



**HOLSTEİN SİĞİRLARDA EMBRİYONİK ÖLÜMLE
İLİŞKİLİ HH5 VE STAT3 GENLERİNDEKİ
MUTASYONLARIN ARAŞTIRILMASI**

Yasemin KILINÇARSLAN
Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Prof. Dr. Cevdet UĞUZ

Tez No: 2021-022

**SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HOLSTEİN SIĞIRLARDA EMBRİYONİK ÖLÜMLE İLİŞKİLİ
HH5 VE STAT3 GENLERİNDEKİ MUTASYONLARIN
ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Yasemin KILINÇARSLAN**

**Danışman
Prof. Dr. CEVDET UĞUZ**

Tez No: 2021-022

AFYONKARAHİSAR

2021

**Bu tez çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Proje Araştırmaları
Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir. Proje No: “19.SAĞ.BİL.14”**

KABUL VE ONAY SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**'nda Yasemin KILINÇARSLAN tarafından hazırlanan **“Holstein Sığırlarda Embriyonik Ölümle İlişkili HH5 ve STAT3 Genlerindeki Mutasyonların Araştırılması”** başlıklı tez çalışması Afyon Kocatepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca **02/07/2021** tarihinde aşağıdaki jüriler tarafından **oy birliği / oy çokluğu ile YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Prof. Dr. Cevdet UĞUZ

Üye

Prof. Dr. Metin ERDOĞAN

Üye

Doç. Dr. Sevim Feyza ERDOĞMUŞ

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

..... / /tarih vesayılı kararıyla
onaylanmıştır.

Prof. Dr. Esmâ KOZAN

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

...../...../.....

İmza

Yasemin KILINÇARSLAN

ÖZET

Holstein Sığırlarda Embriyonik Ölümle İlişkili HH5 ve STAT3 Genlerindeki Mutasyonların Araştırılması

Bu araştırmada, Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan Holstein sığır ırkına ait kanlardan 70 adet örnek üzerinde çalışılmıştır. Çalışmada embriyonik sağ kalımla ilişkili olan HH5 ve STAT3 genlerindeki mutasyonlar saptanmaya çalışılmıştır. HH5'in 138 baz çifti uzunlukta bir delesyondan kaynaklandığı yapılan çalışmalarda bulunmuştur. STAT3 geninin aktivasyonu embriyonik yaşam süresinde önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada bu genlerle ilgili mutasyonda ise heterozigotluk frekansları analiz edilmiştir.

Bu iki genin sığırlarda embriyonik yaşam sürecini etkilediği bilindiğinden bu genlerin daha kapsamlı incelenmesi mutasyonların tespit edilmesi için daha uzun süreli ve daha kapsamlı bir çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu genler üzerine yapılan çalışmaların kısıtlı olması sebebiyle bulgularımızı kıyaslayacak belgeler bulunamamıştır. Holstein sığır ırkının sağlıklı döl veriminin olabilmesi için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Holstein Sığır, STAT3, HH5, Mutasyon, Delesyon, Embriyonik Sağkalım

SUMMARY

Investigation of Mutations in HH5 and STAT3 Genes Associated with Embryonic Death in Holstein Cattle

In this study, 70 samples of Holstein cattle breeds in the laboratory of Afyon Kocatepe University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Medical Biology and Genetics were studied. In the study, mutations in the HH5 and STAT3 genes associated with embryonic survival were tried to be detected. Studies have found that the HH5 is caused by a 138 base pair long deletion. Activation of the STAT3 gene plays an important role in embryonic lifespan. In this study, the frequencies of heterozygosity in the mutation related to these genes were analyzed.

Since these two genes are known to affect the embryonic life process in cattle, a longer and more comprehensive study is needed to examine these genes more comprehensively and to detect mutations. Due to the limited number of studies on these genes, documents to compare our findings could not be found. More studies are required for the Holstein cattle breed to have a healthy fertility

Keywords: Holstein Cattle, STAT3, HH5, Mutation, Deletion, Embryonic Survival

ÖNSÖZ

Gelişen global dünyada teknolojinin de gelişmesiyle özellikle kırsal bölgelerde yapılan hayvancılığın çoğunluğu bilinçsizce ellerden çıkıp daha modern işletmelere geçmiştir. Hayvansal işletmelerin et ve süt üretimine önem vermesinin yanı sıra işletmedeki hayvan sayısının artışına yönelik yapılan çalışmaları takip etmesi ve bu çalışmalara yönelik hareket etmesi finansal yönden ilerleme kaydetmesi açısından önemli bir kriterdir. Bu çalışmalar genetik laboratuvarlarında tüm titizlikle yapılmaktadır. Hayvansal üremenin sağlıklı bir şekilde artması, çevre koşullarının iyi olmasından çok hayvanın sahip olduğu genotip ile alakalıdır. Kısacası hayvancılıkta verimliliği ve karlılığı en başta genotip etkilemektedir. İşletmeler açısından en önemli hususlardan biri sağlıklı üretimin sağlanmasıdır. Böylece hayvanın üretim düzeyinin istikrarı sağlanmış olacaktır.

Yetiştiricilikte farklı verim yönlü ırklar kullanılmaktadır. Bu ırklardan en yaygın yetiştiriciliği yapılan Holstein (Siyah Alaca) ırkıdır. Bu sığır ırkında yapılan çalışmalarda, bir takım genlerin embriyonik ölümlere sebep olduğu anlaşılmıştır. Bu çalışma, Holstein'larda büyüme ve gelişme ile embriyonik ölümle ilgili olduğu bilinen STAT3 ve TFB1M (HH5) genlerindeki mutasyonların araştırılması amacıyla yapılmıştır.

Bu çalışmamda bana engin tecrübeleri ile yol gösteren saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Cevdet UĞUZ 'a, çalışmamın tüm aşamasında bana gerek tecrübe ve bilgi birikimleriyle gerek sevgi dolu telkinleriyle destek olan değerli hocam Prof. Dr. Metin ERDOĞAN' a, yüksek lisans eğitimim süresince sahip oldukları bilgileri benimle paylaşan ve değerli vakitlerini bana ayıran bölümümün değerli hocaları Prof. Dr. Mine AKBULUT ve Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk LENGİR' e en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamda finansal destek ve katkısı olan Afyon Kocatepe Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimine teşekkür ederim. Ayrıca Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı doktora öğrencisi Eda KARABÖCEK arkadaşşıma da laboratuvar çalışmalarımda yardımcı olduğu için teşekkürlerimi sunarım.

Dünyaya gelmesiyle bana şans getiren ve beni dünyanın en mutlu insanı yapan canım oğlum UTKU'ma, yaşamımın her anında beni destekleyen, bugünlere gelmemde çok fazla emeği olan fedakar biricik annem Fatma KILINÇARSLAN 'a, her konuda ve kararlarımda benim yanımda olan sevgili ablalarım Arzu KARANFİL ve Rabiye KILINÇARSLAN 'a en içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yasemin KILINÇARSLAN

Afyonkarahisar

2021

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ	iii
ÖZET	iv
SUMMARY	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
RESİMLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Siyah Alaca (Holstein Friesian)	2
1.1.1. Holştayn Sığırların Özellikleri	3
1.2. Sinyal Mekanizmaları	4
1.2.1. STAT Gen Ailesi	9
1.2.2. STAT Gen Yapısı ve Aktivasyonu	11
1.2.3. STAT3 Gen Özellikleri	16
1.3. Holştayn Haplotipler (HH)	19
1.3.1. Holştayn Haplotip 5'in Yapısı	21
1.4. DNA Polimorfizmi	23
2. MATERYAL VE METOT	25
2.1. Materyal	25
2.1.1. Hayvan Materyali	25
2.1.2. Kullanılan Teknik Aletler	25
2.1.2.1. PCR Cihazı	25
2.1.2.2. Yatay Elektroforez Sistemi	26
2.1.2.3. Jel Görüntüleme Sistemi	26
2.2. Metot	27
2.2.1. Örneklerin Toplanması ve Saklanması	27
2.2.2. DNA İzolasyonu	27

2.2.3. Primer Tasarımı	28
2.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	28
2.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi	28
2.2.6. RFLP (Restriksiyon Fragment Length Polymorphism)	29
2.2.7. İstatistik Analiz	29
3. BULGULAR	30
4. TARTIŞMA	32
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	35
6. KAYNAKLAR	36
7. EKLER	42
7.1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı	42
ÖZGEÇMİŞ	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotit tri fosfat
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EPO	Eritropoietin
HF	Holstein Friesian
HH5	Holstein Haplotype 5
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
JAK	Janus Family Kinase
MgCl₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
NH₂	Aminoterminal Bölge
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriksiyon Arttırılmış Polimorfik DNA
pmol	Pikamol
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
STAT	Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü
TPO	Trombopoietin
TYK	Tirozin Kinaz
SOCS	Sitokin Sinyalleri Baskılayıcıları

ŞEKİLLER DİZİNİ

		SAYFA
Şekil 1.1	Tirozin kinaz sistemini kullanan reseptörler	5
Şekil 1.2	JAK'ların aracılık ettiği sinyal yolları	6
Şekil 1.3	JAK/STAT sinyalizasyonu	7
Şekil 1.4	A) Sitokin-STAT sinyalizasyonunun özgülüğü B) Bir STAT aile üyesinin silindikten sonra değiştirilen STAT sinyal şebekeleri	9
Şekil 1.5	STAT proteinlerinin yapısı	11
Şekil 1.6	STAT transkripsiyonel faktörleri ailesinin üyeleri	13
Şekil 1.7	JAK/STAT aktivasyonu	14
Şekil 1.8	STAT aktivasyon mekanizmalarındaki değişiklikler	14
Şekil 1.9	STAT kristal protein yapısı	16
Şekil 1.10	CmACS-7 deki tanımlanmış haplotipler	20
Şekil 3.1	Gradient PCR agaroz jel elektroforez görüntüsü, A: STAT3, B: HH5	30
Şekil 3.2	STAT3 SNP 25402 Agaroz Jel Elektroforezi Görüntüsü	30
Şekil 3.3	HH5 geni Agaroz Jel Elektroforezi Görüntüsü	31

TABLÖLAR DİZİNİ

	SAYFA
Tablo 1.1 STAT'ların alımına aracılık eden sitokin reseptörleri	8
Tablo 1.2 Doğurganlığı ve ölü doğumu etkileyen yeni haplotiplerin yerleri ve birincil kaynak ataları	22
Tablo 1.3 Yeni haplotiplerin doğurganlık ve ölü doğum üzerindeki güncel sıklıkları ve etkileri	22
Tablo 2.1 Çalışmada kullanılan primerler	28
Tablo 3.1 STAT3 ve HH5 genlerine ait allel frekanları ve heterozigotluk değerleri	31

RESİMLER DİZİNİ

	SAYFA
Resim 1.1 Holştayn sığır ırkı	3
Resim 2.1 PCR Cihazı	25
Resim 2.2 Elektroforez sistemi	26
Resim 2.3 Jel görüntüleme sistemi	26



1.GİRİŞ

Sığır yetiştiriciliğinde, 1990 yılından itibaren, finansal değere sahip özelliklerin daha iyi duruma getirilmesinde rolü olan moleküler genetik tekniklerine ve bu alanda olan araştırmalara ilgi fazlalaşmıştır (Singh vd., 2014). Farklı sığır ırklarında, finansal yönden önemli yerleri olduğu için, yapılan araştırmalarda bulunan bir kaç SNP değerleri keşfedilerek bilinmeyen resesif bozuklukları bulmak için haplotip testleri uygulanmıştır. Bu testler sonucunda holştayn ırkı sığırlarda birkaç ölüme neden olan haplotip bulunmuş ve bulunan bu haplotiplerden en az yedi adedi nedensel mutasyonlar sebebiyle aday genlerde belirlenmiştir. Tüm bu çalışmalara rağmen yine de ölümcül haplotipler için araştırmalara devam edilmektedir (Schütz vd., 2016).

İşletmelerde 1980'li yıllarda ise, yüksek verimli sütçü sığır olarak yetiştirilen Holstein Friesian (HF) ırkı sığırların üreme performansında giderek azalma gözlenmiştir (Egger-Danner, 2015). Oluşan bu olumsuz durumdan dolayı, dünyada bir çok ülke üreme parametrelerini kayıt altına almaya başlamış ve ulusal ıslah programlarına doğurganlık özelliklerini dahil etmişlerdir (Bowley vd., 2015; Miglior vd., 2005). Üreme performansı bir sığır ırkında, sığırın sağlığı, erkek ve dişi doğurganlığı, sürü yönetimi, beslenme, buzağılama özellikleri ve çevre gibi çeşitli nedenlere bağlı olarak değişmektedir. Bundan dolayı, özellikle ineklerde üreme performansı kalıtım derecesi 0.02 - 0.04 olarak belirlenmiştir (Berry vd., 2014). Tüm bu araştırmalara rağmen, son yıllarda genetik seçimlerde kullanılan tekniklerin klasik yetiştirme programlarında kullanılmaya başlanması, olumsuz yönelimlerin bir kısmının daha iyi duruma getirilmesinde yardımcı olmuştur (Segelke vd., 2016).

Moleküler biyoloji teknikleri sığırların genetik çalışmalarında kullanılmaktadır ve son yıllarda bu tekniğin kullanımı artmıştır. Sığırlarda üremeye azalmaya neden olan genetik ve fizyolojik sebeplerin ortaya çıkmasında moleküler biyoloji teknikleri kolaylık sağlamıştır (Butler, 2013). Ölü doğum ve doğurganlığa etki eden çekinik olan bozuklukları belirlemek için tüm genom boyu ilişki analizleri yapılmaktadır (Glusman vd., 2014; VanRaden vd., 2011). Holştayn ırkında üç tane ölüme neden olan haplotip belirlenmiştir. Bunlar; birinci kromozom (HH1), beşinci (HH2) ve sekizinci (HH3) kromozomların üzerinde bulunmuşlardır (VanRaden vd.,

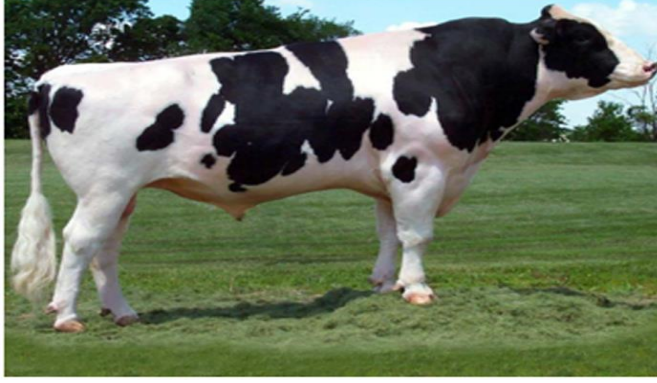
2011). Sonraki çalışmalarda ise holştaynlarda bunlara ek olarak 14 yeni ölüme neden olan haplotip (HH4-HH17) belirlenmiştir. Bunlardan HH1 (APAF1), HH4 (GART) ve HH5 / HH6 (SLC35A3) genlerinde bu duruma neden olan SNP'ler tespit edilmiştir (Fritz vd., 2013).

Takeda vd., (1997) 'nin fareler üzerinde yapmış olduğu çalışmada STAT3 eksikliği olan fare embriyolarının, gebeliğin 7. gününden sonra yaşamlarını kaybettiğini belirtmişlerdir. Gelişimin erken dönemlerinde, embriyonik kök hücrelerin kendisini yenilemesi için STAT3 aktivasyonunun gerekli olduğu görülmektedir. STAT3'ün olmadığı durumlarda bu yokluğun diğer STAT proteinleri tarafından telafi edilmediği görülmüştür (Matsuda vd., 1999).

Sonuç olarak, sığır yetiştiriciliğinde verimin artırılmasının yanında üremede de genetik faktörler önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, canlı ağırlık ve vücut ölçüleri gibi önemli kantitatif özellikler de karkas verimi ve buzağı yaşama gücünü etkilemektedirler. Çok sayıda genle alakalı olan sağlıklı üreme ve buzağının hayatta kalma süresi, ekonomik açıdan hayvancılık işletmeleri için oldukça fazla önem taşımaktadır.

1.1. Siyah Alaca (Holstein Friesian)

Türkiye'de kültür ırkı sığır yetiştiriciliğinde önemli bir yere sahip olan Siyah-Alaca (Holştayn) dünyada da en yaygın yetiştiriciliği yapılan sığır ırkıdır. Holştaynların kıl örtüsü kırmızı- beyaz veya siyah-beyaz olmaktadır. Anavatanları Hollanda ve Kuzey Almanya'dır. Bu renklerin büyüklükleri değişiklik göstermektedir. Erkek ve dişilerinde de boynuz bulunmaktadır.



Resim 1.1. Holştayn sığır ırkı

Türkiye’de genellikle Ege, Akdeniz ve Marmara bölgelerinde yaygın şekilde yetiştirilen Siyah-Alaca ırkı, Orta Karadeniz, İç Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgeleri’nde de yetiştirilmektedir (Şekerden, 1986; Akbulut vd., 1992). Tarım ve Orman Bakanlığı ve bazı özel işletmeler aracılığıyla, 1986 yılından itibaren yaklaşık 10 yıllık dönemde büyük bir çoğunluğu Siyah-Alaca ırkı olan, yaklaşık 300.000 baş gebe düvenin ülkemize girişi sağlanmıştır (Akman, 1998; Kumlu, 1999). Türkiye’ye gelişi 1950’li yıllara kadar dayanan ve önceleri sadece kamu kurumlarında yetiştirilen Siyah-Alaca sığırların sayısında dış ticarete sağlanan teşviklerin katkısıyla, son zamanlarda oldukça artış gözlenmiştir. Bu gelişimden fayda sağlamak ve bu gelişime teşviki gerçekleştirmek için özellikle 1990 yılından itibaren Türk-Alman ve Türk-İtalyan ülkelerinin işbirliği yaptığı Siyah-Alaca sığırlarında verim kayıtlarını tutmak ve soy kütüğü oluşturmak için birçok projeler yapılmıştır. Bu çalışmalarda yapılan projelere yönelik ilk olarak 1995 yılında 'Holştayn Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birlikleri kurulmuştur (Kumlu ve Akman 1996). 1998 yılında ise illerde yer alan bu birliklerden bir kısım toplanarak, 'Damızlık Sığır Yetiştiricileri Merkez Birliği'ni (DSYMB) oluşturmuşlardır (Kumlu, 1999).

Merkez Birliği, Tarım ve Orman Bakanlığı’nın da desteğini alarak “Ulusal Siyah-Alaca Damızlık Sığır Yetiştirme Programı” nı uygulamaya koymuştur (Kumlu, 1999; Kumlu ve Akman, 1999).

1.1.1. Holştayn Sığırların Özellikleri

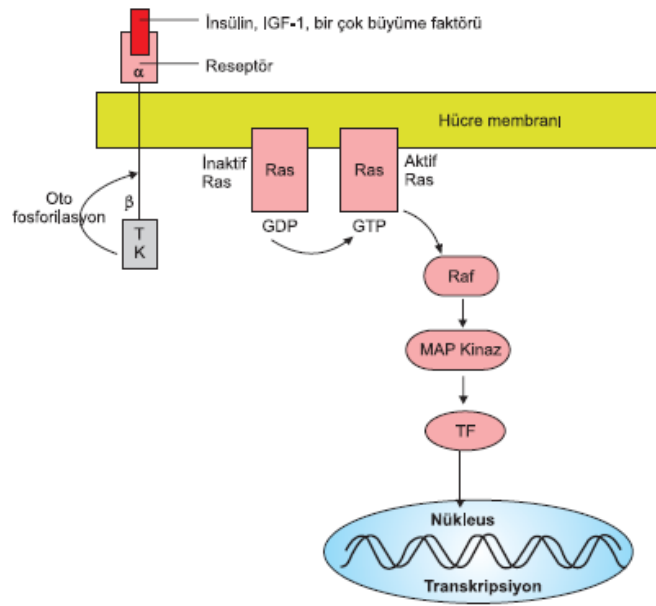
Cidago yükseklikleri diğer sütçü ırklara göre uzundur (Cidago yükseklikleri 140-155 cm). Canlı ağırlıkları 600-1000 kg kadar olan bu ırkın ortalama 305 günlük süt

verimi diğer sütçü ırklara göre %5,6-8,6 oranında daha fazla olduğu görülmüştür (Özkök vd., 2007; Yaylak vd., 2015). İşletmelerde oluşabilecek sorunlar, içinde bulunan mevcut durum, verim düzeyi ve üretim için olan hedeflerle karşılaştırılarak belirlenebilmektedir (Sehar ve Özbeyaz, 2005; Tapkı vd., 2007). Sığırlarda istatistiksel olarak verimin az seviyede olmasının nedeni, genotip ve çevre olarak görülmektedir (Duru ve Tuncel, 2002; Ünal ve Cebeci, 2004; Akman vd., 2005). Sığırlarda verimin yükseltilebilmesi için yalnızca genetik durumun iyi hale getirilmesi yeterli değildir ve ortam koşullarında da verime pozitif katkı sağlayacak şekilde düzenlemeler yapılmalıdır. Bir çok ülkede, döl ve süt verimine olan ortam koşullarının etkisi araştırılmış ve çok sayıda kaynak elde edilmiştir (Akbulut vd., 1997). Buzağılama aralığının fazla olması ya da aşırı açık gün sayısının çok olmasının holştayn ırkı sığırlarda, doğumların mevsimlere göre ayarlanamaması, sığırların bölgelerin durumuna ve ortam şartlarına uyum sağlayamamaları ve işletmelerde meydana gelen idari sorunlardan kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir (Akbulut ve Tüzemen, 1992). Marmara Bölgesi'nde yetişen holştayn sığırların ilk buzağılama yaşının 30 ay olduğu bildirilirken, yıl ve mevsimin etkileri önemli bulunmuş, döl veriminde en büyük etkiye neden olan durumun ise yıl olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Özcan, 1994). Başka bir çalışmada ise, ortalama tohumlama sayısının gebelik başına, sığırlarda 2.4 olarak bulunurken, en yüksek sayıya ise gebelik sırasına göre 6. ve 7. gebelik durumlarında ulaşılmıştır ve mevsimlere göre kıyaslama yapıldığında en düşük oranın kış mevsiminde, en yüksek oranın da sonbahar mevsiminde yapılan tohumlamalarda olduğu sonucuna varılmıştır (Kaya, 2016).

1.2. Sinyal Mekanizmaları

Bir hücrenin görevlerini yerine getirebilmesi ve hücrenin görevlerini tamamlayabilmesi için sinyal ileti sistemi önemlidir. Sinyal ileti sistemi yardımıyla hem hücrenin diğer hücrelerle haberleşebilmesi hem de hücre içinde yer alan bütün yapıların kendi aralarında iletişim sağlamaları ve mekanizmalarının düzenli olması sağlanmaktadır. Sağlıklı ve sorunsuz bir hayat için sinyal ileti sistemi mekanizması düzenli olacak şekilde çalışmalıdır. Hücre membranından başlayıp, DNA'da sonlanan bir haberleşme ağı hücre içerisinde mevcuttur. Bu haberleşme ağında yer

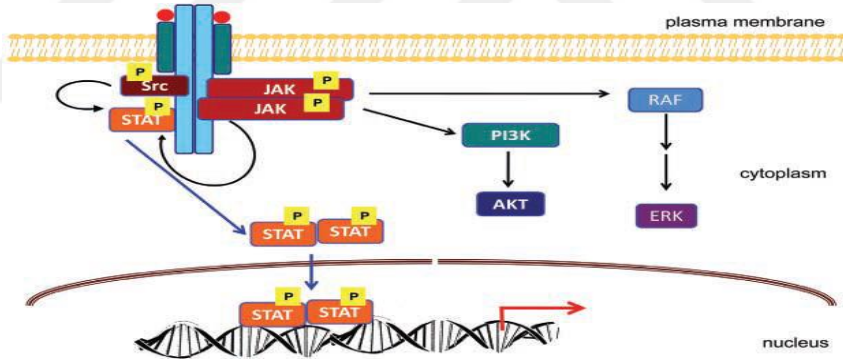
alan işlem basamakları yukarı yönlü (upstream) ve aşağı yönlü (downstream) olan elemanlar sayesinde kontrolü sağlanıp, iki yönde de iletişim olmaktadır (Saydam, 2017). Hücredeki dengenin, hücre yaşam süresinin ve hücre gelişmesinin olması için belirli bir cevap oluşması gerekmekte, bu cevabın oluşabilmesi için de, hücre dışından gelen iletilerin hücrenin içerisinde bulunan yapılara ulaşması sağlanmaktadır (Arbouzova ve Zeidler, 2006).



Şekil 1.1. Tirozin kinaz sistemini kullanan reseptörler (Arbouzova ve Zeidler,2006)

İnsan gen yapısında yer alan ortalama 32.000 genin %20'sinin sinyal ileti sisteminde bulunan proteinleri kodladığı İnsan Genom Projesi'nde yer almaktadır. Bu proteinler arasında G- proteinleri, hücrenin zarında bulunan reseptörler ve sinyal iletimi sağlayan enzimler bulunmaktadır (Jensen ve Hunter, 2001). Kodlanan proteinlerden sinyalin iletimi esnasında fosforilasyonu sağlayan proteinlerin aktif hale gelmesine yardımcı olan protein kinazlar önemli bir yer tutmaktadır. Protein kinazların, sitoplazmik tirozin kinazlar ve membran yerleşimli olanlar şeklinde iki çeşiti vardır. Protein kinazlar dinlenme halindeki hücrelerde, inaktif şekilde hücrenin sitoplazmasında bulunmaktadırlar. Reseptörlerin, sitokinlerin ya da hormonların aracılığıyla hücrenin uyarılması sayesinde bu proteinler aktifleşmektedir.

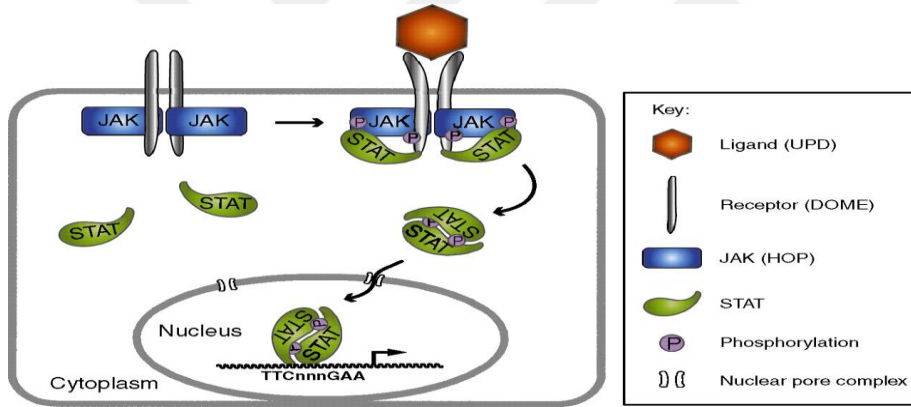
Proteinler aktifleştince çekirdekteki ya da sitoplazmadaki yerlerine geçmektedirler (Doğan ve Güç, 2004). Polipeptid ailesi (sitokin de denilmektedir), hücrenin farklılaşmasını ve hücrenin çoğalmasını denetlemektedir. İnterferonlar (IFN'ler), interlökinler (IL' ler), trombopoietin (TPO), eritropoietin (EPO) ve koloni uyarıcı faktörler sitokinler arasında yer almaktadır. Sinyal iletimini, bu sitokin reseptörlerinin JAK'larda bulunan üyelerin yardımıyla yaptıkları bilinmektedir (Flisikowski vd., 2003). Sitoplazmik bir kinaz alanı olmayan sitokin reseptörlerinin, sinyalin transdüksiyonunun oluşabilmesi için JAK ailesinden olan tirozin kinazların elemanlarına ihtiyaçları vardır. Günümüzde sitokinlerin, 50'den fazla üyesi için önemli sinyalleri dönüştüren JAK1, JAK2, JAK3 ve TYK2 (Tirozin Kinaz) bulunmuştur. JAK1, JAK2 ve TYK2'nin bütün hücrelerde ekspresyonu sağlanırken, JAK3'ün ekspresyonu lenfoid, hematopoietik ve vasküler düz kas hücreleri ile endotelyumdan ekspresyonu sağlanmaktadır (Paukku vd., 2004; Schindler vd., 2008).



Şekil 1.2. JAK' ların aracılık ettiği sinyal yolları (Jatiani vd., 2011)

Hücrelerin sorunsuz bir durumda yaşamlarını idame ettirebilmeleri, hücrenin çoğalması ve planlı hücre ölümünün sağlanmasında rolleri olan en önemli sinyal iletim yolağı Janus Kinaz / Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü (JAK / STAT) dür. Reseptörler sayesinde ilk olarak JAK kinazlar aktif hale getirilmektedir. Aktif olan JAK kinazlar da STAT proteinlerinin fosforile olmasına sebep olmaktadır. SH2 ucu, STAT proteinlerinin içerisinde bulunmakta ve bir başka STAT proteinine tutunmayı sağlamaktadır. Bu olayın sonucunda iki STAT proteini birbirine bağlanarak reseptörden ayrılmaktadır. Birbirine bağlanan ve reseptörden ayrılan bu yapıya STAT dimeri denilmektedir. Hücre çekirdeğine doğru göç eden STAT

dimerleri, gen ekspresyon değişikliklerine neden olmak için sitokine yanıt veren hedefteki genin promoter bölümündeki DNA sekanslarına bağlanmaktadır (Yu ve Jove, 2004). Malignitede ekspresyon artışı gösteren genlerin aktive edilmesine STAT dimerleri yapmış olduğu sinyal iletimi ile sebep olmaktadır. STAT'lar aktif hale geldiklerinde çok önemli mekanizmaların düzenlenmesinden sorumlu olurlar. Önemli olan bu mekanizmalar arasında anjiogenezi uyarma, hücreleri immün sisteme karşı koruma ve hücre çoğalması gibi rolleri olan bazı proteinlerin ekspresyonları yer almaktadır. Bunlardan dolayı da, çoğunlukla hücresel değişime STAT'ların anormal aktivasyonları sebep olmaktadır (Kaymaz vd., 2013). Önceleri STAT'lar, interferon bağımlısı transkripsiyon faktörleri olarak bildirilmiştir. Memelilerde bulunan STAT proteinlerinin yedi üyesinin, 50 ligandının yaşam için gerekli olan sinyalleri dönüştürdüğü araştırmalar sonucunda bulunmuştur (Kisseleva vd., 2002).



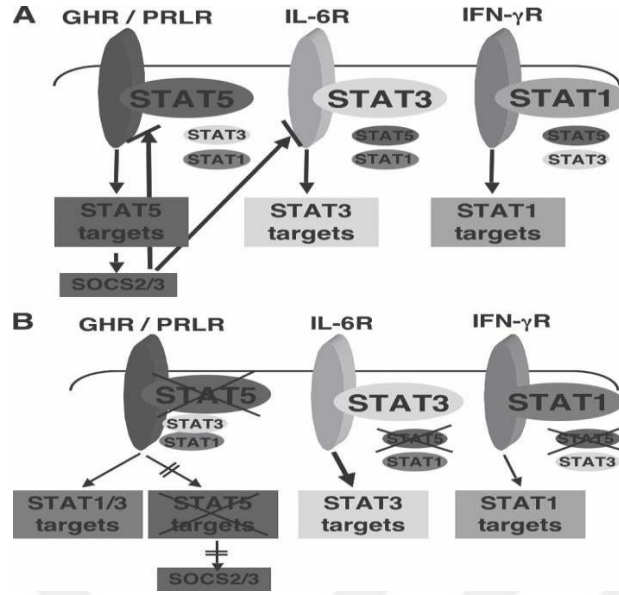
Şekil 1.3. JAK / STAT sinyalizasyonu (Arbouzova ve Zeidler, 2006)

JAK-STAT elemanları bulunmayan fareler ve insanlar arasındaki fenotipik benzerlikler, STAT'ların ve JAK'ların görevlerinin memelilerde büyük oranda korunmuş olduğunu düşündürmektedir (Casanova vd., 2012). Bu zamana kadar tirozin fosforilasyonuyla aktivasyonunun sağlandığı bildirilen tek transkripsiyon faktörü STAT'lardır (Donohue vd., 2010). JAK'lara ek olarak, başka bir tirozin kinaz da, büyüme faktörü reseptörleri ve sitokinler yardımıyla aktivasyonu sağlamaktadır. Fakat, bu kinazların STAT'ları direkt aktif hale getirebilecekleri konusunda çalışmalar halen devam etmektedir (Paukku ve Silvennoinen, 2004). STAT'ların alımına yardımcı olan sitokin reseptörleri Tablo 1.1'de verilmiştir.

Tablo 1.1. STAT'ların alımına aracılık eden sitokin reseptörleri (Kisseleva vd., 2004)

STAT proteini	Reseptör
STAT1	IFN- Gama
STAT2	IFN- Alfa
STAT3	IL-6, IL-10
STAT1, STAT3	IL- 6
STAT4	IL- 12
STAT5	IL- 2
	IL- 7
	IL- 9
	EPO
	PRL
	GH
	GM- CSF
STAT6	IL- 4

Hücreye özgül sitokin sinyalleri, az sayıda da olsa, hücre üzerinde ortaya çıkan reseptörlerden ve onunla karşılaştığı ligandlardan sonuçlanmaktadır. Oluşan ligandlar, aynı kökenli reseptörüne tutunmakta ve sonraları belirli bir hedef gen demetini indükleyen belirli bir STAT molekülünü aktive etmektedir. SOCS proteinlerini, hedef genlerden bazıları kodlamaktadır. Bu proteinler reseptörlerden alınan sinyallerin üzerinde, negatif olacak şekilde geri bildirim düzenlemesi yaparlar. Eksik olan bir STAT aile üyesi varsa, önceleri gerçek üye tarafından yer edinen diğer STAT'ların reseptör bölgelerine tutunarak anormal şekilde aktivasyonlar oluşturmaktadır (Hennighausen ve Robinson, 2008).



Şekil 1.4. A) Sitokin-STAT sinyalizasyonunun özgüllüğü. B) Bir STAT aile üyesinin silindikten sonra değiştirilen STAT sinyal şebekeleri (Hennighausen ve Robinson, 2008)

1.2.1. STAT Gen Ailesi

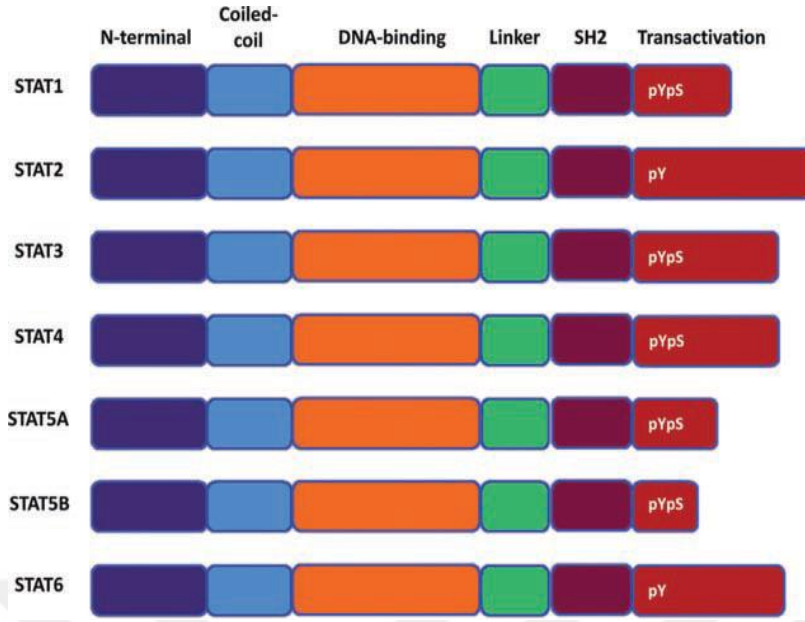
DNA bağlayıcı proteinlerin bir üyesi olarak ilk kez 1990'lı yılların başında STAT proteinleri tanımlanmıştır (Ihle, 1996; Ihle, 2001). STAT'lar, geniş bir yelpazedeki hormonların, sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin hedef gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini düzenleyen ve dönüştüren latent sitoplazmik transkripsiyon faktörleridir (Bromberg vd., 1999; Chaix vd., 2011). Hedef hücrelerdeki sitokinlerin etkileri ve çeşitli peptid hormonlarına aracılık eden, yedi üyeli olan hücre içi faktör familyasına dahildir (Dario vd., 2009). Farklı sitokinlerin çeşitli STAT proteinlerini aktifleştirdikleri günümüzde bilinmektedir. Araştırmalar neticesinde memeli canlıların hücrelerinde STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B ve STAT6 şeklinde yedi adet STAT proteini bulunmuştur (Doğan ve Güç, 2004). Genellikle sitokinlerin hücresel yapılara sinyal iletmesinde STAT proteinleri Janus kinazları ile birlikte önemli bir yer tutmaktadır (Goldammer vd., 1997).

Omurgalı canlıların evrimleşme aşamasının başlangıcında, bir dizi kromozom ve gen çoğalmasından dolayı STAT gen ailesinin bir tek atasal STAT geninden oluştuğu varsayılmaktadır (Ambrosio vd., 2002; Crispi vd., 2004). Bu düşüncenin sebebi

memelilerde olan STAT5 genlerinin, böceklerde olan tek STAT ortologlarına benzer olmasıdır (Davey vd., 1999). İnsan genetiğinde, yedi STAT familyası elemanı üç küme halinde kategorize edilmektedir (Ambrosio vd., 2002). Bu gen kümeleri içinde yer alan ayrıntılı yapı belirsizliği hala devam etmektedir (Davey vd., 1999).

STAT1 proteinin aktive edilmediği durumlarda, farelerde yapılan gen hedefleme çalışmalarında, bu durumun interferonlara bozulan yanıtlara ve malignite artışına sebep olduğu görülmüştür. Bazı dokularda STAT1 ekspresyonunun azaldığı ve interferonlara yanıtların bozulduğu ise STAT2 proteini eksikliğinde tespit edilmiştir. Dokularda hücre sağ kalımının bozulmasına, embriyonik ölümlerin gerçekleşmesine ve patojenlere verilen cevabın bozulmasına STAT3 proteini eksikliği sebep olmaktadır. STAT4 proteini yokluğunda IL-12 cevabının ortadan kalkması sebebiyle Th1 farklılaşmasında bozulma olmaktadır. STAT5A proteini yokluğunda PRL cevabının ortadan kalkması sebebiyle meme bezinin gelişemediği görülmüştür. STAT5B proteini olmadığında GH cevabının kaybolması sebebiyle büyüme olmamaktadır. IL-4 cevabının olmaması sebebiyle bozulmuş Th2 farklılaşması ise STAT6 proteini eksikliğinde gözlenmektedir (Pauku ve Silvennoinen, 2004).

STAT genlerinin farklı işlevleri vardır. Tümörü baskılayan gen olarak işlev gören STAT1 iken, özellikle STAT3 ve STAT5 apoptoza uğramayan, kontrol dışı çoğalan, bağışıklık sisteminden kaçan ve anjiogenezi aktive eden tümör hücrelerinde fazlaca eksprese edilmektedir (Yu ve Jove, 2004; Liang vd., 2009). STAT3 ve STAT5 farklı hücrelerde programlı hücre ölümünü düzenlemekte ve hücre çoğalmasına yardımcı olmaktadır. STAT3 ve STAT5 in bazı hematolojik hastalıklarda normal olmayan düzeyde aktif hale geldiği ve lösemi oluşumuna sebep olduğu bilinmektedir (Kaymaz vd., 2013). Büyüme hormonuna yanıt için STAT5B ye ihtiyaç duyulurken, meme epitelinin oluşumu için ise STAT5A gerekmektedir (Bromberg vd., 1999). Özellikle STAT5'nin, meme gelişimi, bağışıklık sistemi, saç büyümesi, hematopoez, gebelik rolleri ve yağ dokusunun depolanması gibi önemli işlevleri olduğu bulunmuştur (Davey vd., 1999).



Şekil 1.5. STAT proteinlerinin yapısı (Jatiani vd., 2011)

1.2.2. STAT Gen Yapısı ve Aktivasyonu

STAT'lar, sitokinlerin hareketlerine ve hedef hücrelerdeki farklı peptit hormonlarına aracılık ederler ve yedi adet transkripsiyon faktörüne sahiptirler (Flisikowski ve Zwierzchowski, 2003). STAT ailesinin bütün elemanları oldukça korunmuş moleküler bir yapıya sahiptir ve 750-850 aminoasitten meydana gelen proteinler olarak bilinmektedirler (Pauku vd., 2004; Hennighausen ve Robinson, 2008).

STAT proteinlerinin her biri altı adet fonksiyonel korunmuş bölgeye sahiptir (Şekil 1.5). Bu korunmuş fonksiyonel bölgeler; bir aminoterminal bölge (NH₂), bunun devamında bir sarılı bobin bölgesi (coiled-coil), bir DNA bağlama alanı (STAT2 hariç) (DBD), bir bağlayıcı bölge (LK), bir SH2 alanı, amino terminusundan yaklaşık 700 amino asitlik bir korunmuş tirozin kalıntısı ve bir karboksil terminal transaktivasyon bölgesidir (TAD) (Lin ve Leonard, 2000; Yu ve Jove, 2004).

Aminoterminal bölge, fosforile edilmemiş STAT'lar arasında dimer oluşumuna yardımcı olmakta ve 125 amino asitten oluşmaktadır. STAT'ların dinlenme esnasında "kapalı" bir konformasyonda kalmasını sağlamakta, aynı zamanda teslimat ve ardından reseptördeki STAT çiftlerinin aktif olmasında yardımcı olmaktadır.

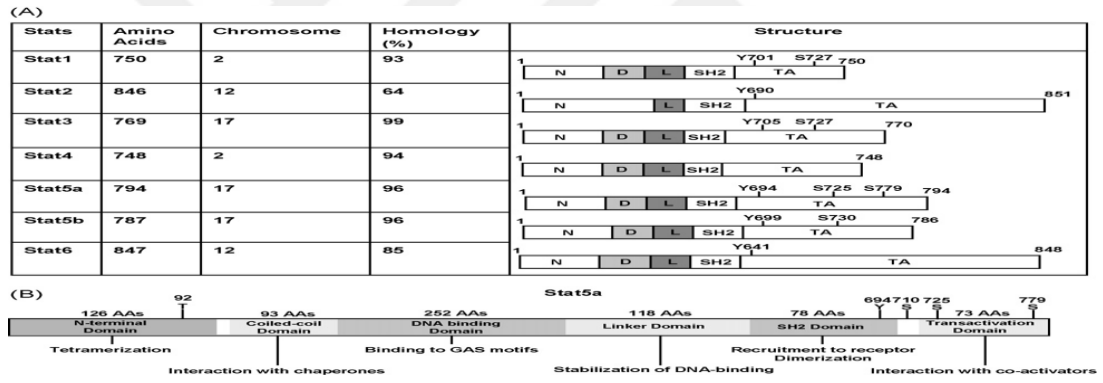
Sarılı bobin bölgesi, çekirdeğin yan tarafından çıkıntı yapan potansiyel olarak dinamik dört helezon demetinden meydana gelmektedir. Sarılı bobin bölgesi, düzenleyici proteinlerle alakalı olmakta, nükleer ihracat ve ithalat sürecinin denetlenmesinde görev almaktadır (Schindler and Plumlee, 2008). DNA'ya sağlıklı bir bağlanma sağlayan bölge ise DNA bağlanma bölgesidir ve iyi korunmuştur. Aktif dimerleşmeyi yapısal olarak DNA bağlama motifine çeviren bölge ise Bağlayıcı bölge (LK) olarak adlandırılmaktadır. Bu bölgenin ayrıca, devamlı bazal nükleer ihracat sürecini de denetlediği araştırmalarda gözlenmiştir. En çok korunan motif olarak tanımlanan bölge SH2 bölgesidir. SH2 bölgesi aktif STAT dimerlerin oluşumuna aracılık etmekte ve reseptör zincirlerine spesifik alımı sağlamaktadır. STAT- reseptör, STAT- JAK ve STAT- STAT etkileşimlerinde görev alırlar. 5-7 özgül karboksi terminal aminoasitleriyle birlikte C- terminal ucu çoğunlukla 700. aminoasit tortusu yakınında bulunan bir tirozinden meydana gelmektedir. Görevi, transkripsiyonel aktiviteyi kontrol etmektir. Karboksi ucunda bulunan tirozin aminoasiti, STAT ailesi üyeleri arasındaki sekans ve uzunluk açısından oldukça farklılık göstermektedir. Tüm STAT proteinlerinin DNA'ya bağlanmasında ve tirozinlerin fosforile edilmesi işlevlerinin düzenlenmesinde rol almaktadır (Doğan ve Güç, 2004; Schindler ve Plumlee, 2008).

Peptit reseptörleri, büyüme faktörü veya sitokinlerden aldıkları sinyaller ile aktive edilen ve bu sinyalleri çekirdeğe ileten latent (sessiz) sitoplazmik transkripsiyon faktörleri olarak görev alan STAT proteinleridir. STAT proteinleri aktifleştiklerinde önce fosforile edilerek, sonra da dimerleşerek çekirdeğe hareket etmekte ve belirlenen genin promoter bölümüne tutunarak gen ekspresyon değişikliklerine sebep olmaktadır (Yu ve Jove, 2004). STAT proteinleri, belirlenen genlerinin akış yönünde olan aynı kökenli tepki elementlerine tutunup bazal transkripsiyonel mekanizmalarla etkileşerek transkripsiyonu düzenli hale getirmektedirler (Saydam, 2017).

Jak kinazlar tarafından STAT'lar, tirozin fosforilasyonu yoluyla aktifleştirilmekte, hedef gen ekspresyonunun düzenlenmesine ve nükleer translokasyona neden olmaktadır (Pauku ve Silvennoinen, 2004).

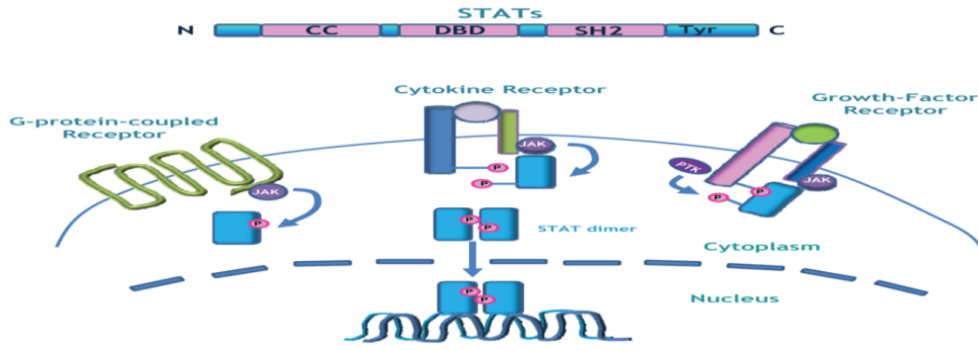
Reseptör / JAK kompleksine tutunduktan sonra, STAT proteinleri kendi kendine fosforile olmakta ve dimerleşmektedirler. Dimerler, özgül DNA elementlerini tanımak suretiyle çekirdekte birikmekte ve transkripsiyonu aktif hale getirmektedirler (Bromberg vd., 1999; Arbouzova ve Zeidler, 2006).

STAT proteinlerinin aktif hale gelmesi, hayatta kalma, hücre çoğalması, gelişme ve farklılaşma gibi önemli hücresel görevleri kontrol eden genlerin sentezlenmesine yardımcı olmaktadır. Normal olmayan STAT proteinlerinin aktivasyonu bir çok kanserlerde ve özellikle lösemide bulunmuş ve neoplaziye STAT aktivasyonunun katkıda bulunduğu rastlanılmıştır (Chaix vd., 2011). STAT'lar sınırlı sayıda da olsa mutasyon geçirmekte, hiper aktivasyona uğramakta ve çoğunlukla aşırı eksprese edilmektedir. Normal olmayan aktivasyonlarının kaynağı budur (Moriggl vd., 2005).



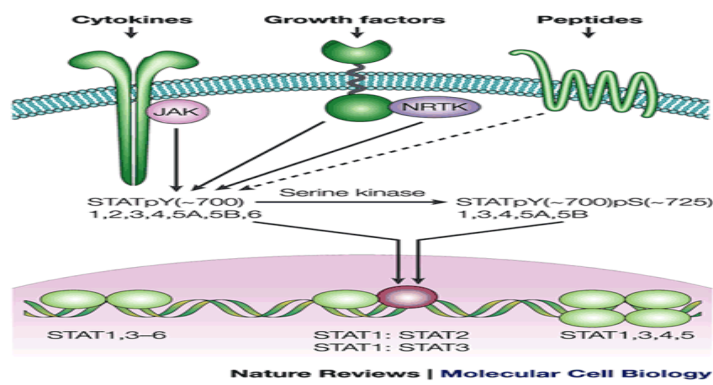
Şekil 1.6. STAT transkripsiyon faktörleri ailesinin üyeleri (Liao vd., 2010).

Büyüme hormonu (BH) kendine ait olan reseptöre bağlanmakta, reseptöre bağlı olan JAK2'yi ise harekete geçirerek kendisi ile BH reseptörü içinde tirozinlerin fosforilasyonunu gerçekleştirmektedir. Bu tirozinler, sinyal aktive edicileri ve sinyal transdüserleri, STAT transkripsiyon ailesinin bir dizi sinyal proteinleri için bağlanma bölgeleri oluşturmaktadırlar (Herrington vd., 2000).



Şekil 1.7. JAK/ STAT Aktivasyonu (Donohue vd., 2010)

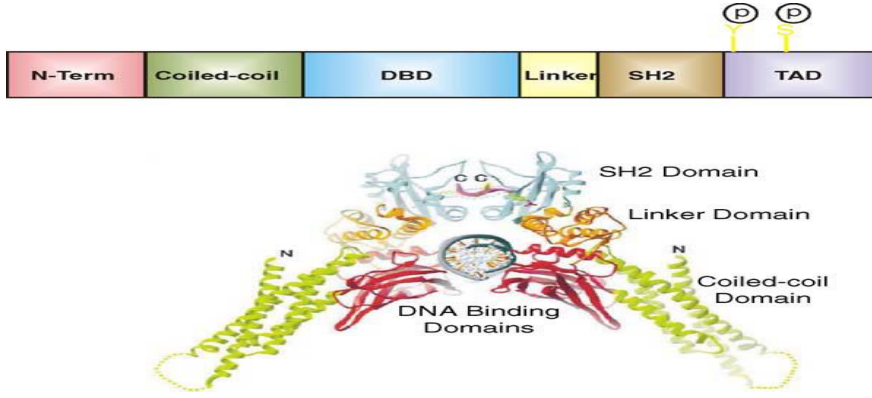
Uyarı olmadığında ise, STAT proteinlerinin monomerik olarak sitozolde gizli bir şekilde bulunduğu tahmin edilmektedir. Sitoplazmada bulunan STAT proteinlerinin yeri tam olarak bulunamamıştır. Sitokinlerin uyarımı neticesinde reseptörlere alınan veya yapısal olarak reseptörlerle bağlantılı olan JAK kinazlar, STAT proteinleri için yerleştirme bölgesi olarak görev alan reseptör üzerindeki tirozin tortularını fosforile etmekle sorumludurlar (Lin ve Leonard, 2000). Tirozin fosforile edildikten sonra, STAT proteinleri üzerinde yer alan fosfotirozin kalıntıları, farklı bir STAT proteininin SH2 alanı için yerleştirme bölgesi olarak görev yapmaktadır. Bu şekilde STAT'lar, heterodimerize ya da homodimerize olmakta ve çekirdeğe translokasyonu gerçekleştirmektedir (Lin ve Leonard, 2000; Frasor ve Gibori, 2003). STAT proteinleri fosforile olduktan sonra çekirdeğe taşınıp, özgül DNA molekülünü bağlayarak direkt kopyalama işlemini gerçekleştirmektedirler (Darnell vd., 1994).



Şekil 1.8. STAT aktivasyon mekanizmalarındaki değişiklikler (Levy ve Darnell, 2002)

STAT aktivasyonu sitokinlerin de yardımıyla şu basamaklardan oluşmaktadır. İlk olarak, hücre yüzeyindeki reseptörüne sitokin bağlanarak alt bir birim oluşmaktadır. Sonrasında ise oligomerizasyon meydana gelmektedir. Oligomerizasyon, reseptör ile alakalı olan JAK proteinlerinin çapraz fosforilasyon ile aktivasyonuna sebep olmaktadır. Aktifleşen JAK proteinleri de reseptörün fosforile edilmesine neden olmaktadır (Bowman vd., 2000). Bu fosforile bölgeler reseptör üzerinde bulunmakta ve sitoplazmada aktif olmayan bir şekilde bulunan STAT'ların reseptör ile etkileşime girmesine olanak sağlamaktadır. Sonra STAT proteinleri reseptörden uzaklaşmakta ve birbirleri ile heterodimer ya da homodimer oluşturmaktadır. STAT proteinleri dimerleştikten sonra hücre çekirdeğine gelip DNA üzerindeki promoter alanlarla etkileşim göstererek hedef genlerin transkripsiyonunu uyarmaktadırlar (Doğan ve Güç, 2004).

Hücre için önemli görevleri olan STAT'ların aynı zamanda bu görevlerin kontrolünü sağlamak için de sayıca fazla düzenleyici mekanizmalarının var olduğu bilinmektedir. Bu düzenleyici mekanizmalar ikiye ayrılır; pozitif regülatörler olarak bilinen yol sinyalizasyonunun transdüksiyonu için aktivasyonu gerekenler ve sinyal verme gücünü azaltmak için davranan negatif regülatörler. Sonuç olarak STAT sinyallerinin sonlandırılmasının defosforilasyon sayesinde olabileceği gösterilmiştir. Bu işlem aynı zamanda STAT proteinlerinin ubiquitin/proteasom aracılı bozunumuyla veya STAT proteinlerinin SOCS (Sitokin sinyalleri Baskılayıcıları) ailesi tarafından aracılık edilen daha basit bir negatif geri besleme döngüsüyle direkt inhibisyon yoluyla da sağlanabilmektedir (Lin ve Leonard, 2000). Genellikle omurgalı canlılarda, SOCS proteinlerinin JAK / STAT yol sinyalizasyonunu birkaç çeşit mekanizmayla baskıladığı bulunmuştur (Davey vd., 1999; Schindler ve Plumlee, 2008). STAT5 aktivasyonunun dengelenmesi SOCS'un PRL reseptörü yoluyla olduğu gösterilmiştir. STAT5A'nın hızlı bir şekilde aktivasyonunun oluşmasına ve hızlandırılmış alveolar çoğalma ve farklılaşmasına SOCS eksikliğinde rastlanılmaktadır (Hennighausen ve Robinson, 2008).



Şekil 1.9. STAT kristal protein yapısı (Paukku ve Silvennoinen, 2004)

1.2.3. STAT3 Gen Özellikleri

Stat3 geni farklı isimlerle anılmaktadır. Bunlardan bazıları;

- APRF
- Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü 3
- Akut-Faz Tepki Faktörü
- DNA Bağlayıcı Protein APRF
- ADMIO
- HIES
- ADMIO1
- Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyonun Aktivatörü 3 (Akut-Faz Tepki Faktörü)
- STAT3

Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü (STAT3), özellikle interlökin-6 (IL-6) ailesi olmak üzere geniş bir reseptör yelpazesinin aşağı akışında aktifleşen bir transkripsiyon faktörü olarak bilinmektedir (Gharibi vd., 2020). Büyüme faktörlerine ve sitokinlere cevap olarak STAT ailesi üyeleri, reseptörle alakalı kinazlar tarafından fosforilasyonu sağlandıktan sonra, transkripsiyon aktivatörleri olarak hücre çekirdeğine hareket ederek translokasyon yapan heterodimerler veya homodimerler oluşturmaktadır. Farklı sitokinlere ve IFN'ler, EGF, IL5, IL6, HGF, LIF ve BMP2 gibi büyüme faktörlerine cevap olarak fosforilasyon yoluyla STAT3 proteini aktif edilmektedir. STAT3 proteini, hücre uyaranlarına yanıt olarak farklı genlerin ekspresyonuna yardımcı olmakta ve bundan dolayı hücre büyümesi ve

apoptoz gibi birçok hücrel faaliyetlerde önemli görev almaktadır. Küçük GTPase Rac1'in STAT3 proteinine bağlandığı ve aktivasyonunu düzenlediği bildirilmiştir. PIAS3 proteini, STAT3 proteininin özgül bir inhibitörüdür. Bu gende meydana gelen mutasyonlar, multisistem otoimmün hastalığı ve hiper-immünoglobulin E sendromu ile alakalı olduğu, alternatif birleştirme, çeşitli izoformları kodlayan çoklu transkript varyantları ile neticelenmektedir (Hillmer vd., 2016).

STAT3 (Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon 3 Aktivatörü) geni, STAT gen ailesinin bir parçasıdır. STAT genleri, hücredeki temel kimyasal sinyal yollarının parçası olan proteinleri sentezlemek için talimatlar vermektedirler. STAT proteinleri belirli kimyasal sinyallerle aktifleştğinde, hücre çekirdeğine hareket ederek özgül DNA'nın belirli alanlarına bağlanmaktadır. Bu proteinler, genlerin yakınında bulunan düzenleyici alanlara tutunmaktadır ve bu işlem proteinlerin bu genlerin aktif ya da inaktif olup olmadığını kontrol etmesine neden olmaktadır. Bundan dolayı STAT proteinleri, transkripsiyon faktörleri olarak adlandırılmaktadır (Matsuda vd., 2001).

STAT3 proteini, gen aktivitesinin düzenlediğinden dolayı birçok hücrel fonksiyonda görev almaktadır. Mesela hücrenin kendi kendini yok etmesini (apoptoz), hücre hareketini (göç), hücre büyümesini ve bölünmesini (proliferasyon) kontrol etmekte sorumludurlar. Vücuttaki dokularda STAT3 proteini aktiftir. Farklı vücut sistemlerinin işlevlerinde ve bu sistemlerin gelişmesinde önemli görevleri vardır ve yaşam için gereklidir. İmmün sistemde STAT3 proteini, bu sistemin hücrelerinin, genellikle T ve B hücrelerinin olgunlaşması için sinyaller oluşturmaktadır. Bu bağışıklık sistemi hücreleri, vücudun mantar ve bakteriler gibi yabancı istilacılara karşı tepkisini kontrol etmekte önemli yer tutmaktadırlar. Ayrıca bu protein, immün sisteminin yaralanmaya ve enfeksiyona karşı yanıt oluşturmalarının sonucu olan iltihaplanmanın düzenlenmesinde görev almakta ve alerjik reaksiyonları aktif eden hücrel süreçlerin de kontrolünü yapmaktadır. İskelet sisteminde ise STAT3 proteini, kemik dokusunu parçalayan ve oluşturan özel hücrelerin oluşmasında görev almakta ve kemiklerin normal şekilde gelişebilmesi için gerekli olduğu bildirilmektedir (Gao vd., 2007).

Sayısı 20'lere ulaşan STAT3 gen mutasyonunun vücut sistemini etkileyen birçok otoimmün bozukluğa sebep olduğu bildirilmiştir. Vücudun kendi dokularına ve hücrelerine saldırdığı, bağışıklık sisteminin bozulduğu bir grup bağışıklık sistemi anormalliklere otoimmün bozukluk adı verilmektedir. Bu koşullarda meydana gelen mutasyonlar genellikle kalıtsaldır ve vücudun hemen hemen bütün hücrelerinde bulunmaktadır. Bu durum germ hattı mutasyonları olarak da adlandırılmaktadır. Bu mutasyonlar STAT3 proteininde yer alan tek bir protein yapısını (amino asitler) değiştirerek anormal derecede aktif durumda olan değiştirilmiş bir proteine sebep olmaktadır. Mutasyonlar tüm bunlardan dolayı, "fonksiyon kazancı" olarak bilinmektedir (Haapaniemi vd., 2014).

Hücre gelişmesini ve büyümesini kontrol eden sinyallere cevap olarak STAT3 proteini açılıp kapanmaktadır. STAT3 proteininin devamlı aktif halde olması, bu kimyasal sinyallerin olmadığında bile çekirdeğe mesajları iletmektedir. Anormal STAT3 aktivasyonu, immün sistemin normal şekilde kontrolünü engelleyerek otoimmüniteye sebep olmaktadır (Hodge vd., 2005).

Sığırlarda STAT1 ve STAT3 genlerindeki polimorfizmler arasındaki etkileşimlerin ve döllenme ile invitro fertilizasyon sistemi kullanılarak erken embriyonik hayatta kalma oranlarının etkileri araştırılmıştır. STAT3 geninde iki SNP (SNP25402 ve SNP19069) tanımlanmış ve SNP25402 ile döllenme oranı arasında anlamlı bir ilişki olduğu ortaya konulmuştur. Bu iki STAT3 SNP arasındaki ve önceden tanımlanmış bir STAT1 SNP(SNP213) ve SNP19069 arasındaki etkileşimler, embriyonik ölüm oranı için son derece önemli bulunmuştur (Khatip, 2009)

Bazen hücre içinde STAT'lar birbirlerine zıt olaylara aracılık etmektedir. Apoptozisi uyarabilirler ve hücre poliferasyonunu indükleyebilirler (Yılmaz vd., 2009). STAT3'ün erken embriyonik gelişim için önemli olduğu ve bu genin ekspresyonunun tümör hücrelerinin kemokin üretmesine ve sitokinlerin inhibisyonuna neden olduğu bildirilmektedir (Tezcanlı, 2010).

“Null” fareler her iki STAT3 geninin aleline sahip değilse embriyonik-letal bir fenotip sergilemektedirler. Bundan dolayı STAT3 geninin erken embriyonik dönem için önemli bir yere sahip olduğu kanıtlanmıştır (Takeda, 1997).

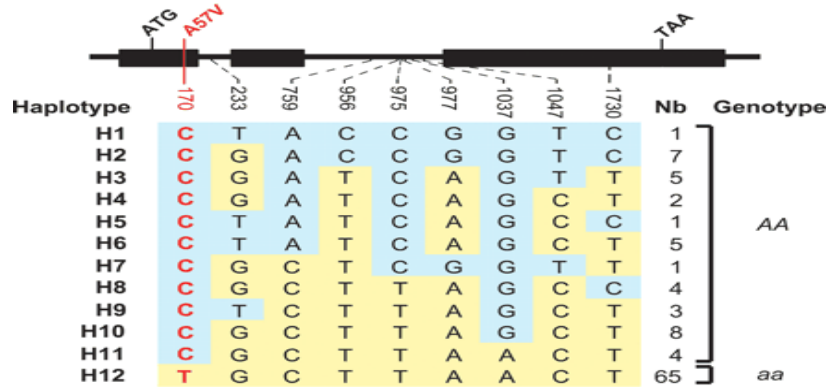
STAT3 proteinin yokluğunda fetal ölümler oluşmakta, dokularda hücre ölümleri meydana gelmekte ve patojenlere verilen cevabın bozulmasına sebep olmaktadır (Paukku ve Silvennoinnen, 2004).

1.3. Holştayn Haplotipler (HH)

Birlikte aktarılan kromozomlar üzerinde birbirleriyle alakalı lokuslardaki allel kombinasyonuna ya da DNA dizisine genetikte haplotip adı verilmektedir. Bir haplotip, belirli lokus kümelerinden oluşan rekombinasyon vakalarına bağlı olarak tek bir lokusu veya tüm bir kromozomu içerebilir (International Hapmap Consortium, 2003).

Haplotipler istatistiksel olarak, birbiriyle ilişkili bir kromozom çiftinin tek bir kromozomu üzerinde yer alan tekli nükleotit polimorfizm dizileridir. Bu istatistiksel bağlantının ve haplotip öbeğindeki bazı allellerin belirlenmesi ile bu bölgedeki diğer polimorfik konumların da belirlenebileceği düşünülmektedir (International Hapmap Consortium, 2005).

Birlikte atadan genetik geçiş olarak alınan tek bir kromozom üzerindeki bir dizi tek nükleotid polimorfizminden (SNP’ler) oluşmaktadır. Genellikle SNP’ler ya da genler ayrı birer terim olarak düşünülmektedir, fakat tek bir kromozomda yan yana bulunan SNP’ler çoğunlukla her zaman bir birim olarak, birlikte atadan genetik geçiş olarak alınmaktadır ve genetik olarak bağlanmış gen gruplarıdaki allellerin belirli kombinasyonları, bu gen grupları, aynı kromozomdaki birbirine yakın bölgelerde yer alan genlerin kodlanmasıyla oluşmaktadır (Kerchner, 2005).



Şekil 1.10. CmACS-7 deki tanımlanmış haplotip (Kerchner, 2005)

Dünyada sığır genomu hakkında artan bilgiler ışığında çok sayıda sığır genetik kusuru keşfedilmiştir. Holstein, Jersey, Brown Swiss ve Ayrshire ırklarındaki bir dizi yeni genetik koşul hakkında bazı bilgileri ortaya çıkmaktadır. Araştırmalarda sığırlardaki haplotipler homozigot durumda olduğunda embriyonik ölümlere veya ölü doğumlara neden olduğu dokuz haplotip belirlenmiştir. Bunlar, genomik değerlendirmeler için kullanılan inek ve boğaların SNP50 genotip veri tabanının tamamı değerlendirilerek ve çeşitli haplotiplerin sıklığı incelenerek keşfedilmiştir. Haplotip için homozigot olan canlı bireyler seçilip ve taşıyıcı boğalarla inekler çiftleştirildiğinde gebe kalma oranında gözlenen bir azalma ya da ölü doğumlarda artış belirlenmiştir (Georges vd., 2019).

Türkiye’de bulunan donmuş boğa spermalarının büyük bir çoğunluğu ithaldir. Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından Türkiye’ye ithal edilen donmuş bu boğa spermalarında ithal esnasında uyulması gereken usul ve kurallar, her yıl güncellenerek yayımlanmıştır (HAYGEM 2016a). Bu kurallara göre ise pedigreede “Holstein ırkına ait boğaların BLAD ve CMV hastalıklarından ari olduğuna dair TL/BLF ve TV/CVF simgeleri ile Brachyspina hastalığı (TY/BYF), kırmızılık gen taşıyıcılığı ile haplotype (Holstein için; HH1, HH2, HH3, Brown Swiss için, BH1 ve Jersey için, JH1) taşıyıcılığı, benzer hastalık ve genetik kusurlarda gen taşıyıcısı olmadığına dair simgeler” bulunması gerekmektedir.

2015 yılında Türkiye’de Tarım ve Orman Bakanlığı sayesinde ithalatına izin verilen donmuş spermardan 273 Holştayn boğadan 79’u (%28.94) kalıtsal kusurlardan ez az birini taşımaktadır. 2015 yılında sperma ithalatı talimatlarına giren

haplotipler, genel anlamda embriyonun ya da zigotun ölümüne yol açmış ve gebelik oranlarında düşüş gözlenmiştir. Holştayn sığırlarda beş farklı haplotip (HH1, HH2, HH3, HH4 ve HH5) bulunmakta ve bulunan bu haplotiplerin homozigot yapıda bulunması halinde (Ör: HH5-HH5) zigot ölmekte ve gebelik oluşmamaktadır. Haplotip genlere sahip olan boğa spermalarının ithalatı ve bu spermaların Türkiye’de kullanımı devam ettikçe, gebelik oranları düşecek, Türkiye sütçü sığır sürülerinde zararlı genlerin frekansı artacak, her bir gebelik için daha fazla tohumlama yapılacak, daha az buzağı, daha az damızlık düve elde edilecek ve sonuç olarak daha fazla damızlık düve ithalatı gerçekleşecektir (İnal ve Çam, 2016).

Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından belirlenen ve takibi yapılan “donmuş boğa sperması ithalatında uyulması gereken usul ve kurallar” neticesinde boğaların Haplotip allellerini taşınamaması gerekmekte idi. Fakat yapılan bir araştırmada (İnal ve ark, 2016) ithal edilen 273 boğanın donmuş spermasında 1 boğada HH1, 1 boğada HH2, 4 boğada HH3, 6 boğada HH4 ve 22 boğada HH5’e rastlanmıştır. Özet olarak 31 boğa (%11.36) en az bir haplotipi taşımaktadır. Bu yüzden 274.525 (%11.70) payet spermada en az bir haplotipe rastlanılmaktadır.

Bu haplotiplerin etkileri popülasyondaki sıklığına ve gebeliklerin hangi aşamada kaybedildiğine göre değişmektedir. Bu haplotiplerin sıklığını, embriyonik ölümler ve ölü doğum oranları Tablo 1.3’de verilmiştir. Popülasyonda görülme sıklığı daha yüksek olan haplotipler gebeliğin ilerleyen dönemlerinde daha fazla embriyonik ölümlere neden olmaktadır (VanRaden vd., 2011).

Haplotiplerin her biri farklı ve benzersiz bir genetik durumu temsil etmektedir. HH2 için heterozigot olan bir boğa, HH3 için heterozigot olan bir inekle çiftleştirildiğinde haplotiplerin hiçbir etkisi bulunmamaktadır. Risk, sadece hayvan genomunun aynı haplotip için heterozigot olmasında yaşanmaktadır (Lee, 2013).

1.3.1. Holştayn Haplotip 5’in Yapısı

Ekonomik açıdan önemli birkaç sığır ırkı için SNP verilerinin bulunmasıyla, bilinmeyen resesif genetik bozuklukları belirlemek için haplotip testleri yapılmıştır.

Holstein sığırlarında birçok ölümcül haplotip ortaya çıkmıştır. Bu ölümcül haplotiplerden birisi de HH5'tir. HH5, sadece dimetil-adenosin transferaz 1 (TFB1M) barındıran, kromozom 9 (BTA9) üzerindeki pozisyon 93,233 kb'den 93,371 kb'ye uzanan 138 kbp'lik bir delesyondan kaynaklanmaktadır (Schütz E vd., 2016)

Tablo 1.2 Doğurganlığı ve ölü doğumu etkileyen yeni haplotiplerin yerleri ve birincil kaynak ataları (Fritz vd., 2013).

Haplotip	Kromozom	Konum (Mbase)	Ata	Doğum yılı
HH4	1	1.2-3.3	FRA4486041658 Besne Buck	1986
HH5	9	91,8-93,8	CAN264804 Thornlea Texal Supreme	1957

Tablo 1.3 Yeni haplotiplerin doğurganlık ve ölü doğum üzerindeki güncel sıklıkları ve etkileri (VanRaden vd., 2011)

Haplotip	Taşıyıcı frekansı	Beklenen homozigotlar	Gözlenen homozigotlar	Taşıyıcı eşleşmeleri	Gebelik oranında azalma	Taşıyıcı eşleşmeleri	Ölü doğum artışı
	(%)	(n)	(n)	(n)	(%)	(n)	(%)
HH4	0.7	1	0	1.034.511	-3.01	Yok	Yok
HH5	4.8	7	12	5.025	-3.5 ± 0.6	1.115	0.7 ± 0.7

HH4 taşıyıcılarının sıklığı Fransa'da % 7,2'dir ve önemli bir taşıyıcı olan Jocko Besne'nin birçok spermasını kullanan diğer ülkelerde de yüksek olabileceği düşünülmektedir. Ancak Kuzey Amerika'da sıklık yalnızca % 0,7 düzeyindedir. HH5 taşıyıcılarının sıklığı, 2000 yılından önce % 1'den az iken, yakın zamanda popüler olan taşıyıcı bir boğa MGS, spermalarının kullanılmasıyla %5'e yükselmiştir. Pedigri analizi ve genotipleme sonucunda haplotip altı kuşak önce doğmuş bir ataya kadar izlenmiştir (Fritz vd., 2013).

HH4 ve HH5 için gebe kalma oranı üzerindeki etkiler, önceki doğurganlık haplotiplerine benzer olduğu bulunmuştur ve HH5 kaynaklı doğurganlık kayıplarının

tamamının gebeliğin 60. gününden önce gerçekleştiği tahmin edilmektedir (VanRaden vd., 2011).

1.4. DNA Polimorfizmi

Dünyada olan bütün canlı türlerinin birbirinden farklı durumda olması ve bir türün kendi ırkları arasındaki farklılıklar genetik çeşitlilikten dolayıdır. Bu farklılıklara neden olan polimorfizmler, genetik çeşitliliğe sebep olmaktadır (Ahmadian vd., 2000; Ekmekçi vd., 2008).

DNA dizilerindeki nükleotitlerde meydana gelen değişimler polimorfizm olarak tanımlanmaktadır. Polimorfizm, bir proteinin yapısında değişikliğe sebep olmayan polimorfik DNA dizileri olarak da bilinmektedir. Genetikte doğal olan canlı türlerinin polimorfik olduğu bildirilmektedir (Goodenough vd., 1975; Turner vd., 2004; Utine , 2012).

İnsanlar, hayvanlar ve bitkilerde popülasyonu meydana getiren her üyede nükleotid dizileri farklıdır ve birden çok polimorfizmleri barındırmaktadır. Bu polimorfizmler; ard arda tekrarlamaları (mikrosatellitler ve STR), kısa ve tek nükleotit polimorfizmlerini (SNP'leri) ve restriksiyon parçası uzunluk polimorfizmlerini (RFLP'leri) içermektedir (Bardakçı vd., 2013).

DNA üzerindeki oluşan mutasyonları belirlemek amacıyla restriksiyon parçası uzunluk polimorfizmleri (RFLP) kullanılmaktadır. Mutasyonların neticesinde restriksiyon enziminin kesim bölgesi kaybolmakta ya da yeni bir kesme bölgesi meydana gelmektedir. Uygulanan bu işlem neticesinde, restriksiyon enzimleri ile DNA kesildiğinde uzunlukları aynı olmayan DNA kesitleri meydana gelmekte ve bu DNA kesitlerinin büyüklüklerine bakılarak analiz gerçekleştirilmektedir (Anonim, 2013). Gen haritalamalarının çıkartılmasında, genetik çeşitlilikte ve farklı canlılar arasında olan evrimsel ilişkinin incelenmesinde ve yakın akraba ilişkilerinin araştırılmasında restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi kullanılmaktadır (Filiz ve Koç, 2011; Bardakçı vd., 2013).

STR (Kısa ardışık tekrarlar), AGAGAG gibi kısa ve tekrarlayan diziler şeklinde olmaktadır ve bu şekildeki dizilere mikrosatellitler denilmektedir. Tekrarlayan diziler çoğunlukla 5-20 defa ve 1-13 nükleotit uzunluğunda olabilmektedir. Genellikle mikrosatellitler moleküler yapıda bir belirteç olarak kullanılmakta ve eş baskın yapıya sahip olmaktadır (Anonim, 2013).

Bir genomda yer alan DNA dizisinin içerisinde olan tek bir nükleotitte (A, G, C ya da T) meydana gelen farklılıklara tek nükleotit polimorfizmi (SNP) denilmektedir. Bu farklılıklar nokta mutasyonları diye de bilinmektedirler. Mesela; GGATCCT dizisinden GGATTCT dizisi oluşması SNP (tek nükleotid polimorfizmi) olarak nitelendirilir. Tek nükleotit polimorfizmi genellikle iki allel bulundurmakta, DNA üzerinde yer alan protein kodlama işlevi yapan ya da bu işlevi yapmayan bütün kısımlarda yer almaktadır (Bardakçı vd., 2013). Klinik genetik testlerde, hastalığa neden olan genlerinin belirlenmesinde ve adli tıp bölümlerinde heterozigotluk kaybının araştırılması için yapılan çalışmalarda SNP'lerin önemli rolleri vardır (Ahmadian vd., 2000). İnsan genomu, büyük bir çoğunluğu tek nükleotid (A, G, T, C) seviyesinde olmak üzere (ortalama on milyon civarı) birçok gen polimorfizmi barındırmaktadır. Bu genler, insanda % 1 oranından daha çok sıklıkta görülürler, tek nükleotid değişimlerini içerirler ve allel genler olarak bilinmektedirler. Evrende olan her bir insanın DNA'sı % 99.9 oranında benzerdir. Geride kalan % 0.1' lik oran ise insanların genotipik ve fenotipik çeşitliliklerin nedeni olarak düşünülmektedir. İnsanın genetik yapısında SNP'ler (tek nükleotid polimorfizmleri) DNA dizisi değişimleri olarak bilinirler ve ortalama olarak 1000 nükleotitte bir rastlanırlar (Ekmekçi vd., 2008; Bardakçı vd., 2013). Tek nükleotid polimorfizmleri yalnızca insanlarda görülmediği gibi her canlı çeşitinde meydana gelmektedir (Filiz ve Koç, 2011).

Bu araştırmada, Türkiye'de yetiştirilen Holştayn ırkı sığırlarda STAT ailesinde önemli bir yere sahip olan STAT3 geni ve haplotiplerden olan HH5 genindeki mutasyonların belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Hayvan Materyali

Bu araştırma, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Medikal Biyoloji ve Genetik ABD Laboratuvarı'nda bulunan 70 baş Holştayn ırkı sığıra ait kan örnekleri ile yapılmıştır.

2.1.2. Kullanılan Teknik Aletler

2.1.2.1. PCR Cihazı

Applied Biosystem Veriti 96-Well Thermal Cycler marka PCR cihazı HH5 ve STAT3 genlerine ait bölgelerin çoğaltılması ve sekans PCR'ı yapılması için kullanılmıştır.



Resim 2.1. PCR Cihazı

2.1.2.2. Yatay Elektroforez Sistemi

Kan örneklerinden izole edilen DNA'yı ve PCR için kullanılacak ürünleri görüntülemek için Thermo midicell primo EC 320 ve Thermo midicell primo EC 330 elektroforez jel sistemlerinden faydalanılmıştır.



Resim 2.2. Elektroforez Sistemi

2.1.2.3. Jel Görüntüleme Sistemi

DNA izole edildikten sonra PCR işlemleri yapılmıştır. PCR sonucunda oluşan ürünler elektroforez sisteminde agaroz jelde yürütülmüştür. Elde edilen ürünlerin görüntüleme işleminde Vilber Lourmat BIO-VISION cihazı kullanılmıştır.



Resim 2.3. Jel Görüntüleme Sistemi

2.2. Metot

2.2.1. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Bu araştırmada kullanılan kan numuneleri, DNA izole edilene kadar, Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Medikal Biyoloji ve Genetik A.B.D. laboratuvarında, -20 °C’de cryo tüplerde muhafaza edilmiştir.

2.2.2. DNA İzolasyonu

Çalışmada kan örneklerinden, spin kolon yöntemi kullanılarak DNA izole edilmiştir. 10 µl Proteinaz-K (20mg/ml), 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüplere konulmuştur. Ardından 200 µl kan numuneleri tüplere ilave edilmiştir. Oluşan karışımın üzerine 200 µl miktarında ekstraksiyon çözeltisi eklenmiştir ve 15 sn. kuvvetli bir şekilde vortekslenip, 56°C’de 15 dk etüvde bekletme işlemi yapılmıştır. Süre tamamlandıktan sonra etüvden çıkartılıp kapakta kalan damlacıkları uzaklaştırmak amacıyla kısa süreli santrifüj işlemi uygulanmıştır. Sonrasında üzerilerine 210 µl kadar binding buffer ilave edilerek 15 sn vortekslenmiştir. Kapakta kalan damlacıkları uzaklaştırmak için kısa süreli santrifüj işlemi uygulanmış ve lizatlar spin kolon tüplerine aktarılmıştır. Tüplerin kapakları kapatılarak 1 dk kadar 8.000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpünün altında kalan sıvı atılmıştır. Sonrasında, 650 µl yıkama solüsyonu-I spin kolonların üzerine eklenerek 1 dk 8.000 rpm’de santrifüj edilerek toplama tüpünün altındaki sıvı dökülmüştür. 500 µl yıkama solüsyonu-II spin kolonlara eklenerek 1 dk 8.000 rpm’de santrifüj işlemi uygulanmış ve tekrar toplama tüpünün altında kalan sıvı kısım atılmıştır. Daha sonra, tekrar 250 µl yıkama solüsyonu-II spin kolonlara ilave edilerek 3 dk 14.000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Yeni mikrosantrifüj tüplere, spin kolon aktarılmış ve üzerilerine 200 µl TE buffer (10mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0) solüsyonu ilave edilerek 5 dk oda sıcaklığında bırakılmıştır. Bekleme süresi dolduktan sonra tüpler, 1 dk daha 8.000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Elde edilen DNA’lar daha sonra kullanılmak için -20°C’de muhafaza edilmiştir.

2.2.3. Primer Tasarımı

STAT3 ve TFB1M gen dizisi için NCBI kullanılarak ve FastPCR Professional 6.1.2 paket programı'ndan (Kalendar vd., 2009) faydanılarak primer tasarlama işlemi yapılmıştır. Primerlerin arasında hairpin ve dimer oluşup oluşmadığı bu program sayesinde kontrol edilmiştir. Bu araştırmada kullanılan primerler Tablo 2.1. de verilmiştir.

Tablo 2.1. Çalışmada Kullanılan primerler

Gen	Forward 5' → 3'	Revers 5' → 3'	Tm (°C)	Baz çifti
STAT3	AACTATGTTACTTGTGGCCC	AACAGATCACCAGGCTCTCC	64	514
TFB1M (HH5)	AGATATGCTAAAGTTTACCT AGAAGAA	CTGAAGCTCCATTCTGAGTC AT	56	442

2.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Gradient PCR, primerlerin bağlanma sıcaklığının (Tm, Melting Temperature) belirlenmesinde kullanılmıştır. Bu nedenle, 1 µl 1xPCR, 3 mM 0,7 µl MgCl₂, 2,2 µl 5Q solüsyonu (Qiagen) 2 mM 0,2 µl dNTP, 2,5 mM 0,25 µl forward 1 ve 0,25 µl revers 1 Platinum Taq polimeraz (Invitrogen), 1 µl DNA (20 ng/µl) ve 4,4 µl ultra distile su ilave edilmiş toplam hacimin 10 µl olması sağlanarak bir PCR karışımı elde edilmiştir. STAT3 ve HH5 primerlerine ait Tm dereceleri Tablo 2.1'de verilmiştir.

2.2.5. Agaroz Jel Elektrofrez

İzole edilen DNA'ları ve elde edilen PCR ürünlerini görüntüleme işlemi için (% 1'lik) agaroz jel yapılmıştır. Bunun için 1 gr Agaroz tozu ile 100 ml TAE (Tris-Asetat- EDTA) solüsyonu karıştırılmış ve mikrodalga fırında erimesi sağlanmıştır. Eriyen jelin içine 1 µl kadar RedSafe boya solüsyonu ilave edilmiştir. Oluşan karışımın ılık bir hale gelmesi beklenmiş sonrasında elektroforez tepsisine aktarılmıştır. Elde edilen jel 30 dk oda sıcaklığında ve 30 dk' da buzdolabı içinde +4 derecede katılaşması için bekletilmiştir. Sonrasında elektroforezin içinde bulunan

taraklar tepside uzaklaştırılmıştır. Tepsi, elektroforez tankına alınmıştır. Elektroforez tankına jelin üzerine geçecek şekilde TAE solüsyonu koyulmuştur. Oluşan her bir kuyucuğa 8,5 µl kadar yükleme boyası (Loading Dye) ile 2,5 µl miktarında PCR ürünü barındıran karışım ilave edilmiştir. Yükleme işleminden sonra cihaz çalıştırılmış ve 30 dk boyunca örnekler 90 Volta jelde yürütülmesi sağlanmıştır. Ardından Vilber Lourmat BIO-VISION jel görüntüleme sisteminden yararlanılarak jel görüntülenmiştir. Görüntünün gözlenmediği bantlar negatif olarak değerlendirilirken görüntünün olduğu bantlar ise pozitif olarak değerlendirmeye alınmıştır.

2.2.6. RFLP (Restriksiyon Fragment Length Polymorphism)

Jelde görüntüleme işleminin ardından aranan mutasyonunun belirlenmesi için STAT3 PCR ürünleri, *Hinf*I (Thermo, ER0801) restriksiyon enzimiyle kesilerek RFLP gerçekleştirilmiştir.

Bu enzim ile protokolde belirtilen oranlarda karıştırılan PCR ürünleri, thermal cycler cihazında inkube edilmiştir (95°C de 2 dk 1 kez, 95°C de 20 sn 64°C de 30 sn 78°C de 1 dk (40 kez), 78°C de 10 dk 1 kez). Ardından restriksiyon enzimiyle kesilerek oluşturulan fragmentler boyutlarına göre ayrılarak polimorfizmlerin belirlenmesi için %2'lik agaroz jelde 40 dakika koşturulmuştur. Bu işlem esnasında fragmentlerin boyutlarının belirlenebilmesi için DNA ladder kullanılmıştır.

HH5 için, aranan mutasyonunun niteliği 138 baz çifti uzunlukta bir delesyon olduğu için herhangi bir enzim ile muameleyi gerektirmeden jelde bantlar arasında fark olması beklenmiştir.

2.2.7. İstatistik Analiz

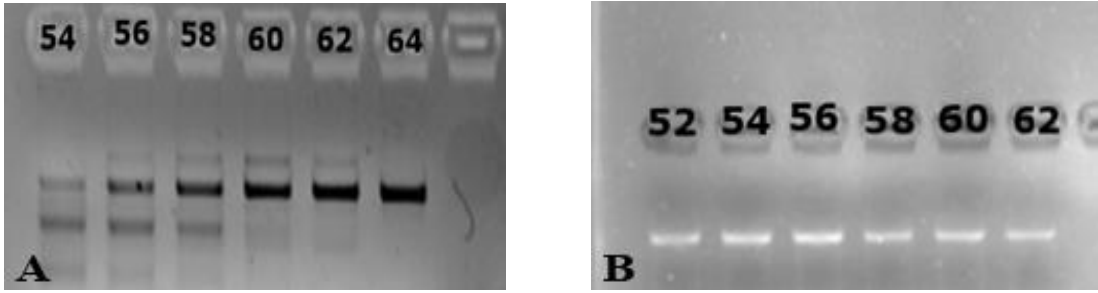
PCR yapılan DNA örnekleri RFLP ile görüntülenmiştir. STAT3 ve HH5 genlerindeki heterozigotluk ve allel frekanslarının hesaplanmasında kullanılan program GENETIX'tir (4.05.02) (Belkhir vd., 1996). Gözlenen ve beklenen heterozigotluk oranları arasındaki kıyaslama Khi kare testi ile belirlenmiştir.

3. BULGULAR

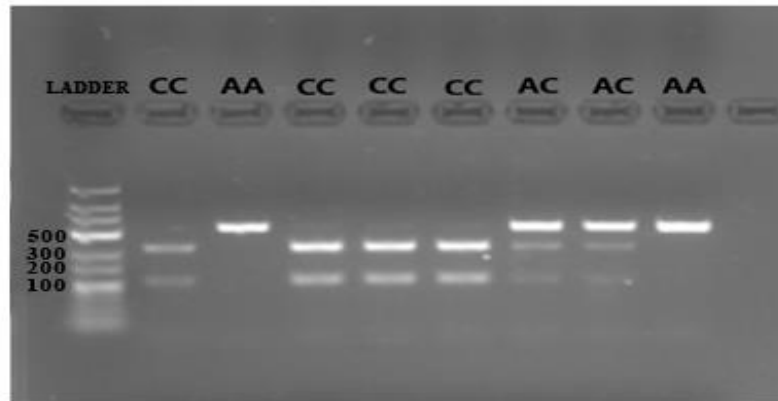
HH5, kromozom 9 (BTA9) üzerindeki pozisyon 93,233 kb'den 93,371kb'ye uzanan 138 kbp'lik bir delesyondan kaynaklandığı bilinmektedir. HH5 için 442 bp uzunluğunda bir bant elde edilmiştir. STAT3 primerleri kullanılarak 514 bp lik bir parça çoğaltılmıştır.

Primerlerin bağlanma sıcaklıklarını belirlemek için yapılan gradient PCR sonucunda; STAT3 primeri için optimum Tm derecesi 64°C, HH5 primeri için optimum Tm derecesi 56°C olarak belirlenmiştir (Şekil 3.1).

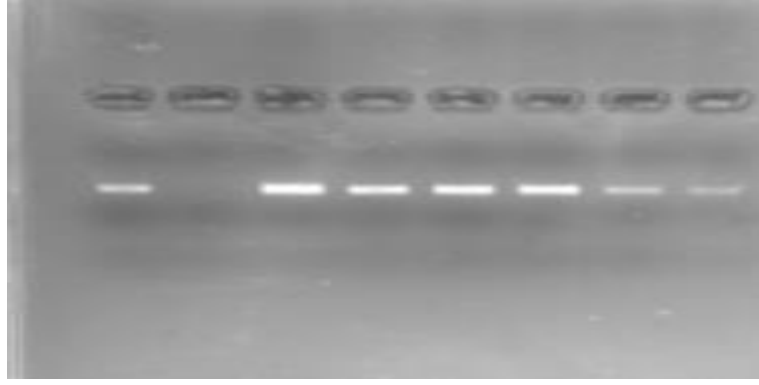
Şekil 3.1. Gradient PCR Agaroz Jel Elektroforezi görüntüsü. A: STAT3, B: HH5



Tüm örneklerin PCR'ları belirtilen Tm derecelerine göre yapılmıştır. RFLP sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 3.2 ve Şekil 3.3 te verilmiştir.



Şekil 3.2. STAT3 SNP25402 Agaroz jel elektroforezi görüntüsü



Şekil 3.3. HH5 geni Agaroz Jel Elektroforezi Görüntüsü

STAT3 SNP 25402 te 514 bp uzunluğunda PCR ürünü elde edilmiştir. HinfI enzimi ile kesim sonucu 359 ve 155 bp uzunluğunda bant elde edilmiştir. Enzim tarafından kesilmemiş ve 514 bp uzunluğundaki bantlara sahip örnekler homozigot AA, enzimce kesilmiş 359 ve 155 bp uzunluğundaki bantlara sahip olan örnekler CC, hem enzimce kesilmemiş hem de kesilmiş 514, 359 ve 155 bp bant büyüklüğüne sahip örnekler heterozigot AC olarak isimlendirilmiştir (Şekil 3.2). HH5 için enzimle kesim uygulanmamıştır ancak 138 bp lik delesyon nedeniyle heterozigotlarda 442 ve 304 bp uzunluğunda iki bant beklenmektedir. Ancak tüm örneklerde 442 bp büyüklüğünde bant gözlenmiştir (Şekil 3.3).

Yapılan analizlerde STAT3 25402 de A allel frekansı 0,421, C allelinin frekansı ise 0,579 hesaplanmıştır. İncelenen örneklerinin %35,7 si heterozigot yapıda bulunmuştur. Khi kare analizinde Hardy-Weinberg dengesinden sapmadığı belirlenmiştir. HH5 haplotipinde ise tüm örnekler aynı genetik yapıdadır ve hiçbir örnekte delesyon bulunmamaktadır.

Tablo 3.1. STAT3 ve HH5 genlerine ait allel frekansları ve heterozigotluk değerleri

Allel	STAT3_25402	HH5
A	0.421	1.000
C	0.579	-
H _{Gözlenen}	0.357	-
H _{Beklenen}	0.488	-
H _{Ortalama}	0.246	

4.TARTIŞMA

STAT3 ve HH5 ile ilgili çalışmalar sığırlar ve fareler gibi memeli birçok canlıda yapılmış ve bu canlılarda birçok tek nükleotid polimorfizmi (SNP'ler) tespit edilmiştir. Genlerin üzerinde yer alan bu SNP'lerin bazılarının embriyonik yaşam süresi üzerinde etkileri olduğu bildirilmiştir. Fakat, yine de Holştayn sığır ırkı üzerine yapılan çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır.

Çeşitli hayvan türleri ile yapılan araştırmalar neticesinde STAT3 geninde yer alan SNP'lerin ve HH5'in embriyonik sağ kalım süresi ve döllenme üzerine etkileri olduğu bildirilmiştir. Bu araştırmada 70 baş holştayn sığır ırkına ait kanlarda HH5 ve STAT3 genleri çalışılmış ve bu genlerdeki heterozigotluk frekanslarına bakılmıştır.

Çalışmada STAT3 SNP 25402 te 514 bp uzunluğunda PCR ürünü elde edilmiştir. Hinfl enzimi ile kesim sonucu 359 ve 155 bp uzunluğunda bant elde edilmiştir. 514 bp uzunluğundaki bantlara sahip örnekler homozigot AA, 359 ve 155 bp uzunluğundaki bantlara sahip olan örnekler CC, 514, 359 ve 155 bp bant büyüklüğüne sahip örnekler heterozigot AC olarak belirlenmiştir. STAT3 25402 de A allel frekansı 0,421, C allelinin frekansı ise 0,579 hesaplanmıştır. İncelenen örneklerinin %35,7 si heterozigot yapıda bulunmuştur. Khi kare analizinde Hardy-Weinberg dengesinden sapmadığı belirlenmiştir.

HH5 te 138 bp lik delesyon nedeniyle heterozigotlarda 442 ve 304 bp uzunluğunda iki bant beklenmektedir. Ancak tüm örneklerde 442 bp büyüklüğünde bant gözlenmiştir. Buna göre HH5 haplotipinde tüm örnekler aynı genetik yapıdadır ve hiçbir örnekte delesyon bulunmamaktadır. Schütz ve diğerlerinin 2016 yılında yaptığı bir araştırmada HH5' in kromozom 9 (BTA9) üzerindeki pozisyon 93,233 kb'den 93,371 kb'ye uzanan 138 kbp'lik bir delesyondan kaynaklandığını ortaya koydular. Bu veriler ışığında çalışmamızda yer alan 70 holştayn sığır ırkında HH5 ve STAT3'e bağlı embriyonik yaşam süresini etkileyecek bir neden bulunmamıştır ve bu iki gen için kalıtsal kusur gözlenmemiştir. Çalışmadaki analiz sonucunda STAT3 25402 ye göre elde edilen %35,7 oranında heterozigot yapıda olan genomlara sahip sığırlarda delesyondan kaynaklanan HH5 gözlense idi bu haplotipe bağlı embriyonik

yaşam süresi kısa olan yavrular ve ölü doğumlar olabilirdi. Bu sığırların atalarına bakıldığında 2015 yılında Türkiye'ye ithal edilen donmuş spermallerden üretildiği düşünülürse, İnal ve diğerlerinin yaptığı bir araştırma sonucunda Türkiye'ye 2015 yılında donmuş sperması ithal edilen 273 boğa içerisinde 1 boğa HH1, 1 boğa HH2, 4 boğa HH3, 6 boğa HH4 ve 22 boğa HH5 geni taşımaktadır. Halbuki Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından belirlenen ve takibi yapılan “donmuş boğa sperması ithalatında uyulması gereken usul ve kurallar” gereğince boğaların bu genleri taşınamaması gerekmektedir. Çünkü bu haplotipler, genel olarak zigot veya embriyonun ölümüne yol açarak gebelik oranlarını düşürmektedir. Şöyle ki, 2015 yılında ithal edilen 273 Holstein boğadan 79'u (%28.94) bu haplotiplere bağlı olarak en az bir kalıtsal kusur taşımaktadır. Geriye kalan 196 (%71.06) boğa ise embriyonik ölümlere sebep olabilecek haplotipleri taşınamamaktadır. Her ne kadar %71.06 oran yüksek görünse de bu haplotiplere bağlı kalıtsal kusurun hiç olmayacağı anlamına gelmemektedir. Kalıtsal kusuru olan sığırların sürüden uzaklaştırıldığı kabul edilirse daha sağlıklı ve verimli döller elde edilebilir. Bu da et ve süt üretimi yapan işletmelerin ekonomik açıdan daha az zarara uğrayacağı anlamına gelmektedir.

İnfertilite, et ve süt üreticileri için ekonomik bir kayıptır. Daha önceki yapılan çalışmalarda JAK/STAT sinyal yolundan farklı genlerin sığırlarda doğurganlık özellikleriyle ilişkileri bildirilmiştir. Erken embriyonik hayatta kalma oranlarını etkileyen genlerden biri de STAT3 tür. STAT3 ve STAT1 genlerinde çekirdeğe giren ve belirli genlerin ekspresyonunu kontrol eden bir heterodimer kompleksi oluşturarak birbirleriyle etkileşimde bulundukları daha önceki çalışmalardan dolayı bilinmektedir. 2009 yılı aralık ayında H Khatib ve diğerleri tarafından holştayn sığır ırkı için yapılan bir çalışmada toplam 7.519 oosit, 445 yumurtalıktan toplanmış, spermilere maruz bırakılmış ve toplam 5.075 embriyo üretmişlerdir. Döllenme oranı, spermilere maruz kalan toplam oosit sayısından döllenmeden 48 saat sonra bölünmüş embriyoların sayısı olarak hesaplamıştır. Embriyoların erken embriyonik hayatta kalma oranı, kültürlenmiş toplam embriyo sayısının 7. günündeki blastosist sayısı olarak hesaplamıştır. Yumurtalık genotiplerinin döllenme üzerindeki etkileri ve erken embriyonik sağkalım oranlarını değerlendirmiştir. Tek SNP analizi, STAT3 teki SNP25402 ile döllenme oranı arasında istatistiksel olarak önemli bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. STAT3 SNP25402 A/C allel frekansını 0.423 olarak hesaplamıştır

ve bu da Hardy-Weinberg dengesine göre <0.001 olarak analiz edilmiştir. Yapılan bu çalışmada ise STAT3 25402 deki A/C allellerindeki heterozigotluk frekansını 0.246 değerinde bulundu ve Hardy-Weinberg dengesinde herhangi bir sapma olmadığı sonucuna ulaşıldı. Khatib ve diğerlerine göre AA genotipli yumurtalıklardan üretilen oositler, AC ve CC yumurtalıklarından üretilen oositler için sırasıyla 0.666 ve 0.663 e karşılık 0.701 döllenme oranı göstermiştir. En yaygın genotip AA (169 birey), AC (155 birey), CC (103 birey) olarak bulunmuştur. A allel frekansının C allel frekansından yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Yaptığımız çalışmada ise en yaygın genotipin CC (28 birey), AC (25 birey) ve AA (17 birey) olduğu belirlenmiştir. Burada da C (0.579) allel frekansının A (0.421) allel frekansından yüksek olduğu görülmektedir. STAT3 SNP (SNP19069/SNP25402) arasındaki etkileşim, hayatta kalma oranı için oldukça önemli olarak bulunmuştur. Embriyonik hayatta kalma ve döllenmede etkili olan genotip kombinasyonları, özellikle süt sığırlarında doğurganlık performansını iyileştirmeyi amaç edinen ıslah programlarına dahil edilmelidir.

Bu zamana kadar holştayn sığırlarda yapılan çalışmalarda STAT3 ve HH5 geninin birlikte çalışılması kısıtlı olduğundan dolayı bulunan veriler bir ilk niteliği taşımaktadır. Bu iki genin fonksiyonları göz önünde bulundurulduğunda, erken embriyonik yaşamda kalma üzerine etkilerinin daha detaylı bir şekilde tespit edilebilmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. STAT3 ve HH5 genlerinin hepsinin ya da ilişkili genlerinin SNP'ler yönünden incelenmesinin embriyonik hayatta kalma ve holştayn sığır ıslahı üzerine katkısı olacağı düşünülmektedir. Zamanla değişen dünyada artan nüfusun et ve süt ihtiyacını karşılayabilmek ve sığırlardan daha sağlıklı verimler alabilmek için holştayn sığır ve diğer çiftlik hayvanları için yapılacak genetik araştırmalarının sayısının artırılması gerekmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Genetik hastalıklar, diğer hastalıklar gibi sığırlarda da ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu sebeple genetik hastalıkların bilinmesi ve gerekli önlemlerin önceden alınması gerekir. Yapılan araştırmalar ile genetik hastalıkların belirlenmesi, takibi ve hastalığa neden olan gene sahip sığırın sürüden uzaklaştırılması daha kolay hale gelmiştir.

STAT3 geni transkripsiyon ailesinin, HH5 ise haplotiplerin bir üyesidir ve embriyonik yaşam süresinde önemli rollere sahiptirler. Ayrıca, yapılan çalışmalarda STAT3 geninin hücre büyümesi ve apoptozunda da görev aldığı bulunmuştur. Sığır yetiştiriciliğinde döl veriminin önemli olması sebebiyle verimle ilgili yapılan genetik çalışmalar önem kazanmaktadır. STAT3 geninin eksikliği ya da aktivasyonunun sağlanmaması durumunda ve HH5 haplotipinin varlığında sığırlarda ve farelerde embriyonik ölümlere sebep olduğu ile ilgili araştırmalar devam etmektedir.

Ancak, şimdiye kadar STAT3 ve HH5 geni üzerinde yapılan araştırmalar oldukça az sayıdadır. Özellikle, bu genlerin embriyonik yaşam süresi ile ilgili olarak yapılan genetik çalışmalar yok denecek kadar azdır. Bu nedenle, bu genlerde daha detaylı ve verimlerle ilişkilendirilen, sahaya yönelik araştırmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Ahmadian A., Gharizadeh B., Gustafsson A.C., Sterky F., Nyren P., Uhlen M., Lundeberg J. (2000). Single-Nucleotide Polymorphism Analysis by Pyrosequencing. *Analytical Biochemistry*, 280: 103-110
- Akbulut Ö., Tüzemen N., Yanar M. (1992) . Erzurum Şartlarında Siyah Alaca Sığırlarının Verimi Döl ve Süt Verim Özellikleri. *Doğa Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi*, 16: 523-533
- Akbulut Ö., Tüzemen N. (1992). Sığırlarda Döl Verimi Ölçüleri. *Atatürk Üniv Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23(1): 104-110
- Akman N., Ulutaş Z., Efil H., Biçer S. (2001). Gelemen Tarım İşletmesinde Yetiştirilen Siyah-Alaca Sürüsünde Süt ve Döl Verimi Özellikleri. *Atatürk Üniv Ziraat Fakültesi Dergisi*, 32(2): 173-179
- Ambrosio R., Fimiani G., Monfregola J., Sanzari E., Felice N.D., Salerno M.C., Pignata C., Urso M.D., Ursini M.V. (2002). The Structure of Human STAT5A and B Genes Reveals Two Regions of Nearly Identical Sequence and an Alternative Tissue Specific STAT5B Promoter. *Gene*, 285: 311-318
- Anonim (2013). Türk Hematoloji Derneği, Genetik Terimler Sözlüğü. s: 22-48
- Arbouzova N., Zeidler M.P. (2006). JAK/STAT Signalling in Drosophila: Insights Into Conserved Regulatory and Cellular Functions. *Development*, 133:2605-2616
- Berry D.P., Wall E., Pryce J.E. (2014). Genetics and Genomics of Reproductive Performance in Dairy and Beef Cattle. *Animal*, 8 Supple, 1: 105-21 PMID: 24703258
- Bowley F.E., Green R.E., Amer P.R., Meier S. (2015). Novel Approaches to Genetic Analysis of Fertility Traits in New Zealand Dairy Cattle. *J Dairy Sci*, 98(3): 2005-12 PMID: 25597971
- Bromberg J.F., Wrzeszczynska M.H., Devgan G., Zhao Y., Pestell R.G., Albanese C., Darnell J.E. (1999). Stat3 as an Oncogene. *Cell*, 98: 295 - 303
- Brown T.A., Çeviri: Bardakçı F., Yenidünya A.F., Yılmaz N. (2013). Gen Klonlama ve DNA Analizi: Giriş, *Nobel Yayınevi*, s: 261- 376
- Butler S.T. (2013). Genetic Control of Reproduction in Dairy Cows. *J Dairy Sci*. 26(1): 1-11 PMID: 24305172

- Casanova J.L., Holland S.M., Notarangelo L.D. (2012). Inborn Errors of Human JAKs and STATs. *Immunity*, 36: 515-528
- Chaix A., Lopez S., Voisset E., Gros L., Dubreuil P., Sepulveda P.D. (2011). Mechanisms of STAT Protein Activation by Oncogenic KIT Mutants in Neoplastic Mast Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (8): 5956-5966
- Cole J.B., Vanden P.M., Null D.J., Hutchison J.L., Cooper T.A., Hubbard S.M. (2015). Haplotype Tests for Recessive Disorders Affecting Fertility and Other Characteristics. *AIP Research Report Genomic*, 09-13
- Crispi S., Sanzari E., Monfregola J., Felice N.D., Fimiani G., Ambrosio R., Urso M.D., Ursini M.V. (2004). Characterization of the Human STAT5A and STAT5B Promoters: Evidence of a Positive and Negative Mechanism of Transcriptional Regulation. *FEBS Letters*, 562: 27-34
- Dario C., Dario M., Ciotola F., Peretti V., Carnicella D., Selvaggi M. (2009). Analysis of STAT5A/AvaI Gene Polymorphism in Four Italian Cattle Breeds. *Biochem Genet.*, 47: 671-679
- Darnell J.E., Kerr I.M., Stark G.R. (1994). JAK-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins. *Science*, 264 (5164): 1415-1421
- Davey H.W., Wilkins R.J., Waxman D.J. (1999). Human Genetics '99: Sexual Development STAT5 Signaling in Sexually Dimorphic Gene Expression and Growth Patterns. *Am. J. Hum. Genet.*, 65: 959-965
- Doğan A.L., Güç D. (2004). Sinyal İletimi Mekanizmaları ve Kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35: 34-42
- Donohue T.S., Fasano A., Smith A., Zhao A. (2010). Enteric Pathogens and Gut Function: Role of Cytokines and STATs. *Gut Microbes*, 1(5): 316-324
- Egger-Danner C., Cole J.B., Pryce J.E., Gengler N., Heringstad B., Bradley A. (2015). Invited review: Overview of new traits and phenotyping strategies in dairy cattle with a focus on functional traits. *Animal*, 9(2): 191-207
- Ekmekçi A., Konaç E., Önen H.İ. (2008). Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık. *Marmara Medical Journal*, 21(3): 282-295
- Filiz E., Koç I. (2011). Bitki Biyoteknolojisinde Moleküler Markörler. *GOÜ, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 28(2): 207-214

- Flisikowski K., Szymanowska M., Zwierzchowski L. (2003). The DNA- Binding Capacity of Genetic Variants of the Bovine STAT5A Transcription Factor. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 8: 831 – 840
- Frasor J., Gibori G. (2003). Prolactin Regulation of Estrogen Receptor Expression. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 14(3): 118-123
- Fritz S., Capitan A., Djari A, Rodriguez S.C., Barbat A. (2013). Detection of Haplotypes Associated With Prenatal Death in Dairy Cattle and Identification of Deleterious Mutations in GART, SHBG and SLC37A2. *Plos one*, 8(6): e65550, PMID: 23762392
- Gao H., Ward P.(2007). STAT3 and Suppressor of Cytokine Signaling 3: Potantial Targets in Lung Inflammatory Responses. *Expert Opin Ther Targets*, 11(7):869-880
- Georges M., Charlier C., Hayes B. (2019). Harnessing Genomic Information for Livestock Improvement. *Nature Reviews Genetics*, 20, 135-156
- Gharibi T., Babaloo Z., Hosseini A., Alitappeh M., Hashemi V., Marofi F., Nejati K., Baradaran B. (2020). Targeting STAT3 in Cancer and Autoimmune Diseases. *J Dairy Sci*, 878: 173107
- Glusman G., Cox H.C., Roach J.C. (2014). Whole-Genome Haplotyping Approaches and Genomic Medicine. *Genome Med*, 6(9): 73, PMID: 25473435
- Goldammer T., Meyer L., Seyfert H.M., Brunner R.M., Schwerin M. (1997). STAT5A Encoding Gene Maps to Chromosome 19 in Cattle and Goat and to Chromosome 11 in Sheep. *Mammalian Genome* 8. *Brief Data Reports*,705-706
- Goodenough U., Levine R.P. (1975). *Genetics*, Published by Holt, Reinhart and Winston, pp: 761
- Hennighausen L., Robinson G.W. (2008). Interpretation of Cytokine Signaling Through the Transcription Factors STAT5A and STAT5B. *Genes & Development*, 22: 711-721
- Herrington J., Smit L.S., Schwartz J., Su C.C. (2000). The role of STAT Proteins in Growth Hormone Signaling. *Oncogene*, 19: 2585- 2597
- Hillmer E.J., Zhang H., Li H.S., Watowich S.S. (2016). STAT3 Signaling in Immunity. *Cytokine&Growth Factor Reviews*. Pages: 1-15
- Hodge D.R., Hurt E.M., Farrar W.L. (2005). The Role of IL-6 and STAT3 in Inflammation and Cancer. *Eur J Cancer*, 41(16):2502-2512

- Ihle J.N. (1996). STATs: Signal Transducers and Activators of Transcription. *Cell*, 84: 331–334
- Ihle J.N. (2001). The Stat Family in Cytokine Signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 13: 211–217
- İnal Ş., Çam M., (2016). Türkiye’de 2015 yılında Sperması İthal Edilen Boğalardaki Kalıtsal Kusurlar. *Eurasian J Vet Sci.*, 32(4): 278-284
- Jensen P.B., Hunter T. (2001). Oncogenic Kinase Signalling. *Nature*, 411: 355 - 365
- Kaymaz B.T., Çetintaş V.B., Kosova B. (2013). İnsan T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi Hücrelerinin Kapsaisin ile İndüklenmiş Apoptozunda Rolü Olabilecek JAK/STAT Sinyal İletim Yolağı Elemanlarının Gen Ekspresyon Profillerinin Belirlemesi. *Kafkas J Med Sci.*, 3(3): 129–135
- Kercher. Haplotype (Ht) vs. Haplogroup (Hg). 13 Mart 2021
- Khatib H., (2009). Methods and Composition for Improved Fertilization and Embryonic Survival. *This application claims priority of U.S. App. Ser. No. 61: 242-390*
- Khatib H., Huang W., Mikheil D., Schutzkus V., Monson R.L. (2009). Effects of signal transducer and activator of transcription (STAT) genes STAT1 and STAT3 genotypic combinations on fertilization and embryonic survival rates in Holstein cattle , *J Dairy Sci*, 92(12): 6186- 6191
- Kumlu S., Akman N. (1999). Türkiye Damızlık Siyah Alaca Sürülerinde Süt ve Döl Verimi. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 39(I): 1-15
- Lin J.X., Leonard W.J. (2000). The role of Stat5a and Stat5b in Signaling by IL-2 Family Cytokines. *Oncogene*, 19: 2566- 2576
- Matsuda T., Nakamura T., Nakao K., Arai T., Katsuki M., Heike T., Yokota T. (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of Mouse embryonic stem cells, *EMBO Sci.* 18(15): 4261-9
- McIlwain D.R., Grusdat M., Pozdeev V.I., Xu H.C., Shinde P., Reardon C., Hao Z., Beyer M., Bergthaler A., Haussinger D., Nolan G.P., Lang K.S., Lang P.A. (2015). T-Cell STAT3 is Essential for Maintaining Humoral Immunity Against LCMV, *European Journal of Immunology*, 45(2): 418-27
- Miglior F., Muir B.L., Van Doormaal B.J. (2005) . Selection Indices in Holstein Cattle of Various Countries. *J Dairy Sci*, 88(3): 1255-1263. PMID: 15738259

- Moriggl R., Sexl V., Kenner L., Duntsch C., Stangl K., Gingras S., Hoffmeyer A., Bauer A., Piekorz R., Wang D., Bunting K.D., Wagner E.F., Sonneck K., Valent P., Ihle J.N., Beug H. (2005). Stat5 Tetramer Formation is Associated with Leukemogenesis. *Cancer Cell*, 7: 87-99
- Özkök H., Uğur F. (2007). Türkiye’de Yetiştirilen Esmer ve Siyah Alaca Sığırlarda Süt Verimi, İlk Buzağılama Yaşı ve Servis Periyodu. *Atatürk Üniv Ziraat Fakültesi Dergisi*, 38(2): 143-149
- Paukku K., Silvennoinen O. (2004). STATs as Critical Mediators of Signal Transduction and Transcription: lessons learned from STAT5. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 15: 435–455
- Segelke D., Taubert H., Reinhardt F., Thaller G. (2016). Considering Genetic Characteristics in German Holstein Breeding Programs. *J Dairy Sci*, 99(1): 458-67. PMID: 26601581
- Schutz E., Wehrhahn C., Wanjek M., Bortfeld R., Wemheuer W., Beck J., Brenig B. (2016). The Holstein Friesian Lethal Haplotype 5 (HH5) Results from a Complete Deletion of TBF1M and Cholesterol Deficiency (CDH) from an ERV-(LTR) Insertion into the Coding Region of APOB. *Plos One*, 11(6): e0157618
- Schindler C., Plumlee C. (2008). Interferons pen the JAK-STAT pathway. *Semin Cell Dev Biol*. 19(4): 311–318
- Singh U., Deb R., Alyethodi R.R., Alex R., Kumar S., Chakraborty S., Dhama K., Sharma A. (2014). Molecular Markers and Their Applications in Cattle Genetic Research: A review. *Biomarkers and Genomic Medicine*, 6: 49-58
- Şekerden Ö., Erdem H., Kankurdan B., Özlü B. (1999). Anadolu Mandalarında Süt Kompozisyonunu Etkileyen Faktörler ve Süt Kompozisyonunun Laktasyon Dönemlerine Göre Değişimi. *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences*, 23: 505-509
- Takeda K., Noguchi K., Shi W., Tanaka T., Matsumoto M., Yoshida N., Kishimoto T., Akira S. (1997). Targeted Disruption of the Mouse STAT3 Gene Leads to Early Embryonic Lethality. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(8): 3801-3804
- Tezcanlı K.B. (2010) . STAT3, STAT5A ve STAT5B Ekspresyonlarının K-562 Lösemi Hücre Dizisinde Modifiye siRNA larla Baskılanması ve Apoptozun İndüklenmesi. *Ege Üniv Sağlık Bilimleri Ens doktora tezi*, İzmir
- The International HapMap Consortium (2003). The International HapMap Project. *Nature*, 426(6968): 789-796. doi: 10.1038/nature02168 PMID 14685227

- The International HapMap Consortium (2005). The International HapMap Project. *Nature*, 437(7063): 1299-1320. Doi: 10.1038/nature04226 PMID 16255080
- Turner P.C., Mclennan A.G., Bates A.D., White M.R. H., Çeviri: KONUK M. (2004). Moleküler Biyoloji, Nobel Akademik Yayıncılık, s: 90
- Utin C.A., Utin G.E. (2012). Oftalmolojide Genetik I – Temel Kavramlar. *Turkish journal of ophthalmology*, 42: 370-377
- Vanraden P.M., Olson K.M., Null D.J., Hutchison J.L. (2011). Harmful Recessive Effects on Fertility Detected by Absence of Homozygous Haplotypes. *J Dairy Sci*, (12)94: 615361 PMID: 22118103
- Yang X.O., Panopoulos A.D., Nurieva R., Chang S.H., Wang D., Watowich S.S., Dong C. (2007). STAT3 Regulates the Generation of Cytokine Mediated İnflammatory Helper T Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282(13): 9358-63
- Yaylak E., Akbaş Y., Özsoy A.N. (2015). Siyah Alaca ile Bazı Süt Sığır Irkları Arasında Yapılan Melezlemeler ve Melez İneklerin Performansları. *Süleyman Demirel Üniv Ziraat Fakültesi Dergisi*, 10(1): 97-106
- Yılmaz Ö., Turgay N., (2009). Sitokin İlişkili Hücre içi Sinyal İletimi ve Paraziter Enfeksiyonlardaki Önemi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 33(4): 301-306
- Yu, H., Jove R. (2004). The STATs of Cancer- New Molecular Targets Come of Age. *Nat Rev Cancer*, 4 (2): 97-105