

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***CARACAL CARACAL* 'IN (KARAKULAK) MİTOKONDRIYAL DNA
KONTROL BÖLGESİNİN BELİRLENMESİ
VE DİĞER KEDİLERLE FİLOGENETİK İLİŞKİLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Betül KOCAMAN

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi. Kenan TUNÇ

Ekim 2018

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CARACAL CARACAL 'IN (KARAKULAK) MİTOKONDRIYAL DNA
KONTROL BÖLGESİNİN BELİRLENMESİ
VE DİĞER KEDİLERLE FİLOGENETİK İLİŞKİLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

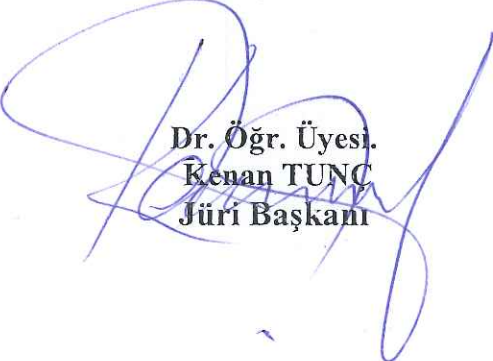
Betül KOCAMAN

Enstitü Anabilim Dalı

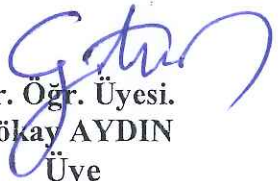
:

BİYOLOJİ

Bu tez 22/10/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.


**Dr. Öğr. Üyesi.
Kenan TUNC
Jüri Başkanı**


**Doç. Dr.
İhsan Hakkı ÇİFTÇİ
Üye**


**Dr. Öğr. Üyesi.
Gökay AYDIN
Üye**

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Betül KOCAMAN

22.10.2018

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, yüksek lisans tez araştırmasının planmasından sonuçlanmasına kadar tüm aşamalarda titizlikle yardımcı ve yol gösterici olan bunun dışında birçok konuda örnek aldığım sayın hocam Prof. Dr. Hikmet Benan DİNÇTÜRK BOTOFTE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Lisans eğitimim ve yüksek lisans tez yazım aşamamda değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan sayın danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Kenan TUNÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışmanın deneysel ve yazım aşamasında aynı laboratuvarı paylaştığım değerli arakadaşlarım Numan CÖMERT ve Oya CARLI'ya destekleri için teşekkür ediyorum. Eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda, her konuda bana destek olan, aile olmanın ne demek olduğunu ve bunun beraberinde getirdiği sevgi, disiplin ve dürüstlük kavramlarını hayatımın merkezi olmasını öğreten sevgili annem Ruşen KOCAMAN'a, sevgili babam Nurettin KOCAMAN'a kardeşlerim Belgin KOCAMAN ve Gizem KOCAMAN'a minnet ve teşekkürlerimi sunarım. Aynı zamanda tezimde kontrol grupları için kılından faydalandığım sevgili kedim şavi'ye teşekkürlerimi sunuyorum. Ailemden bir parça haline gelen değerli arkadaşlarım Dilek TOPAÇ'a, Zeynep TİRYAKİ'ye hayatımın her anında yanımda oldukları ve bana destek çıktıkları için çok teşekkür ediyorum.

Bu tez alışması Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAPK) tarafından (Proje no: 2015-50-01-12) desteklenmiştir. Desteğinden ötürü BAPK'ya teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLOLAR LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	xi
SUMMARY.....	xii

BÖLÜM 1.

GİRİŞ.....	1
1.1. Karakulağın Genel Özellikleri.....	1
1.2. Genetik Çeşitlilik ve Mitokondriyal DNA.....	2
1.3. Çalışmanın Amacı.....	3

BÖLÜM 2 .

KAYNAK VE ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. Karakulağın Biyolojisi.....	4
2.1.1. Boyut.....	4
2.1.2. Morfoloji.....	4
2.1.3. Üreme.....	5
2.1.4. Aktif saatleri.....	6
2.1.5. Habitatı.....	6
2.1.6. Beslenme alışkanlığı.....	6
2.2. Biyocoğrafyası.....	7
2.2.1. Karakulağın dünya ve Türkiye’deki dağılımı.....	7
2.2.2. Tarihçesi.....	8

2.3. Taksonomisi	9
2.4. Türkiye'deki Karakulak Görüntüleri	10
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE YÖNTEM	12
3.1. Materyal	12
3.1.1. Kıl ve dışkı örnekleri	12
3.1.2. Çalışmada kullanılan laboratuvar ekipmanları	12
3.1.3. Kitler	13
3.1.4. Enzimler ve solüsyonlar	13
3.1.5. DNA moleküler ağırlık belirteci	14
3.1.6. Çalışma boyunca kullanılan bilgisayar programları	15
3.1.7. Çalışmada kullanılan primer çiftleri	15
3.2. Yöntem	17
3.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	17
3.2.2. Kıldan DNA saflaştırma protokolü	19
3.2.3. Dışkıda DNA saflaştırma protokolü ve qiaamp DNA stool mini kit içeriği	21
3.2.4. Agaroz jel elektroforezi	23
3.2.5. PCR ürünün saflaştırma basamağında kullanılan kitin (High Pure PCR Cleanup Micro Kit/ Roche) içeriği ve kullanımı	24
3.2.6. PCR ürünün saflaştırma basamağında kullanılan kitin (High Pure PCR Product Purification Kit/ Roche) içeriği ve kullanımı	25
3.2.7. DNA dizi analizi	25
BÖLÜM 4 .	
ARAŞTIRMA VE BULGULARI	27
4.1. Karakulak mtDNA <i>sitokrom-b</i> geni Malgorzata bölgesi amplifiyesi	28
4.2. Karakulak mtDNA Kontrol Bölgesi Geni CR4 Bölgesi Amplifiyesi	33
4.3. Karakulak mtDNA Kontrol Bölgesi Geni CR3 Bölgesi Amplifiyesi	37

BÖLÜM 5.	
TARTIŞMA VE SONUÇLARI	40
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	52

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

A	: Adenin
AJ	: <i>Acinonyx jubatus</i>
ASL	: <i>Panthera leo</i>
bç	: Baz çifti
C	: Sitozin
CR	: Mitokondriyal kontrol bölgesi (D-ilmek bölgesi)
CT	: <i>Catopuma temminckii</i>
dCTP	: Deoksisitidin trifosfat
dGTP	: Deoksiguanozin trifosfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dTTP	: Deoksitimidin trifosfat
E	: Enstitüsü
EBI	: European Biotechnology Institute, Avrupa Biyoinformatik
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EtBr	: Etidyum bromür
FC	: <i>Felis catus</i>
G	: Guanin
g (RCF)	: Relative centrifugal force, göreceli santrifüj kuvveti
HCL	: Hidroklorik asit
H1	: <i>Lynx lynx</i>
IUCN	: International Union for Conservation of Nature and Natural
KARA	: <i>Caracal caracal</i>
km	: Kilometre

Mg	: Magnezyum
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
µg	: Mikrogram
µm	: Mikrometre
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
myö	: Milyon yıl önce
NCBI	: <i>National Center for Biotechnology Information</i>
PAR	: <i>Leopardus guigna</i>
PC	: <i>Puma concolor</i>
PCR	: Polymerase Chain Reaction, Polimeraz zincir reaksiyonu
pH	: Power of Hydrogen, Hidrojen gücü
PO	: <i>Panthera onca</i>
rpm	: Revolution per minute, Dakikadaki dönme sayısı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
T	: Timin
TAE	: Tris-Asetat
°C	: Santrigad Derece
~	: Yaklaşık
%	: Yüzde

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. (URL 1):Yetişkin bir karakulak görüntüsü.....	5
Şekil 2.2. Karakulağın dünya üzerinde ki yayılışı	7
Şekil 2.4. Kedi türleri arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren soy ağacı (Johnson ve ark. 2006)	9
Şekil 2.5. Karakulağın 9 alttürünün dünya üzerindeki dağılımı	10
Şekil 2.6. 16.04.2008 tarihinde Yasin İlemin tarafından fotokapan ile çekilen karakulak fotoğrafı (URL 2).....	10
Şekil 2.7. 01.06.2008 tarihinde Yasin İlemin tarafından fotokapan ile çekilen karakulak fotoğrafı (URL 3).....	11
Şekil 2.8. 04.10.2007 tarihinde Rasim Çetiner tarafından Denizli Acıpayam Bozdağ'da çekilen yavru karakulak fotoğrafı (URL 4).....	11
Şekil 2.9. 14.03.2010 tarihinde Antalya'da Batur Avgan tarafından fotokapan ile çekilen karakulak fotoğrafı (URL 5)	11
Şekil 3.1. DNA molekül ağırlığı belirteci (www.thermoscientificbio.com)	15
Şekil 4.1. Hayvanat bahçesi karakulak örneğinin F3Malg ve R2Malg primeri <i>sitokrom-b</i> geni Malgorzata bölgesi PCR amplifikasyonu, agaroz jel elektroforezi sonuçları	29
Şekil 4.2. Karakulak <i>sitokrom-b</i> geni malgorzata bölgesi düz okuması	31
Şekil 4.3. Karakulak <i>sitokrom-b</i> geni malgorzata bölgesi ters okuma sekans görüntüleri	32
Şekil 4.4. Dişi ve erkek karakulak DNA örneğinin CR4 primeri kontrol bölgesi PCR amplifikasyonu,agoroz jel elektroforezi sonuçları	34
Şekil 4.5. Karakulak mtDNA kontrol bölgesi CR4 geni düz sekans okuma görüntüsü.....	35
Şekil 4.6. Karakulak mtDNA kontrol bölgesi CR4 geni ters sekans okuma görüntüsü.....	36

Şekil 4.7. Erkek karakulak DNA örneğinin CR3 primeri kontrol bölgesi PCR amplifikasyonu, agaroz jel elektroforezi sonuçları	37
Şekil 4.8. Karakulak mtDNA kontrol bölgesi CR3 geni düz sekans okuma görüntüsü.....	38

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1. Karakulağın bilimsel sınıflandırması	1
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan laboratuvar ekipmanları	13
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan primerler	16
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan primerlerin özellikleri.....	16
Tablo 3.4. Çalışma boyunca kurulan PCR reaksiyonlarının bileşenleri.....	18
Tablo 3.5. PCR reaksiyonlarının sıcaklıkları	19
Tablo 4.1. mtDNA <i>sitokrom-b</i> geni malgorzata bölgesi düz okuma sonunda elde edilen karakulak malgorzata bölgesi dizileri	32
Tablo 4.2. Karakulak mtDNA <i>sitokrom-b</i> geni malgorzata bölgesi DNA dizilerinin tamamı	33
Tablo 4.3. mtDNA kontrol bölgesi CR4 geni düz okuma sonunda elde edilen karakulak malgorzata bölgesi dizileri	35
Tablo 4.4. Karakulak mtDNA kontrol bölgesi CR4 geni DNA dizilerinin tamamı.....	36
Tablo 4.5. Karakulak mtDNA kontrol bölgesi CR3 geni DNA dizisine ait keşfedilen 145 bç.....	38
Tablo 5.1. Karakulak ve diğer kedi soylarındaki kedilerin CR4 bölgesi karşılaştırmaları. Tabloda kullanılan kedi isimlerinin kısaltmaları; po: <i>Panthera onca</i> , asl: <i>Panthera leo</i> , h1: <i>Lynx lynx</i> , ct: <i>Catopuma temminckii</i> , par: <i>Leopardus guigna</i> , aj: <i>Acinonyx jubatus</i> , pc: <i>Puma concolor</i> , fc: <i>Felis catus</i> , kara: <i>Caracal caracal</i>	41
Tablo 5.2. Karakulak mtDNA kontrol bölgesi geni CR4 DNA dizisinin diğer kedi soylarına ait CR4 DNA dizileri ile karşılaştırması. Karşılaştırma sonucunda elde edilen nükleotid benzerlikleri – farklılıkları ve baz sırası	42

Tablo 5.3. Karakulak ve diğer kedi soylarında ki kedilerin malgorzata bölgesi karşılaştırmaları. Tabloda kullanılan kedi isimlerinin kısaltmaları; po: <i>Panthera onca</i> , asl: <i>Panthera leo</i> , h1: <i>Lynx lynx</i> , ct: <i>Catopuma temminckii</i> , par: <i>Leopardus guigna</i> , aj: <i>Acinonyx jubatus</i> , pc: <i>Puma concolor</i> , fc: <i>Felis catus</i> , kara: <i>Caracal caracal</i>	43
Tablo 5.4. Karakulak mtDNA <i>sitokrom-b</i> geni Malgorzata bölgesi gen dizisinin diğer kedi soylarına ait Malgorzata bölgesi DNA dizileri ile karşılaştırması. Karşılaştırma sonucunda elde edilen nükleotid benzerlikleri farklılıkları ve baz sırası	44
Tablo 5.5. Karakulak malgorzata bölgesi ve laboratuvarında çalışması yapılan vaşakların malgorzata bölgelerinin karşılaştırması k.kulak: karakulak malgorzata bölgesi, kars: Kars vaşak çalışması malgorzata bölgesi, antalya: Antalya vaşak çalışması malgorzata bölgesi kısaltmaları kullanılmıştır	46

ÖZET

Anahtar Kelimeler: Karakulak, *Caracal caracal* , mitokondriyal DNA, kontrol bölgesi, *sitokrom-b* , moleküler genetik

Karakulak (*Caracal caracal*) kedigiller ailesi içinde yer alan orta boyda yabani bir kedidir. Karakulak, Afrika kökenli olup, dünya genelinde Orta Doğu'da, ülkemizde ise Akdeniz bölgesinde yayılış göstermektedir. Ülkemizde son dönemlerde karakulak ile ilgili çoğunlukla ekolojik çalışma yapılmaktadır. Ancak bu kedi türü ile ilgili sınırlı genetik bilgi bulunmaktadır. Günümüzde Avrupa'da kedigiller familyasının filogenetik ilişkilerinin anlaşılabilmesi için bir çok genetik çalışma yapılmaktadır. Mitokondriyal DNA (mt-DNA) üzerindeki bazı genler filogenetik çalışmalarda belirteç olarak sıklıkla kullanılırlar. Karakulak mitokondriyal DNA'sı üzerinde sadece NADH dehidrogenaz 5 (ND5) geninin dizisi belirlenmiştir. Karakulak ND5 geni ve diğer kedilerin ND5 gen dizisi kullanılarak filogenetik olarak karşılaştırma yapılmıştır.

Bu çalışma için Darıca Faruk Yalçın Hayvanat Bahçesin'ndeki karakulaklardan kıl ve dışkı örnekleri alınmıştır. Bu çalışma ile karakulak mitokondriyal DNA kontrol bölgesi dizisinin belirlenmesi ve ayrıca *sitokrom-b* geninin daha önceki çalışmalarda bulunmayan kısımlarının açığa çıkarılması hedeflenmektedir. Çalışma, karakulak mt-DNA kontrol bölgesinin açığa çıkartılması bakımından dünyada yapılan ilk çalışma özelliğindedir. Ayrıca Türkiye'de karakulağa dair yapılan ilk genetik çalışmadır. Çalışma sonunda karakulak mtDNA'sına ait 613 bç bulunmuştur.

DETERMINATION OF CARACAL (*CARACAL CARACAL*) MITOCHONDRIAL DNA CONTROL REGION AND INVESTIGATION OF PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS WITH OTHER CATS

SUMMARY

Keywords: Caracal, *Caracal caracal*, mitochondrial DNA, control region, cytochrome-*b*, molecular genetics

Caracal (*Caracal caracal*) is a medium-sized wild cat which is in the family of felidae. Caracal is of African origin and spreads throughout the world in the Middle East and in our country in the Mediterranean region. Recently, it is more related to ecological studies carried out in our country, but there is limited genetic information about the Caracal cat species. Nowadays, many genetic studies have been carried out in Europe to understand the phylogenetic relationships of the felidae family. Some genes on mitochondrial DNA (mt-DNA) are frequently used as markers in phylogenetic studies. Only the sequence of the NADH dehydrogenase 5 (ND5) gene was identified on the caracal mitochondrial DNA, compared to the others using only this region in the caracal cat system.


For this study, hair and stool specimens were taken from the Darıca Faruk Yalçın Zoo Garden. With this study, it is aimed to determine the sequence of the caracal mitochondrial DNA control region and also to reveal the parts of the cytochrome-*b* gene that are not present in previous studies. This is the first study of the world about the caracal mt-DNA control region. It is also the first genetic studies of caracal in Turkey. The phylogenetic trees will be drawn with the data obtained at the end of the study, which will allow a clear understanding of the location of the cat's family of felidae. 613 bases of mtDNA were found at the end of the study.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

1.1. Karakulağın Genel Özellikleri

Karakulak (*Caracal caracal*) Afrika altın kedisi (*Caracal aurata*) ve serval (*Leptailurus serval*) kedilerinin içinde bulunduğu *Caracal* soyuna ait etçil , yırtıcı bir kedir (Janczewski ve ark 1995). Dünyada çöl vaşağı, Afrika vaşağı ülkemizde karakulak , step vaşağı olarak adlandırılan *Caracal caracal* fiziksel olarak ince, uzun bacaklı ve orta boya sahiptir (İlemin ve Gürkan 2010). Kediler arasında karakulak arka bacaklarının uzunluğunu kullanarak 2-3 metreye kadar zıplayabilme yeteneği ile bilinirler. Karakulak yaşam alanı olarak, büyük etoburların fazla sayıda bulunmadığı genellikle küçük ve orta büyüklükte memelilerin bulunduğu habitatları yaşam alanı olarak seçerler. İklimsel olarak kurak ve kuru coğrafi alanlarda sıklıkla yaşadığı bilinmektedir (Plessis ve ark 2014).

Tablo 1.1. Karakulağın bilimsel sınıflandırması

<i>Caracal caracal</i> (Karakulak)	Bilimsel sınıflandırma	
	Alem:	Hayvanlar
	Şube:	Kordalılar
	Sınıf:	Memeliler
	Takım:	Etçiller
	Familya:	Kedigiller
	Cins:	<i>Caracal</i>
	Tür:	<i>Caracal caracal</i> (Schreber , 1776)

1.2. Genetik Çeşitlilik ve Mitokondriyal DNA

Bir türün genetik çeşitliliğini korumak için mevcut genetik durumunu ve genetik çeşitliliğin farklı popülasyonlar boyunca nasıl dağıldığını bulmak çok önemlidir (Avice ve ark 2000). Nüfusun genetik durumu hakkında bilgi veren önemli parametreler; akrabalılık düzeyi, etkin popülasyon büyüklüğü ve radyo etkili popülasyon büyüklüğü sayımına göre belirlenmektedir (Beaumont ve Bruford 1999). Türler arasındaki ilişkiyi değerlendiren kesişimsel filogenetik çalışmaların aksine, intraspesifik filojenler, belirli bir tür veya tür kompleksi dağılımının farklı kısımlarındaki popülasyonlarla ilgilidir. Son yirmi yıl içinde filogenetik çalışmalarda, moleküler belirteç olarak mitokondriyal DNA (mtDNA)'nın kullanılması oldukça popüler hale gelmiştir. mtDNA, günümüz genetik varyasyonlarının tahminlerini sağlarken, aynı zamanda popülasyonun daraldığı bölgeleri, melezleşme, üreme davranışı, sosyal yapı ve dağınıklık gibi demografik olaylar da dahil olmak üzere yakın geçmişteki nüfus bilgileri hakkında doğru bilgi sağlar. Son yıllarda yapılmış olan ekolojik çalışmaların evrimsel sorularını cevaplamak, çoklu popülasyonların genetik parametrelerini tahmin etmek için etkili, güçlü ve esnek olması nedeni ile bu çalışmalar için mtDNA kullanılır hale gelmiştir (Selkoe ve Toonen 2006). Moleküler belirteçler kalıtsal olan karakterleri, evrimsel zaman boyunca gerçekleşen mutasyonları yansıtmaktadır (Avice 1994).

Bu tez çalışmasında kediler arasındaki akrabalık derecesini anlayabilmek için moleküler belirteç olarak mtDNA kullanılmıştır. Kedi mtDNA 'sı dairesel olup yaklaşık 17000 bp uzunluğundadır ve insan mtDNA'sından 440 bp daha uzundur (Alberts ve ark, 2002). Bunun nedeninin tekrar bölgelerinin fazlalığından kedi mtDNA'sının daha sıkı ve korunmuş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Lopez ve ark 1996). Bu sebeple kedigiller ile ilgili yapılan filogenetik çalışmalarda mtDNA'nın önemi oldukça önemlidir. Dünyada bu çalışmaları desteleyen karakulak ile ilgili ND5 geni dışında genetik bilgi bulunmamaktadır.

Karakulağa yakın bir soy olan *Lynx* soyunda bulunan ülkemizde yayılış gösteren vaşaklarında filogenetik ilişkilerini belirlemek için önemli bir belirteç olan

mitokondriyal DNA (mtDNA) kullanılmıştır. Birbirinden izole olan Orta Avrupa vaşakları ve Kuzey Avrupa vaşaklarının mtDNA kontrol bölgeleri kullanılarak filogenetik olarak kıyaslanmıştır ve farklı haplotipler bulunmuştur (Cömert ve ark., 2018). Cömert ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma referans alınarak karakulağın kontrol bölgesinin bulunması ve diğer kediler ile kıyaslanması hedeflenmiştir.

IUCN (*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*)'e 2018 verilerine göre dünya genelinde karakulak neslinin tükenme durumu düşük risk (LC) kategorisi içerisinde bulunan hayvanlar arasında olduğu bildirilmiştir. Her ne kadar düşük risk grubunda olmuş olsada genetik özellik, av-avcı ilişki, insanlarla olan bağlantı, popülasyon yoğunluğu gibi bilgiler tam anlamıyla bilinmesi gerekmektedir. Bu durumda var olan veya olabilecek tehlikelere karşı önlemler alınabilir.

1.3. Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışmasında, Darıca Faruk Yalçın Hayvanat Bahçesi ve Botanik Parkı'nda bulunan karakulaklardan etik standartlara uygun ve non-invazif olarak elde edilen kıl örnekleri analiz edilmiştir. Çalışmada genellikle yakın akraba tür ve popülasyonların filogenetik ilişkilerini belirlemek için önemli bir belirteç olan mitokondriyal DNA (mtDNA) kullanılmıştır.

Bu çalışma karakulak mtDNA kontrol bölgesi ile yapılmış olan ilk çalışmadır. Karakulak ile bugüne kadar yapılmış olan çalışmalar daha çok karakulağın ekolojisi ile ilgilidir. Bu çalışma ile karakulak mitokondriyal DNA kontrol bölgesi dizisinin belirlenmesi ve ayrıca *sitokrom-b* geninin daha önceki çalışmalarda bulunmayan kısımlarının bulunması hedeflenmiştir. Çalışma, karakulak mt-DNA kontrol bölgesine dair dünyada ilk çalışma özelliği taşımaktadır. Karakulağın kedigiller familyasındaki yerini daha net bir şekilde anlaşılmasına olanak sağlayacaktır.

BÖLÜM 2. KAYNAK VE ARAŞTIRMASI

2.1. Karakulağın Biyolojisi

2.1.1. Boyut

Karakulağın büyüklüğü veya boyutu yaşam alanları, cinsiyetlerine göre farklılık gösterebilir. Afrika'nın kurak bölgelerinde bulunan karakulaklar Asya'da bulunanlara oranla daha büyüktür. Dişi karakulaklar erkek karakulaklara kıyasla daha küçüktür (Stuart ve Trever, 1982). Yaşadıkları coğrafi alana göre vücut ağırlıkları değişmektedir. Güney Afrika'da ki erkek karakulakların ağırlığı 7.2 kg – 19 kg (yaklaşık 12.9 kg) , dişi karakulakların ağırlığı 7 kg – 15.9 kg (ortalama 10 kg)'dır. İsrail'de yaşayan erkek karakulakların ortalama ağırlığı 9.8 kg ve dişilerin ortalama ağırlığı 6.2 kg'dır (Nowell ve Jackson 1996).

2.1.2. Morfoloji

Karakulak, ön bacaklarına oranla uzun arka bacakları olan kedi türüdür. Uzun arka bacaklara sahip olması karakulağın muhteşem sıçrayışlar yapmasına olanak sağlamaktadır. Karakulak açık kahverengi, gri veya kırmızımsı kürk rengine sahiptir. Göğüsünden bacaklarına kadar uzanan bölge beyazdır. Bu beyazlıklar içerisinde bireyler arasında değişiklik gösteren soluk kırmızımsı lekeler bulunmaktadır (Sapozhenkov, 1960). Yumuşak zeminlerde kurak arazilerde rahat bir şekilde hareket edebilmesi için pençelerinin alt kısımlarında ve sert kıllar bulunmaktadır. Bu sert kıllar karakulağın yaşadığı coğrafyaya hızlı bir şekilde adapte olmasına olanak sağlamaktadır.

Karakulak geniş bir yüze sahiptir ve kafasında uzun üçgen kulakları vardır. Kulaklarının ucunda siyah püsküller bulunmaktadır. Yaşlı bireylerde bu siyah püsküller aşağı doğru sarkarken genç bireylerde püsküller dik bir şekilde kulaklarının ucunda bulunmaktadır. Alnının merkezinden burun deliklerine kadar uzanan koyu karakteristik çizgiye sahiptir (Sunquist ve Sunquist, 2002).



Şekil 2.1. (URL 1). Yetişkin bir karakulak görüntüsü

2.1.3. Üreme

Karakulak yılın her döneminde üreme yeteneğine sahiptir. Dişi karakulakta çiftleşme öncesinde hormonal olarak vücudunu döllenmeye hazırladığı Östrus dönemi 1-3 gün sürmektedir bu süre zarfında çiftleşme gerçekleşmezse östrus döngüsü 3 – 6 gün daha devam etmektedir (Bernard, 1987). Verimli bir döllenme gerçekleştiği zaman dişi 78 – 81 gün içerisinde hamileliğini tamamlar ve hamilelik sonunda 1 - 3 (ortalama 2) tane yavruyu dünyaya getirir (Nowell ve Jackson 1996).

Yavrular 9 – 10 aylık olduğu zaman bağımsızlık yaşına ulaşmış olur ve aileden ayrılırlar. Dişı bireyler 14 – 16 aylıkken hamile kalabilirler , erkek bireyler ise 12.5 – 15 aylık iken cinsel olgunluğa ulaşırlar.

2.1.4. Aktif saatleri

Karakulak gün batımından şafak vaktine yani gün doğana kadar aktiftir. Gündüz saatlerinde yoğun bitki örtülerinin olduğu arazilerde, kaya yarıklarında dinlenirler veya korunaklı bir alanda gözlem yaparlar (Singh ve ark 2014).

2.1.5. Habitatı

Habitat tercihleri genellikle savana, ovalar, yarı kuru ormanlık alanlar, kayalık alanlar ve kuru ovalardır. Bu alanlar dışında yeşil ormanlık alanlarda 2500 metre yüksekliklerde de yaşadıkları bilinmektedir (Avgan ve ark 2016). Karakulaklar genellikle çalılıkların bol olduğu bölgelerde yaşamayı tercih ettikleri gözlenmiştir. Bir bölgede bulunan karakulak yoğunluğu o bölgedeki avın boyutu, türü,yoğunluğu,habitatın karakteristik özellikleri ve insanlar tarafından yapılan zulüm derecesi gibi çevresel değişkenlere bağlı olarak yaşam alanları arasında belirgin farklılık gösterebilir (Avenant, 1998).

2.1.6. Beslenme alışkanlığı

Genellikle kemirgenler, yabani tavşanlar, kuşlar, sürüngenler, böcekler, omurgasızlar gibi ağırlığı 5 kg'dan az olan canlılar ile beslenirler. Bazı zamanlarda yabani keçi ve yabani koyun gibi büyük memelilerde beslenme alışkanlığının bir parçasıdır (Stuart ve Trever 1982). Bunların dışında yapılan dışkı analiz çalışmalarında karakulakığın gün içerisinde az miktarda bitki yediğide kanıtlanmıştır (Avenant 1998).

2.2. Biyocoğrafyası

2.2.1. Karakulağın dünya ve Türkiye'deki dağılımı

Karakulak Afrika'nın birçok bölgesinde dağılım göstermektedir. Sahra ve Namibi'n çöllerinde, Orta Afrika'da, Kongo ve Ekvator ormanlarında, Asya kıtasında ki Türkiye'nin batı kısımlarında, Arap Yarımadası'nda, Orta Asya'da ise Türkiyenin kuzey ucunda bulunan Türkmenistan'a kadar dağılım göstermektedir (Avgan ve ark 2014). Genel olarak karakulağın dünya üzerinde ki dağılımı incelendiği zaman çitanın (*Acinonyx jubatus*) dünya üzerindeki dağılımı ile benzerlik gösterdiği ortaya çıkmaktadır (Sunquist ve Sunquist, 2002).

Yerli olarak yaşadığı ülkeler; Afganistan, Cezayir, Angola, Benin, Botsvana, Burkina, Faso, Kamerun, Çad, Kongo Cumhuriyeti, Mısır, Etiyopya, Gambiya, Gana, Gine, Hindistan, İran, Irak, Ürdün, Kazakistan, Kenya, Kuveyt, Lübnan, Libya, Morokko, Namibya, Nijer, Nijerya, Umman, Pakistan, Sudi Arabistan, Senegal, Somali, Güney Afrika, Güney Sudan, Sudan, Suriye, Tacikistan, Tanzanya, Togo Cumhuriyeti, Tunus, Türkiye, Türkmenistan, Uganda, Arap Emirlikleri, Özbekistan, Batı Sahra, Yemen, Zambiya'dır (Melville ve ark , 2004).



Şekil 2.2. Karakulağın dünya üzerindeki yayılışı

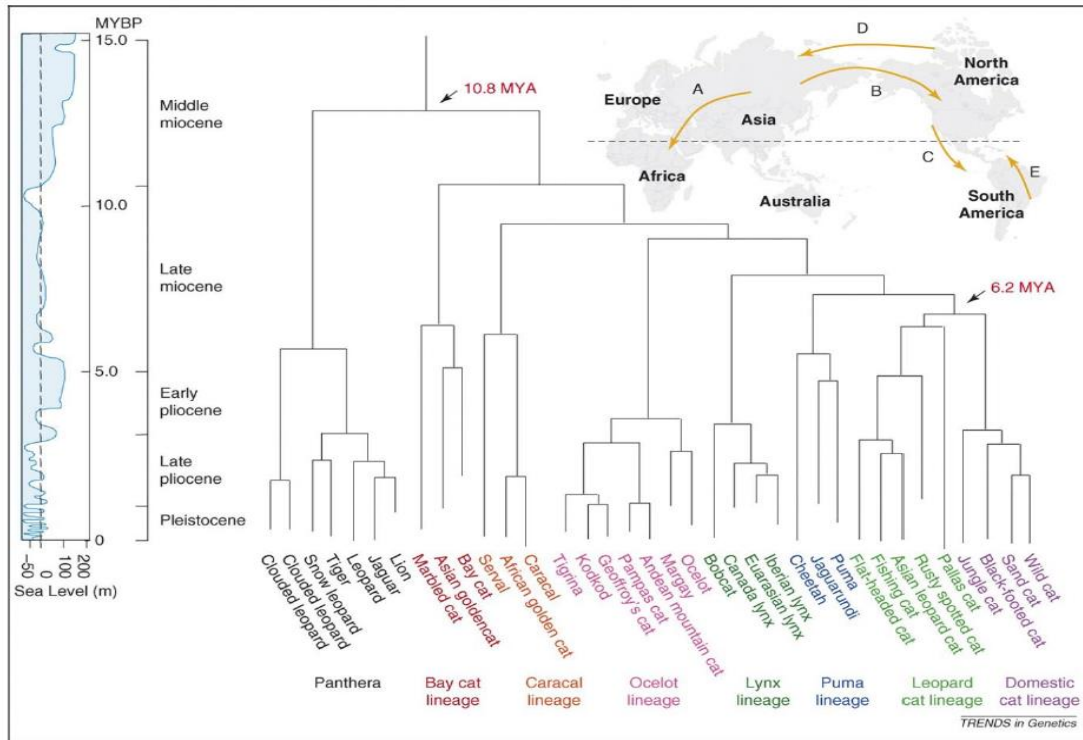
Yapılan çalışmalar doğrultusunda Türkiyede ki dağımı İzmir,Aydın,Denizli,Muğla, Burdur, Antalya, Mersin illeri ile sınırlı kalmış durumdadır (Hepcan ve ark 2008).



Şekil 2.3. Türkiye’de ki karakulak populasyonları

2.2.2. Tarihçesi

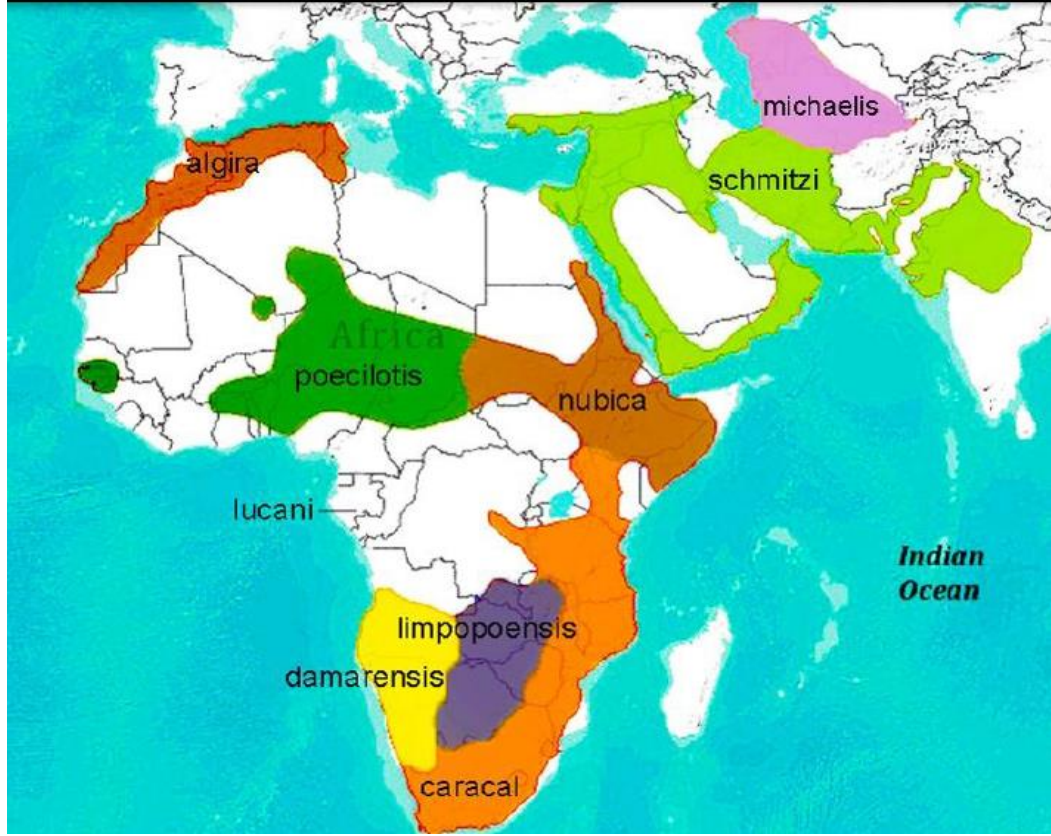
Kedilerin ilk göç dalgası yaklaşık 10 milyon yıl önce (myö) başlamıştır. *Caracal* soyu 10 – 8 myö Asya’dan Afrika’ya doğru yayılmaya başlamıştır. Caracal soyu Asya’dan Afrika’ya göç ettiği sırada deniz seviyesinin şuan ki deniz seviyesinden yaklaşık 60 metre düşük olması Kızıl Deniz boyunca Arap yarımadası ve Afrika arasında kara köprüsü oluşturmuştur. Bu karaköprüsünün oluşması ile serval ve Afrika altın kedisi türleri oluşmuştur. Bu iki tür hızlı bir şekilde Afrika’da coğrafi olarak genişlemeye başlamıştır (O’Brien ve Johnson 2007). Geç Pliyosen dönemde deniz seviyesi tekrardan düşmüştür ve suların geri çekilmesi ile yeni kara köprüleri ortaya çıkmıştır. Afrika altın kedisi bu dönemde meydana gelen kara köprüleri ile Afrika kıtasında kalırken karakulakta Asya kıtasına doğru yayılmaya başlamıştır (Johnson ve ark 2006). Bu bağlantıların oluşması ile kedigiller içerisindeki ilk kıtalar arası göç 8.5 myö Asya’dan Afrika’ya gerçekleşmiş ve *Caracal* soyu oluşmuştur (O’Brien ve Johnson 2007).



Şekil 2.4. Kedi türleri arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren soy ağacı (Johnson ve ark. 2006)

2.3. Taksonomisi

Karakulağın günümüze kadar bulunmuş 9 tane alttürü bulunmaktadır. Bu alttürler; Kuzey Afrika'da yaşayan alttür *Caracal caracal algira* (Wagner, 1841), Güney Afrika'da ki alttür *Caracal caracal aracal* (Schreber, 1776), Namibya'da yayılış gösteren alttür *Caracal caracal damarensis* (Robert, 1926), Botsvana'da ki alttür *Caracal caracal limpopoensis* (Robert, 1926), Gabon'da yayılış gösteren alttür *Caracal caracal lucani* (Rochebrune, 1885), Türkmenistan'da bulunan alttür *Caracal caracal michaelis* (Heptner, 1945), Etiyopya ve Sudan'da bulunan alttür *Caracal caracal nubica* (Fischer, 1829), Batı Afrikada'ki alttür *Caracal caracal poecilotis* (Thomas ve Hinton, 1921), İsrail, Batı Asya, İran, Arabistan Yarımadası, Pakistan ve Hindistan'da yayılış gösteren alttür ise *Caracal caracal schmitzi* (Matschie, 1921)'dir (Yasaman Hassan., 2015).



Şekil 2.5. Karakulağın 9 alttürünün dünya üzerindeki dağılımı

2.4. Türkiye'deki Karakulak Görüntüleri



Şekil 2.6. (URL 2) 16.04.2008 tarihinde Yasin İlemin tarafından fotokapan ile çekilen karakulak fotoğrafı



Şekil 2.7. (URL 3).01.06.2008 tarihinde Yasin İlemin tarafından fotokapan ile çekilen karakulak fotoğrafı



Şekil 2.8. (URL 4).04.10.2007 tarihinde Rasim Çetiner tarafından Denizli Acıpayam Bozdağ'da çekilen yavru karakulak fotoğrafı



Şekil 2.9. (URL 5). 14.03.2010 tarihinde Antalya'da Batur Avgan tarafından fotokapan ile çekilen karakulak fotoğrafı

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kıl ve dışkı örnekleri

Bu çalışmada, Darıca Faruk Yalçın Hayvanat Bahçesi ve Botanik Parkı'nda bulunan karakulaklardan etik standartlara uygun ve non-invazif olarak elde edilen kıl ve dışkı örnekleri analiz edilmiştir. Kıl örnekleri 50 ml Falcon® tüplerde laboratuvara getirilmiştir ve Falcon tüpler içinde saklamıştır. Dışkı örnekleri silika jel eklenerek Falcon tüplerinde saklanmıştır.

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) deneyleri için kullanılacak pozitif ve negatif kontrolü örnekleri Darıca Faruk Yalçın Hayvanat Bahçesi ve Botanik Parkı'nda bulunan vaşak,pumalardan etik standartlara uygun ve non-invazif olarak elde edilen dışkı örnekleri kullanılmıştır. Puma ve vaşak dışkıları 50 ml Falcon tüpler ile getirilmiştir. Falcon tüplerin içerisinde bulunan dışkıların üzeri tamamen kaplanacak şekilde %70'lik etil alkol eklenmiştir. 24 saat etil alkol ile oda sıcaklığında bekletilen dışkıların bulunduğu Falcon tüpündeki alkol boşaltılmıştır ve dışkıların kuraması için tüplere paketlenmiş silika jel ekmiştir. Falcon içerisinde bulunan dışkılar tamamen kuruyana kadar paketlenmiş silika jeller yenileri ile değiştirilmiştir.

3.1.2. Çalışmada kullanılan laboratuvar ekipmanları

Bu tez çalışmasında kullanılan laboratuvar ekipmanları Tablo 3.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan laboratuvar ekipmanları

Ekipmanın Adı	Marka-Model
Su banyosu:	Witeg-WSB30
Kuru banyo inkübatör	Major Science- MD02N
pH metre	Hanna-HI2211
Manyetik ısıtıcı ve karıştırıcı	Wisestir-MSH-20A
Mini tartı	Kern -EMB 1200-1
Masa tipi santrifüj	Kubota-3300
Etüv	Nüve- EN 300
PCR	Bioneer-Mygenie96
Güç kaynağı	Thermo Scientific-EC300XL2
Yatay mini jel elektroforez sistemi ve güç kaynağı	VWR-Mini Gel II
UV transillüminatör	Major Science-MUV26-312
Jel görüntüleme sistemi	DNR-MiniLumi
Buz makinası	Scotsman-F80A
Buzdolabı	Vestel-BZP-S2101 W
Derin Dondurucu	Indesit/ GSF-1350
Mikropipet takımı	Ecopipette (3 adet)
Bilgisayar	Dell

3.1.3. Kitler

Çalışmada kullanılan karakulak kılından elde edilen DNA'ların izolasyonu için kit kullanılmamıştır. Kıldan DNA izolasyonunun basamakları 3.2 Yöntemler bölümünde anlatılacaktır. PCR reaksiyonu pozitif ve negatif kontrolü hayvanat bahçesinde getirilen vaşak ve puma dışkılarından DNA saflaştırması için QIAamp® DNA Stool Mini Kit kullanılmıştır.(QIAGEN, referans no:145020436, 2010, Almanya).

PCR ürünlerinin saflaştırılması için Roche® High Pure PCR Cleanup Micro Kit ve (Roche, referans no: 04 983 955 001, 2013, Almanya) High Pure PCR Product Purification Kit/ Roche® (Ürün kodu: 11732668001, Almanya, 2013) kullanılmıştır.

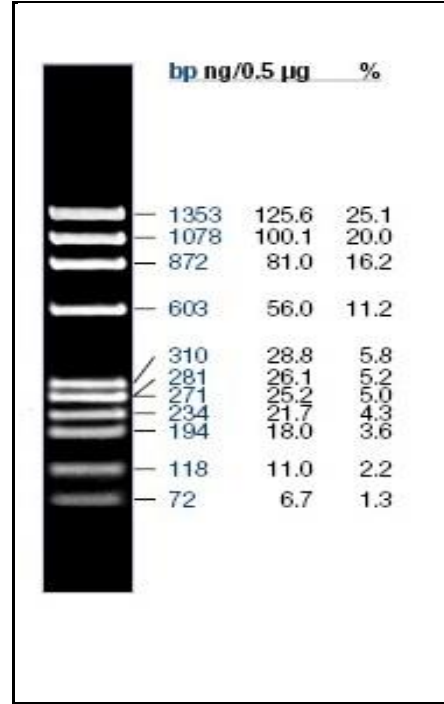
3.1.4. Enzimler ve solüsyonlar

Solüsyonların hazırlanışı ve kullanım ile ilgili bilgiler için Sambrook ve ark. (1989) kaynağı referans alınmıştır ve kullanılmıştır.

1. Taq DNA polimeraz enzimi: Thermo Scientific, konsantrasyon 5 u/ μ l
2. Taq polimeraz tamponu: Thermo Scientific, 10X Taq tamponu +KCl -MgCl₂,
3. Etidyum bromür (EtBr): Jel boyama solüsyonu (10 mg/ml)
4. Proteinaz K enzimi (20 mg/ml)
5. dNTP karışımı: Thermo Scientific, dATP, dCTP, dGTP, dTTP'nin her birinden 10mM içerir. Fermentas, # RO192, Lot 00166700
6. TAE elektroforez tamponu (50X)
7. MgCl₂: Thermo Scientific, 25 mM MgCl₂
8. EDTA: 0.5 litre 0.5 M EDTA pH: 8.0
9. Bromofenol mavisi: %0.25 bromofenol mavisi ve %30 gliserol ün karışımı ile elde edilmiştir. PCR reaksiyonu sonunda elde edilen DNA örneklerini agaroz jele yüklemek için kullanılmıştır.
10. Etidyum bromür (EtBr) : Jel boyama solüsyonu (10 mg/ml).
11. Kıldan DNA saflaştırma solüsyonu

3.1.5. DNA moleküler ağırlık belirteci

Çalışma boyunca PCR reaksiyonu sonunda elde edilen DNA fragmentlerinin büyüklüğünü agaroz jel elektroforezinde ölçebilmek için Φ X174 DNA/BsuRI *Hae* III kesimi moleküler ağırlık belirteci kullanılmıştır ve molekül ağırlığı belirteci Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. (URL 6) : DNA molekül ağırlığı belirteci

3.1.6. Çalışma boyunca kullanılan bilgisayar programları

1. Natioanl Center for Biotechnolgy Information (NCBI) (Altschul ve ark., 1990). (www.ncbi.nlm.nih.gov)
2. Clustal W (Higgins ve ark., 1994). (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2)
3. Chromas 2.4.3 programı (Technelysium Pty Ltd, Conor McCarthy, 2004, Avustralya)

3.1.7. Çalışmada kullanılan primer çiftleri

Çalışmada kullanılmak üzere primer seçimi vaşak örnekleri referans alınarak yapılmıştır. Çalışmada karakulak mtDNA kontrol bölgesi ve *sitokrom-b* geni bulunması hedeflenmiştir ve bu bölgeler daha önceki çalışmalarda bulunmadığı için karakulağa evrim ağacında yakın olan bir tür olan vaşak mtDNA kontrol bölgesi ve *sitokrom-b* geni dizileri referans alınmıştır. Gugolz ve arkadaşlarının 2008 yılında yapmış olduğu çalışma incelenmiştir ve bu çalışma sonunda kullanılacak primerler oluşturulmuştur. Çalışmada 3 ters ve 3 düz primer olmak üzere toplam 6 adet primer

kullanılmış. Bu 3 primer çifti de kedigillere özgü primerlerdir. CR3F - CR3R ve CR4F - CR4R primerleri ile kontrol bölgesinden DNA dizileri bulunması hedeflenirken F3Malg – R2Malg primerleri ile *sitokrom-b* geni dizilerinin bulunması hedeflenmiştir

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan primerler

Primer adı	5'-3' yönünde primer dizisi	Kaynak
F3Malg- düz primer	5'- ATC TCA GCC TTA GCA GGA GTA CAC -3'	Natonek-Wisniewska (2009)
R2Malg- ters primer	5'- TGG ATC GGA GAA TTG CGT ATG CGA -3'	
CR3F- düz primer	5'- TCC CAA AGC TGA AAT TCT TT -3'	Gugolz ve ark. (2008)
CR3R- düz primer	5'- CAG TGG TTG GTA GGT TAA TTT T -3'	
CR4F- düz primer	5'- TAG TGC TTA ATC GTG CAT T -3'	Gugolz ve ark. (2008)
CR4-R- düz primer	5'- CAG ATG CCA GGT ATA GTT CC -3'	

Kullanılan primerlerin uzunluğu, mtDNA üzerinde hangi bölgeleri amplifiye ettiği, amplifiye edilen bölgenin uzunluğu ve primerin özelliği Tablo 3.3.'te gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan primerlerin özellikleri

Primer adı	Primer uzunluğu	Primer özelliği	mtDNA' da amplifiye ettiği bölge	Amplifikasyon bölge uzunluğu
F3Malg-R2Malg	24-24	Kedigillere özgü	<i>Sitokrom-b</i> geni	286 bç
CR3F-CR3R	20-22	Kedigillere özgü	Kontrol bölgesi	199 bç
CR4F-CR4R	19-20	Kedigillere özgü	Kontrol bölgesi	182 bç

Çalışma boyunca kurulan PCR reaksiyonlarının herbirinde pozitif ve negatif kontrollerde kurulmuştur. Kurulan bu pozitif ve negatif kontrollerde Tablo 3.2.'de gösterilen primerler eklemiştir. Primerler kedi özgü primer olduğu için bazı deneylerde negatif kontrol olarak güvercin DNA'sı kullanılmıştır. Kedi özgü primerlerin sadece kedi DNA'sını amplifiye etmesi beklenmektedir. Bu deney grubunda yani güvercinin negatif kontrol olarak kullanılan deneylerde güvercinin

bulunduğu agaroz jel kuyularında DNA amplifiye bandı beklenmemiştir. Bu şekilde deneyler boyunca kullanılan primerlerin güvenilirliği test edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Moleküler biyolojide sıklıkla kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygun *in vitro* şartlar altında nükleik asitlerin klonmasını sağlayan yöntemdir (Birben 2006).

PCR reaksiyonu esasında yüksek sıcaklık altında DNA'nın birbirinden ayrılmasına (denatürasyon) ayrılan DNA fragmentine uygun sıcaklıkta sentetik oligonükleotidlerin bağlanmasına (hidridizasyon) ve zincirin DNA polimerazı ile uzamasına (polimerizasyon) dayanmaktadır (Sambrook ve ark., 1989).

Bu üç asıl basamak yaklaşık 35 - 40 siklus olacak şekilde tekrarlanarak hedef DNA'nın klonlanması sağlanmaktadır. Çift zincirli hedef DNA 95 °C'de hidrojen bağlarının kopması ile denatürasyona uğramaktadır. Denatürasyon işlemi tamamlandıktan sonra sıcaklık 37 – 65 °C'ye düşürülür (Erol ve ark, 1990). Hidridizasyon basamağının kaç °C olacağı hedef DNA'nın çoğaltılmak istenilen bölgesine uygun tasarlanan primerin yapısına ve uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir (Aldemir ve Ucan, 2001).

Hedef DNA zincirine bağlanan primerin uzaması 72 °C'de DNA polimeraz tarafından gerçekleşir. Bu aşamada Taq DNA polimeraz 5' den 3' yönünde aktivasyon gösterir ve ortamdaki nükleotidleri kullanarak hedef DNA'nın tamamlanmasını sağlar. PCR'ın temelini oluşturan bu 3 basamak yaklaşık 10 dk. sürmektedir. En az 35 tekrardan sonra hedef DNA yaklaşık olarak 33.6 milyon adet çoğaltılmış olur (Aydın ve ark. 2010).

Çalışma boyunca kurulan kurulan PCR reaksiyonlarının içeriği; 2.5 mM MgCl₂ solüsyonundan 5 µL, 10X Taq polimeraz tamponundan 5 µL, 25 µM primerden 1 µL

düz primer (*forward* primer), 1 µL ters primer (25 µM) (*reverse* primer) olmak üzere 2 µL primer (25 µM), 10 mM dNTP mix solüsyonundan 2 µL, Taq DNA polimerazdan (5 unit/µL) 0.5 µL ve 1 µL kalıp DNA örneği kullanılarak reaksiyon saf suyla 50 µL'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon yüksek sıcaklıklarda gerçekleştiği için sıcaklık nedeni ile buharlaşma ile birlikte DNA miktarında kayıp yaşanmaması için reaksiyon üzerine bir damla mineral yağ eklenmiştir.

Tablo 3.4. Çalışma boyunca kurulan PCR reaksiyonlarının bileşenleri

PCR REAKSİYONU BİLEŞENLERİ	SON KONSANTRASYON	MİKTAR
TAQ TAMPONU	1X	5µL
DÜZ PRİMER (<i>FORWARD</i>)	0.5µM	1µL
TERS PRİMER (<i>REVERSE</i>)	0.5µM	1µL
MgCl ₂	2.5mM	5µL
dNTP KARIŞIMI	0.4mM	2µL
STERİL SU	-	34.5µL
TAQ DNA POLİMERAZ	-	0.5µL
KALIP DNA	-	1µL
TOPLAM		50 µL

Çalışmada kurulan PCR reaksiyon siklusları için sıcaklık değişimleri sadece hidridizasyon basamağı için değiştirilmiştir. mtDNA *sitokrom-b* geninin klonlanması yapılan PCR döngülerinde kullanılan F3Malg ve R2Malg primerlerinin hedef DNA'ya yapışma sıcaklığı için 55 °C'dir ve malgorzata bölgesi deneylerinde bu optimum sıcaklık kullanılmıştır. mtDNA kontrol bölgesi geni CR3 bölgesinin klonlanması için kullanılan CR3F ve CR3R primerlerinin yapışma sıcaklığı optimum olarak 50 °C olarak hesaplandığı için CR3 bölgesi çalışmalarında bu sıcaklık kullanılmıştır. mtDNA kontrol bölgesi geni CR4 bölgesinin klonlanması için kullanılan CR4F ve CR4R primerlerinin yapışma sıcaklığı optimum olarak 48 °C olarak hesaplandığı için CR4 bölgesi çalışmalarında bu sıcaklık kullanılmıştır. Her üç bölge için kurulan PCR reaksiyonlarının denatürasyon sıcaklığı 94 °C, uzama sıcaklığı ise 72 °C olarak ayarlanmıştır ve tüm deneyler bu sıcaklıklarda yapılmıştır. Çalışma boyunca kullanılan PCR döngü sıcaklıkları ve süreleri Tablo 3.5.'te ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.

Tablo 3.5. PCR reaksiyonlarının sıcaklıkları

PCR BASAMAKLARI	mtDNA PRİMERLERİ	SICAKLIK	SÜRE
DENATÜRASYON		94 °C	8 dakika
DENATÜRASYON		94 °C	30 saniye
BAĞLANMA	F3Malg- R2Malg	55 °C	45 saniye
	CR3F- CR3R	50 °C	45 saniye
	CR4F- CR4R	48°C	45 saniye
UZAMA		72°C	45 saniye
SONLANMA		72 °C	15 dakika

35 döngü

3.2.2. Kıldan DNA saflaştırma protokolü

Darıca Faruk Yalçın Hayvanat Bahçesi ve Botanik Parkı'nda bulunan karakulaklardan etik standartlara uygun ve non-invazif olarak elde edilen kıl örnekleri stereo mikroskop altında inlenmiştir ve kıl kapsüllerine yakın bir şekilde kesilmiştir. Kesilen kıl karakulak kılları 30 – 40 ar adet tüplere konulmuştur.

1. Hayvanat bahçesinden gelen kılların bir kısmı petri kaplarına alınmıştır. Kıllar sırası ile %100'lük , % 90'lık , % 80'lik , % 70'lik etil alkol serilerinden geçirilmiş ve en son olarak da distile (otoklavlanmış) su kullanılarak yıkama işlemi yapılmıştır.
2. Kıllar, yıkama işlemi bittikten sonra kuruması için yuvarlak şekilde kesilen kurutma kağıtlarının arasına konulmuştur ve oda sıcaklığında gece boyu bekletilmiştir.
3. Kuruyan kıllar ertesi gün stereo mikroskop altında incelenmiştir. İncelenen kıllar, kıl köküne yakın bir şekilde kesilmiştir. Kesilen kıllar yaklaşık 1 cm uzunluğundadır. Kesim işlemi sonunda elde edilen kıllar 2.0 ml'lik Eppendorf® tüpüne aktarılmıştır.
4. Eppendorf® tüpün üzerine aşağıdaki konsantrasyonda hazırlanan solüsyondan 0.7 ml eklenmiştir;

50 mM Tris HCl pH: 8.0

100 mM EDTA pH:8.0

%2'lik SDS

5. Tüpe, yukarıdaki solüsyon eklendikten sonra son olarak 35µl (10 mg / ml) proteinaz K ilavesi yapılmıştır ve 55°C sıcaklığındaki hafif çalkalamalı su banyosuna gece boyu bırakılmıştır.
6. Ertesi gün su banyosundan çıkartılan tüpe 0.7 ml fenol-kloroform eklenmiştir. Fazların tam olarak birbirine karışması için 3 dakika hızlı bir şekilde el yordamı ve vortex ile çalkalanmıştır. Fazların tam olarak birbirine karışmadığı gözlenirse süre uzatılabilir.
7. Çalkalama işlemi bittikten sonra tüp içerisindeki fazların birbirinden ayrılması için örnek 15.000 rpm'de (~20.620xg) 3 dk. santrifüj yapılmıştır.
8. Santrifüj işleminden sonra üst kısımda bulunan *aquos* faz temiz Eppendorf® tüpe aktarılmıştır. Bu basamakta *aquos* fazın alt kısmında kalan fenol-kloroformun alınmamasına dikkat edilmesi gerekmektedir.
9. Temiz tüp içerisinde bulunan *aquos* faz üzerine tekrardan 0.7 ml fenol-kloroform eklenmiştir. 3 dakika el ile çalkalama yapılmıştır. Daha sonra 15.000 rpm'de (~20.620xg) 2 dk. santrifüj yapılmıştır.
10. Santrifüj cihazından çıkan örneğin üst kısmında bulunan *aquos* faz temiz 1.5 ml'lik Eppendorf tüpe aktarılmıştır. *Aquos* fazın altında bulunan fenol: kloroformun alınmamasına dikkat edilmesi gerekmektedir.
11. Temiz tüp içerisinde bulunan örneğin üzerine 70 µl 3M sodyum asetat pH:6 çözeltisinden ve 1.4 ml %100'lük etanol (*ice cold*) eklenmiştir. Örnek -20°C'de 1 saat bekletilmiştir.
12. DNA çökme işlemi için örnek 15.000 rpm'de (~20.620xg) 10 dk. santrifüj yapılmıştır.
13. Tüp içerisinde bulunan üst kısım atılmıştır. Tüpe 1 ml %70'lik etil alkol (*ice cold*) eklenmiştir ve -20°C'de 1 saat bekletilmiştir.
14. 1 saat sonunda örnek 15.000 rpm'de (~20.620xg) 10 dk. santrifüj yapılmıştır.
15. Üst kısım tekrardan atılmıştır tüpün altında kalan yani DNA olduğunu düşündüğümüz kısım üzerine 1 ml %70'lik etil alkol (*ice cold*) eklenmiştir ve

-20°C 'de 1 saat bekletildikten sonra örnek 15.000 rpm'de (~20.620xg) 10 dk. santrifüj yapılmıştır.

16. 10 dakikalık santrifüj sonunda tüp içerisinde bulunan alkol tamamen uzaklaştırılmıştır ve tüp kurutma kağıdı üzerine kapak kısımları kurutma kağıdına temas edecek şekilde ters çevrilerek bırakılmıştır.
17. Yaklaşık 1 dakika bu şekilde bekletildikten sonra tüp kapağı açık bir şekilde 15.000 rpm'de (~20.620xg) 2 dk. santrifüj yapılmıştır.
18. Santrifüj sonunda tüpe 0.1 ml distile ve otoklavlanmış steril su ilave edilmiştir. Yaklaşık 3–4 saat oda sıcaklığında bekletilerek süspansiyon edilmiştir.

3.2.3. Dışkıda DNA saflaştırma protokolü ve qiaamp DNA stool mini kit içeriği

Karakulak DNA'sı kurulan PCR reaksiyonları için kullanılan vaşak ve puma DNA'ları QIAamp DNA Stool Mini Kit/ Qiagen kit ile elde edilmiştir. Hayvanat bahçesinden gelen vaşak ve puma dışkı örneklerinden DNA elde edilmiştir ve bu DNA'lar çalışma boyunca pozitif örnek olarak kullanılmıştır. Dışkıdan DNA izolasyonunun basamakları ve kit içeriği şu şekildedir; QIAamp DNA Stool Mini Kit; İnhibitEX tablet, tampon AW2 (yıkama solüsyonu), tampon AW1 (yıkama solüsyonu), tampon AE (elüsyon tamponu), tampon ASL (parçalama solüsyonu), proteinaz K, tampon AL (bağlama solüsyonu), döndürücü filtre (spin filtre) ve toplatıcı tüp içermektedir ve bu kit ile dışkıdan DNA izolasyonu için kullanılmaktadır.

Dışkıdan DNA saflaştırma protokolü

Dışkıların yüzey kısmından kazıntı ile elde edilen 180-220 mg ağırlığındaki numune 2 ml'lik Eppendorf tüpüne aktarılır.

1. Eppendorf tüp içerisinde bulunan dışkı numunesinin üzerine 1.6 ml tampon ASL eklenir ve karışım homojen bir hâl alana kadar vorteks ile 1 dk. karıştırılır.
2. Dışkı örnekleri 15.000 rpm'de (~20.620xg) 1 dk. santrifüjlenerek, çökelti ve süpernatant kısmının ayrılması sağlanır.
3. Süpernatant kısımdan 1.4 ml alınarak, 2.0 ml'lik Eppendorf tüpe aktarılır.

4. Süpernatant kısmın bulunduğu tüp içerisine InhibitEX tablet eklenir.
5. Tabletın örnek içerisinde tam olarak çözünmesi için vortekslenir ve inkübasyon için tüpler 1 dk. oda sıcaklığında bekletilir.
6. 1 dk. oda sıcaklığında bekletilen örnekler 15.000 rpm'de (~20.62xg) 3 dk. santrifüj edilir.
7. Elde edilen süpernatant 1.5 ml'lik yeni bir Eppendorf tüpe aktararak 15.000 rpm'de (~20.62xg) 3 dk. ikinci santrifüjü yapılır .
8. Santrifüjden sonra elde edilen süpernatanttan 600 µL süpernatant Eppendorf tüpe aktarılır üzerine 25 µL proteinaz K ilave edilir. Proteinaz K'lı karışımın üzerine 600 µL tampon AL eklenir ve karışım 15 saniye vorteks yardımı ile karıştırılır.
9. Eppendorf tüpün kapağı iyice kapatılır ve proteinaz K'nın aktif hale gelebilmesi için tüp su banyosunda 70 °C'de 10 dk. inkübe edilir.
10. Su banyosunda 10 dk bekleyen tüpün içerisine 600 µL etanol (%96-100) eklenerek vorteks ile karıştırılır.
11. Elde edilen lizat dikkatli bir şekilde *spin* kolona aktararak 15.000 rpm'de (~20.620xg) 1 dk. santrifüj yapılır.
12. Lizattan kalan kısım bitene kadar lizat kolona ilave edilerek 15.000 rpm'de (~20.620xg) 1 dk. santrifüj işlemi tekrarlanır.
13. Santrifüjler sonunda *spin* kolon üzerine 500 µL tampon AW2 eklenerek 15.000 rpm'de (~20.620xg) 3 dk. santrifüj yapılır.
14. *Spin* kolon 15.000 rpm'de (~20.620xg) 1 dk. ikinci bir santrifüjden geçirilir.
15. *Spin* kolon, etiketlenmiş 1.5 ml'lik Eppendorf tüpe transfer edilir. Kolonun üzerine 200 µL tampon AE aktarılır ve 1 dk. oda sıcaklığında inkübe edilir.
16. Eppendorf tüp 15.000 rpm'de (~20.620xg) 1 dk. santrifüjü yapılarak kolonda yapışık olarak kalan DNA ların tüp içerisine geçmesi sağlanır.
17. Santrifüjden sonra elde edilen DNA -20 °C'de saklanır.

3.2.4. Agaroz jel elektroforezi

Moleküler biyolojide sıklıkla kullanılan agaroz jel elektroforezinin ana maddesi olan agaroz denizlerde yaşayan kırmızı alg türünden elde edilen bir polisakkarittir (Normand ve ark., 2000).

Kullanılan bu yöntemde DNA fragmentleri katı agaroz bloklarına yerleştirilir ve moleküllerin elektriksel alanda hareket etmesi sağlanır. Bu hareket sonunda DNA fragmentleri agaroz jel içerisinde büyüklüklerine göre ayrılır (Topal,1999). Agaroz jelde yüklü bulunan DNA fragmentlerinin hareketi katottan anota doğru gerçekleşir (Çetinkaya ve Ayhan., 2012).

Jelin yoğunluğu, içeriği, jelin hazırlanmasında ve elektriksel akımı sağlayan tampon çözelti, sıcaklık, voltaj farkı gibi faktörler DNA'nın jeldeki hareketine etki etmektedir (Birren ve Eric., 1993).

Çalışma boyunca elde edilen DNA fragmenleri küçük boyutta olduğu için agaroz jel elektroforezinde kullanılan jelin yoğunluğunun yüksek olması gerekmektedir. Bunun için çalışma boyunca %1.7 yoğunluğunda jeller hazırlanmış ve kullanılmıştır. Prensipte olarak jelin hazırlanmasında ve elektrik akımının sağlandığı haznede kullanılan tampon çözültinin aynı olması gerekmektedir. Çalışma boyunca TAE tampon çözeltisi kullanılmıştır. PCR sonrasında elde edilen DNA fragmentleri jele yüklendikten sonra jelin bulunduğu hazneye 80 volt 200 amper akım uygulanmıştır. Jelde bulunan kuyulara DNA fragmentlerinin yanı sıra bir kuyucuğa da DNA fragmentlerin boyutunu ölçebilmek için DNA molekül ağırlığı belirteci yüklenmiştir. Çalışma boyunca DNA molekül ağırlığı belirteci olarak Φ X 174 DNA/BsuRI (HaeIII kesimi) kullanılmıştır. Bu belirteç ile 1353 bp ile 72 bp arasında ki DNA fragmentlerinin ölçümü yapılabilmektedir.

Agaroz je elektroforezi tamamlandıktan sonra jel yaklaşık 5 dk. boyunca etidyum bromür (EtBr) ile boyanmıştır ve UV-transillüminatör altında incelenmiştir.

3.2.5. PCR ürünün saflaştırma basamağında kullanılan kitin (High Pure PCR Cleanup Micro Kit/ Roche) içeriği ve kullanımı

İçerisinde bağlayıcı solüsyon, bağlanmayı artırıcı solüsyon (binding enhancer), yıkama solüsyonu, elüsyon tamponu, micro filtre ve toplayıcı tüp içeren kit ile PCR reaksiyonları sonuncunda elde edilen DNA'nın diğer PCR maddelerinden ayrılması sağlanmıştır ve işlemin sonunda istenilen boyuttaki DNA fragmanleri saf halde tüplere toplanmıştır.

PCR ürünü saflaştırma protokolü

1. PCR reaksiyonu sonunda elde edilen ürün steril su ile 100 µL'ye tamamlanır.
2. Üzerine 200 µL bağlayıcı solüsyonu ve 200 µL bağlanmayı artırıcı solüsyon eklenerek karışım pipet yardımı ile karıştırılır.
3. High Pure filtre, toplayıcı tüpe yerleştirilir ve karışım bu filtrelili tüplere aktarılır.
4. PCR ürününün filtreden geçebilmesi için tüp 9.000 rpm'de (~7.245 xg) 1 dk. santrifüj yapılır.
5. Santrifüj sonunda tüpte elde edilen ürün atık üründür ve tüpün alt kısmında kalan sıvı atılır.
6. Filtrelili tüpün üzerine 400 µL yıkama solüsyonu eklenerek 9.000 rpm'de (~7.245 xg) 1 dk. santrifüj yapılır.
7. Santrifüj sonunda tüpün alt kısmında bulunan sıvı dökülür ve filtreye 300 µL yıkama solüsyonu eklenir ve 9.000 rpm'de (~7.245 xg) 1 dk. santrifüj işlemi gerçekleştirilir.
8. Yine tüpün alt kısmında bulunan sıvı dökülür boş tüp ile 15.000 rpm'de (~20.620xg) 1 dk. santrifüj işlemi tekrarlanır.
9. Üst kısımda kalan filtre 1.5 ml'lik temiz Eppendorf tüpüne yerleştirilir.
10. Filtrenin tam ortasına gelecek şekilde olmak üzere 20 µL elüsyon tamponu eklenerek 9.000 rpm'de (~7.245 xg) 1 dk. santrifüj edilir.
11. Santrifüj sonunda elde edilen tüpün alt kısmında bulunan sıvı saf DNA'yı oluşturduğu için elde edilen elüsyonlar -20 °C'de saklanır.

3.2.6. PCR ürünün saflaştırma basamağında kullanılan kitin (High Pure PCR Product Purification Kit/ Roche) içeriği ve kullanımı

İçerisinde bağlayıcı tampon, yıkama solüsyonu, elüsyon tamponu, mikro filtre ve toplayıcı tüp içeren kit PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen DNA'yı PCR elemanlarında ayırtırmak için kullanılan diğer saflaştırma kitidir.

PCR ürünü saflaştırma protokolü

1. 100 µL tamamlanan PCR reaksiyonu sonunda elde edilen ürünün üzerine 500 µL bağlayıcı solüsyon eklenir. PCR ürünü ve bağlayıcı solüsyon pipet yardımı ile karıştırılır.
2. Elde edilen karışım filtrelili tüpe aktarılır ve ürün 15.000 rpm'de (~20.620xg) 1 dk. santrifüj yapılır. Santrifüj sonunda elde edilen tüpün alt kısmında bulunan sıvı atık maddedir ve bu sıvı dökülür.
3. Filtrenin üzerine 500 µL yıkama solüsyonu eklenir ve 15.000 rpm'de (~20.620xg) 1 dk. santrifüj yapılır. Santrifüj sonunda elde edilen sıvı tekrardan dökülür.
4. Filtreye 200 µL yıkama solüsyonu eklenir ve 15.000 rpm'de (~20.620xg) 1 dk. santrifüj yapılır.
5. Filtre temiz 1.5 ml'lik Eppendorf tüpüne takılır ve üzerine 50 µL elüsyon tamponu eklenir.
6. Elüsyon tamponlu filtre 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edilir.
7. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra filtrelili tüp 15.000 rpm'de (~20.620xg) 1 dk. santrifüj yapılır.
8. Santrifüj sonunda elde edilen elüsyon saf DNA'dır ve elüsyon -20 °C'de sekansa hazır bir şekilde bekletilir.

3.2.7. DNA dizi analizi

PCR reaksiyonları sonunda elde edilen DNA fragmentleri agaroz jel elektrofori ile incelendikten sonra pozitif sonuç alınan karakulak DNA örnekleri saflaştırıldıktan

sonra İontek firmasına gönderilmiştir. İontek firması DNA dizi analizini yaptıktan sonra sonuçlar Chromas 2.4 programından incelenmiştir. Elde edilen karakulak DNA dizileri NCBI programından bulunan diğer kedi türleri DNA dizileri ile EBI-Clustal W programı kullanılarak çoklu hizalaması yapılmıştır ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA VE BULGULARI

Bu tez çalışmasında, Darıca Faruk Yalçın Hayvanat Bahçesi ve Botanik Parkı'nda bulunan karakulaklardan etik standartlara uygun ve non-invazif olarak elde edilen kıl örneği analiz edilmiştir. Hayvanat bahçesinden elde edilen karakulak kılları kıldan DNA saflaştırma protokolü kullanılarak karakulak DNA'sı elde edilmiştir. Çalışma sonunda karakulağa ait bugüne kadar yapılmış olan çalışmalarda bulunamayan mtDNA kontrol bölgesi genlerinin bulunması ve *sitokrom-b* geninin bir kısmının bulunması hedeflenmiştir. Bu bölgelerin bulunabilmesi için PCR yöntemi kullanılmıştır. PCR reaksiyonlarının kurulabilmesi için NCBI programından faydalınarak kedigillere özgü primerler tasarlanmıştır. Bu primer çiftleri kullanılarak amplifiye edilen bölgeler karakulak mtDNA ve *sitokrom-b* dizilerine ilk defa ulaşılmıştır. Elde edilen mtDNA dizileri laboratuvarında bu çalışma ile eş zamanlı deneyleri sürdürülen vaşak DNA'ları ve NCBI'de elde edilen diğer kedi soy hatlarına ait bireyler ile çoklu dizi hizalama yöntemi kullanılarak kıyaslanmıştır. Karşılaştırmalar ile hem bulunan karakulak DNA larının kontamine olmadığına kanıtı hem de diğer kedi soylarına ait kediler ile karakulağın hangi bölgelerde farklılıklarının olduğu bulunmuştur.

Bu çalışma gibi filogenetik çalışmalarda genetik materyal olarak nükleer DNA'ya ek olarak hücrenin organeli olan mitokondrinin içerisinde bulunan mtDNA'da son zamanlarda moleküler biyolojide moleküler belirteç olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Aşıcıoğlu ve ark. 2003).

Filogenetik olarak kimliklendirme çalışmalarında DNA dizi analizi o türün kimliğinin ve tarihinin hangi aşamalardan geçtiğini gösteren en güvenilir yöntemdir (Gill ve ark 1994). mtDNA'yı nükleer DNA'dan ayıran bazı özellikler vardır ve bu özellikler şu şekildedir; mtDNA nükleer DNA ya oranla daha yüksek kopya sayısına sahiptir.

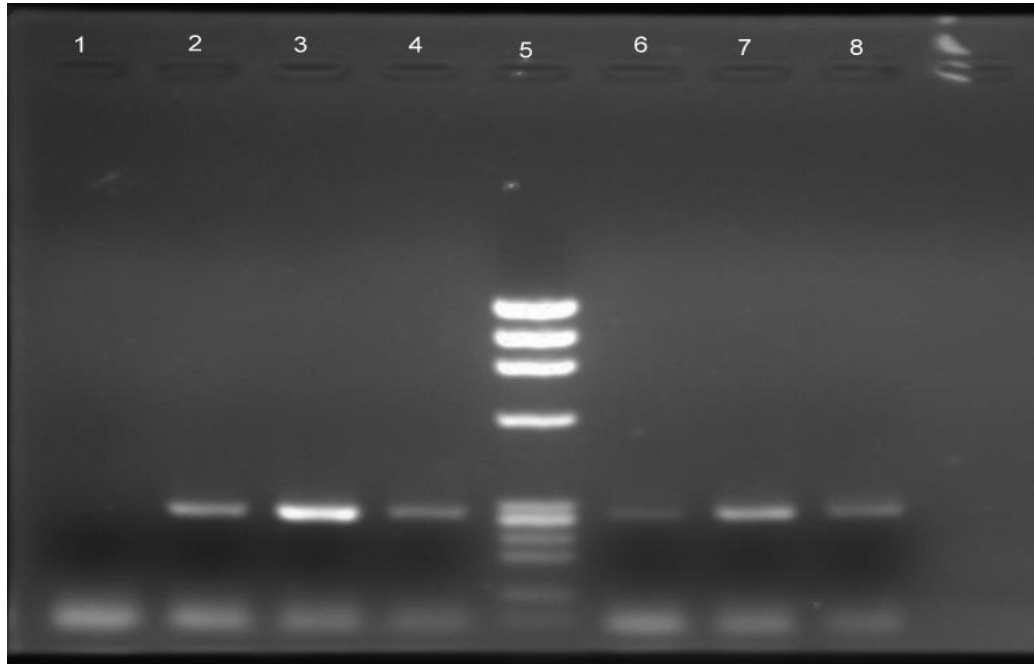
mtDNA'da mayotik rekombinasyon özelliği yoktur ve mtDNA maternal kalıtım göstermektedir (Butler ve Levin 1998). Maternal kalıtım göstermesinin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte yaklaşık 100.000 – 1.000.000 oosit mitokondrisinin içine giren 100 – 1000 arasında mitokondri sayısında değişim gösteren sperm mitokondrilerinin azlığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Döllenmeden sonra sperm başı içerisinde kalan mitokondriler de ovum hücreleri tarafından yok edilmesi olduğu düşünülmektedir. Kısacası döllenme tamamlandıktan sonra oluşan yeni hücre içerisinde sadece anneden gelen mitokondriler ve bu mitokondriler içerisinde bulunan mtDNA'lar bulunmaktadır (Chinnery ve ark 2000).

Çalışma boyunca mtDNA'nın en polimorfik bölgesi olan D-loop bölgesi yani kontrol bölgesinin bir kısmının bulunması hedeflenmiştir. mtDNA'nın mutasyon hızı nükleer DNA'nın mutasyon hızından çok yüksektir. Bunun nedeni mtDNA nükleer DNA'ya oranla daha az korumaya sahiptir ve kontrol mekanizması az gelişmiştir. mtDNA'nın bu özelliğinden dolayı filogenetik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. mtDNA da meydana gelen mutasyonlar bireyler ve türler arasında gerçekleşen farklılıkların takibini kolaylaştırmaktadır. Bu özelliklerden faydalanılmak için çalışma boyunca genetik materyal olarak mtDNA kullanılmıştır. Karakulak mtDNA'sı ve diğer kedilerin mtDNA'sı kıyaslanarak kediler arasındaki farklılıkların bulunması hedeflenmiştir.

4.1. Karakulak mtDNA *sitokrom-b* geni Malgorzata bölgesi amplifiyesi

Karakulak kılından elde edilen DNA ile PCR reaksiyonları bölüm 3.2.1 de ki şartlar altında kurulmuştur. PCR reaksiyonu kurulurken bu bölgenin tespiti için F3Malg ve R2Malg primerleri kullanılmıştır. Bu primerler ile malgorzata bölgesinden toplamda 286 baz çiftinin bulunması hedeflenmiştir ve deney sonunda beklenen büyüklükte DNA bölgesi amplifiye edilmiştir. PCR reaksiyonu esnasında negatif kontrol olarak kalıp DNA kullanılmamıştır. Negatif kontrole kalıp DNA eklenmediği için çevresel bir kontaminasyonun var olup olmadığı test edilmiştir. Pozitif kontrol olarak hayvanat bahçesi vaşak ve puma DNA ları kullanılmıştır. PCR reaksiyonu esnasında primerin kalıp DNA ya bağlanma sıcaklığı 51 °C olarak yapılan birçok denemeden sonra

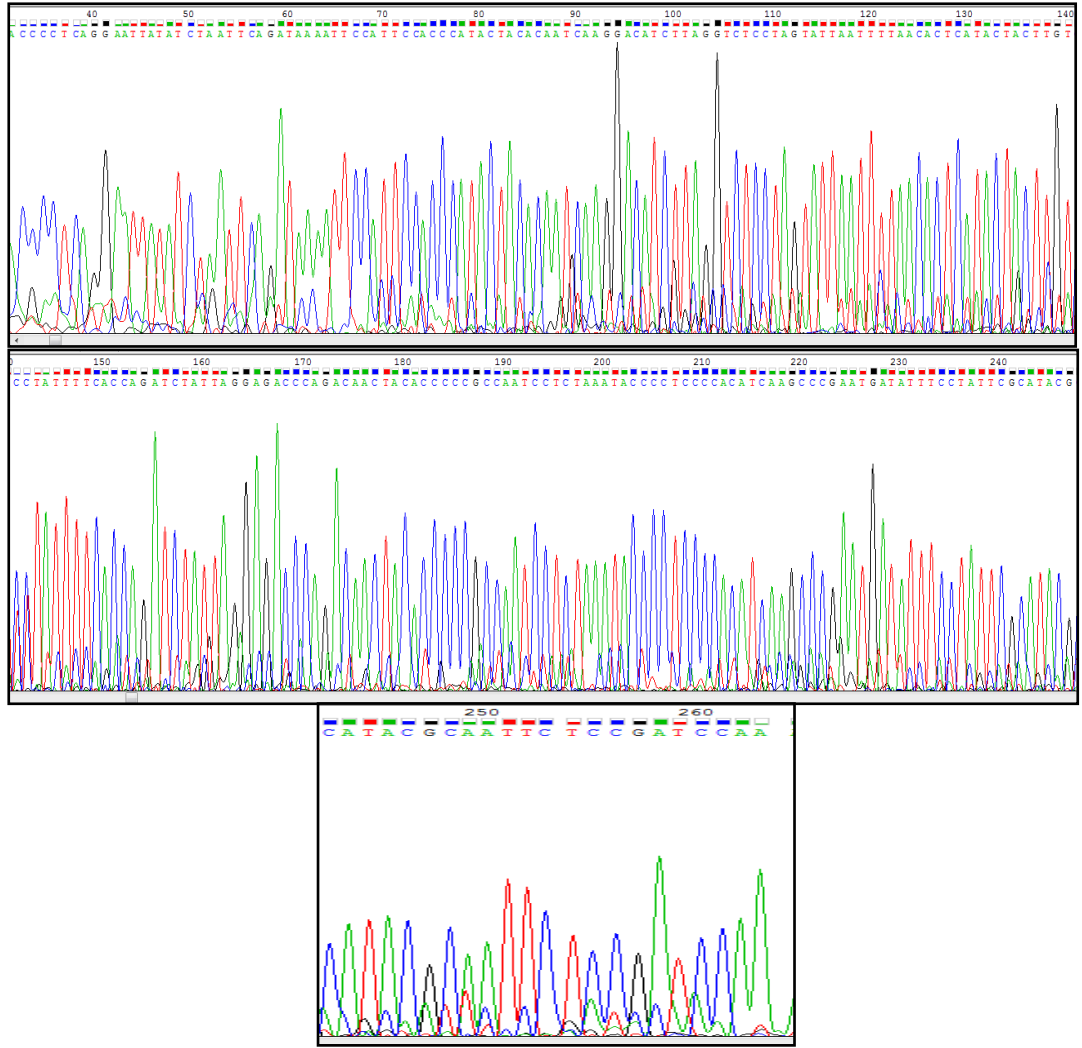
optimum bağlanma sıcaklığı olduğu tespit edilmiştir. Sıcaklık tespiti optimum olarak bulunduktan sonra deney 4 kez tekrar edilmiştir ve 4 tekrarda da aynı sonuçlar alınmıştır. Pozitif olarak sonuçlanan karakulak PCR reaksiyonları High Pure PCR Cleanup Micro Kit/ Roche kiti ile PCR ürünlerinden saflaştırılmıştır. Kitin içeriği ve kullanım talimatları bölüm 3.2.4.'te ayrıntılı bir şekilde verilmiştir. Elüatlar agaroz jele yüklenerek sekansa gitmeden önce varlıkları tekrardan incelenmiştir. PCR ürünlerinden saflaştırılan karakulak mtDNA *sitokrom-b* geni malgorzata bölgesi DNA parçalarının sekansının yapılması için İontek firmasına gönderilmiştir. Sekans işlemi İontek firması tarafından yapıldıktan sonra sonuçlar Chromas 2.4 programıyla analiz edilmiştir. mtDNA *sitokrom-b* geni malgorzata bölgesine ait karakulak DNA fragmentleri 2 kez İontek firmasına gönderilip sekansı yapılmıştır. Yapılan sekanslar sonucunda sonuçların aynı olduğu gözlenmiştir. Analiz sonunda elde edilen DNA dizileri yapılan çoklu dizi hizalama yöntemi ile diğer kedilerden ayrıldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. Hayvanat bahçesi karakulak örneğinin F3Malg ve R2Malg primeri sitokrom-b geni Malgorzata bölgesi PCR amplifikasyonu, agaroz jel elektroforezi sonuçları (Kuyu 1: Negatif kontrol (Kalıp DNA yok), Kuyu 2: Pozitif kontrol hayvanat bahçesi vaşak örneği, Kuyu 3: Hayvanat bahçesi dişi karakulak örneği, Kuyu 4: Hayvanat bahçesi erkek karakulak örneği Kuyu 5: DNA molekül ağırlığı belirteci (ϕ X 174 DNA/BsuRI kesimi), Kuyu 6: Pozitif kontrol hayvanat bahçesi Puma örneği, Kuyu 7: Hayvanat bahçesi dişi karakulak örneği, Kuyu 8: Hayvanat bahçesi erkek karakulak örneği).

Şekil 4.1.'de de gösterildiği gibi PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen DNA fragmentleri agaroz jele yüklenmiştir ve DNA fragmentleri istenilen büyüklükte gözlenmiştir. Elde edilen bantların tamamı molekül ağırlığı belirtecinin 310 bç ve 271 bç bantlarının arasındadır. Deney sonunda 286 bç büyüklüğünde DNA fragmentlerinin elde edilmesi beklenmiştir. Elde edilen DNA fragmentlerinin bu aralıkta çıkması kullanılan primerlerin güvenilirliğinin tekrardan test edilmesine olanak sağlamıştır. Şekil 4.1. Kuyu 1'de ki örnek negatif kontrol olduğu için kalıp DNA kullanılmamıştır. Kalıp DNA kullanılmadığı için deney sonunda bu kuyuda bant gözlenmemesi gerekmektedir ve deney sonunda 1. kuyu da bant gözlenmemiştir. Bu kuyuda bant gözlenmemesi deneyde çevresel kontaminasyon yaşanmadığını ifade etmektedir. Deneyin steril ortam koşullarda gerçekleştirilip sonuç alındığı gözlenmiş olunmuştur. Malgorzata primerleri ile yapılan bu deney aynı ortam koşullarında 4 kez tekrar edilmiştir. Tüm tekrarlarda beklenen büyüklükte DNA fragmentleri elde edilmiştir. Sekans işlemi öncesinde PCR reaksiyonları sonunda elde edilen DNA'ların PCR ürünlerinden saflaştırma işleminden önce 4 kez tekrar edilen karakulak DNA fragmentlerinin bulunduğu PCR tüplerindeki içerik birleştirilmiştir. Bu basamağın amacı sekans işlemine fazla miktarda DNA örneği gönderilmesidir. Fazla miktarda DNA örneği gönderildiği zaman sekans sonucu daha güvenilir hale gelmektedir. Bunun için saflaştırma işleminden sonra yaklaşık 70 µL karakulak malgorzata bölgesine ait DNA fragmentleri sekans işlemi için İontek firmasına gönderilmiştir. İontek firmasından gelen DNA dizileri Chromas 2.4 programıyla analiz edilmiştir. Analiz sonunda karakulağa ait 286 bç'lik malgorzata bölgesi DNA dizileri ilk defa bu çalışma ile bulunmuştur.

İontek firması karakulağa ait DNA'ların ilk önce düz okumasını yapmıştır. Bu okuma sonunda elde edilen sekans görüntüleri Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Karakulak *sitokrom-b* geni malgorzata bölgesi düz okuması

Şekil 4.2.'de gösterilmiş olan sekans ile karakulak mtDNA *sitokrom-b* geni malgorzata bölgesi dizisinin son kısmı bulunmuştur. Ters okuma ile malgorzata bölgesi dizisinin baş kısmı bulunacaktır. Düz sekans işleminden sonra karakulağa ait malgorzata bölgesinin dizileri Tablo 4.1.'de ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.

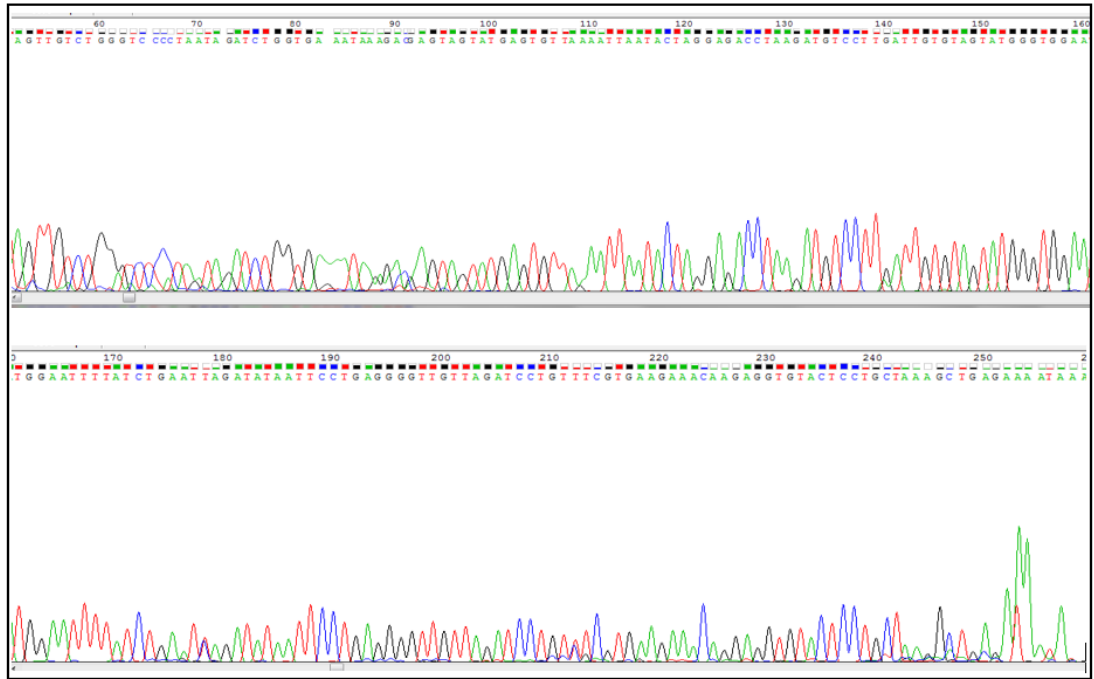
Tablo 4.1. mtDNA *sitokrom-b* geni malgorzata bölgesi düz okuma sonunda elde edilen karakulak malgorzata bölgesi dizileri

```

CCCCTCAGGAATTATATCTAATTCAGATAAAAATTCCATTCCACCCATACTACACAATCAAGGAC
ATCTTAGGTCTCCTAGTATTAATTTAACACTCATACTACTTGTCTATTTTCACCAGATCTATTA
GGAGACCCAGACAACACTACACCCCGCCAATCCTCTAAATACCCCTCCCCACATCAAGCCCGAAT
GATATTCCTATTCGCATACGCAATTCTCCGATCCA(R2M&lg primeri)

```

Karakulağa ait DNA'nın düz okuması tamamlandıktan sonra dizinin tamamlanması için aynı DNA dizisinden ters okuma yapılmıştır ve yapılan okuma sonunda karakulak mtDNA *sitokrom-b* geni malgorzata bölgesi tamamlanmıştır. Ters okuma ait sekans görüntüleri Şekil 4.3.'te ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Karakulak *sitokrom-b* geni malgorzata bölgesi ters okuma sekans görüntüleri

Yapılan ters okuma sekansı ile birlikte karakulak *sitokrom-b* geni malgorzata bölgesi 286 bp'nin tamamı bulunmuştur ve bu bölgeye ait DNA dizilerin tam hali Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Karakulak mtDNA *sitokrom-b* geni malgorzata bölgesi DNA dizilerinin tamamı

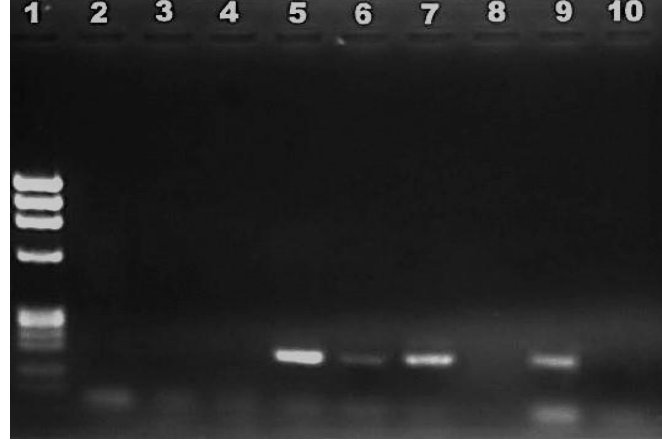
```

CTCCTGTTTCTTCACGAAACAGGATCTAACAAACCCTCAGGAATTATATCT
AATTCAGATAAAATTCCATTCCAACCATACTACACAATCAAGGACATC
TTAGGTCTCCTAGTATTAATTTAACACTCATACTACTTGTCCATTTTC
ACCAGATCTATTAGGAGACCCAGACAATAACCCCCGCCAATCCTCT
AAATACCCCTCCCCACATCAAGCCCGAATGATATTTTCCTAT

```

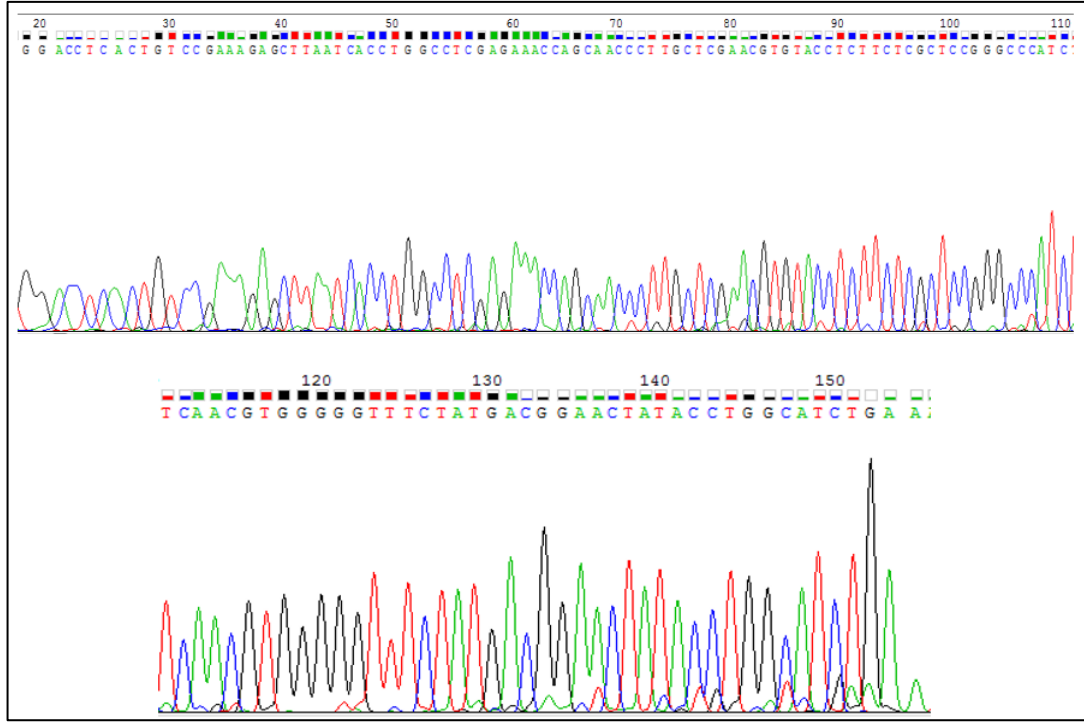
4.2. Karakulak mtDNA Kontrol Bölgesi Geni CR4 Bölgesi Amplifiyesi

Karakulak kılından elde edilen DNA ile PCR reaksiyonları bölüm 3.2.1’de ki şartlar altında kurulmuştur. mtDNA kontrol bölgesi amplifiyesi için PCR reaksiyonları kurulurken CR4R ve CR4F primerleri kullanılmıştır. Bu primerler ile 182 bp’lik bölgenin amplifiye olması beklenmektedir. Deneyde kullanılan primerler kedi özgü primerler olduğu için PCR reaksiyonları esnasında negatif kontrol tüplerinin içerisine güvercin dışkısından saflaştırılan DNA eklenmiştir. Bu şekilde primerlerin güvenilirliği bir kez daha kontrol edilmiştir. Negatif kontrol olarak güvercin DNA’sının PCR reaksiyonu sonunda CR4F ve CR4R primerleri ile amplifiye olmaması gerekmektedir. Pozitif kontrol olarak hayvanat bahçesinden getirilen vaşak ve puma dışkılarında elde edilen DNA kullanılmıştır. PCR reaksiyonunda kullanılan primer, kedi özgü primer olduğu için vaşak ve puma tüplerinde amplifiye olması beklenmiştir ve PCR sonunda yapılan agaroz jelde vaşak ve puma kuyularında bant gözlenmiştir. PCR sonunda yapılan agaroz jel elektroforezi görüntüsünde hayvanat bahçesi karakulak örneğinden pozitif sonuç alınmıştır. Bu deney ile ilk kez karakulak mtDNA kontrol bölgesi CR4 geni bulunmuştur. Şekil 4.4.’te CR4F ve CR4R primerleri ile elde edilen karakulak DNA amplifiyesinin agaroz jel görüntüsüdür. Şekil 4.4.’te negatif, pozitif kontroller ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Dişi ve erkek karakulak DNA örneğinin CR4 primeri kontrol bölgesi PCR amplifikasyonu, agaroz jel elektroforezi sonuçları (Kuyu 1: DNA molekül ağırlığı belirteci (ϕ X 174 DNA/BsuRI kesimi), (Kuyu 2: Negatif kontrol (Kalıp DNA güvercin DNA'sı), Kuyu 3: Negatif kontrol (Kalıp DNA yok), Kuyu 4: Negatif kontrol (Kalıp DNA yok), Kuyu 5: Pozitif kontrol hayvanat bahçesi puma örneği, Kuyu 6: Hayvanat bahçesi dişi karakulak Kuyu 7: Hayvanat bahçesi erkek karakulak örneği, Kuyu 8: boş kuyu, Kuyu 9: Hayvanat bahçesi dişi karakulak örneği).

Şekil 4.4.'te ki agaroz jel görüntüsünde de gözlendiği gibi deney esnasında herhangi bir kontaminasyon yaşanmadı için negatif kontrollerde bant gözlenmemiştir. PCR kurulum esnasında kullanılan CR4F ve CR4R primerleri kedigillere özgü primer olduğu için Şekil 4.4.'te 2 kuyu da bulunan güvercin DNA'sın da bant gözlenmemiştir. Bu sonuç ile de PCR reaksiyonlarında kullanılan primerin güvenilirliği bir kez daha kanıtlanmış olmuştur. Şekil 4.4.'te ki 6. 7. ve 8. kuyulara karakulak DNA'sı yüklenmiştir ve agaroz jelde de gözlendiği gibi bant elde edilmiştir. Şekil 4.4.'te de gözlenen bu karakulak bantları, karakulak mtDNA kontrol bölgesi CR4 geninin gözlendiği ilk agaroz jel görüntüsüdür. CR4 primerleri ile yapılan bu deney aynı ortam koşulları altında 3 kez daha tekrarlanmıştır ve 3 tekrarda da aynı sonuçlar alınmıştır. Agaroz jel görüntülemesi sonunda karakulak DNA'sının amplifiye olduğu tüpler PCR ürünlerinden saflaştırılmıştır ve saflaştırılan DNA'lar sekans işlemi için İontek firmasına gönderilmiştir. Sekans sonrasında gelen sonuçlar Chromas 2.4 programı ile incelenmiştir. CR4 bölgesinin önce düz okuması yapılmıştır ve Şekil 4.5.'de sekans sonunda elde edilen düz okuma sekans tikleri gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Karakulak mtDNA kontrol bölgesi CR4 geni düz sekans okuma görüntüsü

Sekans okuması sonunda Tablo 4.3.'de gösterilen karakulağa ait ilk CR4 dizileri elde edilmiştir.

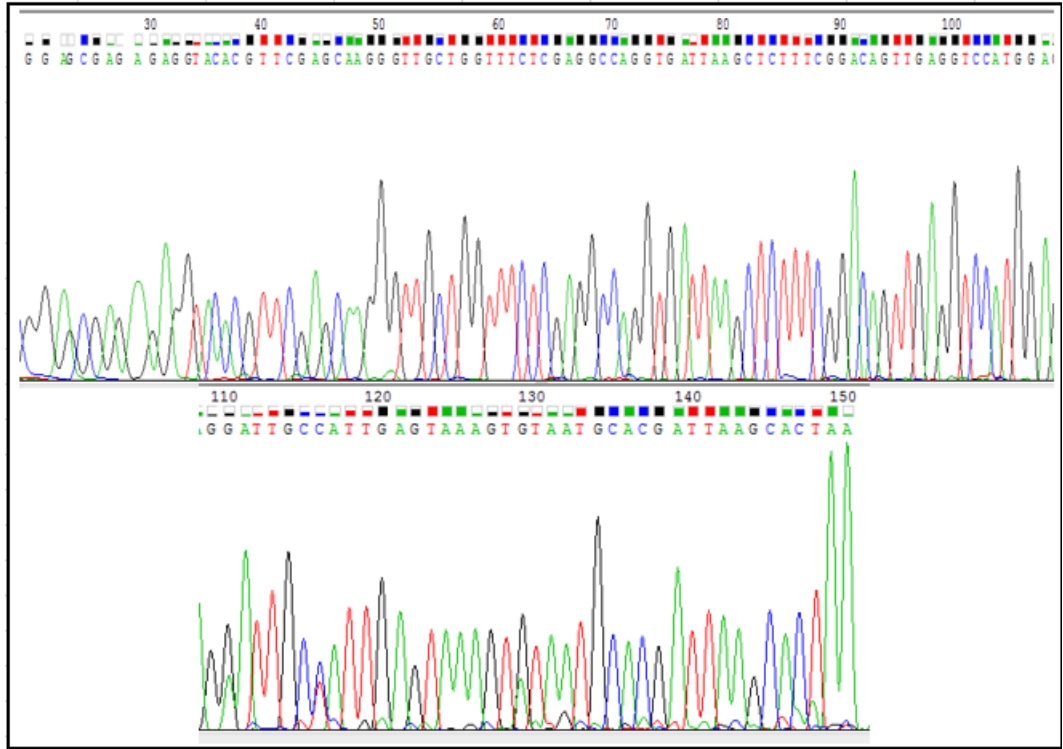
Tablo 4.3. mtDNA kontrol bölgesi CR4 geni düz okuma sonunda elde edilen karakulak dizileri

```

GGACCTCACTGTCCGAAAGAGCTTAATCACCTGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGC
TCGAACGTGTACCTCTTCTCGCTCCGGGCCATCTCAACGTGGGGGTTTCTATGACGGA
ACTATACCTGGCATCTG(CR4R PRIMERİ)

```

Düz okuma tamamlandıktan sonra İontek firmasına gönderilen karakulak DNA örneği üzerinden ters okuma yapılması istenmiştir ve ters okuma ile dizinin tamamının bulunması hedeflenmiştir. Şekil 4.6.'da karakulak CR4 geni düz okuma sekans görüntüleri ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.



Şekil 4.6 . Karakulak mtDNA kontrol bölgesi CR4 geni ters sekans okuma görüntüsü

Tablo 4.4.'de sekans okuması sonunda tamalanan CR4 dizisinin tamamı gösterilmiştir. CR4 ters okuması ile dizi tamamlanmıştır ve hedeflendiği gibi CR4 bölgesinin tamamı yani 182 baz çifti bulunmuştur. Bulunan bu baz çiftleri karakulağın kontrol bölgesine ait dünyada ki ilk gen dizileridir.

Tablo 4.4. Karakulak mtDNA kontrol bölgesi CR4 geni DNA dizilerinin tamamı

```

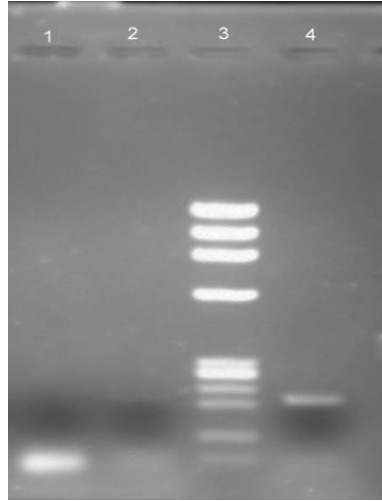
ACACTTTACTCAATGGCAATCCTCCATGGACCTCACTGTCCGAAAGAGCTTAATCAC
CTGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGCTCGAACGTGTACCTTCTTCGCTCCGGG
CCCATCTCAACGTGGGGGTTTCTATGAC

```

CR4 bölgesinin sekans okuması tamamlandıktan sonra 286 bç malgorzata bölgesinin tamamı 182 bç CR4 bölgesinin tamamı bulunmuştur. Karakulak mtDNA'sının 468 bazı keşfedilmiş olmuştur.

4.3. Karakulak mtDNA Kontrol Bölgesi Geni CR3 Bölgesi Amplifiyesi

Karakulak kontrol bölgesi CR3 genin bulunması için bölüm 4.1 ve 4.2’de ki ortam koşulları altında PCR reaksiyonları kurulmuştur. Bölüm 4.1.’de F3Malg ve R2Malg primerleri, bölüm 4.2’de CR4F ve CR4R primerleri kullanılmıştır. Bölüm 4.3.’de gösterilen deneyde de CR3F ve CR3R primerleri kullanılarak PCR reaksiyonları kurulmuştur. Kurulan PCR reaksiyonları agaroz jel elektrofezinde görüntülenmesi için amplifiye edilen DNA fragmentleri agaroz jele yüklenmiştir ve agaroz jel görüntüsü Şekil 4.7.’de gösterilmiştir. Bu deney sonunda 199 bç’lik bölgenin bulunması hedeflenmiştir. Deney sonunda elde edilen karakulak DNA’sı CR3 fragmentlerinin olduğu PCR tüplerindeki örnekler saflaştırma kitleri ile saflaştırılmıştır.



Şekil 4.7. Erkek karakulak DNA örneğinin CR3 primeri kontrol bölgesi PCR amplifikasyonu, agaroz jel elektroforezi sonuçları (Kuyu 1: Negatif kontrol (Kalıp DNA güvercin DNA’sı), Kuyu 2: Pozitif kontrol kalıp DNA hayvanat bahçesi puma örneği Kuyu 3: DNA molekül ağırlığı belirteci (ϕ X 174 DNA/BsuRI kesimi), Kuyu 4: Hayvanat bahçesi karakulak örneği).

Örnekler sekans okuması yapılması için İontek firmasına gönderilmiştir. Örneğin önce düz okuması yapılarak CR3 bölgesinin son kısımlarının bulunması hedeflenmiştir. Hedeflendiği gibi okuma sonunda CR3 bölgesinin son kısımları bulunmuştur. Şekil 4.8.’de CR3 bölgesinin düz okumasın sekans görüntüsü gösterilmiştir.

mtDNA genomu için keşfedilmiştir. Bu çalışma ile karakulak mtDNA genlerinden 613 bç'ti ilk defa bulunmuştur.

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇLARI

PCR reaksiyonları sonucunda elde edile DNA fragmentleri Roche High Pure PCR Product Prufication Kit ve Roche High Pure PCR Cleanup Micro Kit kullanılarak PCR ürünleri saflaştırılmıştır. Saflaştırılan ürünler DNA dizi analizine gönderilmiştir ve çalışmanın hedefinde olduğu gibi karakulak mtDNA kontrol bölgesi dzileri ve *sitokrom-b* malgorzata bölgesi dizileri elde edilmiştir.

Felis soy hattından ev kedisi(*Felis catus*), Puma soy hattından pumanın (*Puma concolor*) ve çitanın (*Acinonyx jubatus*) , *Lynx* soy hattından vaşağın (*Lynx lynx*) *Ocelot* soy hattından şili orman kedisinin (*Leopardus guigna*) Bay cat soy hattından Asya altın kedisinin (*Catopuma temminckii*) *Panthera* soy hattından Jaguarın (*Panthera onca*) ve aslanın (*Panthera leo*) mtDNA kontrol bölgesi geninin CR4 bölümü dizileri ve *sitokrom-b* geni malgorzata bölgesi dizileri NCBI veri tabanından elde edilmiştir ve *Caracal* soy hattından olan karakulak (*Caracal caracal*) ile çoklu dizi hizalama yapılarak incelenmiştir.

mtDNA kontrol bölgesi geni CR4 bölümü karşılaştırmasına göre karakulak CR4 dizileri Johnson ve arkadaşlarının (2006) yapılan çalışmalar sonrasında oluşturmuş oldukları kedi filogenetiği soy ağacına göre karakulağa yakın olan *Bay cat* soy hattı ile yine karakulağa yakın olan *Panthera* soy hattı ile birçok yerde aynı bazların olduğu tesbit edilmiştir. Aynı şekilde *Lynx* soy hattında bulunan H1 vaşağı (Avrasya vaşağı, Hellborg) ile de birçok bazda benzerliklerinin olduğu tesbit edilmiştir. Bu benzer olan bazların bazıları Tablo 5.2.'de gösterilmiştir. mtDNA kontrol bölgesi geninin CR4 (182 bç) DNA dizileri Türkiye'de ve Dünya'da ilk defa bu çalışma ile keşfedilmiştir. CR4 bölgesi ile yapılan çalışma laboratuvar ortamında aynı PCR reaksiyonu şartları altında 2 kez tekrar edilmiştir ve 2 tekrarda da aynı sonuçlar elde edilmiştir.

CR4 bölgesinin çoklu dizi hizalamasında uygulanan yöntem *sitokrom-b* geninin malgorzata bölgesi içinde uygulanmıştır. Karakulak malgorzata DNA dizisi kedi filogenetiği soy ağacında bulunan 8 ayrı kedi soyunu oluşturan kedilerin malgorzata bölgeleri kıyaslanmıştır. Karakulağın Tablo 5.1.'de de görüldüğü gibi karşılaştırma sonunda CR4 bölgesi dizilerinin diğer kedi soyları ile birçok yerde ayrıldığı gözlenmiştir. Birçok dizide de benzerliklerinin olduğu tesbit edilmiştir.

Karakulak CR4 dizileri ile diğer kedi soylarına ait CR4 dizileri çoklu dizi hizalama yöntemi ile kıyaslanmıştır. Bu karşılaştırma Tablo 5.1.'de ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.

Tablo 5.1. Karakulak ve diğer kedi soylarındaki kedilerin CR4 bölgesi karşılaştırmaları. Tabloda kullanılan kedi isimlerinin kısaltmaları ; po: *Panthera onca*, asl: *Panthera leo*, h1: *Lynx lynx*, ct: *Catopuma temminckii*, par: *Leopardus guigna*, aj: *Acinonyx jubatus*, pc: *Puma concolor*, fc: *Felis catus*, kara: *Caracal caracal*

par	ACATTCTATTCTAGAGCAGTTCTCTATGGACCTCAA-CTGTCCGAAAGAGCTTAATCACC
FC	CACCTTAATTCTAGGACAGTCTTCTATGGACCTCAA-CTATTCCAAAAGAGCTTAATCACC
PO	ATTCATGATTTCC-AACAGTCTCTTATGGACCTCAA-CTGTCCGAAAGAGCTTGATCACC
ASL2	ACTCATGATCTATAACAGTATCTCTATGGACCTCAA-CTGTCCGAAAGAGCTTAATCACC
kara	ACACTTTACTCAATGGCAATCCTCCATGGACCTCACT-CTGTCCGAAAGAGCTTAATCACC
CT	CCACTTTGACTCAGAACAATCCTTCATGGACCTCAATATCCAAAAGAGTATTGATCACC
AJ	ATAACTTGTTACGGGACAATTCTCTATGGACCTCAA-TATCCAAAAGAACTTAATCACC
H1	ATACCTTGCTCTAGAACAGTCTCTCATGGACCTCAA-CTGTCCGAAAGAGCTTAATCACC
PC	TCCATACTTTCTAGGACAATTCTCTATGGACCTCAA-CTGTCCAAAAGAACTTGATCACC
	***** * * *****
par	TGGCTCGAGAAACCAAGCAAACCTTGCTCG-AAAGTGTACCTCTTCTCGCTCCGGGCCAT
FC	TGGCTCGAGAAACCAAGCAAACCTTGCTCGAACGTGTACCTCTTCTCGCTCCGGGCCAT
PO	TGGCTCGAGAAACCAAGCAAACCTTGCTTGAACGTGTACCTCTTCTCGCTCCGGGCCAT
ASL2	TGGCTCGAGAAACCAAGCAAACCTTGCTTGAACGTGTACCTCTTCTCGCTCCGGGCCAT
kara	TGGCTCGAGAAACCAAGCAAACCTTGCTCGAACGTGTACCTCTTCTCGCTCCGGGCCAT
CT	TAGCCTCGAGAAACCAAGCAAACCTTGCTTGAACGTGTACCTCTTCTCGCTCCGGGCCAT
AJ	TAGCTCGAGAAACCAAGCAAACCTTGCTTGAACGTGTACCTCTTCTCGCTCCGGGCCAT
H1	TGGCTCGAGAAACCAAGCAAACCTTGCTCGAACGTGTACCTCTTCTCGCTCCGGGCCAT
PC	TGGCTCGAGAAACCAAGCAAACCTTGCTCGAACGTGTACCTCTTCTCGCTCCGGGCCAT
	* * ***** ** * ***** * ***** *****
par	TTCAACGTGGGGGTTNNNNNN
FC	TTCAACGTGGGGGTTTCTATAAC
PO	TTCAACGTGGGGGTTCTATAAT
ASL2	TTTAAATGTGGGGGTTCTATGGT
kara	TTCAACGTGGGGGTTTCTATGAC
CT	TTCAACGTGGGGGTTTCTATCAT
AJ	TTCAACGTGGGGGTTTCTATAAC
H1	TTCAACGTGGGGGTTTCTATAAC
PC	TTCAACGTGGGGGTTTCTATGGT
	** ***** * *

Tablo 5.2 . Karakulak mtDNA kontrol bölgesi geni CR4 DNA dizisinin diğer kedi soylarına ait CR4 DNA dizileri ile karşılaştırması. Karşılaştırma sonucunda elde edilen nükleotid benzerlikleri – farklılıkları ve baz sırası

	1.BAZ	2.BAZ	5.BAZ	36.BAZ	42.BAZ	121.BAZ
OCELOT SOYU	A	C	T	A	C	T
FELİS SOYU	C	A	T	A	T	T
PANTHERA SOYU	A	T	A	A	C	T
PANTHERA SOYU	A	C	A	A	C	T
CARACAL SOYU	A	C	T	C	C	C
BAY CAT SOYU	C	C	T	A	C	T
PUMA SOYU	A	T	C	A	C	T
LYNX SOYU	A	T	C	A	C	C
PUMA SOYU	T	C	T	A	C	T

Malgorzata primerleri ile yapılan PCR reaksiyonu amplifikasyonun gösterildiği Şekil 4.1.'de ki agaroz jel elektroforezi görüntüsünde amplifiye edilen karakulak dizisi DNA molekül ağırlığı belirtecinin (ϕ X 174 DNA/BsuRI kesimi) 310 bç ile 271 bç arasında gözlenmiştir. Malgorzata primerleri ile 286 bç'lik dizinin amplifeye olması beklendiği için agaroz jel elektroforezinde DNA bandının bu aralıkta olması gerekmektedir. Malgorzata primerleri ile elde edilen bu gen dizisi karakulağın *sitokrom-b* geninin malgorzata bölgesine ait ilk gen dizilerinin görüntüsüdür.

Karakulak mtDNA *sitokrom-b* geni malgorzata bölgesi ile diğer kedilere ait malgorzata bölgeleri çoklu dizi hizalama yöntemi ile kıyaslanmıştır. Bu karşılaştırma Tablo 5.3.'de gösterilmiştir. Tablo 5.3.'nin oluşturulmasında kullanılan karakulak malgorzata dizilerine F3Malg ve R2Malg primerleri dahil edilmemiştir. Primerler

dahil edilmediği için karakulak malgorzata bölgesi için 238 baz ile diğer kedilerin malgorzata bölgeleri kıyaslanmıştır.

Tablo 5.3 . Karakulak ve diğer kedi soylarında ki kedilerin malgorzata bölgesi karşılaştırmaları. Tabloda kullanılan kedi isimlerinin kısaltmaları ; po: *Panthera onca*, asl: *Panthera leo*, h1: *Lynx lynx*, ct: *Catopuma temminckii*, par: *Leopardus guigna*, aj: *Acinonyx jubatus*, pc: *Puma concolor*, fc: *Felis catus*, kara: *Caracal caracal*

po	TTCCATTTCATCATCTCAGCCCTAGCAGCAGTCCATCTCCTATTCCCTTCATGAGACAGGAT	15671
asl	TTCCATTTATCATCTCAGCCCTAGCAGCAGTCCACCTCCTATTCCCTCCATGAAACAGGAT	15620
h1	TCCCATTTCATCATCTCAGCCCTAGCAGCAGTACACCTCCTATTCCCTCCAGAAACAGGAT	15668
ct	TCCCATTTCATCATCTCAGCCCTAGCAGCAGTACACCTCCTATTCCCTTCAGAAACAGGAT	15687
par	TCCCGTTTCATCATCTCAGCCCTGGCAGCAGTACACCTTTCTATTCTCCATGAAACAGGAT	15595
aj	TTCCATTTCATCATCTCAGCCCTAGCAGCAGTACACCTCTTATTCTCCAGAGACAGGAT	15673
pc	TCCCATTTCATCATCTCAGCTTAGCAGCAGTACACCTCTTATTCTCCAGAAACAGGAT	15638
fc	TTCCATTTCATCATCTCAGCCCTAGCAGGAGTACACCTCTTATTCCCTTCATGAAACAGGAT	15650
kara	-----CTCCTGTTCTTCAAGAAACAGGAT	25
	* * * * *	
po	CCAATAACCCCTCAGGAGTGGTATCCAACCTCAGACAAAATCCCATTTCACCCTACTACTACA	15731
asl	CTAATAACCCCTCAGGAATGGTATCTGACTCAGATAAAATTCATTCCATCCATACTACTATA	15680
h1	CTAACAAACCCCTCAGGAATTCATCTGACTCAGACAAAATCCCCTTCCACCCTACTACTATA	15728
ct	CTAACAAACCCCTCAGGAATTCATCTGACTCAGACAAAATCCCCTTCCACCCTACTACTACA	15747
par	CTAATAACCCCTCAGGAATTCGGAATCTCCTCAACTCAGACAAAATCCCATTCCACCCTACTATA	15655
aj	CCAATAACCCCTCAGGAATTCATCTGACTCAGACAAAATTCATTTCACCCTACTACTACA	15733
pc	CTAACAAACCCCTCAGGAATTCATCTGACTCAGACAAAATCCCATTTCATCCATACTACTACA	15698
fc	CTAACAAACCCCTCAGGAATTCATCTGACTCAGACAAAATCCCATTTCACCCTACTACTATA	15710
kara	CTAACAAACCCCTCAGGAATTTATCTTAATTCAGATAAAATTCCTTCCACCCTACTACTACA	85
	* * * * *	
po	CAATCAAAGATATCCTGGGCCTCCTAGTACTAATCCTAATACTCATGCTACTCGTCTCTAT	15791
asl	CAATCAAAGATATCCTAGGCCTTCTAGTACTATCC---ACACTCACACTACTCGTCTCTAT	15737
h1	CAATCAAAGACATCTTAGGCCTCCTAGTACTAATCTTACACTCATACTGCTCGTCTCTAT	15788
ct	CAATCAAAGACATCCTAGGTCTCCTAGTATTAATTTCTAACACTTATATTGCTCGTCTCTAT	15807
par	CAATTAAGGATATCTTAGGCCTCTTAGTGCTAGTTTAACTACTACTACTCGTCTCTAT	15715
aj	TAATCAAAGACATCTTAGGTCTCCTAATACTAATTTAACTACTACTACTCGTCTCTAT	15793
pc	CAACCAAAGACATCTTAGGTCTCCTAGCATTAACTTAACTACTACTACTCGTCTCTAT	15758
fc	CAATCAAAGACATCCTAGGTCTCCTAGTACTAGTTTAACTACTACTACTCGTCTCTAT	15770
kara	CAATCAAAGACATCTTAGGTCTCCTAGTATTAATTTAACTACTACTACTGTCCTAT	145
	* * * * *	
po	TTCACCAGACCTACTAGGAGACCCCGATAACTATACCCCGCCAACCCCTAAACACCC	15851
asl	TTCACCAGACCTATTAGGAGATCCCGATAACTATACCCCGCCAATCCTTAAGCACCC	15797
h1	TTCACCAGACCTGTTAGGAGACCCGGACAATTATATCCCGCTAACCCCTAAGTACTC	15848
ct	TTCACCAGACCTGCTAGGAGACCCAGACAATTACATTCCTGCCAACCCCTAAATACCC	15867
par	TTCACCAGACCTGCTAGGAGACCCAGACAACCTACATCCCGGCCAACCCCTCTAAATACCC	15775
aj	TTCACCAGACCTGTTAGGAGATCCAGACAACCTACATCCCGGCCAACCCCTAAACACTC	15853
pc	TCTTACCAGATATATTAGGAGACCCAGACAACCTACATCCCGGCCAACCCCTAAATACTC	15818
fc	TTCACCAGACCTGCTAGGAGACCCAGACAACCTACATCCAGCCAACCCCTTAAATACCC	15830
kara	TTCACCAGATCTATTAGGAGACCCAGACAACCTACAACCCGCCAATCCTCTAAATACCC	205
	* * * * *	
po	CTCCCCAATCAAACCCGAATGATATTTCTATTTCGCATACGCAATCCTCCGATCTATTTC	15911
asl	CTCCCCATATCAAACCTGAATGGTACTTCTTATTTCGCATATGCAATCCTCCGATCTATTTC	15857
h1	CTCCCCATATTAAGCCCGAATGGTACTTCTTATTTCGCATATGCAATCCTCCGATCCATTC	15908
ct	CTCCCCATATTAACCTGAGTGGTACTTCTTATTTCGCATACGCAATCCTCCGATCCATTC	15927
par	CTCCCCATATTAACCCGAATGATACTTCTTATTTCGCATACGCAATCCTCCGATCCATTC	15835
aj	CTCCCCATATTAACCCGAATGATATTTTATTTCGCATACGCAATCCTCCGATCCATTC	15913
pc	CCCCTCATATCAAACCCGAATGATACTTCTTATTTCGCATATGCAATCCTCCGATCCATTC	15878
fc	CTCCCCATATTAACCTGAATGATACTTCTTATTTCGCATACGCAATCCTCCGATCCATTC	15890
kara	CTCCCCAATCAAACCCGAATGATATTTCTAT-----	238
	* * * * *	

Bu çalışmada bulunan karakulak malgorzata bölgesi genleri ile diğer kedilere ait genler incelendiği zaman birçok noktada dizilerin farklılaştığı gözlenmektedir. Karakulak dizilerindeki bazı bazların da sadece karakulakta olduğu Tablo 5.3.'de ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir. Tablo 5.3.'de yer alan bilgiler kullanılarak Tablo 5.4. oluşturulmuştur. Tablo 5.4.'te ki bilgiler Tablo 5.3.'de yer alan bilgilerden rastgele seçilmiştir. Tablo 5.4. incelenirken kedi filogenetiği soy ağacı dikkate alınmalıdır.

Tablo 5.4. Karakulak mtDNA *sitokrom-b* geni Malgorzata bölgesi gen dizisinin diğer kedi soylarına ait Malgorzata bölgesi DNA dizileri ile karşılaştırması. Karşılaştırma sonucunda elde edilen nükleotid benzerlikleri – farklılıkları ve baz sırası.

	3.BAZ	5.BAZ	14.BAZ	30.BAZ	45.BAZ	138.BAZ
OCELOT SOYU	T	A	T	T	C	C
FELİS SOYU	C	A	T	C	T	C
PANTHERA SOYU	C	A	T	T	G	C
PANTHERA SOYU	C	A	T	T	G	C
CARACAL SOYU	C	G	C	C	T	T
BAY CAT SOYU	C	A	C	C	T	C
PUMA SOYU	C	A	C	T	C	C
LYNX SOYU	C	A	C	C	C	C
PUMA SOYU	T	A	C	C	C	C

mtDNA kontrol bölgesi geni ve *sitokrom-b* geninden elde edilen karakulak DNA dizileri Tablo 5.1. ve Tablo 5.3.'de olduğu gibi diğer kedi soyları ile kıyaslanmıştır. Bu karşılaştırmalar sonucunda soy ağacında *Caracal* soy hattına yakın olan soy hattında ki kediler ile baz olarak benzerlikleri mevcuttur. Tablo 5.2. ve Tablo 5.4. incelendiği zaman bazı kedi soylarında iki ayrı kedinin örneği görülmektedir. Tablo 5.2.'de *panthera* soy hattındaki kediler (*Panthera onca*, *Panthera leo*) incelendiği

zaman rastgele gösterilen 6 tane bazda benzerliklerinin olduğu gözlenmektedir. Yine Tablo 5.4.'de puma soy hattından iki kedinin (*Puma concolor*, *Acinonyx jubatus*) *sitokrom-b* dizilerine bakıldığı zaman birçok yerde bu soy hattında baz açısından benzerliklerin olduğu gözlenmektedir.

Johnson ve arkadaşlarının 2006 yılında yayınlamış olduğu çalışmadaki kedi türleri arasındaki filogenetik ilişkinin gösterildiği soy ağacında puma soyu evrimini tamamladıktan sonra *lynx* soyunun evrimini tamamladığı görülmektedir. Dolayısıyla bu evrim ağacında puma ve *lynx* soylarının yeri ağaçta peşpeşe gelmektedir. Tablo 5.2.'de ki CR4 dizileri bu peşpeşe gelen soy hatları için incelendiği zaman puma ve *lynx* soyunda bulunan bireylerin CR4 bölgelerinde de birçok bazda benzerliklerinin olduğu gözlenmiştir.

Yine evrim ağacı incelendiği zaman *lynx* soy hattı ve *ocelot* soy hattı ağaçta altalta olduğu görülmektedir. *Lynx* ve *ocelot* soy hattında bulunan bireylerin CR4 dizilerindeki bazlar Tablo 5.2.'de incelendiği zaman yine bu iki soy hattında bulunan kedi türlerinde de benzerliklerin olduğu gözlenmektedir.

Evrin ağacına göre Caracal soy hattına yakın olan kedi soyları; *Ocelot*, *Bay cat*, *Panthera* ve *lynx* soylarıdır. Hem *sitokrom-b* dizilerinin bulunduğu Tablo 5.4. hem de CR4 dizilerinin bulunduğu Tablo 5.2. incelendiği zaman karakulağın bu çalışmada bulunan *sitokrom-b* dizileri ve CR4 dizileri bu 4 soy hattında ki kediler ile birçok yerde benzediği gözlenmiştir.

Bu tez çalışması ile bulunan karakulak malgorzata gen dizileri laboratuvarında eş zamanlı yapılan vaşak çalışması ile bulunan vaşak mtDNA *sitokrom-b* geni malgorzata bölgesi genleri ile kıyaslanmıştır. Bu kıyaslanmanın amacı kediler arasında herhangi bir kontaminasyonun yaşanıp yaşanmadığını kontrol etmektir.

Tablo 5.5. Karakulak malgorzata bölgesi ve laboratuvarında çalışması yapılan vaşakların malgorzata bölgelerinin karşılaştırması k.kulak: karakulak malgorzata bölgesi, kars: Kars vaşak çalışması malgorzata bölgesi, antalya: Antalya vaşak çalışması malgorzata bölgesi kısaltmaları kullanılmıştır.

k.kulak	-----CTCCTGT
kars	-----GCAGGAGTACACTTCCTAT
antalya	-----TCTCAGCCTTAGCAGGAGTACATATCTCAGCCTTAGCAGGAGTACACCTCCTAT
	**** *
k.kulak	TTCTTCACTGAAACAGGATCTAACAAACCCTCAGGAATATATCTAATTCAGATAAAATTC
kars	TCCTCCAAGAAACAGGATCTAACAAACCCTCAGGAATCACATATGACTCAGACAAAGTCC
antalya	TCCTCCAAGAAACAGGATCTAACAAACCCTCAGGAATCACATCTGACTCAGACAAAGTCC
	* ** * ***** * ** * * ***** ** * *
k.kulak	CATCCACCATACTACAACTCAAGGACATCTTAGGCTCTCCTAGTATTAATTTAACAC
kars	CCT-----TATACTATACTCAAGGACATCTTAGGCCTCCTAGTACTAATCTTTATAC
antalya	CCTCCACCATACTATACTCAAGGACATCTTAGGCCTCCTAGTACTAATCTTTATAC
	* * ***** ***** ***** * ** ***** ***** * * **
k.kulak	TCATACTACTTGTCTCTATTTCACCAGATCTATTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCG
kars	TCATACTGCTCGTCTCTATTCTCACCAGACCTGT TAGGAGACCCGGACAAATTATATCCCG
antalya	TCATACTGCTCGTCTCTATTCTCACCAGACCTGT TAGGAGACCCGGACAAATTATATCCCG
	***** * * ***** ***** ***** * ** ***** ***** * * *****
k.kulak	CCAACTCTTAAATACCCCTCCCACTAAGCCCGAATGATATTCCTAT-----
kars	CTAACCCCTAAGTACTCCTCCCACTAATAGCCCGAATGGTACTTCTTAT-----
antalya	CTAACCCCTAAGTACTCCTCCCACTAATAGCCCGAATGGTACTTCTTAT-----
	* ** * ***** * ** ***** ***** * ** *****

Tablo 5.5. ayrıntılı bir şekilde incelendiği zaman laboratuvarında eş zamanlı yapılan vaşak çalışması ile karakulak çalışmasında elde edilen verilerin kontaminasyonu görülmemektedir. Karakulağın birçok bazda vaşaklardan ayrıldığı görülmektedir. Bu çalışma ile bulunan karakulak malgorzata bölgesine ait genlerin sadece karakulağa ait olduğu Tablo 5.5.'de yer alan karşılaştırma ile tekrardan ispat edilmiştir.

Karşılaştırmalar sonucunda Johnson ve arkadaşlarının 2006 yılında yayınlamış olduğu çalışmadaki kedi türleri arasındaki filogenetik ilişkinin gösterildiği soy ağacında karakulağa yakın olan *Ocelot*, *Panthera*, *Lynx* ve *Bay cat* soylarına ait kediler ile baz benzerliklerinin olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar dikkate alındığı zaman karakulak ile karakulağa evrim acağında en yakın olan *Ocelot* soy hattına ait birey ile *Bay cat* soy hattına ait birey arasında benzerliklerin olması beklenmiştir ve çalışma sonucunda bu benzerlikler bulunmuştur.

Bu çalışma ile Türkiye’de ve Dünya’da karakulağa ait mtDNA *sitokrom-b* genine ait 286 bç, kontrol bölgesi genlerine ait CR4 bölgesinin tamamı 182 bç, CR3 bölgesine ait 145 bç bulunmuştur. Çalışma sonunda karakulağın mtDNA genomuna 613 bç’lik bölgenin bulunmasıyla genom bilgisine destek olunmuştur.

Evrin ağacı ile kediler arasındaki ilişkinin tam olarak incelenebilmesi için bu çalışmada bulunan bilgilerin genişletilip daha uzun mtDNA dizilerinin belirlenmesi ve diğer kediler ile kıyaslanması gerekmektedir.

Bu çalışma Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAPK) tarafından (Proje no: 2015-50-01-12) desteklenmiştir. Desteğinden ötürü Sakarya Üniversitesi BAPK’ya teşekkürlerimi sunarım.

KAYNAKLAR

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., Hücrenin Moleküler Biyolojisi, 4. Baskı, Buyru, N., Alay, N., Özgüç, M., Öztürk, M., Sakızlı, M. 2002-2008. Garland Science-Ankara Tüba, 809-813, New York-Ankara.
- Aldemir, O. S., Uçan, U. S., 2001. Polimeraz zincir reaksiyonu, temel prensipler. Hayvancılık Araştırma Dergisi., 11 (1): 53-59.
- Avenant, N, L., John, R., Martins, Q., Drouilly, M., Thorn, M., Neils, A., Power, R, J.2017. A conservation assessment of *caracal caracal*, The Red List Of Mammals Of South Africa.
- Avenant, N. L., Nel, J. A. J. 1998. Home – range use, activity and density of caracal relation to prey density. African Journal of Ecology., 36: 274 – 59.
- Avgan, B., Raza, H., Barzani, M., Breitenmoser, U. 2016. Do recent leopard *Panthera pardus* records from northern Iraq and south - eastern Turkey reveal an unknown population nucleus in the region?. Journal Zoology in the Middle East , 62:13-20. Türkiye.
- Avgan, B., Zimmermann, F., Guntert, M., Arikan, F., Breitenmoser, U. 2014. The first density estimation of an isolated Eurasian lynx population in southwest asia, Wildlife Biology (Doi: 10.2981/Wlb.00025).
- Avise, J. C. 1994. Molecular markers, natural history & evolution. London: Chapman&Hall.
- Avise, J. C. 2000. Phylogeography: the History and Formation of Species. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Beaumont, M. A., Bruford, M. W. 1999. Microsatellites in conservation genetics. In microsatellites evolution and applications , 165 – 182 . New York : Oxford University Press.
- Bernard, R. T. F. 1987. Reproduction of the caracal *felis caracal* from the cape province of south Africa.
- Birren, B., Eric, L. 1993. Pulsed Field Gel Electrophoresis: A Practical Guide, Academic Press Inc. San Diego, California.
- Çetinkaya, E., Ayhan, K. 2012. Mikrobiyolojide kullanılan bazı moleküler teknikler.

- Cömert, N., Carli, O., Dinçtürk, H, B. 2018. The missing lynx of eurasia at its southern edge: a connection to the critically endangered balkan lynx, Mitochondrial DNA Part A, Doi : 10.1080/24701394.
- Demirsoy, A., Yaşamın Temel Kuralları, Omurgalılar/ Amniyota (Sürüngenler, Kuşlar ve Memeliler, Cilt 3, Kısım 2, Beşinci Baskı, Meteksan A.Ş. Baskı, 768, Ankara, 2003.
- Eggert, L, S., Maldonado, J, E., Fleischer, R, C. 2005. Nucleic acid isolation from ecological samples-animal scat and other associated materials, Methods Enzymol 395: 73-87.
- Gugolz, D., Bernasconi, V, M., Breitenmoser-Würsten, C., Wandeler. 2008. Historical DNA reveals the phylogenetic position of the extinct alpine lynx, Journal Of Zoology (Doi:10.1111/J.1469-7998.2008.00428.X), 275(2):201-208.
- Hassan, Y. 2015. Conservation Biology of the Caracal (*Caracal caracal*) in Iran: action plan and conservation genetics. Lisbon Üniversitesi , Fen Bilimleri Fakültesi , Hayvan Bilimleri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Hepcan, Ş., Hepcan, Ç. C., Bouwma, I. M., Jongman, R. H. G., Özkan, M. B. 2018 Ecological networks as a new approach for nature conservation in Turkey: a case study of İzmir province, Landscape And Urban Planning, 12 : 3- 6, İzmir.
- Hepcan, Ş., Hepcan, Ç. C., Bouwma, I. M., Jongman, R. H. G., Özkan, M. B. 2008. Ecological networks as a new approach for nature conservation in Turkey: A case study of Izmir province. Landscape and Urban Planning. 25: 30- 42.
- İlemin, Y., Gürkan, B. 2010. Status and activity patterns of the caracal, *Caracal caracal* (schreber, 1776), in Datça and Bozburun peninsula, Southwestern Turkey, Zoology In The Middle East , 50: 3 – 10 , Ankara .
- Janczewski, D. N., William, S. M. J., Claiborne, S., O'Brien, S. J. 1995. Molecular evolution of mitochondrial 12S RNA and cytochrome b sequences in the pantherine lineage of felidae. Molecular Biology and Evolution. 12(4):690 – 707.
- Johnson, E. W., Eizirik, E., Pecon-Slattey, J., Murphy, J. W., Antunes A., Teeling, E., O'brien, J. S. 2006. The late miocene radiation of modern felidae : A Genetic Assessment, Science, 311(5757): 73-77.
- Karaelmas Fen Ve Mühendislik Dergisi , Karaelmas Science And Engineering Journal., 2 (1), 53-62.
- Lopez, J, V., Cevario, S., O'brien, S, J. 1996. Complete nucleotid sequences of the domestic cat (felis catus) mitochondrial genome and a transposed mtDNA tandemrepeat in thenuclear genome, Genomics, 33: 229-246.
- Melville, H, I., Michael, G., L., M. Bothma, J. 2004 . Prey selection by caracal in the Kgalagadi Transfrontier Park, African Journal of Wildlife Research, 34(1):67-75.

- Natonek-wisniewska, M. 2009. Species identification of Felinae DNA based on analysis of *cytochrome-b*, Ann. Anim. Sci., 9(4): 379–383.
- Nowell, K., Jackson, P. 1996. Wild Cats: Status Survey And Conservation Action Plan, Gland Switzerland : IUCN.
- O'brien, J. S., Johnson, E. W. 2007. The Evolution Of Cats, Scientific American (Doi:10.1038/Scientificamerican0707-68), 296: 68-75.
- O'brien, S, J., Johnson, W, E. 2005. Big Cat Genomic, 6:407 – 429.
- Osmanağaoğlu, A., Kıran, F., Oral, B. 2010. Laktik asit bakterilerinin 16S rDNA sekans analizi ile tanımlanması, Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu, Ankara Üniversitesi, Ankara, 28 s.
- Panasci, M., Ballard, B. W., Breck, S., Rodriguez, D., Densmore, D. L., Wester, B.D., Baker, J. R. 2011. Evaluation of fecal DNA preservation techniques and effects of sample age and diet on genotyping success, Journal Of Wildlife Management 75(7):1616-1624.
- Plessis, J., 2014. Rooijakkals-en rooikat- bestuur en die rol van predatore in ekosistiem. Culna 69: 11-13. Sambrook, J., Fritsch, F.E., Maniatis, T. 1989. molecular cloning: a laboratory manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 14.19, New York.
- Sapozhenkov, Y. F. 1960. Caracal around repetek. Priroda, 2: 107 – 108.
- Selkoe, K. A., Toonen, R. J. 2006. Microsatellites for ecologist : a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. Ecology Letters., 9: 615 – 629.
- Singh, R., Qureshi, Q., Sankar, K., Krauman, P, R., Goyal, S, P. 2014. Population And Habitat Characteristics Of Caracal In Semi-Arid Landscape, Western India, Journal Of Arid Environments, 103: 92-95.
- Stuart, A., Trever, C. 1982. Aspect of the Biology of the Caracal (Felis caracal, Schreber, 1776) in the Cape Province, South Africa. M.S. Thesis. University of Natal. 12: 345-357.
- Sunquist, M., Sunquist, F. 2002. Wild Cats Of The World, Chicago: The University Of Chicago Press, Pp: 452.
- Topal, A. 1999. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler/ DNA'nın Analizi, Nobel Tıp Kitapevleri, 33-39, İstanbul.
- URL 1: <https://tr.pinterest.com/acara72/caracal>, Erişim Tarihi: 12.05.2016.
- URL 2: <http://www.tramem.org/memeliler/?fsx=2fsdl15@d&idx=418#>.
WznWQrkUPY Erişim Tarihi : 27.05.2018.
- URL 3: <http://www.tramem.org/memeliler/?fsx=2fsdl15@d&idx=3988#>.
WznW6rkUIPY Erişim Tarihi: 17.07.2015.
- URL 4 <http://www.tramem.org/memeliler/?fsx=2fsdl15@d&idx=575#>.
WznXNrKUIPY Erişim Tarihi : 24.03.2017.

URL 5 <http://yurdanurduman.blogspot.com/2010/10/antalyann-karakulag-ve-yaban-hayat.html> Erişim Tarihi: 17.06.2016.

ÖZGEÇMİŞ

Betül Kocaman, 14.04.1991'de Mersin'de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Kocaeli'nde tamamladı. 2009 yılında Körfez Atatürk Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. 2009 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başladığı lisans eğitimini 2013 yılında tamamladı. Eylül 2013 tarihinde Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.