

70677

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

**KANGAL KÖPEKLERİNİN GENETİK YAPILARININ
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Vahdettin ALTUNOK

Danışman

Prof. Dr. Mehmet NİZAMLIOĞLU

KONYA-1998

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI
SABE PROJE NO: 95/062

**KANGAL KÖPEKLERİNİN GENETİK YAPILARININ
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Vahdettin ALTUNOK

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından ...26./ 03./1998 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavı oybirliği ile kabul edilmiştir. (S.B.E. Yön. Kur. Tarih ve No: 12.02.1998 - 315/2696)

Tez Jürisi : Jüri başkanı : Prof. Dr. İsmail TOSUN
Danışman : Prof. Dr. Mehmet NİZAMLIOĞLU
Üye : Prof. Dr. Behiç SERPEK
Üye : Doç. Dr. Nuri BAŞPINAR
Üye : Doç. Dr. Ali Muhittin RİFTKİ

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1-2
2. LİTERATÜR BİLGİSİ	3-21
2.1. Köpeğin Önemi ve Kangal Köpeklerinin Özellikleri	3
2.2. Kangal Köpekleri ile İlgili Bazı Çalışmalar	7
2.3. Dünya Köpek Irkları Üzerinde Enzim Polimorfizmi ile Yapılan Çalışmalar ..	9
2.4. Biyokimyasal Genetik	12
2.5. Populasyonun Genetik Yapılarının Protein Elektroforez Tekniği ile Belirlenmesi.....	15
2.6. Genetik Sistemler İçin Enzimlerin Kullanılması	16
2.6.1.1. İzoenzimleri belirleyen multipl lokuslar	17
2.6.1.2. Multipl allelizm	17
2.6.1.3. Sekunder izoenzimler	17
2.6.2. Esteraz D enzimi	18
2.6.3. Fosfoglukonat dehidrojenaz enzimi	19
2.6.4. Karbonik anhidraz 1 enzimi	19
2.6.5. Süperoksit dismutaz enzimi	20
2.7. Çalışmanın Amaçları	20
3. MATERYAL ve METOT	22-37
3.1. Materyal	22

3.2. Metotlar	23
3.2.1. Elektroforetik Sistemde Kullanılan Metotlar	23
3.2.1.1. Elektroforez tekniği	23
3.2.1.2. Nişasta jel elektroforezi ve g¼¼ kaynağı	24
3.2.1.3. Kullanılan tamponlar	26
3.2.1.4. Nişasta jelinin hazırlanışı	27
3.2.1.5. Kan örneklerinin hazırlanması	28
3.2.1.6. Elektroforez işlemleri	28
3.2.2. Enzimleri boyama metotları	30
3.2.2.1. Fluorejenik boyama metotları	30
3.2.2.1.A. Esteraz D enzimi boyama metodu	31
3.2.2.1.B. Karbonik anhidraz 1 enzimi boyama metodu	32
3.2.2.2. Elektron transfer boya boyama metotları	32
3.2.2.2.A. Fosfoglukonat dehidrojenaz enzimi boyama metodu.....	33
3.2.2.2.B. Süperoksit dismutaz enzimi boyama metodu	34
3.2.3. Biyoistatistiksel analiz	35
4. BULGULAR	38-43
4.1. Esteraz D Enzimi	38
4.2. Fosfoglukonat Dehidrojenaz Enzimi.....	39
4.3. Karbonik Anhidraz 1 Enzimi	39

4.4. Süperoksit Dismutaz Enzimi	40
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	44-53
5.1. Esteraz D Enzimi	45
5.2. Fosfoglukonat Dehidrojenaz Enzimi	46
5.3. Karbonik Anhidraz 1 Enzimi	47
5.4. Süperoksit Dismutaz Enzimi	47
5.5. Çalışılan Enzimlerin Birlikte Değerlendirilmesi	50
6. ÖZET	54-55
7. SUMMARY	56-57
8. LİTERATÜR LİSTESİ.....	58-65
9. ÖZGEÇMİŞ	66
10. TEŞEKKÜR	67

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1. Kangal Köpeklerinin yaş ve cinsiyete göre dağılımı	22
Tablo 3.2. Enzimlerin elektroforez şartları	29
Tablo 3.3. Enzimlerin boyama şartları ve boyama komponentleri.....	35
Tablo 4.4.1. SOD enziminin bölgelere göre gözlenen ve beklenen genotipleri ve allel frekansları, Hardy-Weinberg denge durumuna uyumlulukları için elde edilen khi-kare değerleri	42
Tablo 4.4.2. Bölgelere göre gözlenen heterozigot birey sayısı ve beklenen ortalama heterozigotluk dereceleri	42
Tablo 4.4.3. Populasyonlar arası genetik uzaklık ve yakınlık değerlerini gösteren matriks	43
Tablo 5.4.1. İspanyol Köpeklerinin süperoksit dismutaz enzim lokusunun allel frekansları	49
Tablo 5.4.2. Gos d'Atura köpek soyunun 5 ayrı populasyonunun süperoksit dismutaz enzim lokusunun allel frekansları	49

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1. Esteraz D'nin boyama sistemi	31
Şekil 3.2. Karbonik anhidraz I'in boyama sistemi	32
Şekil 3.3. Fosfoglukonat dehidrojenaz'ın boyama sistemi	34
Şekil 3.4. Süperoksit dismutaz'ın boyama sistemi	34



RESİM LİSTESİ

Resim 3.1. Elektroforez sistemi.....	29
Resim 4.1. Esteraz D enziminin nişasta jel elektroforez sonrası gözlenen bantları....	38
Resim 4.2. Fosfoglukonat dehidrojenaz enziminin nişasta jel elektroforez sonrası gözlenen bantları	39
Resim 4.3. Karbonik anhidraz 1 enziminin nişasta jel elektroforez sonrası gözlenen bantları.....	40
Resim 4.4. Süperoksit dismutaz enziminin nişasta jel elektroforez sonrası gözlenen bantları	41

KISALTMALAR

ESD : Esteraz D

PGD : Fosfoglukonat dehidrojenaz

CA₁ : Karbonik anhidraz 1

SOD : Süperoksit dismutaz

SÜVFAUÜ : Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama
Ünitesi

SKKÇ : Sivas Kangal Kaymakamlığı Çiftliği

SUTİMÇ : Sivas Ulaş Tarım İşletmesi Müdürlüğü Çiftliği

GAVOEMK : Gemlik Askeri Veteriner Okulu ve Eğitim Merkez Komutanlığı

SMK : Sivas'ın merkez ve köyleri

FCI : Federation Cynologique Internationale

EC : Enzyme Commission numbering system

MTT : Methylthiazolyl tetrazolium

PMS : Phenazine methosulfate

NAD : Nicotinamide Adenine Dinucleotide

NADP : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

MUA :4-methylumbelliferyl acetate

Tris : Tris(-hydroxymethyl)-aminomethane

1. GİRİŞ

Köpek, insanların evcilleştirdiği ilk hayvan olmuştur. İnsanlar köpeklerle olan arkadaşlıklarını, dostluklarını ifade etmek için değişik devirlerde duvarlara, taşlara köpeklerinin kabartma resimlerini yapmışlardır. Bunlar, eski çağlardan beri insanların köpeklere olan sevgilerini, his ve duygularını, ayrıca güncel hayatta köpeklerden ne ölçüde yararlandıklarını ortaya koyan en güzel belgelerdir.

Köpek, evcilleştirilmesinden günümüze kadar, daha çok av ve bekçilik işlerinde kullanılmıştır. Günümüzde köpeklerden av ve bekçilik dışında, hayvancılıkta sürü koruma, savunma, askeri ve polisiye amaçlı olarak da yararlanılmaktadır. Ayrıca bugün değişik ırklardaki köpekler, yaygın bir şekilde ve her türlü ihtiyaçları karşılanmak suretiyle evlerde de yetiştirilmektedir.

Kangal Köpeği, Anadolu'da yüzyıllar boyu çobanın yanında onun sürüsünü kötü niyetli kimselerden ve vahşi hayvanlardan korumuş bir köpek ırkı olup, Babiller hatta Asurlar zamanından beri varlığı bilinmektedir. Bu köpekler savaş köpeği olarak kullanıldığı gibi, at ve aslan avında da kendisinden yararlanılmıştır. Çeşitli arkeolojik kayıtlarda, Osmanlı İmparatorluğu arşivlerinde ve Evliya Çelebinin seyahatnamesinde Kangal Köpeğinin varlığı kanıtlanmıştır. Doğada serbest iken başka köpeklerle çiftleşmediği dolayısıyla özel bir gen kombinasyonuna sahip olan ender soylardan biri olduğu söylenen Kangal Köpeklerinin küçümsenemeyecek derecede zekaları, çok alıngan ve hassas bir ruh yapıları vardır. Sevinçlerini ve elemlerini belli ederler. Hatta hislerini yalnız hal, hareket, mimik ve jestlerle değil, çıkardıkları çeşitli tonlardaki havlamalarla açığa vururlar. İyi ve kötü niyetli kişileri hemen anlarlar. Türk Çoban Köpeği olarak da bilinen bu köpeklerin sürü koruma ve yönetme, çok iyi işitme, koku alma gibi önemli

özelliklerinin yanında, kuvvetleri, cesaretleri, bağılıkları ve kıvrak zekaları ile 40-50 komutu kolaylıkla öğrenebilme ve diğer üstün özellikleri ile ülkemiz için gerçekten genetik bir hazine olup, köpekle ilgilenen çevrelerin gittikçe artan bir ilgisini çekmektedir (Anonim 1990, Aksoy 1991, Özgüneş ve Çiftçi 1993, Özbeyaz 1994, Kalaycıoğlu ve ark 1995, Tuncel 1996).

DNA molekülünün fonksiyonel olan parçalarına gen adı verilir. Bu parçalarda yer alan özel baz dizileri, genin tanınmasına neden olmaktadır. Genlerin bazılarının, enzimlerin biyokimyasal yapısı için bilgi taşıdığı bilinmektedir. DNA üzerindeki genin bulunduğu yere lokus adı verilir.

Homolog kromozomların aynı lokuslarında yer alan birbirinin aynı veya farklı bilgiler üreten genetik ünitelere allel adı verilir. Bir bireyin tek lokus açısından genetik yapısı tanımlanırken, homolog kromozomlarındaki alleller birbirinin aynı ise homozigot, farklı ise heterozigot birey olarak adlandırılır. Elektroforez tekniğinin populasyon genetiği alanına uygulanması ile birçok lokus çalışılarak genetik sistemin allelleri ve genotipleri kolayca gözlemlenebilir hale gelmiştir. Enzimler doku ve doku aralıklarının hemen hepsinde ve alyuvarlarda bulunmaktadır. Alyuvarlar bu enzimler yönüyle en basit ve en kolay elde edilebilen kaynaklardır. Birçok enzim lokusu incelendiğinde önce bireyin sonra populasyonun genetik yapısı ve populasyonların heterozigotluk seviyeleri belirlenebilmektedir. Bölgesel ve reproduktif izolasyon, çevresel etkiler, rastlantısal genetik dalgalanma, mutasyon, göç, doğal seleksiyon sonucunda farklılaşan populasyonlar arasındaki genetik farklılığın kantitatif ölçümü, birçok enzim lokusu açısından ortak allellerin eksikliği, ortak olanların frekanslarının farklılığının dikkate alınması ile mümkün olmaktadır (Nei 1987).

2. LİTERATÜR BİLGİ

2.1. Köpeğin Önemi ve Kangal Köpeklerinin Özellikleri

İnsanlar yaşamlarını sürdürmek için ilk önce karınlarının doyurulması gerektiğini anlamışlardır. Bu amaçla kendilerine zeki, kuvvetli, cesur ve o derecede sadık bir yardımcı aramışlardır. Sayılan bu yeteneklere sahip olan köpek, insanların dikkatini çeken ve onlarla kader birliği yapan ilk canlı olmuştur (Öncül 1983).

Köpeğe duyulan önem ve ilgi yüzyıllar boyu devam etmiş ve uzun yıllar köpekler avcılıkta ve sürü korumada yaygın olarak kullanılmıştır. Bunların dışında Birinci ve İkinci Dünya, Kore ve Vietnam harplerinde köpekler nöbetçilik, keşif, habercilik ve devriye görevleri için eğitilmiş ve kullanılmışlardır (Kırmızı 1991).

Ülkemizin özgün hayvanlarından olan ve Türkiye’de önemi çok geç anlaşılan Kangal Köpekleri dünyaca meşhur olmuş bir köpek ırkıdır. Türk Çoban Köpeği, Anadolu Çoban Köpeği ya da Karabaş olarak da bilinen bu köpeğin kökeni hakkında iki farklı görüş vardır. İlk görüşe göre, bu köpekler tamamen Anadolu’nun yerli bir ırkıdır. Hitit (M.Ö. 2000-1180), Babil (M.Ö. 1900-331) ve Asur (M.Ö. 858-627) Uygarlıkları döneminde yapılan köpek kabartma resimlerinin Anadolu Çoban Köpeğini ifade etmesi, bu görüşün en önemli desteğidir. Bu kabartma resimleri halen İngiltere’deki British Museum’daki Assyan odasında sergilenmektedir (Kırmızı 1994, Anonim 1 1995, Anonim 2 1995). İkinci görüşe göre ise Kangallar Anadolu’nun yerli bir ırkı değildir ve Türkler Orta Asya’dan Anadolu’ya göç ederken bu köpekleri beraberlerinde getirmişlerdir. Yine bu görüşe göre, Türklerin Avrupa içlerine kadar ilerlemesinden sonra birçok Avrupa Çoban Köpeği ırkının orijini Türk Çoban Köpeklerine dayandırılmaktadır (Anonim 1 1995, Anonim 2 1995).

17. yüzyılda yaşayan Evliya Çelebi, seyahatnamesinde aslan kadar kuvvetli olarak tarif ettiği bu köpek ırkı, büyük bir baş, kuvvetli bir çene ve sağlam bir boyun yapısına sahiptir. Başta bulunan siyah maske yani burun, ağız çevresinde ve kulak ucundaki siyahlık dominant bir kalıtım yolu izlemektedir (Kırmızı 1994, Özbeyaz 1994, Nelson 1996).

Kangallar yüksek anlama yeteneğine sahiptir. Bu hayvanlar 40-50 kadar komutu çok kolay öğrenebilmektedir. Hatta en olgun döneminde (5 yaş) 200 sözcüğü rahatlıkla anlayabilmektedir. Koku alma ve işitme duyuları, dişleri ve pençeleri oldukça iyi gelişmiştir (Anonim 1990, Özbeyaz 1994). Bu köpeklerin savaş ve polis köpeği olduğu kanıtlanmış ve bu gerçek tüm ülkelerde de benimsenmiştir (Cengiz ve ark 1993). Sürü korumada kullanılan tuzaklar, kiralık avcılar, elektrikli çit uygulaması gibi çeşitli yöntemlerin bazı dezavantajlarının bulunması ve kayıpları yeterince azaltmaması nedeniyle sürü korumada köpeğin daha avantajlı ve ekonomik olduğu Amerika'da yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur (Özbeyaz 1994).

Köpeği köpek yapan, ona canlılık kazandıran, sağlıklı kılan diğer unsurlar yanında bazı özel organları saymak gerekir. Köpeğin zekası onu sevimli ve canlı kılarken, kuyruk sallayışı, diliyle yalamaları, bunlara verdiği şekiller ve çeşitli havlamalarla getirdiği yorumlar onun yaşam tarzının ifadesi olur. Köpeğin kuyruğu önemli bir göstergedir ve onun mizacını, tavrını ifade eder. Kuyruğunu sallayarak zevk ve neşesini bildirir. Kuyruğun diğer pozisyonları ise kızgınlığını ya da teslimiyetini gösterir (Taylor 1993).

Kangal Köpeklerinin gözleri bir ceylan gözü kadar çekici ve parlaktır. Yüz şekli aynen bir aslanı andırır. Göğüsleri geniş ve çok iyi gelişmiştir. Kas, eklem ve kemik yapıları kusursuzdur. Göz ve ağız etrafı ile burun çevresi ve kulak siyah, post rengi kirli beyazdan gri renge kadar olup, genellikle sarımtırak beyaz renktedirler. Göğüste beyaz bir madalyon bulunabilir. Kuyruk oldukça yüksek olup, rahat durumdayken düşük ve kıvrık, uyarıldığı zaman sırt

üstünde yüksek ve helezoni tarzında kıvrılmıştır. Koku alma duygusu diğer tüm köpeklere göre daha üstündür. Ayrıca kuvvet, dikkat ve cesaretleri ile bugün her ülkede aranılan en soylu bir ırk haline gelmiştir. Bunlara ilaveten sadakati ve görev anlayışıyla dikkat çekmektedir. Bütün köpek türleri içinde yabani kurda karşı gelen ve onu yıldırان tek köpek türüdür. Bir kurt ile mücadele ettiğinde yakalayınca kadar onu kovalar. Kilometrelerce uzağa kadar da olsa peşini bırakmaz. Kurdu yakaladığında önce göğsü ile yere yıkar ardından boğazını parçalayarak öldürür. Dişileri saatte 75 km hız yapabilmektedir. Bu sayede sürüye saldıran kurdun önünü kesmek suretiyle arkadan gelen erkeğin kurda yetişip etkisiz duruma getirmesini sağlar. Hatta gebe dişi köpekler, kurt takibi esnasında kurdu kovalarken yavru dahi atabilirler. Fakat bu kovalama işini yine de devam ettirirler (Öncül 1983, Anonim 1990, Aksoy 1991, Özgüneş ve Çiftci 1993, Taylor 1993, Gönül 1996).

Yurdumuz hayvan ırkları içerisinde çok ayrı bir özelliğe sahip olan Kangal Köpeklerinin, bütün bu yeteneklerine rağmen çok sakin ve mütevazı bir görünümü vardır. Ancak verilen görevleri mutlaka başarır. Yüzyıllardır koyun sürülerini korumaya şartlandırılmışlardır. Bu nedenle çoban dahi olmadan koyun sürülerini yönlendirir. Hatta yeni doğmuş kuzuları korur ve göğüsleri ile ite ite ağıla kadar getirirler. Keza kaybolan koyunları da bulup getirebilirler. Bu köpeklerin, birbirine karışmış sürülerin içinden sorumluluğu altındaki koyunları tek tek ayırma kabiliyetleri de vardır. Sahip olduğu evi ve eve ait canlı cansız her bireyi de aynen koyunlar gibi korur. Bilhassa çocuklarla zayıflara ve kendisinden korkanlara asla saldırmaz. Aksine çocuk ve kadınları korur ve onlara karşı çok duyguludur. Nerede ve ne zaman havlayacağını veya saldıracağını çok iyi bilir. Sürü koruyan bu köpeklerin güçleri ve hızları dillere destandır. Bu soy diğer bütün köpeklere göre, daha baskın bir karakterdedir. Sahibine karşı sadık, yabancılara karşı şüphecidirler ve kötü niyetli kişileri kokusundan tanıdığı söylenmektedir. Bir yaşından sonra

koruma içgüdüleri gelişir. Emirlerle uyma ve sosyalleşmeleri kontrol edilebilir. Barındıkları yeri oldukça temiz tutmaya gayret ederler. Aile köpeği olabilir ve çocuklarla oynarlar. Bunların koruma bölgesine girmek çok tehlikelidir. Bölgeye giren geri çekilirse kendini kurtarabilir. Provokatörleri dürüst bir şekilde uyarır, fakat savaşmaktan da kaçmazlar. Amerika'da bir rakunu kovalayan tazılar yanlışlıkla Kangal Köpeğinin koruduğu sürüye girmişler ve sonuçta hepsinin öldürüldüğü bildirilmiştir (Öncül 1983, Anonim 1990, Aksoy 1991, Gönül 1996, Tuncel 1996).

Açlığa ve susuzluğa çok dayanıklıdırlar. Beslenmeleri sorun değildir. Her türlü gıdayı mükemmel değerlendirirler. Ancak dengeli beslenenler daha cüsseli ve daha kudretli olmaktadır (Aksoy 1991, Özgüneş ve Çiftci 1993). Kan asaletine çok sadıktır. Dolayısıyla doğada serbest iken başka bir karnivorla çiftleşmesi mümkün değildir (Öncül 1983).

Ne yazık ki milletçe sahip çıkamadığımız bu büyük genetik hazine, 1930 ve 1950'li yıllarda dünyanın değişik ülkelerine götürülen damızlık köpeklerle saf Kangal yetiştiriciliği yapanlar (özellikle Amerika Birleşik Devletleri ve İngiltere'de) farklı isimler (İnternasyonel Anadolu Çoban Köpeği, Maranda Anatolians, Sakarya Anatolians, Karabash ya da Anadolu Çoban Köpeği gibi) altında kulüpler, dernekler kurmuşlardır. Bunlar reklamlarına ya da ilanlarına Türkiye'den ithal edilmiş, şampiyon ana babadan olma garantili yavrular bulunur ibaresini koymaktadırlar. Bu köpekler bugün Amerika ve İngiltere'de üstün kabiliyetlerinden dolayı aranan, asker ve polis kuruluşlarında tercih edilen bir seviyeye erişmiştir. Amerika'da bu köpeklerin sırtlanlara karşı da kullanıldığı söylenmektedir (Öncül 1983, Aksoy 1991, Nelson 1996, Reed 1996, Tuncel 1996).

1989 yılında F.C.I. (Federation Cynologique Internationale) tarafından Kangal Çoban Köpeğinin standart numarası 331 olarak belirlenmiş ve bazı özelliklerinin standartları tanımlanmıştır (Borg 1996).

Ülkemizde askeri amaçlar için 1975 yılından itibaren Gemlik'te Askeri Veteriner Okulu ve Eğitim Merkez Komutanlığı Köpek Üretim ve Eğitim biriminde ve diğer bazı askeri tesislerde yetiştirilmektedir. Bu köpek ırkı askeri amaçlarla eğitime alınmış ve asırlardır bu yönde eğitim gören diğer köpek ırklarından daha kabiliyetli olduğu tespit edilmiştir. Özellikle Türk Silahlı Kuvvetlerinin bekçilik görevinde kendisini kabul ettirmiştir. Kangal Köpekleri bugün Sivas'ın Kangal İlçe Kaymakamlığı Çiftliğinde, Sivas-Ulaş Tarım İşletmesi Müdürlüğü Çiftliğinde ve bazı özel çiftlikler ile son birkaç yıldır Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Ünitesi'nde yetiştirilmektedir. Ayrıca Emniyet Genel Müdürlüğü'ne bağlı Ankara-Gölbaşı ve İstanbul - Bayrampaşa'da Köpek Eğitim Merkezleri (KEM) bulunmaktadır (Öncül 1983, Anonim 1990, Aksoy 1991, Kırmızı 1991, Kalaycıoğlu ve ark 1995, Gönül 1996, Tepeli 1996)

2.2. Kangal Köpekleri ile İlgili Bazı Çalışmalar

Son derece üstün özelliklere sahip ve ülkemize özgün bir köpek olan Kangal Köpekleri hakkında ne yazık ki, çalışma ve literatür bilgileri çok yetersizdir. Aksoy (1991), bu köpek ırkının bazı vücut ölçülerini şematize etmiştir. Özgüneş ve ark (1993), Kangal Köpekleri hakkında genel bilgiler vermişlerdir. Bazı hematolojik parametreler ile kan gazları ve plazma elektrolit düzeyleri değişik araştırmacılar tarafından çalışılmıştır (Bilal ve Uysal 1990, Cengiz ve ark 1993, Keskin ve ark 1994). Özbeyaz (1994), Kangal Köpeklerinin bazı morfolojik özelliklerini araştırmıştır. Kalaycıoğlu ve ark (1995), sağlıklı Kangal Köpeklerinin bazı biyokimyasal kan parametrelerinin normal seviyelerini tespit etmişlerdir. 1996 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi tarafından organize edilen "Uluslararası Türk Çoban Köpeği Sempozyumu" Konya'da gerçekleştirilmiştir. Dünyanın 26 seçkin bilim adamı, uzman ve yetiştiricinin katılımı ile Dünyada ilk kez yapılan Uluslararası Türk Çoban Köpeği Sempozyumunda, Türk Çoban Köpeğinin ABD'de 1650, İngiltere'de 630 adet, Almanya, Belçika, İtalya, Fransa, İsviçre,

Hollanda ve Finlandiya’da ise sınırlı sayıda resmi kayıtlı saf örneklerinin bulunduğu, Türkiye’deki sayılarının bilinmediği; ABD ve İngiltere’de sistemli saf yetiştiriciliğin yapıldığı, birçok ülkede sürü koruma köpeği ve bahçeli mekanlarda (ev / işyeri) koruma köpeği olarak başarılı bir şekilde kullanıldığı; Türk Çoban Köpeklerinin bazı Kafkas (örn., Kafkas Owtcharka, Agouti) ve Avrupa (örn., Pirene Dağ Köpeği, Maremma, Chuvatch, Kuvasz Tatra) sürü koruma köpeklerinin oluşumunda genetik etkisi olduğu belirtilmiştir. Türkiye’de Türk Çoban Köpeklerinin morfolojik ve davranış karakterlerinin yeterince bilinmemesi ve köpek eğitimi konusunda çok sınırlı elemanın bulunması sonucu, bu köpek ırkından gerektiği şekilde yararlanılmadığı, Türkiye’de bu ırkın öncelikle varlığı ve saflığının korunması için yetiştirme programlarının ve sistemli yoğun bir dizi araştırmaların yapılmasının zorunlu olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca Kangal Köpeklerinin üstün niteliklerinden yararlanmak amacıyla ABD’de yoğun araştırmaların yapıldığı, bu araştırma sonuçlarının uygulamaya konulduğu Dünyanın önde gelen koyun yetiştiricisi ülkelerinden Avustralya ve Arjantin ile ABD ve bazı Afrika ülkelerinde sürü koruma köpeği ve bekçi köpeği olarak hızlı bir yayılma eğilimi gösterdiği ifade edilmiştir (Borg 1996, Chappell 1996, Nelson 1996) .

Bütün bunların dışında Kangal Köpekleri ile ilgili olarak; Kırmızı (1991), “Türk Çoban Köpeği ve Alman Çoban Köpeğinin Dölverimi, Büyütülen Yavru Oranı, Büyüme ve Beden Ölçüleri Yönünden Karşılaştırılması”, Tepeli (1996), “Kangal Irkı Türk Çoban Köpeklerinde Büyüme, Bazı Vücut Ölçüleri ve Dölverimi Özelliklerinin Belirlenmesi”, Gönül (1996), “Gemlik Askeri Veteriner Okulu ve Eğitim Merkez Komutanlığı’nda Yetiştirilen Türk Çoban Köpeği ve Alman Çoban Köpeğinin Başlıca Morfolojik Özellikleri ile Bu Genotiplerin Karşılaştırmalı Eğitim Performansları” konulu doktora tezleri bulunmaktadır.

2.3. Dünya Köpek Irkları Üzerinde Enzim Polimorfizmi ile Yapılan Genetik Çalışmalar

Biyokimyasal enzim polimorfizmi çalışmaları değişik elektroforez teknikleri kullanılarak 1950'li yıllardan beri gerçekleştirilmektedir. Değişik ülkelerdeki bazı araştırmacılar kendi ülkelerine özgü köpek ırklarının genetik yapılarını belirlemişler ve diğer ülke köpek ırkları ya da kurt gibi vahşi hayvanlar arasındaki genetik yakınlığın araştırılması çalışmalarını sürdürmektedirler. Ancak evcil köpeklerdeki alyuvar enzimlerinin biyokimyasal polimorfizm çalışmaları, diğer hayvanlara nazaran her zaman geride kalmıştır. Bunun başlıca sebepleri, teknik ve örneklendirme problemleridir (Seixas ve ark 1988).

Jordana, ve ark (1992a), kanın enzimlerini ve suda çözünebilir proteinlerini kodlayan yapısal genleri, değişik elektroforetik teknikler (nişasta, poliakrilamid ve agaroz-poliakrilamid jel elektroforez) kullanarak yetiştirilen İspanyol Köpekleri arasındaki genetik ilişkileri araştırmak amacıyla, süperoksit dismutaz (*Sod* *), glukoz fosfat izomeraz (*Gpi*), fosfoglukonat dehidrojenaz (*Pgd*), fosfoglukomutaz-1 (*Pgm-1*), malat dehidrojenaz (*Mdh*) ve glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (*G6pd*) olmak üzere bazı alyuvar enzim lokuslarını çalışmışlar ve sadece *Sod* lokusunda polimorfizm gözlemişlerdir.

Braend (1984), köpek serumlarında esteraz enzim lokusunun genetik varyasyonunu izoelektrik fokusing metoduyla araştırmış ve arilesteraz (*ArE*)'ın 5 kodominant allel ve bir lokusun genetik teorisi ile uygunluk içerisinde olduğunu bulmuştur.

Braend ve Andersen (1987), köpek serumunda transferrin ve esteraz varyasyonunu poliakrilamid jelde izoelektrik fokusing tekniğini kullanarak

* Kısaltmada enzim ifade ediliyorsa baş harfleri büyük olarak (süperoksit dismutaz için SOD), enzimi kodlayan genetik lokus ifade ediliyorsa aynı kısaltma ile, sadece ilk harfi büyük ve italik (*Sod*) olarak yazılır

çalışmışlar ve önceden açıklanamayan arilesteraz (*ArE*) fenotiplerini de içine alan 7 kodominantın hepsini açıklamışlardır.

Braend ve Roed (1987), 146 Alaskan kurt serumunda transferrin ve esteraz (*ArE*) polimorfizmini, poliakrilamid jelde izoelektrik fokusing tekniği ile ortaya koymuşlar ve elde edilen fenotipik bant örneklerini, ya laboratuvara babalık problemleri için getirilen ya da polimorfizm çalışmaları için toplanan örneklerden seçilen Norveç Köpekleri ile karşılaştırmışlardır. *ArE*, köpeklerde 4 allel iken kurtlarda 3 allel olarak gözlemlenmişlerdir.

Seixas ve ark (1988), evcil köpeklerde nişasta jel elektroforez tekniği ile alyuvar ve plazma enzimlerinin biyokimyasal polimorfizmi konulu çalışmalarında, Harris ve Hopkinson (1976)'un insan kanındaki enzimlerin elektroforetik incelenmesinde kullandıkları tekniklerin, köpeklere de direkt olarak uygulanabilirliğinin kontrol edilmesi ve elektroforetik değişkenlikleri göz önünde tutularak sonuçları daha iyi elde etmek için bu tekniğe yararlı olacak yeni değişiklikleri bulup bunları kullanabilme olanaklarını araştırmışlar ve birçok alyuvar enzimlerinin belirlenmesinde kullanılan klasik tekniklerin, hemen her durumda köpeklerde de insanlarda olduğu kadar elverişli olduğunu ortaya koymuşlardır.

Simonsen (1976), evcil köpekler ve diğer Canidae'lerin kan proteinlerinde yaptığı elektroforetik çalışmalar ile bazı enzim ve proteinlerin bantlarını tanımlamış ve köpek ile kurdun birbiriyle çok yakın ilişkili olduğu ve aynı ortak atadan gelebileceğini göstermiştir.

Baur ve Schorr (1969) köpeklerde süperoksit dismutaz'ın A ve B olmak üzere 2 allel tarafından determine edildiğini ve genetik polimorfizmini belirlemişlerdir.

Gerard ve ark (1987), kan grupları ya da polimorfik kan proteinlerini determine eden genetik varyantların, köpeklerin identifikasyonu ve babalık kontrolünde kullanılabilirliğini araştırmışlardır.

Meera ve ark (1973), melez köpeklerin lökosit ve alyuvarlarında 21 farklı genetik lokus tarafından determine edilen 15 enzimin izoenzim varyasyonlarını elektroforetik olarak incelemişlerdir.

Braend (1985), köpek serumlarındaki esteraz enzim polimorfizminin izoelektrik fokusing elektroforez yöntemiyle ortaya koymuştur.

Ingrid ve ark (1985), transferrin, postalbumin, plazma esteraz ve mannoz fosfat izomeraz varyantlarının gen frekanslarını populasyon çalışmalarında ve babalık kontrollerinde kullanmışlardır.

Dostál ve Stratil (1994), köpeklerde babalık kontrolü için kullanılan polimorfik özellikler üzerinde çalışmışlardır.

Weiden ve ark (1974), tarafından köpeklerde bazı alyuvar enzimleri ve hemoglobin genetik varyantlarını elektroforetik olarak incelemişlerdir.

Juneja ve ark (1987), 21 farklı Avrupa köpek ırkının plazma örneklerinde 2-dimensionel agaroz jel, horizontal poliakrilamid jel elektroforez teknikleri ve genel protein boyaması ile genetik polimorfizmleri ve köpeklerde babalık kontrolünde kullanılan varyantları gözlemlemişlerdir.

Jordana ve ark (1991a), 10 İspanyol Köpeği soyunun 21 gen lokuslarındaki alloenzim değişkenliklerini elektroforetik teknikler kullanarak araştırmışlardır.

Jordana, ve ark (1992b) tarafından 10 İspanyol Köpek soyu alt populasyonlarının genetik yapısı ve aralarındaki akrabalık derecesi, F istatistik ile çalışılmış ve kanda çözünebilir proteinleri ve enzimleri kodlayan 21 yapısal gen lokusunu elektroforez tekniği ile belirlemişlerdir.

Jordana ve ark (1991b), “Gos d’Atura” köpek soyunun 5 populasyonu arasındaki akrabalık ve genetik değişkenlik derecesini 21 gen lokusu verilerini kullanarak analiz etmişlerdir.

2.4. Biyokimyasal Genetik

Son yüzyılın başlarında hücre metabolizması ve döllenen yumurtadan meydana gelen canlıların gelişmesinde enzimlerin önemli ölçüde rol oynadığı görüşü yaygınlaşmıştır. Yüzyılımızın ortalarına doğru enzimlerin özelliklerinin genlerdeki baz dizilerine göre tanımlandıkları anlaşılmıştır.

Yakın zamanlarda genlerdeki yapı farklılıklarının ve genler arası ilişkilerin gen ürünlerine ve bu ürünlerin biyokimyasal özelliklerine yansımaları çalışılmaktadır. Bu çalışmaları içeren alana biyokimyasal genetik denir.

Biyokimyasal genetik vücudun bütün metabolizma ve bağışıklık reaksiyon alanlarını kapsar. Genetiğin bu dalının pratik hayvan yetiştiriciliğindeki önemi giderek artmaktadır. Bu arada birçok metabolizma bozuklukları, enfeksiyon hastalıklarına kalıtsal duyarlılık söz konusu olabilir. Buna ek olarak yağların, süt ve et proteinlerinin kalitesi onları aslında kalıtsal olarak belirleyen kimyasal yapılarına bağlı biyokimyasal genetik sonraki yıllarda hayvansal ürünlerin kaliteleri üzerindeki araştırmalarda önemli rol oynayacaktır (Arıtürk 1983a, Düzgüneş ve Ekingen 1983).

Bütün canlılarda hayat, çeşitli ve düzenli birtakım biyokimyasal reaksiyonlarla sürdürülmektedir. Biyokimyasal reaksiyonların genler tarafından idare edildiği görüşü ilk defa 1902 yılında A. E. Garrod tarafından insanlarda alcaptonuria hastalığı incelenirken ortaya atılmıştır. Bu alandaki çalışmalar 1940 yılına kadar ihmal edilmiş, aynı yıl G. W. Beadle ve E. L. Tatum ekmecek küfünde (*Neurospora*'da) normal gelişme ve çoğalma için gerekli biyokimyasal reaksiyonlar zincirini ve bu zincirin her halkası için belirli genlerin gerekliliğini deneysel olarak göstermiştir. Bundan sonra yapılan çalışmalarda da aynı yönde sonuçlar elde edilmiştir (Düzgüneş ve Ekingen 1983, Başaran 1994).

Aynı kimyasal reaksiyonu katalizleyen farklı yapıdaki enzimlere izoenzimler adı verilmektedir. Ayrıca izoenzimlerin kimyasal, fiziksel ya da immunolojik karakterleri ile elektroforetik göçleri de farklıdır (Ersoy ve Bayşu 1986, Gözükara 1997). Kontrol mekanizmasında önemli rol oynayan olaylardan birisi de, aynı kimyasal reaksiyonu katalizleyen fakat enzim protein yapısı farklı olan izoenzimlerin hücrede bulunmasıdır (Gözükara 1997). Elektroforez teknikleri kullanılarak izoenzimler olarak adlandırılan enzimlerin birçok moleküler formları direkt olarak gözlemlenebilmektedir. Bir ya da daha fazla lokus tarafından kodlanan izoenzimler fonksiyonel olarak benzer fakat yapısal olarak farklı formladırlar ve elektroforezis ile ayrımlanabilirler. İzoenzimlerin yapılarının farklı olması, homolog kromozomlardaki bir lokusa ait genin mutasyonla birbirinden farklı iki veya daha fazla ürün oluşturması, kromozom duplikasyonu ya da tandem duplikasyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkabilmektedir. Bağımsız mutasyonlar bu lokuslar üzerinde toplandığı zaman izoenzimlere neden olabilmektedir (Harris ve Hopkinson 1976, Ayala 1982).

Bilim adamları, özellikle jel elektroforezis gibi modern biyokimya tekniklerinin geliştirilmesi ile populasyonların genetik yapılarını ve farklılıklarını ortaya koyabilmektedirler (Crozier ve Ferguson 1986). Yapısal gen lokuslarındaki genetik değişkenliklerin belirlenmesi için bu tekniklerin populasyon genetiği alanında kullanılması ile populasyonlarda ortalama heterozigotluk ve gen polimorfizmi hakkında büyük bir bilgi patlaması olmuştur (Ayala 1982).

Bir lokusun ürünü, alleller olarak adlandırılan alternatif formlarda olabilmektedir. Bu gen lokusu allellerinin frekansları 0,01'den (ya da daha sıkı ölçüt ile 0,05'den) daha büyük olursa polimorfik olarak adlandırılır. Aksi durumda bu lokus monomorfik lokus olarak ifade edilir. Alloenzim (allozym) terimi, tek bir lokusun allellerini tanımlamak için kullanılmaktadır. Bir izoenzim 2 ya da 4 alt ünitelerden kurulu ve bu alt üniteler ayrı lokusların farklı

allellerinin ürünleri ise bu izoenzimler sırasıyla heterodimer ya da heterotetramer olarak adlandırılır. Aksine aynı lokusun allelleri bir alloenzimi oluşturmak için biraraya gelirlerse, bu lokus allelleri homodimer ya da homotetramerler olarak adlandırılır (Ayala 1982).

Yapısal genlerdeki herhangi bir genetik değişiklik, genler tarafından belirlenen polipeptiddeki amino asit kompozisyonunun değişimi ile sonuçlanmaktadır. Bu değişim sırası ile, net elektrostatik yükteki ve / veya moleküler ağırlıktaki ve / veya polipeptit zincirdeki değişiklik şeklinde gerçekleşmektedir. Seçilen enzimler ve onların polipeptit zincirindeki farklılık, tampon içeren bir yürütme ortamında (nişasta jel, poliakrilamid jel, agaroz jel vd) ve elektriksel alanda belirli göç bölgelerine ayrımlanabilmektedirler (Harris ve Hopkinson 1976, Ayala 1982).

Araştırmacılar bir enzimin popülasyondaki izoenzim bantlarını belirleyebilmek için: (1) enzim kodlayan lokusların sayısını, (2) homodimer / homotetramer ve heterodimer / heterotetramer'lerin varlığını ve gösterdikleri bantları, (3) her lokusun allellerinin sayısını ve (4) popülasyondaki allellerin frekanslarını ortaya koymaya çalışırlar.

Jel üzerinde gözlemlenen izoenzim ya da alloenzimlerinin bantları (zymogram), o popülasyon bireylerinin belirli lokus veya lokuslarının allel frekanslarının hesaplanmasında kullanılmaktadır. Birçok enzim lokusunun enzim elektroforez yoluyla incelenmesi ile bu enzimler yönüyle popülasyonun genetik yapıları belirlenebilmektedir. Bu bilgilerle popülasyondaki genetik varyasyonun düzeyi hesaplanabilmektedir (Ayala 1982, Nei 1987). Nispeten düşük değişkenlik gösteren popülasyonlarda, diğer popülasyonlara göre daha yüksek derecede bir akrabalı yetiştirmenin yapıldığını gösterebilmektedir. İki popülasyonun allel frekansları, popülasyonlar arasındaki genetik uzaklığın hesaplanmasında da kullanılmaktadır. Bunun için, Nei (1987)'nin genetik uzaklık D (genetic distance D)'den yaygın olarak yararlanılmaktadır.

2.5. Populasyonun Genetik Yapılarının Protein Elektroforez Tekniği ile Belirlenmesi

Her gen özel bir görevle yüklü olup yapısında belirli enzimler için bilgi taşımaktadır. Genler etkileri bakımından (1) yapısal genler (2) kontrol genleri olarak iki ana gruba ayrılabilir. Yapısal genler hangi RNA ve proteinlerin üretileceğini, kontrol genleri de her bir özel safhadaki üretimin hızını belirlerler (Düzgüneş ve Ekingen 1983). Populasyonların genetik karakterizasyonunu ortaya koyan ve çok kolay izlenebilen birçok yapısal gen lokuslarını araştıran çalışmalar bulunmaktadır. Protein kodlayan genler içerisinde enzim kodlayan genler en kolay çalışılabilen sistemlerden biridir. Çünkü enzimler, ayırlama işlemine ihtiyaç duyulmaksızın uygun boyama teknikleri yardımıyla tanımlanabilmektedirler. Bu enzimler doku ve doku aralıklarının hemen hepsinde ve alyuvarlarda bulunmaktadır. Alyuvarlar bu enzimler yönüyle en basit ve en kolay elde edilebilen kaynaklardır. Literatür incelemeleri, insanlarda enzim kodlayan yaklaşık 104 lokusun çalışıldığı ve ancak 24 tanesinin polimorfik olduğunu göstermektedir (Harris ve Hopkinson 1976, Arıtürk 1983a, Arıtürk 1983b).

Bir populasyonda, bir lokusa ait iki veya daha fazla farklı allel olabilir. Bir canlının bir tek lokus ile ilgili olarak genotipik kompozisyonu (örneğin homozigot ya da heterozigot) elektroforetik tipleme ile elde edilebilir. Canlı gruplarından elde edilen bilgiler, incelenen lokusların allel frekanslarının hesaplanmasında kullanılabilir. Birçok lokusun allel frekanslarıyla sağlanan veriler o populasyonun genetik yapıları hakkında temel bilgi verir. Elde edilen bu veriler Hardy-Weinberg dengesi yönünden değerlendirilir. Yalnızca iki allel varlığında belirtilen Hardy-Weinberg yasası, populasyonda bir otozomal lokus için A'nın gen frekansı p ile, a'nın gen frekansı q ile gösterilirse ve doğal seleksiyon, genetik sürüklenme (genetik drift), göç, şans, mutasyon gibi evrimsel unsurları taşımayan ve rasgele seçilen populasyonun denge frekansı; AA için p^2 , Aa için $2pq$ ve aa için q^2 olan tek bir jenerasyon

modifikasyonlar, asetilasyonları, sülfidrillerin oksidasyonu, fosfat gruplarının ilavesi, karbonhidrat grupları ve farklı sayıdaki sialik asit rezidülerinin ilavesi veya ayrılması, proteolitik enzimler tarafından polipeptidin bir bölümünün koparılması ve agregasyon ya da polimerizasyonunu kapsayabilmektedir.

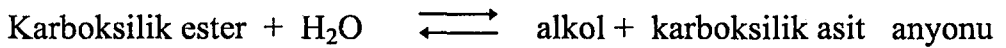
Sekunder modifikasyon enzim protein moleküllerine kısmen ya da farklı derecelerde etkir ya da bir seri basamaklardan geçerek karakteristik sekunder izoenzimler gözlenebilir.

Farklı doku hücrelerindeki sekunder izoenzim oluşumu, önemli derecede farklılık gösterebilir. Bu varyasyonlar, primer formun sentez oranına, sekunder formun oluşma oranına ve hücrenin yaşama süresine bağlı olabilmektedir (Harris ve Hopkinson 1976, Arıtürk 1983a, Gözükara 1997).

Bu çalışmada her biri farklı lokuslardan kodlanan 4 enzim çalışıldı. Bunların kataliz yolları ve izoenzimleri hakkında bilgi aşağıda sunulmuştur.

2.6.2. Esteraz D (Esterase D, ESD, EC 3. 1. 1. 1) enzimi

Aşağıdaki reaksiyon ESD enzimi tarafından katalizlenir:

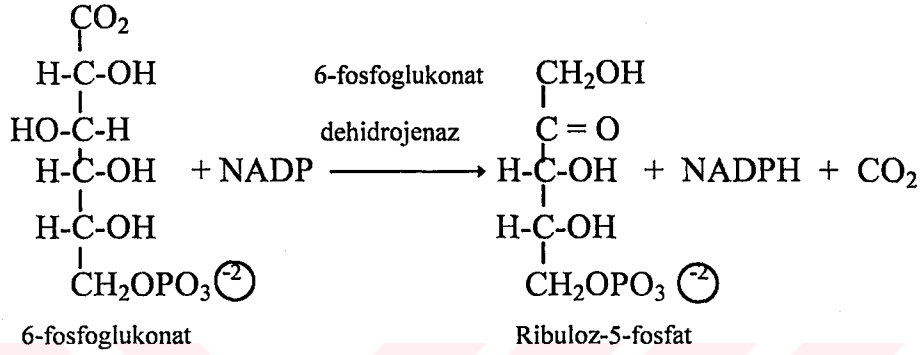


Dimerik bir enzim olan esteraz D izoenzimi ilk önce 1973 yılında Hopkinson tarafından identifiye edildi. Bu enzim bütün dokularda bulunur ve fluoregenic 4-methylumbelliferyl ve fluorescein esterlerini hidrolize edebilmeleri ile tanınırlar (Harris ve Hopkinson 1976).

Bu enzimi determine eden lokus, esteraz A, B, C izoenzimlerinin belirlenmesi ile ilgili lokuslardan bağımsız olduğu için ESD'nin genetik karakterizasyonu önem arzeder (Hopkinson ve ark 1973).

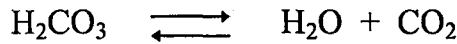
2.6.3. Fosfoglukonat dehidrojenaz (Phosphogluconat dehydrogenase, PGD, 6PGD, EC 1.1.1.44) enzimi

6-fosfoglukonat dehidrojenaz (6- PGD ya da PGD), 6 fosfoglukonatin ribuloz-5-fosfata oksidatif dekarboksilasyonunu katalizleyen dimerik bir enzimdir (Johnson 1974, McDermid ve ark 1975, Ersoy ve Bayşu 1986).

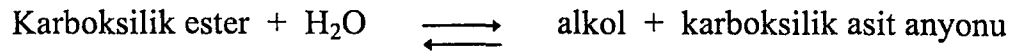


2.6.4. Karbonik anhidraz 1 (Carbonic anhidrase 1 , CA₁, EC 4.2.1.1) enzimi

Karbonat dehidrataz olarak da bilinen bu enzim aşağıdaki reaksiyonu katalizler:



Bu enzim bir esteraz gibi de etki göstererek aşağıdaki reaksiyon tipini katalizleyebilir.



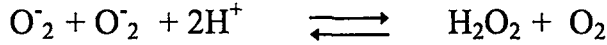
4-methylumbelliferyl acetat, CA₁ izoenzimleri ile çok hızlı hidrolize edilirken CA₂ ile oldukça yavaş hidrolize edilir. Oysa fluorescein diacetate (CA₂'nin boyanmasında kullanılır), CA₁ için kötü bir substrat iken CA₂ ile çok hızlı hidrolize edilir.

CA₁ ve CA₂ izoenzimleri olgun eritrosit lizatlarında çok aktiftirler. Fakat fetal eritrositlerde çok düşük aktiviteye sahiptirler. CA₁ izoenzimi

genellikle anodal olarak yürürken CA₂ izoenzimi katodal olarak yürür. Fakat genetiksel olarak determine edilen CA₁ ve CA₂'nin varyantları farklı elektroforetik mobilite ile gözlemlenebilmektedirler. CA₁ ve CA₂'nin her ikisi de monomeriktir (Harris ve Hopkinson 1976).

2.6.5. Süperoksit dismutaz (Superoxide dismutase, SOD, EC 1.15.1.1) enzimi

Bu enzim aşağıdaki reaksiyonu katalize eder:



Enzim bitki ve hayvan türlerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Enzimin esansiyel fonksiyonu, potansiyel iyonik oksijen toksisitesine karşı savunma mekanizması gibi etkimesidir. Bu enzim ayrıca tetrazolium oksidaz (tetrazolium oxidase) ya da indofenol oksidaz (indophenol oxidase) olarak da adlandırılır (McDermid ve ark 1975, Harris ve Hopkinson 1976).

2.7. Çalışmanın Amaçları

Bu çalışmada Türkiye'de bulunan ve önemi gittikçe artan, ülkemize özgü bir çoban köpeği olan Kangal Köpeklerinin genetik yapılarını belirlemek amacı ile:

a) Populasyon bireylerinin hepsinde dört farklı enzim (EsD, Pgd, Ca₁, Sod) lokusu çalışılarak araştırmak,

b) Bu enzim lokusları açısından populasyon içi ve populasyonlar arasındaki benzerlik veya farklılıkları ortaya koymak,

c) Populasyonların heterozigotluk derecelerini saptamak. Böylece ileride yapılabilecek genetik erozyonun önlenmesi ve saf yetiştirmenin kontrollü olarak yapılması çalışmalarına veri tabanı oluşturmak,

d) Kangal Köpeklerinin çevreye uyumu, döl verimi, yaşama gücü ve bazı hastalıklara hassasiyeti ile heterozigotluk derecesi arasındaki ilişkilerin araştırılabileceği çalışmalar için kaynak oluşturmak,

e) Kangal Köpeklerinin çalışılan lokuslar açısından diğer bazı köpek ırklarından farklı olup olmadıklarını belirlemektir.

Ayrıca bu çalışma ile:

a) Ülkemizdeki köpek ırklarının kendi aralarında ve diğer ülkelerdeki köpek ırkları arasındaki genetik yakınlığın veya uzaklığın karşılaştırmasını amaçlayan çalışmalara katkıda bulunmak,

b) Sunulan çalışma ile bu tekniğin laboratuvarımızda da yapılabilmesini sağlamaktır. Böylece laboratuvarımızda bu metodun çalışır hale getirilmesiyle, hayvancılığın yaygın olarak yapıldığı Konya ve çevresinde yetiştirilen diğer evcil ve ekonomik değeri olan hayvanların genetik ıslahı için moleküler düzeyde yapılabilecek araştırmalara başlangıç teşkil edilecektir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Ünitesi (SÜVAUÜ)'nde yetiştirilen 31, Bursa-Gemlik Askeri Veteriner Okulu ve Eğitim Merkez Komutanlığı (GAVOEMK)'nda yetiştirilen 34, Sivas-Kangal Kaymakamlığı Çiftliği (SKKÇ)'nde yetiştirilen 13, Sivas-Ulaş Tarım İşletmesi Çiftliği (SUTİMÇ)'nde yetiştirilen 17, Sivas'ın merkez ve köyleri (SMK)'nde yetiştirilen 13 Kangal Köpeği olmak üzere toplam 108 Kangal Köpeğinden kan örnekleri toplanmıştır. Tablo 3.1'de materyal olarak kullanılan Kangal Köpeklerinin yaş ve cinsiyetlerine göre dağılımı verilmiştir. Ayrıca 1-3 yaş arasında değişen 7 farklı köpek ırkından (Alman Kurt Köpeği (3), Boxer (6), Collie (1), Danua (1), Doberman (1), Pointer (7) ve Setter (2)) 21 kan örneği ve çalışılan tekniğin kontrolü amacıyla bir insan kan örneği toplanmıştır.

Tablo 3.1. Kangal Köpeklerinin yaş ve cinsiyete göre dağılımı

Y A Ş L A R I							
Yetiştirildiği Yer	Alınan Örnek Sayısı	Dişi Sayısı	Erkek Sayısı	10-12 Ay (Ort. 1 Yaş)	13-36 Ay (1-3 yaş)	37-72 Ay (3-6 yaş)	73 Ay sonrası (6 yaş ve daha büyükler)
SÜVFAUÜ	31	19	12	9	12	5	5
GAVOEMK	34	23	11	6	16	9	3
SKKÇ	13	8	5	1	4	7	1
SUTİMÇ	17	11	6	5	7	3	2
SMK	13	4	9	5	2	4	2
TOPLAM	108	65	43	26	41	28	13

3.2. Metotlar

3.2.1. Elektroforetik sistemde kullanılan metotlar

3.2.1.1. Elektroforez tekniği

Modern biyokimya analizleri içinde en önemli tekniklerden biri de elektroforezdir. Elektroforez ismi yunanca “electron” ve latince “phore” kelimelerinden meydana gelmiştir. 1907 yılında Field ve Teague tarafından çeşitli madde karışımlarından oluşan kısımların, elektriksel alanda farklı hızlara sahip oluşlarına dayanılarak ayrımlanması fikri tatbik edilmiştir. Bununla beraber 1937’de Teselius tarafından bildirilen tatbik şeklinden sonra elektroforez ilk olarak geniş bir kullanma sahası bulmuştur (Ersoy ve Bayşu 1981, Dayıoğlu ve Tüzemen 1989, Epstein ve Karcher 1994, Gözükara 1997).

Elektroforez biyolojik olarak önemli proteinlerin separasyonunda kullanılabilen fiziksel bir metottur. Amino asitler, peptidler, proteinler ve nükleik asitler gibi biyolojik önemi olan birçok molekül iyonize olabilen gruplara sahiptir (Williams ve Wilson 1979, Grunbaum ve Crim 1981, Donald ve Voet 1990).

Proteinler buldukları ortama göre, ya proton alırlar ya da proton verirler. Alkali ortamda negatif yüklü olmaları nedeniyle pozitif kutba, asit ortamda ise pozitif yüklü olmaları nedeniyle negatif kutba göç ederler. Böyle elektrik yüklü kolloid taneciklerinden meydana gelen bir solüsyona, doğru akım uygulandığında taneciklerin kendi yüklerinin aksi yöndeki kutba göç etmelerine elektroforez denir (Bingöl 1983, Devlin 1993, Vesterberg 1993, Epstein ve Karcher 1994, Gözükara 1997).

3.2.1.2. Nişasta jel elektroforezi ve güç kaynağı

Smithies tarafından 1955 yılında ortaya konulan nişasta-jel elektroforezi, enzim ya da proteinlerin separasyonu için büyük önem taşımaktadır (Geldermann 1970, Vesterberg 1993).

Jel elektroforezi, protein ayrışması metotları içerisinde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Genel prensibi diğer protein separasyonu elektroforetik sistemleri ile aynıdır ve enzim ya da proteinlerin kalıtsal yapıdaki polimorf özelliklerin, nişasta jeli ve doğru akım ile ayrıştırılması esasına dayanır. Protein elektroforezinde kullanılan kağıt, selüloz asetat ya da agaroz jeli ile albumin, α_1 , α_2 , β ve χ -globulinler gibi sadece 5 zon ortaya çıkarılmaktadır. Nişasta ya da poliakrilamid jel elektroforezi ile 20 ya da daha fazla fraksiyon ortaya çıkarılabilmektedir. Bu nedenle özellikle izoenzim ve genetik varyant çalışmalarında nişasta ya da poliakrilamid jel elektroforezi daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Nişasta jel plakasına yerleştirilen kan protein partikülleri değişik pH değerlerindeki eriyiklerde yapılarına göre farklı yük, şekil ve büyüklükte iyonlarına ayrılırlar. Elektriksel bir alanda bu iyonlar taşıdıkları elektrik yüklerine göre belli bir süratle anoda ya da katoda doğru göç ederler. Geliştirilen nişasta jel elektroforez tekniği diğer birkaç zon elektroforez tipine göre daha iyi ayırılma sağlamaktadır. Enzim proteinleri yürütme ortamı tamponunun pH'sına göre negatif ya da pozitif net yükü taşıyabilmektedirler. Belirli bir pH'daki bu net yük, aspartik ve glutamik rezidüleri tarafından verilen serbest karboksil gruplarının iyonizasyonuna, histidin rezidülerinin imadözollerine ve arjinin ve lizin rezidüleri tarafından verilen serbest amino gruplarının iyonizasyonuna bağlıdır. Örneğin pH 6,4'de aspartik ve glutamik asit negatif (-) yükle yüklüdürler ve anoda göç ederlerken arjinin, lizin ve histidin gibi bazı amino asitler pozitif (+) yükle yüklüdürler ve katoda göçerler. Yürümenin hızı, enzim molekülündeki net yükün büyüklüğü, ortam ısı ve uygulanan akım şiddeti ile ilişkilidir. Göçme hızı molekül ağırlığına da bağlıdır ve küçük moleküller daha hızlı, büyük

moleküller daha yavaş göç ederler. Bununla birlikte benzer yüklü moleküllerin moleküler ağırlıklarındaki kalıtsal farklılıklardan dolayı yük/ağırlık oranı farklı olacaktır. Elektriksel alanda negatif yüklü moleküller pozitif elektroda (anoda) doğru yürürken, pozitif yüklü moleküller negatif elektroda (katoda) doğru yürürler. (Poulik 1957, Harris ve Hopkinson 1976, Bayşu 1979, Williams ve Wilson 1979, Ersoy ve Bayşu 1981, Bohinski 1987, Donald ve Voet 1990, TSE 1991, Kaman 1992, Tüzün 1992, Devlin 1993, Vesterberg 1993, Epstein ve Karcher 1994).

Elektroforezde bir karışımda bulunan çeşitli protein fraksiyonları birbirinden farklı hızlarla kutuplara göç ederler ve bu suretle birbirinden ayrılırlar. Bu amaçla geliştirilmiş çeşitli elektroforez cihazları vardır (Bayşu 1979). Elektroforez cihazının vertikal (dikey) ve horizontal (yatay) olmak üzere iki farklı sistemi vardır. Vertikal sistem 1968 yılında Shaw ve Koen, horizontal sistem ise 1964 yılında Beckman ve Johnson tarafından ortaya konulmuştur (Shaw ve Prasad 1970). Son 30 yıl içerisinde bazı elektroforetik metotlar analitik kimyada, biyokimyada ve biyoloji bilimlerinde çok hızlı gelişme göstermiştir. Bugün biyokimyada yayımlanan bilimsel yayınların yarısından fazlası elektroforetik metotların uygulanması ile gerçekleştirilmektedir (Vesterberg 1993).

Çalışmada horizontal nişasta-jel elektroforez tekniği uygulanmıştır. Bu sistem güç kaynağı, elektrot tankı, elektrotlar ve soğutucu sistem (Termostatik Sirkülatör)'den oluşmaktadır. Ayrıca ultraviyole (UV) lamba (UVİS Desega), jel kalıpları, aplikatör ve diğer gereçlerden de yararlanılmıştır.

Elektroforez işleminde doğru akım, güç kaynağı ile sağlandı. Enzimlerin elektroforez esnasında jelde bozulmadan yürütülebilmesi için termostatik sirkülatör'den yararlanıldı.

3.2.1.3. Kullanılan tamponlar

Enzim elektroforezi için çok sayıda tampon kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan tamponlar Fosfat, Tris; EDTA, Borat, Sitrat, Pridin, Asetat vd. tamponlarıdır (Williams ve Wilson 1979, Epstein ve Karcher 1994). Tamponun temel fonksiyonu, elektroforez süresince pH değişikliklerini önlemektir. Bu değişiklik kullanılan voltaja, devrede üretilen akıma ve elektroforez süresince harcanan zamana bağlıdır. Bu nedenle ideal bir tampon, istenilen pH'ya yakın bir pK değerinde olmalıdır. Aslında her uygulama için taze tampon solüsyonu hazırlanmalıdır. Ancak pratikte bu tamponlar 5 kez kullanılabilir. Bu çalışmada tamponlar, her uygulamadan sonra pH'sı ayarlanarak 4 kez kullanıldı.

Uygulama süresince Grunbaum ve Crim(1981) ile Harris ve Hopkinson (1976) tarafından belirtilen metotlar kullanıldı. Harris ve Hopkinson'un tekniği, Seixas ve ark (1988) tarafından insan ve köpeklerde enzim elektroforezi ile kontrol edilmiş ve bu tekniğin köpeklerde de rahatlıkla kullanılabileceği bildirilmiştir.

ESD ve PGD için önerilen tamponlar 0.1 M Tris, 0.1 M Maleic acid, 0.0087 M Na₂EDTA ve 0.01 M MgCl₂.6 H₂O ile hazırlanan Tris-Maleic acid tamponudur ve pH'sı 5 N NaOH ile 7.4'e ayarlanarak +4°C'de saklandı. Bu tampon, PGD için elektrot tamponu olarak aynen, 1 : 15 dilüsyonu ise jel tamponu olarak kullanıldı. ESD için bu tamponun 1:10 dilüsyonu hem elektrot tamponu hem de jel tamponu olarak kullanıldı.

Karbonik anhidraz 1 için kullanılan tampon ise 0.3 M Tris, 0.166 M Borat ve 0.0066 M EDTA ile hazırlanan Tris / EDTA /Borat tamponudur, pH 8.6. Bu stok tampon solüsyonu +4°C'de saklandı ve tamponun 1 : 14 dilüsyonu tank tamponu, 1 : 35 dilüsyonu jel tamponu olarak kullanıldı.

SOD enzimi için 0.0786 M KH_2PO_4 ve 0.0207 M Na_2HPO_4 'dan hazırlanan ve 0.1 M fosfat pH 6.5 tamponu olarak adlandırılan farklı bir tampon kullanılmıştır. Bu tampon Harris ve Hopkinson (1976) tarafından belirtildiği gibi hazırlandı. Ancak pH 6.5 olarak modifiye edildi. pH'sı ayarlandıktan sonra $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanan bu tampon elektrot tamponu olarak kullanılırken, jel tamponu için ise bunun 1 : 10 dilüsyonu kullanıldı.

Enzimlerinin boyanmasında 3 tampon kullanıldı:

ESD ve CA_1 enzimlerinin boyanmasında 0.1 M fosfat tamponu pH 6.5 kullanıldı. Bu tampon SOD enzimi için kullanılan tank tamponu gibi hazırlandı.

PGD enziminin boyanmasında ise 0.1 M Tris-HCl tamponu kullanıldı. Bu tamponun pH'sı HCl ile 8'e ayarlandı.

SOD enziminin boyanmasında kullanılan 0.06 M Tris-HCl tamponunun pH'sı 8'e HCl ile ayarlandı.

3.2.1.4. Nişasta jelinin hazırlanışı

Nişasta jelleri, hidrolize nişasta uygun bir tampon içerisinde ısıtılarak hazırlandı. Sonra soğutuldu. Böylece moleküller arasında yan bağların kurulmasıyla yarı katı jel elde edildi. Nişasta jeli, gözeneklerinin büyüklüğüne göre % 2 (w/v) ya da % 8-15 (w/v) arasında hazırlanabilmektedir. Bununla birlikte nişasta jelinin por büyüklüğü net olarak bilinmemektedir (Williams ve Wilson 1979).

Bu çalışmada nişasta jeli, hidrolize nişasta ile % 8 (w/v)'lik olarak hazırlandı. Bunun için 14 g nişasta tartılarak üç erlene konuldu. Üzerine 175 ml jel tamponu ilave edilerek karıştırıldı. Süspansiyon dairesel hareketlerle çalkalanarak ısıtıldı. Bu işleme, nişasta saydam, berrak ve jel kıvamına gelinceye kadar devam edildi. Isıtma sırasında meydana gelen gaz ve hava

kabarcıkları su trompundan yararlanılarak uzaklaştırıldı. Sonra sıcak jel, düzgün bir yüzeyde önceden cam üzerine hazırlanan 13x20x0.6 cm boyutlarındaki jel kalıbına döküldü. 15-20 dakika kadar oda ısısında ve 50-60 dakika kadar da +4 °C'de bekletilerek jelin istenilen kıvamda sertleşmesi sağlandı.

3.2.1.5. Kan örneklerinin hazırlanması

Yaş ve cinsiyeti tespit edilen hayvanlardan kan örnekleri EDTA'lı tüplere vena cephalica antebrachii veya vena saphena parva'nın ramus dorsalis'inden tekniğine uygun olarak alındı. Oda ısısında 10 dakika süre ile 3000 rpm'de santrifüj edildi. Plazma ve akyuvarlar pastör pipeti ile uzaklaştırıldı. Akyuvarlar distile su ile 3 defa yıkandı ve her aşamada santrifüj ile ayrımlandı. Daha sonra örnekler -20 °C'de derin dondurucuda bekletildi ve bu materyal çözündürüldükten sonra elektroforez için kullanıldı.

3.2.1.6. Elektroforez işlemi

Nişasta jeli hazırlandıktan sonra jelde aplikatör ile enine yarıklar oluşturuldu. Küçük dikdörtgen biçimindeki kağıtlara (0,2x0,3 cm) (Whatman Grade 17) hemolizat örnekleri emdirilerek, ince uçlu pens yardımıyla yarıklara yüklendi. Her kağıt şeridinin jel yarığına iyice yerleşip yerleşmediği kontrol edildi. Oluşturulan yarıklardan birinci yarığına bromofenol blue yüklendi. Bu boya, proteinden biraz daha hızlı yürüdüğünden ve boyanın yürümesi gözle görülebildiğinden elektroforez işlemi esnasında yürümenin olduğu ya da proteinlerin ne kadar yürüdüğüne göstergesini oluşturmaktadır.

Çerçeve içindeki örneklerle yüklü jel, elektroforez tankı (Pharmacia LKB)'nin soğutma tablasına yerleştirildi. Önceden tanka dökülen elektrot tamponu ile jel arasındaki bağlantı Whatman (Grade 3) kağıdı ile kuruldu. Elektroforetik yürütmeler + 4 °C'de yapıldı. Bu soğutma işlemi için termostatik sirkülasyon kullanıldı (bu soğutma cihazı "Heterofig Cb II'nin

analoğu olarak Konya'da KARİPEK A.Ş.'ye yaptırılmıştır). Güç kaynağı (Pharmacia Electrophoresis Power Supply-EPS 600) ile doğru akım uygulandı. Sistem resmi 3.1.'de gösterilmiştir. Her enzim için uygulanan elektroforez şartları tablo 3.2.'de verilmiştir.



Resim 3.1. Elektroforez sistemi

Tablo 3.2. Enzimlerin elektroforez şartları

Enzimler	Elektroforez süresi (saat)	Tampon	Voltaj (v)
Esteraz D (ESD)	5 ⁰⁰	Tris-maleik asit pH 7.4	150
Fosfoglukonat dehidrojenaz (PGD)	4 ³⁰	Tris-maleik asit pH 7.4	165
Karbonik Anhidraz I (CA ₁)	3 ²⁰	Tris/EDTA/Borat pH 8.6	180
Süperoksit dismutaz (SOD)	7 ⁰⁰	Fosfat Tamponu pH 6.5	90

3.2.2. Enzimleri boyama metotları

Değişik tekniklerle separe edilen jeldeki protein bantları farklı boyamalarla görsel olarak gözlemlenebilmektedir (Donald ve Voet 1990, Epstein ve Karcher 1994, Gözükara 1997). Bu amaçla enzim aktivitesi değişik yollarla ortaya çıkarılabilmektedir. Boyama metotları 6 ana başlıkta incelenebilir:

- a) Kromojenik (Chromogenic) boyama metotları
- b) Fluorojenik (Fluorogenic) boyama metotları
- c) Radyoaktif (Radioactive) boyama metotları
- d) Kimyasal (Chemical) boyama metotları
- e) Elektron transfer boya boyama metotları
- f) Enzim bağlama (Enzyme-linked) boyama metotları

Bu araştırmada, fluorojenik boyama metodu ve elektron transfer boya boyama metodu olarak adlandırılan 2 metot kullanıldı. Fluorojenik boyama metodu ESD ve CA₁ enzim bantlarının, elektron transfer boya boyama metodu ise SOD ve PGD enzim bantlarının ortaya çıkarılmasında kullanıldı.

3.2.2.1. Fluorojenik boyama metotları

Bu metotlar, non-flüoresan (non-fluorescent) substrat üzerine enzim etkisi ile flüoresan ürünün oluşması (bu nedenle pozitif flüoresan boyama olarak adlandırılır) ya da flüoresan substrattan non-flüoresan ürünün oluşmasına (bu nedenle negatif flüoresan boyama olarak adlandırılır) bağlıdır. Esteraz D ve CA₁ enzimlerinin boyanması pozitif bir boyamadır. Substrat olarak kullanılan 4-methylumbelliferon deriveleri pozitif flüoresan boyama tekniğinde son derece duyarlı ve özellikle değerli olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Esteraz D ve karbonik anhidraz 1 boyamasında 4-methylumbelliferyl acetate (MUA) türevi kullanıldı (Harris ve Hopkinson 1976)

3.2.2.1.A. ESD enzimi boyama metodu

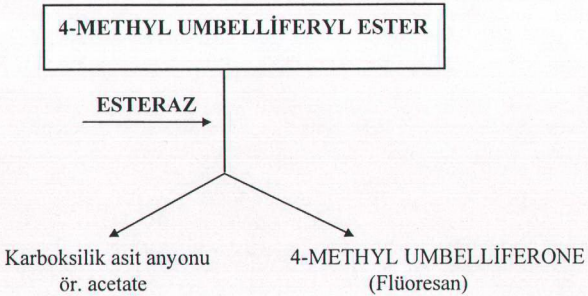
50 ml 0.1 M fosfat tamponu pH 6.5

22 mg 4- methylumbelliferyl acetate (MUA)

250 mg agar noble

2 ml aseton

MUA 2 ml aseton içinde çözdürüldü. Agar noble 0.1 M fosfat tamponu içinde hafif kaynatılarak eritildi. Agar çözeltisi çeşme suyu altında soğutulduktan sonra iki çözelti karıştırıldı ve elektroforez işlemi tamamlanan jel üzerine döküldü. 37 °C'deki etüvde 10-20 dakika bekletildi. Bantlar ultraviyole (UV) lambada 366 nm dalga boyunda gözlemlendi. Yukarıdaki karışımlar elektroforez yapıldığı gün taze olarak hazırlandı. Boyama sistemi şekil 3.1.'de gösterilmiştir (Harris ve Hopkinson 1976).



Şekil 3.1. ESD'nin boyama sistemi

3.2.2.1.B. CA₁ enzimi boyama metodu

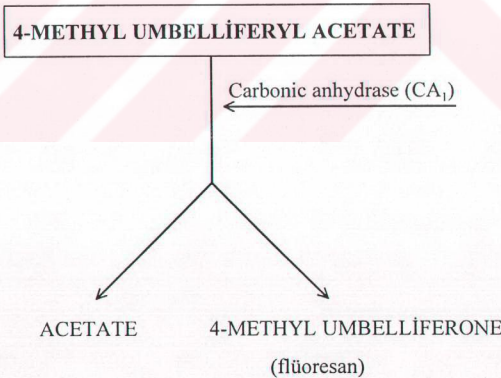
50 ml 0.1 M fosfat tamponu pH 6.5

20 mg 4-methylumbelliferyl acetat (MUA)

200 mg agar noble

2 ml aseton

2 ml aseton içinde MUA çözündürüldü. Agar noble 0.1 M fosfat tamponu içinde hafif kaynatılarak eritildi. Agar çözeltisi çeşme suyu altında soğutulduktan sonra iki çözelti karıştırıldı ve elektroforez işlemi sona eren jel üzerine döküldü. 37 °C'deki etüvde 10-15 dakika bekletildi. Bantlar ultraviyole lambada 366 nm dalga boyunda gözlemlendi. Burada kullanılan çözeltiler elektroforezin yapıldığı gün taze olarak hazırlandı. CA₁'in boyama sistemi şekil 3.2'de gösterildi.



Şekil 3.2. CA₁'in boyama sistemi.

3.2.2.2. Elektron transfer boya boyama metotları

Elektron transfer boyaları, elektroforez sonrası izoenzim bantlarının ortaya çıkarılmasında çok yaygın olarak kullanılan boyalardır.

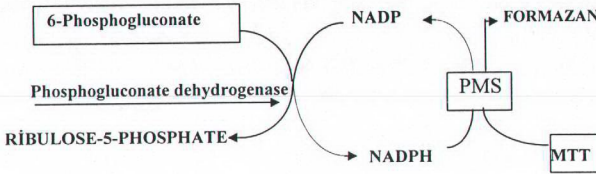
Methylthiazolyl tetrazolium (MTT), dehidrojenaz reaksiyonlarında bir elektron alıcısıdır. MTT bu reaksiyonda elektron donörleri tarafından koyu mavi-mor renkte ve suda çözünmeyen bir bileşik formu olan formazana indirgenir. Reaksiyon, katalizör olarak etkiyen phenazine methosulfate (PMS) varlığında çok hızlı gerçekleşir. Bu iki kimyasal (MTT ve PMS), NAD ve NADP koenzimlerinin indirgenmiş formlarının oluşmasına neden olan reaksiyonların ortaya çıkarılması için standart bileşiklerdir. Bu sisteme dışardan substratın katılması ile, ortamdaki enzim (ya da izoenzim) ile substrat arasında reaksiyon gerçekleşmekte ve bantların gözlenmesi görsel olarak yapılabilmektedir. Burada dikkat edilecek nokta MTT ve PMS boya karışımları asit ya da nötral şartlarda çok daha dayanıklı olduklarından kuvvetli alkalik boya tamponundan veya jel tamponundan yararlanılmamalıdır. Bu karışımlar ışığa duyarlı olduklarından karanlıkta inkübe edilirler (Brewer 1967, Harris ve Hopkinson 1976).

3.2.2.2.A. PGD enzimi boyama metodu

50 ml	0.1 M	Tris-HCl tamponu pH 8.0
150 mg	MgCl ₂	.6H ₂ O
10 mg	6-phosphogluconic acid	
8 mg	NADP	
5 mg	MTT	
5 mg	PMS	
200 mg	agar noble	

6-phosphogluconic acid, NADP, MTT ve PMS 15-20 ml 0.1 M Tris-HCl tamponu içerisinde çözündürülür. Geriye kalan Tris-HCl tamponu da agar noblenin hafif kaynatılarak eritilmesinde kullanılır. Agar çeşme suyu altında soğutulduktan sonra iki çözelti karıştırılarak jel üzerine dökülür. 37 °C'de 30-

40 dakika inkübe edilir ve uygun bir ışık altında bantlar gözlemlenir. PGD'nin boyama sistemi şekil 3.3.'de gösterilmiştir (Harris ve Hopkinson 1976).



Şekil 3.3. PGD'in boyama sistemi.

3.2.2.2.B. SOD enzimi boyama metodu

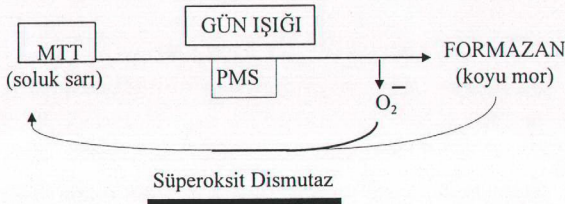
50 ml 0.06 M Tris-HCl tamponu pH 8.0

6 mg MTT

6 mg PMS

250 mg agar noble

MTT ve PMS 15-20 ml Tris-HCl tamponu içerisinde çözündürülür. Geriye kalan Tris-HCl tamponu ile de agar noble hafif kaynatılarak eritilir. Çeşme suyunda soğutulduktan sonra çözeltiler karıştırılır ve elektroforez sonrası jel üzerine dökülür. Birkaç dakika ışığa maruz bırakılır ve daha sonra 37 °C'de 20-25 dakika inkübe edilir. Bantlar uygun bir ışık ortamında gözlemlenir. Bu enzimin boyama sistemi şekil 3.4.'de gösterilmiştir (Harris ve Hopkinson 1976).



Şekil 3.4. SOD'in boyama sistemi

Çalışılan enzimlerinin boyama şartları ve boyama komponentleri tablo 3.3.'de verilmiştir.

Tablo 3.3. Enzimlerinin boyama şartları ve boyama komponentleri

Enzim	Boyama Süresi (dk)	İnkübasyon Isısı (°C)	Boyama Tamponu (50 ml)	Boya Komponentleri	Bantların Gözlemlenmesi
ESD	10 - 20	37	Fosfat tamponu pH 6.5	22 mg MUA 250 mg Agar noble 2 ml Aseton	Ultraviyole lambada
PGD	30-40	37	Tris-HCl pH 8.0	150 mg MgCl ₂ .6H ₂ O 10 mg 6-Phosfogluconic acid 8 mg NADP 5 mg MTT 5 mg PMS 200 mg Agar noble	Uygun bir ışık ortamında
CA ₁	10-15	37	Fosfat tamponu pH 6.5	20 mg MUA 200 mg Agar noble 2 ml aseton	Ultraviyole lambada
SOD	20 -25	37	Tris-HCl pH 8.0	6 mg MTT 6 mg PMS 250 mg Agar noble	Uygun bir ışık ortamında

2.3.3. Biyoistatistiksel analiz

Bir otozomal gen lokusu için 2 allelin varlığında allel frekansların hesaplanması için aşağıdaki formüller kullanılmıştır:

$$\text{Allel Frekans} = \frac{(2 \times \text{homozigot sayısı}) + (\text{heterozigot sayısı})}{2 \times \text{Genotip sayısı}}$$

(P)

$$q = 1 - P$$

Her allel için allel frekansların hesaplanmasından sonra Hardy-Weinberg denge frekansları (p^2 , $2pq$, q^2) hesaplandı. Bunun için N sayıdaki bir popülasyonda:

Beklenen homozigot birey sayısı = $p^2 \times N$

Beklenen heterozigot birey sayısı = $2pq \times N$

Beklenen ve gözlenen birey sayıları arasındaki farklar X^2 istatistiğinin saptanması için kullanıldı.

$$X^2 = \sum \frac{(N_B - N_G)^2}{N_B}$$

Bu formülde:

N_B = Beklenen Homozigotluk (veya Heterozigotluk)

N_G = Gözlenen Homozigotluk (veya Heterozigotluk)

X^2 = Toplam Khi-Kare değeri

X^2 istatistiği daha sonra popülasyonun dengede olup olmadığını bulmak için uyumda iyilik (Goodness of fit test) testi (Rohlf and Sokal 1981) çerçevesinde değerlendirildi.

Popülasyonlar için beklenen ortalama heterozigotluk dereceleri (Ayala 1982, Nei 1987) aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$$H = \frac{1}{n} \sum_i [1 - (a_i^2 + b_i^2)]$$

H = Beklenen ortalama heterozigotluk

n = Toplam lokus sayısı

a_i = Popülasyondaki i'nci lokusun allel frekanslarından birincisi

b_i = Popülasyondaki i'nci lokusun allel frekanslarından ikincisi

Populasyonlar arası genetik uzaklık derecesinin hesaplanmasında Nei'nin genetik uzaklık "D" (genetic distance D) standardı kullanıldı (Ayala 1982).

$$\text{Genetik uzaklık belirlenmesi için: } I = \frac{\sum a_i b_i}{\sqrt{\sum a_i^2 \sum b_i^2}}$$

$$D = -\ln I$$

Bu formüldeki sembollerin anlamı aşağıda verilmiştir:

a_j = Populasyonların birinci allel frekansları

b_j = Populasyonların ikinci allel frekansları

I = Genetik yakınlık

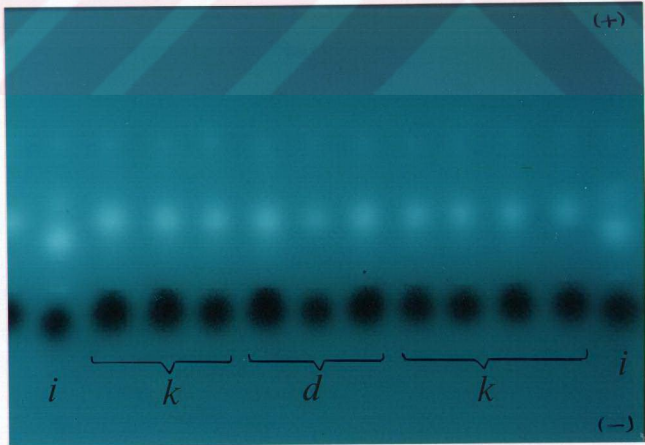
D = Genetik uzaklık

4. BULGULAR

Bu çalışma Türkiye’de bulunan ve önemi gittikçe artan, ülkemize özgü bir çoban köpeği olan Kangal Köpeklerinin genetik yapılarını belirlemek amacıyla 4 farklı enzim (*EsD*, *Pgd*, *Ca*, *Sod*) lokusu populasyon bireylerinin hepsinde nişasta jel elektroforez tekniği ile çalışılmıştır. Ayrıca her enzim için insan örneğinin ve bazı köpek ırkları örneklerinin (Alman Kurt Köpeği, Boxer, Collie, Danua, Doberman, Pointer, Setter) de elektroforezi gerçekleştirilmiştir.

4.1. Esteraz D (ESD) Enzimi

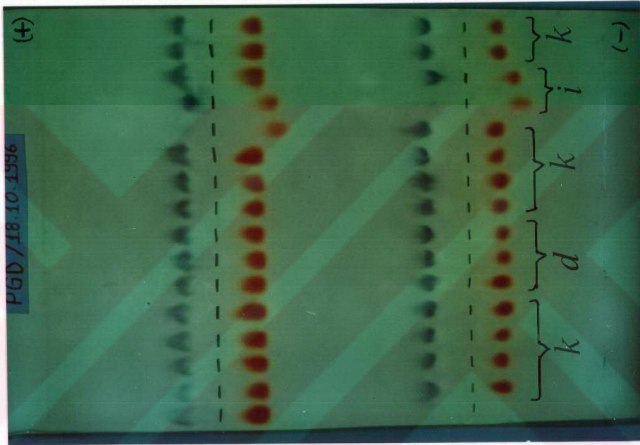
Bu enzim dimerik bir enzimidir. Elektroforetik incelemeler sonucu Kangal populasyonlarının tümünde ve diğer köpek ırklarında aynı hızda ve anodal çift bant olarak ve alttaki bant keskin, üstteki bant ise silik olarak gözlemlendi (Resim 4.1.). Bu durum, *EsD*’nin 2 lokus ve her lokusta birer allel ile determine edildiğini ve bu enzim lokusu yönü ile Kangal populasyonlarının monomorfik olduklarını göstermektedir. İnsan örneğinde bu enzim anodal 3 bant ile heterozigot olarak gözlemlendi.



Resim 4.1. ESD enziminin nişasta jel elektroforez sonrası gözlenen bantları, k : Kangal Köpeği, d : Diğer köpek ırkları, i : İnsan.

4.2. Fosfoglukonat Dehidrojenaz (PGD, 6PGD) Enzimi

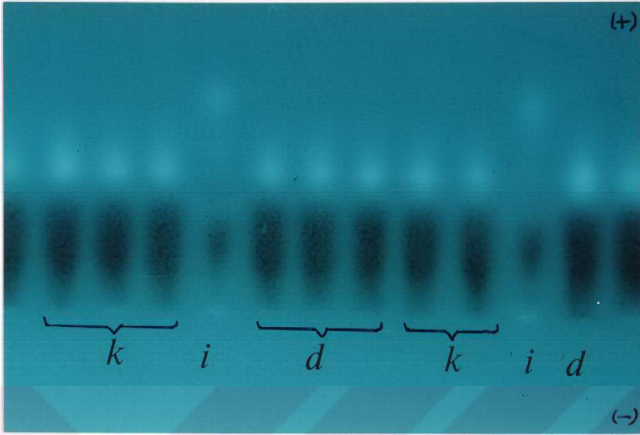
Dimerik bir enzim olan fosfoglukonat dehidrojenaz, elektroforez sonrası bütün Kangal Köpeği populasyonlarında ve diğer köpek ırklarında aynı hizada anodal tek bant olarak gözlemlendi (Resim 4.2.). Populasyonların hepsinde monomorfik olarak gözlemlenen bu enzim, bir lokus ve bir allel tarafından determine edilmektedir. İnsan PGD enzim bandı da anodal tek bant olarak ve Kangal bantlarının gerisinde olduğu görülmüştür.



Resim 4.2. PGD enziminin nişasta jel elektroforez sonrası gözlenen bantları, k : Kangal Köpeği, d : Diğer köpek ırkları, i : İnsan.

4.3. Karbonik Anhidraz 1 (CA₁) Enzimi

Karbonik anhidraz 1 monomerik bir enzimidir. Bu enzim elektroforetik analiz sonrası, Kangal populasyonu bireylerinin hepsinde ve diğer köpek ırklarında aynı hizada anodal tek bant olarak gözlemlendi (Resim 4.3.). CA₁, 1 lokusta 1 allel ile determine edilmektedir ve Kangal Köpekleri bu lokus yönü ile monomorfiktirler. İnsan CA₁ bandı anodal tek bant olarak ve Kangal bandının önünde olduğu görülmüştür.

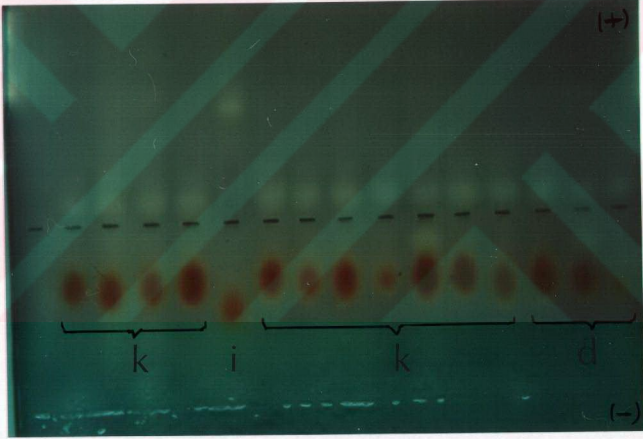


Resim 4.3. CA₁ enziminin nişasta jel elektroforez sonrası gözlenen bantları, k : Kangal Köpeği, d : Diğer köpek ırkları, i : İnsan.

4.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzimi

Kangal Köpeklerinin süperoksit dismutaz enzim lokusunda GAVOEMK popülasyonu hariç diğer tüm popülasyonlarda polimorfizm görülmüştür. *Sod* bir otozomal lokusta A ve B olmak üzere 2 kodominat allel tarafından determine edilmektedir. Popülasyonlara göre beklenen ve gözlenen genotipleri ve allel frekansları, Hardy-Weinberg denge durumuna uygunlukları için elde edilen Khi-Kare değerleri (X^2) tablo 4.4.1.'de gösterilmiştir. SOD enzimi homozigotlarda (AA) anodal 1 bant, heterozigotlarda (AB) biri anodal diğeri katodal iki bant olarak gözlemlenmiştir (Resim 4.4.). GAVOEMK popülasyon bireylerinin hepsi homozigot (AA) ve anodal tek bant olarak belirlenmiştir. Bu gözlem, GAVOEMK popülasyonunda A alleli frekansının "1", B alleli frekansının "0" olduğu sonucunu vermektedir.

Polimorfizm gözlenen populasyonların hepsi Hardy-Weinberg dengesinde bulunmuştur. Kangal populasyonları için gözlenen ve beklenen heterozigot birey sayısı ve populasyonlar için beklenen ortalama heterozigotluk (H) derecesi tablo 4.4.2.'de verilmiştir. Bu verilere göre en düşük ortalama heterozigotluğun GAVOEMK populasyonunda, en yüksek ortalama heterozigotluğun ise SUTİMÇ populasyonunda olduğu görülmüştür. Ayrıca bu enzim insanda anodal tek bant ve Kangal bantlarından 2-3 kat önde olduğu gözlemlenmiştir. Çalışılan diğer köpek ırklarının bazılarında da aynı iki allelin varlığı gözlenmiş ve 6 Boxer'den ikisi, 3 Alman Kurt Köpeklerinden biri *Sod* enzim lokusu yönünden heterozigot (AB), bunların dışındaki köpeklerin ise tamamen homozigot (AA) oldukları belirlenmiştir.



Resim 4.4. SOD enziminin nişasta jel elektroferez sonrası gözlenen bantları, k : Kangal Köpeği, d : Diğer köpek ırkları, i : İnsan.

Kangal populasyonlarının allel frekanslarının farklı olması (A için 1.000-0.882, B için 0.000-0.118), populasyonlar arası farklılıkların olduğunu ortaya çıkarmıştır. Populasyonlar arası farklılıkların Nei'nin uzaklık (D) ve yakınlık (I) ölçütleri cinsinden değerleri tablo 4.4.3'de verilmiştir.

Tablo 4.4.1. *Sod* enziminin bölgelere göre gözlenen ve beklenen genotipleri ve allel frekansları, Hardy-Weinberg denge durumuna uygunlukları için elde edilen Khi-kare değerleri

Yetiştirildiği Yer	Köpek Sayısı (N)	Genotipler						Alleller		Khi-Kare değerleri* (x ²)
		AA		AB		BB		A	B	
		N Gözlenen	N Beklenen	N Gözlenen	N Beklenen	N Gözlenen	N Beklenen	allelinin frekansı	allelinin frekansı	
SÜVFAUÜ	31	27	27.101	4	3.768	0	0.131	0.935	0.065	0.146
SKKÇ	13	12	12.031	1	0.950	0	0.019	0.962	0.038	0.022
SUTİMÇ	17	13	13.225	4	3.539	0	0.237	0.882	0.118	0.271
SMK	13	11	11.075	2	1.848	0	0.077	0.923	0.077	0.090
GAVOEMK	34	34	34	0	0.000	0	0.000	1.000	0.000	0
Toplam	108	97	97.265	11	10.454	0	0.281	0.949	0.051	0.310

* : (p > 0.05).

AA : *Sod* için homozigot genotipli birey

BB : *Sod* için homozigot genotipli birey

AB : *Sod* için heterozigot genotipli birey

Tablo 4.4.2. Bölgelere göre gözlenen heterozigot birey sayısı ve beklenen ortalama heterozigotluk (H) dereceleri

Yetiştirildiği Yer	Köpek Sayısı	Gözlenen Heterozigot Birey Sayısı (Sod İçin)	Beklenen Heterozigot Birey Sayısı (Sod için)	Beklenen Ortalama Heterozigotluk (H)
SÜVFAUÜ	31	4	3.768	0.0243
SKKÇ	13	1	0.950	0.0146
SUTİMÇ	17	4	3.539	0.0416
SMK	13	2	1.848	0.0284
GAVOEMK	34	0	0.000	0.0000

Tablo 4.4.3. Populasyonlar arası genetik uzaklık ve yakınlık değerlerini gösteren matris

Yetiştirildiği Yer	SÜVFAUÜ	SKKÇ	SUTİMÇ	SMK	GAVOEMK
SÜVFAUÜ	*****	0.0004	0.0020	0.0001	0.0024
SKKÇ	0.9996	*****	0.0044	0.0010	0.0008
SUTİMÇ	0.9980	0.9956	*****	0.0012	0.0088
SMK	0.9999	0.9990	0.9988	*****	0.0035
GAVOEMK	0.9976	0.9992	0.9912	0.9965	*****

Not : Tabloda; üst yarımda populasyonlar arası genetik uzaklık, alt yarımda ise populasyonlar arası genetik yakınlık değerleri verilmiştir

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Köpeklerde alyuvar enzim polimorfizmi kullanılarak yapılan genetik çalışmaların sayıları giderek artmaktadır. Fakat diğer evcil hayvanlara nazaran her zaman geride kalmıştır (Braend ve Andersen 1987, Seixas ve ark 1988). Bunun başlıca sebepleri polimorfizmin ortaya çıkarılmasında karşılaşılan zorluklardır. Bu zorluklar, köpeklerdeki teknik ve örneklendirme problemleri olarak ortaya çıkmaktadır (Seixas ve ark 1988).

Köpeğin genetik yapısının araştırılması ve morfolojik özellikler ile genetik ilişkisinin kurulması çok yararlı olacaktır. Farklı ırklardaki köpeklerin genetik kompozisyonunun elektroforez teknikleriyle belirleme çalışmaları yapılmaktadır. Ancak bugüne kadar çözümlenmemiş problemler, değişik ırk örneklerinin analizi ile giderilebilir. O halde büyük köpek ırklarının, hatta cinslerinin araştırılmaları ile önemli ilerlemeler kaydedilebilecektir (Seixas ve ark 1988).

Bu çalışmada, analiz edilen enzimlerden; süperoksit dismutaz (Baur ve Schorr 1969, Meera ve ark 1973, Weiden ve ark 1974, Simonsen 1976, Gerard ve ark 1987) ve esteraz (Braend 1984, Braend 1985, Braend ve Andersen 1987, Seixas ve ark 1988)'nin en çok çalışılan polimorfik lokuslardan biri olması, Esteraz D'yi determine eden lokusun diğer esteraz A, B, C izoenzimlerinin belirlenmesi ile ilgili lokuslardan bağımsız olması nedeniyle genetik karakterizasyonunun önemli olması (Hopkison ve ark 1973), fosfoglukonat dehidrojenaz'ın çok nadir varyasyon gösteren lokus olduğunun (Seixas ve ark 1988) aktarılması ve karbonik anhidraz'ın ise alyuvarlar için önemli bir enzim olması ve köpeklerde çok az çalışılmış olması nedeniyle seçilmiş ve bu enzimler SÜVFAUÜ, GAVOEMK, SKKÇ, SUTİMÇ, SMK olmak üzere 5 ayrı populasyon örneklerinin hepsinde nişasta jel elektroforez tekniği ile analiz edilmiştir.

Araştırma süresince Grunbaum ve Crim(1981) ile Harris ve Hopkinson (1976) tarafından belirtilen metotlar takip edilmiştir.

Seixas ve ark (1988), Harris ve Hopkinson'un insan kanındaki enzimlerin elektroforetik incelemelerinde kullandıkları tekniklerin, köpeklerde de direkt olarak uygulanabilirliğinin kontrol edilmesi ve daha iyi sonuçlara ulaşabilmek amacıyla teknikte gerekli yeni değişikliklerin yapılması ve kullanılabilmesi olanaklarını araştırmışlardır. Alyuvar enzimlerinin birçoğunun belirlenmesinde kullanılan tekniklerin, köpeklerde de insanlardaki gibi yararlı bir şekilde kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır. Sunulan çalışmada da Kangal Köpeklerinde çalışılan her enzim için, insan örneğinin de aynı jellerde elektroforezi gerçekleştirilmiş ve insan örneğinin bantları, Harris ve Hopkinson (1976)'un elektroforez sonuçları ile karşılaştırılarak çalışılan teknik kontrol edilmiştir. İnsan örneği olarak araştırmacının alyuvar enzimlerinden yararlanılmıştır. Ayrıca çalışılan her enzim için, Kangal Köpeği örnekleri ile birlikte diğer köpek ırklarının örnekleri de aynı jellerde elektroforez işlemi yapılarak, hem bantların görünüşleri yönünden hem de elektroforetik göçleri bakımından benzerlik veya farklılıkları birarada gözlemlenmiştir.

5.1. Esteraz D (EsD) Enzimi

Nişasta jel elektroforez tekniği ile çalışılan Kangal Köpeklerinin alyuvar enzimlerinden *EsD* için, polimorfizm görülmemiştir. İki bant şeklinde gözlemlenen enzimin her lokusta birer allel olmak üzere iki lokus tarafından determine edildiği belirlenmiş ve Kangal Köpekleri ile incelenen diğer köpek ırkları arasında farklılık gözlenmemiştir.

Bu sonuçlar, Seixas ve ark (1988)'nin evcil köpeklerde aynı enzim ve tekniklerle yaptıkları çalışmada da polimorfizm gözleyememiş olmaları ile uyuşmaktadır.

Farklı Avrupa köpek ırklarında ve kurtlarda, serum ya da plazma örnekleri kullanılarak izoelektrik fokusing ya da 2-demensional agaroz jel elektroforez teknikleri ile arilesteraz'ın genetik varyasyonunun varlığı saptanmış (Braend 1984, Braend 1985, Braend ve Andersen 1987, Braend ve Roed 1987), ancak çalışmalarda kullanılan örnek ve tekniklerin farklı olması nedeniyle bulguların bu çalışmanın bulgularıyla tartışılması mümkün olmamıştır.

5.2. Fosfoglukonat Dehidrojenaz (*Pgd*) Enzimi

Fosfoglukonat dehidrojenaz enziminin polimorfizmi konusunda yapılan çalışmalarda genel olarak bir polimorfizmin bulunmadığı ve enzimin monomorfik olduğu bildirilmektedir (Meera ve ark, 1973, Simonsen 1976, Jordana ve ark 1992a, Jordana ve ark 1992b). Meera ve ark (1973)'ınca akraba olmayan 92 tane melez köpekte yapılan çalışmada elektroforetik varyasyon görülmezken, Simonsen (1976) nişasta jel elektroforezi ile yürüttüğü çalışmasında tek bir enzim bandının varlığı saptanmış ve polimorfizm bulunmadığını belirlemiştir. Keza Jordana ve ark (1992a) ile Jordana ve ark (1992b) çeşitli İspanyol köpek ırkları üzerindeki çalışmalarında da aynı bulgulara ulaşmışlar ve enzimin monomorfik olduğunu ortaya koymuşlardır. Fakat Seixas ve ark (1988) bu enzimin polimorfizminin sadece bir kez çok düşük sıklıkla gözlemlendiğini, daha sonra tekrarlanan çalışmalar sırasında da polimorfizmin nadiren görülebildiğini bildirmektedirler.

Sunulan araştırmada da tüm Kangal populasyonlarında ve incelenen diğer köpek örneklerinde Pgd anodal tek bant olarak gözlemlenmiş ve bu lokusun diğer köpek ırklarında bildirildiği (Meera 1973, Simonsen 1976, Jordana ve ark 1992a, Jordana ve ark 1992b) gibi monomorfik olduğu gözlemlenmiştir.

5.3. Karbonik Anhidraz1 (Ca_1) Enzimi

Simonsen (1976) daha önce yapılan elektroforetik çalışmaların özetini içeren tabloda karbonik anhidrazı tek bant olarak aktarılmaktadır.

Diğer evcil hayvanlarda bu enzim ile ilgili birçok çalışma (Morera ve ark 1983, Ordas ve Primitivo 1986, Clarke ve ark 1989) bulunmasına rağmen, köpeklerde bu enzim lokusu üzerinde yeterli çalışmaya rastlanılamamıştır. Sadece Seixas ve ark (1988), köpeklerde karbonik anhidraz 2'yi herhangi bir sorunla karşılaşmadan belirlenebilirken, karbonik anhidraz 1'in elektroforetik olarak analiz edilemediğini bildirmektedirler.

Köpeklerde çok az çalışılan ve daha önce analizi gerçekleştirilemeyen Ca_1 , Kangal Köpekleri ve diğer köpek ırklarında çok belirgin bantlarla ve net bir şekilde belirlenmiştir. Monomerik bir enzim olan ve anodal tek bant gözlemlenen Ca_1 , tek lokus ve 1 allel tarafından determine edildiği saptanmış ve enzimde polimorfizm görülmemiştir.

5.4. Süperoksit Dismutaz (Sod) Enzimi

Baur ve Schorr (1969), köpek alyuvarlarındaki *Sod*'un genetik polimorfizmi, 1 otozomal lokusda A ve B olmak üzere 2 kodominant allel ile determine edildiğini nişasta jel elektroforez tekniği ile belirlemişlerdir. Baur ve Schorr (1969)'un sonuçları değişik araştırmacılar (Meera ve ark 1973, Weiden ve ark 1974, Simonsen 1976, Gerard ve ark 1987) tarafından da doğrulanmıştır.

Sod enzim lokusunun köpek populasyonlarında varyasyon gösterdiği, spesifik soy karakterlerine bakılan çalışmalarda önemli olduğu (Ingrid ve ark 1985) ve babalık kontrollerinde kullanılan kan polimorfik özellikleri içerisinde *Sod*'ın kolay analiz edilen enzimlerden biri olduğu ayrıca, Baur ve Schorr (1969)'un uyguladığı nişasta jel elektroforez tekniğinin halen kullanıldığı ifade edilmektedir (Dostal ve Stratil 1994).

Simonsen (1976) değişik soy ve sayıdan oluşan köpekleri 4 gruba ayırarak nişasta jel elektroforezi ile alyuvar enzimlerinden yararlanarak yaptığı çalışmada, *Sod*'ın polimorfizm gösterdiğini ortaya koymuştur. 110 yetişkin köpek içinde 4 heterozigot gözlemleyen Simonsen, diğer Kanidae (kurt, akal, koyote, Hallstrom köpeği, kırmızı foks, köpek-kurt melezi, köpek-akal melezi) 'lerin, Fisher ve ark (1976) koyote, dingo ve kurtların, Ferrell (1980), koyote ve kurtların da köpeğin *Sod* lokusunun yaygın alleleline sahip olduklarını belirlemişlerdir.

Çalışılan bu enzim lokusunda, GAVOEMK populasyonu hariç bütün populusyonlarda polimorfizm gözlemlenmiştir. A ve B allellerin frekansları sırasıyla, SÜVFAUÜ'nde 0.935, 0.065; SKK'nde 0.962, 0.038; SUTİMÇ'nde 0.882, 0.118; SMK'nde 0.923, 0.077; GAVOMK'da 1.000, 0.000 olarak tespit edilmiştir. (Tablo 4.4.1.)

Jordana ve ark (1991a) ve Jordana ve ark (1992a)'nın belirlediği İspanyol köpeklerinin *Sod* enzim lokusunun allel frekansları tablo 5.4.1.'de verilmiştir.

Jordana ve ark (1992b), bu soyların alt populusyonlarının da allel frekanslarını belirlemişlerdir. oğunluğu yukardaki değerlere yakın olduğu için bunların allel frekansları burada tekrar verilmemiştir.

Jordana ve ark (1991b), İspanyol köpeği olan Gos d'Atura köpek soyunun 5 ayrı populusyonun *Sod* enzimi için elde ettiği allel frekansları tablo 5.4.2.'de verilmiştir.

Tablo 5.4.1. İspanyol Köpeklerinin *Sod* enzim lokusunun allel frekansları

Lokus (Sod)	Köpek Sayısı	Alleller	
Köpekler	N	A	B
Gos d'Atura	93	0,973	0,027
Mastin Pirineos	55	0,918	0,082
Mastin Espanol	45	0,878	0,122
Perdiguero Burgos	42	1,000	0,000
Galgo Espanol	31	0,952	0,048
Sabueso Espanol	53	0,868	0,132
Ca de Bestiar	46	0,967	0,033
Podenco İbicenco	71	0,993	0,007
Podenco Canario	15	1,000	0,000
Podenco İberico	33	0,955	0,045

Tablo 5.4.2. Gos d'Atura köpek soyunun 5 ayrı popülasyonunun *Sod* enzim lokusunun allel frekansları

Lokus (Sod)		Alleller	
Popülasyon	N	A	B
Vallferrera	22	0,932	0,068
Vall D'assua	12	1,000	0,000
Urgell (UR)	10	1,000	0,000
Conca de Barbera	25	0,980	0,020
Barcelona Girona	17	1,000	0,000

Sunulan çalışmada gözlenen *Sod* enziminin allel frekansları, gerek İspanyol köpeklerinde gerekse Gos d'Atura popülasyonları için elde edilmiş frekanslar ile tam bir uyum içerisinde.

Çalışmada BB genotipi hiç gözlenmemiştir. Kodominant A ve B allellerinin AA, AB genotipleri gibi bazı bireylerin BB genotipini de göstermeleri beklenebilir. Ancak toplam 108 bireyde B allel frekans değerinin 0.051 olduğu göz önüne alınırsa, 108 bireyde görülmesi beklenen BB birey sayısı : $108 \times (0.051)^2 = 0.281$ olarak bulunur. Bu değer 1'den oldukça küçük bir değer olduğundan, BB'nin hiç gözlenmemesi doğal bir sonuçtur.

5.5. Çalışılan Enzimlerin Birlikte Değerlendirilmesi

Gerek Kangallarda gerekse çalışmada kullanılan diğer köpeklerde *EsD*, *Pgd* ve *Ca₁* lokusları varyasyon göstermemiştir. Bununla birlikte *EsD*, *Pgd* ve *Ca₁* enzimlerinin Kangal köpeklerinde ilk defa çalışılmış olması, ayrıca köpeklerde çok az çalışılmış olan ve daha önce Seixas ve ark (1988)'nin yaptığı çalışmada analiz edilemeyen karbonik anhidraz 1 bantlarının belirgin ve net bir şekilde analiz edilmiş olması önemli bir gelişme olarak değerlendirilebilir. Bu enzim lokuslarının varyasyon göstermemeleri akrabalı yetiştirmenin bir sonucu olabilir. Uzun zaman akrabaların birbirleri ile birleştirilmeleri suretiyle çoğalmış popülasyonlarda bireyler hemen hemen bütün genleri bakımından homozigot hale gelmektedirler(Aritürk 1983a, Düzgüneş ve Ekingen 1983). Ayrıca diğer literatür bilgileri de köpeklerin pek çok lokusunda monomorfizm görüldüğünü yansıtmaktadır. Bu nedenle köpek türlerinin genelde enzim genleri açısından fazla varyasyon göstermediği söylenebilir. Bu çerçevede hatırlanmalıdır ki, akrabalı yetiştirmenin yüksek derecede yapıldığı Kangal Köpeklerinin daha önce vurgulandığı gibi *Sod* enzim lokusunda polimorfizmin ortaya çıkarılması önemli bir bulgu olarak değerlendirilebilir.

Kendi içinde sürekli eşleştirilen köpeklerde bir süre sonra bazı kusurlar belirmeye başlamış ve hayvanlarda yaşamsal uyum parametrelerinde düşüşler izlenmiştir (Taylor 1993). Oysa gerek insanlar tarafından yetiştirilen ve gerekse tabiatta bulunan popülasyonlarda birçok genler bakımından heterozigotların selektif avantajları vardır (Aritürk 1983a, Düzgüneş ve Ekingen 1983). Heterozigotluk düzeyi ile çevreye uyumu, döl verimi, yaşama gücü, bazı hastalıklara hassasiyet ve diğer verim özellikleri arasında pozitif ilişkiler bulunmuştur (Dayıoğlu ve Tüzemen 1989).

Özbeyaz (1994), Kangal Köpeklerinde bazı morfolojik özellikler konulu ve Gemlik Askeri Veteriner Okulunda yetiştirilen Kangal Köpek sürüsünde ırk

standartlarının belirlenmesine yardımcı olacak beden ağırlıkları ve bazı beden ölçülerinin belirlenmesi amacıyla yaptığı çalışmada, Gemlik'te yetiştirilen sürünün ortalama ağırlık ve diğer ölçülerinin, Sivas'ta yetiştirilen örneklerinden ve yabancı ülkelerde yetiştirilenlerden daha düşük olduğunu bulmuştur. Ayrıca Gemlik'te yetiştirilen Kangal Köpeklerinin İngiltere ve Amerika Köpek Kulüplerinin bildirdiği ırk standartlarından da düşük olduğunu belirtmiştir.

Hatırlanmalıdır ki, çalışılan 5 lokus açısından hiç heterozigotluk göstermeyen tek populasyon GAVOEMK populasyonudur. Eğer bu 5 lokustan elde edilen bilgiler tüm lokuslar açısından elde edilen bilgileri temsil ediyorsa, büyük bir olasılıkla GAVOEMK populasyonu diğer Kangal populasyonlarına göre daha fazla akrabalı yetiştirmeye maruz kalmıştır ve morfolojik özelliklerindeki dejenerasyon da düşük heterozigotluğuna bağlanabilir.

Gemlikte yetiştirilen Kangal Köpeklerinin, az sayıda damızlık köpeğin yavruları olması ve damızlık olarak kullanılan bu köpeklerin de akrabalı yetiştirme sonucu elde edilmiş olması, genel olarak bu populasyonda heterozigotluğun daha düşük olduğu inancını kuvvetlendirmektedir (Özbeyaz 1994, Tuncel 1996). Ancak diğer Kangal populasyonlarının genellikle Gemlik populasyonundan üstün morfolojik ölçüler taşımasının; hem bazı köpek ırklarının deniz iklimine sahip bölgelerde yetiştirildiği takdirde morfolojik bazı karakterlerinde bozulmalar olabileceği, hem de ırkın sahip olduğu genetik kapasitenin iyi bakım ve besleme ile daha belirgin bir şekilde ortaya çıkmasından kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir (Aksoy 1991, Özbeyaz 1994).

Süperoksit dismutaz enziminin Kangal Köpeklerinde farklı düzeylerde heterozigotluk gösterdiği ve en düşük düzeyin GAVOEMK, en yüksek düzeyin ise SUTİMÇ populasyonuna ait olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.4.2).

Bu çalışma ile populasyonlar arasındaki genetik uzaklık da (D : 0.0001-0.0088) ortaya konulmuştur. Tablo 4.4.3'deki uzaklık değerleri, birbirine en yakın 2 populasyonun SMK ve SÜVFAUÜ populasyonu olduğunu göstermektedir. Bu iki populasyona yakın üçüncü populasyon SKKÇ'dir. Üçlüye (SMK, SÜVFAUÜ, SKKÇ) yakın populasyon ise GAVOEMK'dur. GAVOEMK iki boyutlu uzayda bir ucu oluşturmaktadır. GAVOEMK'dan en uzak populasyon olan ve diğer ucu oluşturan SUTİMÇ ise üçlü gruba yaklaşık olarak GAVOEMK populasyonu kadar uzak, fakat ters yönde yer almaktadır. Görsel olarak gösterilirse tek polimorfik lokusa göre populasyonların yakınlık ilişkileri şöyledir:



1: SÜVFAUÜ 2: SKKÇ 3: SUTİMÇ 4: SMK 5: GAVOEMK

Dikkat edilirse GAVOEMK-SUTİMÇ sıralamasında populasyonlar heterozigotluk derecelerine göre en azdan en çoğa doğru sıralanmışlardır.

Kangal populasyonları için 5 enzim lokusu açısından genetik uzaklık (D) hesaplandığında uzaklık değerlerinin (0.0001-0.0088), çeşitli hayvan türleri için populasyonlar arası uzaklık değerleri (0.0000-0.0490) ile uyum içerisinde olduğu görülmektedir (Nei 1987).

Sonuç olarak:

a) Türkiye'de enzim elektroforezi yöntemi köpeklerde ilk defa kullanılmış ve *EsD*, *Pgd*, *Ca₁* ve *Sod* enzim lokusları yönü ile Kangal Köpeklerinin genetik yapıları belirlenmiştir.

b) *EsD*, *Pgd* ve *Ca₁* lokusları açısından Kangal Köpeklerinin monomorfik oldukları ve bu genlerin bütün bireylerde homozigot olduğu ortaya konmuştur. Köpeklerde daha önce çok az çalışılmış olan ve bazı

araştırıcılar tarafından analiz edilemeyen Ca_1 bantları, belirgin ve net bir şekilde gözlemlenmiştir.

c) *Sod* enzim lokusu açısından Kangal Köpek populasyonları arasında farklılıkların olduğu ortaya çıkarılmış ve GAVOEMK populasyon bireylerinin tamamen homozigot; SÜVFAUÜ'nde, SKKÇ'nde, SUTİMÇ'nde ve SMK'de yetiştirilen Kangal Köpeklerin ise değişen oranlarda heterozigot oldukları tespit edilmiştir. Genetik uzaklık "D" açısından GAVOEMK ve SUTİMÇ populasyonlarının birbirine en uzak olduğu ve diğer populasyonların (SMK, SÜVFAUÜ, SKKÇ) ise bu iki uzaklık değerlerinin arasında olduğu ortaya konulmuştur.

d) Temelde *Sod* enzimi ile saptanan heterozigotluk dereceleri populasyonların gen havuzları için genelleştirilebilirse; (i) GAVOEMK populasyonunun morfolojik parametreler açısından Sivas populasyonlarından zayıf oluşu, dūřük heterozigotluğuna bağlanabilir, (ii) ilerde yeni bir Kangal Köpeėi populasyonu başlatılacaksa çalışılan populasyonlar içerisinde SUTİMÇ'nin en heterozigot populasyon olarak tercih edilmesi önerilebilir.

e) Kangal Köpeklerinin araştırılan lokuslar açısından, çalışılan diğer köpeklerden farklı bir allel taşımadığı gözlemlenmiştir.

f) Sunulan alışma ile bu teknik laboratuvarımızda da rahatlıkla uygulanabilir hale getirilmiştir.

6. ÖZET

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya (VET) Anabilim Dalı
DOKTORA TEZİ /KONYA-1998

Vahdettin ALTUNOK

Danışman
Prof. Dr. Mehmet NİZAMLIOĞLU

Kangal Köpeklerinin Genetik Yapılarının Moleküler Yöntemlerle Araştırılması

Bu çalışmada, Kangal Köpeklerinin genetik yapılarını ve populasyon içi ve populasyonlar arası genetik varyasyonu belirlemek ayrıca, Kangal Köpekleri ile diğer bazı köpek ırkları arasındaki benzerlikleri (ya da farklılıkları) ortaya koymak için 4 farklı enzim; esteraz D (ESD), fosfoglukonat dehidrojenaz (PGD), karbonik anhidraz 1 (CA₁), süperoksit dismutaz (SOD) ve bu enzimlerin 5 lokusu nişasta jel elektroforezi ile araştırıldı.

Araştırmada, S.Ü. Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Ünitesi (SÜVFAUÜ)'nden, Sivas-Kangal Kaymakamlığı Çiftliği (SKKÇ)'nden, Sivas-Ulaş Tarım İşletmesi Müdürlüğü Çiftliği (SUTİMÇ)'nden, Gemlik Askeri Veteriner Okulu ve Eğitim Merkez Komutanlığı (GAVOEMK)'ndan ve Sivas'ın merkez ve köyleri (SMK)'nden 108 Kangal Köpeğin ve diğer 7 köpek ırkından 21 köpeğin alyuvar enzimleri kullanıldı. Her enzim için, literatür verilerine uygun tampon ve enzim aktivite boyaması için kimyasallar kullanıldı. Gözlenen izoenzim bantları analiz edildi.

EsD, *Pgd* ve *Ca₁* enzim lokusları yönünden, Kangal Köpeklerinde ve diğer köpeklerde varyasyon görülmedi. Kangallar ve diğer köpeklerin aynı bantlara sahip ve hepsinin homozigot olduğu görüldü. Bununla birlikte *Sod* enzim lokusu yönünden populasyon içinde ve populasyonlar arasında

varyasyon gözlemlendi. *Sod* enzim lokusunun A ve B allel frekansları sırası ile SÜVFAUÜ'nde 0.935, 0.065; SKKÇ'nde 0.962, 0.038; SUTİMÇ'nde 0.882, 0.118; SMK'inde 0.923, 0.077; GAVOEMK'nda 1.000, 0.000 idi. *Sod* enzim lokusunun sonuçları esas alındığında, GAVOEMK populasyon bireylerinin tamamen homozigot, diğer populasyon bireylerinin ise değişen oranlarda heterozigot (0.0146-0.0416) oldukları görüldü.

Sod lokusu, GAVOEMK populasyonunun bütün gen havuzunu gösteren bir belirteç olarak düşünülebilirse, bu populasyonun diğer çalışmalar ile önceden gözlenen morfolojik özellikleri bakımından zayıf oluşu, düşük heterozigotluğuna bağlanabilir.

Polimorfizm gözlenen populasyonların hepsi Hardy-Weinberg dengesinde bulunmuştur. Populasyonlar arasında Nei'nin genetik uzaklık D'si hesaplandı. SMK-SÜVFAUÜ-SKKÇ populasyonlarının birarada kümelendiği ve bir grup oluşturduğu halde, GAVOEMK ve SUTİMÇ populasyonlarının ise bu gruptan uzak ve ters yönde oldukları gözlemlendi.

Bu çalışma ile (1) 4 enzim lokusundan sadece *Sod* lokusunda polimorfizmin varlığı, (2) maksimum genetik uzaklığın (0.0088) GAVOEMK ve SUTİMÇ populasyonları arasında olduğu, (3) GAVOEMK populasyonunun en düşük ve SUTİMÇ populasyonunun en yüksek heterozigotluğa sahip olduğu ve (4) çalışılan lokuslar yönüyle Kangal Köpeklerinin diğer köpeklerden farklı olmadığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kangal Köpekleri, Alyuvar Enzimleri, ESD,PGD, CA1, SOD, Nişasta Jel Elektroforezi, Biyokimyasal Polimorfizm, Hardy-Weinberg Dengesi

7. SUMMARY

Investigation Of Genetic Structure Of Turkish Kangal Dogs Using Molecular Techniques

In this present study to determine the genetic structure of Kangal dogs and genetic variation both within and among the populations also, to discern the similarities (or dissimilarities) between the Kangal dogs and some other breeds of dogs, four different enzyme loci; esterase D (ESD), phosphogluconate dehydrogenase (PGD), carbonic anhydrase 1 (CA₁), superoxide dismutase (SOD) and their 5 loci were examined by starch gel electrophoresis.

In the study, red blood cell enzymes of 108 Kangal dogs from Veterinary Faculty of Selçuk University Research and Application Unit, Sivas Kangal Farm of the District Government, Sivas Ulaş Farm of the Directorate of Agricultural Enterprises, Gemlik Military School of Veterinary and the Educational Command Center and city and villages of Sivas and 21 dogs belonging to 7 other breeds were employed.

For each of the enzyme systems appropriate buffers and chemicals for the activity staining were used in accordance with the information given in the literature. The observed bands of the isozymes were analysed.

For the enzyme loci *EsD*, *Pgd*, *Ca*₁ neither the individuals of Kangal dogs nor the individuals of other dogs exhibited any variation. They displayed identical bands and they were all homozygotes. However with respect to *Sod* enzyme locus were observed variation both within and among the populations. A and B allele frequencies of *Sod* enzyme locus were as follows: 0.935, 0.065 in Veterinary Faculty of Selçuk University Research and Application Unit, 0.962, 0.038 in Sivas Kangal Farm of the District Government, 0.882, 0.118 in Sivas Ulaş Farm of the Directorate of Agricultural Enterprises, 0.923, 0.077 in city and villages of Sivas, 1.000, 0.000 in Gemlik Military School of Veterinary and the Educational Command Center. Based on the results of *Sod*

enzyme locus the Gemlik Military School of Veterinary and the Educational Command Center population had null heterozygosity but other populations exhibit various degrees of expected heterozygosity.

If *Sod* can be considered as the indicator for the whole gene pool of, for the Gemlik Military School of Veterinary and the Educational Command Center population, relatively inferior morphological characteristics previously observed by the other researchers could be attributed to the lowest heterozygosity of the population.

The population exhibited polymorphism were all in Hardy-Weinberg equilibrium. Nei's D^2 's between all pairs of populations were calculated. It was observed that city and villages of Sivas-Veterinary Faculty of Selçuk University Research and Application Unit-Sivas Kangal Farm of the District Government populations were clumped together and formed a group where as Gemlik Military School of Veterinary and the Educational Command Center and Sivas Ulaş Farm of the Directorate of Agricultural Enterprises populations were further away from this group in opposite directions.

This study showed that (1) among the 4 enzyme loci only *Sod* exhibited polymorphism, (2) the maximum genetic distance is 0.0088, and it is observed between Gemlik Military School of Veterinary and the Educational Command Center and Sivas Ulaş Farm of the Directorate of Agricultural Enterprises populations, (3) Gemlik Military School of Veterinary and the Educational Command Center population had the lowest and Sivas Ulaş Farm of the Directorate of Agricultural Enterprises population had the highest expected heterozygosity levels and (4) it seems that, with respect to the loci studied, Kangal dogs do not differ from the other breeds of dogs.

Key Words: Kangal Dogs, Red Blood Cell Enzymes, ESD, PGD, CA1, SOD, Starch Gel Electrophoresis, Biochemical Polymorphism, Hardy-Weinberg Equilibrium.

8. LİTERATÜR LİSTESİ

Aksoy G (1991) *Kangal Çoban Köpekleri*. Türk Veteriner Hek Derg 2 (10) : 25-27.

Anonim (1990) *Korkusuz ve kendinden emin bir köpek : Sivas Kangal*. Pfizer Veteriner Bülteni Sayı 2.

Anonim 1 (1995) *An Illustrated Breed Standard, Presented by The Anatolian (Karabash) Dog Club*.

Anonim 2 (1995) *Anatolian Shepherd, Livestock Guardian of Turkey*. An Educational Publication by Anatolian Shepherd Dog Club of America, Alpine.

Arıtürk ME (1983a) "Evcil Hayvanların Genetiği" 2. Baskı, A Ü Basımevi, Ankara.

Arıtürk ME (1983b) "Genel Zootečni, A Ü Basımevi, Ankara.

Ayala FJ (1982) "Population and Evolutionary Genetics: A Primer". The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc., California.

Başaran N (1994) "Tıbbi Genetik" 5. Baskı, Bilim Teknik Yayınevi, Eskişehir.

Baur EW and Schorr RT (1969) *Genetic Polimorphism of tetrazolium oxsidase in dogs*. Science 166 : 1524-1525.

Bayşu N (1979) "Temel Biyokimya", A Ü Basımevi, Ankara.

Bilal T ve Uysal A (1990) *Sağlıklı Sivas Kangal Köpeklerinde bazı kan parametreleri üzerinde çalışmalar*. İ Ü Vet Fak Derg 16 (2) : 27-34.

Bingöl G (1983) "Biyokimya" Hacettepe TAŞ Kitapçılık Ltd Şti, Sıhhiye-ANKARA.

- Bohinski RC (1987)** *Modern Concepts in Biochemistry*, Fifth Edition, Allyn and Bacon, Inc. U.S.A.
- Borg L (1996)** *Breeding of Turkish Shepherd Dogs in Europe* In “Uluslararası Türk Çoban Köpeği Sempozyumu”, 111-120.
- Braend M (1984)** *Genetic variation of esterase system in sera dogs*. *Acta Vet Scand* 25 : 526-535.
- Braend M (1985)** *Polimorphism of an esterase system in dog sera*. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics* 16 (Suppl. 1) : 54.
- Braend M and Andersen AE (1987)** *Variation of transferrin and esterase in sera of dogs*. *Acta Vet Scand* 28 : 435-444.
- Braend M and Roed KM (1987)**. *Polimorphism of transferrin and esterase in Alaskan Wolves : evidence of close molecular homolgy with the dog*. *Animal Genetics* 18 : 1473-148.
- Brewer GJ (1967)** *Achromatic regions of tetrazolium stained gels : inherited electrophoretic variation*. *American Journal of Human Genetics* 19 (5) : 674-680.
- Cengiz F, Yıldız B ve Kırbıyık H (1993)** *Türk Çoban ve Alman Kurt Köpeklerinde bazı kan parametreleri ile alyuvar Na^+ , K^+ değerlerinin incelenmesi*. *U Ü Vet Fak Derg* 2 (12) : 11-15.
- Chappell J (1996)** *The Breeding of Karabaş in Britain* In “Uluslararası Türk Çoban Köpeği Sempozyumu”, 121-146, KONYA.
- Clarke SW, Tucker EM and Osterhoff DR (1989)** *Blood groups and biochemical polymorphism in the Namaqua sheep breed*. *Animal Genetics* 20 : 279-286.

- Crozier WW and Ferguson A (1986)** *Electrophoretic Examination of the Population Structure of Brown Trout, Salmo trutta L., from the Lough Neagh Catchment Northern Ireland.* J Fish Biol 28 : 459-477.
- Dayıoğlu H ve Tüzemen N (1989)** *Polimorfik kan karakterlerinin tespitinde kullanılan biyokimyasal laboratuvar metotları ve değerlendirme prensipleri.* Atatürk Ü Zir Fak Derg 20 (2) : 125-134.
- Devlin TM (Ed.) (1993)** Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, Third Ed., A John Willey and Sons, Inc., Publication New York.
- Donald V and Voet J (1990)** Biochemistry, John Wiley and Sons New York.
- Dostal J and Stratil A (1994)** Polimorphic markers as tools for paternity control in dogs. Animal Genetics 25 (2) : 13.
- Düzgüneş O ve Ekingen HR (1983)** Genetik, 2. Baskı A Ü Ziraat Fakültesi Yayınları : 555, A. Ü. Basımevi, Ankara.
- Epstein E and Karcher RE (1994)** *Electrophoresis* In "Tietz Textbook of Clinical Chemistry" Ed by CA Burtis, ER Aswood, Second Edition, 191-205, WB Saunders Company, ABD.
- Ersoy E ve Bayşu N (1981)** Pratik Biyokimya, A Ü Veteriner Fakültesi Yayınları, A.Ü. Basımevi Ankara.
- Ersoy E ve Bayşu N (1986)** Biyokimya, A Ü Veteriner Fakültesi Yayınları No : 408, A.Ü. Basımevi Ankara.
- Ferrell RE, Morizot DC, Horn J and Carley CJ (1980)** *Biochemical markers in a species endangered by introgression: The Red Wolf.* Biochemical Genetics 18 (1-2) : 39-49.
- Fisher RA, Putt W and Hackel E (1976)** *An investigation of the products of 53 gene loci in three species of wild canidae : Canis lupus, Canis*

lantrans, and Canis familiaris. Biochemical Genetics 14 (11-12) : 963-974.

Geldermann H (1970) *An improved method for horizontal starch-gel electrophoresis*. Animal Blood Groups Biochemical Genetics 1 : 229-234.

Gerard C, Braun JP and Darre R (1987) *Groupes sanguins et polymorphisme biochimique du chien. Applications a l'identification et au controle de filiation*. Rec Med Vet 163 (3) : 297-302.

Grunbaum BM and Crim MDPH (1981) Handbook for Forensic Individualization of Human Blood and Bloodstains, Published by Hayward California U.S.A.

Gönül N (1996) Gemlik Askeri Veteriner Okulu ve Merkez Komutanlığında Yetiştirilen Türk Çoban Köpeği ve Alman Çoban Köpeğinin Başlıca Morfolojik Özellikleri ile Bu Genotiplerin Karşılaştırılmalı Eğitim Performansları (Yayınlanmamış Doktora Tezi), Bursa.

Gözükara EM (1997) Biyokimya, cilt 1-2, 3. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd Şti., Çapa, İstanbul.

Harris H and Hopkinson DA (1976) Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics, Elsevier Publishing Company, Inc., New York.

Hopkinson DA, Mestriner MA, Cortner J and Harris H (1973) *Esterase D : a new human polymorphism*. Annals of Human Genetics 37 : 119-137.

Ingrid CJ, Arnold and Jacob B (1985) *Biochemical variants in dogs*. Animal Blood Groups Biochemical Genetics 16 (Suppl.1) 54-56.

Johnson GB (1974) *Enzyme Polymorphism and Metabolism*. Science 184 : 28-37.

- Jordana J, Piedrafita J and Sanchez A (1991a)** *Varriabilidad genetica en diez razas caninas espanolas. Arch Zootec 40 : 115-129.*
- Jordana J, Piedrafita J and Sanchez A (1991b)** *Variabilidady relaciones geneticas de cinco poblociones de la raza canina "Gos D'Atura". Invest agr Prod Sanid Anim 6 (3) : 211-223.*
- Jordana J, Piedrafita J and Sanchez A (1992a)** *Genetic relationships in Spanish dog breeds. II. The analysis of biochemical polymorphism. Genet Sel Evol 24 : 245-263.*
- Jordana J, Piedrafita J, Sanchez A and Puig P (1992b)** *Comparative F statistics analysis of the genetic structure of ten Spanish dog breeds. Journal of Heredity 83 : 367-374.*
- Juneja RK, Arnold ICJ, Gahne B and Bouw J (1987)** *Parantage testing of dogs using variants of blood proteins : description of fiwe new plasma protein polymorphism. Animal Genetics 18 : 297-310.*
- Kalaycioğlu L, Nizamlioğlu M ve Altunok V (1995)** *Sağlıklı Kangal Kōpeklerinde kanda bazı biyokimyasal parametreler. Vet Bil Derg 11 (1) : 47-49.*
- Kaman N (1992)** *Hayvancılıkta Biyokimyasal Polimorfizm. TİGEM 7 (42) : 22 -23.*
- Keskin E, Durgun Z ve Kocabatmaz M (1994)** *Kangal ırkı kōpeklerde bazı hematolojik parametreler ile kan gazları ve plazma elektrolit düzeyleri. S Ü Vet Fak Derg 10 (1-2) : 35-38.*
- Kırmızı E (1991)** *Türk Çoban Kōpeđi ve Alman Çoban Kōpeđinin Dōl Verimi, Büyütülen Yavru Oranı, Büyüme ve Beden Ölçüleri Yönünden Karşılaştırılması (Yayınlanmamış Doktora Tezi), İstanbul.*

- Kırmızı E (1994)** *Türk Çoban Köpeğinin tarihçesi*. Türk Vet Hek Derg 6 (1) : 39-41.
- McDermid EM, Agar NS and Chai CK (1975)** *Electrophoretic variation of red cell enzyme systems in farm animal*. Animal Blood Groups Biochemical Genetics 6 : 127-174.
- Meera K, Los WRT, Does JAVD and Epstein RB (1973)** *İzoenzyme markers in dog blood cells*. Transplatation 15 (6) : 624-628.
- Morera L, Llanes D, Barbancho M and Rodero (1983)** *Genetic polymorphism in Spanish Merino Sheep*. Animal Blood Groups Biochemical Genetics 14 : 77-82.
- Nei M (1987)** "Molecular Evolutionary Genetics", Columbia Universty Press, New York.
- Nelson DD (1996)** *A General classification of the native dogs of Turkey* In "Uluslararası Türk Çoban Köpeği Sempozyumu", 19-96.
- Ordas JG and Primitivo FS (1986)** *Genetic variation in blood proteins within and between Spanish dairy sheep breeds*. Animal Genetic 17 : 255-266.
- Öncül O (1983)** Köpekler Ailesi, Dönmez Ofset, Ankara.
- Özbeyaz C (1994)** *Kangal Köpeklerinde bazı morfolojik özellikler*. Lalahan Araş Ens Derg 34 (1-2) : 38-46.
- Özgüneş AF ve Çiftçi N (1993)** *Kangal Köpeği hakkında genel bilgiler*. TİGEM 8 (45) : 1-8.
- Poulik MD (1957)** *Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers*. Nature 28 : 1477-1479.

- Reed S (1996)** *The History of Turkish Shepherd Dogs* In “Uluslararası Türk Çoban Köpeği Sempozyumu”, 97-109.
- Seixas D, Arnaud H, Queinnec G and Queinnec B (1988)** *Approche du polymorphisme biochimique des enzymes erythrocytaires et plasmatiques du chien domestique*. Revue Med Vet 139 (3) : 285-291.
- Shaw CR and Prasad R (1970)** *Starch gel electrophoresis of enzymes-A compilation of recipes*. Biochemical Genetics 4 : 297-320.
- Simonsen V (1976)** *Electrophoretic studies on the blood proteins of domestic dogs and other Canidae*. Hereditas 82 : 7-18.
- Sokal RR and Rohlf FJ (1981)** *Biometry, Second Edition*, W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Taylor D (1993)** *Köpek Bakımı*, İnkılap Kitabevi Yayın Sanayi ve Tic AŞ., İstanbul.
- Tepeli C (1996)** *Kangal Irkı Türk Çoban Köpeklerinde Büyüme, Bazı Vücut Ölçüleri ve Döl Verimi Özelliklerinin Belirlenmesi (Yayınlanmamış Doktora Tezi)*, Konya.
- TSE (1991)** TS 8833 / ŞUBAT, UDK 616.15-078, Birinci Baskı.
- Tuncel LF (1996)** *Kangal Çoban Köpeği* In “Uluslararası Türk Çoban Köpeği Sempozyumu”, 1-5, KONYA.
- Tüzün C (1992)** *Biyokimya*, 2. Baskı, Palme Yayınları, Ankara.
- Vesterberg O (1993)** *A short history of electrophoretic metod*. Electrophoresis 14 : 1243-1249.

Weiden P, Storb R, Kolb HJ, Graham T, Anderson J and Giblett E (1974)
Genetic variation of red blood cell enzymes in dog. Transplantation 17
(1) : 115-120.

Willams BL and Wilson K (1979) *Electrophoretic Techniques* In “Principles
and Techniques of Practical Biochemistry”, 99-122, Willam Clowes and
Sons Limited Beccles and London.



9. ÖZGEÇMİŞ

1966 yılında Konya ili Güneysınır ilçesi Kurukavak köyünde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Konya'da tamamladıktan sonra 1986 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesine girerek Haziran 1991'de mezun oldu. 1992 yılında açılan araştırma görevliliği sınavını kazanarak araştırma görevlisi olarak göreve başladı. Halen Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında bu görevini sürdürmektedir.

Evli ve iki çocuk babasıdır.



10. TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım esnasında ilgi ve desteğini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Mehmet NİZAMLIOğLU'na, Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Leyla KALAYCIOğLU'na, Prof. Dr. Behiç SERPEK'e, Doç. Dr. Nuri BAŞPINAR'a, Doç. Dr. Ali Muhtar TİFTİK'e ve diğer mesai arkadaşlarım ile bu tekniği öğrenmemde büyük yardımlarını gördüğüm ODTÜ Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. İnci TOGAN ve Dr. Ayőe ERGÜVEN'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

