIE, Palmer DN, 1997. Ceroid-lipofuscinosis in Miniature Schnauzer Dogs. *Aust Vet J*, 75: 67.
- 12- Muraleedharan P, Khoda V, Sven G, Mukhapadhyaya PN, Manfred S, Mehta HK, 1999. Incidence of hereditary citrullinemia and bovine leukocyte adhesion deficiency syndrome in Indian dairy cattle (*Bos taurus*, *Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalus*) population. *Arch Tierz*, 42: 347-352.
- 13- Nicholas FW, 1996. *Introduction to Veterinary Genetics*, Oxford: Oxford University Press, pp. 157-159, 205-213.
- 14- Piper L, Ruvinsky A, 1997. *The Genetics of Sheep*, Oxon: Cambridge University Press, p. 88
- 15- Rotfhuizen J, Ubbink GJ, van Zon P, Teske E, van Den Ingh T, Yuzbasiyan-Gurkan V, 1999. Diagnostic value of a microsatellite DNA marker for copper toxicosis in West-European Belington Terriers and incidence of the disease. *Anim Genet*, 30: 190-194.
- 16- Schwenger B, Schöber S, Simon D, 1993. DUMPS cattle carry a point mutation in the uridine monophosphate synthase gene. *Genomics*, 16: 241-244.
- 17- Shin EK, Perryman LE, Meek K, 1997. A kinase-negative mutation of DNA-PKcs in equine SCID result in defective coding and signal joint formation. *J Immunol*, 158: 3565-3569.
- 18- Tammen I, Klippert H, Kuczka A, Treviranus A, Pohlenz J, Stöber M, Simon D, Harlizius B, 1996. An improved DNA test for bovine leucocytes adhesion deficiency. *Res Vet Sci*, 60: 218-221.
- 19- Ünal N, 1999. Biyoteknoloji ve imkanları. *Türk Vet Hek Dern Derg*, 11: 20-28.
- 20- Wang X, Miller AB, Lepine AJ, Scott JD, Mupy KE, 1999. Analysis of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for identifying genetics markers associated with canine hip dysplasia. *J Hered*, 90: 99-103.
- 21- Wood S, Langlois S, 1991. DNA typing in hereditary disease. *J Chromatogr*, 569: 421-447.

## Yazı ma Adresi:

Dr. Bilal AKYÜZ  
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Zootečni ABD.  
Barı Manço C. Sümer M.38090  
Kocasinan, Kayseri,  
Tel: 0-352-3380005/1205  
Fax: 0-352-3372740  
E-Mail: bakyuz@erciyes.edu.tr