

**KLON SIĞIR VE  
JENERASYONLARINDA  
mtDNA HETEROPLAZMİ VE  
HAPLOTİP ANALİZİ**

**Volkan SÖNMEZ  
Yüksek Lisans Tezi  
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Sezen ARAT**

**2017**

**T.C.  
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KLON SIĞIR VE JENERASYONLARINDA mtDNA HETEROPLAZMİ  
VE HAPLOTİP ANALİZİ**

**Volkan SÖNMEZ**

**TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Danışman: Prof. Dr. Sezen ARAT**

**TEKİRDAĞ-2017**

**Her hakkı saklıdır.**

**Bu tez çalışması Namık Kemal Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından NKUBAP.00.24.AR.14.25 numaralı proje ile desteklenmiştir.**

Prof. Dr. Sezen ARAT danışmanlığında, Volkan SÖNMEZ tarafından hazırlanan “Klon Sığır ve Jenerasyonlarında mtDNA Heteroplazmi ve Haplotip Analizi” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Güldehen BİLGEN

*İmza:*

Üye: Prof. Dr. Sezen ARAT (Danışman)

*İmza:*

Üye: Doç. Dr. Fulya ÖZDİL

*İmza:*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU  
**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### KLON SIĞIR VE JENERASYONLARINDA mtDNA HETEROPLAZMİ VE HAPLOTİP ANALİZİ

**Volkan SÖNMEZ**

Namık Kemal Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sezen ARAT

Bugünkü anlamıyla klonlama; klonlanmak istenen bireyin vücut hücresine ait çekirdeğin daha önce çekirdeği çıkartılmış olan yumurta hücresi içinde geriye programlanarak bireyin genetik kopyasının oluşturulması anlamına gelmektedir. Üretilen klonların ve onların yavrularının daha ayrıntılı tanımlanması başarı yüzdesi halen istenilen seviyede olmayan teknolojinin daha anlaşılır ve kontrol edilebilir hale gelmesinde faydalı olacaktır. Bu çalışmanın amacı geriye programlama prosesinde ve daha sonrasında gelişim, performans, verim özellikleri gibi değişik parametrelere etkili olabileceği düşünülen alıcı ve verici hücre arasındaki mtDNA farkının ve bireylerdeki heteroplazminin etkisinin daha iyi anlaşılması amacıyla mtDNA varlığının klonlar ve onların yavrularında izlenmesidir. Bu amaçla çalışmada 5 klon boz sığır (1 erkek, 4 dişi), onların 8 adet (F<sub>1</sub> jenerasyonu) yavrusu ve bu yavruların 3 adet (F<sub>2</sub> jenerasyonu) yavrusunda D-loop'u da içeren mtDNA gen bölgesi PCR ile çoğaltılmış, enzim kesimi ile haplotip farkı, tek iplikli konformasyon polimorfizmi analizi (Single Strand Conformation Polymorphism-SSCP) ve sekans analizi ile mtDNA heteroplazmisi varlığı belirlenmeye çalışılmıştır. Bu analizler sonucunda bir erkek ve iki dişi klonun ve onların yavrularının kan örneklerinde verici hücreye ait mtDNA varlığı saptanmazken diğer iki dişi klonda heteroplazmi tespit edilmiştir. Ancak kan örneklerinde heteroplazmi tespit edilen bu klon dişilerin doku örneklerinde ve bu klonların yavrularının kan örneklerinde heteroplazmi görülmemiştir. Bu sonuç klonlara hücre kaynaklı mtDNA geçişinin ya hiç olmadığını veya tespit edilemeyecek düzeyde olduğunu ve olsa bile bunun hayvanların, sağlığı, gelişimi ve üremesi üzerinde olumsuz etkisinin dikkate değer olmadığını göstermiştir. Haplotip analizi sonuçları ise klonların bazılarının hücre vericisi ile aynı bazılarının farklı haplotipte olduğunu dolayısı ile haplotip farkının da teknolojinin başarısı için dikkate değer olmadığını göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Sığır, klonlama, nükleer transfer, klon yavruları, mtDNA, haplotip

**2017, 69 Sayfa**

## **ABSTRACT**

Master Thesis

### **mtDNA HETEROPLASMY AND HAPLOTYPE ANALYSIS ON CLONED CATTLE AND THEIR GENERATIONS**

**Volkan SÖNMEZ**

Namık Kemal University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Sezen ARAT

Cloning for today means creating a genetic copy of an individual of which a donor nucleus from a somatic cell of the individual is taken and reprogrammed into an enucleated oocyte. The identification of the clones and their offspring in details will be useful for understanding and controlling the technology which is not at the desired success level. The aim of this study is to monitor the presence of mtDNA in clones and their offspring in order to understand the difference in mtDNA between recipient and donor cells and the effect of heteroplasmy in individuals, which is thought to be effective for various parameters such as development, performance, yield characteristics in the objective backward programming process and later. For this purpose, mtDNA gene region including D-Loop were amplified by PCR in 5 clone bovine (1 male, 4 female), 8 offspring (F<sub>1</sub> generation) and 3 offspring (F<sub>2</sub> generation) and the presence of mtDNA heteroplasmy by single strand conformation polymorphism (SSCP) method and haplotype difference by RFLP analysis were determined. The results showed that there is no evidence of donor mtDNA existence in the blood samples of one male and two female clones and their offspring, on the other hand the heteroplasmy is detected in the other two female clones. But heteroplasmy is not observed in the blood samples of the offspring of these female clones that heteroplasmy is detected in the tissue samples of same female clones. The results indicate that either there is no cell mediated mtDNA transition to the clones or it may be very low so that it cannot be detected and even if there is any transition there is no remarkable negative effect on the health, development and reproduction of the animals. The results of the haplotype analysis showed that some of the clones are the same as the cell donor, some are in different haplotypes, and therefore the haplotype difference is not remarkable for the success of the technology.

**Keywords:** Bovine, cloning, nuclear transfer, clone offspring, mtDNA, haplotype

**2017, 69 Sayfa**

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÇİZELGE DİZİNİ</b> .....	<b>v</b>
<b>ŞEKİL DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER</b> .....	<b>4</b>
2.1 Klonlama ve Klonlamada Kullanılan Hücre Kaynakları ve Tipleri .....	4
2.1.1 Klonlamanın temel basamakları .....	5
2.2 Mitokondri, mitokondriyal DNA (mtDNA) ve D-loop Bölgesi.....	6
2.2.1 Mitokondri .....	6
2.2.2 mtDNA ve özellikleri .....	6
2.2.3 mtDNA D-loop bölgesi .....	8
2.3 Moleküler Genetik Çalışmalarda mtDNA'nın Kullanıldığı Yerler .....	10
2.4 Doğal Üremede mtDNA Kalıtımı .....	10
2.5 Somatik Hücre Nükleer Transferi (SHNT) Sonrası mtDNA Kalıtımı .....	11
2.5.1 Tür içi SHNT sonrası mtDNA kalıtımı .....	11
2.5.2 Türler arası SHNT sonrası mtDNA kalıtımı .....	13
2.6 mtDNA Analiz Yöntemleri .....	13
2.6.1 PCR-RFLP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu – Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) .....	13
2.7 SSCP (Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi).....	14
<b>3. MATERYAL VE METOD</b> .....	<b>15</b>
3.1 Materyal.....	15
3.1.1 Kullanılan cihaz ve teçhizat.....	16
3.1.2 Kullanılan kimyasallar.....	17
3.2 Yöntem .....	19
3.2.1 Kan, sperma ve doku örneklerinin alınması .....	19
3.2.2 Hücre kültürü .....	20
3.3 DNA İzolasyonu .....	21
3.3.1 Kan örneklerinden DNA izolasyonu .....	21
3.3.2 Hücre örneklerinden DNA izolasyonu .....	22
3.3.3 Sperm örneğinden DNA izolasyonu.....	23
3.3.4 Dokudan DNA izolasyonu.....	24
3.3.5 DNA kalitesinin kontrolü .....	24
3.4 PCR ile mtDNA Çoğaltılması .....	25
3.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Elde Edilen DNA Bantlarının Görüntülenmesi .....	28
3.6 SSCP Analizi .....	29
3.7 PCR Ürünlerinin RFLP Analizi.....	29
3.8 DNA Dizi Analizi.....	30
<b>4. ARASTIRMA BULGULARI</b> .....	<b>31</b>
4.1 Genomik DNA İzolasyonu Sonuçları.....	31
4.2 mtDNA Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	31
4.3 SSCP Analizi Sonucu .....	32

4.4 PCR-RFLP Sonuçları .....	33
4.5 Dizi Analizi Sonucu .....	40
4.5.1 Klon Ece ve Ecem'in doku ve kan örneklerinin karşılaştırılması .....	40
4.5.2 Dişi Klon Ecem kan, doku ve yavrularının birbiri ile karşılaştırılması.....	46
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>55</b>
<b>6. SONUÇ .....</b>	<b>59</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>61</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>69</b>



## ÇİZELGE DİZİNİ

### Sayfa

Çizelge 2.1: Sığırlarda mtDNA genomunun organizasyonu (GenBank: AF492351.1 numaralı mtDNA bölgesine göre düzenlenmiştir).....	9
Çizelge 3.1: Çalışmada kullanılan verici hücreler, 4 dişi 1 erkek klon, bu klonların yavruları (F <sub>1</sub> jenerasyonu olan 3 erkek, 5 dişi), bu yavruların yavruları (F <sub>2</sub> jenerasyonu olan 2 erkek, 1 dişi) .....	15
Çizelge 3.2: Çalışmada kullanılan bireyler, örnek numaraları ve DNA izolasyon kaynakları	16
Çizelge 3.3: Çalışmada kullanılan cihaz ve aletler.....	17
Çizelge 3.4: DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar .....	18
Çizelge 3.5: Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasallar.....	18
Çizelge 3.6: SSCP analizleri sırasında kullanılan kimyasallar.....	19
Çizelge 3.7: PCR konsantrasyonları.....	27
Çizelge 3.8: mtDNA PCR reaksiyonu sıcaklık döngüleri .....	27
Çizelge 3.9: <i>HpaII</i> enzimi tanıma dizisi.....	29
Çizelge 3.10: Enzim kesimi reaksiyon bileşenleri ve miktarları .....	29
Çizelge 3.11: Restriksiyon enzimlerinin tanıma dizisi.....	29
Çizelge 4.1: <i>HpaII</i> ve <i>ApoI</i> restriksiyon enzim kesimi sonucu verici hücre, klonlar ve jenerasyonlarında görülen haplotipler .....	38
Çizelge 4.2: Klon Ece ve Ecem'in kan örnekleri ve doku örnekleri ile Cemre ve Efecan'ın kan örneklerindeki baz farklılıkları .....	54

## ŞEKİL DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1: Blastomer ve embriyonik kök hücre (EKH) transferi ile klonlama (Arat 2017) .....	4
Şekil 2.2: Klonlama tekniği şeması (Arat 2017) .....	5
Şekil 2.3: mtDNA'nın yapısı (Strachan ve Read 2010) .....	7
Şekil 2.4: İnsanın ve hayvanların D-loop bölgelerinin karşılaştırması (Sultana ve Mannen 2004) .....	8
Şekil 3.1: Sığır mtDNA D-loop bölgesini (15429-16338. nt mavi olarak gösterilmiştir) de içeren 999 baz çifti uzunluğundaki bölge (AF492351.1) .....	26
Şekil 3.2: Sığır mtDNA D-loop'un 499 baz çifti uzunluğundaki bölgesi (AF492351.1) .....	27
Şekil 4.1: DNA örneklerinin jel görüntüsü .....	31
Şekil 4.2: mtDNA D-loop bölgesini de içeren 999 bp'lik PCR ürünleri agaroz jel görüntüsü, M: 50 bp'lik DNA marker, 1-20 örnek .....	32
Şekil 4.3: SSCP analizi sonucu, 1- Dişi verici hücre (Granüloza), 2- Ecem, 3- Cemre, 4- Efecan, 5- Nilüfer, 6- Kardelen, 7- Yazgülü, 8- Kiraz, 9- Karakız, 10- Kurban, 11- Ece, 12- Erkek verici hücre (Fibroblast), 13- Efe, * hatalı yükleme .....	33
Şekil 4.4: Kan ve doku örneklerinde <i>ApoI</i> restriksiyon enzimi kesim sonucu, M: 50 bp'lik DNA marker, 1- Dişi verici hücre (Granüloza), 2- Ece (Kan), 3- Ecem (Kan), 4- Ece (Doku), 5- Ecem (Doku), 6- Cemre (Kan) .....	34
Şekil 4.5: <i>ApoI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucu .....	35
Şekil 4.6: <i>ApoI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucu .....	35
Şekil 4.7: <i>HpaII</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucu .....	36
Şekil 4.8: <i>HpaII</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucu .....	37
Şekil 4.9: <i>AluI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucu .....	39
Şekil 4.10: <i>HinfI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucu .....	39
Şekil 4.11: <i>TaqI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucu .....	40
Şekil 4.12: Klon Ece ve Ecem doku örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15694. ve 15711. nükleotidde gözlemlenen farklılık ve kan örneklerinde aynı nükleotidde izlenen çift pik .....	41
Şekil 4.13: Klon Ece ve Ecem doku örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15791. nükleotidde gözlemlenen farklılık ve kan örneklerinde aynı nükleotidde izlenen çift pik .....	42
Şekil 4.14: Klon Ece ve Ecem doku örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15821. nükleotidde gözlemlenen farklılık ve kan örneklerinde aynı nükleotidde izlenen çift pik .....	43
Şekil 4.15: Klon Ece ve Ecem doku örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15892. nükleotidde gözlemlenen farklılık ve kan örneklerinde aynı nükleotidde izlenen çift pik .....	44
Şekil 4.16: Klon Ece ve Ecem doku örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15937. nükleotidde gözlemlenen farklılık ve kan örneklerinde aynı nükleotidde izlenen çift pik .....	45
Şekil 4.17: Klon Ece ve Ecem doku örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15983. nükleotidde gözlemlenen farklılık ve kan örneklerinde aynı nükleotidde izlenen çift pik .....	46

Şekil 4.18: Klon Ecem doku ve yavruları Cemre ve Efecan'ın kan örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15694. nükleotidde gözlemlenen benzerlik ve Klon Ecem kan örneğinde aynı nükleotidde yavrulardan farklılık.....	47
Şekil 4.19: Klon Ecem doku ve yavruları Cemre ve Efecan'ın kan örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15711. nükleotidde gözlemlenen benzerlik ve Klon Ecem kan örneğinde aynı nükleotidde yavrulardan farklılık.....	48
Şekil 4.20: Klon Ecem doku ve yavruları Cemre ve Efecan'ın kan örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15791. nükleotidde gözlemlenen benzerlik ve Klon Ecem kan örneğinde aynı nükleotidde yavrulardan farklılık.....	49
Şekil 4.21: Klon Ecem doku ve yavruları Cemre ve Efecan'ın kan örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15821. nükleotidde gözlemlenen benzerlik ve Klon Ecem kan örneğinde aynı nükleotidde yavrulardan farklılık.....	50
Şekil 4.22: Klon Ecem doku ve yavruları Cemre ve Efecan'ın kan örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15892. nükleotidde gözlemlenen benzerlik ve Klon Ecem kan örneğinde aynı nükleotidde yavrulardan farklılık.....	51
Şekil 4.23: Klon Ecem doku ve yavruları Cemre ve Efecan'ın kan örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15937. nükleotidde gözlemlenen benzerlik ve Klon Ecem kan örneğinde aynı nükleotidde yavrulardan farklılık.....	52
Şekil 4.24: Klon Ecem doku ve yavruları Cemre ve Efecan'ın kan örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15983. nükleotidde gözlemlenen benzerlik ve Klon Ecem kan örneğinde aynı nükleotidde yavrulardan farklılık.....	53

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Adenin nükleotidi
ADP	: Adenozin Difosfat
APS	: Amonyum Persülfat
ATP	: Adenozin Trifosfat
bç	: Baz çifti
C	: Sitozin nükleotidi
CO <sub>2</sub>	: Karbondioksit
dH <sub>2</sub> O	: Distile su
DMEM	: Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotid Trifosfat
DPBS	: Dulbecco'nun fosfat içeren tuz tamponu
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EKH	: Embriyonik Kök Hücre
FBS	: Fetal buzağı serumu
G	: Guanin nükleotidi
g	: Gram
GAA	: Glasiyal Asetik Asit
kb	: Kilobaz
M	: Molar
mg	: Miligram
MgCl <sub>2</sub>	: Magnezyum klorür
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
NaCl	: Sodyum klorür
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Dehidrogenaz
NaOH	: Sodyum hidroksit
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	: Sodyum karbonat
nDNA	: Çekirdek DNA
ng	: Nanogram
NT	: Nükleer Transfer
nt	: Nükleotid
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RE	: Restriksiyon Enzimi
RNA	: Ribonükleik Asit
RFLP	: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
SHNT	: Somatik Hücre Nükleer Trasfer
SDS	: Sodyumdedosilsülfat
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
SSCP	: Tek İplikli Konformasyon Polimorfizmi
STE	: Sodyum Tris EDTA tampon çözeltisi
T	: Timin Nükleotidi
TBE	: Tris-borik asit-EDTA tampon çözeltisi
TE	: Tris-EDTA

tRNA	: Taşıyıcı RNA
U	: Ünite
UV	: Ultraviole
$\mu\text{M}$	: Mikromolar
$\mu\text{L}$	: Mikrolitre

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve tüm yüksek lisans eğitimim sürecinde yakın ilgi ve önerileriyle beni yönlendiren, laboratuvar analizleri ile pratik kazanmamı sağlayan, düşünceleriyle bana daima yol gösteren, bilgi ve desteğini esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Sezen ARAT'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez projem kapsamındaki tüm laboratuvar çalışmalarında özveri ile yardımcı olan, laboratuvarda karşılaştığım birçok sorunun çözümünde bana yol gösteren, mesai harcayarak destek olan, moleküler genetik tekniklerin uygulanmasında, sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanmasında desteklerini gördüğüm ve bilgilerini benimle paylaşan değerli hocalarım Doç. Dr. Fulya ÖZDİL (NKÜ, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü), Doç. Dr. Emel ÖZKAN ÜNAL (NKÜ, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü), Doç. Dr. Rıfat BİRCAN (NKÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü), Yrd. Doç. Dr. Behiye Banu BİLGİN (NKÜ, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü ), Arş. Gör. Dr. Raziye IŞIK'a (NKÜ, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü ) ve bu günlere gelmemde emekleri olan, beni yetiştiren Namık Kemal Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

DNA örneklerini ve dizi analiz sonuçlarını kullandığım, laboratuvar çalışmalarında bana her zaman yardımcı olan Ziraat Yüksek Mühendisi Emel TÜTEN SEVİM'e, desteklerini benden esirgemeyen, tanımaktan büyük mutluluk duyduğum değerli yüksek lisans arkadaşlarıma ve tez çalışmam süresince yardım ve sabırları için tüm mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Oğulları olmaktan gurur duyduğum, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim, annem ve babama, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kasım, 2017

Volkan SÖNMEZ

## 1. GİRİŞ

Klon, bir canlıdan eşeyli üreme olmaksızın oluşturulan ve aynı genetik yapıya sahip olan yavru olarak tanımlanabilmektedir. Örneğin; tek yumurta ikizleri doğal klonlardır ve bu durum klonlama tekniğinin ilerlemesi noktasında başlangıç noktası olarak kabul edilebilmektedir (Arat 2010). Günümüzde nükleer transfer (NT) yöntemiyle klonlama, klonlanmak istenen canlının, eşeysiz üreme yoluyla, genetik olarak birebir kopyasının oluşturulması şeklinde tanımlanmaktadır. Klonlama teknolojisi, ileri üreme teknikleri ve mikrocerrahi yöntemleri kullanılarak erişkin bir hücre çekirdeğinin, yumurta hücresi içerisinde geriye programlanarak embriyonal döneme geri dönmesi esasına dayanmaktadır. Programlanmaya etki eden faktörler, tam olarak aydınlığa kavuşturulabilmiş değildir. Klonlama teknolojisi kullanılarak üretilen klonların ve onların jenerasyonlarının moleküler genetik metodlar kullanılarak ayrıntılı bir biçimde tanımlanması, teknolojinin daha anlaşılır hale gelmesinde ve geliştirilmesinde yararlı olacaktır (Arat 2010, Keefer 2015, Arat 2017).

Modern biyoteknolojinin ulaştığı son noktalardan biri olan klonlamanın pratikte bazı önemli çıktıları bulunmaktadır. Bunlardan başlıcaları; nesli tükenmiş ve tükenmekte olan hayvanların genetik kopyalarının oluşturulması yoluyla geri getirilmesi, nesli tükenmeye giden ırk veya türlerin korunma altına alınması, üstün genetik yapıya sahip veya hastalıklara dirençli bireylerin sayısının artırılması ve bazı hastalıklara karşı yürütülen alternatif ve yeni nesil tedavi yaklaşımlarında bu teknolojinin kullanılmasıdır (Campbell 2002).

İlk klonlama çalışmaları 1980’li yılların başlarında, embriyonun bölünmesi ve bir embriyodan birden fazla canlının oluşturulması ile başlamıştır. İlk defa 1997 yılında, “Dolly” adında, erişkin bir koyunun genetik kopyası yapılmıştır (Wilmot ve ark. 1997). İlk klonu takiben sığır, keçi, at, domuz, tavşan, manda, katır, köpek, kedi, fare, gelincik, sıçan ve deve gibi birçok memeli türü aynı yöntem kullanılarak klonlanmıştır (Cibelli ve ark. 1998, Wakayama ve ark. 1998, Baguisi ve ark. 1999, Onishi ve ark. 2000, Chesne ve ark. 2002, Shin ve ark. 2002, Zhou ve ark. 2003, Galli ve ark. 2003, Woods ve ark. 2003, Lee ve ark. 2005, Shi ve ark. 2007, Wani ve ark. 2010). Klonlama çalışmalarında büyük ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen klon canlı yavru eldesinde verimlilik henüz % 0,5-5 civarındadır. Yapılan denemelerde, doğum öncesi veya doğum sonrası dönemlerde büyük oranda kayıplarla karşılaşılabilir. Söz konusu sorunlarla özellikle gebeliğin ilk üç ayında karşılaşılırsa da, ilerleyen dönemlerde de kayıplar görülebilmektedir. Ayrıca,

nükleer transfer çalışmalarındaki verimlilik oranının çalışmanın yürütüldüğü laboratuvarlara göre de radikal şekilde değişiklik gösterebildiği kaydedilmiştir (Smith ve ark. 2000, Heyman ve ark. 2002, Hill ve Chavatte-Palmer 2002, Pace ve ark. 2002, Chavatte-Palmer ve ark. 2004, Shi ve ark. 2007, Wani ve ark. 2010).

Klonlama sürecinde üzerinde durulan konulardan biri hücrenin geriye programlanmasında etkili olduğu düşünülen mtDNA kaynağıdır. Klonun mitokondriyal DNA (mtDNA)'sının alıcı hücreden mi, yoksa verici hücreden mi yoksa her ikisinden mi kaynaklandığı hala tartışma konusudur. Genelde klondaki mtDNA yapılarının alıcı oositten geleceği öngörülmektedir. Ancak nükleer transfer (NT) sonrası hayvanlarda iki farklı kökene ait mtDNA varlığı, yani heteroplazmisi meydana gelebilmektedir. Bu durumda farklı kökenden genetik materyallerin birbiriyle uyumu önemli bir noktadır. Yine, somatik hücre nükleer transferi sürecinde, gerek oositin maturasyonu sırasında gerekse hücre kültürü sırasında mtDNA'ya hasar verilebilmekte ve bu durum oosit içerisinde kusurlu mtDNA ile sonuçlanabilmektedir Tüm bu konularda çok az çalışma vardır ve mtDNA geçişinin nasıl organize edildiği hala aydınlatılamamıştır. Yapılan çalışmaların çoğunda NT ile elde edilen hayvanlarda verici hücre kaynaklı mtDNA tespit edilememiş veya çok düşük seviyelerde tespit edilmiştir (Evans ve ark. 1999, Steinborn ve ark. 2000, Meirelles ve ark. 2001, Takeda ve ark. 2003, 2006).

Bununla beraber klonların bazılarında, farklı dokularında verici hücreden geçen mtDNA'nın varlığı, hücre kaynaklı mtDNA replikasyonunu göstermektedir (Takeda ve ark. 2003, Han ve ark. 2004, St. John ve ark. 2005, Smith ve ark. 2005). Ayrıca mtDNA'nın jenerasyonlara geçişinin çalışıldığı bir çalışmada klon yavruları arasında farklı mtDNA geçişi ile ilgili sonuçlar bildirilmektedir (Takeda ve ark. 2008). Elde edilen mtDNA kompozisyonundaki farklılıkların sebebi çalışmalarda uygulanan farklı NT prosedüründen veya nükleositooplazmik etkileşiminden kaynaklanmış olabilir (St. John ve ark. 2005). Ayrıca klonlamanın etkinliğini arttırmak amacıyla oosit ve DNA kaynağı verici hücrenin otolog olması ve aynı mtDNA haplotipine sahip olması üzerine yapılan çalışmalar bulunmaktadır (Yang ve ark. 2006, Yan ve ark. 2010). Ancak nesli tehlike altında olan veya tamamen ortadan kaybolmuş ırkların klonlanmasında böyle seçimlerin yapılması mümkün değildir. Bu çalışmanın materyalini oluşturan boz sığır klonlarında Boz ırkın hücresi Holstain ırkın yumurtası içine transfer edilmiş ve ırklar arası NT yapılmıştır. Bu nedenle gelecekte hücre bankalarının bu amaçlarla kullanılabilirliğinin daha iyi anlaşılabilmesi için ırklar arası NT ile



elde edilen bu klonların ve onların yavrularının daha ayrıntılı incelenmesi ve karakterize edilmeleri yararlı olacaktır.

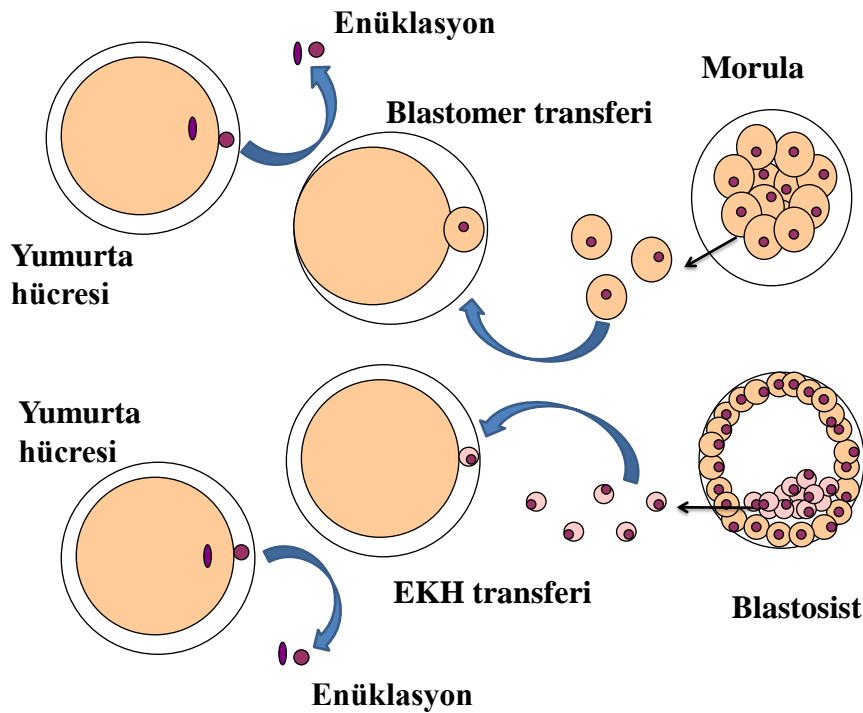
Bu çalışmada daha önce “TÜBİTAK-TOVAG-104O360-Anadolu Yerli Sığır Irklarının Klonlanması” projesi ile üretilmiş 5 klon boz sığır (1 erkek, 4 dişi), bu klonların yavruları (F<sub>1</sub> jenerasyonu olan 3 erkek, 5 dişi), bu yavruların yavruları (F<sub>2</sub> jenerasyonu olan 2 erkek, 1 dişi) ve klonların üretilmesinde kullanılan 3 hücre hattı çalışmanın ana materyalini oluşturmuştur. Bireylerden alınan kan, doku, sperm örneklerinden ve hücre hatlarından izolasyonu yapılan DNA’lardan D-loop’u içeren 999 baz çiftlik (bç) mtDNA bölgesi PCR ile çoğaltılıp, enzim kesimi ile haplotip analizi, tek iplikli konformasyon polimorfizmi analizi (Single Strand Conformation Polymorphism-SSCP) ve sekans analizi ile mtDNA heteroplazmisi varlığı araştırılmıştır. Bu çalışmada, sayıları gitgide azalmakta olan bir ırkın, farklı ırka ait çekirdeği çıkarılmış yumurta hücresi kullanılarak elde edilen klonların durumu çeşitli yönleriyle ortaya konmaya çalışılmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1 Klonlama ve Klonlamada Kullanılan Hücre Kaynakları ve Tipleri

Klonlama, çeşitli bilim dallarınca farklı şekillerde tanımlanabilmektedir. Moleküler biyolojide, DNA'nın identik kopyasının oluşturulması olarak tanımlanırken, hayvan biyolojisinde nükleer transfer metoduyla bir hayvanın genetik kopyasının oluşturulması olarak tanımlanmaktadır.

Nükleer transfer ile klonlama, farklılaşmamış embriyonik hücre çekirdeğinin (blastomer), çekirdeği çıkartılmış (enükle edilmiş) yumurta hücresi veya zigot içine transfer edilmesi anlamına gelmektedir (Şekil 2.1). Memeli hayvanlarda bu teknik ilk olarak başarılı bir şekilde koyunlarda uygulanmıştır (Willadsen 1986). Takip eden yıllarda sığırdan (Prather ve ark. 1987), tavşanda (Stice ve Robl 1988) ve domuzda da uygulama gerçekleştirilmiştir (Prather ve ark. 1989).

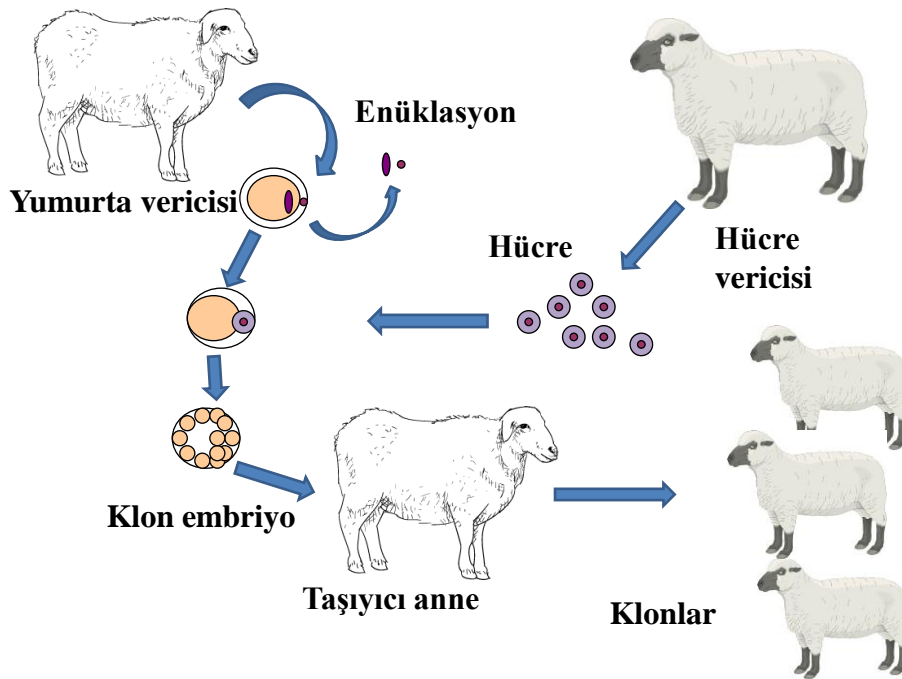


Şekil 2. 1. Blastomer ve embriyonik kök hücre (EKH) transferi ile klonlama (Arat 2017)

Nükleer transfer işleminde kullanılan hücreler embriyonik hücreler (blastomer veya embriyonik kök hücre), fetal ve erişkin vücut hücreleri olmak üzere üç grupta değerlendirilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalara bakıldığında vücut hücrelerinin daha

çok tercih edildiği görülmektedir. Bugüne kadar yapılmış klonlama çalışmalarında hücre kaynağı olarak embriyonik hücreler, fibroblastlar, meme bezi hücreleri, kumulus hücreleri, yumurta hücreleri, lökositler, granüloza hücreleri, germ hücreleri, kas hücreleri, karaciğer hücreleri ve kıkırdak hücreleri gibi çeşitli hücre tipleri kullanılmıştır (Campbell ve ark. 1996, Wilmut ve ark. 1997, Cibelli ve ark. 1998, Arat ve ark. 2001, Brem ve Kuhholzer 2002, Arat ve ark. 2011).

Günümüzdeki anlamı ile klonlama, erişkin bir canlıdan alınan vücut hücresinin o türe ait genetik materyali çıkartılmış bir yumurta hücresi içerisine yerleştirilmesi ve vücut hücresi alınan canlının birebir kopyası olan bir embriyo oluşturulmasıdır (Arat 2010) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Klonlama tekniği şeması (Arat 2017)

### 2.1.1 Klonlamanın temel basamakları

- i) Klonlanacak hayvandan hücrenin elde edilmesi
- ii) Olgun yumurtanın (Metafaz II oositinin) kutup hücresi ve metafaz kromozomlarının uzaklaştırılması (enükleasyon işlemi)
- iii) Kültüre edilen sessiz fazdaki (G0-G1) verici hücrenin, enükle MII oositinin perivitellin boşluğuna bırakılması
- iv) Verici hücre ve oositin füzyona tabi tutulması

- v) Kimyasallar veya elektrik akımı kullanarak hücre bölünmesinin aktivasyonu
- vi) Gelişimi başarılı olmuş embriyoların taşıyıcı dişilere aktarılması
- vii) Verici hücre ile tamamen aynı nükleer genlere sahip klon yavrunun elde edilmesi

## **2.2 Mitokondri, mitokondriyal DNA (mtDNA) ve D-loop Bölgesi**

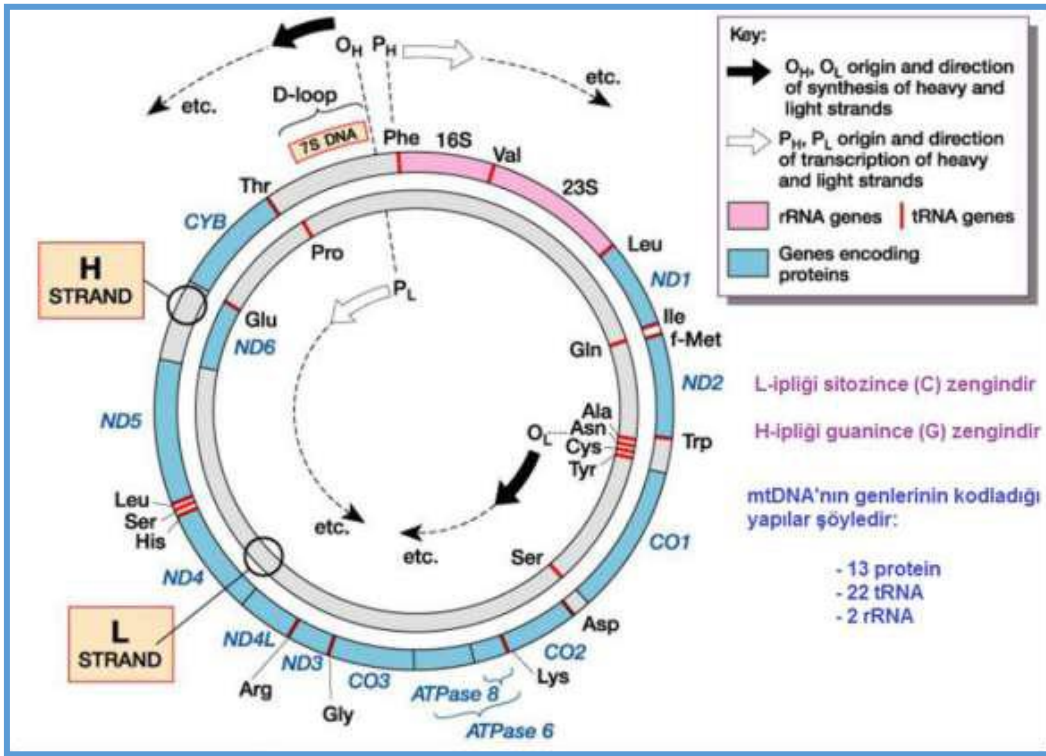
### **2.2.1 Mitokondri**

Canlılarda kalıtım materyali olan çekirdek dışında sitoplazmada yer alan, bitkilerde kloroplastta, hayvan ve insanlarda mitokondride de kalıtım materyali bulunmaktadır. Bu organeller hücre sitoplazmasına dağılmış vaziyettedir. Ökaryotlarda bulunan mitokondri, hücre içi işlevlerde gerekli enerjinin sağlanabilmesi için oksidatif fosforilasyon yoluyla adenozin tri fosfat (ATP) üretilmesini sağlayan önemli organellerinden biridir. Ayrıca, hücre sinyallerinin iletilmesi ve apoptoz süreci gibi birçok hücrel tepkimede görev almaktadır (Griffiths ve ark. 2012). Mitokondri çift zarla çevrili ve büyüklüğü 0,5-1 µm olan bir yapıdır. Hücrelerdeki mitokondri sayısı hücreden hücreye, özellikle de hücrenin aktiflik ve enerji gerektiren işleyişinin bulunup bulunmamasına göre değişiklik göstermektedir. Söz konusu sayı, hücreye göre genellikle 500-1000 arasında değişmekle birlikte, yumurta hücrelerinde bu sayı 10000'lere ulaşabilmektedir (Cummins 1998, Rokas ve ark. 2003).

### **2.2.2 mtDNA ve özellikleri**

Atasal olarak bakteri kökenli olduğu düşünülen mitokondrinin işlevinde oldukça önemli bir yer tutan genetik materyal (mtDNA) bulunmaktadır. Eşeyli çoğalan türlerde mtDNA molekülü temel olarak halkasaldir. Köken olarak maternal bir özellik taşımaktadır. Spermatazoonlar, yumurta hücrelerine göre çok daha az mtDNA kopyası taşırlar. Bir hücrede yer alan mtDNA'nın % 0,1'den daha azı paternal kökenli olup genotip ve olasılıkla fenotip üzerindeki rolü çok azdır (Wang 1996, Fourtounis 1999, Chinnery ve Schon 2003). mtDNA'da intron bölgelerinin bulunmadığı, ancak küçük intergenik aralıkların bulunduğu bilinmektedir. Bu nedenden dolayı, 1000 baz çifti uzunluğundaki D-loop bölgesi haricinde genomunun neredeyse tüm bölgelerinin transkribe olduğu, protein, enzim, rRNA ve tRNA gibi bir ürün karşılığının bulunduğu bildirilmiştir (Cornuet ve Garnery 1991, Griffiths ve ark. 2012). Her mitokondri 2-10 mtDNA'ya sahiptir ve her mtDNA molekülü yaklaşık 16,3-17,0 kb büyüklüğündedir. Her bir mtDNA molekülü ADP (Adenozindifosfat)'den ATP'nin elde edilmesi sürecinde görevli 13 elektron taşıma zinciri proteini, 2 adet rRNA ve 22 adet tRNA

geni olmak üzere 37 gen içeren bir yapıdır (Şekil 2.3). Protein kodlayan genler NADH dehidrogenaz (Nikotinamid Adenin Dinükleotid Dehidrogenaz), sitokrom C oksidoredüktaz, sitokrom C oksidaz ve ATP sentetaz enzimlerini kodlamaktadır. CO genleri sitokrom oksidazın, ND genleri ise NADH dehidrogenazın kodlanmasından sorumludur (Lewin 1987). Diğer mitokondriyal proteinler nükleer genom tarafından kodlanmaktadır (Wang 1996, Fourtounis 1999). mtDNA uzunluğunun sığırdaki 16338 bp (Anderson ve ark. 1982), koyunda 16616 bp (Hiendleder ve ark. 1998) ve domuzda 16679 bp (Ursing ve Arnason 1998) olduğu kaydedilmiştir.



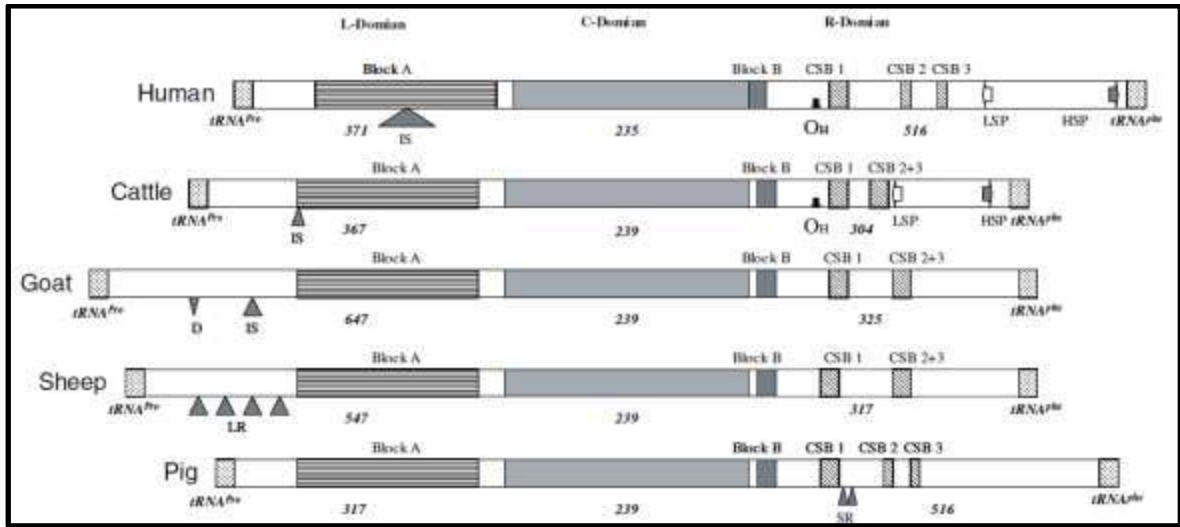
Şekil 2.3. mtDNA'nın yapısı (Strachan ve Read 2010)

mtDNA genomu tamamen tanımlanmış olup genotipleri homoplazmik bir yapı arz etmektedir. Hücrede, iki farklı tip mtDNA bulunması durumu "heteroplazmi" olarak adlandırılır. Bireyde, hem anneye ait hem de babaya ait mtDNA'nın birlikte bulunması (Zsurka ve ark. 2005), sağlıklı mtDNA yanında mutant mtDNA'nın bulunması (Özdemir ve Doğru 2007), ikizlerde görülen intrauterin gelişim sırasında embriyolar arasında vasküler anastomozdan (Hiendleder ve Wolf 2003) kaynaklanan karşılıklı hücre değişimi heteroplazminin sebepleri arasında sayılmaktadır.

Aynı kromozom üzerinde, bağlantı halinde bulunan ve birlikte dölden dölle aktarılan özgün bağlantı gruplarına “haplotip” denmektedir. Aynı zamanda mtDNA genotipleri de “haplotip” olarak isimlendirilir. Haplotipler, tek genomlu (n kromozomlu) canlıların genotipini ifade ederken, mitokondriyal özellikler bakımından genotiplerin tanımlanmasında kullanılır (Özdil 2007, Piljug 2016).

### 2.2.3 mtDNA D-loop bölgesi

mtDNA’da kodlanmayan tek bölge D-loop (displacement loop-kontrol bölge) bölgesidir. Yaklaşık 1000 bp uzunluğa sahip olan bölge, hem H-ipliğinin replikasyon orijini, hem de her iki ipliğin promotor bölgelerini içermektedir (Cornuet ve Garnery 1991). Mitokondriyal genomun diğer kısımlarına göre 3-5 kat daha hızlı evrimleştiği bildirilen D-loop bölgesinin (Wenink ve ark. 1994), L-Domain (5’-end, left domain / sol etki alanı), C-Domain (central domain / merkez alanı) ve R-Domain (3’-end, right domain / sağa etki alanı) olmak üzere üç ana alanı bulunmaktadır (Sultana ve Mannen 2004) (Şekil 2.4).



**Şekil 2. 4.** İnsanın ve hayvanların D-loop bölgelerinin karşılaştırması (Sultana ve Mannen 2004)

Sığır mtDNA’sı 16338 baz çiftinden oluşan, çift iplikli, halkasal bir DNA’dır. Sığır mtDNA’sında yaklaşık % 61 oranında A+T’ce zengin bölge bulunmaktadır. Aslında bu bölge D-loop bölgesidir (AF492351.1) (Çizelge 2.1)

**Çizelge 2.1.** Sığırlarda mtDNA genomunun organizasyonu (GenBank: AF492351.1 numaralı mtDNA bölgesine göre düzenlenmiştir)

Gen ismi	Lokasyon	Uzunluk (bç)
<b>D-loop</b>	<b>15429..16338</b>	<b>910</b>
tRNA-Phe	1..67	67
s-rRNA	68..1023	956
tRNA-Val	1024..1090	67
l-rRNA	1091..2660	1570
tRNA-Leu	2661..2735	75
ND1	2738..3694	957
tRNA-ile	3694..3762	69
tRNA-Gln	3760..3831	72
tRNA-Met	3834..3902	69
ND2	3903..4946	1044
tRNA-Trp	4945..5011	67
tRNA-Ala	5013..5081	69
tRNA-Asn	5083..5155	73
rep_origin	5156..5187	32
tRNA-Cys	5188..5254	67
tRNA-Tyr	5255..5322	68
COX1	5324..6868	1545
tRNA-Ser	6866..6936	71
tRNA-Asp	6942..7009	68
COX2	7011..7694	684
tRNA-Lys	7698..7764	67
ATP8	7766..7966	201
ATP6	7927..8607	681
COX3	8607..9390	784
tRNA-Gly	9391..9459	69
ND3	9460..9805	346
tRNA-Arg	9807..9875	69
ND4L	9876..10172	297
ND4	10166..11543	1378
tRNA-His	11544..11613	70
tRNA-Ser	11614..11673	60
tRNA-Leu	11675..11745	71
ND5	11746..13566	1821
ND6	13550..14077	528
tRNA-Glu	14078..14146	69
CYTB	14151..15290	1140
tRNA-Thr	15294..15363	70
tRNA-Pro	15363..15428	66

### 2.3 Moleküler Genetik Çalışmalarda mtDNA'nın Kullanıldığı Yerler

Evrimleşme karakteristiğinden (Wenink ve ark. 1994) dolayı bu bölge, populasyon yapısının belirlenmesinde ırklar arasındaki ayırım ve filogenetik ağaçların çizilmesi gibi araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. mtDNA ile ilgili karakterler populasyonların tanımlanması, populasyon ve ekotiplerin orijinlerinin belirlenmesi, populasyonların coğrafi dağılımlarının ortaya konması, alt tür içerisindeki haplotiplerin belirlenmesi, populasyonlar arasındaki gen akışı ve hibritlenme seviyelerinin tahmin edilmesi, anasal kalıtım modellerinin izlenmesi, populasyonlar içi/arası genetik varyasyon düzeylerinin hesaplanması ve populasyonların genetik benzerlik ve farklılıklarından yararlanılarak filogenetik ilişkilerin tespit edilmesi çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Özgül 2007).

Söz konusu yaygın kullanımda, mtDNA'nın bazı özellikleri ayrıcalıklı bir rol oynar. Örneğin, molekülün boyutu küçük ve elde edilmesi kolaydır. Bu durum birçok moleküler yöntemin (DNA dizileme, PCR, RFLP, SSCP, SNP gibi) kullanımını açısından idealdir. PCR-RFLP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Restriksiyon Parçası Uzunluk Polimorfizmi) metodu ile bireyler arası inter ve intraspesifik ilişkiler ortaya konabilmektedir (Uphold ve Dawid 1977, Hecht 1990). Yine, mtDNA'nın moleküler analizi bireyler arası genetik mesafe, populasyondaki varyasyon, gen akışı, etkili populasyon büyüklüğü, bireyin biyografisi, ortak ata tespiti, doğum öncesi araştırma, gen klonlanması, doku tipleni ve enfeksiyon ajanlarının tespiti (Meghen ve ark. 2002), populasyonlar arası akrabalık derecelerinin belirlenmesi, ırklardaki genetik çeşitliliğin tespiti, filogenetik ilişkinin tespiti ve başarılı yetiştirme stratejilerinin geliştirilmesi gibi çalışma ve araştırma alanlarına katkı sağlayabileceği bildirilmektedir (Zhang ve Shi 1992, Chen ve Leibenguth 1995).

### 2.4 Doğal Üremde mtDNA Kalıtımı

Memelilerde mitokondriyal DNA'nın maternal kalıtımı ilk olarak 1974 yılında at x eşek hibritinde gösterilmiştir (Hutchison ve ark 1974). Takibinde, benzer veriler rodentlerde ve insanlarda yapılan çalışmalardan da elde edilmiştir (Hiendleder 2007). Söz konusu maternal kalıtım, yumurta ve spermatozondaki mtDNA kopyası sayısındaki farklılıkla ilişkilendirilmiştir (Gyllensten ve ark. 1985). Yapılan çalışmalarda spermatozonda yaklaşık 10 mtDNA kopyası belirlenirken (May-Panloup ve ark. 2003), yumurta hücresinde  $317-795 \times 10^5$  mtDNA kopyası saptanmıştır.



Baba kaynaklı mtDNA varlığı ilk olarak, *Mus musculus* ve *Mus spretus* hibritlerinin, geri melezlerinde saptanmıştır. Bu çalışmada elde edilen baba kökenli mtDNA varlığı, yavruda mtDNA'nın cinsiyete bağlı seçilimi konusunun mekanizması hakkında bazı ipuçları sağlamış olup, mtDNA eliminasyonunun tür içi bir özellik taşıyor olabileceğini göstermiştir. Aynı tür içinde oluşan melezlerde hücredeki genetik materyal yarışması babaya ait mtDNA'yı elemine edebilirken, farklı türlere ait hibritlerde babasal mtDNA'nın kalabileceği öne sürülmüştür. Bu sav, *M. musculus* tür içi melezleri ile *M. musculus* ve *M. spretus* hibritleri arasında yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda açıkça gösterilmiştir. Tür içi melezlerde babasal mtDNA sadece pronükleus aşamasında görülmüştür. Öte yandan, türler arası hibritlerde babasal mtDNA yavrunun bütün gelişim dönemlerinde saptanmıştır. Yapılan ek çalışmalarda, babasal *M. musculus* mtDNA'sı taşıyan hibrit yavrulara (*M. Musculus* x *M. spretus* hibriti) ait sperma ile döllenmiş *M. musculus* yumurtasında, spermatazoondan gelen mtDNA'ların yumurta tarafından elemine edilebildiği görülmüştür. Kaneda ve ark. (1995) bu sürecin mtDNA'nın kendisinden değil, spermde bulunan özel bir proteinden kaynaklandığını ifade etmişlerdir. Sutovsky ve ark. (1999, 2004) tarafından yapılan destekleyici araştırmalar, söz konusu babasal mtDNA eliminasyonunun, fertilizasyondan hemen sonra meydana gelen proteozomal ve/veya lizozomal sindirim ile gerçekleştiğini göstermiştir.

Tür içi melezlemelerde, babasal mtDNA'nın tamamen elemine olduğu ve yavrunun tümünden anne mtDNA'sına sahip olduğu ile ilgili inanış, 2002 yılından itibaren gelmeye başlayan yeni çalışma verileriyle temelden sarsılmıştır (Hiendleder 2007). Bu durum ilk olarak, mitokondriyal myopati sorunu yaşayan, heteroplazmik bir bireyde ortaya konmuş, aynı hastada hem anasal hem de babasal mtDNA'ların varlığı belirlenmiştir. Çalışmalar, insanlardaki iskelet kaslarında babasal mtDNA'nın da yaygın olarak bulunabildiğini açıkça göstermiş durumdadır (Zsurka ve ark. 2005).

## **2.5 Somatik Hücre Nükleer Transferi (SHNT) Sonrası mtDNA Kalıtımı**

### **2.5.1 Tür içi SHNT sonrası mtDNA kalıtımı**

Klon embriyo blastomerlerinde veya klon nesillerde yapılan analizlerde değişen derecelerde heteroplazmiye rastlanmıştır, klonlarda, nükleer verici hücrelerine ait mtDNA'ların da olabileceği anlaşılmıştır (Hiendleder 2007). Yapılan deneysel çalışmalarda, mikroenjeksiyon yöntemiyle değişen derecelerde heteroplazmik hücreler elde edilebilmiştir (Hiendleder ve Wolf 2003). Esasen, Dolly ve diğer koyun klonlarda

yapılan ilk araştırmalarda heteroplazmi tespit edilememiştir (Evans ve ark. 1999, Loi ve ark. 2001). Ancak takip eden sığır, keçi, domuz ve fare klonlarında değişen derecelerde verici hücre mtDNA'sı kaynaklı heteroplazmi tespit edilmiştir (Steinborn ve ark. 2000, Jiang ve ark. 2004, Inoue ve ark. 2004, St. John ve ark. 2005). Öte yandan, SHNT embriyo ve nesillerinde mtDNA analizleri ile ilgili zorluklar, bu konuda elde edilmiş verilerin kesinliğini de tartışmalı hale getirmektedir. Bu noktada, verici hücre tipi, verici hücrenin pasaj sayısı ve embriyonun kültür koşulları etkilidir. Ayrıca, heteroplazminin belirlenmesi amacıyla kullanılan analizler ve biyolojik materyaller birbirinden farklı sonuçlar verebilmektedir (Hiendleder 2007). Konu ile ilgili olarak kesinleşmiş verileri řu şekilde sıralamak mümkündür: i) Koyun, sığır ve domuzlardan elde edilen SHNT bireyler genelde homoplazmikler veya nükleer verici hücrelerinden kaynaklı kısmi heteroplazmilere rastlanmaktadır (Evans ve ark. 1999, Steinborn ve ark. 2000, Loi ve ark. 2001, Do ve ark. 2002, Steinborn ve ark. 2002); ii) Heteroplazminin derecesi dokunun çeşidine bağlıdır (Steinborn ve ark. 2000, 2002, Hiendleder ve Wolf 2003, Inoue ve ark. 2004 Takeda ve ark. 2003, 2006); iii) Bazı SHNT bireyler normalden çok daha yüksek düzeyde bir heteroplazmi seviyesine sahip olabilmektedirler. En yüksek heteroplazmi seviyesine, alıcı ve vericinin intrasubspesifik kombinasyonlarında rastlanmaktadır (Steinborn ve ark. 2002, Inoue ve ark. 2004, Takeda ve ark. 2003, 2006) ve bu durum olasılıkla, mtDNA üretiminden sorumlu nükleer genlerle ilişkilidir (Battersby ve ark. 2003). Çalışmalar, heteroplazmik dişilerin, sahip oldukları heteroplazmiyi sonraki nesillere de aktarabildiğini göstermiştir (Takeda ve ark. 2006).

Heteroplazminin klon hayvanın organ ve dokularına göre değişebildiğine yönelik bazı önemli çalışmalar bulunmaktadır. Öte yandan, Evans ve ark. (1999) yapmış oldukları çalışmada, somatik hücre hattından klonlanan ilk klon hayvan "Dolly" ve nükleer transfer ile üretilmiş diğer 9 koyunun mtDNA'sı incelenmiş ve verici hücrenden herhangi bir mtDNA katkısı olmadan sadece alıcı yumurta mtDNA'sından oluştuğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, Steinborn ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışmaya göre 3 nükleer verici hücre tipinden üretilmiş 6 fetüs (60-212 gün) ve 4 buzağıdan alınan çeşitli dokularda (kalp, böbrek, karaciğer, akciğer, kas ve deri) % 0,1 ile 4 arasında verici hücre mtDNA'sı aktarımına rastlanmıştır. Yine, 12 tane klon koyunun 7'sinde verici hücre mtDNA'nın aktarımına rastlanmış, 1 klon hariç 6'sında % 1'in altında verici hücre mtDNA'sı (düşük düzeyde % 0,1 ve % 0,9) tespit edilmiştir (Burgstaller ve ark. 2007). Başka çalışmalarda sığırlarda, fare ve domuzlarda da verici mtDNA geçişinin olabildiği gösterilmiştir (Burgstaller ve ark. 2015).

## **2.5.2 Türler arası SHNT sonrası mtDNA kalıtımı**

Sığır, koyun, keçi, domuz gibi hayvanlara ait tür içi SHNT klonlarında heteroplazmiye yaygın olarak rastlanmıştır; ancak kaydedilen heteroplazmi seviyeleri değişkendir. Yine, söz konusu heteroplazminin zigotun bölünme sürecinde giderek değiştiği, embriyonun 16 hücreli aşamasından veya morula aşamasından itibaren verici hücre mtDNA seviyesinin azaldığı bildirilmiştir. Bu değişim, genomun zaman içerisinde aktive olmasıyla ilişkilendirilmektedir. Yapılan çalışmalar, ooplazmik transfer ile yeni bir yumurtaya aktarılan mitokondrilerin, aktarılan hücrede inaktive edildiği, mevcut mitokondrilerle karıştırılmadığı, ancak in vitro kültürün 144. saatinde bile bir yığın halinde bulunabildikleri, ortadan kalkmadıkları gözlenmiştir. Konu ile ilgili yapılmış çalışmalardan bazı sonuçlar elde edilmiştir; ancak veriler henüz tam kesinleşmiş değildir ve farklı türlerden farklı sonuçlar elde edilebilmektedir (Hiendleder 2007).

## **2.6 mtDNA Analiz Yöntemleri**

### **2.6.1 PCR-RFLP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu - Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi)**

RFLP analizinde, restriksiyon enzimleri (RE) ile çalışılan lokustaki allelik uzunluğa dayalı polimorfizm incelenir. RFLP tekniği popülasyonlarda, DNA nükleotid dizisinde bireyler arasında insersiyon, delesyon ve nokta mutasyonları şeklinde meydana gelen değişimlerin tanımlanmasını sağlamaktadır. RFLP iki şekilde uygulanabilir. İlgilenilen DNA uygun restriksiyon enzimi ile kesilir ve Southern blot ile membrana transfer edilir. Denatürasyonla tek zincirli hale getirilir. İncelenen bölgenin yanındaki tek kopya diziye komplementer olan işaretli proba hibridize edilir. Diğer bir yol ise, polimorfik bölgenin PCR ile çoğaltılıp restriksiyon enzimi ile kesilmesidir. Kesim ürünleri agaroz veya poliakrilamid jelde elektroforeze tabi tutulur (Lüleyap 2008, Işık ve ark. 2017).

Hibridizasyona dayalı RFLP markerlerinin birçok avantajları vardır. RFLP markeri bir tür için bir kez haritalandığında diğer türler, cinsler ve hatta familyalar için de kullanılabilir. Farklı laboratuvarlarda tekrarlanabilirliği yüksektir. Orta düzeyde polimorfizm göstermekte ve kodominant özelliكتedir. RFLP markerlerinin en önemli dezavantajları ise; pahalı, fazla zaman alıcı ve çok fazla iş gücü gerektirmekte ve yüksek miktarda DNA'ya ihtiyaç duymaktadır (Saraçoğlu 2007).

RFLP'nin dezavantajlarının giderilmesi amacıyla geliştirilmiş olan PCR-RFLP yöntemi RFLP metodunun PCR ile kombine edilmiş halidir. Bu sayede fazla miktarda ve kaliteli DNA bulundurma zorunluluğu bertaraf edilebilmiştir. Önce PCR ile istenilen gen bölgesi milyonlarca kez çoğaltılmakta sonra restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi gerçekleştirilmektedir. PCR-RFLP yöntemi günümüzde daha sık kullanılan bir moleküler yöntemdir (Eijk ve ark. 1992, Işık 2016).

## **2.7 SSCP (Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi)**

Tek zincir konformasyon polimorfizmi (SSCP "Single-strand conformational polymorphism") markerleri, 1000 baz çiftinden daha kısa bölgeler için, özellikle nokta mutasyonlarını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir (Orita ve ark. 1989). Bu yöntemde taranacak DNA bölgesi PCR ile çoğaltılarak, belli oranda oligonükleotid ve formamid içeren yükleme boyası ile karıştırılarak uygun ısıda denatürasyona tabi tutulmaktadır. Mutasyon içeren DNA bölgesinin normal diziden farklı bir yapıda katlanıp kıvrılması ile oluşan ikincil yapının, poliakrilamid jel elektroforezinde farklı hızda hareket etmesine dayalı bir yöntemdir.

SSCP analizinin duyarlılığı % 35-100 arasında değişmektedir (Solak ve ark. 2000). Duyarlılığı etkileyen etkenlerden birisi DNA bölgesinin uzunluğudur. Optimal sonuç için DNA parçası uzunluğu 150-300 bp arasında olmalıdır. Örneğin 300 bp'den kısa olan DNA parçalarında başarı oranı % 99 iken bu oran, 300-450 bp uzunluğunda DNA parçalarının incelenmesinde % 90 seviyesine düşmektedir. Bu sebeple uzun DNA molekülünün RE ile kesimi yapılmaktadır.

SSCP analizi başarısı kullanılan jel tipine göre değişmektedir. Poliakrilamid jel, küçük gözeneklere sahip olması nedeniyle DNA fragmentinde varyasyonların belirlenmesinde en çok kullanılan jel tipidir (Ravnik ve ark. 1994).

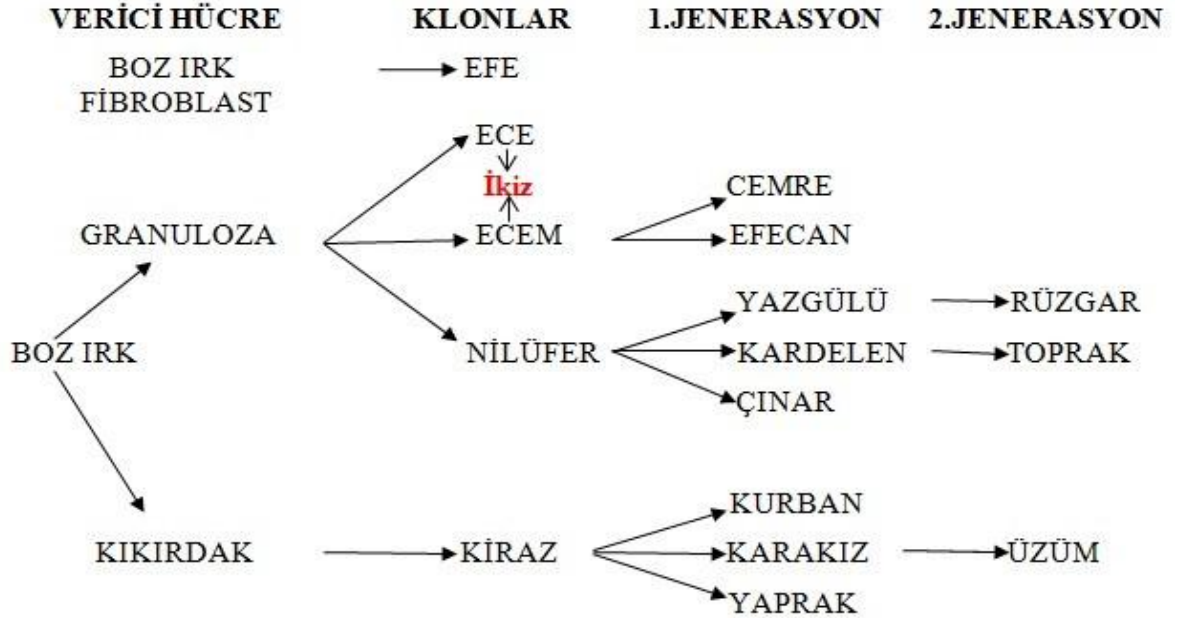
SSCP analizlerinin başarısını ve hassasiyetini etkileyen diğer bir faktör ise düşük pH ve yüksek tuz konsantrasyonuna sahip jellerdir. Düşük pH ile beraber yüksek tuz konsantrasyonları nükleik asit arasındaki fosfat bağlarının kırılmasında oldukça etkin bir ortam oluşturmaktadır. Böylece, tek iplikli DNA fragmentinin farklı konformasyonlara geçişi gerçekleşebilmektedir (Nataraj ve ark. 1999).

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1 Materyal

Çalışmada “TÜBİTAK-TOVAG-104O360-Anadolu Yerli Sığır Irklarının Klonlanması” projesi kapsamında üretilmiş 5 klon boz sığır (1 erkek, 4 dişi), bu klonların yavruları (F<sub>1</sub> jenerasyonu olan 3 erkek, 5 dişi), bu yavruların yavruları (F<sub>2</sub> jenerasyonu olan 2 erkek, 1 dişi) ve klonların üretilmesinde kullanılan 3 hücre hattı kullanılmıştır. Bu kullanılan hücre tipleri fibroblast, kıkırdak ve granüloza hücreleridir (Çizelge 3.1). Erkek klon Efe, boz ırk bir boğadan alınan fibroblast hücresi kullanılarak elde edilmiştir. Dişi klonlar Ece, Ecem ve Nilüfer boz ırk bir sığırdan alınan granüloza hücresi kullanılarak, klon Kiraz ise, aynı sığırın kıkırdak hücresi kullanılarak elde edilmiştir. Ece ve Ecem aynı taşıyıcı anneden doğan ikiz klonlardır. Nükleer transfer işleminde alıcı sitoplazma olarak, mezbahadan alınan holstain ırkı sığır yumurta hücreleri kullanılmıştır. Klonlar ve jenerasyonlarla ilgili bilgi Çizelge 3.1’de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Çalışmada kullanılan verici hücreler, 4 dişi 1 erkek klon, bu klonların yavruları (F<sub>1</sub> jenerasyonu olan 3 erkek, 5 dişi), bu yavruların yavruları (F<sub>2</sub> jenerasyonu olan 2 erkek, 1 dişi)



TÜBİTAK-TOVAG Projesi kapsamında elde edilen klon hayvanlar ve jenerasyonlarından alınan kan örnekleri ile klon hayvanların asıllarına ait hücre örnekleri, Klon Efe’den alınan sperm örneği ve Klon Ece ve Ecem’den alınan kulak doku örneklerinden

DNA izolasyonu yapılmıştır. Çalışmada kullanılan bireyler, örnek numaraları ve DNA izolasyon kaynakları Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Çalışmada kullanılan bireyler, örnek numaraları ve DNA izolasyon kaynakları

Örnek Numarası	Birey	DNA İzolasyon Kaynağı
1	GRANÜLOZA- Hücre Vericisi 2	Hücre
2	ECE- Klon2	Doku, kan
3	ECEM-Klon 3	Doku, kan
4	CEMRE	Kan
5	EFECAN	Kan
6	NİLÜFER-Klon 4	Kan
7	YAZGÜLÜ	Kan
8	RÜZGAR	Kan
9	KARDELEN	Kan
10	TOPRAK	Kan
11	ÇINAR	Kan
12	KIKIRDAK-Hücre Vericisi 2	Hücre
13	KİRAZ-Klon 5	Kan
14	KURBAN	Kan
15	YAPRAK	Kan
16	KARAKIZ	Kan
17	ÜZÜM	Kan
18	FİBROBLAST-Hücre Vericisi 1	Hücre
19	EFE-Klon 1	Kan
20	EFE-Klon 1	Sperm

### 3.1.1 Kullanılan cihaz ve teçhizat

Çalışmanın DNA izolasyonu, PCR, RFLP ve SSCP analizleri sırasında kullanılan cihazlar ve modelleri Çizelge 3.3’te verilmiştir.

### Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan cihaz ve aletler

<b>Cihaz</b>	<b>Model</b>
Buzdolabı +4 °C	Profilo, Türkiye
Hassas terazi	AND GF-600, Hollanda
Otoklav	Alp CL40M, ABD
Ph Metre	Jenco 6173, ABD
Ultra saf su cihazı	Millipor Direct-Q 3 UV, ABD
Soğutmalı Santrifüj (+4°C)	Hettich 320R, Almanya
Mikrodalga fırın	Beko, Türkiye
PCR Isısal Döngü Cihazı (Thermal Cycler)	Applied Biosystem, Veriti, Profilex, ABD
Vorteks	Biosan, Letonya
Jel görüntüleme sistemi	Vilber Lourmart, Avustralya
Laminar Flow Kabin	Healforce HF Safe 1200, Çin
-80 °C Derin dondurucu	Hettich, Almanya
Su banyosu	DAIHAN WB-11, Kore
Santrifüj	Hettich Universal 320, Almanya
CO <sub>2</sub> İnkübatör	Panasonic, Japonya
Ters Mikroskop	BOECO-BAB DCM 510, Almanya
SDS-Page elektroforez cihazı	Bio-Rad, TGX Stain-Fre Precast Gels, ABD
Elektroforez Güç Kaynağı	Wealtec (Elit 300 Plus), USA
Elektroforez Güç Kaynağı	Clever NanoPAC-300, UK
Elektroforez Tankı	Wealtec (mini, midi), USA
Elektroforez Tankı	Clever (midi, maxi), UK
DNA Fluorometre	Qubit 2.0 Fluorometer

#### 3.1.2 Kullanılan kimyasallar

Kan, sperm ve doku örneklerinden DNA izolasyonu, hücre kültürü ve SSCP analizleri sırasında kullanılan kimyasallar ve hazırlanan çözeltiler Çizelge 3.4, Çizelge 3.5, Çizelge 3.6'da gösterilmiştir.

**Çizelge 3.4.** DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar

<u>NETS LYSIS TAMPON</u> 0,01 M NaCl 1 mM EDTA 0,01 M Tris (pH=8) % 0,05 SDS	<u>10XTBE</u> 0,89 M Tris 0,89 M Borik Asit 20 mM EDTA-Na <sub>2</sub> 1000 ml dH <sub>2</sub> O	<u>10XLYSIS TAMPON</u> 770 mM NH <sub>4</sub> Cl 46 mM KHCO <sub>3</sub> 10 mM EDTA
<u>DİGESTİON TAMPON</u> (pH=8) 10 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 1 mM EDTA	<u>TE</u> (pH=7,5) 10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA	<u>SALT EDTA</u> 75 mM NaCl 25 mM EDTA
<u>PROTEİNAZ K</u> (10 mg/ml) 100 mg Proteinaz K 10 ml dH <sub>2</sub> O	<u>SDS</u> (% 10) 10 g SDS 100 ml dH <sub>2</sub> O	<u>SDS</u> (% 20) 20 g SDS 100 ml dH <sub>2</sub> O
<u>STE LYSIS TAMPON</u> 0,1 M NaCl 0,02 M EDTA 0,01 M Tris (pH=8)		

**Çizelge 3.5.** Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasallar

<u>STOK DMEM/F12</u> (pH:7,2-7,4) 12 g DMEM 2,438 g sodyum bikarbonat 1000 ml dH <sub>2</sub> O	<u>DMEM/F12</u> % 10 FBS % 1 antibiyotik % 79 stok DMEM	<u>Dondurma Medyumu</u> % 20 DMSO % 80 FBS
--	--	--



**Çizelge 3.6.** SSCP analizleri sırasında kullanılan kimyasallar

<u>Akrilamid Bisakrilamid (Stok Çözelti) (% 30)</u>	<u>Amonyum Persulfat (APS) (% 10)</u>
29 g Akrilamid 1 g Bisakrilamid 100 ml dH <sub>2</sub> O	1 g Amonyum Persulfat 10 ml dH <sub>2</sub> O
<u>Denatüre Edici Yükleme Boyası</u>	<u>Gümüş Nitrat</u>
9,5 ml Formamid 100 µL M NaOH 0,005 g Brom Fenol Mavisi 0,005 g Xylene Cyanol	0,15 g Gümüş Nitrat 140 µL Formaldehit (% 37) 100 ml dH <sub>2</sub> O
<u>Developer Çözeltisi</u>	<u>Sodyum Tiyosülfat</u>
15 gr Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 700 µL Formaldehit (% 37) 200 µL Sodyum Tiyosülfat 500 µL dH <sub>2</sub> O	0,2 g Sodyum Tiyosülfat 50 ml dH <sub>2</sub> O
<u>Fiksatif Çözelti (% 7,5)</u>	<u>50 ml % 12' lik Poliakrilamid Jel</u>
37,5 ml Glasiyal Asetik Asit (GAA) 37,5 ml Metanol 425 ml dH <sub>2</sub> O	20 ml Akrilamid Bisakrilamid (Stok Çözelti) 5 ml TBE (10X) 250 µL APS (% 10) 20 µL Temed 24,730 ml dH <sub>2</sub> O

## 3.2 Yöntem

### 3.2.1 Kan, sperma ve doku örneklerinin alınması

İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde bakılan 3 klon boz sığır (2 dişi, 1 erkek) ve F<sub>1</sub> jenerasyonu (1 erkek, 1 dişi yavru) ile Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde bakılan 2 dişi klon boz sığır, F<sub>1</sub> jenerasyonu (2 erkek, 4 dişi) ve F<sub>1</sub> jenerasyonundan doğan F<sub>2</sub> jenerasyonu 3 yavrudan (2 erkek, 1 dişi) toplam 10 ml olacak şekilde kan örnekleri K<sub>3</sub>EDTA'lı tüplere alınmıştır. Erkek klon Efe'nin dondurulmuş sperm örneği İstanbul Üniversitesi'nden temin edilmiştir. Klon Ece ve Ecem'den kulak doku örnekleri alınmıştır.

### 3.2.2 Hücre kültürü

Tübitak-Marmara Araştırma Merkezi'nde bulunan ve klonların üretilmesinde kullanılan fibroblast, kıkırdak ve granüloza hücre hatları ve Klon Ece ve Ecem'den alınan kulak dokusundan elde edilen primer kültür hücreleri üniversitemiz "Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü" Hayvan Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda çoğaltılmıştır.

Dokudan primer kültür hatlarının elde edilme basamakları aşağıdaki gibidir (Arat ve ark. 2011).

- Klon Ece ve Ecem'in kulağının uç kısmı % 70'lik alkol ile sterilize edildikten sonra kulak işaretleme pensi yardımıyla alınan dokular, +4 derecede % 5 antibiyotik içeren Phosphate Buffered Saline (PBS) çözeltisinde işleneceği laboratuvara gelene kadar saklanmıştır. Dokuların alınması sırasında steriliteye özen gösterilmiştir.
- Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Hayvan Hücre Kültürü Laboratuvarı'na ulaşan doku örnekleri laminar kabin içinde % 5 antibiyotikli PBS'den % 2 antibiyotikli PBS içerisine aktarılmıştır.
- Kulak doku parçalarının üzerindeki kıllı deri bisturi ucu yardımı ile temizlenmiştir.
- Elde edilen kıkırdak ve bağ dokusu temiz bir petriye aktarılmış ve kurumaması için üzerine az miktarda PBS damlatılmıştır.
- Steril bisturi ve pensler ile dokular iğne başı kadar küçük parçalara ayrılmıştır. Bu parçalar 35 mm'lik hücre kültür petrilere aktarılmıştır.
- Dokuların kültür petrisine yapışması için 2-3 dk. beklenmiştir. Bu parçacıklar petri kabının yüzeyine yapışacak şekilde belirli aralıklarla konulmuştur.
- Hücre kültür medyumunu petrinin kenarından yavaş bir şekilde dokuların üzerini kaplayacak şekilde uygulanmıştır.
- Ekim yapılan kültür petrileri sarsmamaya özen göstererek inkübatöre yavaşca kaldırılmıştır. Aksi takdirde dokuların yerlerinden kalkma olasılığı vardır.
- Petriler kontaminasyon oluşuma karşı her gün dışarıdan kontrol edilmiştir.

Tübitak-Marmara Araştırma Merkezi'nden alınan hücre hatlarının ve doku örneğinden hazırlanan primer hücre hatlarının çoğaltılması işlemi aşağıdaki gibidir (Arat ve ark. 2011).

- Petri kabının içine konulan hücrelerin üzerine % 10 fetal buzağı serumu (FBS) ve % 1 antibiyotik içeren hücre kültür medyumunu (DMEM-F12) ilave edilerek, % 5 karbondioksit

(CO<sub>2</sub>) ve 37 °C sıcaklık koşullarına sahip inkübatörde konfluent (petri kabının tüm yüzeyini kaplayana kadar) olana kadar bekletilmiştir.

- Konfluent olan hücrelerin içerisindeki medyum pastör pipet yardımıyla çekilerek üzerine % 0,25 tripsin EDTA çözeltisi eklenerek inkübatörde (37 °C ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren) 5 dk. bekletilmiştir.
- Tripsinin etkisiyle petri yüzeyine yapışan hücreler yüzer vaziyete geçince, tripsinin etkisini yok etmek için tripsin miktarının 2 katı kadar % 10 fetal buzağı serumu (FBS), % 1 antibiyotik içeren DMEM/F12 eklenerek hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirilmiştir.
- Mikropipet kullanarak, 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınan hücreler 1000 rpm'de, 5 dk. santrifüj edilmiştir. Ardından, hücre peletinin üst kısmındaki medyum çekilmiş ve 1 ml DMEM/F12 ile sulandırılarak, içerisinde 5 ml DMEM/F12 bulunan 60 mm'lik kültür petrilere ekilmiştir.
- 3-4 gün sonra yapılan kontroller sonucunda, konfluent olan petrilerin içindeki hücrelerin bir kısmı dondurulmuş, kalan hücreler ise DNA izolasyonu amacıyla kullanılmıştır.
- Dondurma işlemi için tripsinlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirilen hücreler, % 80 FBS ve % 20 dimetilsülfoksit (DMSO) içeren ve +4 °C'de saklanan dondurma medyumunu ile 1:1 oranında karıştırılarak dondurma tüplerine aktarılmıştır.
- Hücreleri içeren dondurma tüplerindeki son konsantrasyon % 40 FBS, % 10 DMSO ve % 50 DMEM/F12 olmuştur. Tüpler sıcaklığı 1 °C/dk düşüren dondurma kabı içerisine yerleştirilmiş ve dondurma kabı -80 °C derin dondurucuya konmuştur.

### **3.3 DNA İzolasyonu**

#### **3.3.1 Kan örneklerinden DNA izolasyonu**

Hayvanlardan alınan kan örneklerinden standart fenol/kloroform yöntemi kullanılarak, Sambrook ve ark. (1989)'nın protokolüne uygun olarak DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonda, araştırmacı protokolüne ek olarak DNA miktarı ve kalitesini arttırmak amacıyla bazı modifikasyonlar yapılmıştır. DNA izolasyon basamakları aşağıdaki gibidir.

- 10 ml kan örneğinin üzerine 40 ml 2X Lysis Tampon çözeltisi eklenerek 50 ml'ye tamamlanmıştır.
- Falcon tüpler homojen bir karışım elde edilinceye kadar karıştırıldıktan sonra yirmi dört saat buz içerisinde +4 °C'de inkübe edilmiştir.

- İnkübasyondan sonra buzdan alınan tüplerin 10-15 dk. homojenizatörde iyice karışması sağlanmıştır. 3000 rpm'de +4 °C'de 20 dk. santrifüj yapılmıştır.
- Santrifüjü takiben tüpün dibinde kalan beyaz pelete zarar vermeden süpernatant dökülmüştür.
- Pelet üzerine 3 ml NaCl-EDTA çözeltisi, 300 µL % 10'luk SDS ve 150 µL proteinaz K (10 mg/ml) eklenmiş ve vorteks ile homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır.
- Vorteksleme sonrası örnekler 55 °C'de 3 saat etüvde inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda alınan tüplerin üzerine 3 ml fenol (pH 8,0) eklenmiştir.
- Tüpler vortekslelendikten sonra 15 dk. rotatorda karıştırılmıştır.
- Karıştırıldıktan sonra 3000 rpm'de +4 °C'de 15 dk. santrifüj edilip süpernatant kısmı yeni steril tüplere alınmıştır.
- Üzerine 3 ml fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) eklenerek tüpler tekrar vortekslenip 15 dk. rotatorda karıştırılmıştır.
- Daha sonra tüpler 3000 rpm'de +4 °C'de 15 dk. santrifüje bırakılmıştır.
- Oluşan yeni üst faz (süpernatant kısmı) cam tüplere alınıp üzerine soğuk haldeki (-20 °C) % 96'lık etanol eklenerek DNA peletinin sarmal bir hal alması sağlanmıştır.
- Görünür hale gelen DNA pipet yardımı ile çekilerek ependorf tüplere aktarılmıştır. 9670 rpm'de 6,5 dk. +4 °C de santrifüj edilmiştir.
- Üstteki alkol döküldükten sonra pelet kurutulup 400 µL TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA) ile sulandırılmıştır.

### 3.3.2 Hücre örneklerinden DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için Sambrook ve ark. (1989)'nın protokolü modifiye edilerek uygulanmıştır. Özetle;

- İlk olarak dondurulmuş haldeki hücreler +37 °C'deki su banyosunda çözdürüldükten sonra DMEM-F12 hücre kültür medyumunu ile sulandırılıp 1000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant vakum aracılığıyla çekildikten sonra pelet 200 µL PBS ile sulandırılmıştır.
- Üzerine 30 µL proteinaz-K (20 mg/ml), 30 µL RNase (5 mg/ml) ve 400 µL NETS tampon eklenerek 65 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrası 600 µL fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) eklenerek 13000 rpm'de 7 dk. santrifüj edilmiştir.

- Üst faz alınıp yeni bir ependorf tüp içerisine aktarılarak üzerine 600 µL kloroform:izoamilalkol (24:1) eklenip 13000 rpm’de 7 dk. santrifüj edilmiştir.
- Üst faz alınıp yeni tüpe aktarılarak üzerine alınan fazın % 10’u kadar sodyum asetat (3M), 2,5 katı kadar soğuk saf alkol eklenerek gece boyu -20 °C’de bekletilmiştir.
- Ertesi gün tüpler 13000 rpm’de 7 dk. santrifüj edilerek üst faz atılarak 2 kez % 70’lik etanol ile yıkanmıştır.
- Daha sonra alkol dökülerek pelet kurumaya bırakılmış, kuruduktan sonra 100 µL TE ile sulandırılmıştır.

### 3.3.3 Sperm örneğinden DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için Anvar ve ark. (2015)’nin protokolü modifiye edilerek uygulanmıştır. Özetle;

- İlk olarak 2 ml’lik ependorfa yaklaşık 300 µL “high vacuum grease jel” konulmuştur.
- Alınan sperm örnekleri 1,5 ml’lik ependorf tüpe aktarılarak, 13000 rpm’de 1 dk. santrifüj yapılmıştır.
- Santrifüj işleminden sonra elde edilen süpernatant dökülmüş ve peletin üzerine 500 µL digestion tamponu eklenmiştir.
- Tamponla oluşturulan bu karışım, içerisinde 300 µL “high vacuum grase jel” bulunan 2 ml’lik ependorf tüpe aktarılmıştır.
- Tüpün içerisine sırasıyla 25 µL % 20’lik SDS, 50 µL (10 mg/ml) proteinaz K, 25 µL (1M) DTT (dithiothreitol) ilave edilmiştir.
- Bu karışım 37 °C’de 180 rpm’de çalkalayıcıda 13-15 saat inkübasyon yapılmıştır.
- Inkübasyon süresinin sonunda ikinci aşama olarak üzerine 500 µL fenol ve 500 µL kloroform:izoamilalkol (24:1) konulmuş ve karışım kısa bir süre vorteks yapılmıştır.
- Daha sonra karışım 15 dk. 13000 rpm’de santrifüj yapılmıştır.
- Santrifüj işlemi takiben süpernatant steril bir ependorfa alınmıştır.
- Elde edilen süpernatant üzerine 800 µL soğuk izopropanol konulmuş ve 13000 rpm’de 3 dk. santrifüj yapılmıştır.
- Santrifüjden sonra tüpün içerisindeki izopropanol dikatli bir şekilde boşaltılmış ve elde edilen pelet % 70’lik alkol ile 2 defa yıkanmıştır.
- Yıkama işleminden sonra alkol dökülmüş ve tüpler 37 °C’de kurumaya bırakılmıştır.
- İçerisinde pelet bulunan tüpler kuruduktan sonra 100 µL TE ilave edilerek sulandırılmıştır.

### 3.3.4 Dokudan DNA izolasyonu

Sambrook ve ark. (1989)'nın protokolüne uygun olarak DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonda, araştırmacı protokolüne ek olarak DNA miktarı ve kalitesini arttırmak amacıyla bazı modifikasyonlar yapılmıştır. Özetle;

- Alınan doku örneğinden 10-20 mg doku tartılarak bistüri yardımıyla küçük parçacıklara ayrılmış ve 2 ml'lik ependorf tüplere konmuştur.
- Üzerine 500 µL STE (0,1 M NaCl, 0,01 M Tris HCL pH=8, 0,02 M EDTA pH=8) parçalama tamponu eklenmiş homojenizatörde 6 dk. homojenize edilmiştir.
- Homojenizasyondan sonra tüpün içerisine sırasıyla 30 µL % 10 SDS, 3µL Proteinaz-K, 2 µL Rnase eklenmiştir.
- Takibinde, 56 °C'de gece boyunca yaklaşık 13-15 saat inkübasyon yapılmıştır.
- İnkübasyondan sonra tüpe 500 µL fenol:kloroform:izoamilalkol eklenip vortekslenmiştir. İşlem, tüp içerisindeki karışım beyaza çalan renk alıncaya kadar sürdürülmüştür.
- Bu karışım 13000 rpm'de 7 dk. santrifüj yapılmış, santrifüj işlemi sonunda tüp içinde rahatlıkla ayırt edilebilir fazlar oluşmuştur. Süpernatant steril bir tüpe alınmıştır.
- Alınan süpernatanın üzerine 500 µL kloroform:izoamilalkol eklendikten sonra vorteks yapılmış, 13000 rpm'de 7 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant steril bir tüpe alınmıştır.
- Son alınan süpernatanın hacmi ölçülerek üzerine, süpernatanın 0,1 katı oranında 3 M'lık sodyum asetat ve 2,5 katı oranında saf alkol (-20 °C saklanan) eklenmiş ve -20 °C'de gece boyu bekletilmiştir.
- Gece boyu bekledikten sonra 13000 rpm'de 7 dk. santrifüj yapılarak içerisindeki alkol dikkatli bir şekilde dökülmüş ve 2 defa % 70'lik alkol ile yıkanmıştır.
- Yıkama işleminden sonra alkol dökülmüş ve tüpler 37 °C'de kurumaya bırakılmıştır.
- İçerisinde pelet bulunan tüpler kuruduktan sonra 100 µL TE ilave edilerek sulandırılmıştır.

### 3.3.5 DNA kalitesinin kontrolü

Elde edilen genomik DNA'nın miktar ölçümleri Qubit 2.0 Fluorometer (İnvitrogen) kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca izole edilen genomik DNA'nın kalitesi ve miktarı % 1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri, PCR işlemi yapılmıncaya kadar +4 °C'de saklanmıştır.

İzole edilen DNA'ların, PCR ve RFLP yöntemiyle kesim sonucu elde edilen ürünlerin elektroforetik ayrışması amacıyla 1X TBE Elektroforez/Jel tampon çözeltisi kullanılmıştır. Elektroforez çözeltisi önce 10X TBE Elektroforez/Jel stok tampon çözeltisi olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan 10X TBE Elektroforez stok çözeltisi çift distile su ile 1/10 oranında sulandırılarak (1X TBE Elektroforez/Jel tampon çözeltisi) hem jel hem de elektroforez tampon çözeltisi olarak kullanılmıştır.

DNA izolasyonu sonrasında elde edilen genomik DNA'ların elektroforetik analizi için % 1'lik jel hazırlamak üzere, 1 g agaroz tartılıp 100 ml'lik erlenmayerin içine konmuş ve üzerine 100 ml 1X TBE Elektroforez/Jel tampon çözeltisi eklenmiş, mikrodalga fırında 3 dakika boyunca şeffaf bir görüntü elde edilinceye kadar kaynatılmıştır. Soğumaya bırakılan karışıma 2,5 µL DNA boyası (G108, Safe View Classic, ABM) ilave edilmiştir. Jel kabına dökülen agaroz karışımının donması için oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Hazırlanan jel 1X TBE Elektroforez/Jel tampon çözeltisi ile dolu yatay elektroforez tankına yerleştirilmiştir. İlk kuyuya 2 µL 50 bp marker, diğer kuyulara her bir genomik DNA örneği (3 µL), 2 µL yükleme boyası (Loading Dye, Thermo Fisher Scientific) ile karıştırılarak ayrı ayrı yüklenmiştir. Elektroforez cihazı 100 volt (V) 500 amper (A) ve 30 dk. olacak şekilde ayarlanarak jel yürütülmüş ve ardından görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir.

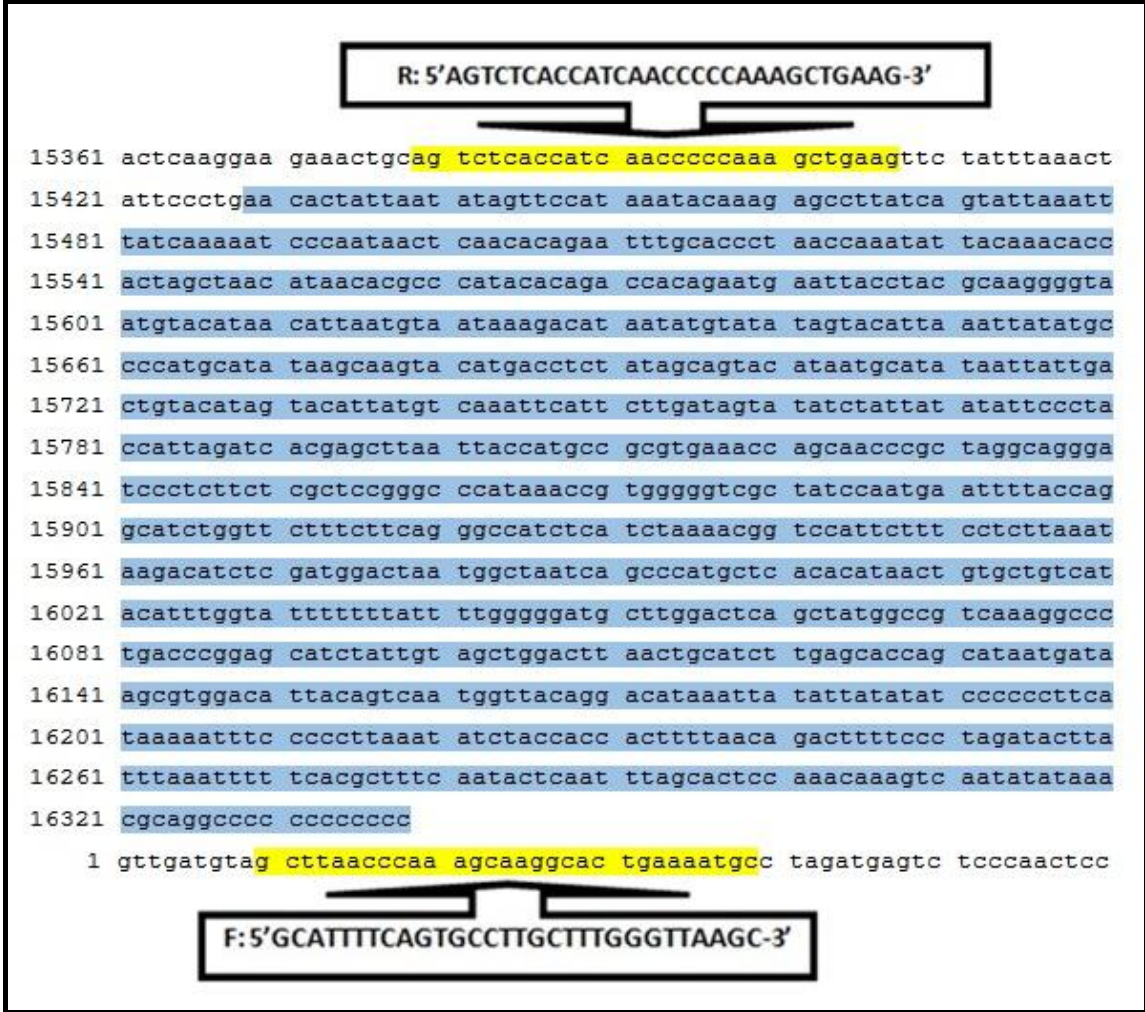
### 3.4 PCR ile mtDNA Çoğaltılması

Hedeflenen D-loop bölgesini de içeren 999 bp'lik bölge, ilgili primerler (forward (5'-GCATTTTCAGTGCCTTGCTTTGGGTAAAGC-3') ve reverse (5'-AGTCTCACCATCAA CCCCCAAAGCTGAAG-3')) (Harumi ve ark. 1994) kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. NCBI gen bankası AF492351.1 erişim numaralı referans nükleotid dizisi verilen sığır mtDNA D-loop bölgesini de içeren (15429-16338. nt) 999 baz çifti uzunluğundaki bölgesinin (Şekil 3.1) çoğaltılması amacıyla Çizelge 3.7'de verilen PCR konsantrasyonları kullanılmıştır.

Ayrıca bir önceki çalışmada (Tüten Sevim 2016), Klon Ece ve Ecem'in kan örnekleri DNA dizi analiz sonucu hiçbir nükleotid farklılığının görülmemesi, bazı nükleotidlerde çift pik görülmesi, Klon Ecem'in yavrularından farklı mtDNA dizisine sahip olduğunun tespit edilmesinden dolayı aynı dişi klonların doku örneklerinde mtDNA dizi analizi yapılmıştır. Bu amaçla bir önceki çalışmada (Tüten Sevim 2016) kullanılan D-loop'un 499 bp'lik bölgesi ilgili primerler (forward 5'-CCATACACAGACCACAGAATGA-3', reverse 5'-AGTCCAAG

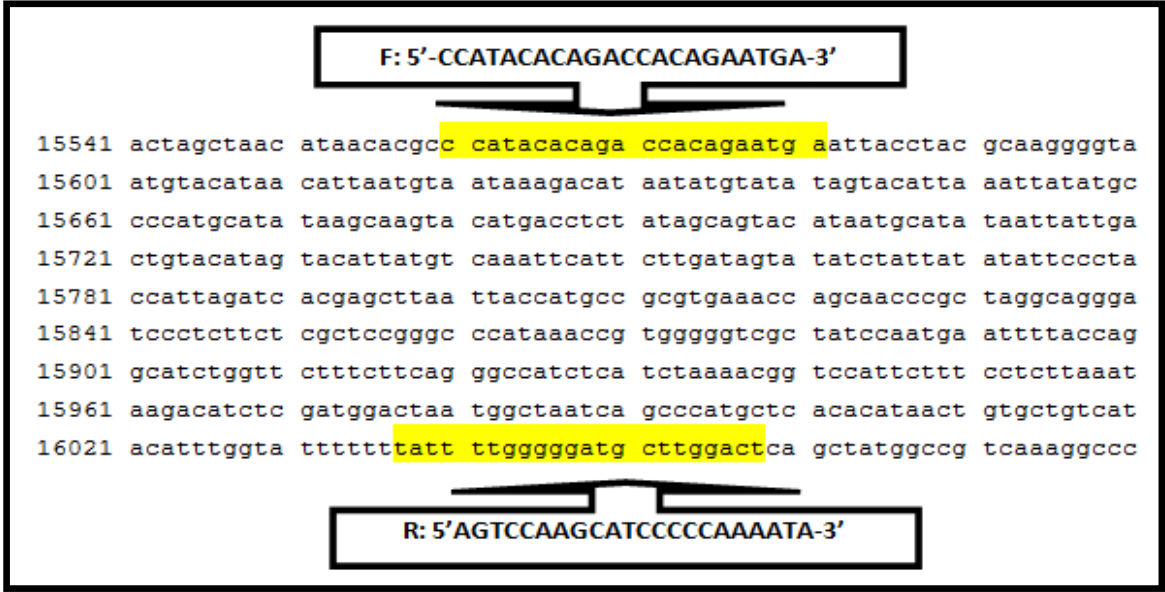
CATCCCCAAAATA-3' (Takeda ve ark. 2008)) kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. NCBI gen bankası AF492351.1 erişim numaralı referans nükleotid dizisi verilen sığır mtDNA D-loop'un 499 baz çifti uzunluğundaki bölgesinin (Şekil 3.2) çoğaltılması amacıyla Çizelge 3.7'de verilen PCR konsantrasyonları kullanılmıştır.

Her iki primer için de PCR reaksiyonu sıcaklık döngüleri Çizelge 3.8'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Sığır mtDNA D-loop bölgesini (15429-16338. nt mavi olarak gösterilmiştir) de içeren 999 baz çifti uzunluğundaki bölge (AF492351.1)





**Şekil 3.2.** Sığır mtDNA D-loop' un 499 baz çifti uzunluğundaki bölgesi (AF492351.1)

**Çizelge 3.7.** PCR konsantrasyonları

Bileşenler	PCR Karışımına Konulan Miktar	Stok Konsantrasyonlar
DNA	0,5 µL	30-40 ng
1X PCR tampon	1 µL	10X
0,2 mM dNTP	2 µL	1 mM
1,5 mM MgCl <sub>2</sub>	0,6 µL	25 mM
0,25 µM primer (ileri ve geri)	0,25 µL	10 µM/µL
0,5 U Taq Polimeraz	0,1 µL	5 U/µL
Yukarıdaki bileşim dH <sub>2</sub> O ile 10 µL'ye tamamlanmıştır.		

**Çizelge 3.8.** mtDNA PCR reaksiyonu sıcaklık döngüleri

PCR Döngüsü	Harumi ve ark. (1994)		Takeda ve ark. (2008)	
Ön ayırım (Pre-denaturation)	: 95 °C	3 dakika	94 °C	5 dakika
Ayrılma (Denaturation)	: 94 °C	30 saniye	94 °C	30 saniye
Bağlanma (Annealing)	: 60 °C	50 saniye	59 °C	30 saniye
Uzama (Extension)	: 72 °C	80 saniye	72 °C	60 saniye
Final uzama (Final Extension)	: 72 °C	10 dakika	72 °C	4 dakika
Döngü sayısı	30 döngü		35 döngü	

### 3.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Elde Edilen DNA Bantlarının Görüntülenmesi

PCR işlemi tamamlandıktan sonra PCR ürünlerinin elektroforezinde % 2'lik agaroz jel kullanılmıştır. Bu amaçla 2 g agaroz tartılıp 100 ml'lik erlenmayerin içine konmuş ve üzerine 100 ml 1X TBE Elektroforez/Jel tampon çözeltisi eklenmiştir. Elde edilen çözelti mikrodalga fırında 3 dakika boyunca şeffaf bir görüntü elde edinceye kadar kaynatılmıştır. Soğumaya bırakılan karışıma 2,5 µL DNA boyası (Safe View Classic, G108, ABM) ilave edilmiştir. Hazırlanan jel 1X TBE Elektroforez/Jel tampon çözeltisi ile dolu yatay elektroforez tankına yerleştirilmiştir. İlk kuyuya 2 µL 50 bç marker, diğer kuyulara her bir PCR ürünü (5 µL) 2 µL yükleme boyası (Loading Dye, Thermo Fisher Scientific) ile karıştırılarak ayrı ayrı yüklenmiştir. 100 V, 500 A'da 60 dakika yürütülmüştür.

### 3.6 SSCP Analizi

Hazırlanan % 12'lik poliakrilamid jel çözeltisi (Çizelge 3.6) enjektör yardımıyla cam plakalar arasına dökülmüştür. Üzerine tarak yerleştirerek 1 saat boyunca jelin kuruması için beklenmiştir. Elektroforez tankı yaklaşık 4-5 litre TBE (1X) ile doldurulmuştur. Jel kuruduktan sonra tarak çıkarılarak kuyucuklar mikropipet yardımıyla temizlenmiştir. PCR ürünleri Çizelge 3.9'da gösterilen nükleotid dizisine sahip *HpaII* (ER0541, Thermo Fisher Scientific) restriksiyon enzimi ile Çizelge 3.10'da gösterildiği şekilde hazırlanarak 37 °C'de 15 saat inkübe edilerek kesilmiştir. Kesimi yapılan her bir örnekten 4 µL alınıp ve 20 µL denatüre edici yükleme boyası ile karıştırılarak, 95 °C'de 10 dakika denatüre edilmiştir. Daha sonra örnekler buz üzerine alınarak hazırlanan % 12'lik poliakrilamid jele yüklenmiştir. Örnekler poliakrilamid jelde 180 V'de gece boyu (14 saat) yürütülmüştür. Bunu takiben jel plakalar arasından çıkarılmıştır. Önce % 7,5'lik fiksatif çözeltide 10 dk. bekletilmiştir. Fiksatif çözelti dökülerek jel saf su ile 10 dk. yıkanıp hazırlanan gümüş boyası ile 30 dk. muamele edilerek karanlık bir ortamda çalkalanmıştır. Bunu takiben jel saf su ile 5-20 saniye hızlı bir şekilde yıkanmıştır. Üzerine developer çözeltisi eklenerek bantlar görünür hale gelene kadar çalkalanmıştır. Daha sonra başlangıçta kullanılan fiksatif çözelti ile bantlar sabitlenmiştir. Ultra saf su ile fiksatif çözelti uzaklaştırılmıştır. UV ışığı altında görüntü alınmıştır.

**Çizelge 3.9.** *HpaII* enzimi tanıma dizisi

<i>HpaII</i>	5...C <sup>↓</sup> C G G...3' 3'...G G C <sup>↑</sup> C...5'
--------------	---

**Çizelge 3.10.** Enzim kesimi reaksiyon bileşenleri ve miktarları

Reaksiyon Bileşeni	Miktar
PCR ürünü	10 µL
10X Tango Tampon	1-2 µL
Kesim enzimi	1-2 µL
ddH <sub>2</sub> O	18 µL

### 3.7 PCR Ürünlerinin RFLP Analizi

Mitokondriyal DNA D-loop bölgesini de içeren 999 bp'lik bölge PCR ile amplifiye edildikten sonra, PCR ürünleri *HpaII*'ye ilave olarak *ApoI* (ER1381, Thermo Fisher Scientific), *AluI* (ER0011, Thermo Fisher Scientific), *HinfI* (ER0801, Thermo Fisher Scientific) ve *TaqI* (ER0671, Thermo Fisher Scientific) restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. PCR ürünlerinin inkübasyonu Çizelge 3.11'de gösterilen nükleotid dizisine sahip restriksiyon enzimleri ile Çizelge 3.10'daki protokole uygun olarak yapılmıştır. *ApoI*, *AluI* ve *HinfI*, restriksiyon enzimleri 37 °C'de, *TaqI* enzimi ise 65 °C'de 15 saat inkübe edilmiştir. Tüm kesim ürünleri % 2,5'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir.

**Çizelge 3.11.** Restriksiyon enzimlerinin tanıma dizisi

<i>AluI</i>	5'...A G <sup>↓</sup> C T...3' 3'...T C <sup>↑</sup> G A...5'
<i>HinfI</i>	5'...G <sup>↓</sup> A N T C...3' 3'...C T N A <sup>↑</sup> G...5'
<i>TaqI</i>	5'...T <sup>↓</sup> C G A...3' 3'...A G C <sup>↑</sup> T...5'
<i>XapI (ApoI)</i>	5'...R <sup>↓</sup> AA T T Y...3' 3'...Y TT AA <sup>↑</sup> R...5'

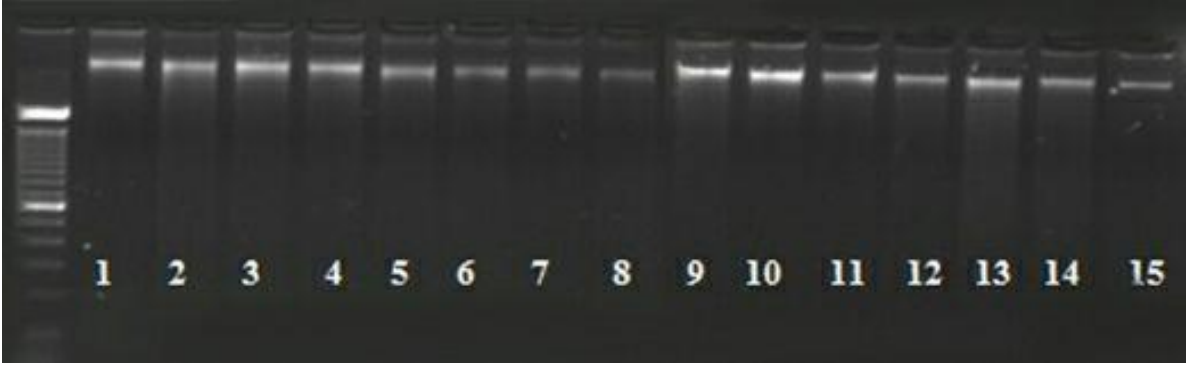
### 3.8 DNA Dizi Analizi

Daha önceki bir çalışmada (Tüten Sevim 2016), iki dişi (Ecem ve Ece) klonun, kan örneklerinden yapılan dizi analizinde mtDNA D-loop' un 499 baz çifti uzunluğundaki bölgesinin nükleotid dizileri bakımından aralarında hiçbir fark tespit edilmediği, bazı nükleotidlerde çift pik görüldüğü ve Klon Ecem'in yavrularının mtDNA'larının annelerinden farklı olduğu belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında aynı dişi klonların bu kez kulak doku örneklerinde aynı işlemin tekrar edilmesine karar verilmiştir. PCR ile çoğaltılan mtDNA D-loop'un 499 bç'lik bölgesinin sekanslanması amacıyla DNA dizi analizi, hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. PCR ürünleri saflaştırılıp, forward ve reverse primer vasıtasıyla çift yönlü dizileme işlemi, kapiller elektroforez (ABI 3500XL Genetic Analyzer, USA) cihazında yapılmıştır. Elde edilen sekanslar Chromas Pro (Version 2.6.2) programında eşleştirilmiş ve nükleotid farklılıkları belirlenmiştir.

## 4. ARASTIRMA BULGULARI

### 4.1 Genomik DNA İzolasyonu Sonuçları

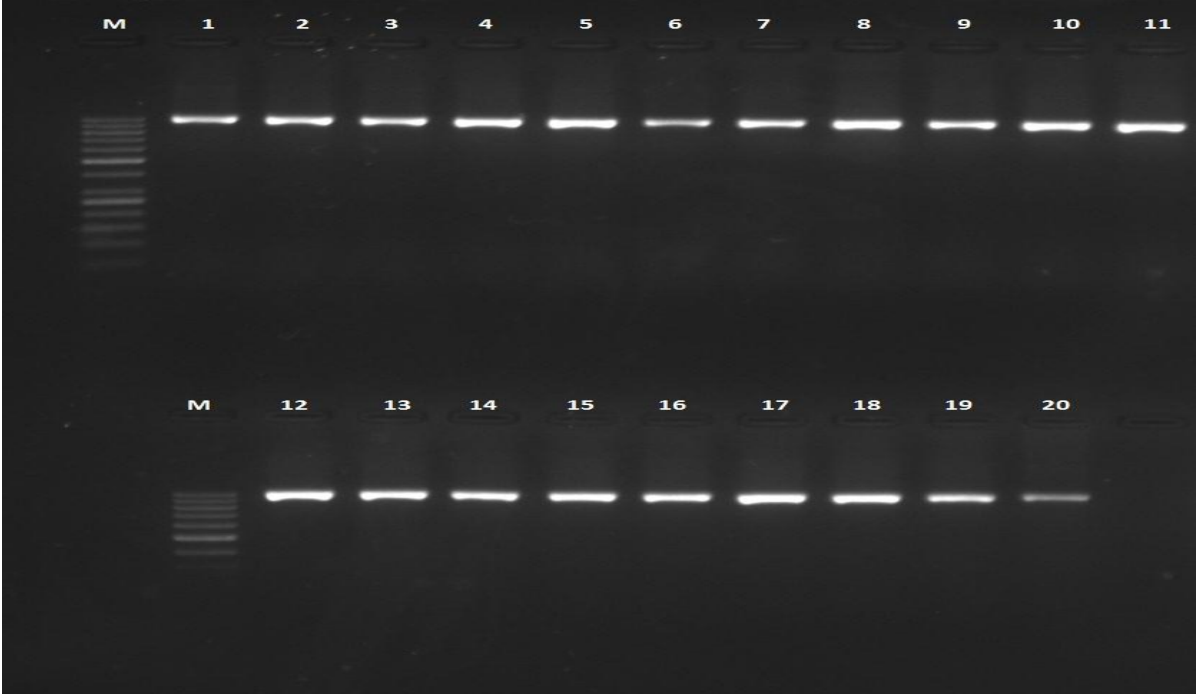
İzole edilen DNA örnekleri, % 1'lik agaroz jel elektroforezi yapılarak kontrol edilmiş ve görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir. DNA örneklerinin miktarı Qubit 2.0 Fluorometer (İnvitrogen) kullanılarak kontrol edilmiştir. DNA örneklerinin uygun kalitede ve miktarlarının ortalama  $154,03 \pm 6,70$  ng/ $\mu$ L olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.1. DNA örneklerinin jel görüntüsü

### 4.2 mtDNA Polimeraz Zincir Reaksiyonu

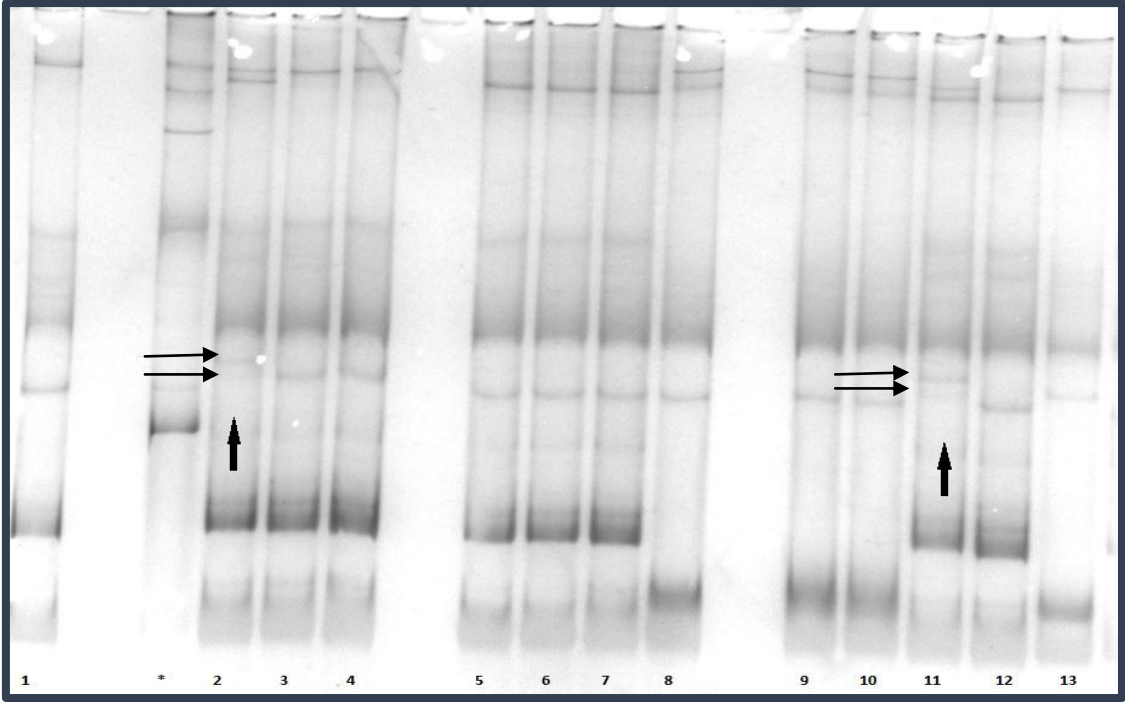
Thermal cycler cihazında belirli konsantrasyonlar ve döngü sıcaklıkları kullanılarak, elde edilen DNA örneklerinden mtDNA D-loop bölgesini de içeren 999 baz çifti uzunluğundaki bölge çoğaltılmış, PCR ürünleri % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. 999 baz çiftinden oluşan PCR ürünlerinin başarıyla çoğaltıldığı gözlenmiştir. PCR ürünlerine ait sonuçlar Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.2.** mtDNA D-loop bölgesini de içeren 999 bç'lik PCR ürünleri agaroz jel görüntüsü, M: 50 bç'lik DNA marker, 1-20 örnek

### 4.3 SSCP Analizi Sonucu

Yapılan PCR sonucu *HpaII* restriksiyon enzimiyle kesim yapılmış ve SSCP analizi gerçekleştirilmiştir. Tüm bireylerin kan örnekleri kullanılarak yapılan SSCP analizinde Klon Ece ve Ecem'in (2, 11, şekilde ok ile gösterilen) aynı profili gösterdiği ve her ikisinde de heteroplazmi olduğu, ancak Klon Ecem'in yavruları Cemre ve Efecan'da (3, 4) heteroplazminin olmadığı ve annelerinden farklı bir profile sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.3).

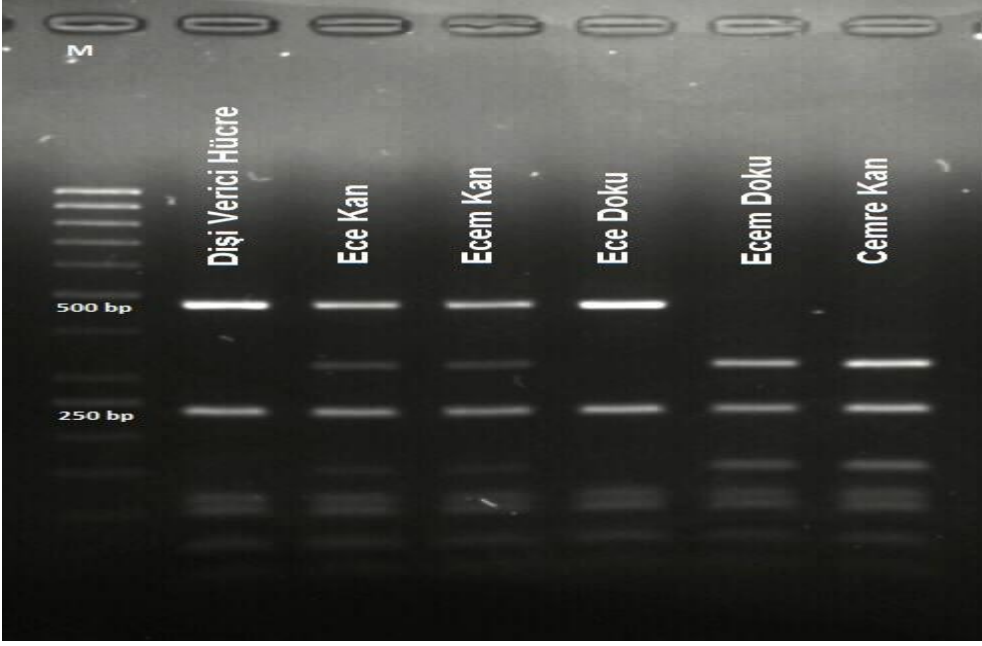


**Şekil 4.3.** SSCP analizi sonucu, 1- Dişi verici hücre (Granüloza), 2- Ece, 3- Cemre, 4- Efecan, 5- Nilüfer, 6- Kardelen, 7- Yazgülü, 8- Kiraz, 9- Karakız, 10- Kurban, 11- Ece, 12- Erkek verici hücre (Fibroblast), 13- Efe, \* hatalı yükleme

#### 4.4 PCR-RFLP Sonuçları

Tüm örneklerin D-loop bölgesini içeren mtDNA bölgesi PCR işlemi ile çoğaltıldıktan sonra *ApoI*, *HpaII*, *AluI*, *HinfI*, *TaqI* restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilmiştir.

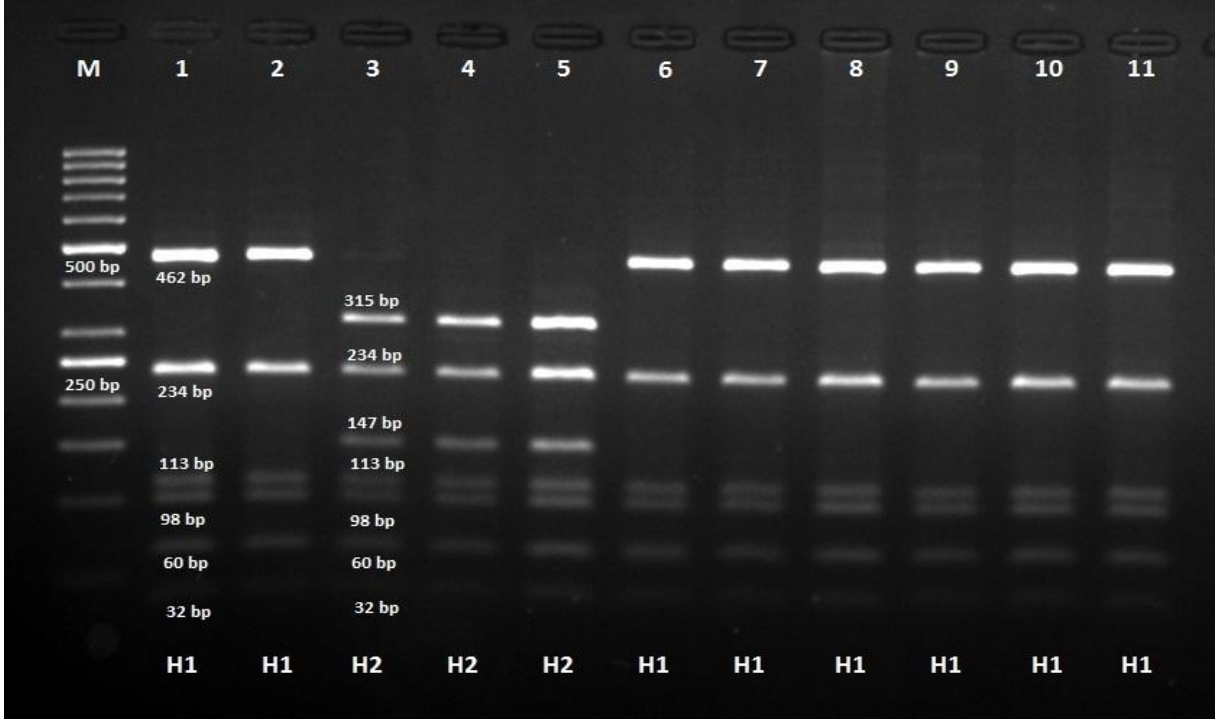
Yapılan SSCP analizinde (Şekil 4.3), ikiz klonlar Ece ve Ecem'in aynı bant profiline sahip olduğu, Klon Ecem'in yavrularının, annesinden farklı profil gösterdiği belirlenmiştir. Kan örneklerinde görülen heteroplazminin doku örneklerinde belirlenmesi amacıyla doku örneklerinden elde edilen PCR ürünlerinde, *ApoI* restriksiyon enzimiyle kesim yapılmıştır (Şekil 4.4). Kesim sonucunda, Klon Ece ve Ecem'in doku örneklerinin birbirinden farklı profile sahip olduğu ve bu profillerin kan örneklerinde birbiri içine geçmiş şekilde (heteroplazmi) olduğu görülmüştür. Aynı şekilde Klon Ecem'in doku örneği ile yavrusu Cemre'in aynı profile sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.4). Bundan sonraki enzim kesimlerinde Klon Ece ve Ecem'in kan örnekleri yerine doku örnekleri kullanılmıştır.



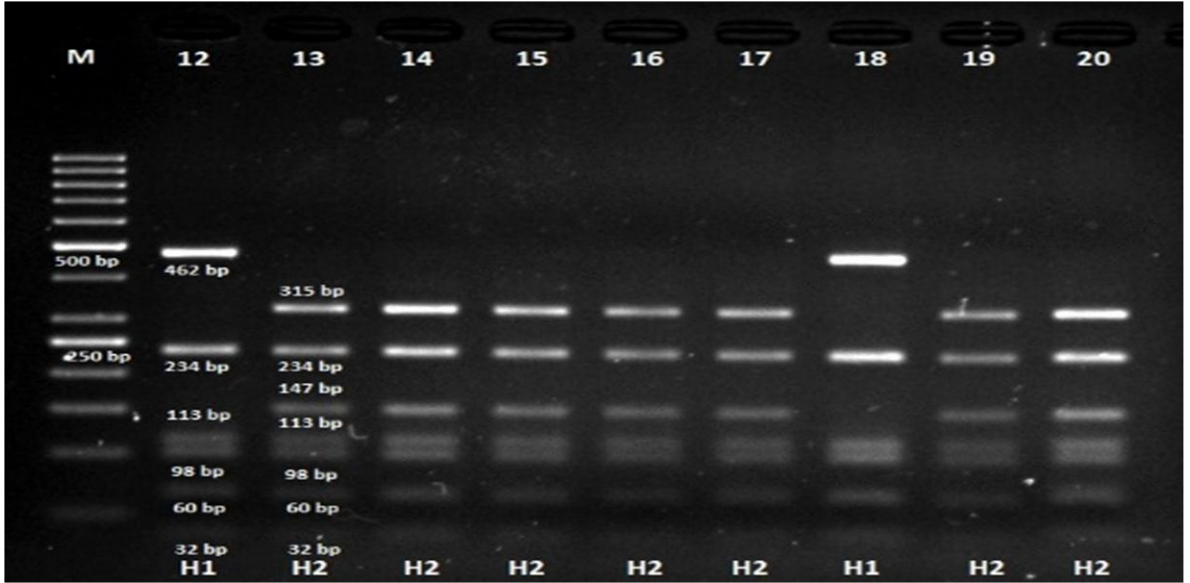
**Şekil 4.4.** Kan ve doku örneklerinde *ApoI* restriksiyon enzimi kesim sonucu, M: 50 bç'lik DNA marker, 1- Dişi verici hücre (Granüloza), 2- Ece (Kan), 3- Ecem (Kan), 4- Ece (Doku), 5- Ecem (Doku), 6- Cemre (Kan)

*ApoI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu (Şekil 4.5) iki farklı haplotip gözlenmiştir. Birinci haplotipte (H1) beş kesim noktası (98, 130, 364, 826 ve 886. nt) ve altı (32, 60, 98, 113, 234 ve 462 baz) bant oluşmuştur. Diğer haplotipte (H2) 462'lik fragment içinde yeni bir kesim noktası olduğundan altı kesim noktası (98, 130, 364, 511, 826 ve 886. nt) ve yedi bant (32, 60, 98, 113, 147, 234 ve 315 baz) gözlenmiştir. Dişi verici hücre (granüloza) ve ondan elde edilen Klon Ece ve Klon Nilüfer H1 haplotipinde iken, Klon Ecem (3 numaralı örnek) ve yavruları (F1 jenerasyonu) H2 haplotipi göstermiştir (Şekil 4.5). Dişi verici hücre (kıkırdak) H1 haplotipinde iken Klon Kiraz ve yavruları (F1 ve F2 jenerasyonu) H2 haplotipi göstermiştir (Şekil 4.6). Aynı şekilde Klon Efe H2 haplotipinde iken DNA vericisi hücre (fibroblast) H1 haplotipinde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6).



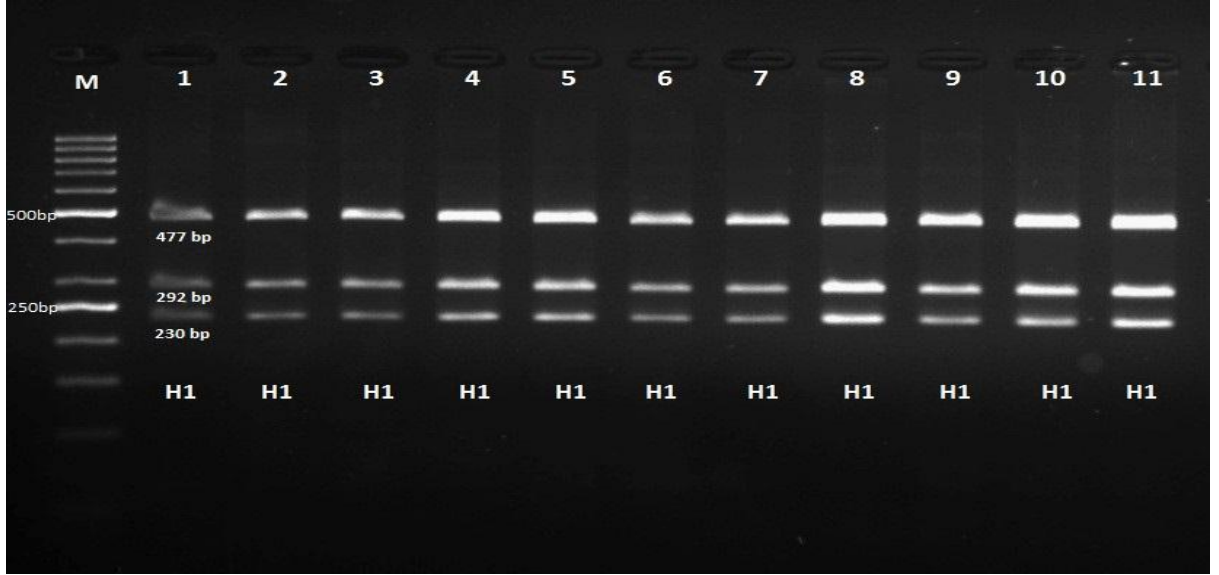


**Şekil 4.5.** *ApoI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu, M: 50 bç' lik DNA marker, 1- Dişı verici hücre (Granüloza), 2- Ece (Doku), 3- Ecem (Doku), 4- Cemre, 5- Efecan, 6- Nilüfer, 7- Yazgülü, 8- Rüzgar, 9- Kardelen, 10- Toprak, 11- Çınar



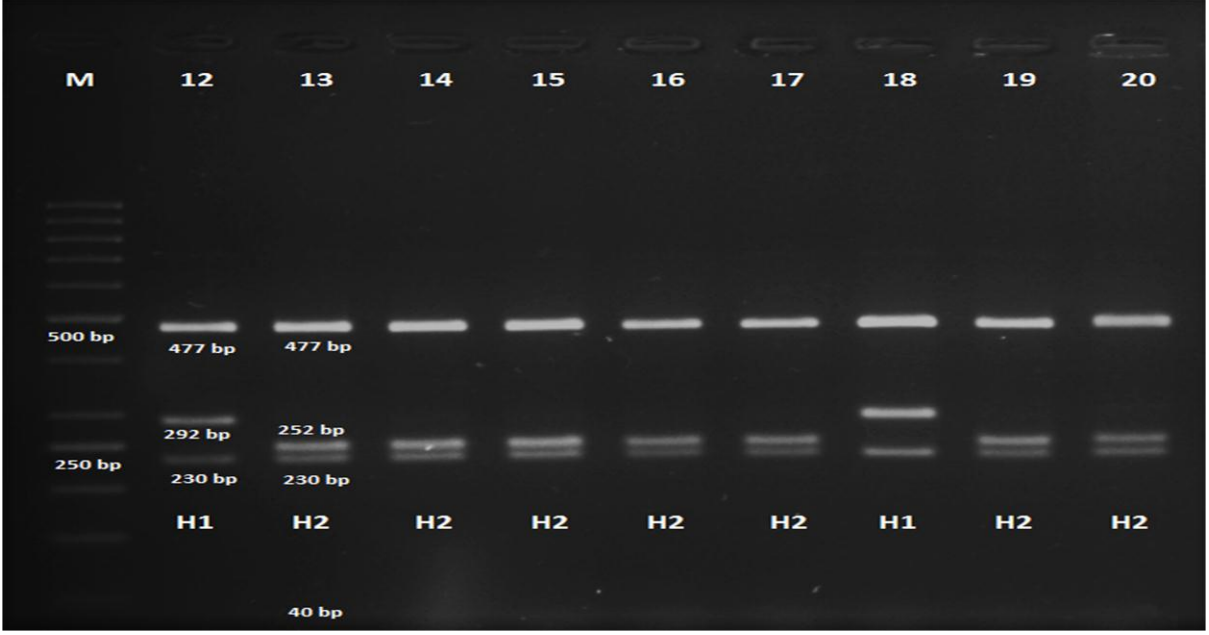
**Şekil 4.6.** *ApoI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu, M: 50 bç' lik DNA marker, 12- Dişı verici hücre (Kıkırdak), 13- Kiraz, 14- Kurban, 15- Yaprak, 16- Karakız, 17- Üzüm, 18- Erkek verici hücre (Fibroblast), 19- Efe, 20- Efe (Sperm)

*HpaII* restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda örneklerde iki tip haplotip gözlenmiştir. Birinci haplotipte 477. ve 707. nt'de iki kesim gözlenirken 477, 292 ve 230 bç uzunluğunda üç bant oluştuğu görülmüştür. Diğer haplotipte ise 292 bç'lik fragment içinde ilave bir kesim noktası olduğundan 477, 252, 230 ve 40 bç uzunluğunda dört bant oluşmuştur. 40 bç'lik fragment çok küçük olduğu için % 2'lik agaroz jelinde görüntülenememiştir. Şekil 4.7'de verilen örnekler birinci haplotipi (H1) sergilemiştir.



**Şekil 4.7.** *HpaII* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu, M: 50 bç' lik DNA marker, 1- Dişi verici hücre (Granüloza), 2- Ece (Doku), 3- Ecem (Doku), 4- Cemre, 5- Efecan, 6- Nilüfer, 7- Yazgülü, 8- Rüzgar, 9- Kardelen, 10- Toprak, 11- Çınar

Şekil 4.8'de dişi verici hücre (kıkırdak) DNA kaynağı H1 haplotipi gösterirken, ondan elde edilen Klon Kiraz (13 numaralı örnek), Kiraz'ın F1 (14, 15, 16 numaralı örnekler) ve F2 (17 numaralı örnek) jenerasyonu farklı bir haplotip (H2) göstermiştir. Aynı şekilde erkek klon Efe (19, 20 numaralı örnekler) H2 haplotipinde iken, onun DNA verici hücrelerinin (18 numaralı örnek) H1 haplotipinde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.8).



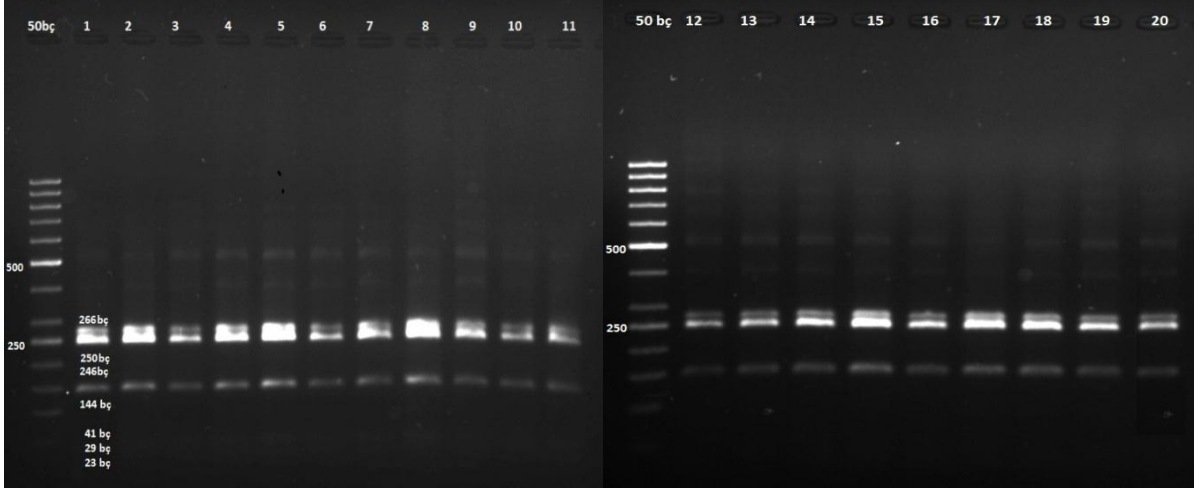
**Şekil 4.8.** *HpaII* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu, M: 50 bç' lik DNA marker, 12- Dişi verici hücre (Kıkırdak), 13- Kiraz, 14- Kurban, 15- Yaprak, 16- Karakız, 17- Üzüm, 18- Erkek verici hücre (Fibroblast), 19- Efe, 20- Efe (Sperm)

*HpaII* ve *ApoI* restriksiyon enzim kesimi sonucu oluşan haplotipler Çizelge 4.1'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** *HpaII* ve *ApoI* restriksiyon enzim kesimi sonucu verici hücre, klonlar ve jenerasyonlarında görülen haplotipler

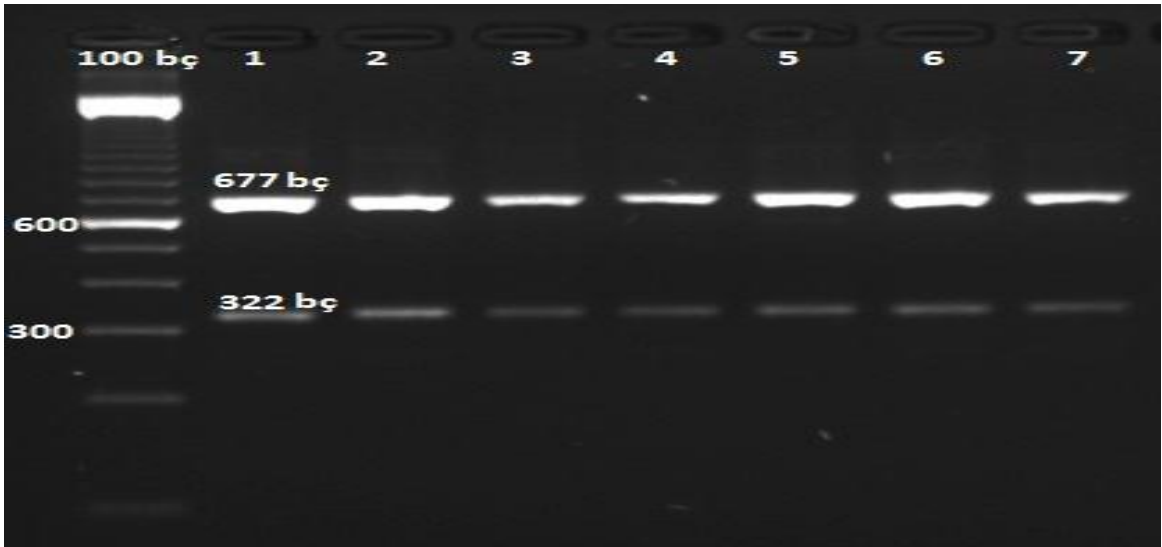
VERİCİ HÜCRE	KLONLAR		1. JENERASYON	2. JENERASYON
<b>BOZ IRK FİBROBLAST</b> (verici hücre 1) <i>HpaII-H1,</i> <i>ApoI-H1</i>	<b>EFE kan</b> <i>HpaII-H2,</i> <i>ApoI-H2</i>	<b>EFE Sperm</b> <i>HpaII-H2,</i> <i>ApoI-H2</i>		
<b>BOZ IRK GRANÜLOZA</b> (verici hücre 2) <i>HpaII-H1,</i> <i>ApoI-H1</i>	<b>ECE</b> <i>HpaII-H1,</i> <i>ApoI-H1</i>			
	<b>ECEM</b> <i>HpaII-H1,</i> <i>ApoI-H2</i>		<b>CEMRE</b> <i>HpaII-H1, ApoI-H2</i>	
			<b>EFECAN</b> <i>HpaII-H1, ApoI-H2</i>	
	<b>NİLÜFER</b> <i>HpaII-H1,</i> <i>ApoI-H1,</i>		<b>YAZGÜLÜ</b> <i>HpaII-H1, ApoI-H1</i>	<b>RÜZGAR</b> <i>HpaII-H1, ApoI-H1</i>
			<b>KARDELEN</b> <i>HpaII-H1, ApoI-H1</i>	<b>TOPRAK</b> <i>HpaII-H1, ApoI-H1</i>
			<b>ÇINAR</b> <i>HpaII-H1, ApoI-H1</i>	
<b>BOZ IRK KIKIRDAK</b> (verici hücre 2) <i>HpaII-H1,</i> <i>ApoI-H1</i>	<b>KİRAZ</b> <i>HpaII-H2,</i> <i>ApoI-H2</i>		<b>KURBAN</b> <i>HpaII-H2, ApoI-H2</i>	
			<b>KARAKIZ</b> <i>HpaII-H2, ApoI-H2</i>	<b>ÜZÜM</b> <i>HpaII-H2, ApoI-H2</i>
			<b>YAPRAK</b> <i>HpaII-H2, ApoI-H2</i>	

*AluI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu tek haplotip gözlenmiştir. *AluI* restriksiyon enzimiyle kesim sonucu altı kesim noktası (23, 167, 417, 683, 724 ve 970. nt) ve yedi (23, 29, 41, 144, 246, 250 ve 266 baz) bant gözlenmiştir. Tüm bireylerin aynı profile sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.9).



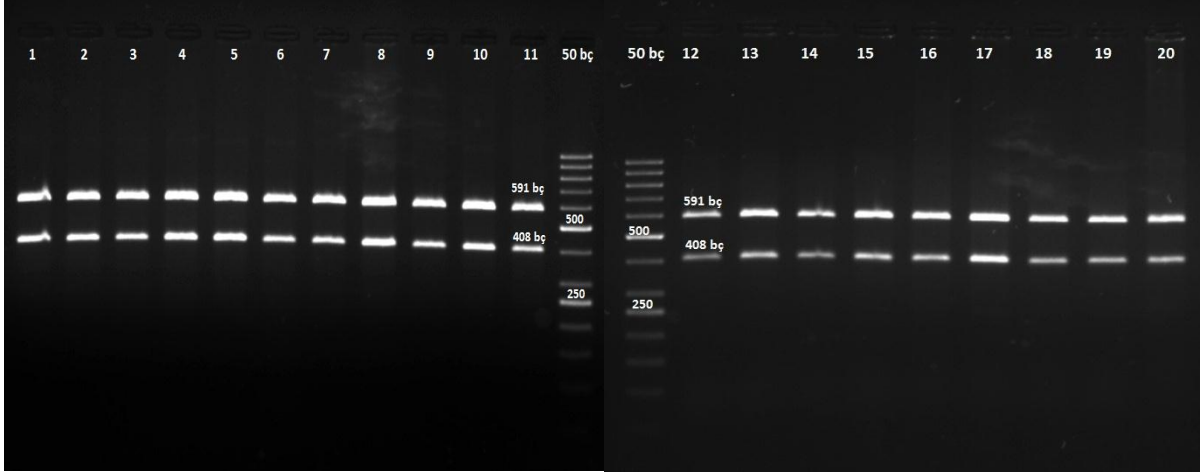
**Şekil 4.9.** *AluI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu, M: 50 bç' lik DNA marker, 1- Dişi verici hücre (Granüloza), 2- Ece (Doku), 3- Ecem (Doku), 4- Cemre, 5- Efecan, 6- Nilüfer, 7- Yazgülü, 8- Rüzgar, 9- Kardelen, 10- Toprak, 11- Çınar, 12- Dişi verici hücre (Kıkırdak), 13- Kiraz, 14- Kurban, 15- Yaprak, 16- Karakız, 17- Üzüm, 18- Erkek verici hücre (Fibroblast), 19- Efe, 20- Efe (Sperm)

*HinfI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu tek haplotip gözlenmiştir. *HinfI* restriksiyon enzimiyle kesim sonucu, bir kesim noktası (677. nt) ve iki (322 ve 677 baz) bant gözlenmiştir. Verici hücrelerin ve tüm klonların aynı profile sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10.** *HinfI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu, M: 100 bç' lik DNA marker, 1- Dişi verici hücre (Granüloza), 2- Ece, 3- Ecem, 4- Nilüfer, 5- Kiraz, 6- Erkek verici hücre (Fibroblast), 7- Efe

*TaqI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu tek haplotip gözlenmiştir. *TaqI* restriksiyon enzimiyle kesim sonucu, bir kesim noktası (591. nt) ve iki (408 ve 591 baz) bant gözlenmiştir. Tüm bireylerin aynı kesim profiline sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.11).



**Şekil 4.11.** *TaqI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu, M: 50 bç' lik DNA marker, 1- Dişi verici hücre (Granüloza), 2- Ece (Doku), 3- Ecem (Doku), 4- Cemre, 5- Efecan, 6- Nilüfer, 7- Yazgülü, 8- Rüzgar, 9- Kardelen, 10- Toprak, 11- Çınar, 12- Dişi verici hücre (Kıkırdak), 13- Kiraz, 14- Kurban, 15- Yaprak, 16- Karakız, 17- Üzüm, 18- Erkek verici hücre (Fibroblast), 19- Efe, 20- Efe (Sperm)

#### 4.5 Dizi Analizi Sonucu

SSCP analizi sonucu Klon Ece ve Ecem'in kan örneklerinde her ikisinde de aynı yerde ilave görülen bantlar ve aynı zamanda bir önceki çalışmada (Tüten Sevim 2016) bu iki dişi klonun dizi analizinde 7 nükleotidde çift pik görülmesi heteroplazmi ihtimalini güçlendirmiştir. Ancak her iki klonun dizi analiz sonucu hiçbir nükleotid farklılığının görülmemesi şaşırtıcı bulunmuştur (Tüten Sevim 2016). Bu durumu aydınlatmak için bu tez çalışmasında aynı dişi klonların doku örneklerinde mtDNA D-loop'un 499 bç'lik bölgesi, DNA dizi analizi ile incelenmiştir.

Tüten Sevim'in (2016) tez çalışmasında Klon Ece, Ecem ve yavrularının kan örneklerinden elde ettiği mtDNA D-loop'un 499 bç'lik bölgesinin dizi analizi sonuçları, dişi Klon Ece ve Ecem'in doku örneklerinin dizi analiz sonuçları ile karşılaştırılmak amacıyla kullanılmıştır.

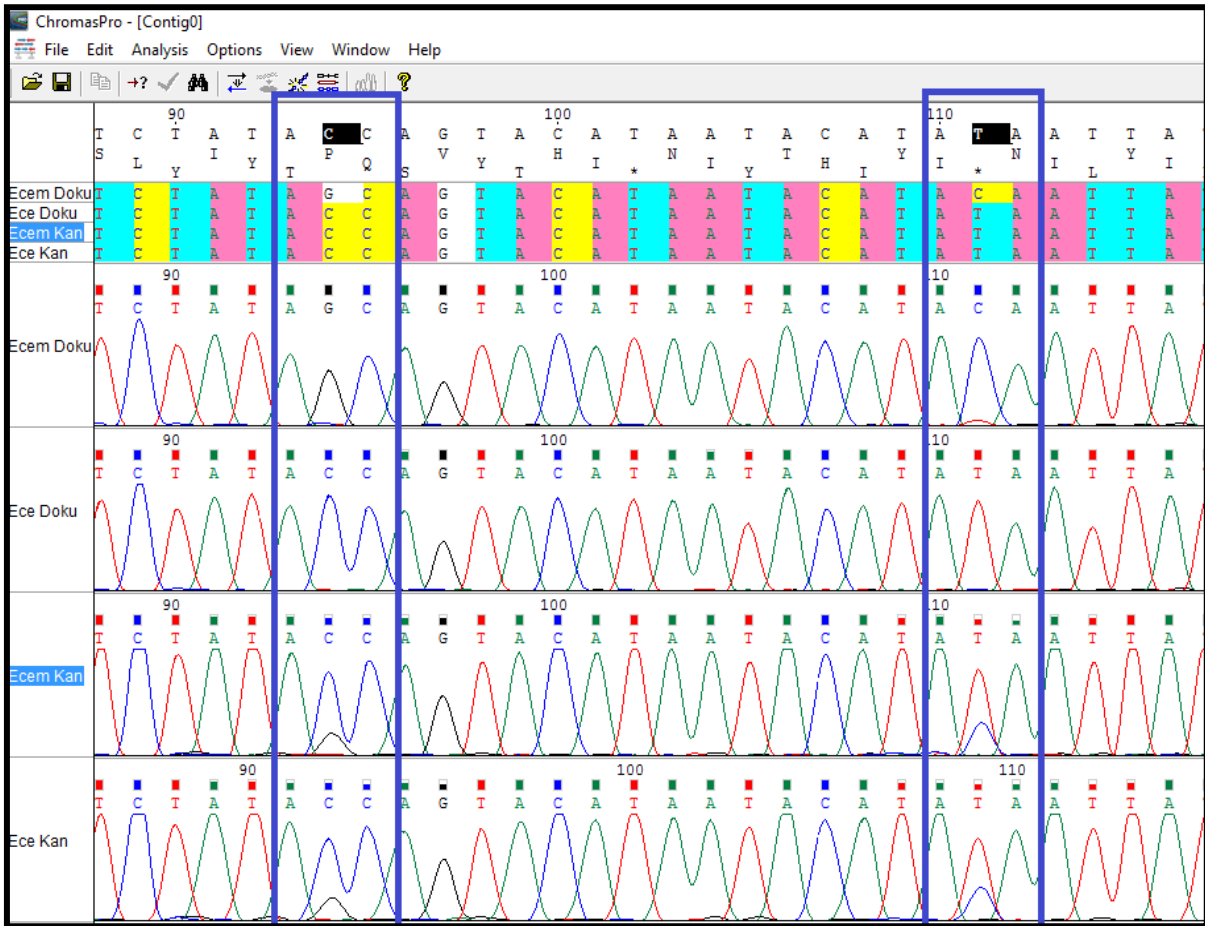
##### 4.5.1 Klon Ece ve Ecem'in doku ve kan örneklerinin karşılaştırılması

Klon Ece ve Ecem doku örnekleri arasında gen bankasında kayıtlı sekansa göre 15694, 15711, 15791, 15821, 15892, 15937, 15983 numaralı pozisyonlarda olmak üzere 7

nükleotidde farklılık tespit edilmiştir. Daha önceki çalışmada (Tüten Sevim 2016) kan örneklerinde aynı nükleotidlerde hiçbir fark tespit edilmediği, ancak çift pik olduğu belirtilmiştir (Tüten Sevim 2016). Her bir nükleotid için farklılıklar ayrı ayrı verilmiştir (Şekil 4.12-17).

Klon Ece ve Ecem kan örneklerinde 15694. nükleotidde hiçbir farklılık görülmezken (sitozin), aynı nükleotidde Ecem doku örneğinde guanin, Ece doku örneğinde ise sitozin bazı gözlenmiştir (Şekil 4.12).

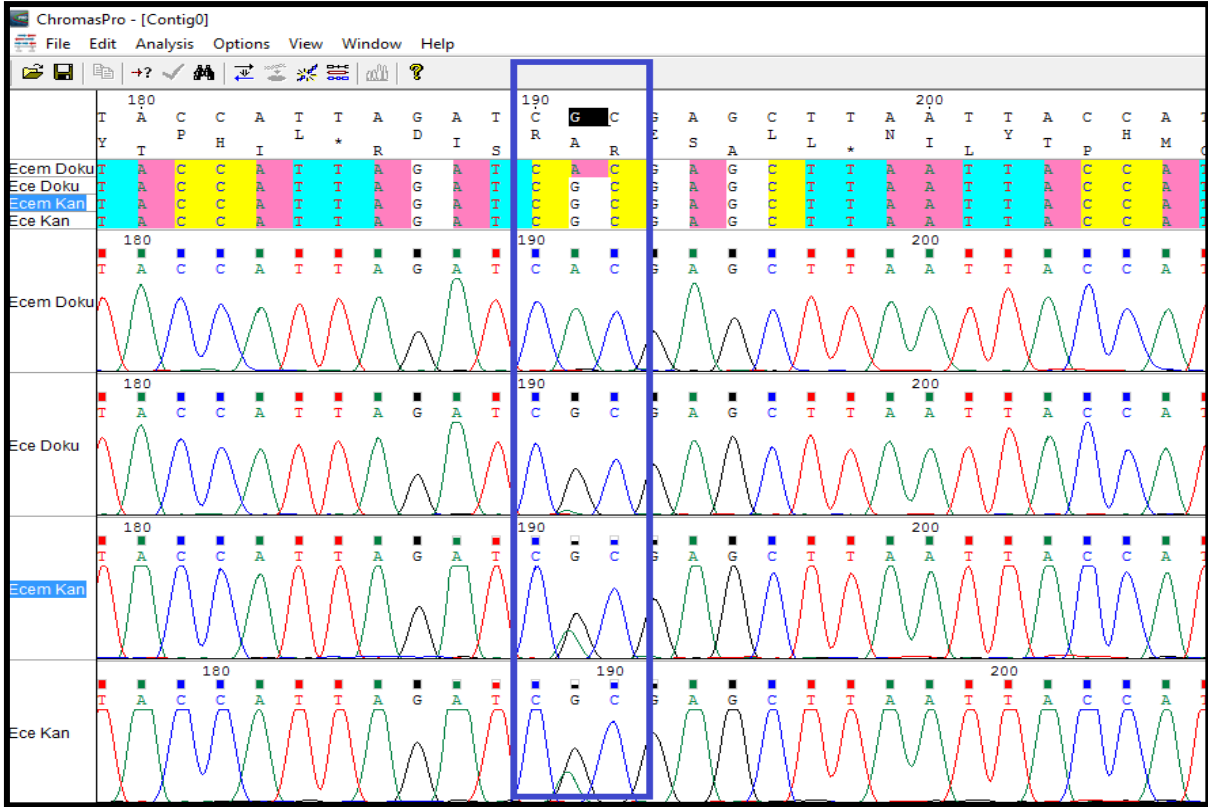
Klon Ece ve Ecem kan örneklerinde 15711. nükleotidde hiçbir farklılık görülmezken (timin), aynı nükleotidde Ecem doku örneğinde sitozin, Ece doku örneğinde ise timin bazı gözlenmiştir (Şekil 4.12).



**Şekil 4.12.** Klon Ece ve Ecem doku örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15694. ve 15711. nükleotidde gözlemlenen farklılık ve kan örneklerinde (Tüten Sevim 2016) aynı nükleotidde izlenen çift pik



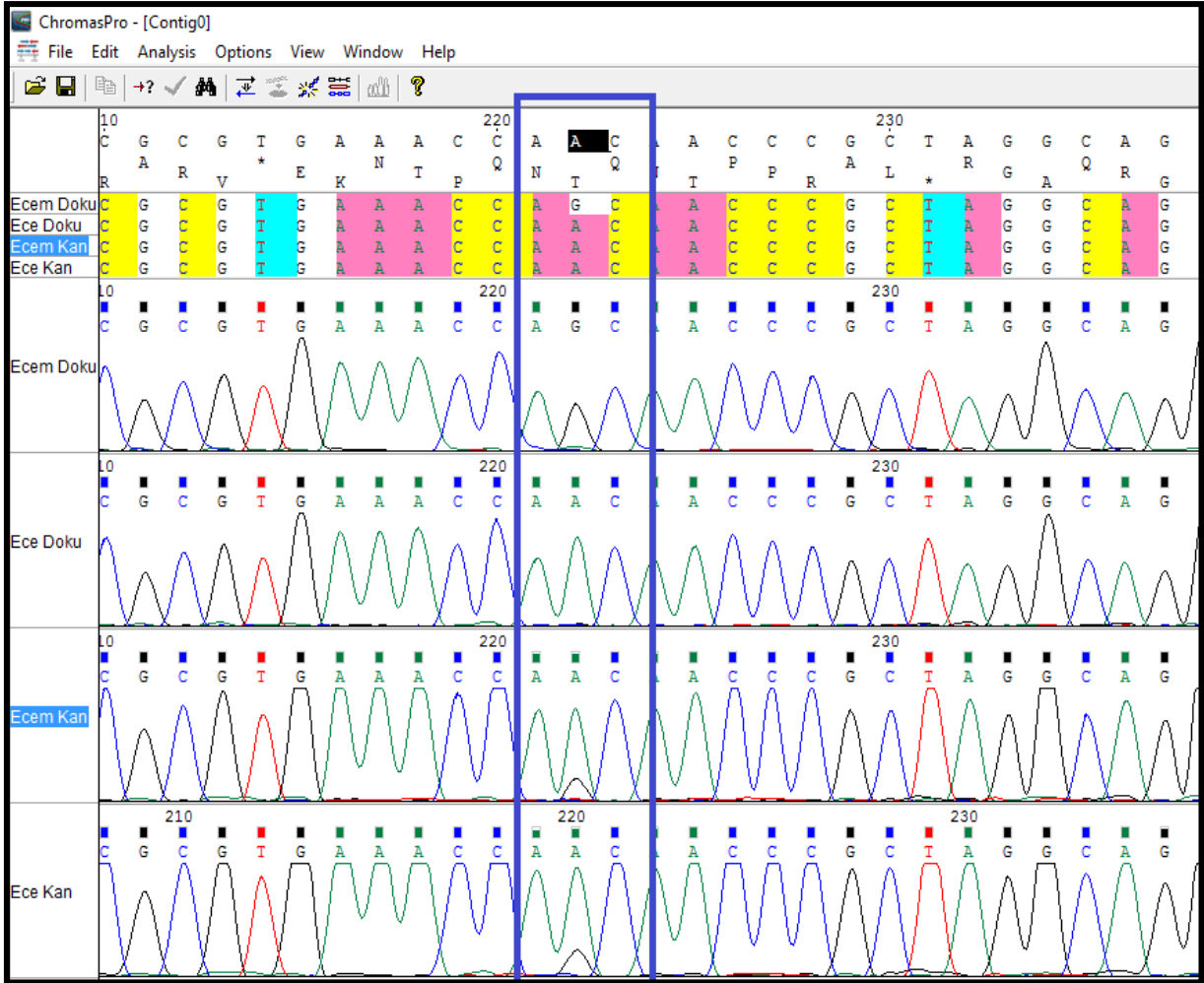
Klon Ece ve Ecem kan örneklerinde 15791. nükleotidde hiçbir farklılık görülmezken (guanin), aynı nükleotidde Ecem doku örneğinde adenin, Ece doku örneğinde ise guanin bazı gözlenmiştir (Şekil 4.13).



**Şekil 4.13.** Klon Ece ve Ecem doku örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15791. nükleotidde gözlemlenen farklılık ve kan örneklerinde (Tüten Sevim 2016) aynı nükleotidde izlenen çift pik

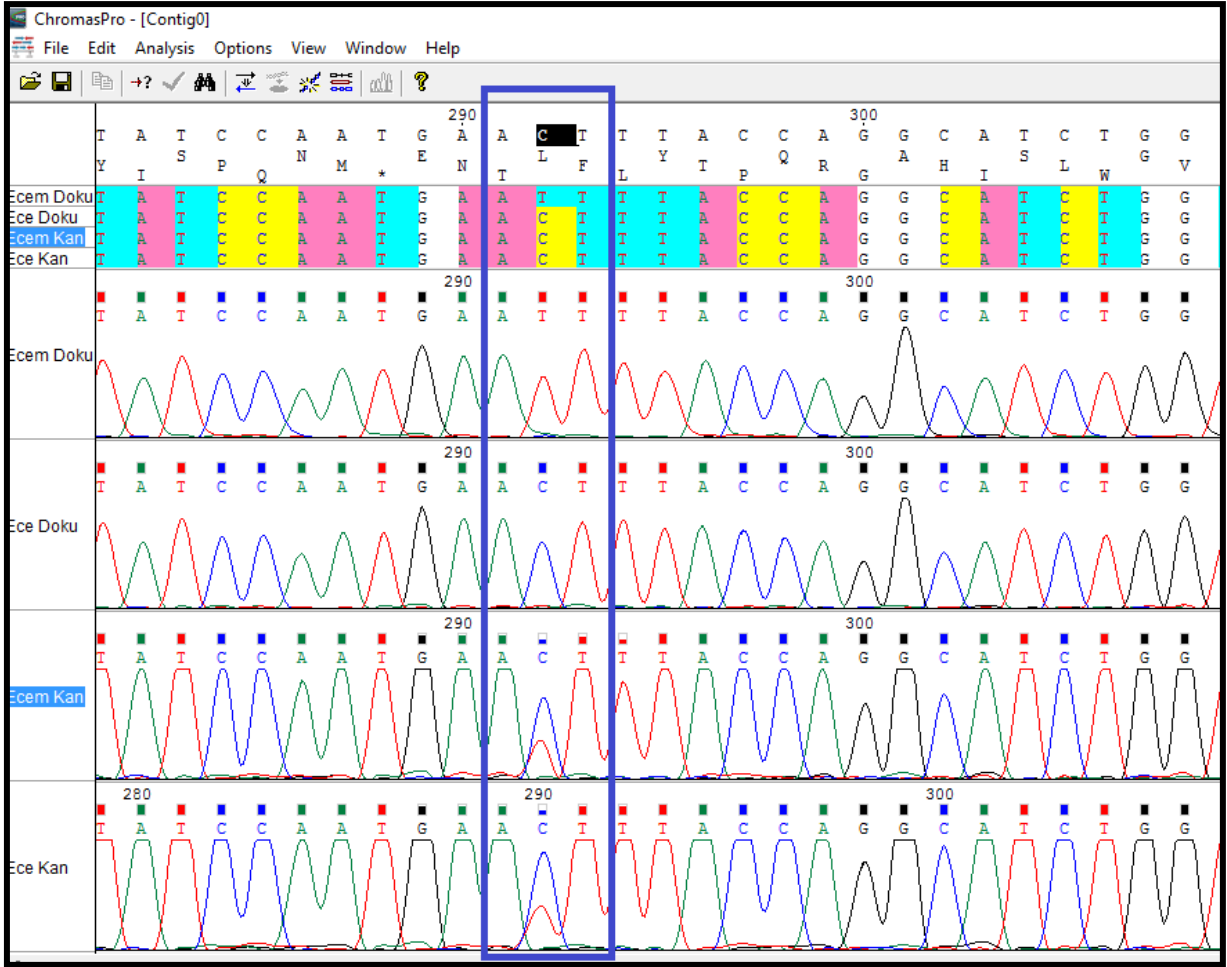
Klon Ece ve Ecem kan örneklerinde 15821. nükleotidde hiçbir farklılık görülmezken (adenin), aynı nükleotidde Ecem doku örneğinde guanin, Ece doku örneğinde ise adenin bazı gözlenmiştir (Şekil 4.14).





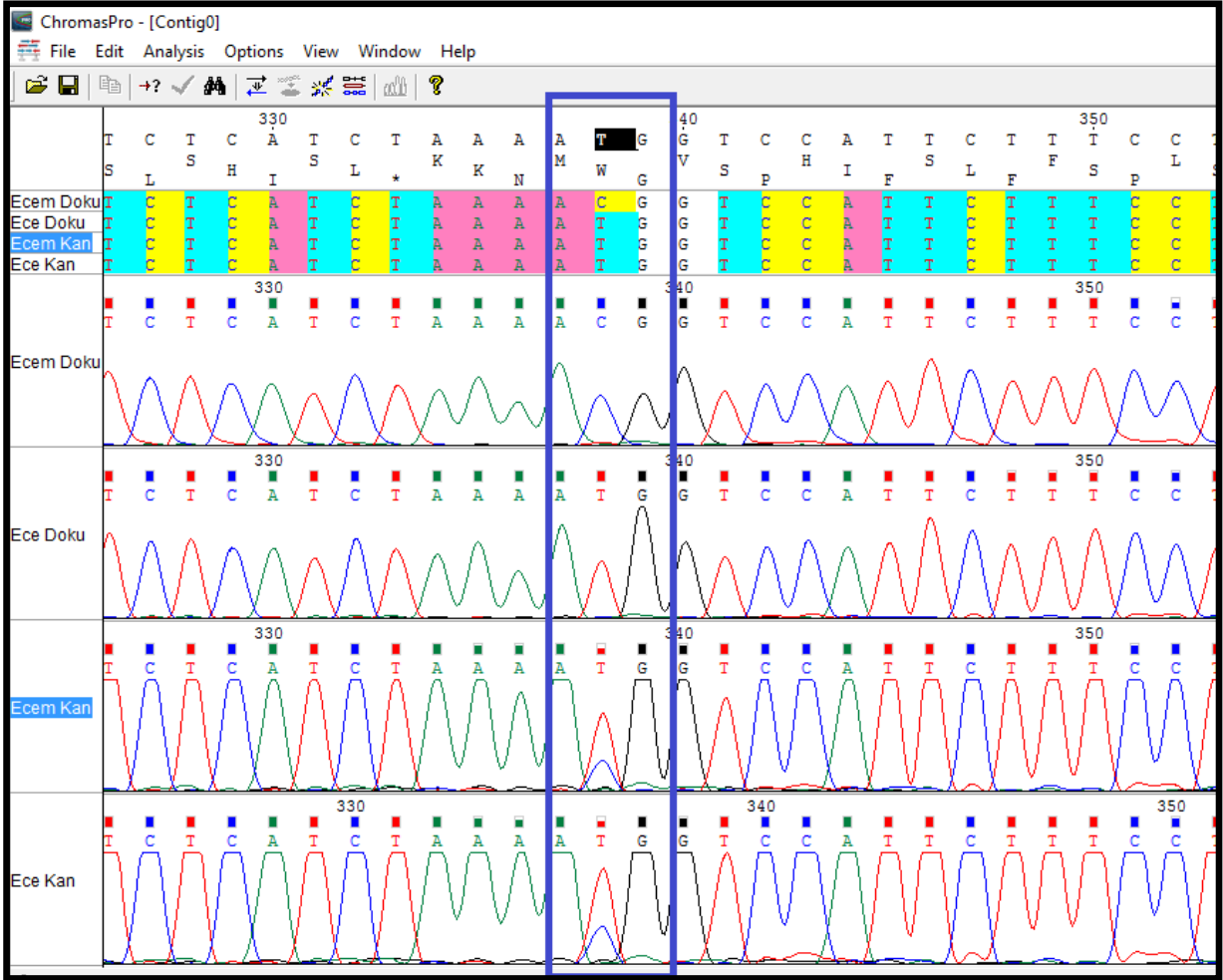
**Şekil 4.14.** Klon Ece ve Ecem doku örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15821. nükleotidde gözlemlenen farklılık ve kan örneklerinde (Tüten Sevim 2016) aynı nükleotidde izlenen çift pik

Klon Ece ve Ecem kan örneklerinde 15892. nükleotidde hiçbir farklılık görülmezken (sitozin), aynı nükleotidde Ecem doku örneğinde timin, Ece doku örneğinde ise sitozin bazı gözlenmiştir (Şekil 4.15).



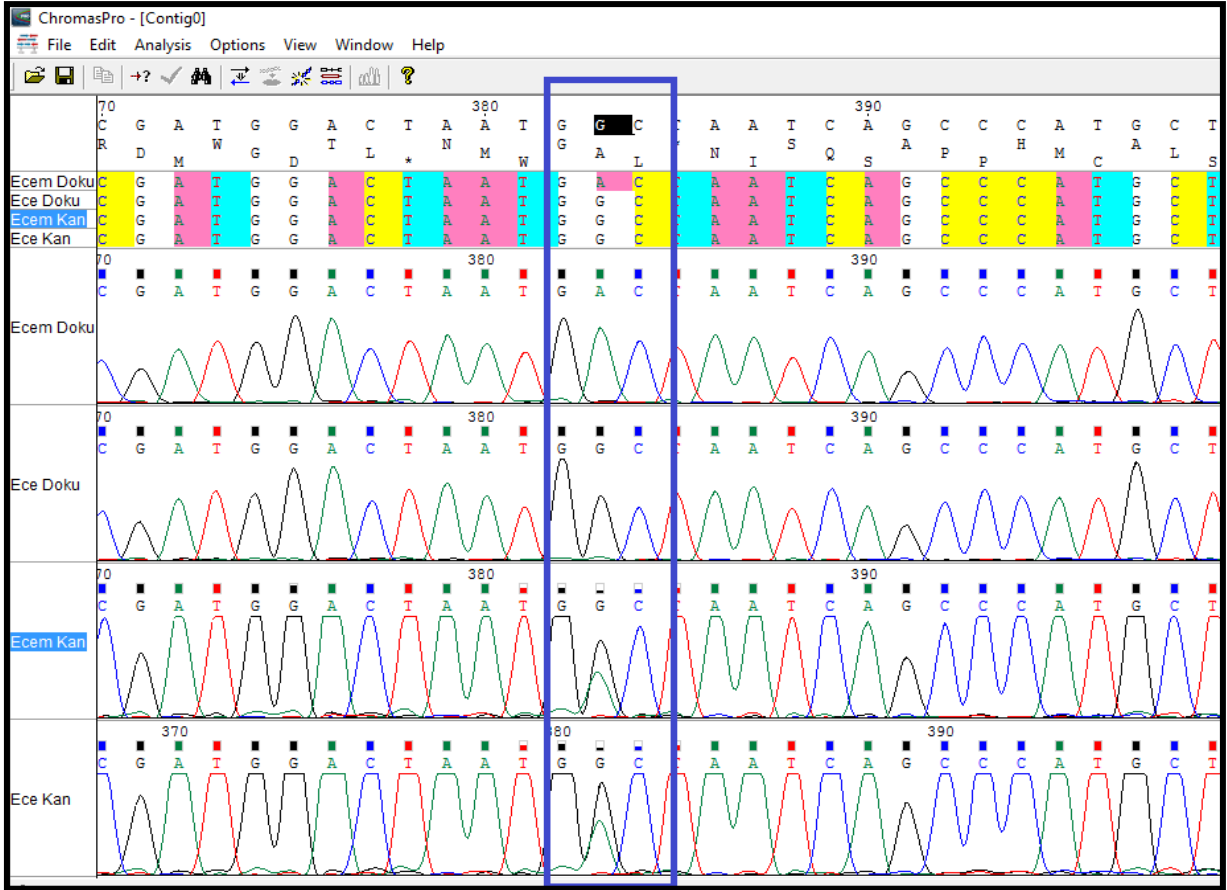
**Şekil 4.15.** Klon Ece ve Ecem doku örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15892. nükleotidde gözlemlenen farklılık ve kan örneklerinde (Tüten Sevim 2016) aynı nükleotidde izlenen çift pik

Klon Ece ve Ecem kan örneklerinde 15937. nükleotidde hiçbir farklılık görülmezken (timin), aynı nükleotidde Ecem doku örneğinde sitozin, Ece doku örneğinde ise timin bazı gözlenmiştir (Şekil 4.16).



**Şekil 4.16.** Klon Ece ve Ecem doku örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15937. nükleotidde gözlemlenen farklılık ve kan örneklerinde (Tüten Sevim 2016) aynı nükleotidde izlenen çift pik

Klon Ece ve Ecem kan örneklerinde 15983. nükleotidde hiçbir farklılık görülmezken (guanin), aynı nükleotidde Ecem doku örneğinde adenin, Ece doku örneğinde ise guanin bazı gözlenmiştir (Şekil 4.17).

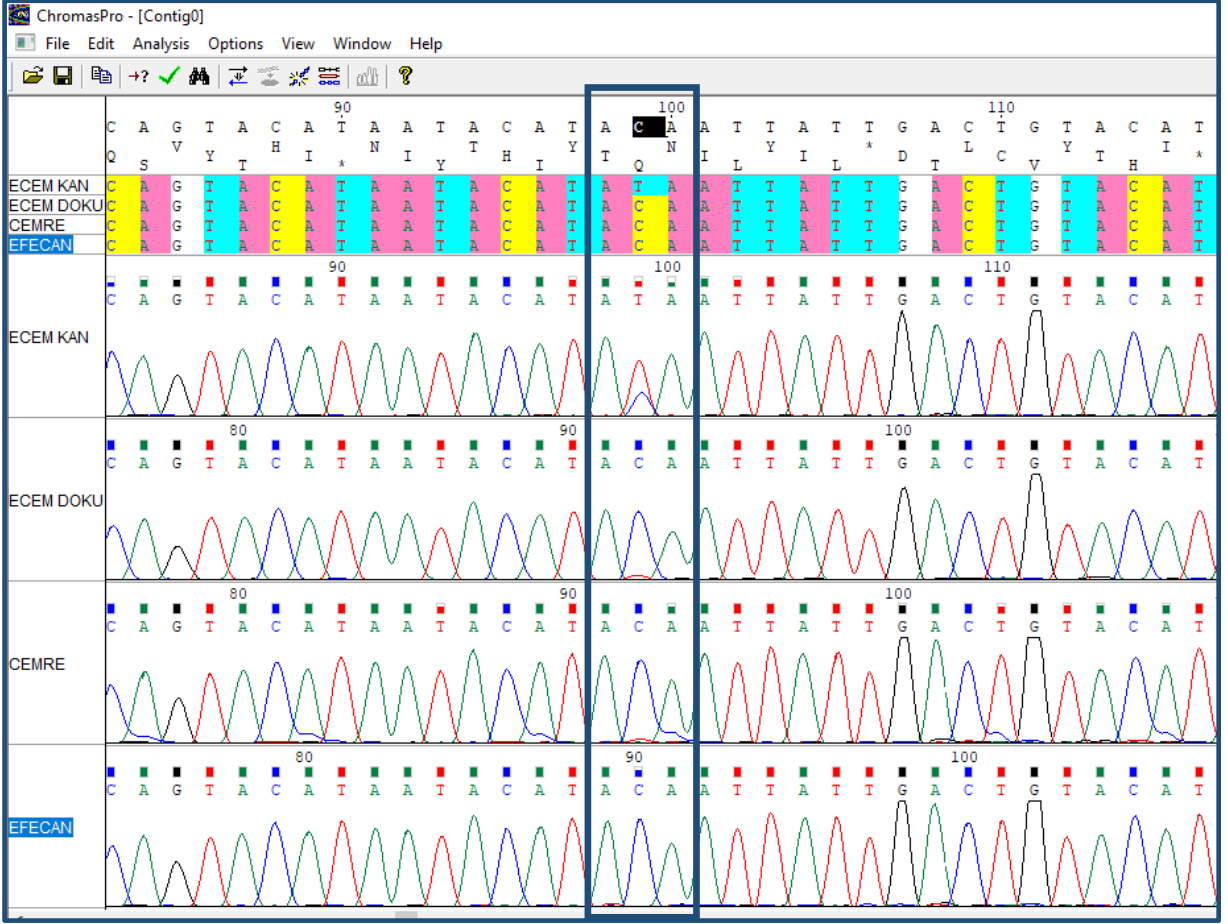


**Şekil 4.17.** Klon Ece ve Ecem doku örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15983. nükleotidde gözlemlenen farklılık ve kan örneklerinde (Tüten Sevim 2016) aynı nükleotidde izlenen çift pik

#### 4.5.2 Dişi Klon Ecem kan, doku ve yavrularının birbiri ile karşılaştırılması

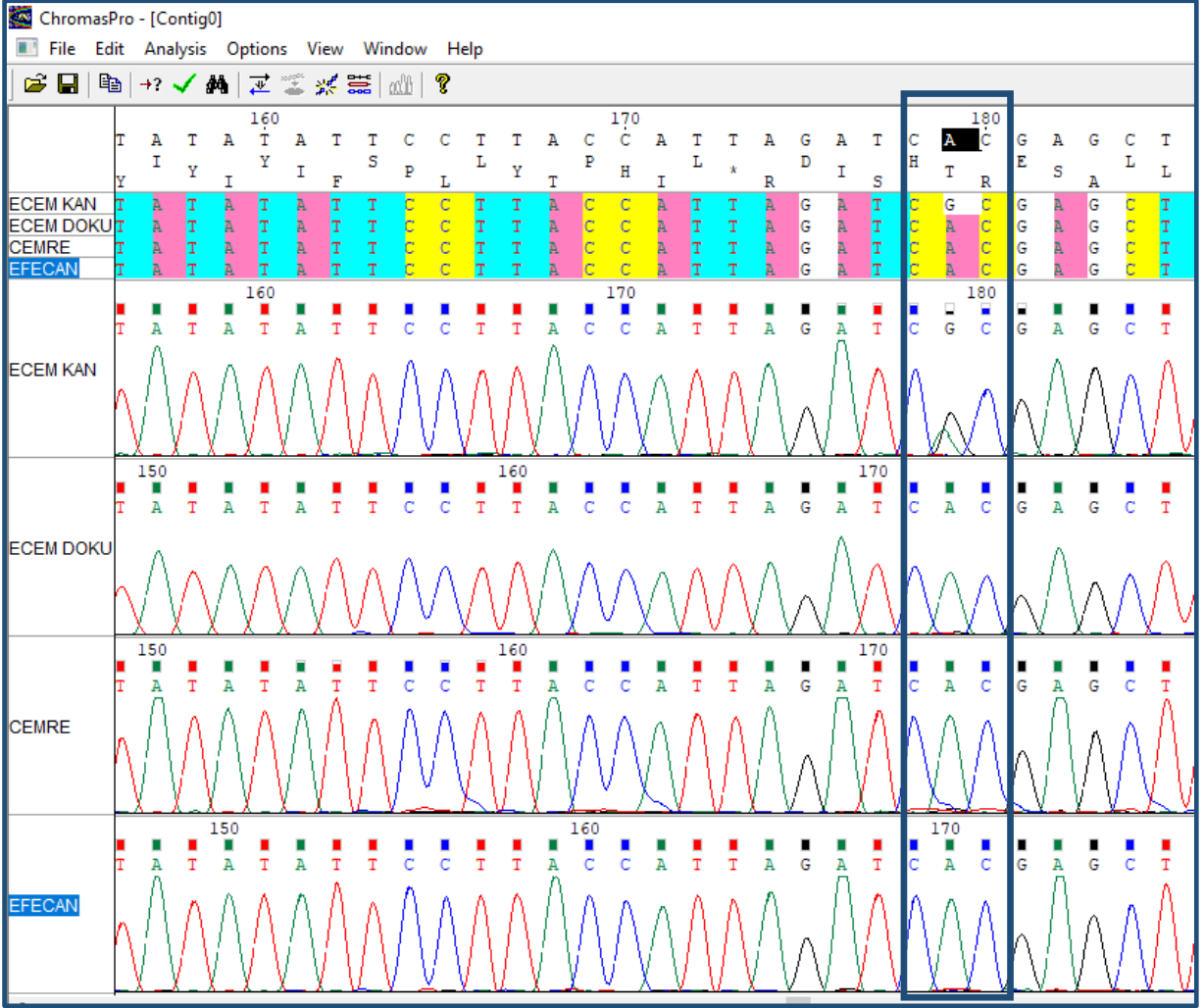
Daha önceki çalışmada (Tüten Sevim 2016) Klon Ecem'in kan örnekleri ile yavrularının (Cemre ve Efecan) kan örnekleri arasında gen bankasında kayıtlı sekansa göre 15694, 15711, 15791, 15821, 15892, 15937, 15983 numaralı pozisyonlarda olmak üzere 7 nükleotidde farklılık tespit edilmiştir. Mevcut tez çalışmasında ise Klon Ecem'in doku örnekleri ile yavruların kan örneklerinin dizi analiz sonuçları yukarıda belirtilen nükleotidlerde anne ve yavrular arasında fark olmadığını göstermiştir.





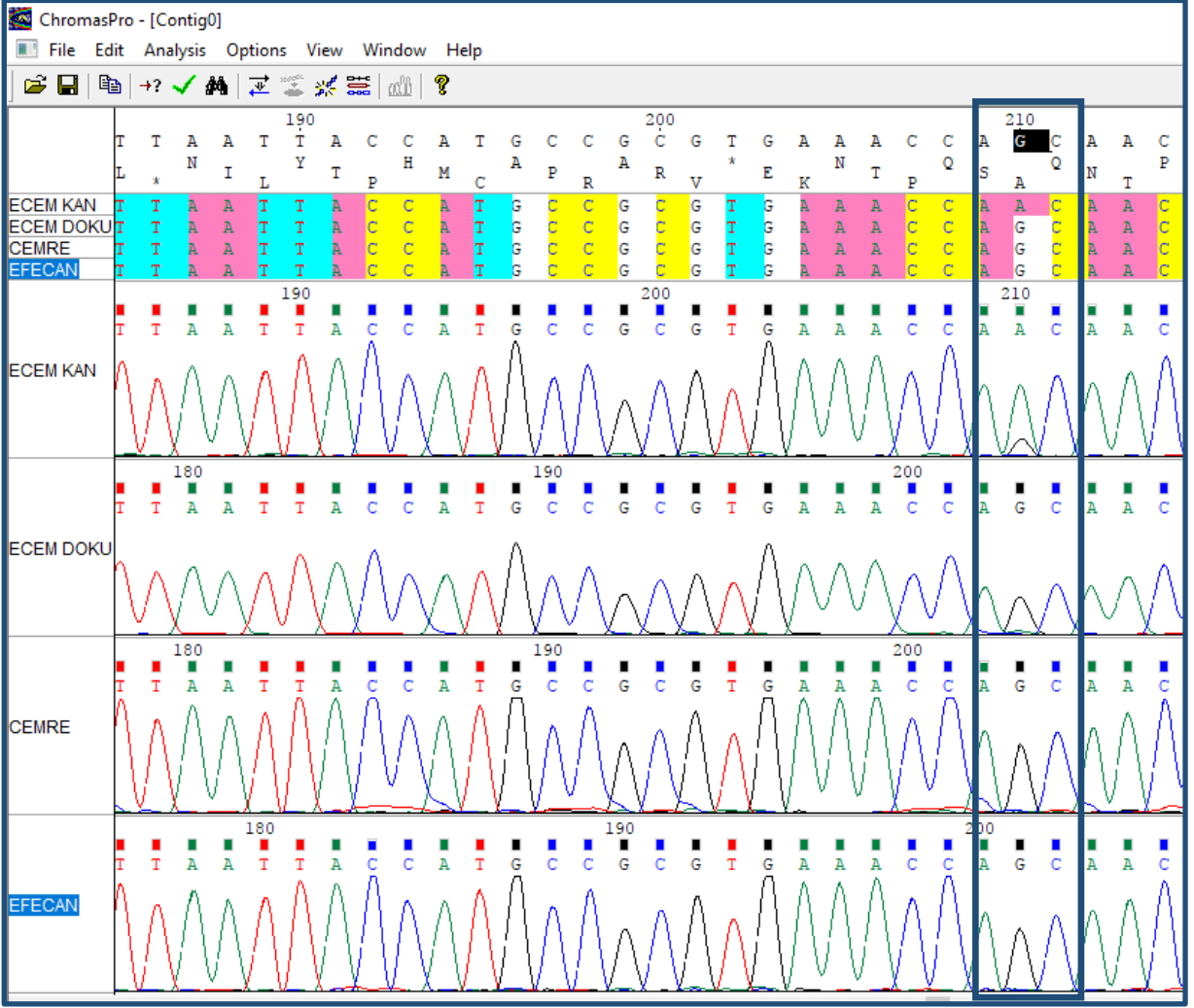
**Şekil 4.19.** Klon Ecem doku ve yavruları Cemre ve Efecan'ın kan örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15711. nükleotidde gözlemlenen benzerlik ve Klon Ecem kan örneğinde (Tüten Sevim 2016) aynı nükleotidde yavrulardan farklılık

Dizi analizi sonucu Genbank referans dizisine göre 15791. nükleotidde, Klon Ecem doku örneği ile yavrularının kan örneklerinin dizi analizinde farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 4.20).



**Şekil 4.20.** Klon Ecem doku ve yavruları Cemre ve Efecan'ın kan örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15791. nükleotidde gözlemlenen benzerlik ve Klon Ecem kan örneğinde (Tüten Sevim 2016) aynı nükleotidde yavrulardan farklılık

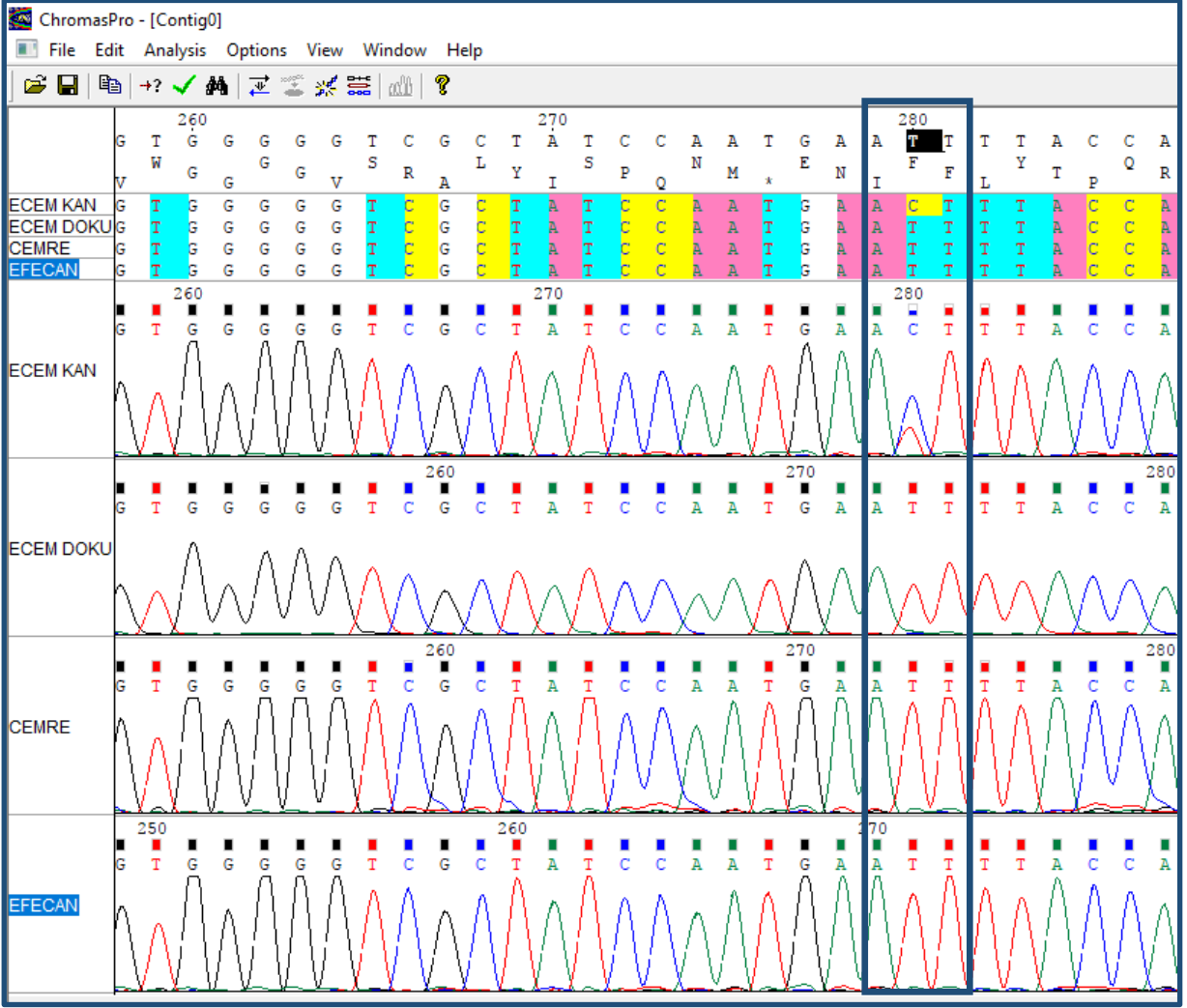
Dizi analizi sonucu Genbank referans dizisine göre 15821. nükleotidde, Klon Ecem doku örneği ile yavrularının kan örneklerinin dizi analizinde farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 4.21).



**Şekil 4.21.** Klon Ecem doku ve yavruları Cemre ve Efecan'ın kan örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15821. nükleotidde gözlemlenen benzerlik ve Klon Ecem kan örneğinde (Tüten Sevim 2016) aynı nükleotidde yavrulardan farklılık

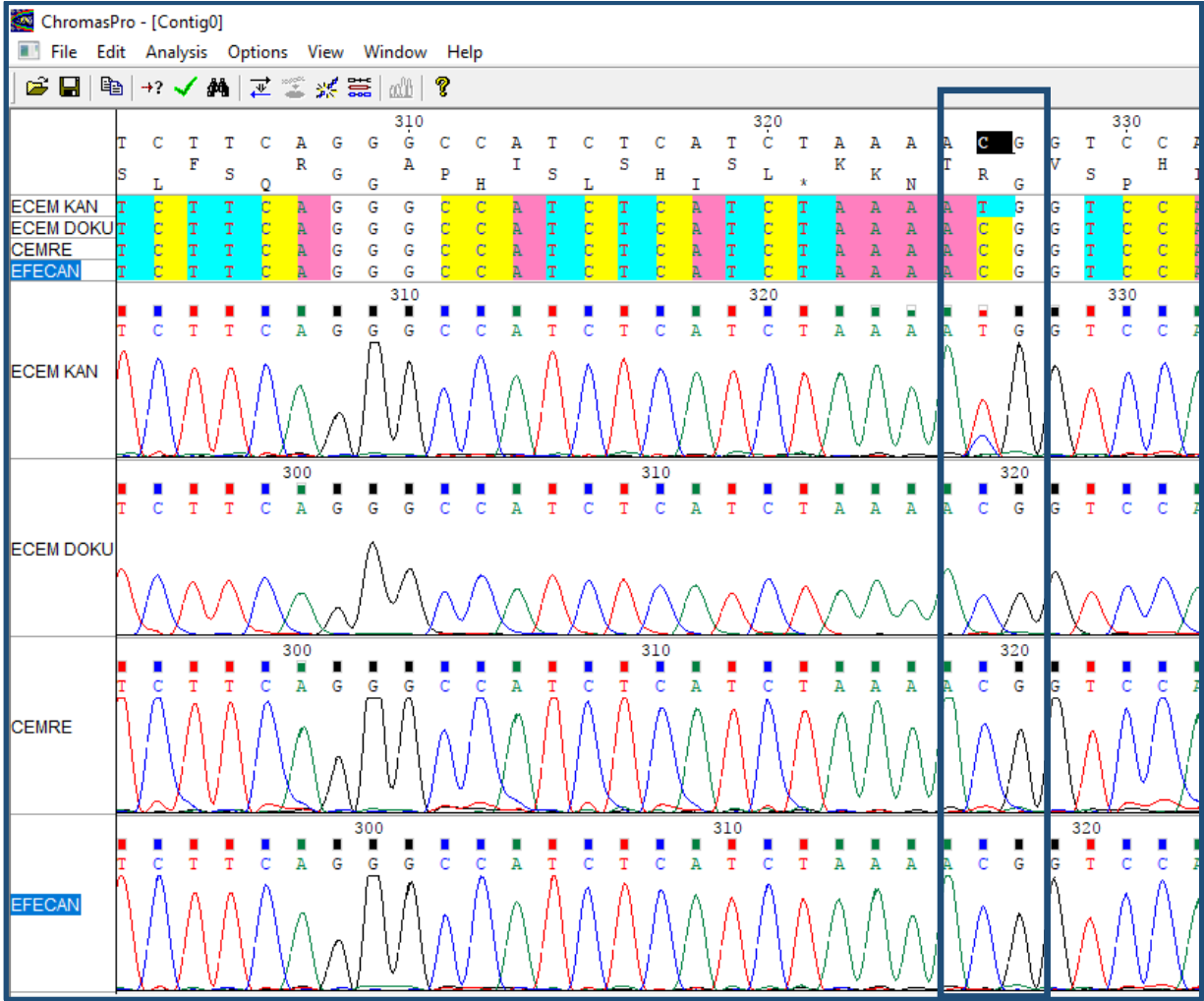
Dizi analizi sonucu Genbank referans dizisine göre 15892. nükleotidde, Klon Ecem doku örneği ile yavrularının kan örneklerinin dizi analizinde farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 4.22).





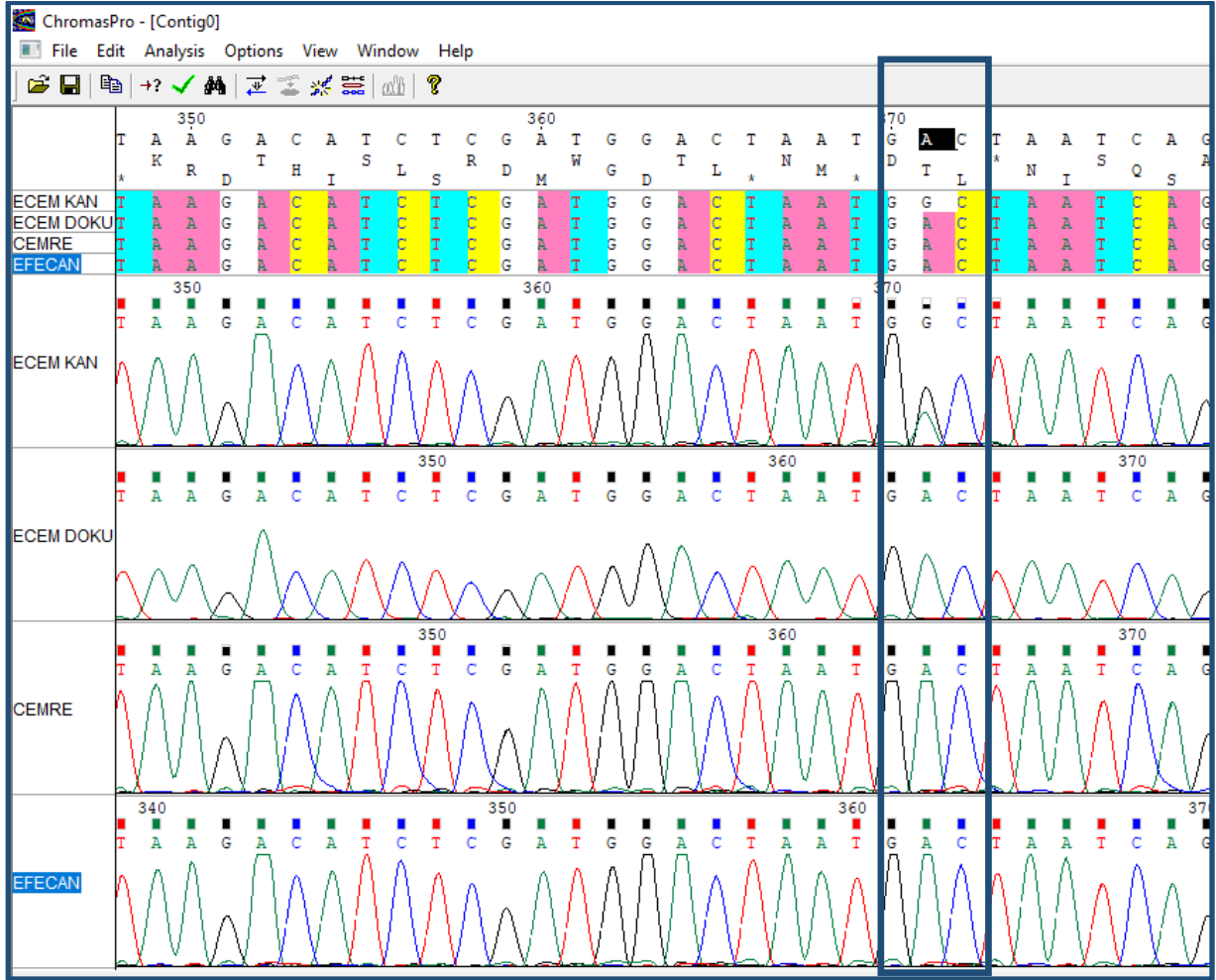
**Şekil 4.22.** Klon Ecem doku ve yavruları Cemre ve Efecan'ın kan örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15892. nükleotidde gözlemlenen benzerlik ve Klon Ecem kan örneğinde (Tüten Sevim 2016) aynı nükleotidde yavrulardan farklılık

Dizi analizi sonucu Genbank referans dizisine göre 15937. nükleotidde, Klon Ecem doku örneği ile yavrularının kan örneklerinin dizi analizinde farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 4.23).



**Şekil 4.23.** Klon Ecem doku ve yavruları Cemre ve Efecan'ın kan örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15937. nükleotidde gözlemlenen benzerlik ve Klon Ecem kan örneğinde (Tüten Sevim 2016) aynı nükleotidde yavrulardan farklılık

Dizi analizi sonucu Genbank referans dizisine göre 15983. nükleotidde, Klon Ecem doku örneği ile yavrularının kan örneklerinin dizi analizinde farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 4.24).



**Şekil 4.24.** Klon Ecem doku ve yavruları Cemre ve Efecan'ın kan örnekleri arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15983. nükleotidde gözlemlenen benzerlik ve Klon Ecem kan örneğinde (Tüten Sevim 2016) aynı nükleotidde yavrulardan farklılık

Klon Ece ve Ecem'in kan örnekleri ile doku örnekleri ve Klon Ecem'in yavrularının dizi analiz sonucunda, gen bankasına kayıtlı 15694, 15711, 15791, 15821, 15892, 15937 ve 15983. nt'de görülen bazlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Klon Ece ve Ecem'in kan örnekleri ve doku örnekleri ile Cemre ve Efecan'ın kan örneklerindeki baz farklılıkları

NÜKLEOTİDLER	KLONLAR				YAVRULAR	
	ECE KAN	ECEM KAN	ECE DOKU	ECEM DOKU	CEMRE	EFECAN
15694. nt	C	C	C	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
15711. nt	T	T	T	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>
15791. nt	G	G	G	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
15821. nt	A	A	A	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
15892. nt	C	C	C	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>
15937. nt	T	T	T	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>
15983. nt	G	G	G	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>

## 5. TARTIŞMA

Birçok türün klonlanmasından sonra nükleer transfer teknolojisi özellikle nesli tehlike altındaki türlerin korunma programlarında ele alınmaya başlanmıştır. Yıllar önce teknolojinin nesli tehlike altındaki türlerin korunmasına nasıl fayda sağlayacağı ile ilgili bir rapor yayınlanmıştır (Wells ve ark. 1998). Ancak teknolojinin başarısı halen arzu edilen seviyeye ulaşmamıştır. Bugüne kadar yapılan ve günümüzde de devam eden araştırmalar farklılaşmış hücre DNA'sının geriye programlanmasında bazı sorunlar olduğunu göstermiş ancak bunun sebepleri henüz aydınlatılamamıştır. Bu nedenle klonlar ve onların jenerasyonlarının detaylı incelenmesi, doğaya adaptasyonlarının izlenmesi ve özellikle laboratuvarında üretilen bu özel canlıların genetik yapılarının araştırılması sorunların aydınlatılması ve belki de çözümü noktasında fayda sağlayabilir.

Nükleer ve mitokondriyal etkileşim somatik hücre DNA'sının geri programlanması ve böylece klonlama başarısını etkileyen bir faktör olabilir. Bu bağlamda klonlama başarısını arttırmak için otolog somatik hücre nükleer transferi (Yang ve ark. 2006) veya alıcı ile aynı mtDNA haplotipine sahip verici hücre kullanılması ile ilgili çalışmalar vardır (Jiao ve ark. 2007). Bu çalışmalarda mtDNA, A ve B haplotipleri olarak kodlandırılmış ve haplotip A'ya sahip yumurta sitoplazmasının in vitro embriyo gelişimini B'ye sahip olandan daha fazla desteklediği (Jiao ve ark. 2007) veya homotip NT embriyo gelişimin (sitoplazma ve hücre mtDNA' sının aynı haplotipte olması) heterotipten daha iyi olduğu rapor edilmiştir (Yang ve ark. 2006). Aynı zamanda yumurta ve verici hücrenin aynı haplotipte seçilmesinin NT embriyoların gelişme potansiyelini ve epigenetik mekanizmayı olumlu yönde etkileyerek implantasyon sonrası gelişim kabiliyetini arttığı belirtilmiştir (Yan ve ark. 2010). Genetik çeşitlilik çalışmaları mtDNA kontrol bölgesinde (D-loop) yapılmaktadır (Bradley ve ark. 1996, Mannen ve ark. 2004). Bu çalışmalarda çeşitlilik, ırklar arasında değil bireyler arasında bulunmuştur ve benzer şekilde yapılan haplotip analizinde Holstain, İsviçre Esmeri, Angus ve Anadolu Boz ırk örneklerinde her iki haplotipte tespit edilmiştir (Arat ve ark. 2011). Bu tez çalışmasında *ApoI*, *HpaII*, *HinfI*, *AluI*, *TaqI* restriksiyon enzimleri kullanılarak haplotip analizi yapılmıştır. *HinfI*, *AluI*, *TaqI* restriksiyon enzimleri kullanılarak yapılan kesim sonucunda verici hücre ile klon hayvanların ve yavrularının aynı profil gösterdiği tespit edilmiştir. *HpaII* restriksiyon enzim kesimi sonucu Klon Ece, Ecem, Nilüfer ve onların yavrularının hücre vericisi ile aynı haplotipe ( $H_1$ ) sahip olduğu, Kon Kiraz ve yavruları ile Klon Efe'nin hücre vericisinden farklı haplotipe sahip olduğu görülmüştür. *ApoI* restriksiyon

enzim kesimi sonucu Klon Ece, Nilüfer ve yavrularının hücre vericisi ile aynı haplotipe sahip olduğu, Klon Ecem, Kiraz ve yavruları ile Klon Efe'nin hücre vericisinden farklı haplotipe sahip olduğu görülmüştür. Verici hücresi ile aynı veya farklı haplotipe sahip klonların doğması, halen bu klonların hayatta olması ve sağlıklı yavrular dünyaya getirmeleri bu haplotip farkının NT başarısında önemli bir etken olmadığını göstermektedir.

Tek iplikli konformasyon polimorfizmi analizi, tek iplikli DNA'nın belirlenmesinde avantajlı bir tekniktir. SSCP analizi, tek zincir DNA molekülündeki tek veya çoklu nükleotid değişikliklerinin, elektroforetik mobilitayı değiştirme etkisine dayanarak saptayabilen bir uygulamadır. Aynı boyuttaki tek iplikli DNA, kendilerindeki değişikliklere bağlı olarak non-denature jelde farklı pozisyonda yürürler. Komplementer iplikler ve tek baz değişikliği gösteren DNA parçaları ise değişik migrasyon gösterir. Tek iplikli DNA'nın farklı bantlar göstermesi mutasyona işaret etmektedir. Bu yöntem ile nükleotid dizisinde mutasyon ya da polimorfizm sonucu oluşan tek baz değişiklikleri, delesyon ve insersiyonlar belirlenebilmektedir. Sadece tek bir bazda bile olsa nükleotidlerin bilinmeyen değişimlerini tespit etmek amacıyla kullanılabilmesi belirtilen (Orita ve ark. 1989, Suzuki ve ark. 1991) bu yöntem, sığır mtDNA D-loop bölgesi polimorfizmlerinin (Harumi ve ark. 1994, Takeda ve ark. 1997) ve klonlarda heteroplazminin belirlenmesi (Takeda ve ark. 1999, 2003, 2008) amacıyla çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır.

Sığır yumurtasındaki mtDNA moleküllerinin sayısı yaklaşık olarak  $9,5 \times 10^5$  (Smith ve ark. 2005)'dir. Hücrenin içerdiği mtDNA miktarı hücre tipleri ve koşullarına bağlı olarak değişebilse (Van den Bogert ve ark. 1993, Takeda ve ark. 2002) bile teorik olarak yumurtanın mtDNA miktarının % 1'i kadardır (Michaels ve ark. 1982). Ancak SSCP örneklerde % 5 oranındaki hücre kaynaklı mtDNA'yı saptayabilme duyarlılığına sahiptir. Daha önce yapılan bir çalışmada klon buzağuların farklı dokularında değişik oranlarda heteroplazmi tespit edilmişken (Takeda ve ark. 2003, 2008), tüm vücuda ait mtDNA dağılımını yansıtmada yetersiz olan kan ve kıl örneklerinin incelendiği çalışmada çoğu klonda hücre kaynaklı mtDNA tespit edilememiştir (Takeda ve ark. 2008). Bu durum klonlarda eğer farklı dokulardan örnekleme yapılır ise heteroplazminin tespit edilebileceğini düşündürmektedir.

Gelişmekte olan yumurta hücresindeki mtDNA sayısı önce azalır ve olgunlaşırken büyük bir artış gösterir. Bu kısıtlanma ve ardından gözlenen amplifikasyona, mitokondriyal "genetik bottleneck (darboğaz)" denir (Hiendleder 2007). Bu durum birbirinden farklı oranda mutant mtDNA'nın bir sonraki kuşağa aktarılmasına ve farklı oranlarda etkilenen yavruların

doğmasına neden olur. Aynı şekilde genellikle dişi eşey hattındaki genetik darboğazın homoplazmik duruma yardımcı olması gerekir ancak heteroplazmik anneden doğan heteroplazmik yavruların bazılarında hücre kaynaklı mtDNA oranının anneden daha fazla olması (Takeda ve ark. 2008) bu doğal sürecin aynı zamanda düzensiz mtDNA dağılımına sebep olduğunu da göstermektedir. Bu veriler klon sığırlarda hücre kaynaklı mtDNA'nın yavrulara değişik oranlarda geçtiğini göstermektedir.

Hücre çalışmalarında iki farklı hücrenin füzyonu sonrası ortaya çıkan hibrid hücrelerde iki farklı mtDNA varlığının hücrenin fonksiyonunu bozduğu ve apoptoza sebep olduğu görülmüştür (Hiendleder ve ark. 2005). Bu durum nükleer transfer ile ilgili heteroplazmide yüksek ölüm oranlarının sebebi olabilir (Sutovsky ve ark. 1999). Bu yaklaşım nükleer transfer sonrası incelenen klonların çoğunluğunun homoplazmik veya çok az heteroplazmik olması ile desteklenebilir ancak ölü fetuslarda mtDNA heteroplazmisinin rastlanma oranı da çok düşüktür (Hiendleder ve Wolf 2003). Enteresan olarak tür içi nükleer transferlerde heteroplazmi araştırmaları heteroplazminin derecesinin kullanılan hücre tipi ve nükleer transfer prosedürü ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Örneğin fibroblastların elektro füzyonu ile üretilen klonlarda kumulusların mikroenjeksiyonu ile üretilen klonlardan daha yüksek seviyede hücre mtDNA geçişi olduğu görülmüştür (Inoue ve ark. 2004).

İki sağlıklı ancak farklı mtDNA'dan meydana gelen mtDNA heteroplazminin yavrular için zararlı olup olmadığı açık değildir. Eğer mtDNA heteroplazmi gelişime etki etmiş olsaydı heteroplazmik yavruların doğal seleksiyon ile azalması veya tamamen yok olması gerekirdi. Oysaki heteroplazmik sığırların büyüme, üreme, laktasyon ve ürün karakteristiklerinin normal olduğunu (Yonai ve ark. 2005), birinci jenerasyon heteroplazmik klon yavrularının da aynı şekilde normal gelişim gösterdiğini (Takeda ve ark. 2008) rapor eden çalışmalar vardır.

Bu çalışmada da SSCP analizi sonucunda bir erkek ve iki dişi klonun ve onların yavrularının kan örneklerinde verici hücreye ait mtDNA varlığı saptanmazken diğer iki dişi klonda heteroplazmi tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Ancak heteroplazmi tespit edilen dişi klonun yavrularının kan örneğinde heteroplazmi görülmemiştir. Heteroplazmi görülen iki dişi klonun mtDNA D-loop analizlerinin yapıldığı bir önceki çalışmada her ikisinin de aynı mtDNA'ya sahip olduklarının görülmesi ve bu klonlardan birinin yavrularının annelerinden farklı mtDNA varlığı göstermesi şaşırtıcı bulunmuştur (Tüten Sevim 2016). Bu çalışmada da aynı materyaller üzerindeki SSCP analizi iki klonda birden heteroplazmi olduğunu göstermiş

ancak bu analizin tek başına görülen bu heteroplazminin hücre kaynaklı olduğunu belirlemek için yeterli olmadığı kanısına varılmıştır.

Heteroplazminin bir başka sebebi ikiz sığırlarda görülen intrauterin gelişim sırasında embriyolar arasında vasküler anastomozdan (damarlar arası bağlantı) kaynaklanan karşılıklı hücre değişimidir. Bu ikizlerde lenfosit hücreleri ve üreme hücreleri kimerizmi bildirilmiştir. Benzer kimerizm aynı zamanda at, koyun, insan, lama gibi diğer memeli türlerinde de görülmüştür (Hiendleder ve Wolf 2003). İn vitro embriyoların farklı yumurta kaynağından üretildiği ve aynı anneye transfer edildiği bir çalışmada ikiz fetusların kan ve karaciğerinde kimerizm tespit edilmiştir (Hiendleder 2007). Bu tez çalışmasında iki dişi klonun kanında tespit edilen ancak deri örneklerinde tespit edilemeyen heteroplazminin aynı anneden doğan ikiz klonlarda embriyonal dönemde meydana gelmiş olan bir vasküler anastomoz sonucu karşılıklı hücre değişimi olduğu ve kanlarında iki ayrı yumurtadan kaynaklanan hücreleri birlikte taşıdıklarını düşündürmektedir. Daha önceki çalışmada (Tüten Sevim 2016) bu klonların kanlarından elde edilen mtDNA'nın dizi analiz sonuçları her iki klonun aynı mtDNA profiline sahip olduğunu gösterilirken bu tez çalışmasında aynı klonların dokularında elde edilen mtDNA'nın analizi birbirinden farklı iki mtDNA profilini göstermiştir. Ayrıca klonun dokularından elde edilen mtDNA ile klonun yavrularının mtDNA'sı arasında fark bulunmamıştır. Bu sonuç kanlarında iki ayrı yumurta hücresinden gelen hücrelere sahip olan bu iki klonun yumurta hücreleri de dahil olmak üzere kan dışındaki diğer hücrelerinin birbirinden farklı iki yumurtadan geldiğini desteklemektedir.



## 6. SONUÇ

Memeli mtDNA molekülü 16,5 kb büyüklüğünde çift sarmal bir moleküldür. mtDNA molekülleri hücre sitoplazmasının önemli bir kısmını kaplayan mitokondri içinde bulunur. Pek çok hücre tipinde mtDNA moleküllerinin sayısı  $2 \times 10^3$  kadardır. Sitoplazmasında en çok mitokondri taşıyan tek bir yumurtadaki mtDNA sayısı  $2 \times 10^5$  dir. Hücre ile gelen mtDNA miktarı ise % 1 olarak düşünülürse oldukça azdır. Ancak buna rağmen heteroplazminin tespit edildiği ve hatta jenerasyonlara da aktarıldığını gösteren çalışmalar vardır. Bununla birlikte sağlıklı iki mtDNA içeren heteroplazmik bir klonun buna bağlı olarak sorun yaşadığı rapor edilmemiştir. Bu çalışma ise elde edilen klonlar bazında değerlendirildiğinde kan örneklerinde heteroplazmi tespit edilen iki dişi klonunun doku örneklerinde ve yavrularında heteroplazminin görülmemiş olması, klonun dokusundan elde edilen mtDNA analiz sonucunun yavruları ile örtüşmesi bu heteroplazminin hücre kaynaklı olmayıp aynı anneden bir batında doğan iki klon dişi arasında anne karnında gelişim sırasında meydana gelen hücre değişiminden kaynaklandığını göstermektedir. Geri kalan hiçbir klon ve yavrusunda heteroplazminin tespit edilememesi, klonlara hücre kaynaklı mtDNA geçişinin ya hiç olmadığını veya tespit edilemeyecek düzeyde olduğunu göstermiştir. Ancak mtDNA'nın hücrelere rastgele dağıldığı ve daha önceki çalışmalarda klon ve yavrularının farklı dokularında değişik oranlarda heteroplazminin tespit edildiği düşünülürse mevcut çalışmanın materyalinde hücre kaynaklı heteroplazminin tespit edilememesi sebebi sadece kan örneklerinin incelenmiş olması olabilir. Ancak her halukarda tüm klon ve yavrularında heteroplazmi olsa bile bunun hayvanların sağlığı, gelişimi ve üremesi üzerinde olumsuz etkisinin dikkate değer olmadığı görülmektedir. Veya bu durum heteroplazminin hiç veya tespit edilemeyecek kadar zararsız derecede düşük olduğu embriyoların sağlıklı bir doğumla sonuçlanmış olduğu dolayısıyla tez çalışmasında incelenen klon populasyonunda bu nedenle hücre kaynaklı heteroplazminin tespit edilemediği şeklinde de yorumlanabilir.

Bununla birlikte mtDNA'nın mutasyon hızının nükleer DNA ile karşılaştırıldığında 5-10 kat daha yüksek olduğu da unutulmamalıdır. Solunum sırasında oluşan serbest  $O_2$  radikallerinin yüksek konsantrasyonda olması, koruyucu histonların az olması, tamir mekanizmalarının etkin olmaması, mtDNA'daki replikasyon hızının yüksek olması, intron bölgelerin olmaması mutasyonlara daha açık olmasının sebebidir. Bu mutasyonlar hayvanın yaşı ilerledikçe artar ve hücre kültür koşulları da mutasyonları tetikleyebilir. Bireyin tüm hücrelerinde mtDNA oranları da farklıdır. Bu nedenle çok yaşlı hayvana ait hücrenin

kullanılmasının, seçilen hücre tipinde daha çok mutasyon içeren mtDNA bulunmasının veya uzun süre uygun olmayan koşullarda verici hücrenin kültüre edilmesinin yüksek oranda mutasyon taşıyan bir hücrenin NT’de kullanılmasına sebep olabileceği ve bu durumda oluşan heteroplazminin de zararlı olabileceği unutulmamalıdır. Bu çalışma aynı zamanda tek batında doğan ikiz klonlarda olduğu gibi mtDNA’nın farklı dokularda farklılık göstermesinden dolayı sadece kan örnekleri üzerinde mtDNA analizlerinin yapıldığı çalışma sonuçlarının güvenilirliğinin şüpheli olabileceğini de düşündürmektedir.

Bunlara ilave olarak bu çalışma klonlarda heteroplazmi araştırması için SSCP yönteminin tek başına güvenilir sonuç vermeyebileceğini, bu analiz sonucu görülen heteroplazminin her zaman hücre kaynaklı olmayıp başka sebeplere de bağlı olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle heteroplazmi araştırmalarında SSCP analizi başka analiz yöntemleri ile desteklenmelidir.

Klonlamanın başarılı olabilmesi için hücre ve yumurta kaynağının aynı haplotipe sahip olması gerektiği varsayımı bu çalışma sonuçları ile desteklenmemektedir. Aksine çalışma bulgularının her iki kaynağın farklı haplotipe sahip olduğu klonlarında sağlıklı doğabileceğini ve sağlıklı jenerasyonlar vereceğini göstermiş olması, özellikle nesli tehlike altındaki hayvanların klonlama teknolojisi ile çoğaltılabileceğini ve gelecekte hücre bankalarının bu amaç için kullanılabileceğini göstermesi bakımından önemlidir.

## 7. KAYNAKLAR

- Anderson S, De Bruijn MH, Coulson AR, Eperon IC, Sanger F, Young IG (1982). Complete sequence of bovine mitochondrial DNA, conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *Journal of Molecular Biology*, 156:683-717.
- Anvar Z, Namavar-Jahromi B, Ebrahimi S, Ghareasi-Fard B (2015). Genomic DNA Extraction from Sperm. *Journal of Advanced Medical Sciences and Applied Technologies (JAMSAT)*, 1(1):120-121.
- Arat S, Gibbons J, Rzucidlo SJ, Miyoshi K, Venable A, Waltenburg R, Stice SL (2001). Bovine cloning using adult donor cells treated with roscovitine. *Biol. Reprod*, 64(1):173.
- Arat S (2010). “Hayvan Klonlama Teknolojileri”, “Modern Biyoteknoloji ve Uygulamaları” Editör: Dündar M, Bağış H. Erciyes Üniversitesi Matbaası, 56-98.
- Arat S, Çaputcu A, Akkoç T, Pabuccuoğlu S, Sağırkaya H, Cirit U, Nak Y, Koban E, Bağış H, Demir K, Nak D, Senunver A, Kılıçaslan R, Tuna B, Çetinkaya G, Denizci M, Aslan Ö (2011). Using cell banks as a tool in conservation programmes of native domestic breeds: the production of the first cloned Anatolian Grey cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 23:1012-1023.
- Arat S (2017). “Hayvan Klonlama”, *Güncel Biyoteknoloji ve Uygulamaları*” Editör: Dündar M, Bağış H. Erciyes Üniversitesi Matbaası, 43-60.
- Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempe MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW, Echelard Y (1999). Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnology*, 17:456–461.
- Battersby BJ, Loredano-Osti JC, Shoubridge EA (2003). Nuclear genetic control of mitochondrial DNA segregation. *Nat Genet*, 33:183-186.
- Bradley DG, MacHugh DE, Cunningham P, Loftus RT (1996). Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:5131-5135.
- Brem G, Kuhholzer B (2002). The recent history of somatic cloning in mammals. *Cloning Stem Cells*, 4:57–63.
- Burgstaller JP, Schinogl, P, Dinnyes A, Müller M, Steinborn R (2007). Mitochondrial DNA heteroplasmy in ovine fetuses and sheep cloned by somatic cell nuclear transfer. *BMC Developmental Biology*, 7:141.
- Burgstaller JP, Johnston IG, Poulton J (2015). Mitochondrial DNA disease and developmental implications for reproductive strategies. *Molecular Human Reproduction*, 21(1):11–22.
- Campbell KHS, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380:64–66.

- Campbell KHS (2002). A background to nuclear transfer and its applications in agriculture and human therapeutic medicine. *J Anat*, 200:267-275.
- Chavatte-Palmer P, Remy D, Cordonnier N, Richard C, Issenman H, Laigre P, Heyman Y, Mialot JP (2004). Health status of cloned cattle at different ages. *Cloning Stem Cells*, 6(2):94–100.
- Chen H, Leibenguth F (1995). Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA of three farm animal species: cattle, sheep and goat. *Comp. Biochem. Physiol. Vol. 111B*, (4):643-649.
- Chesne P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP (2002). Cloned rabbits production by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotechnology*, 20(4):366–369.
- Chinnery PF, Schon EA (2003). Mitochondria. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry*, 74:1188-1199.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM (1998). Cloned transgenic calves from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 280:1256–1258.
- Cornuet JM, Garnery L (1991). Mitochondrial DNA variability in honeybees and its phylogeographic implications. *Apidologie*, 22:627- 642.
- Cummins J (1998). Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. *Reviews of Reproduction*, 3:172-182.
- Do JT, Lee JW, Lee B (2002). Fate of donor mitochondrial DNA in cloned bovine embryos produced by micro injection of cumulus cells. *Biol Reprod*, 67:555-560.
- Eijk MV, Stewart-Haynes JA, Lewin HA (1992). Extensive polymorphism of the BOLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Animal Genetics*, 23(6):483-496.
- Evans MJ, Gurer C, Loike JD, Wilmut I, Schnieke AE, Schon EA (1999). Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep. *Nat Genet*, 23:90-93.
- Fourtounis D (1999). Mutations in the control region of the mitochondrial genome linked to traits of economic value in white leghorns. Thesis of Master degree, McGill University. Canada.
- Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, Duchi R, Lazzari GA (2003). Cloned horse born to its dam twin. *Nature*, 424:635.
- Griffiths AJF, Wessler SR, Carroll SB, Doebley J (2012). *Introduction to Genetic Analysis*. 10th Edition. Freeman and Worth Publishing Group, LLC, 41 Madison Avenue, pp.103-105, New York.
- Gyllensten U, Wharton D, Wilson AC (1985). Maternal inheritance of mitochondrial DNA during backcrossing of two species of mice. *J Hered*, 76:321-324.

- Han ZM, Chen DY, Li JS, Sun QY, Wan QH, Kou ZH, Rao G, Lei L, Liu ZH, Fang SG (2004). Mitochondrial DNA heteroplasmy in calves cloned by using adult somatic cell. *Molecular Reproduction Development*, 67:207–214.
- Harumi T, Furukawa T, Awata T, Kumagai M, Yasue H (1994). Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphisms in D-loop region of the bovine mitochondrial DNA. *Animal Science Technology*, 65:149-151.
- Hecht W (1990). Studies on mitochondrial DNA in farm animals. In *genome Analysis in Domestic Animals*, 259-268.
- Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, Camous S, Vignon X, Renard JP (2002). Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biology Reproduction*, 66: 6–13.
- Hiendleder S, Lewalski H, Wassmuth R, Janke A (1998). The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *Journal of Molecular Evolution*, 47(4): 441-448.
- Hiendleder S, Wolf E (2003). The mitochondrial genome in embryo Technologies. *Reproduction Domestic Animals*, 38:290-304.
- Hiendleder S, Zakhartchenko V, Wolf E (2005). Mitochondria and the success of somatic cell nuclear transfer cloning: from nuclear-mitochondrial interactions to mitochondrial complementation and mitochondrial DNA recombination. *Reproduction Fertility Development*, 17:69-83.
- Hiendleder S (2007). Mitochondrial DNA Inheritance after SCNT, Somatic Cell Nuclear Transfer, Ed: P. Sutovsky, Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, 103-116.
- Hill JR, Chavatte-Palmer P (2002). Pregnancy and neonatal care of cloned animals. In 'Principles of Cloning', Ed. J. Cibelli. Academic press, San Diego, 247–266.
- Hutchison CA, Newbold JE, Potter SS (1974). Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature*, 251:536-538.
- Inoue K, Ogonuki N, Yamamoto Y (2004). Tissue-specific distribution of donor mitochondrial DNA in cloned mice produced by somatic cell nuclear transfer. *Genesis*, 39:79-83.
- Işık R (2016). Saanen ırkı keçilerde POU1F1 geni polimorfizmi ve verim özellikleri ile ilişkilerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Işık R, Bilgen G, Koşum N, Kandemir Ç, Taşkın T (2017). Polymorphism in exon 7 of  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -LG) gene and its association with milk yield in saanen goats. The Special Issue of 2nd International Balkan Agriculture Congress May, 16-18, Tekirdağ.
- Jiang Y, Liu SZ, Zhang YL, Jiang MX, Sun QY, Chen DY (2004). The fate of mitochondria in *Ibex-hirus* reconstructed early embryos. *Acta Biochimica Biophysica Sinica*, 36:371-374.

- Jiao F, Yan JB, Yang XY, Li H, Wang Q, Huang SZ, Zeng F, Zeng YT (2007). Effect of oocyte mitochondrial DNA haplotype on bovine somatic cell nuclear transfer efficiency. *Molecular Reproduction Development*, 74(10):1278–1286.
- Kaneda H, Hayashi JI, Takahama S, Taya C, Lindahl KF and Yonekawa H (1995) Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92:4542–4546.
- Keefer Carol L (2015). Artificial cloning of domestic animals. *PNAS*, 112: 8874–8878.
- Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Shamim MH, Kim JJ, Kang SK, Schatten G, Hwang WS (2005). Dogs cloned from somatic cells. *Nature*, 436:641.
- Lewin B (1987). *Genes*. Third edition. John Wiley & Sons, 422–431. Canada.
- Lüleyap HÜ (2008). *Moleküler Genetik Esasları*. 1. Baskı, Nobel Kitabevi, Adana.
- Li MH, Adamowicz T, Switonski M, Ammosov I, Ivanova Z, Kiselyova T, Popov R, Kantanen J (2006). Analysis of population differentiation in North Eurasian cattle (*Bos taurus*) using single nucleotide polymorphisms in three genes associated with production traits. *Animal Genetics*, 37(4):390–392.
- Loi P, Ptak G, Barboni B (2001). Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nature Biotechnology*, 19:962–964.
- Mannen H, Kohno M, Nagata Y, Tsuji S, Bradley DG, Yeo JS, Nyamsamba D, Zagdsuren Y, Yokohama M, Nomura K, Amano T (2004). Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation of north eastern Asian cattle. *Molecular Phylogenetics Evolution*, 32:539–544.
- May-Panloup P, Chretien MF, Savagner F (2003). Increased sperm mitochondrial DNA content in male infertility. *Human Reproduction*, 18:550–556.
- Meghen C, Machugh DE, Bradley DG (2002). Genetic characterization and West African cattle. Department of Genetics, Trinity College, Dublin 2, Ireland, [www.fao.org/3/a-t1300t/t1300T0j.htm](http://www.fao.org/3/a-t1300t/t1300T0j.htm) (2017).
- Meirelles FV, Bordignon V, Watanabe Y, Watanabe M, Dayan A, Lobo RB, Garcia JM, Smith LC (2001). Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos Taurus* Oocyte. *Genetics*, 158:351–356.
- Michaels GS, Hauswirth WW, Laipis PJ (1982). Mitochondrial DNA copy number in bovine oocytes and somatic cells. *Dev Biol*, 94:246–251.
- Nataraj AJ, Olivos-Glander I, Kusukawa N, Edward HW (1999). Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis*, 20:1177–1185.
- Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry ACF (2000). Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 289:1188–1190.

- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86:2766–2770.
- Özdemir M, Doğru Ü (2007). Genetik Karakterizasyonda Mitokondriyal DNA Kullanımı. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 38:105–111.
- Özdil F (2007). Mitokondriyal DNA PCR-RFLP (Restriction Parça Uzunluk Polimorfizmi) markerleri kullanılarak Türkiye'nin farklı yörelerine ait balarılarının tanımlanması. *Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.*
- Pace MM, Augenstein ML, Betthausen JM, Childs LA, Eilertsen KJ, Enos JM, Forsberg EJ, Golueke PJ, Graber DF, Kemper JC, Koppang RW, Lange G, Lesmeister TL, Mallon KS, Mell GD, Misica PM, Pfister-Genskow M, Strelchenko NS, Voelker GR, Watt SR, Bishop MD (2002). Ontogeny of cloned cattle to lactation. *Biol. Reprod.* 67:334–339.
- Piljug A (2016). Bosna Hersek yerli koyunları ve keçilerindeki mitokondriyal DNA (MtDNA) D-loop polimorfizmi. *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.*
- Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH, First NL (1987). Nuclear transplantation in the bovine embryos: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reproduction*, 37:859-866.
- Prather RS, Hagemann LJ, Neal L (1989) First preimplantation mammalian aggregation and injection chimeras. *Gamete Research*, 22(2):233–247.
- Ravnik-Glavac M, Glavac D, Dean M (1994). Sensitivity of single strand conformation polymorphism and heteroduplex method for mutation detection in the cystic fibrosis gene. *Human Molecular Genetics*, 3:801-807.
- Rokas A, Ladoukakis E, Zouros E (2003). Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(8):411-417.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Saraçoğlu D (2007). Yabani ve Kültür Nohutlarının Moleküler Genetik Yöntemlerle Karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.*
- Shi D, Lu F, Wei Y, Cui K, Yang S, Wei J, Liu Q (2007). Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biology Reproduction*, 77:285–291.
- Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L, Westhusin M (2002). A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, 415:859.
- Smith, LC, Bordignon V, Babkine M, Fecteau G, Keefer C (2000). Benefits and problems with cloning animals. *The Canadian Veterinary Journal*, 41:919–924.

- Smith LC, Thundathil J, Filion F (2005). Role of the mitochondrial genome in preimplantation development and assisted reproductive technologies. *Reproduction Fertility Development*, 17:15–22.
- Solak M, Şengil AZ, Öztaş S, Bağcı H (2000). Moleküler genetik ve rekombinant DNA teknolojisi. *Afyon: Uyun Ajans*, : 130-133, 135
- St John JC, Moffatt O, D'Souza N (2005). Aberrant heteroplasmic transmission of mtDNA in cloned pigs arising from double nuclear transfer. *Molecular Reproduction Development*, 72:450-460.
- Steinborn R, Schinogl P, Zakhartchenko V (2000). Mitochondrial DNA heteroplasmy in cloned cattle produced by fetal and adult cell cloning. *Nature Genetics*, 25:255-257.
- Steinborn R, Schinogl P, Wells D (2002). Coexistence of *Bos taurus* and *B. indicus* mitochondrial DNA's in nuclear transfer-derived somatic cattle clones. *Genetics*, 162:823-829.
- Stice SL, Robl JM (1988). Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biology Reproduction*, 39:657-664.
- Strachan T, Read A (2010). *Human Molecular Genetics*. Garland Science, Taylor Francis Group, 782, New York.
- Sultana S, Mannen H (2004). Polymorphism and evolutionary profile of mitochondrial DNA control region inferred from the sequences of Pakistani goats. *Animal Science Journal*, 75:303-309.
- Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, 402:371-372.
- Sutovsky P, Van Leyen K, McCauley T (2004). Degradation of paternal mitochondria after fertilization: Implications for heteroplasmy, assisted reproductive technologies and mtDNA inheritance. *Reprod Biomed Online*, 8:24-33
- Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1991). Allele-specific polymerase chain reaction: a method for amplification and sequence determination of a single component among a mixture of sequence variants. *Analytical Biochemistry*, 192:82-84.
- Takeda K, Onishi A, Takahashi S, Kojima T, Hanada H (1997) Genetic variants of bovine mitochondrial DNA D-loop region in Japanese Black, Japanese Brown and Holstein breeds *Animal Science and Technology (Japan)*, 68:1161-1165.
- Takeda K, Takahashi S, Onishi A, Goto Y, Miyazawa A, Imai H (1999). Dominant distribution of mitochondrial DNA from recipient oocytes in bovine embryos and offspring after nuclear transfer. *Journal of Reproduction and Fertility*, 116:253–259.
- Takeda K, Akagi S, Takahashi S, Onishi A, Hanada H, Pinkert CA (2002). Mitochondrial activity in response to serum starvation in bovine (*Bos taurus*) cell culture. *Cloning Stem Cells*, 4:223–230.
- Takeda K, Akagi S, Kaneyama K, Kojima T, Takahashi S, Imai H, Yamanaka M, Onishi A, Hanada H (2003). Proliferation of donor mitochondrial DNA in nuclear transfer calves



- (*Bos taurus*) derived from cumulus cells. *Molecular Reproduction Development*, 64:429–437.
- Takeda K, Tasai M, Iwamoto M (2006). Transmission of mitochondrial DNA in pigs and progeny derived from nuclear transfer of Meishan pig fibroblast cells. *Molecular Reproduction Development*, 3:306-312.
- Takeda K, Kaneyama K, Tasai M, Akagi S, Takahashi S, Yonai M, Kojima T, Onishi A, Tagami T, Nirasawa K, Hanada H (2008). Characterization of a donor mitochondrial DNA transmission bottleneck in nuclear transfer derived cow lineages. *Molecular Reproduction Development*, 75(5):759-765.
- Tüten Sevim E (2016). Nükleer Transfer İle Elde Edilen Klon Sığır ve Yavrularının MtDNA Ve Mikrosatellit Belirteçlerle Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ
- Uphold WB, Dawid IB (1977). Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goats: Rapid evolution in the D-loop region. *Cell*, 11:571-583.
- Ursing BM, Arnason U (1998). Analyses of mitochondrial genomes strongly support a hippopotamus whale clade. *Proceedings Royal Society Biological Sciences* 265 (1412):2251-2255.
- Van den Bogert C, De Vries H, Holtrop M, Muus P, Dekker HL, Van Galen MJ, Bolhuis PA, Taanman JW (1993). Regulation of the expression of mitochondrial proteins: Relationship between mtDNA copy number and cytochrome-c oxidase activity in human cells and tissues. *Biochimica Biophysica Acta*, 1144:177–183.
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394:369–374.
- Wang H (1996). Contribution of the mitochondrial genome to nuclear gene expression in chicken cells. PhD. Thesis. University of Montreal. USA.
- Wani NA, Wernery U, Hassan FAH, Wernery R, Skidmore JA (2010). Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. *Biology Reproduction*, 82:373–379.
- Wells GL, Small M, Penrod S, Malpass RS, Fulero SM, Brimacombe CAE (1998). Eye witness identification procedures: Recommendations for lineups and photospreads. *Law and Human Behaviour*, 22:603-647.
- Wenink PW, Baker AJ, Tilanus MGJ (1994). Mitochondrial control region sequences in two shorebird species, the Turnstone and the Dunlin, and their utility in their population genetic studies. *Molecular Biology Evolution*, II( 1):22-31.
- Willadsen SM (1986). Nuclear transplantaion in sheep embryos. *Nature*, 320:63-65.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385:810–813.
- Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Li GP, Aston KI, Bunch TD, Meerdo LN, Pate BJ (2003). A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science*, 301:1063.

- Yan ZH, Zhou YY, Fu J, Jiao F, Zhao LW, Guan PF, Huang SZ, Zeng YT, Zeng F (2010). Donor-host mitochondrial compatibility improves efficiency of bovine somatic cell nuclear transfer. *BMC Dev. Biol.* 10, 31.
- Yang XY, Li H, Ma QW, Yan JB, Zhao JG, Li HW, Shen HQ, Liu HF, Huang Y, Huang SZ, Zeng YT, Zeng F (2006). Improved efficiency of bovine cloning by autologous somatic cell nuclear transfer. *Reproduction* 132(5):733–739.
- Yonai M, Kaneyama K, Miyashita N, Kobayashi S, Goto Y, Bettpu T, Nagai T (2005). Growth, reproduction and lactation in somatic cell cloned cows with short telomeres. *J Dairy Sci*, 88:4097–4110.
- Zhang YP, Shi LM (1992). Mitochondrial DNA polymorphisms in animals: a review. *Zoological Research* (13):3, 289-298.
- Zhou Q, Renard JP, Le Friec G, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, Fraichard A, Cozzi J (2003). Generation of fertile cloned rates by regulating oocyte activation. *Science*, 302:1179.
- Zsurka G, Kraytsberg Y, Kudina T, Kornblum C, Elger CE, Khrapko K, Kunz WS (2005). Recombination of mitochondrial DNA in skeletal muscle of individuals with multiple mitochondrial DNA heteroplasmy. *Nature Genetics*, 37:873–877.

## ÖZGEÇMİŞ

Volkan SÖNMEZ; 14.07.1984 tarihinde Edirne ili Uzunköprü ilçesinde doğdu. İlk ve ortaöğretimini aynı ilçede tamamladıktan sonra Konya Veteriner Sağlık Meslek Lisesi'nde okudu. Erzurum Atatürk Üniversitesi'nde 2006 yılında Veteriner Sağlık Teknisyeni olarak memuriyete başladı. 2011 yılında Tekirdağ İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü'nde, 2014 yılından bu yana Süleymanpaşa İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü'nde görev yapmaktadır. Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nden 2015 yılında fakülte 1.'si olarak mezun oldu. Aynı yıl Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. 2015 yılından günümüze yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.