

ATLARDA PROTEAZ İNHİBİTÖR SİSTEM POLİMORFİZMİ

Çiğdem ALTINSAAT¹

Ahmet KOPAR²

Protease inhibitor system polymorphism in horses

SUMMARY

A total of 85 Arabian and 104 Thoroughbred horse were examined in respect to protease inhibitor phenotypes by acid gradient polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). A combination of protein, antitrypsin and antichymotrypsin staining were performed after gradient polyacrylamide gel electrophoresis .

Thirtyfive phenotypes arising from twelve alleles namely Pi^F, Pi^G, Pi^I, Pi^L, Pi^{L2}, Pi^{L*}, Pi^N, Pi^P, Pi^S, Pi^T, Pi^U, Pi^Z were recognized in the course of this study. The gene frequencies of the alleles were calculated. Gene frequencies of variant Pi^L (0.418) in Thoroughbreds and Pi^U (0.357) in Arab horses were discovered to be the highest. Pi^P and Pi^Z in Thoroughbreds, Pi^{L*}, Pi^N, Pi^T in Arabs were not observed in this population.

KEY WORDS: Horse, protease inhibitor system, polymorphism

ÖZET

Bu çalışmada poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yöntemi ile 85 Safkan Arap ve 104 Safkan İngiliz atında proteaz inhibitör (Pi) sistemine ait fenotipler belirlenmiştir. Elektroforez işleminden sonra jeller protein ve antitripsin, antikemotripsin boyama metodu ile boyanmıştır.

Pi^F, Pi^G, Pi^I, Pi^L, Pi^{L2}, Pi^{L*}, Pi^N, Pi^P, Pi^S, Pi^T, Pi^U, Pi^Z olmak üzere 12 allel ile kontrol edilen 35 fenotip saptanmış ve gen frekansları hesaplanmıştır. Allel gen frekansı Safkan İngiliz at ırkında Pi^L (0.418), Safkan Arap atlarında ise Pi^U (0.357) allellerinde en yüksek olarak saptanmıştır. Safkan Arap atlarında Pi^{L*}, Pi^N, Pi^T, Safkan İngilizlerde ise Pi^P ve Pi^Z allellerine rastlanmamıştır.

ANAHTAR KELİMELEER: At, proteaz inhibitör sistemi, polimorfizmi

GİRİŞ

Prealbumin terimi ilk kez insan kan serumunda alkali nişasta jel elektroforezinde albumine doğru göç eden protein kesimi için kullanılmıştır (Smithies 1955). Gahne (1966) ve Braend (1967)'in asidik nişasta jel elektroforezi ile atların kan serumunda anoda doğru albuminden daha hızlı göç eden protein hatlarını saptaması ile Pr olarak simgelenen prealbumin sistemi ortaya konmuştur. Antitripsin aktivitesi elektroforetik mobilitesi ve moleküler ağırlığı (60 000) göz önüne alındığında bu proteinin insan proteaz inhibitör (Pi) proteini ile benzerlik gösterdiği bildirilmektedir (Ek 1977).

Braend (1967), bu protein sisteminde Pr^F, Pr^I, Pr^L, Pr^S olmak üzere 4 kodominant otozomal allel tarafından kontrol edilen 8 prealbumin fenotipi bildirmiştir. Daha sonra Pr^N, Pr^T, Pr^U, Pr^W allellerinin saptanmasıyla toplam 27 fenotip kaydedilmiştir (Braend 1970). Yapılan çalışmalarda prealbumin sisteminin, atlarda genetik polimorfizmin belirlenerek

parentajın saptanmasında en duyarlı ve güvenilir sistem olduğu ve tekrarlanabilir sonuçlar verdiği vurgulanmaktadır (Scott 1977). Bu sistem daha sonra Pr yerine Pi olarak sembolize edilmeye başlanmıştır (Juneja ve ark 1979, Pollitt ve Bell 1980). Bell ve ark. (1984) ise, çalışmalarında poliakrilamid jel elektroforezinden sonra jelin tripsin ve kemotripsin inhibisyonu için kullanılan boyama yöntemi ile Pi lokusundaki H, J, K, O, P, Q, R, V, X ve Z allelerini saptamışlardır.

Günümüzde at sportif yönden önemini ve güncelliğini korumakta ve bu önem ülkemizde gittikçe artmaktadır. Türkiye'de bu amaçla safkan Arap ve İngiliz atı yetiştiriciliğine devam edilmektedir. İstenilen vasıflarda at elde etmek için kontrollü yetiştiricilik yapılması, genetik karakterlerin belirlenmesi ve soy kütükleri kaydının tutulması gerekmektedir.

Genetik işaretleyicilerden, kan grubu sistemlerinin ve hemoglobin, albumin, transferrin, esteraz, prealbumin sistemi, eritrosit enzimleri gibi proteinlerin genetik polimorfizminin birlikte değerlendirilmesi,

1: A.Ü. Veteriner Fakültesi, ANKARA

2: Etlük Vet. Kont. Arş. Enst., ANKARA

parentaj testinden elde edilen sonuçlardaki doğruluk payının artmasını sağlar. Bu polimorfik sistemlerden bazıları, ülkemizde safkan atların parentaj kontrolü için değerlendirmeye alınmasına rağmen, Türkiye'deki at ırklarının prealbumin sistemi ile ilgili olarak yapılmış çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada; parentaj testinde değerlendirmeye alınan serum proteinlerinden biri olan ve elektroforezde albuminden daha hızlı göç eden polimorfik sistemler içinde allel sayısı en fazla olması bakımından en güvenilir serum proteini olarak nitelendirilen proteaz inhibitör sistemine ait fenotiplerin ortaya konulması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Araştırmada proteaz inhibitör sistemi polimorfizmini incelemek için Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'na bağlı Tarım İşletmelerinde yetiştirilen 85 Arap, 104 İngiliz atı kullanılmıştır.

Her atın vena jugularisinden alınan 5 ml kan 3000 g. 10 dakika santrifüj edildikten sonra serumları ayrılmış ve kullanılıncaya kadar -20°C de saklanmıştır.

Asidik horizontal nişasta jel elektroforezi için %11.6 nişasta pH 4.5 olan jel tampon solüsyonu (0.005 M sitrik asit, 0.2 M tris) ile hazırlanarak 26x18.5 boyutlarındaki cam plakalar üzerine dökülmüş ve +4°C'de bekletilmiştir. Elektrot solüsyonu olarak da 0.03 M borik asit ve 1M NaOH pH 7.4 olacak şekilde ayarlanmış ve tanklara doldurularak kullanıma hazır hale getirilmiştir. Serum örnekleri oda ısısında çözdürüldükten sonra Whatmann No:7 filtre kağıdına emdirilerek jel üzerinde katoda 5.5 cm. kadar uzaklıkta yerleştirilmiştir. Elektroforez işlemi, 5°C'de 150 V'da yürütülmüş ve numune emdirilmiş kağıtlar 30 dakika sonra uzaklaştırılmıştır. Daha sonra borat çizgisi 7.5 cm. kadar ilerleyene dek elektroforez işlemine 400 V'da devam edilmiştir (Trommerhausen-Smith ve Suziki 1978).

Prealbumin sisteminde polimorfik lokusların belirlenmesi için ince tabaka poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) Pollitt ve Bell (1980)'in bildirdiği yöntemle hazırlanmıştır. Bu amaçla, 72.75 gr. akrilamid, 180 gr. bis-akrilamid, 2.5 gr. ambellite MB-1 (Sigma) ile 100 ml. distile suda eritilmiş, bir saat sonra Whatmann No:1 filtre kağıdından süzülerek, distile su ile toplam hacim 250 ml.'ye tamamlanmış ve stok akrilamid çözeltisi olarak +4°C'de saklanmıştır.

Poliakrilamid jel elektroforezi ise 29 x 24 cm lik cam plakalara akrilamid ana solüsyonu jel tampon solüsyonu ile %10, %8, % 4 olmak üzere üç ayrı konsantrasyonda hazırlanan poliakrilamid tabakalar oluşturacak şekilde dökülmüş ve jelin donması için bir süre beklenmiştir. Jelin oluşturulmasında 1.24 gr. L-histidine, 2 mg. riboflavin, 1mg. sitrik asit, 1.20 ml. TEMED (N,N,N,N-tetramethyl-ethylendiamine) ve HCl pH 4.6 olacak şekilde ayarlanmış jel tampon solüsyonu olarak kullanılmıştır. Elektrod çözeltileri ise; katod çözeltisi 3.8 gr. MES [2-[N- morpholino] ethane sulfonic acid], 1.5 gr. L-histidin, 0.1 ml. %1'lik bromo

fenol mavisi ile pH 5.8, anod çözeltisi; 12.8 gr. L-histidin, 6.3 ml. saf HCl ile karıştırılarak toplam hacim distile su ile 1 litre olacak şekilde hazırlanmıştır (Ek ve Braend 1984). Serum örnekleri; oda ısısında çözdürüldükten sonra 0.3x0.4'lük boyutlarda hazırlanan Whatmann No:3 filtre kağıtlarına emdirilerek jel üzerinde %4'lük akrilamid içeriği olan tabakanın ortasına sırasıyla yerleştirilmiştir.

PAGE elektroforezi için güç kaynağı (Consort E 734) başlangıçta 400V, 19 W akım ise 50 mA olacak şekilde ayarlanmış ve 2°C'lık ısı altında işleme 30 dak. devam edilmiştir. Bu aşamada serum emdirilmiş kağıtlar uzaklaştırılmış ve elektroforez işlemine, albumin hattı %8- %10'luk jel hattına ulaşana kadar 4.5-5 saat devam edilmiştir.

Jeldeki bantların boyama işlemi Coomasie blue G250 ve perklorik asit ile protein boyama (Holbrook ve Leaver 1976) ve tripsin-kemotripsin inhibisyonu (Uriel ve Berges 1968) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Okuma ve bantların değerlendirilmesi amacıyla her jelde Cordoba Üniversitesi Veteriner Fakültesi Kan Grupları laboratuvarından sağlanan referans serumlar kullanılmıştır.

Gen frekanslarının belirlenmesinde gen sayım metodu kullanılmıştır (Jamieson 1965).

BULGULAR

Şekil 1' de aynı poliakrilamid jel üzerinde, aynı şartlarda koşturulan serumların protein (üst) ve anti-tripsin boyama (alt) yöntemiyle oluşan proteaz inhibitör tiplerini göstermektedir. Anti-tripsin boyama ile hazırlanan jelde bantlar kırmızı arka alan üzerinde boya almayan bölgeler şeklindedir. Bu bölgeler protein bantlarındaki anti-tripsin etkinlik nedeniyle tripsinin kromojenik substratla karşılaşmasının engellenmesiyle oluşmuştur. Anoda doğru hareket eden bantlar, jel üzerinde koşturulan standart numunelere göre katettikleri mesafe gözönüne alınarak değerlendirilmiştir.

Çalışmada kullanılan Safkan İngiliz ve Safkan Arap ırkı için gözlenen proteaz inhibitör lokusunda bulunan allellere ait gen frekansları, Tablo-1'de gösterilmiştir.

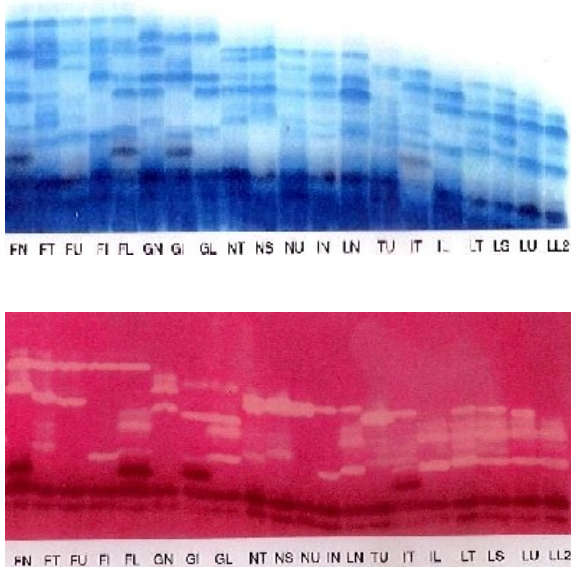
Buna göre Safkan İngiliz atlarında Pi^L alleli en yüksek frekansı (0.418) göstermiştir. Bu ırkta, Pi^P ve Pi^Z allellere rastlanmazken, bu allellerin Arap atlarında frekansı sırasıyla 0.029, 0.014 olarak gözlemlenmiştir.

Safkan Arap atlarında ise Pi^U alleli gen frekansı 0.357, Pi^S alleli gen frekansı 0.243 olarak bulunmuştur. Bu ırkta Pi^U ve Pi^S, diğerlerine göre görülme sıklığı en yüksek olan iki allel olarak belirlenmiştir. Safkan İngiliz atlarında ise bu iki allelin gen frekansı oldukça küçüktür (Pi^U 0.112, Pi^S 0.033).

Çalışmada kullanılan Arap atı popülasyonunda Pi^{L*}, Pi^N, Pi^T allelleri görülmemiştir.

Tablo 1. Safkan Arap ve İngiliz Atlarında Proteaz İnhibitör Sistemi Allellerinin Gen Frekansları
Table 1. Gen Frequencies of Protease Inhibitor Types in Thoroughbred and Arab Horses

	Prealbumin Allelleri											
	Pr ^F	Pr ^G	Pr ^I	Pr ^L	Pr ^{L2}	Pr ^{L*}	Pr ^N	Pr ^P	Pr ^S	Pr ^T	Pr ^U	Pr ^Z
Safkan Arap n=85	0.029	0.057	0.071	0.186	0.014	-	-	0.029	0.243	-	0.357	0.014
Safkan İngiliz n=104	0.041	0.038	0.084	0.418	0.003	0.005	0.231	-	0.033	0.035	0.112	-



Şekil 1. Protein ve Anti-Tripsin boyama yöntemiyle poliakrilamid jel üzerinde oluşan proteaz inhibitör tipleri

Fig 1. Protease inhibitor system types on polyacrylamide gel stained with protein and anti trypsin staining methods

TARTIŞMA ve SONUÇ

Proteaz inhibitör sistemi, atlarda bu lokusu determine eden allel sayısının fazla olması nedeniyle soy testinde değerlendirilen diğer polimorfik sistemler arasında en karışık protein sistemidir ve bu testte değerlendirildiğinde tek başına testin güvenilirliğini arttırdığı bildirilmektedir (Scott 1977). Yapılan çalışmalarda, anoda doğru ilerleyen bu protein bantlarındaki ortak özelliğin proteaz inhibitör etkinliği olduğu saptanmış ve bu sistem proteaz inhibitör (Pi) sistemi olarak adlandırılmıştır (Ek ve Braend 1984, Michie ve Reid 1968, Politt ve Bell 1983 a,b).

Bu proteinin poliakrilamid jel üzerinde asidik nişasta jel üzerindeki benzer şekilde desen oluşturduğu, ancak numunelerin uygulandığı yerden yaklaşık 6 cm kadar uzaklıkta ayrıştığı ve bu nedenle hızlı göç eden esteraz bantlarını okunmaz kıldığı için

bantların okunmasını kolaylaştırdığı görülmüştür. Dolayısıyla daha iyi bir ayrışım sağlanmış ve ayrıntılı olarak belirlenebildiği gözlenmiştir (Patterson ve ark. 1990).

Çalışmada, Safkan İngiliz atlarında en sık rastlanılan varyantın Pr^L (0.418) olduğu saptanmıştır. Bu değer, literatürde bildirilenlerle uyum göstermektedir. Pr^U allel frekansında iki ırk arasında farklılık olduğu saptanmış, görülme sıklığının Safkan Arap atlarında 0.357, Safkan İngiliz atlarında ise 0.112 olduğu belirlenmiştir. Yine prealbumin tiplerden Pr^F ve Pr^G frekansları arasında farklılık olduğu görülmüştür. Pr^N allelinin Safkan İngiliz atlarında daha sıklıkla ortaya çıkmış (0.231) ancak, Safkan Arap atlarında hiç rastlanmamıştır. Bu sonuca bağlı olarak diğer polimorfik lokuslarda (örn: Tf^F, Es^I) olduğu gibi bazı tipleri belli ırklar için spesifik kabul etmek pek doğru değildir. Pr^S, gen frekansının ise Safkan Arap atlarında daha yüksek (0.243) olduğu görülmüştür. Bu bulgu ile literatür bilgileri paralellik içindedir (Bowling ve Clark 1985, Rodriguez ve Aguilar 1992).

Bowling ve Clark (1985)'in, Amerika'daki yedi ırk at üzerinde yaptıkları çalışmada Safkan İngiliz atlarında T ve Z allelerine rastlamazken, L, N ve U allel frekanslarını sırasıyla 0.461, 0.173, 0.122 olarak bildirmişlerdir. Çalışmadaki aynı ırk at populasyonuna ait sonuçların, bu bildirimlerle benzerlik gösterdiği ancak T allelinin (0.035) gözlenmesi bir farklılık olarak göze çarpmaktadır. Yine aynı çalışmada kullanılan Arap atı populasyonunda bu populasyondakine benzer şekilde T genine rastlanmazken, en yüksek gen frekansının L alleleine ait olduğu (0.350), U (0.170) ve S (0.140) gen frekanslarının izlediği görülmektedir. Bu çalışmadaki Arap atı populasyonunda ise gen frekansları U (0.357), S (0.243) ve L (0.186) olarak sıralanmaktadır.

Polonya'daki Arap atlarında (Zurkowski ve Kuryl 1992), belirlenen W (0.003), N (0.008), Bowling ve Clark (1985)'in bildirdiği N (0.01) allellerine bu populasyonda rastlanmaması, Scott (1977) 'in 0.160 olarak bildirdiği F allel frekansının bu populasyonda 0.029 olarak bulunması diğer Arap atı populasyonları ile olan başlıca farklılıktır.

Safkan Arap at ırkında en düşük gen frekansıyla kendini gösteren Pi^{L2} (0.014) ve Pi^Z (0.014) allelleri ise Safkan İngiliz atlarında Pi^L (0.003) olarak gözlenmiş, Pi^Z alleleine ise hiç rastlanmamıştır. Bu bulgu daha önceki bilgiler doğrultusundadır (Kaminski ve Andres Cara 1986, Zurkowski ve Kuryl 1992).

Bu çalışmada, kan grubu ve kan proteinleri polimorfizmi değerlendirmesinde Pi şeklinde sembolize edilerek F, G, H, I, K, L, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, Z alleleri standardize edilmiş olan prealbumin lokusu polimorfizminin belirlenmesinde laboratuvarlarımızda uygulanması en uygun yöntem ortaya konmuş, yetiştiriciliği yapılan safkan Arap ve safkan İngiliz atlarının bu protein yönünden fenotipik dağılımı gösterilmiştir. Bu polimorfik sistemin rutin soy testinde kullanılmasıyla testin güvenilirliğini artıracığı ve bu yönüyle yerli at ırklarının genetik özelliklerinin korunmasına katkıda bulunulacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Bell K, Patterson S, Politt CC (1984) The plasma protease inhibitory system (Pi) of Standardbred horses. *Anim. blood. Grps biochem. Genet.* 15 : 191-206.
- Braend M (1967) Variation of horse prealbumins in acidic starch gel *Acta Vet. Scand.* 8: 193-194.
- Braend M (1970) Genetics of horse acidic prealbumins. *Genetics*, 65: 495-503.
- Bowling AT, Clark RS (1985) Blood group and protein polymorphism gene frequencies for seven breeds of horses in the United States. *Anim. blood. Grps biochem. Genet.* 16 : 93-108.
- Ek N (1977) Identification of the Pr prealbumin proteins in horse serum. *Acta vet. Scand.*, 18: 458-470.
- Ek N, Braend M (1984) Studies on the nature of the equine protease inhibitors. *Anim. blood. Grps biochem. Genet.* 15 : 151-154.
- Gahne B (1966) Studies on the inheritance of electrophoretic forms of transferrins, albumins, prealbumins and plasma esterases of horses. *Genetics* 53: 681-694
- Holbrook IB, Leaver AG, (1976) A procedure to increase the sensitivity of staining by Coomassie Brilliant Blue G250- Perchloric Acid solution. *Anal. Biochem*, 634-636.
- Jamieson A (1965) The genetics of transferrins in cattle. *Heredity* 20 : 419-441.
- Juneja RK, Gahne B, Sandberg K (1979) Genetic polymorphism and close linkage of two α 1 protease inhibitors in horse serum. *Anim. blood. Grps biochem. Genet.* 10: 235-251.
- Kaminski M, Andres Cara DF (1986) Electrophoretic markers of Andalusian horses: comparison of Spanish and Lusitanian lineages. *Comp.Biochem.Physiol.Vol.* 83B(3):575-578
- Michie MJ, Reid WW (1968) Characterization of natural inhibitors of trypsin and chymotrypsin by electrophoresis in acrylamide-agarose gels. *Nature*, Vol.: 578-580.
- Patterson SD, Bell K, Manton VJA (1990) Equus przewalskii plasma protease inhibitor (Pi) system. *Animal Genetics* 21: 129-139.
- Pollitt CC, Bell K (1980) Protease inhibitor system in horses: classification and detection of a new allele. *Anim. blood. Grps biochem. Genet.* 11 : 235-244.
- Pollitt CC, Bell K (1983a) Characterisation of the α 1-protease inhibitor system in thoroughbred horse plasma by horizontal two-dimensional (iso-dalt) electrophoresis. 1.Protein staining. *Anim. blood. Grps biochem. Genet.* 14 : 83-105.
- Pollitt CC, Bell K. (1983b) Characterisation of the α 1-Protease inhibitor system in thoroughbred horse plasma by horizontal two-dimensional (iso-dalt) electrophoresis. 2.Protease inhibition. *Anim. blood. Grps biochem. Genet.* 14 : 107-118.
- Rodriguez P, Aguilar P (1992) Blood group and protein polymorphism gene frequencies for the Andalusian horse breed. A comparison with four American horse breeds. *Arch. Zootec.* 41(extra) : 443-442
- Scott AM (1977) Prealbumin.: the single most useful system in Thoroughbred horse blood typing. *Anim. blood. Grps biochem. Genet.(Suppl.)* 19.
- Smithies O (1955) Zone electrophoresis in starch gels: Group variations in starch gels:Group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem.* 61: 629-641.
- Trommerhausen-Smith A, Suzuki Y (1978) A new allele in the prealbumin system of horse serum markers. *Anim. blood. Grps biochem. Genet.* 9: 97-104.
- Uriel J, Berges J (1968) Characterization of natural inhibitors of trypsin and chymotrypsin by electrophoresis in acrylamide-agarose gels. *Nature* 218:578-580
- Zurkowski M, Kuryl J, (1992) A new genetic variant Z₂ in the Pi system of horses.,*Animal Genetics* 23: 279-281