

**ANADOLU MANDALARINDA SÜT VERİMİ
ÜZERİNE STAT5A GENİNDEKİ SNP'LERİN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Emsal İBİŞ
Doktora Tezi
Danışman: Prof. Dr. Metin ERDOĞAN
Tez No: 2023-004
Afyonkarahisar

**T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**ANADOLU MANDALARINDA SÜT VERİMİ ÜZERİNE STAT5A
GENİNDEKİ SNP'LERİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Emsal İBİŞ**

**Danışman
Prof. Dr. Metin ERDOĞAN**

Tez No: 2023-004

AFYONKARAHİSAR

Bu tez çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Proje Araştırmaları Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir. Proje No: "19.SAĞ.BİL.24"

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Medikal Biyoloji ve Genetik **Anabilim Dalı'nda** Emsal İBİŞ tarafından hazırlanan “**Anadolu Mandalarında Süt Verimi Üzerine STAT5A Genindeki SNP' lerin Etkisinin Araştırılması**” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 17/02/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Prof. Dr. Mustafa TEKERLİ

İmza

Üye

Prof. Dr. Cafer TEPELİ

İmza

Üye

Prof. Dr. Cevdet UĞUZ

İmza

Üye

Prof. Dr. Mikail ARSLAN

İmza

Üye

Prof. Dr. Metin ERDOĞAN

İmza

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... / / tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Esmâ KOZAN

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

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

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiđimi,
- 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 bulunduđum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiđimi,
- 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.

17/02/2023

Emsal İBİŞ

ÖZET

ANADOLU MANDALARINDA SÜT VERİMİ ÜZERİNE STAT5A GENİNDEKİ SNP'LERİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

STAT5A genleri meme bezi gelişimi, süt proteini sentezi, meme glandüler hücre proliferasyonu ve süt-protein gen ekspresyonunun düzenlenmesi, PRL ve GH sinyallerine atmakta, döllenme ve embriyonik gelişim süreçlerinde önemli rol oynamaktadır. Meme bezi oluşumunda ve laktasyonda önemli rollere sahip olan STAT5A geni özellikle süt üreten hayvanlarda araştırılmaya aday genler arasında bulunmaktadır. Bu çalışmada Afyonkarahisar bölgesinde bulunan 192 adet Anadolu mandasından kıl örnekleri alınmış ve DNA Dizi Analizi işlemi uygulanmıştır. Elde edilen bulgulara süt verimleri eklenerek polimorfik bölgelerle süt verimi arasındaki ilişki tespit edilmeye çalışılmıştır.

Araştırmada STAT5A geninin 6-9. ekzonları arasındaki 1720 bp uzunluğundaki alan incelenmiştir. DNA Dizi Analizi sonucunda 7. intronda 5, 8. intronda 7 ve 8. ekzonda 1 adet olmak üzere toplamda 13 adet polimorfizm tespit edilmiştir. Düzeltilmiş süt verim ortalamaları eklenerek Minitab istatistik programı yardımıyla ilişkilendirme analizi yapılmış ve 8. ekzonda yer alan SNP12237 C>T polimorfizminin süt verimiyle arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır. Belirlenen SNP'lerde genotip frekansı, toplam allel sayısı, allel frekansları ve heterozigotluk değerleri R dili kullanılarak geliştirilmiş Genetics paketi ile hesaplanmıştır. Haplogrupların oluşturulmasında Haploview programı kullanılmıştır. Sonuç olarak, SNP12237' nin manda ıslah çalışmalarında süt verimini artırmak amacıyla kullanılabileceği kanaatine varılmış olup, mandaların ıslahı için STAT5A geninin daha kapsamlı araştırılmasında fayda vardır.

Anahtar Kelimeler: Anadolu Mandası, STAT5A, Süt Verimi

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF SNPS IN STAT5A GENE ON MILK PRODUCTION IN ANATOLIAN BUFFALOES

STAT5 genes play an important role in mammary gland development, milk protein synthesis, mammary glandular cell proliferation and regulation of milk-protein gene expression, mediating PRL and GH signals, fertilization and embryonic development. The STAT5A gene, which has important roles in mammary gland formation and lactation, is among the candidate genes to be investigated, especially in milk-producing animals. In this study, hairs samples were taken from 192 Anatolian buffaloes in Afyonkarahisar region and DNA Sequence Analysis process was applied. By adding milk yields to the findings obtained, the relationship between polymorphic regions and milk yield was tried to be determined.

In the study, the 1720 bp long area between the 6-9 exons of the STAT5A gene was examined. As a result of DNA Sequence Analysis, a total of 13 polymorphisms were detected, 5 in the 7th intron, 7 in the 8th intron and 1 in the 8th exon. Correlation analysis was performed with the help of Minitab statistical program by adding corrected milk yield averages and it was determined that there is a statistically significant relationship between SNP12237 C>T polymorphism in the 8th exon and milk yield. Genotype frequency, total number of alleles, allele frequencies and heterozygosity values of the determined SNPs were calculated with the Genetics package developed using the R language. Haploview program was used to create haplogroups. As a result, it has been concluded that SNP12237 can be used in buffalo breeding studies to increase milk yield, and it would be beneficial to investigate the STAT5A gene more comprehensively for breeding buffaloes.

Keywords: Anatolian buffalo, STAT5A, Milk Yield

ÖNSÖZ

Beslenme tüm canlılar için vazgeçilmez bir eylemdir. Yaşamın sürdürülebilmesi için her canlı besin maddesine ihtiyaç duyar. İnsanlar geçmiş yıllardan beri bitkisel ve hayvansal gıdaları beslenme için kullanmışlardır. Ancak günümüzde küresel iklim değişikliği gibi pek çok nedenden dolayı özellikle bitkisel gıdalarda üretim miktarı ve çeşitliliği giderek azalmaktadır. Bu durum hayvansal gıdaların önemini arttırmıştır. Hayvansal gıdaların başında et, süt, peynir, yoğurt ve yumurta gelmektedir. Manda zor koşullara uyum sağlayan bir hayvan olmasından dolayı hayvansal gıda ihtiyacını karşılamak için kullanılabilir en iyi adaylar arasında bulunmaktadır. Bu nedenle, mandalarda verimi artırmaya yönelik yapılan benzeri çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışma, Anadolu mandalarında STAT5A genindeki polimorfizmler ile süt verimi arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Bu çalışmanın planlama sürecinde bana gerekli tüm desteği veren ve yol gösteren, tecrübeleriyle ve bilgileriyle akademik hayatıma ışık tutan değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Metin ERDOĞAN' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Eğitimim boyunca sahip olduğu bilgileri benimle paylaşan ve değerli zamanlarını ayıran değerli hocalarım Prof. Dr. Cevdet UĞUZ ve Prof. Dr. Mine DOSAY AKBULUT' a, Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk LENGER' e, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklenen “Mandaların Halk Elinde Islahı Projesi” kapsamında toplanan örnekleri kullanmama yardımcı olan değerli hocam Prof. Dr. Mustafa TEKERLİ' ye ve TAGEM'e (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü) en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmamda bana her türlü yardımı gösteren Samet ÇİNKAYA, Zeynep Nur ÇİNKAYA, Arş. Gör. Mustafa DEMİRTAŞ, Arş. Gör. Eda KARABÖCEK DEMİRTAŞ' a teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her aşamasında beni destekleyen babam Nail İBİŞ' e, eğitimim için her fedakârlığı sağlayan, ancak zamansız ayrılığıyla sadece kalbimde yaşatabildiğim canım annem Hatice İBİŞ' e, her konuda bana destek olan ve beni motive eden sevgili kardeşim Doç. Dr. Osman İBİŞ' e ve ailesine, enerjisiyle hayatıma neşe katan kız kardeşim Emel TERZİ' ye ve ailesine en içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Emsal İBİŞ
Afyonkarahisar
2023

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

bç	Baz çifti
DBD	DNA Bağlanma Alanı
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EPOR	Eritropoetin Reseptörü
GH	Büyüme Hormonu (Growth Hormon)
GHR	Büyüme Hormon Reseptörü
HSC	Hematopoetik Kök Hücre
IL	İnterlökin
JAK	Janus Family Kinase
LK	Bağlayıcı Bölge
MgCl₂	Magnezyum Klorür
MGF	Meme Bezi Faktörü
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
NH₂	Aminoterminal Bölge
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pmol	Pikamol
PRL	Prolaktin
PRLR	Prolaktin Reseptörü
RFLP	Restriksiyon Arttırılmış Polimorfik DNA
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SH2	SRC Homology Domain 2
SNP	Single Nucleotide Polimorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)
SOCS	Sitokin Sinyalleri Baskılayıcı
STAT	Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü
TAD	Trans Aktivasyon Alanı
TAGEM	Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü
TYK	Tirozin Kinaz

ŞEKİLLER

	SAYFA
Şekil 1.1: Mandalara ait genel gruplandırma	2
Şekil 1.2: 2013 yılı Türkiye manda varlığının coğrafi bölgelere göre dağılımı	9
Şekil 1.3: JAK/STAT Yolu	10
Şekil 1.4: Ev faresinde kromozom 11'de bulunan STAT5'in yapısal alanları	12
Şekil 1.5: STAT5A ve STAT5B genlerinin farklı dokulardaki ekspresyon düzeyleri	16
Şekil 3.1: DNA Dizi Analizi sonucunda tespit edilen SNP'lerin kromatogram görüntüsü	27
Şekil 3.2: STAT5A geninde belirlenen SNP'lere ait haploview görüntüsü	32

ÇİZELGELER

	SAYFA
Çizelge 1.1: Mandanın bilimsel sınıflandırılması	1
Çizelge 1.2: Farklı hayvan türlerindeki süt içerikleri (%)	5
Çizelge 1.3: Manda ve sığır etinin içerikleri (100 gr)	6
Çizelge 1.4: Türkiye'deki en yüksek manda sayısına ait ilk 10 il	8
Çizelge 1.5: Türkiye'deki 2021-2022 yıllarına ait hayvan sayıları ve değişim oranları	9
Çizelge 1.6: Manda STAT5A geninde bulunan ekzonlar ve uzunlukları	15
Çizelge 1.7: Sütçü sığırlarda prolaktin yolağındaki STAT genlerin süt bileşenlerine etkileri	17
Çizelge 2.1: Çalışmada kullanılan primerler	20
Çizelge 3.1: DNA dizi analizi sonucu belirlenen SNP ler	26
Çizelge 3.2: STAT5A genindeki genotip ve allel frekansları, heterozigotluk ve Hardy-Weinberg değerleri	29
Çizelge 3.3: Anadolu manda ineklerinde belirlenen genotipler ve düzeltilmiş süt verimi ortalamaları arasındaki ilişkiyi gösterir varyans analiz tablosu	33

RESİMLER

	SAYFA
Resim 1.1: Nehir ve bataklık mandasının tahmin edilen göç yollarını gösteren harita	3
Resim 1.2: Anadolu Mandası	7
Resim 2.1: PCR Cihazı	21
Resim 2.2: Jel Görüntüleme Sistemi	22
Resim 2.3: DNA Dizi Analiz Cihazı	23
Resim 3.1: PCR Jel Görüntüsü	25

1. GİRİŞ

Manda, uzun yıllardır insanlar tarafından kullanılan önemli hayvan türlerinden biri olmuştur. Özellikle zor şartlara uyum sağlayabildiği için özellikle Asya kıtasında manda yetiştiriciliği yapılmaktadır. Artan dünya nüfusu ile birlikte, hayvansal ürün tüketimi de artış göstermiş, ülkeler de bu talebi karşılamak amacıyla hayvansal üretime verilen önemi ve yatırımları artırmaya başlamıştır. Özellikle hayvanlar üzerinde yapılacak genetik temelli verim çalışmaları, bu alanda atılacak adımlar için yol gösterici olacaktır.

1.1. Manda

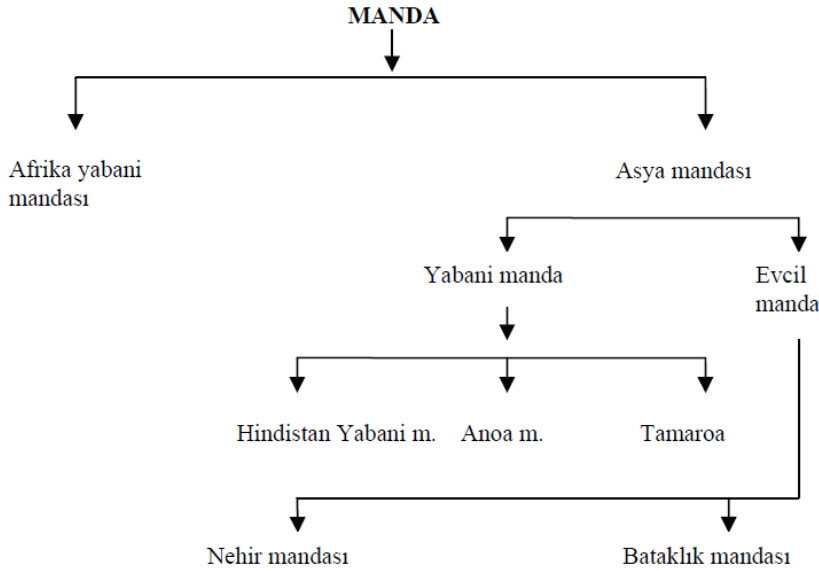
Manda, Bovidae ailesine ait *Bubalus bubalis* türü içerisinde yer almaktadır. Manda yabani bir tür olmasına rağmen yaklaşık 5000 yıl önce evcilleştirilmiş olduğu düşünülmektedir (Sarıözkan, 2011; El-Debaky vd., 2019). Yabani ve evcil formlardan köken almış olan mandanın 72 ayrı ırkı olduğu tahmin edilmektedir (Atasever ve Erdem, 2008). Mandanın bilimsel olarak sınıflandırılması Çizelge 1. 1' de gösterilmektedir.

Çizelge 1.1: Mandanın bilimsel sınıflandırılması (Toparşlan ve Mercan, 2018)

Taksonomik Grup	Bilimsel Adı	Türkçesi
Alem	Animalia	Hayvanlar
Şube	Chordata	Kordalılar
Sınıf	Mammalia	Memeliler
Takım	Artiodactyla (Çift Toynaklılar)	Çift Toynaklılar
Familya	Bovidae	Boynuzlugiller
Alt Familya	Bovinae (Sığırlar)	Sığırlar
Cins	Bubalus	Antiloplar
Tür	B. bubalis	Mandalar

Mandaların, süt, et, boynuz ve deri gibi ürünleri önemli bir gelir kaynağı olduğu için gelişmekte olan ülkelerin hayvancılıkla ilgili ekonomilerinde çok önemli bir rol oynamaktadırlar. Uzak Doğu'nun çeltik tarlalarında diğer yük hayvanlarına göre daha avantajlı konumda bulunmaktadır. Mandalar ayrıca ulaşımda da, öküzden çok daha büyük yükleri taşıyabilmektedirler. Daha düşük kaliteli ve daha az sindirilebilir yemlerle beslenebilmekte ve farklı olatma seçenekleri ile de kullanılabilirler. Bu durum yerel olarak mevcut kaba yemlerle bakımlarını kolaylaştırmaktadır. Ayrıca yaygın sığır hastalıklarına karşı direnç göstermekte, süt ve et ürünlerinin kaliteli olması bakımından da sığırlara göre daha avantajlı yönleri bulunmaktadır (El-Debaky vd., 2019).

Manda ırkları morfolojik ve davranışsal kriterlere göre Bataklık mandaları ve Nehir mandaları olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Bu iki alt türün farklılaşmasının, evcilleştirmeden çok önce (10.000 ila 1.7 milyon yıl) meydana geldiği düşünülmektedir. Nehir mandaları sıklıkla et ve süt üretimi için, bataklık mandaları ise daha çok yük hayvanı olarak kullanılmaktadır. Mandalara ait genel gruplandırma Şekil 1.1 'de gösterilmektedir (Atasever ve Erdem, 2008; El-Debaky vd., 2019).

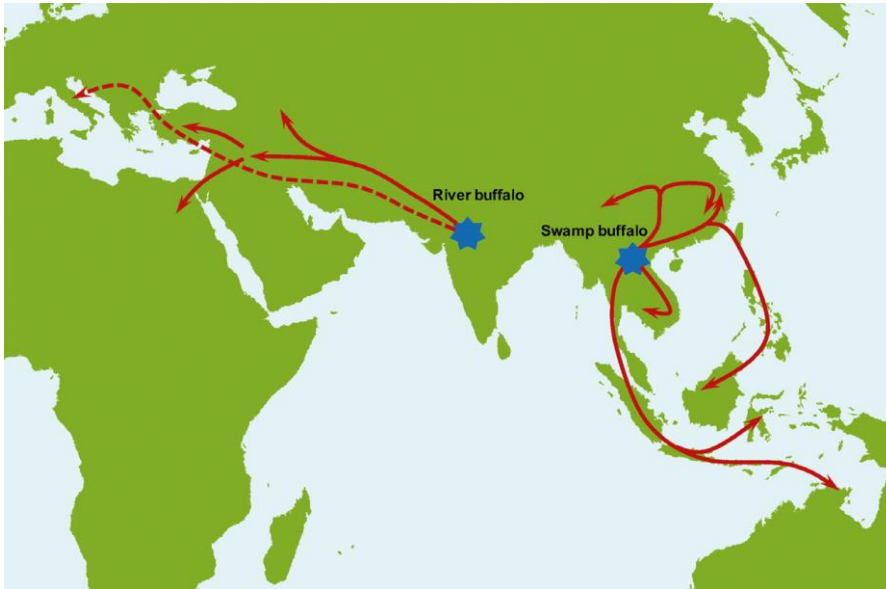


Şekil 1.1: Mandalara ait genel gruplandırma (Atasever ve Erdem, 2008)

Evcil Asya mandası (*Bubalus bubalis*) popülasyonu, yaklaşık 202 milyon olan sayılarıyla beş kıtanın hepsinde bulunmaktadır. En az 67 ülkede çeki gücü, süt ve/veya et sağlayan önemli bir hayvansal kaynak olarak görülmekte ve pek çok insan geçimini diğer evcil hayvanlardan çok bu türden sağlamaktadır. Asya mandaları 1941 yılında Bataklık ve Nehir mandası olmak üzere ikiye ayrılmıştır (Zhang vd., 2020).

Bataklık mandası, Hint yarımadasının batı bölgesinde evcilleştirildikten sonra (yaklaşık 6300 yıl önce), Güneydoğu Asya ve Çin'den Yangtze Nehri vadisine kadar dağılım göstermektedir. Moleküler ve morfolojik bulgular, bataklık manda popülasyonlarının genetik olarak farklılaşmakla birlikte fenotipik olarak benzer yapıda olduklarını göstermektedir (Zhang vd., 2020).

Nehir mandası, Hindistan yarım adasında evcilleştirildikten sonra Mısır, Balkanlar ve İtalya'ya kadar dağılım göstermektedir. Moleküler ve morfolojik bulgular, nehir manda popülasyonlarının daha zayıf bir filoğrafik yapıya sahip olduğunu göstermekle birlikte daha yüksek fenotipik çeşitlilik görülmektedir (Zhang vd., 2020). Nehir ve bataklık mandasının tahmin edilen göç yollarını gösteren harita Resim 1.1' de verilmiştir.



Resim 1. 1: Nehir ve bataklık mandasının tahmin edilen göç yollarını gösteren harita (Zhang vd., 2020)

İki tür, morfolojik ve kromozom sayısı bakımından farklılık göstermektedir. Nehir mandaları 50 kromozoma sahipken, bataklık mandaları 48 kromozom taşımaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalar iki türün genetik olarak da farklı olduğunu kanıtlamaktadır (Mintoo vd., 2019; Zhang vd., 2020). Bataklık ve nehir manda popülasyonları arasındaki ve içindeki alellik değişkenliklerine bakıldığında, önemli popülasyon içi ve popülasyonlar arası farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir. Bu iki alt tür arasındaki morfolojik ve genetik farklılıklar her iki alt türün de farklı bölgelerde evcilleştirildiğini göstermektedir. Farklı nehir manda gen havuzlarına bakıldığında bu farklılığın çoklu göç dalgalarından kaynaklandığı tahmin edilmektedir (El-Debaky vd., 2019).

Akdeniz mandası, dünya nehir mandası popülasyonunun yaklaşık %3' ünü temsil etmektedir. İtalya, Bulgaristan, Romanya, Yunanistan, Türkiye, Mısır, İran, Irak ve Suriye'de bulunan mandalar arasında fenotipik olarak benzerlik bulunmaktadır (Zhang vd., 2020).

1. 1. 1. Mandaların Verim Özellikleri

Dünyanın birçok yerinde, özellikle Güneydoğu Asya ülkelerinde, manda çiftlik gücünün % 20-30' unu sağlamak ve manda dışkısı, yüksek nüfuslu birçok ülkede gübre ve yakıt olarak kullanılmaktadır (Ermetin, 2017; Mintoo vd., 2019).

Bataklık mandası, sıklıkla çiftçilik ve nakliye için güç sağlayan yük hayvanları olarak kullanılırken, nehir mandası daha çok süt üretimi için yetiştirilmektedir. Nehir mandaları, genellikle düşük kaliteli yemle beslenmelerine rağmen yüksek kaliteli süt ve et sağlayabilmektedirler. İnek sütüyle karşılaştırıldığında, manda sütünün, daha düşük kolesterol, sodyum ve potasyum içeriğine sahip olduğu, buna karşılık kalsiyum, fosfor ve vitaminler, özellikle beta-karoten pigmentinin dönüştürülmesinden kaynaklanan E ve A vitaminleri bakımından daha zengin olduğu bildirilmektedir (Ermetin, 2017; Zhang vd., 2020). Manda sütünün içeriğinin diğer hayvan türü sütleriyle karşılaştırılması Çizelge 1. 2' de gösterilmektedir.

Çizelge 1. 2: Farklı hayvan türlerindeki süt içerikleri (%) (Atasever ve Erdem, 2008)

Tür	Su	Kuru madde	Protein	Yağ	Laktoz	Mineral Madde
Manda	82,0	17,7	4,15	7,85	4,8	0,77
İnek	87,5	12,4	3,4	3,65	4,65	0,75
Koyun	82,9	17,2	5,4	6,25	4,55	0,88
Keçi	87,1	13,0	3,7	4,1	4,45	0,8

Küresel olarak, insanlar tarafından tüketilen sütün % 16,9'u sığır dışındaki hayvan türlerinden elde edilmektedir ve mandalar, süt ineklerinden sonra dünyanın ikinci büyük süt elde edilen türüdür (Çınar vd., 2019; Öz vd., 2021). Türkiye, 2014 yılında 54.803 ton ile en büyük manda sütü üreticileri arasında onuncu sırada yer almaktadır. Manda sütünden üretilen Mozzarella peyniri, lor, yoğurt, manda kaymağı ve dondurma gibi ürünler, manda sütündeki yüksek protein, yağ, laktoz, mineral ve vitamin konsantrasyonları nedeniyle giderek daha popüler hale gelmektedir (Ağyar vd., 2020; Erdoğan vd., 2021). Manda sütünden üretilen bir diğer ürün Manda yoğurdu, Doğu Avrupa ve Türkiye' de yaygın olarak tüketilmektedir (Zhang vd., 2020).

Manda eti üretimi de birçok ülkede yaygın olmakta ve sığır etiyle karşılaştırıldığında kısmen daha düşük kolesterol içeriği (yaklaşık 2/3) nedeniyle İtalya'da tercih edilmektedir (Değirmencioğlu, 2018; Zhang vd., 2020). Dünyadaki toplam et üretiminin yaklaşık % 5,86' sı mandalardan karşılanmaktadır (Turan vd., 2021).

Yapılan araştırmalar, manda etinin sığır etinden % 40 daha az kolesterol, % 12 daha az yağ, % 55 daha az kalori ve %11 daha fazla protein ve mineral içerdiğini göstermektedir (Çizelge 1. 3). Bu nedenle, manda etinin kalp ve dolaşım sistemi hastalıkları olan kişiler için iyi bir kırmızı et seçimi olduğu bildirilmektedir (Değirmencioğlu, 2018; Soysal vd., 2018). Türkiye'de, Anadolu mandasının eti, sucuk, sosis ve pastırma yapımında kullanılmaktadır (Turan vd., 2021).

Manda derisinin kalın olması nedeniyle deri sanayinde ayrı bir yeri ve önemi bulunmaktadır. Özellikle, kalın deri gerektiren ayakkabı, kösele, tasma, yular, çanta gibi özel tasarımlarda manda derisi kullanılmaktadır (Sarıözkan, 2011).

Çizelge 1. 3: Manda ve sığır etinin içerikleri (100 gr) (Atasever ve Erdem, 2008)

Bileşen	Manda	Sığır
Kalori (kcal)	131,0	289,0
Protein (gr)	26,8	24,0
Yağ (gr)	1,8	21,0
Kolesterol (gr)	61,0	90,0
Mineral (mg)	641,8	584,0
Vitamin (mg)	21,0	18,5

1. 1. 2. Dünyada ve Türkiye'de Manda Yetiştiriciliği

Dünya çapında daha yaygın olan nehir mandası (*Bubalus bubalis*), Güney Asya, Balkanlar, Türkiye, Mısır, İtalya ve Avustralya'da baskın alt tür iken, bataklık mandası (*Bubalus carabanesis*) güneydoğu Çin'de bulunmaktadır. Dünya genelinde manda popülasyonu yaklaşık 202 milyon baş olarak bilinmektedir. Bu oranın % 81,5' lik kısmını nehir mandası ve % 18,5' lik bölümünü ise bataklık mandası oluşturmaktadır. Bu sayının % 97' si Asya, % 2' si Afrika, özellikle Mısır' da, % 1' i ise Güney Amerika, Avustralya ve Avrupa'da yetiştirilmektedir. En fazla mandaya sahip ülkeler arasında ilk sıralarda Hindistan, Pakistan, Çin, Mısır ve Nepal gelmektedir (Kaplan vd., 2018; El-Debaky vd., 2019; Zhang vd., 2020). Mandalar ilk olarak Asya'da evcilleştirilmiştir, ancak günümüzde sütleri için dünya çapında yaygın olarak yetiştiriciliği yapılmaktadır (Öz vd., 2021).

Türkiye' de mandanın varlığı M.Ö. 3000 yıllarına dayanmaktadır. Türkiye' deki tek manda ırkı olan Anadolu mandasının 50 kromozoma sahip olduğu ve nehir mandaları

grubunun Akdeniz tipi olarak sınıflandırıldığı, siyah veya gri renkte ve seyrek tüy örtüsü ile kaplı olduğu bildirilmektedir (Çelikeloğlu vd., 2019; Çınar vd., 2019; Koçak vd., 2019). Anadolu mandasının yaklaşık 1500 yıllık bir süreçte Anadolu ve Trakya koşullarına iyi uyum sağladığı ve bu bölgeye özgü özellikler geliştirdiği görülmektedir. Sığırlardan daha az ter bezlerine sahip olduklarından, bir gölet veya benzeri su birikintisi ya da duş sistemi ile serinletilmesi gerekmektedir (Ermetin, 2017; Kocaman ve Kurç, 2020).



Resim 1. 2: Anadolu Mandası (Çelikeloğlu vd., 2019)

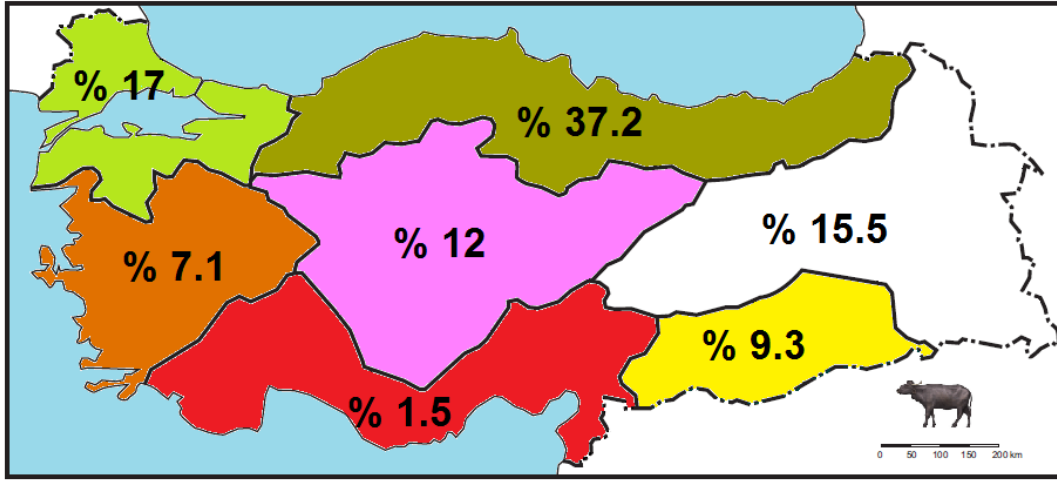
Türkiye'de önemli bir genetik ve kültürel kaynak olarak kabul edilen Anadolu mandaları birçok bölgede yetiştirilmektedir. Bu bölgeler arasında Kuzey Anadolu kıyılarında Samsun ve Sinop, Orta ve İç Kuzey Anadolu'da Çorum, Amasya ve Tokat, İç Batı Anadolu'da Afyon ve Kütahya, Marmara bölgesinde İstanbul ve Balıkesir, Doğu Anadolu'da Sivas ve Muş, Güneydoğu Anadolu'da Diyarbakır yer almaktadır (Yılmaz vd., 2017; Soysal vd., 2018; Karlı vd., 2021). Türkiye'de en yüksek manda sayısına ait ilk 10 il Çizelge 1. 4' de gösterilmektedir.

Çizelge 1. 4. Türkiye'deki en yüksek manda sayısına ait ilk 10 il (İnt. Kyn. 2)

Bölge Adı	Manda (Baş)
Samsun	23633
Diyarbakır	15914
İstanbul	15598
Tokat	10846
Bitlis	10123
Muş	7591
Kayseri	7528
Afyonkarahisar	7137
Balıkesir	5475
Sivas	5363

Manda popülasyonunun Türkiye'deki bölgesel dağılımına bakıldığında, geleneksel manda yetiştiriciliği yapılan birçok ilin bulunduğu Karadeniz Bölgesi, % 37,2'lik payla (43.846 baş) listenin başında gelmektedir. Karadeniz bölgesini %17'lik pay ile Marmara bölgesi izlemektedir. Üçüncü sırada %15,5 ile Doğu Anadolu Bölgesi yer alırken, onu %12 pay ile İç Anadolu Bölgesi takip etmektedir. Geriye kalan bölgelerin payları %10'un altındadır ve özellikle Akdeniz Bölgesi'ndeki manda popülasyonu oldukça az miktarda bulunmaktadır (Ermetin, 2017). 2013 yılı Türkiye manda varlığının coğrafi bölgelere göre dağılımı Şekil 1. 2' de gösterilmektedir.

Türkiye'de manda yetiştiriciliği daha çok süt ve et üretimi amacıyla yapılmaktadır. Ayrıca, birçok bulaşıcı hastalığa karşı dirençli olması, düşük yetiştirme maliyeti ve düşük gelirli yetiştiriciler için uygun bir hayvan olması nedeniyle de tercih edilmektedir (Soysal vd., 2018). Türkiye'de Haziran 2022 tarihi itibarıyla 182717 baş manda bulunmakta ve bu hayvanlar Türkiye'nin farklı bölgelerinde süt, et ve çeki gücü gibi farklı amaçlarla yetiştirilmektedir. Bununla birlikte, 1970 ve 2008 yılları arasında Anadolu mandalarının popülasyon büyüklüğünün önemli ölçüde azaldığı bildirilmektedir (Yılmaz vd., 2017; Kul vd., 2018).



Şekil 1. 2: 2013 yılı Türkiye manda varlığının coğrafi bölgelere göre dağılımı (Şahin, 2015)

Bu düşünün 2010 yılında, Tarım ve Orman Bakanlığı, TAGEM tarafından yürütülen "Anadolu Mandasının Halk Elinde Islahı" Projesi ile tersine çevrilerek arttırılmaya çalışıldığı görülmektedir (Koçak vd., 2019; Ağyar vd., 2020; Öz vd., 2021). Bu projenin başlamasıyla 2011 – 2017 yılları arasında manda sayısının % 60 artarak 161 bin başa çıktığı bildirilmektedir. Modern hayvancılık ve üreme tekniklerindeki gelişmeler ile manda ıslah çalışmalarının, mandaların süt veriminde önemli bir artış sağladığı görülmektedir (Karlı vd., 2018; Kaplan vd., 2018). Islah uygulamalarında genetik çeşitlilikten yararlanılmaktadır (Tekerli vd., 2016). Ancak Anadolu Mandalarında süt verimi, büyüme ve gelişme ile ilgili genler arasındaki ilişkiyi belirlemeye yönelik çok az sayıda araştırma bulunmaktadır (Alyörük ve Erdoğan, 2018). Türkiye'de Aralık 2021 – Haziran 2022 arasındaki hayvan sayıları ve değişim oranları Çizelge 1. 5' de gösterilmektedir.

Çizelge 1. 5: Türkiye'deki 2021-2022 yıllarına ait hayvan sayıları ve değişim oranları (İnt. Kyn. 2)

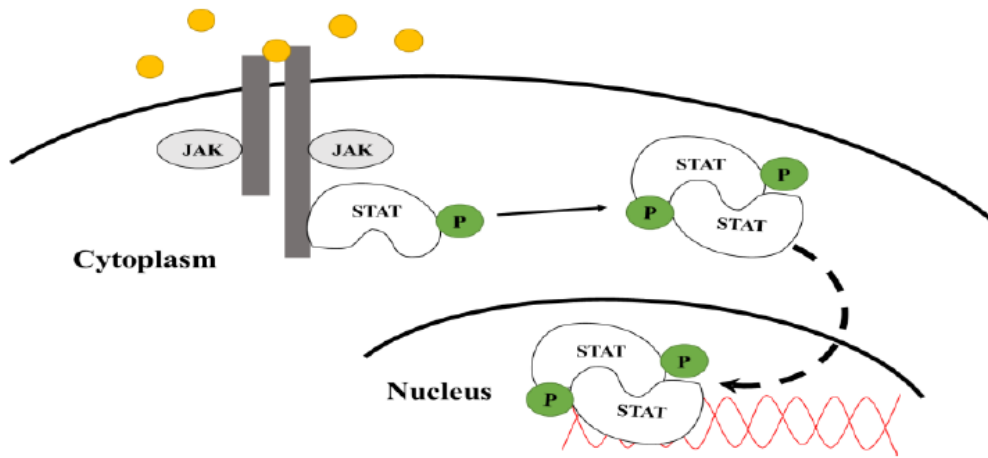
	Aralık 2021 (Baş)	Haziran 2022 (Baş)	Değişim (%)
Büyükbaş	18.036.117	17.875.672	-0,9
Sığır	17.850.543	17.692.955	-0,9
Manda	185.574	182.717	-1,5
Küçükbaş	57.519.204	58.447.555	1,6
Koyun	45.177.690	45.122.627	2,1
Keçi	12.341.514	12.324.928	-0,1

1.2. STAT5A Geni

1.2.1. STAT Gen Ailesi

STAT (Sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü), çekirdek içindeki DNA bağlanma alanları aracılığıyla spesifik DNA motiflerini tanıyarak ve bunlara bağlanarak gen ekspresyonunu düzenleyebilen hücre içi transkripsiyon faktörleri olarak tanımlanmaktadır (Li vd., 2018).

JAK-STAT sinyal yolu, hücre dışı sinyalleri çekirdeğe iletmekte ve apoptoz, farklılaşma, proliferasyon ve immünolojik yanıtlar dahil olmak üzere çeşitli hücrel aktiviteyi düzenlemektedir (Able vd., 2017; Silveira vd., 2019). Bu yol, reseptörle ilişkili Janus kinazlar (JAK), STAT' lar, bir sitokin veya hormon reseptöründen oluşmaktadır. JAK' lar, büyüme faktörlerini, hormonları, interferonları ve çeşitli sitokinleri içeren ligandların kendi spesifik reseptörlerine bağlanmasıyla aktive edilen bir tirozin kinaz ailesidir. Memelilerde JAK1, JAK2, JAK3 ve Tirozin kinaz 2 (TYK2) olmak üzere dört adet JAK bulunmaktadır. STAT' lar JAK' lar tarafından tirozin fosforilasyonu yoluyla aktive edilmekte, aktive edilmiş STAT' lar dimerizasyona uğrayarak hedef genlerin transkripsiyonunu düzenlemek için DNA'nın spesifik promoter bölgelerine bağlanmakta ve gen transkripsiyon düzeylerini etkileyebilmektedir (Able vd., 2017; Khan vd., 2020). JAK/STAT yolu Şekil 1.3' de gösterilmektedir.



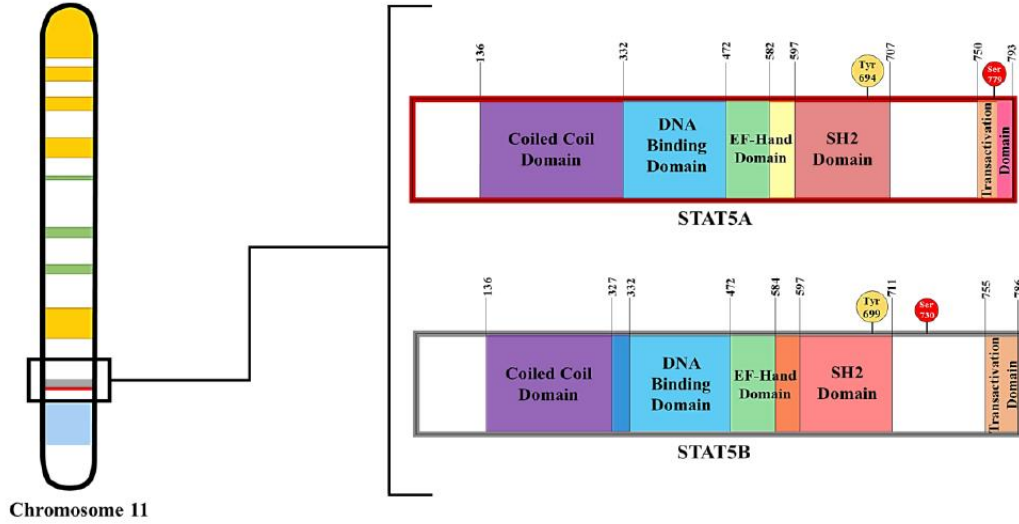
Şekil 1.3: JAK/STAT yolu (Able vd., 2017)

JAK-STAT sinyal yolu, zardan çekirdeğe iletişimde ve gen ekspresyonunun kontrolünde yardımcı olan önemli bir hücre içi yol olarak tanımlanmaktadır. 50'den fazla sitokin ve büyüme faktörü bu yolu kullanmakta ve böylece bağışıklık ile hücrel çoğalmaya yardımcı olmaktadır. Çalışmalar, JAK-STAT yolu ile ilgili genlerdeki tek nükleotid polimorfizminin farklı türlerde çeşitli bağışıklık bozukluklarına ve malignitelere yol açtığını ortaya koymaktadır (Ali vd., 2020). JAK-STAT sinyal yolu, memelilerde laktasyon ve üremede anahtar rol oynayan prolaktin (PRL) hormonu tarafından da kullanılmaktadır (Ali vd., 2020). Meme bezi gelişiminde kritik bir role sahip olmasının yanı sıra, herhangi bir anormal düzenleme, JAK-STAT yolunun normal işlevini bozabilmekte, bu da meme bezi gelişiminin bozulmasına ve meme enfeksiyonlarına maruz kalmasına neden olabilmektedir (Khan vd., 2020).

Memelilerde keşfedilen yedi STAT proteini bulunmaktadır. Bunlar STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B ve STAT6 olarak adlandırılmaktadır (Able vd., 2017; Abousoliman vd., 2020). STAT proteinlerinde bir N-terminal alanı (ND), bir sarmal bobin (CC) alanı, bir DNA bağlama alanı (DBD), bir sarmal bağlayıcı (LK), bir Src homoloji 2 (SH2) alanı ve C terminal bölgesinde bulunan bir transaktivasyon alanı (TAD) bulunmaktadır. STAT proteinlerinin hormon / sitokin reseptörüne bağlanması için SH2 alanı kullanılmaktadır (Able vd., 2017; Li vd., 2018). Bazal koşullar altında, inaktif STAT'lar sitozolde bulunmaktadır. Aktive JAK / reseptör kompleksine dahil edildikten ve SH2 alanı içinde JAK'lar tarafından tirozinle fosforile edildikten sonra, dimerler ve / veya tetramerler oluşturmakta, çekirdeğe doğru yer değiştirmekte ve genlerin promoter bölgeleriyle birleşmektedirler (Able vd., 2017). Her bir STAT proteininin spesifik bölgelere bağlanma afinitesi değişmekte ve STAT'ların gen promoterleri ile etkileşimi, hedef genlerinin ekspresyonunu inhibe edebilmekte veya artırabilmektedir (Able vd., 2017). Manda (*Bubalus bubalis*) STAT1 ve STAT4 geni 2. kromozom üzerinde, STAT3, STAT5A ve STAT5B genleri 3. kromozom üzerinde, STAT2 ve STAT6 4. kromozom üzerinde bulunmaktadır (İnt. Kyn. 1).

Bir ev faresinde Kromozom 11'de bulunan STAT5'in yapısal alanları ve fosforilasyon bölgeleri Şekil 1. 4' de gösterilmektedir. STAT5 aktivasyonu için SH2

alanındaki tirozin fosforilasyonu sarı renkle, serin fosforilasyonu kırmızı renkle ifade edilmektedir (Able vd., 2017).



Şekil 1.4: Ev faresinde Kromozom 11'de bulunan STAT5'in yapısal alanları (Able vd., 2017)

1.2.2. STAT5A Geni

Meme bezi; embriyonik, pubertal, gebelik, emzirme ve involüsyon dahil olmak üzere birçok farklı gelişim aşamasından geçebilen eşsiz bir organ olarak tanımlanmaktadır. Meme bezi dokuları, yetişkinlik döneminde farklı hormonların, büyüme faktörlerinin ve kodlayıcı genlerin regülasyonu altında; hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz döngüleri geçirmektedir. Bu aşamalar, farklı düzenleyici işlevlere sahip çok sayıda sinyal yolu gerektirmektedir. JAK/STAT sinyal yolları, meme bezi gelişimi ve süt proteini sentezi için gerekli olan yollar arasında kabul edilmektedir (Jiao vd., 2018). Aynı zamanda büyüme hormonunun ana aracısı olarak da bilinmektedir (Naveed vd., 2021). Büyüme, manda dahil çiftlik hayvanlarının verim özellikleri ile ilişkili önemli bir faktör olarak görülmektedir (Çelikeloğlu vd., 2015). Sinyal dönüştürücü ve aktivatörü 5 (STAT5), meme glandüler hücre proliferasyonunun ve süt-protein gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli roller oynamaktadır (Ao vd., 2015; Li vd., 2018).

STAT5, iki ayrı gen tarafından kodlanan, A ve B olmak üzere birbiriyle yakından ilişkili iki formda bulunmaktadır (Al-Azzawi vd., 2020). Başlangıçta koyunlarda tek bir STAT5 geni tanımlanmış, ancak daha sonra fare, insan, sıçan ve sığır hücrelerinde yapılan çalışmalar sonucunda iki farklı fakat kromozomal olarak bağlantılı gen tarafından kodlanan iki STAT5 formu (STAT5A ve STAT5B) bulunmuştur. STAT5A ve STAT5B genleri, hem DNA-bağlanma özgüllüklerinde hem de doku dağılımlarına göre farklılıklar gösterebilirler de, yüksek oranda homolog oldukları bilinmektedir (%96) (Kumar ve Ratwan, 2016; Selvaggi vd., 2017). STAT5A proteini başlangıçta meme bezi faktörü olarak tanımlanmıştır (Schennink vd., 2009). STAT5A geni birçok fizyolojik süreçte önemli bir rol oynamaktadır. Bu rolleri arasında, embriyoların yaşayabilirliği, süt üretimi ve sığırlarda bazı büyüme özellikleri bulunmaktadır (Al-Azzawi vd., 2020). Transgenik farelerle yapılan çalışmalar, STAT5 proteinlerinin meme dokusu gelişiminin düzenlenmesinde önemli bir fonksiyona sahip olduğunu ve başka birkaç çalışmada da STAT5A'nın adipogenez ve yağ hücresi fonksiyonunda rolü olduğunu göstermektedir (Schennink vd., 2009). STAT5A, ayrıca çiftlik hayvanlarında döllenme, embriyonun ölümü ve süt üretim özellikleri üzerine etki göstermektedir (Naveed vd., 2021).

STAT5A, sitokine ve büyüme faktörlerine karşı çeşitli hücre tepkilere aracılık eden anahtar bir transkripsiyon faktörü ve sinyal proteini olarak tanımlanmaktadır. Sitokine ve büyüme faktörlerine yanıt olarak STAT5A, reseptörle ilişkili kinazlar tarafından fosforile edilmekte ve daha sonra transkripsiyon aktivatörü olarak görev yaptıkları hücre çekirdeğine yer değiştiren homo veya heterodimerler oluşturmaktadır. STAT5A klasik olarak sitoplazmadaki sitokin ve büyüme faktörü sinyallerini algılayabilmekte ve bu sinyalleri DNA hasarını, çoğalmayı, farklılaşmayı, büyümeyi ve apoptozu düzenlemek için çekirdekteki duyarlı genlere iletebilmektedir (Zhao vd., 2020).

İnsan prostat kanserinin klinik örneklerinde, STAT5A'nın, sağlıklı prostat numunelerine kıyasla prostat kanserinde aşırı ifade edildiği gösterilmektedir (Boutillon vd., 2019). Çeşitli çalışmalar STAT5'in prostat kanserinin ilerlemesinde çok önemli bir rol oynadığını ifade etmektedir (Mohanty vd., 2017; Erb vd., 2020). STAT5A protein aktivitesinin kesintiye uğraması, gebeliği desteklemek için gerekli olan progesteronu

üreten korpus luteumun eksikliğine ve kısırılığa yol açmaktadır (Regalado vd., 2020). STAT5A geni, sadece meme bezi değil, rahim epitel hücrelerinde de sinyal iletiminde önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, STAT5A geninin döllenme ve embriyonik gelişim süreçlerinde de önemli rolleri olduğu tahmin edilmektedir (Naveed vd., 2021).

Yapılan diğer bir çalışmada (Dees vd., 2020) yapısal olarak aktive edilmiş bir STAT5A mutantının aşırı ekspresyonunun, farelerin meme bezlerinde tümör oluşumuna neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca STAT5A'nın, kemirgenlerde ve memelilerde adiposit gelişimini desteklediği, bu durumda kardiyovasküler hastalıklar ve tip 2 diyabet gibi obezite ile ilgili hastalıklara neden olabileceği ifade edilmektedir (Shi vd., 2019). STAT5A bağışıklık sistemi, kanser gelişimi ve meme bezi gelişiminde de önemli roller oynamaktadır (Li vd., 2018). Khan vd. (2020) yaptıkları çalışmada, STAT5A ve STAT5B'nin sütçü sığırlarda mastitisin patogenezini kolaylaştıran proinflamatuvar genlerin üretimine aracılık ettiğini bildirmektedirler. STAT5 genlerinin depresyonu, bozulmuş meme bezi gelişimi ve süt proteini genlerinin aşağı (down) regülasyonu ile ilişkilendirilirken, STAT5'nin aşırı ekspresyonu, meme bezi gelişimi ve süt-protein gen ekspresyonu üzerinde olumlu etkiler yapmaktadır. Birlikte ele alındığında tüm bu bulgular, STAT5A'nın laktasyonda temel bir rol oynadığını kuvvetle göstermektedir (Li vd., 2018).

1.2.3. STAT5A Geninin Süt Verimi Üzerine Etkileri

Memelilerde prolaktin hormonunun (PRL) en önemli rolü laktasyonun kontrolü olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca, PRL salgısı inhibe edildiğinde ineklerin meme bezlerinde daha fazla apoptoz görülmektedir. Süt üretimini düzenleyen bazı faktörler de PRL salgısını etkilemektedir (Tong vd., 2017; Du vd., 2020). STAT5A'nın PRL sinyalizasyonunda rolü olduğu ifade edilmektedir (Frasor ve Gibori, 2003; Ao vd., 2015). Dolaşıma salındığında prolaktin, reseptörüne (PRLR) bağlanmakta, bu da STAT proteinlerinin fosforilasyonuna ve aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu olayın sonucunda aktive olan STAT5A geni, süt verimiyle alakalı olan genlerin ekspresyonunu uyarılmaktadır (Singh vd., 2014; Lee ve Kelleher, 2016). STAT5A, meme bezi

gelişiminde önemli bir oyuncu olarak ifade edilmektedir. Özellikle, STAT5A'nın süt salgılayan meme epitel hücrelerinde gen ekspresyonunun transkripsiyonel uyarımı yoluyla PRL ve büyüme hormonu (GH) sinyallerine aracılık ettiği bilinmektedir. Süt üretim özelliklerindeki belirgin rolü nedeniyle, STAT5A, daha önce sığır ve keçilerde araştırılmış, genetik varyantlar süt yağ asidi profilleri ve süt verimi ile ilişkilendirilmiştir (Du vd., 2019; Gebreyesus vd., 2019; Abousoliman vd., 2020). STAT5A geni sığırlarda 19. kromozom üzerinde mandada 3. kromozom üzerinde bulunmaktadır. Manda (*Bubalus bubalis*) STAT5A geni 21 077 baz çifti uzunluğundadır ve 794 amino asit zincirini kodlayan 19 ekzondan (Çizelge 1.6) oluşmaktadır (Ouerghi vd., 2017).

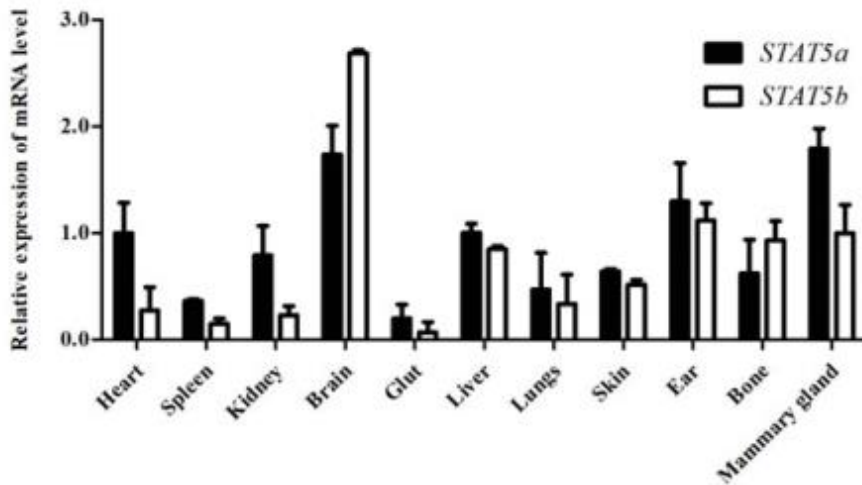
Çizelge 1.6: Manda STAT5A geninde bulunan ekzonlar ve uzunlukları (İnt. Kyn. 1)

Ekzon	Konumu	Uzunluk (bç)
1. ekson	1 - 155	154
2. ekson	998 - 1135	137
3. ekson	1460 - 1616	156
4. ekson	2702 - 2791	89
5. ekson	5785 - 5959	174
6. ekson	11184 - 11314	130
7. ekson	11546 - 11697	151
8. ekson	12147 - 12302	155
9. ekson	12708 - 12887	179
10. ekson	14361 - 14448	87
11. ekson	14556 - 14678	122
12. ekson	15227 - 15319	92
13. ekson	15774 - 15980	206
14. ekson	16691 - 16785	94
15. ekson	16870 - 17000	130
16. ekson	17427 - 17582	155
17. ekson	18329 - 18380	51
18. ekson	18668 - 18775	107
19. ekson	19737 - 21077	1340

Li vd. (2018), mandaların meme epitel hücrelerinde STAT5A ve STAT5B genlerinin klonlanması ve fonksiyonel karakterizasyonu üzerine yapmış oldukları çalışmada,

STAT5A geninin özellikle meme bezlerinin epitel hücrelerinde eksprese edildiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, STAT5A baskılanmasının, süt protein genlerinin önemli ölçüde düşük ekspresyonuna neden olduğunu, STAT5A'nın aşırı ekspresyonunun ise süt-protein genlerinin önemli ölçüde daha yüksek ekspresyonuna yol açtığını ifade etmişlerdir (Li vd., 2018). STAT5A genindeki SNP'ler, Jersey, Polonya ve ABD Holstein sığırlarında süt yağı yüzdesi dahil olmak üzere süt üretim özellikleri ile ilişkilendirilmiştir (Schennink vd., 2009).

Manda doku ve hücrelerinde STAT5A ve STAT5B ekspresyon seviyeleri üzerine yapılan araştırmalarda, farklı dokularda farklı miktarlarda eksprese edildiği görülmektedir. En yüksek STAT5A ifadesinin meme bezinde, en yüksek STAT5B ifadesinin beyinde bulunduğu ifade edilmektedir (Li vd., 2018). STAT5A ve STAT5B genlerinin farklı dokulardaki ekspresyon düzeyleri Şekil 1.5' de gösterilmektedir.



Şekil 1.5: STAT5A ve STAT5B genlerinin farklı dokularda ki ekspresyon düzeyleri (Li vd., 2018).

Yapılan çalışmalar, JAK-STAT yolu ile ilgili genlerdeki SNP'lerin, sığırlarda üreme özelliklerinin yanı sıra farklı inflamatuvar hastalıklar üzerinde de önemli etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Ali vd., 2020). Son yıllarda, RNA teknolojilerini kullanan araştırmacılar, meme epitel hücrelerindeki STAT5A'nın gebelik sırasında meme bezi morfolojisinin korunmasına yardımcı olduğunu, ayrıca kazein geni ile etkileşime girerek, süt proteini sentezini etkilediğini ifade etmektedirler. STAT5'in etkileşime

girdiği reseptörler arasında prolaktin reseptörü (PRL), büyüme hormonu reseptörü (GHR), IL-3R (interlökin 3 reseptörü) ve EPOR (eritropoetin reseptörü) bulunmaktadır (Able vd., 2017). STAT'ların inhibisyonunda, sitokin sinyalleşmesinin baskılayıcı (SOCS) proteinleri, önemli bir yer tutmaktadır. SOCS proteinleri doğrudan tirozin kinazlara bağlanmakta ve JAK/STAT yolundaki sitokin reseptörleri üzerinde bulunan kenetlenme bölgelerini bloke etmektedir. Bu mekanizmanın sonucunda JAK'lar STAT'ları aktive edememekte ve STAT'lar deaktive olmaktadır. SOCS ailesi ilk başta SOCS1'den 3'e kadar araştırılmıştır. Ancak, son araştırmalar (Able vd., 2017), SOCS7'nin doğrudan STAT5 ile etkileşime girdiğini ve aktivitesini inhibe ettiğini göstermektedir. Yapılan çalışmalar, SOCS7 ekspresyonunun lökositlerde PRL ve GH sinyalleşmesini bozduğunu ve STAT5 aktivasyonunu inhibe ettiğini göstermektedir.

Çizelge 1. 7: Sütçü sığırlarda prolaktin yolağındaki STAT genlerin süt bileşenlerine etkileri (Raven vd., 2014)

Gen	Yağ	% Yağ	Süt	Protein	% Protein
PRL	0,19	0,04	0,11	0,19	0,36
STAT3	0,43	0,84	0,53	0,78	0,84
STAT5A	0,36	0,85	0,61	0,75	0,80
STAT5B	0,10	0,83	0,78	0,55	0,80

Sütçü sığırlarda STAT5A geninin polimorfizmi üzerine yapılan çalışmalarda, meme bezlerindeki STAT5A genotiplerinin, ineklerdeki laktasyonel özelliklerle yakından ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (Li vd., 2018). Laktasyon süt verimi ve laktasyonun devamlılığının da süt ekonomisi üzerinde belirgin etkileri bulunmaktadır (Tekerli vd., 2001). Farelerde yapılan araştırmalar, STAT5A eksikliğinin, gebelik sırasında meme bezlerinin bozulmasına ve hücreyel farklılaşmaya yol açtığını ortaya koymaktadır (Able vd., 2017). Raven vd., (2014) süt sığırlarında genetik varyasyonlar ve süt verimi üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Özellikle meme gelişimi, prolaktin sinyalizasyonu ve involüsyon yollarında etkisi olduğu düşünülen genlerde SNP'ler tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu çalışma sonucunda hem meme bezinde hem de Prolaktin yolağındaki genetik varyasyonlarla süt içerikleri arasında

anlamli farklılıklar tespit etmişlerdir. Bazı genlerle süt verimi arasındaki ilişki Çizelge 1. 7' de gösterilmektedir (Raven vd., 2014).

Bu çalışma, Anadolu mandalarında STAT5A genindeki polimorfizmleri tespit etmek, bulunan polimorfizmler ile süt verimi arasındaki ilişkiyi araştırmak ve Anadolu mandalarının ıslah çalışmalarına katkı sağlamak amacıyla yapılmıştır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

Araştırmada, T.C. Tarım Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından desteklenen “Anadolu Mandalarında büyüme ve süt verim özellikleri yönünden damızlık seçimi için genetik tanı kiti geliştirilmesi” başlıklı proje kapsamında toplanan ve Afyonkarahisar ilinde yetiştirilen 192 baş mandaya ait kıl örnekleri kullanılmıştır.

2.2. Metot

2.2.1. DNA izolasyonu

Mandalardan toplanan kıl örneklerinden DNA izolasyonu için manda kılı bulunan mikrosantrifüj tüplerine 200 µL PBS (Fosfat Tamponlu Tuz) solüsyonu, 20 µL Proteinaz K ve 200 µL lizis buffer konularak önce güçlü bir şekilde vortekslenmiş, daha sonra 65 °C’de yaklaşık 40 dk inkübe edilmiştir. Tüpler 10.000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiş ve içlerinde bulunan sıvı tamamen çekilerek başka bir tüpe aktarılmıştır ve üzerlerine 40-50 µL manyetik bilye ile 225 µL binding buffer eklenerek yavaş hızda 5 dk vortekslenmiştir. Daha sonra manyetik tabla üzerine konulmuş, 10 dk beklenmiş ve sıvı kısım atılmıştır. Manyetik bilyeler sonrasında sırasıyla önce 700 µL yıkama solüsyonu-1 ile bir kez, 650 µL yıkama solüsyonu-2 ile iki kez temizlenmiştir. Yıkama işleminden sonra tüplerin ağzı 15 dk açık bırakılarak bekletilmiş ve son olarak üzerine 120 µL elüsyon solüsyonu (10 mM Tris HCl, pH 8,3) eklenerek 10 dk oda ısısında bekletilmiştir. Tüpler daha sonra manyetik tablaya yerleştirilmiş ve 5 dk beklemeden sonra sıvı kısım ayrı tüplere aktarılmıştır (Boom vd., yöntemi manyetik bilyeye uygun şekilde değiştirilerek kullanılmıştır) (Boom vd., 1990). İzole edilen DNA örnekleri, Multiscan GO (ThermoFisher Sci.) ile 260/280 ve 260/230 dalga boyunda saflıkları, Qubit 2.0 (Invitrogen) ile miktarları bakımından ölçülmüş ve daha sonra tüm DNA’lar kullanılmak üzere –20 °C’de saklanmıştır.

2.2.2. Primer Tasarımı

Çalışmada kullanılacak primerler NCBI'da bulunan STAT5A gen dizisinden (NW_005784710.1) yararlanılarak ve FastPCR Professional 6.1.2 paket programı (Kalendar vd., 2009) kullanılarak tasarlanmıştır. Kullanılacak primerler arasında dimer oluşup oluşmadığının kontrolü de aynı program ile yapılmıştır. Çalışmada farklı bölgeler için birçok primer tasarımı yapılmış, ancak sadece optimizasyonu yapılan primerler kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primerler Çizelge 2. 1' de verilmiştir.

Çizelge 2. 1: Çalışmada kullanılan primerler

Forward / Revers	Primer (5'→3')	Tm (°C)	Baz uzunluğu
F1 (STAT5A_F11159)	TCCTCCAGCTCAGTTTGCCCA	58 °C	1003 bp
R1 (STAT5A_R12162)	TCTGCCAGATGATCTCCGCCA		
F2 (STAT5A_F11950)	TTGGAAGGCAGGGCATCTCTGC	62 °C	929 bp
R2 (STAT5A_R12879)	CAGCGTACTTGCGGGTGTTC		

2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Primerlerin bağlanma sıcaklıklarının (Melting Temperature, Tm) tespit edilmesi amacıyla Gradient PCR işlemi yapılmıştır. Bu işlemi yapmak amacıyla her bir örnek için 0,3 pmol forward, 0,3 pmol reverse, 0,3 mM dNTP, 1X Phusion GC Buffer, 1 U/μL Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher Sci., F549L) ve 10-20 ng DNA koyularak PCR karışımı hazırlanmıştır. Toplam hacim 12,5 μL olacak şekilde ultra distile su ile ayarlama yapılmıştır. PCR cihazı, 98 °C' de 2 dk bir döngü; 98 °C' de 10 sn, 54 – 64 °C' de 30 sn ve 72 °C' de 1 dk 35 döngü ve 72 °C' de 10 dk bir döngü olacak şekilde ayarlanmıştır. STAT5A genindeki bölgelerinin çoğaltılması amacıyla Veriti 96-Well Thermal Cycler PCR (Applied Biosystem) cihazı (Resim 2.1) kullanılmıştır.



Resim 2.1: PCR Cihazı

2. 2. 4. Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilen PCR ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla % 1,5'lik agaroz jeli hazırlanmıştır. Jel hazırlanırken 100 ml TAE (Tris–Asetat–EDTA) solüsyonu ve 1,5 gr Agaroz (Prona, Biomax) karıştırılarak mikrodalga fırında eritilmiş ve üzerine 1 μ L RedSafe (INtRON, 21141) boya solüsyonu eklenmiştir. Soğutulan ve katılaştıran jel elektroforez tankına yerleştirilmiş ve tank TAE solüsyonu ile doldurulmuştur. Jelin kuyucuklarına örnek başına 8 μ L yükleme boyası (1X Loading Dye) ve 4 μ L PCR ürünü içeren karışım konulmuştur. Daha sonra cihaz çalıştırılmış ve örnekler 30 dk süreyle 90 V' da yürütülmüştür. Jeller, BIO-VISION jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat) aracılığıyla görüntülenmiş (Resim 2.2), bant gözlenen örnekler pozitif olarak değerlendirilmiş ve DNA dizileme amacıyla $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de saklanmıştır.



Resim 2. 2: Jel Görüntüleme Sistemi

2. 2. 5. DNA Dizilime Analizi

PCR ürünlerinin baz dizilimini ve SNP'leri tespit etmek amacıyla sekanslama (DNA dizi analizi) yapılmıştır. Bu işlem sırasıyla 3 aşamada yapılmıştır. İşlemin ilk aşamasında PCR ürünleri temizlenmiştir. Bu aşama için örnek başına 1,0 μL FastAP (ThermoFisher Sci., EF0652), 0,5 μL Exonuclease-1 (ThermoFisher Sci., EN0582) ve 4 μL PCR ürünü mikrosantrifüj tüplere konulmuştur. Elde edilen karışım PCR cihazı aracılığıyla 37 °C' de 15 dakika, 85 °C' de 15 dakika olacak şekilde işleme tabi tutulmuş; dNTP'ler, primerler ve tek zincirli yapılardan temizlenmesi sağlanmıştır.

İşlemin ikinci aşamasında Sekans PCR yapılmıştır. Bu işlem için örnek başına 2 μL BigDye solüsyonu, 11 μL 1x SB solüsyonu (sequencing buffer), 5 μL primer (F veya R) (1 pmol) ve 2 μL temizlenmiş PCR ürünü kullanılmıştır. Elde edilen karışım PCR cihazı aracılığıyla 96 °C' de 2 dakika ve 1 döngü, 96 °C' de 10 saniye, 54 °C' de 15 saniye ve 60 °C' de 4 dakika olacak şekilde 35 döngüye tabi tutulmuştur. Üçüncü aşamada Sekanslama işlemi sonucunda elde edilen DNA'ların baz dizilimleri tespit edilmiştir. Baz Dizilimleri Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzer cihazı (Resim 2.3) kullanılarak belirlenmiştir.



Resim 2. 3: DNA Dizi Analiz Cihazı

2. 2. 6. İstatistik Analizi

DNA dizi analizi işlemiyle alınan sonuçlar Sequencher 5.6.1 paket programı kullanılarak düzenlenmiştir. Düzenlemeleri yapılan örneklerin hizalanması amacıyla BioEdit programı (Hall, 1999) kullanılmış ve polimorfik olan SNP'ler belirlenmiştir.

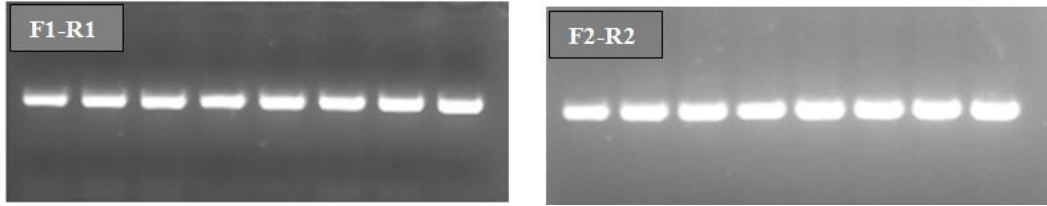
Yapılan DNA dizileme analizi sonucu belirlenen SNP'lerde genotip frekansı, toplam allel sayısı, allel frekansları (X_i) ve heterozigotluk değerleri (H_e) R dili kullanılarak geliştirilmiş Genetics paketi (Warnes, 2003) ile hesaplanmıştır. Haplogrupların oluşturulmasında Haploview programı (Barrett vd., 2005) kullanılmış, en küçük allel frekansı ve Hardy-Weinberg p değeri 0,001'den büyük olanlar analize dahil edilmiş ve blokların oluşturulmasında dört gamet kuralı göz önüne alınmıştır.

T.C. Tarım Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından yürütülen Anadolu mandalarının halk elinde ıslahı projesi aracılığıyla ve TAGEM/18/AR-GE/12 kodlu "Anadolu Mandalarında büyüme ve süt verim özellikleri yönünden damızlık seçimi için genetik tanı kiti geliştirilmesi" başlıklı proje kapsamında Afyonkarahisar ilinde yetiştirilen mandalardan toplanan ve "Manda Yıldızı" (Tekerli, 2015-2019) isimli veri tabanı programına kayıt edilen hayvanların

farklı çevre faktörleri bakımından arındırılmış süt verim ortalamaları kullanılmıştır. Düzeltmiş süt verimleri ve SNP"ler arasındaki ilişki ANOVA (Tek Yönlü Varyans Analizi) yöntemi kullanılarak ve Minitab istatistik programı yardımıyla analiz edilmiştir.

3. BULGULAR

Nehir mandalarının (*Bubalus bubalis*) STAT5A geni 21077 bp uzunluğundadır. Bu çalışmada, toplamda 192 baş mandada STAT5A geninin 6 – 9. ekzonlar arasında (11176 – 12896 bazlar) kalan 1720 bp uzunluğundaki bölge PCR ile çoğaltılmış ve bu bölgedeki polimorfizmler DNA dizi analizi kullanılarak belirlenmiştir. PCR sonucunda elde edilen jel görüntüleri Resim 3. 1' de gösterilmiştir.



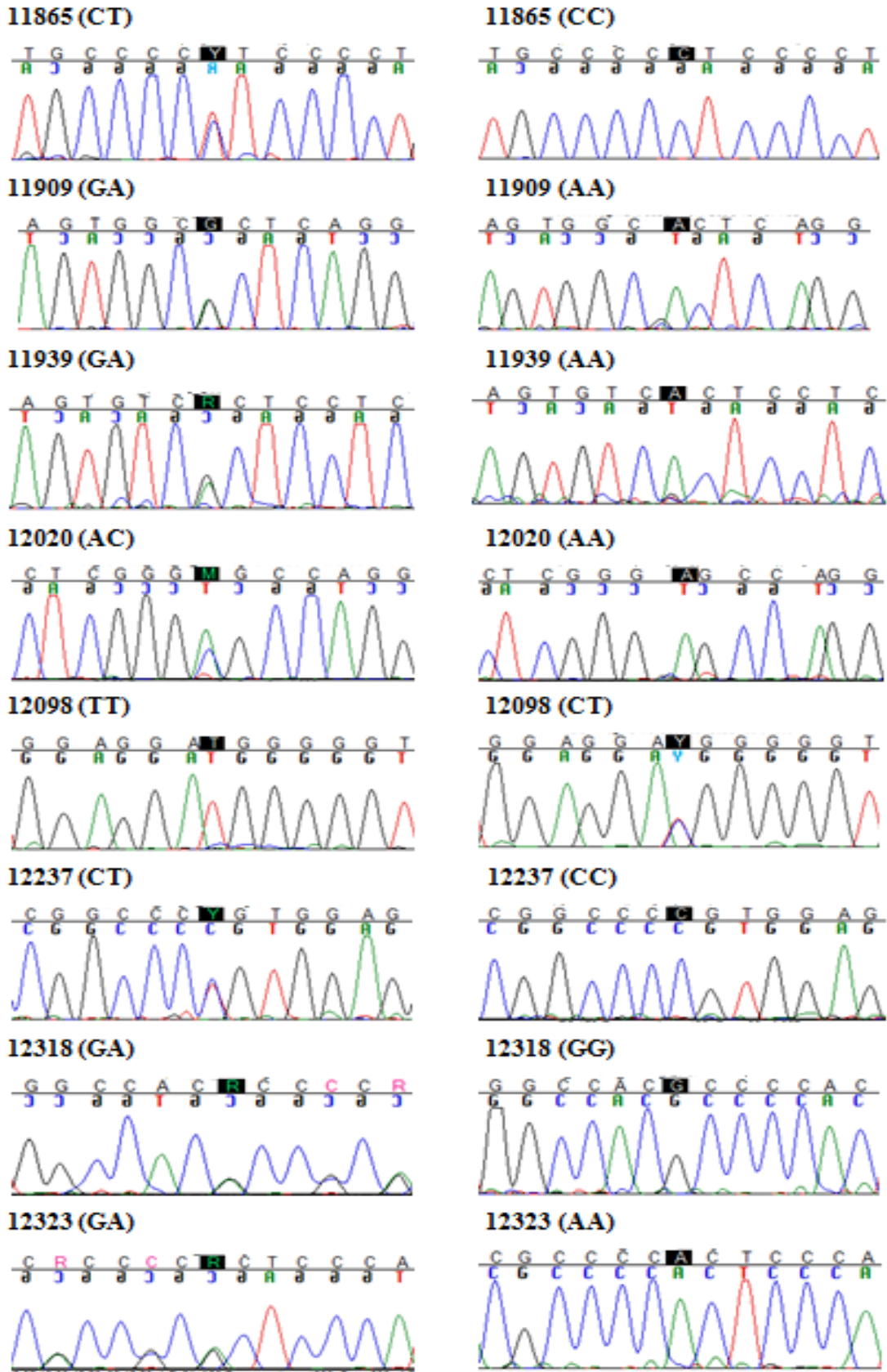
Resim 3. 1: PCR Jel Görüntüsü

DNA Dizi Analizi sonucunda toplanan veriler Sequencher 5.6.1 bilgisayar programı ile düzenlenmiştir. Süt verimleri alınmış örneklerin 171 tanesi sorunsuz okunabilmiştir. Çalışma sonucunda toplamda 13 farklı bölgede polimorfizm saptanmıştır. Tespit edilen polimorfik bölgeler Çizelge 3. 1 'de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre 7. intronda 5, 8. intronda 7 ve 8. ekzonda 1 adet olmak üzere toplamda 13 adet polimorfizm tespit edilmiştir. DNA dizi analizi sonucunda tespit edilen SNP'lerin pik görüntüsü Şekil 3. 1' de verilmiştir.

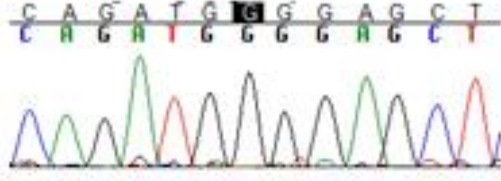
Çizelge 3. 1. DNA dizi analizi sonucu belirlenen SNP ler

Bölge	Ekzon / İtron	Polimorfizm
11865	7. intron	C / T
11909	7. intron	A / G
11939	7. intron	A / G
12020	7. intron	A / C
12098	7. intron	T / C
12237	8. ekzon	C / T
12318	8. intron	A / G
12323	8. intron	A / G
12372	8. intron	G / A
12446	8. intron	G / T
12464	8. intron	G / C
12598	8. intron	G / A
12646	8. intron	C / T

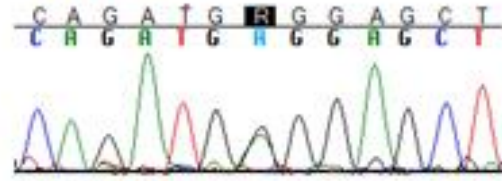


Şekil 3. 1: DNA Dizi Analizi sonucunda tespit edilen SNP'lerin kromatogram görüntüsü

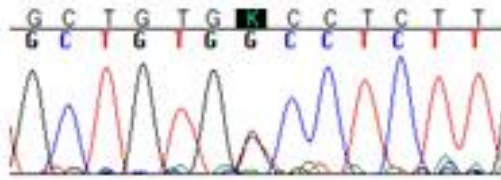
12372 (GG)



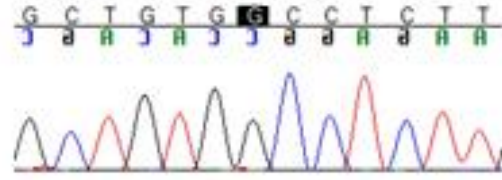
12372 (GA)



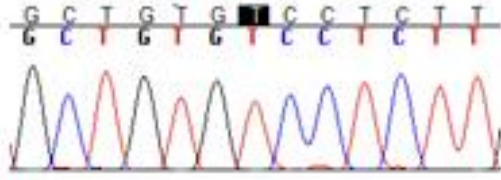
12446 (GT)



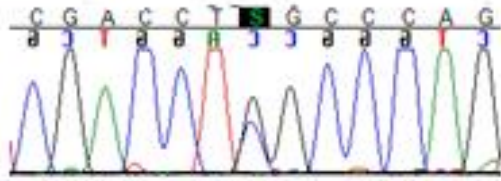
12446 (GG)



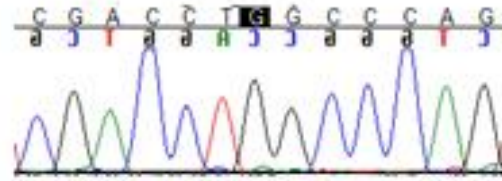
12446 (TT)



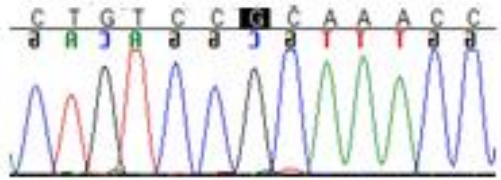
12464 (GC)



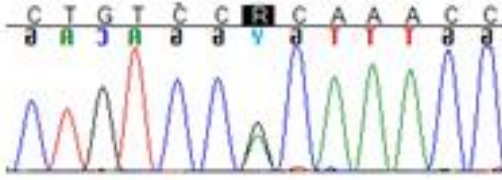
12464 (GG)



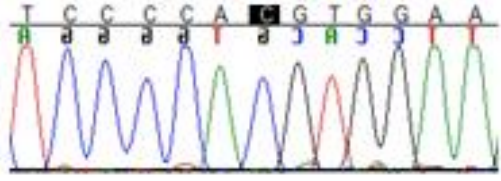
12598 (GG)



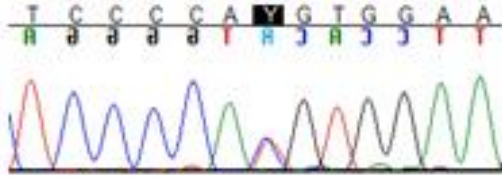
12598 (GA)



12646 (CC)



12646 (CT)



Şekil 3. 1: (Devam) DNA Dizi Analizi sonucunda tespit edilen SNP'lerin kromatogram görüntüsü

Çizelge 3. 2. STAT5A genindeki genotip ve allel frekansları, heterozigotluk ve Hardy-Weinberg değerleri

SNP	Bulunduğu Bölge	Allel	Allel Frekansları	Genotipler	Genotip Frekansları	Heterozigotluk Değerleri	Hardy-Weinberg Khi-Kare	Hardy-Weinberg p değeri																																																																																																																																																															
11865	Intron 7	C	0,73	CC	0,46	0,395	24,704	2,36x10 ⁻⁸																																																																																																																																																															
		T	0,27	CT	0,54				11909	Intron 7	G	0,74	GG	0,50	0,381	14,825	6,09x10 ⁻⁵	A	0,26	GA	0,49			AA	0,01	11939	Intron 7	G	0,25	AA	0,50	0,376	20,222	4,72x10 ⁻⁷	A	0,75	GA	0,50	12020	Intron 7	C	0,15	AA	0,70	0,257	5,766	0,0161	A	0,85	AC	0,30	12098	Intron 7	C	0,20	TT	0,60	0,322	11,453	0,0002	T	0,80	TC	0,40	12237	Ekzon 8	C	0,82	CC	0,63	0,301	9,262	0,0011	T	0,18	CT	0,37	12318	Intron 8	G	0,95	GG	0,90	0,099	0,552	1,0000	A	0,05	GA	0,10	12323	Intron 8	A	0,95	AA	0,90	0,094	0,493	1,0000	G	0,05	AG	0,10	12372	Intron 8	G	0,80	GG	0,60	0,318	11,065	0,0003	A	0,20	GA	0,40	12446	Intron 8	G	0,74	GG	0,51	0,386	6,044	0,0203	T	0,26	GT	0,46			TT	0,03	12464	Intron 8	G	0,95	GG	0,90	0,094	0,496	1,0000	C	0,05	GC	0,10	12598	Intron 8	G	0,78	GG	0,57	0,341	13,984	3,58x10 ⁻⁵	A	0,22	GA	0,43	12646	Intron 8	C	0,87	CC	0,73	0,233	4,404
11909	Intron 7	G	0,74	GG	0,50	0,381	14,825	6,09x10 ⁻⁵																																																																																																																																																															
		A	0,26	GA	0,49																																																																																																																																																																		
				AA	0,01																																																																																																																																																																		
11939	Intron 7	G	0,25	AA	0,50	0,376	20,222	4,72x10 ⁻⁷																																																																																																																																																															
		A	0,75	GA	0,50				12020	Intron 7	C	0,15	AA	0,70	0,257	5,766	0,0161	A	0,85	AC	0,30	12098	Intron 7	C	0,20	TT	0,60	0,322	11,453	0,0002	T	0,80	TC	0,40	12237	Ekzon 8	C	0,82	CC	0,63	0,301	9,262	0,0011	T	0,18	CT	0,37	12318	Intron 8	G	0,95	GG	0,90	0,099	0,552	1,0000	A	0,05	GA	0,10	12323	Intron 8	A	0,95	AA	0,90	0,094	0,493	1,0000	G	0,05	AG	0,10	12372	Intron 8	G	0,80	GG	0,60	0,318	11,065	0,0003	A	0,20	GA	0,40	12446	Intron 8	G	0,74	GG	0,51	0,386	6,044	0,0203	T	0,26	GT	0,46			TT	0,03	12464	Intron 8	G	0,95	GG	0,90	0,094	0,496	1,0000	C	0,05	GC	0,10	12598	Intron 8	G	0,78	GG	0,57	0,341	13,984	3,58x10 ⁻⁵	A	0,22	GA	0,43	12646	Intron 8	C	0,87	CC	0,73	0,233	4,404	0,0474	T	0,13	CT	0,27																									
12020	Intron 7	C	0,15	AA	0,70	0,257	5,766	0,0161																																																																																																																																																															
		A	0,85	AC	0,30				12098	Intron 7	C	0,20	TT	0,60	0,322	11,453	0,0002	T	0,80	TC	0,40	12237	Ekzon 8	C	0,82	CC	0,63	0,301	9,262	0,0011	T	0,18	CT	0,37	12318	Intron 8	G	0,95	GG	0,90	0,099	0,552	1,0000	A	0,05	GA	0,10	12323	Intron 8	A	0,95	AA	0,90	0,094	0,493	1,0000	G	0,05	AG	0,10	12372	Intron 8	G	0,80	GG	0,60	0,318	11,065	0,0003	A	0,20	GA	0,40	12446	Intron 8	G	0,74	GG	0,51	0,386	6,044	0,0203	T	0,26	GT	0,46					TT	0,03				12464	Intron 8	G	0,95	GG	0,90	0,094	0,496	1,0000	C	0,05	GC	0,10	12598	Intron 8	G	0,78	GG	0,57	0,341	13,984	3,58x10 ⁻⁵	A	0,22	GA	0,43	12646	Intron 8	C	0,87	CC	0,73	0,233	4,404	0,0474	T	0,13	CT	0,27																																	
12098	Intron 7	C	0,20	TT	0,60	0,322	11,453	0,0002																																																																																																																																																															
		T	0,80	TC	0,40				12237	Ekzon 8	C	0,82	CC	0,63	0,301	9,262	0,0011	T	0,18	CT	0,37	12318	Intron 8	G	0,95	GG	0,90	0,099	0,552	1,0000	A	0,05	GA	0,10	12323	Intron 8	A	0,95	AA	0,90	0,094	0,493	1,0000	G	0,05	AG	0,10	12372	Intron 8	G	0,80	GG	0,60	0,318	11,065	0,0003	A	0,20	GA	0,40	12446	Intron 8	G	0,74	GG	0,51	0,386	6,044	0,0203	T	0,26	GT	0,46					TT	0,03				12464	Intron 8	G	0,95	GG	0,90	0,094	0,496	1,0000	C	0,05	GC	0,10	12598	Intron 8	G	0,78	GG	0,57	0,341	13,984	3,58x10 ⁻⁵	A	0,22	GA	0,43	12646	Intron 8	C	0,87	CC	0,73	0,233	4,404	0,0474	T	0,13	CT	0,27																																														
12237	Ekzon 8	C	0,82	CC	0,63	0,301	9,262	0,0011																																																																																																																																																															
		T	0,18	CT	0,37				12318	Intron 8	G	0,95	GG	0,90	0,099	0,552	1,0000	A	0,05	GA	0,10	12323	Intron 8	A	0,95	AA	0,90	0,094	0,493	1,0000	G	0,05	AG	0,10	12372	Intron 8	G	0,80	GG	0,60	0,318	11,065	0,0003	A	0,20	GA	0,40	12446	Intron 8	G	0,74	GG	0,51	0,386	6,044	0,0203	T	0,26	GT	0,46					TT	0,03				12464	Intron 8	G	0,95	GG	0,90	0,094	0,496	1,0000	C	0,05	GC	0,10	12598	Intron 8	G	0,78	GG	0,57	0,341	13,984	3,58x10 ⁻⁵	A	0,22	GA	0,43	12646	Intron 8	C	0,87	CC	0,73	0,233	4,404	0,0474	T	0,13	CT	0,27																																																											
12318	Intron 8	G	0,95	GG	0,90	0,099	0,552	1,0000																																																																																																																																																															
		A	0,05	GA	0,10				12323	Intron 8	A	0,95	AA	0,90	0,094	0,493	1,0000	G	0,05	AG	0,10	12372	Intron 8	G	0,80	GG	0,60	0,318	11,065	0,0003	A	0,20	GA	0,40	12446	Intron 8	G	0,74	GG	0,51	0,386	6,044	0,0203	T	0,26	GT	0,46					TT	0,03				12464	Intron 8	G	0,95	GG	0,90	0,094	0,496	1,0000	C	0,05	GC	0,10	12598	Intron 8	G	0,78	GG	0,57	0,341	13,984	3,58x10 ⁻⁵	A	0,22	GA	0,43	12646	Intron 8	C	0,87	CC	0,73	0,233	4,404	0,0474	T	0,13	CT	0,27																																																																								
12323	Intron 8	A	0,95	AA	0,90	0,094	0,493	1,0000																																																																																																																																																															
		G	0,05	AG	0,10				12372	Intron 8	G	0,80	GG	0,60	0,318	11,065	0,0003	A	0,20	GA	0,40	12446	Intron 8	G	0,74	GG	0,51	0,386	6,044	0,0203	T	0,26	GT	0,46					TT	0,03				12464	Intron 8	G	0,95	GG	0,90	0,094	0,496	1,0000	C	0,05	GC	0,10	12598	Intron 8	G	0,78	GG	0,57	0,341	13,984	3,58x10 ⁻⁵	A	0,22	GA	0,43	12646	Intron 8	C	0,87	CC	0,73	0,233	4,404	0,0474	T	0,13	CT	0,27																																																																																					
12372	Intron 8	G	0,80	GG	0,60	0,318	11,065	0,0003																																																																																																																																																															
		A	0,20	GA	0,40				12446	Intron 8	G	0,74	GG	0,51	0,386	6,044	0,0203	T	0,26	GT	0,46					TT	0,03				12464	Intron 8	G	0,95	GG	0,90	0,094	0,496	1,0000	C	0,05	GC	0,10	12598	Intron 8	G	0,78	GG	0,57	0,341	13,984	3,58x10 ⁻⁵	A	0,22	GA	0,43	12646	Intron 8	C	0,87	CC	0,73	0,233	4,404	0,0474	T	0,13	CT	0,27																																																																																																		
12446	Intron 8	G	0,74	GG	0,51	0,386	6,044	0,0203																																																																																																																																																															
		T	0,26	GT	0,46																																																																																																																																																																		
				TT	0,03																																																																																																																																																																		
12464	Intron 8	G	0,95	GG	0,90	0,094	0,496	1,0000																																																																																																																																																															
		C	0,05	GC	0,10				12598	Intron 8	G	0,78	GG	0,57	0,341	13,984	3,58x10 ⁻⁵	A	0,22	GA	0,43	12646	Intron 8	C	0,87	CC	0,73	0,233	4,404	0,0474	T	0,13	CT	0,27																																																																																																																																					
12598	Intron 8	G	0,78	GG	0,57	0,341	13,984	3,58x10 ⁻⁵																																																																																																																																																															
		A	0,22	GA	0,43				12646	Intron 8	C	0,87	CC	0,73	0,233	4,404	0,0474	T	0,13	CT	0,27																																																																																																																																																		
12646	Intron 8	C	0,87	CC	0,73	0,233	4,404	0,0474																																																																																																																																																															
		T	0,13	CT	0,27																																																																																																																																																																		

Tespit edilen SNP 11865, 11909, 11939, 12020 ve 12098 intron 7'de bulunmaktadır. Bunlardan SNP 11865'de 91 tane CT genotipinde, 80 tane de CC genotipinde olduğu tespit edilmiştir. Bu SNP'de C allel frekansı 0,73; T allel frekansı 0,27 ve heterozigotluk değeri 0,395 bulunmuştur. SNP 11909'da 171 örnekten 2 tanesinin AA, 85 tanesinin GG ve 84 tanesinin de GA genotipinde olduğu görülmüştür. Bu SNP'de G allelinin frekansı 0,74, A allelinin frekansı 0,26 ve heterozigotluk değeri 0,381 olarak hesaplanmıştır. SNP 11939'da 86 tane AA ve 85 tane de GA genotipinde hayvan tespit edilmiştir. Bu SNP'de A allel frekansı 0,75; G allel frekansı 0,25 ve heterozigotluk değeri 0,376 bulunmuştur. SNP 12020'de 171 örnekten 119 tanesi AA genotipine, 52 tanesi de AC genotipine sahip bireylerin olduğu görülmüştür. Bu SNP'deki A allel frekansı 0,85; C allel frekansı 0,15 ve heterozigotluk değeri 0,257 olarak hesaplanmıştır. SNP 12098'de 101 TT ve 70 CT genotipinde birey olduğu belirlenmiştir. Bu SNP'deki T allel frekansı 0,8 ve C allel frekansı 0,2 ve heterozigotluk değeri 0,322 bulunmuştur (Çizelge 3.2).

Ekzon 8'de bulunan SNP 12237'de 109 örneğin CC genotipinde, 62 örneğin ise CT genotipinde olduğu belirlenmiş; C allel frekansı 0,82; T allel frekansı 0,18 ve heterozigotluk değeri 0,301 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.2).

Sekizinci intronda SNP 12318, 12323, 12372, 12446, 12464, 12598 ve 12646'da polimorfizm tespit edilmiştir. SNP 12318'de 19 GA genotipinde, 152 GG genotipinde manda olduğu belirlenmiş ve G allel frekansı 0,95; A allel frekansı 0,05 ve heterozigotluk değeri 0,099 bulunmuştur. SNP 12323'de 153 AA, 18 GA genotipinde manda tespit edilmiş ve A allel frekansı 0,95; G allel frekansı 0,05 ve heterozigotluk değeri 0,094 olarak hesaplanmıştır. SNP 12372'de 106 GG, 65 GA genotipinde hayvan tespit edilmiş ve G allel frekansı 0,8; A allel frekansı 0,2 ve heterozigotluk değeri 0,318 bulunmuştur. SNP 12446'da 86 GG, 6 TT ve 79 GT genotipinde hayvan tespit edilmiş ve G allel frekansı 0,74; T allel frekansı 0,26 ve heterozigotluk değeri 0,386 olarak hesaplanmıştır. SNP 12464'de 155 GG ve 16 GC genotipinde hayvan tespit edilmiş ve G allel frekansı 0,95; C allel frekansı 0,05 ve heterozigotluk değeri 0,094 bulunmuştur. SNP 12598'de 99 GG ve 72 GA genotipinde hayvan tespit edilmiş ve G allel frekansı 0,78; A allel frekansı 0,22 ve heterozigotluk değeri 0,341 olarak hesaplanmıştır. SNP

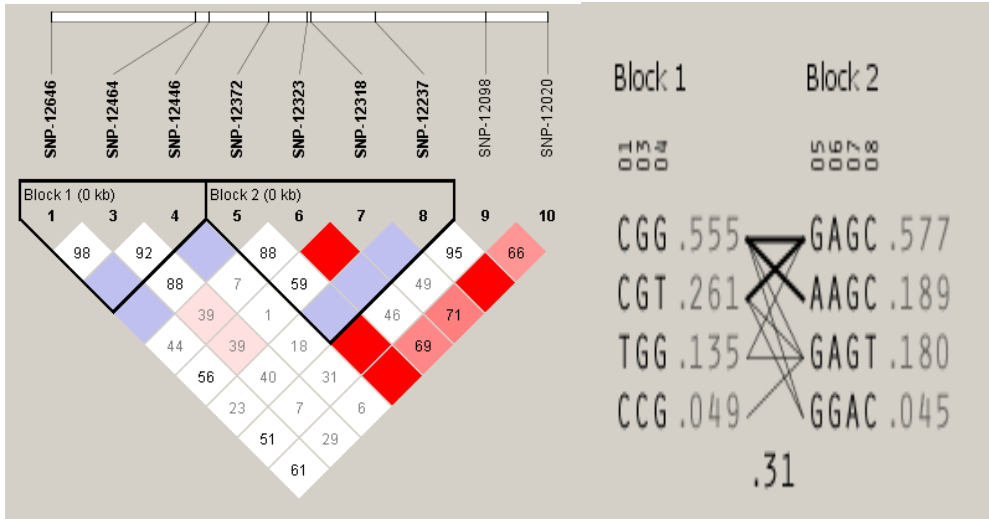
12646'da 124 CC ve 47 CT genotipinde hayvan tespit edilmiş ve C allel frekansı 0,87; T allel frekansı ise 0,13 olarak belirlenmiştir. Heterozigotluk değeri ise 0,233 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.2).

Bağlantı dengesizliği (Linkage Disequilibrium-LD), farklı lokuslardaki aleller arasındaki rastgele olmayan ilişki olarak tanımlanmakta ve LD katsayıları olarak D' ve r^2 sıklıkla kullanılmaktadır. D' iki lokus arasındaki rekombinasyon geçmişini, r^2 ise iki SNP arasındaki ilişkinin gücünü göstermektedir. Haplotip blokları, düşük rekombinasyon oranı gösteren kromozom bölgeleri olarak tanımlanmaktadır. Bir nesilden diğerine tek birimler olarak kalıtılmaktadır (Salem vd., 2018). Bağlantı dengesizliğini belirlemek amacıyla yapılan haploview analizinde incelenen bölgedeki SNP'ler arasındaki bileşikler Şekil 3.2' de verilmiştir. Şekil incelendiğinde SNP'lerin iki blok oluşturdukları görülmektedir. Birinci blokta SNP 12446, 12464 ve 12646 yer almakta iken, ikinci bloğu SNP 12237, 12318, 12323 ve 12372 oluşturmuştur. SNP 11865, 11909, 11939 ve 12598 Hardy-Weinberg P değeri 0,0001 den küçük olduğu için analize dahil edilmemiştir. Birinci blokta SNP 12646 ile 12464 arasındaki D' , LOD ve r^2 değerleri sırasıyla 0,98; 0,26 ve 0,008; SNP 12464 ile 12446 arasındaki D' , LOD ve r^2 değerleri sırasıyla 0,92; 0,33 ve 0,016; SNP 12646 ile 12446 arasındaki D' , LOD ve r^2 değerleri sırasıyla 1,00; 1,89 ve 0,055 bulunmuştur. Birinci blokta CGG, CGT, TGG ve CCG haplotipleri gözlenmiştir ve en fazla CGG (0,555) ve CGT (0,261) haplotiplerinin olduğu görülmüştür.

İkinci blokta SNP 12237 ile 12318 arasındaki D' , LOD ve r^2 değerleri sırasıyla 1,00; 0,52 ve 0,012; SNP 12237 ile 12323 arasındaki D' , LOD ve r^2 değerleri sırasıyla 1,00; 0,43 ve 0,012; SNP 12237 ile 12372 arasındaki D' , LOD ve r^2 değerleri sırasıyla 1,00; 1,46 ve 0,056 bulunmuştur. SNP 12318 ile 12323 arasındaki D' , LOD ve r^2 değerleri sırasıyla 1,00; 24,01 ve 0,945; SNP 12318 ile 12372 arasındaki D' , LOD ve r^2 değerleri sırasıyla 0,60; 0,13 ve 0,005; SNP 12323 ile 12372 arasındaki D' , LOD ve r^2 değerleri sırasıyla 0,88; 0,27 ve 0,01 hesaplanmıştır. İkinci blokta GAGC, AAGC, GAGT ve GGAC haplotipleri gözlenmiş ve en fazla GAGC (0,577) ve AAGC (0,189) haplotiplerinin olduğu görülmüştür (Şekil 3.2). Birinci ve ikinci bloklarda en fazla

CGGGAGC, CGTGAGC ve CCGAAGC haplogruplara sahip hayvanlara rastlanmaktadır.

Haploview analizi blokları incelendiğinde birinci blokta bulunan SNP 12446, 12464 ve 12646 arasında bir bileşiklik olduğu gözlenmektedir. İkinci blokta ise SNP 12237, 12318, 12323 ve 12372 arasında bir bileşiklik olduğu görülmektedir. Bu durum bu blokların kendi içlerinde bir crossing over olmadığını, birlikte kalıtıldıklarını ve muhtemel bir QTL (kantitatif özellik lokusu) olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 3.2: STAT5A geninde belirlenen SNP'lere ait haploview görüntüsü

TAGEM/18/AR-GE/12 kodlu "Anadolu Mandalarında büyüme ve süt verim özellikleri yönünden damızlık seçimi için genetik tanı kiti geliştirilmesi" başlıklı proje kapsamında Afyonkarahisar ilinde yetiştirilen mandalardaki mevcut çalışmada STAT5A geninde tespit edilen SNP'ler ile "Manda Yıldızı" (Tekerli, 2015-2019) isimli veri tabanı programından alınan ve farklı çevre faktörleri bakımından arındırılmış süt verim ortalamaları arasındaki ilişkileri tespit etmek amacıyla Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) yapılmıştır. Bu analiz sonucunda elde edilen genotipler, hayvan sayıları ve ortalama süt verimleri Çizelge 3. 3' de verilmiştir.

Yapılan istatistik analiz sonucu 7. ve 8. intronlarda bulunan SNP'ler ile süt verimi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. STAT5A geninin 8. ekzonunda yer alan SNP

12237 (g+12237 C>T) ile süt verimi arasındaki ilişki önemli ($P<0,01$) bulunmuştur. Bu SNP’de CC genotipine sahip mandaların CT genotipindeki mandalardan daha az süt verdikleri tespit edilmiştir (Çizelge 3. 3). Analizlerde TT genotipinde mandalar bulunamamıştır.

Çizelge 3.3. Anadolu manda ineklerinde belirlenen genotipler ve düzeltilmiş süt verimi ortalamaları arasındaki ilişkiyi gösterir varyans analiz tablosu

SNP	Genotipler	N	Düzeltilmiş Süt Verimi Ortalaması	P değeri
11865	CC	80	893,5	0,767
	CT	91	884,6	
11909	GG	85	892,3	0,970
	GA	84	885,0	
	AA	2	897,0	
11939	AA	86	890,0	0,933
	GA	85	887,5	
12020	AA	119	893,4	0,645
	AC	52	878,2	
12098	TT	101	885,5	0,796
	TC	70	893,4	
12237	CC	109	856,8	0,005**
	CT	62	944,9	
12318	GG	152	895,3	0,220
	GA	19	836,5	
12323	AA	153	894,2	0,293
	GA	18	842,6	
12372	GG	106	888,7	0,997
	GA	65	888,8	
12446	GG	86	882,2	0,446
	GT	79	902,4	
	TT	6	802,8	
12464	GG	155	884,4	0,363
	GC	16	931,4	
12598	GG	99	885,1	0,778
	GA	72	893,7	
12646	CC	124	881,4	0,428
	CT	47	908,1	

** $P < 0,01$

4. TARTIŞMA

STAT genleri, çekirdek içindeki DNA bağlanma alanları aracılığıyla gen ekspresyonunu düzenleyebilen hücre içi transkripsiyon faktörleri olarak tanımlanmaktadır. STAT5A, meme bezi gelişimi, süt proteini sentezi, meme glandüler hücre proliferasyonunun ve süt-protein gen ekspresyonunun düzenlenmesinde görev almaktadır. Aynı zamanda süt salgılayan meme epitel hücrelerinde gen ekspresyonunun transkripsiyonel stimülasyonu yoluyla PRL ve GH sinyallerine aracılık ettiği, döllenme ve embriyonik gelişim süreçlerinde de önemli rol oynadığı bilinmektedir. STAT5A daha önce sığır, keçi ve koyunlarda araştırılmış ve genetik varyantlar süt yağ asidi profilleri ve süt verimi ile ilişkilendirilmiştir (Brym vd., 2004; Schennink vd., 2009; An vd., 2013; Abousoliman vd., 2020). Bu araştırma ile Anadolu mandalarının STAT5A genindeki polimorfizmler araştırılmış ve intron 7 ile intron 8'de içeren bölgede toplam 13 SNP belirlenmiştir. Bu SNP'lerden beş tanesi intron 7'de, bir tanesi ekzon 8'de ve yedi tanesi de intron 8'de bulunmuştur. SNP'ler birbirine çok yakın bölgelerde yer almasına rağmen Haploview analizinde iki blok oluştuğu gözlenmiştir.

Süt verimi ile SNP'ler arasındaki ilişki incelendiğinde ekzon 8'de bulunan SNP 12237 ile süt verimi arasındaki ilişki önemli ($P < 0,01$) bulunmuştur. Bu SNP'deki CT genotipine sahip mandaların süt verimi ortalamasının CC genotipine sahip mandalardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Schennink vd. (2009), Holştayn ırkı sığırların STAT5A genindeki polimorfizmler ile süt verimi ve süt yağı kompozisyonu arasındaki ilişkiyi belirlemek için yaptıkları çalışmada, STAT5A g.9501G>A polimorfizminin süt verimi ve süt yağı kompozisyonunu etkilediğini bulmuşlardır.

Kale ve Yadav (2012), Murrah mandalarında STAT5A genindeki polimorfizmleri belirlemek için yaptıkları bir çalışmada 7. ekzonda tespit ettikleri SNP'nin 305 günlük süt verimi üzerine etkisinin önemli ($P < 0,05$) olduğunu bildirmişlerdir. Anadolu Mandalarında yapılan bu çalışmada 7. ekzonda herhangi bir polimorfizm tespit

edilememiş, ancak 8. ekzonda tespit edilen polimorfizmin süt verimini önemli ölçüde ($P < 0,01$) etkilediği bulunmuştur.

Ouerghi vd. (2017), 120 baş sütçü sığırdada yapmış oldukları çalışmada, STAT5A geninin 7. ve 9. intronları arasındaki 820 bp'lik bölgedeki SNP12195 araştırmışlardır. Çalışmalarında, CC genotipindeki ineklerin GG ve GC genotipindeki ineklere kıyasla % 8-9 daha fazla embriyolarının hayatta kalma ve fertilizasyon oranına sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Öner vd. (2017) 160 Holstein düvede yaptıkları bir çalışmada STAT5A genindeki polimorfizmler ile fertilité arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. STAT5A geninin 8. ekzonundaki SNP'nin sığırlarda fertilité üzerine etkisinin olduğunu ancak istatistikî olarak önemli olmadığını bildirmişlerdir. Mevcut çalışmada Anadolu Mandalarında yapılan bu çalışmada ise STAT5A geninin 8. ekzonda belirlediğimiz SNP12237 ile süt verimi arasındaki ilişki önemli bulunmuştur.

Selvaggi vd. (2017) Ageroles ırkı sığırlarda yaptıkları çalışmada STAT5A genindeki polimorfizm ile süt kompozisyonu arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. TC genotipli ineklerle karşılaştırıldığında, TT genotipine sahip ineklerin sütlerinin daha yüksek yağ ve protein içeriğine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Khatib vd. (2009) sığırlarda STAT5A geninin 8. ekzonundaki tek bir nükleotid polimorfizminin (SNP12195 G>C) süt proteini ve yağ yüzdesini etkilediğini bildirmiştir. Ayrıca, bu SNP'nin döllenme ve embriyonun hayatta kalma oranına da etkisinin olduğunu belirlemişlerdir. Anadolu Mandalarında SNP 12237 de CT genotipine sahip manda ineklerinin CC genotipindekilere oranla daha fazla süt verdikleri bulunmuştur. Bu araştırmada TT genotipindeki hayvanlara rastlanmamıştır.

Li vd. (2018) manda STAT5A geninin ekspresyon seviyeleri üzerine bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada STAT5A geninin azalan ekspresyonunun süt proteini genlerinin ekspresyonunu önemli ölçüde inhibe ettiğini, STAT5A geninin aşırı ekspresyonunun süt proteini genlerinin ekspresyonunu arttırdığını tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda STAT5A geninin ekspresyon seviyelerinin, manda meme epitel

hücreleri üzerinden süt proteini gen ekspresyonunu ve hücre döngüsü geçişini, dolayısıyla hücre proliferasyonunu ve laktasyonunu etkileyebileceği sonucuna varmışlardır.

Coizet vd. (2018), 491 baş İtalyan manda ineğinde yaptıkları çalışmada STAT5A genindeki polimorfizmler ile süt verimi arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmada üç tane intron ve bir tane ekzonda SNP belirlemişlerdir. Bu SNP'lerden 8.intronda bulunan STAT5A_c989+344'de TT genotipindeki hayvanların süt protein yüzdesinin TC ve CC genotipindekilere oranla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, Anadolu mandalarında bulunan SNP'ler ile süt protein yüzdesi arasındaki ilişkiye bakılmamıştır. Ancak, 8. introndan belirlenen yedi SNP ile süt verimi arasında ilişki bulunamamıştır.

Abousoliman vd. (2020), Mısır Barki koyunlarında yaptıkları araştırmada STAT5A (rs161082816) polimorfizminin süt verimi ve bileşenleri üzerine önemli etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. STAT5A geninin 11 ekzonundaki SNP rs161082816'de, AA genotipindeki koyunların GG ve AG genotipindekilere oranla daha fazla laktoz yüzdesine sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Kıyıcı vd. (2018), Kayseri ilinde yetiştirilen 167 baş Holştayn inek üzerinde yaptıkları bir çalışmada STAT5A geninin 7. ekzon üzerinde bulunan ve Aval polimorfizmi olarak adlandırdıkları bir SNP belirlemişlerdir. Ancak, bu SNP ile süt verimi ve süt kompozisyonu arasında bir ilişki bulamamışlardır. Yapmış oldukları başka bir çalışmada (Kıyıcı vd., 2020) STAT5A-Aval polimorfizmi ile somatik hücre sayısı arasında anlamlı bir ilişki olmadığını, ancak TT genotipine sahip ineklerde mastitise duyarlılığın arttığını bildirmişlerdir. Al-Azzawi vd. (2020), Irak' da yetiştirilen 50 baş Holstein ineğinde STAT5A geninin 7. ekzonundaki iki mutasyon (C12483T ve C12471T) ile süt üretim özellikleri arasındaki ilişkiyi belirlemeye çalışmışlardır. Bulunan bu iki SNP ile günlük süt miktarı, toplam süt verimi ve laktasyon dönemi özelliklerinde anlamlı bir farklılığa yol açmadığını bildirmişlerdir. Anadolu mandalarının STAT5A geninin 7. ekzonunda polimorfizm belirlenememiş, ancak 7.

intronunda 5 SNP bulunmuştur. Bu SNP'ler ile süt verimi arasında bir ilişki ortaya konulamamıştır.

Regalado vd. (2020), Meksika'da yetiştirilen Holştayn ırkı 112 baş süt ineğinde yaptıkları çalışmada STAT5A genindeki polimorfizmlerle üreme parametreleri arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. STAT5A geninde belirledikleri bir SNP ile üreme parametreleri arasında ilişki bulamadıklarını bildirmişlerdir.

İbiş ve Erdoğan (2019), 96 baş Anadolu mandası malağı üzerinde yapmış oldukları araştırmada STAT5A geninin 6. intronunda bir, 7. intronunda beş, 8. intronunda üç ve 8. ekzonda 1 olmak üzere 10 adet SNP tespit etmişlerdir. Anadolu mandası ineklerinde yapılan mevcut çalışmada ise 7. intronda beş, 8. intronda yedi ve 8. ekzonda bir adet olmak üzere toplamda 13 adet polimorfizm tespit edilmiştir. Tespit edilen bu SNP'lerden 8. ekzonda T alleli taşıyan hayvanların daha fazla süt verdiği bulunmuştur.

Daldaban vd. (2020), Anadolu mandalarında et ve süt veriminin artırılması sürecinde belirteç olarak kullanılacak potansiyele sahip MYF-5 ve STAT5A gen polimorfizmlerini araştırmışlardır. Araştırmalarında 120 baş Anadolu mandası kullanmışlar ve STAT5A-AvaI polimorfizmi açısından tüm hayvanların CC genotipinde olduğunu bildirmişlerdir.

Naveed vd. (2021), Pakistan'da Nili Ravi mandaları üzerinde yaptıkları çalışmada STAT5A geninde altı tanesi intronda, üç tanesi ekzonda olmak üzere toplam 9 SNP belirlemişlerdir. Bu polimorfizmlerden 5. ekzondaki G→A (AGT>AAT), Serin'den (S) Asparagin'e (N) bir aminoasit değişimine neden olduğunu bildirmişler, ancak süt verimi ile ilişkisini araştırmamışlardır. Anadolu mandalarında 5. ekzon çalışılmamıştır, ancak 8. ekzondaki SNP12237'de T alleli taşıyan mandaların süt verimlerinin diğer alleli homozigot taşıyanlara oranla daha fazla ($P<0,01$) süt verdikleri belirlenmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sağlıklı, dengeli ve doğal beslenmenin önem kazandığı günümüzde manda sütü ve ürünlerine talep her geçen gün artmaktadır. Türkiye coğrafi koşulları nedeniyle Anadolu mandalarının yetiştirilmesi için uygun bir ortam sağlamaktadır. Yetiştirme yapılırken ıslah çalışmalarının yapılmasının ve genetik belirteçlerin kullanılmasının mandalarda süt verimini artırarak ülke ekonomisine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu genetik belirteçler arasında özellikle süt veriminde ve büyümede etkili olan, süt protein genlerine sinyal iletimi düzenleyen STAT5A, PRLR ve GHR ön plana çıkmaktadır.

Farklı hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda STAT5A geninin farklı bölgelerinde tespit edilen polimorfik bölgelerin başta süt verimi olmak üzere, embriyonik yaşam süresi, döllenme, meme bezi gelişimi gibi önemli olaylarda rol aldığı bildirilmiştir. Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü olması nedeniyle prolaktin dışında da birçok genin ekspresyon mekanizmasında etkili olması muhtemel olarak görülmektedir.

Bu çalışmada, 192 baş Anadolu mandası ineğinde STAT5A geninin 6-9. ekzonları arasında kalan 1720 bp'lik bölge çalışılmış ve 12 tanesi intron bölgelerinde, 1 tanesi de 8. ekzonda olmak üzere toplamda 13 SNP belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda intron bölgelerinde bulunan polimorfik bölgelerin süt verimiyle arasında anlamlı bir ilişki olmadığı tespit edilmiştir. Ancak, 8. ekzonda yer alan SNP12237 C>T süt verimini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu SNP daha fazla sayıda hayvanda araştırılarak süt verimini artırmak amacıyla mandaların ıslahında kullanılabilir.

Sonuç olarak, STAT5A geni meme bezi gelişimini ve prolaktin salınımını etkilediği için özellikle süt veriminde önemli etkilerinin olduğu düşünülmektedir. Ancak, mandalarda STAT5A geninin incelendiği çalışma sayısı oldukça az sayıdadır. Meme bezi gelişimi, süt proteini sentezi, meme glandüler hücre proliferasyonu ve süt-protein gen ekspresyonunun düzenlenmesi, PRL ve GH sinyallerine aracılık etmeleri, döllenme ve embriyonik gelişim süreçlerinde önemli etikeri nedeniyle STAT5 geninin mandalarda daha kapsamlı araştırılmasına ve bulunan SNP'lerin verimlerle ilişkilendirilerek manda ıslahında kullanılmasının faydalı olacağı kanısına varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Able, A.A., Burrell, J.A., Stephens, J.M. (2017). STAT5-interacting proteins: A synopsis of proteins that regulate STAT5 activity. *Biology*, DOI:10.3390/biology6010020.
- Abousoliman, I., Reyer, H., Oster, M., Muráni, E., Mourad, M., Rashed, M.A.S., Mohamed, I., Wimmers, K. (2020). Analysis of candidate genes for growth and milk performance traits in the Egyptian Barki Sheep. *Animals*, DOI:10.3390/ani10020197.
- Ağyar, O., Ertürk, A.S., Özkaya, A., Sucak, M.G., Şahin, Y. (2020). Estimation of mineral, trace element and fatty acid profile of Anatolian water buffalo milk. *Bulgarian Chemical Communications*, 52 (2): 230 – 236.
- Al-Azzawi, Z.M.M., Al-Dulaimi, M.R.K. (2020). Relationship of STAT5A gene (exon 7) polymorphism with milk production traits in Holstein cows in Iraq. *Plant Archives* 20 (1): 983-988.
- Ali, N., Niaz, S., Khan, N.U., Gohar, A., Khattak, I., Dong, Y., Khattak, T., Ahmad, I., Wang, Y., Usman, T. (2020). Polymorphisms in *JAK2* gene are associated with production traits and mastitis resistance in dairy cattle. *Ann. Anim. Sci.*, 20 (2): 409 – 442.
- Alyörük, Y., Erdoğan, M. (2018). Determination of the polymorphisms in the 8. exon of *PPARGC1A* gene of Anatolian Water Buffaloes. *Eurasian J Vet Sci*, 34 (1): 13–18.
- An, X.P., Hou, J.X., Zhao, H.B., Bai, L., Peng, J.Y., Zhu, C.M., Yan, Q.M., Song, Y.X., Wang, J.G., Cao, B.Y. (2013). Polymorphism identification in goat *DGAT1* and *STAT5A* genes and association with milk production traits. *Czech J. Anim. Sci.*, 58: 321–327.
- Ao, J., Wei, C., Si, Y., Luo, C., Lv, W., Lin, Y., Yingjun Cui, Y., Gao, X. (2015). Tudor-SN regulates milk synthesis and proliferation of bovine mammary epithelial cells. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 29936 – 29947.
- Atasever, S., Erdem, H. (2008). Manda yetiştiriciliği ve Türkiye'deki geleceği. *J. of Fac. of Agric., OMU*, 23 (1): 59 – 64.
- Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans, M. M. M., Jansen, C. L., Dillen, P. M. E. W., Noordaa, J. (1990). Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (3): 495-503.
- Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J., Daly, M.J. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21(2): 263 – 265.
- Boutillon, F., Pigat, N., Sala, L.S., Gomez, E.R., Moriggl, R., Guidotti, J.E., Goffin, V. (2019). *STAT5a/b* deficiency delays, but does not prevent, prolactin - driven prostate tumorigenesis in mice. *Cancers*, DOI:10.3390/cancers11070929
- Brym, P., Kaminski, S., Rusc, A. (2004). New SSCP polymorphism within bovine *STAT5A* gene and its associations with milk performance traits in Black-and-White and Jersey cattle. *J. Appl. Genet.*, 45: 445–452.
- Coizet, B., Frattini, S., Nicoloso, L., Lannuzzi, L., Coletta, A., Talenti, A., Minozzi G., Pagnacco, G., Crepaldi, P. (2018). Polymorphism of the *STAT5A*, *MTNR1A* and *TNFA* genes and their effect on dairy production in *Bubalus bubalis*. *Italian Journal of Animal Science*, 17 (1): 31 – 37.

- Çelikeloğlu, K., Erdoğan, M., Koçak, S., Zemheri, F., Tekerli, M. (2015). The effect of environmental factors and Growth Hormone Receptor gene polymorphism on growth curve and live weight parameters in buffalo calves. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.*, 55 (2): 45–49.
- Çelikeloğlu, K., Koçak, S., Erdoğan M., Bozkurt, Z., Tekerli, M. (2019). The investigation of viability and body measurements for water buffalo calves. *Turk J Vet Anim Sci*, 43: 60 – 67.
- Çınar, M.U., Özsoy T., Beyzi, S.B., Kaliber, M., Konca, Y. (2019). Milk and fatty acid composition of Anatolian water buffalo (*Bubalus bubalis*) from different provinces. *Buffalo Bulletin*, 38 (1): 107-118
- Daldaban, F., Arslan, K., Aksel, E.G., Akyüz, B. (2020). Polymorphism of the STAT5A and MYF-5 genes in Anatolian water buffalo. *Turk J Vet Anim Sci* 44: 284 – 289.
- Dees, S., Pontiggia, L., Jasmin, J.F., Sotgia, F., Lisanti, M.P., Mercier, I. (2020). Essential role of STAT5a in DCIS formation and invasion following estrogen treatment. *Aging*, 12 (14): 15104–15120.
- Değirmencioglu, T. (2018). Anatolian water buffalo's role in the organic animal production in the Republic of Turkey. 11th Int'l Conference on Agriculture, Biological, Environmental and Medical Sciences (ABEMS-18) April 27 – 28, Bangkok (Thailand), DOI: 10.15312/EurasianJVetSci.2019.250.
- Du, C., Deng, T., Zhou, Y., Ye, T., Zhou, Z., Zhang, S., Shao, B., Wei, P., Sun, H., Khan, F.A., Yang, L., Hua, G (2019). Systematic analyses for candidate genes of milk production traits in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Animal Genetics*, 50: 207 – 216.
- Du, C., Deng, X., Zhou, Y., Ghanem, N., Hua, G.H. (2020). Bioinformatics analysis of candidate genes for milk production traits in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Tropical Animal Health and Production*, 52: 63 – 69.
- El-Debaky, H.A., Kutchy, N.A., Ul-Husna, A., Indriastuti, R., Akhter, S., Purwantara, B., Memili, E. (2019). Potential of water buffalo in world agriculture: Challenges and opportunities. *Applied Animal Science*, 35: 255– 268.
- Erb, H.H.H., Bodenbender, J., Handle, F., Diehl, T., Donix, L., Tsaur, I., Gleave, M., Haferkamp, A., Huber, J., Fuessel, S., Juengel, E., Culig, Z., Thomas, C. (2020). Assessment of STAT5 as a potential therapy target in enzalutamide- resistant prostate cancer. *Plos One*, DOI: 10.1371/journal.pone.0237248.
- Erdoğan, M., Tekerli, M., Çelikeloğlu, K., Hacan, Ö., Koçak, S., Bozkurt, Z., Çinkaya, S., Demirtaş, M. (2021). Associations of SNPs in GHR gene with growth and milk yield of Anatolian buffaloes. *Turk J Vet Anim Sci*, 45: 1080–1086
- Ermetin, O. (2017). Husbandry and sustainability of water buffaloes in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture – Food Science and Technology*, 5 (12): 1673 – 1682.
- Frasor, J., Gibori, G. (2003). Prolactin regulation of estrogen receptor expression. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 14 (3): 118 – 123.
- Gebreyesus, G., Buitenhuis, A.J., Poulsen, N.A., Visker, M.H.P.W., Zhang, Q., Valenberg, H.J.F., Sun, D., Bovenhuis, H. (2019). Multi-population GWAS and enrichment analyses

reveal novel genomic regions and promising candidate genes underlying bovine milk fatty acid composition. *BMC Genomics*, DOI: 10.1186/s12864-019-5573-9.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41: 95 – 98.

İbiş, E., Erdoğan M. (2019). The determination of polymorphisms between 6-9 exons of the water buffalo STAT5A gene. *Eurasian J Vet Sci*, 35 (4): 230 – 235.

İnternet Kaynak 1: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Erişim Tarihi: 25.10.2021

İnternet Kaynak 2: <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-Haziran-2022-45594> (Erişim Tarihi: 01.12.2022).

Jiao, B.L., Zhang, X.L., Wang, S.H., Wang, L.X., Luo, Z.X., Zhao, H.B., Khatib, H., Wang, X. (2018). MicroRNA-221 regulates proliferation of bovine mammary gland epithelial cells by targeting the STAT5a and IRS1 genes. *J. Dairy Sci.* 102: 426–435.

Kale, D.S., Yadav, B.R. (2012). PCR-SSCP within STAT5A gene and its association with milk yield in Murrah buffalo. *Indian Vet. J.*, 89 (11): 16 – 20.

Kalendar, R., Lee, D., Schulman, A.H. (2009). FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. *Genes, Genomes and Genomics*, 3 (1): 1-14.

Kaplan, Y., Bozkurt, Z., Tekerli, M. (2018). Evaluation of water buffalo holdings in Yozgat province in terms of environmental factors affecting animal welfare. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.*, 58 (2): 67 – 76.

Karlı, B., Gül, M., Akpınar, M.G., Taşcıoğlu, Y., Bozkurt, Y. (2018). Problems of water buffalo breeding in Turkey and suggestions for its development. *Brazilian Journal of Animal Science*, DOI: 10.1590/rbz4720170230.

Karlı, B., Gül, M., Akpınar, M.G., Taşcıoğlu, Y., Bozkurt, Y., Şirikçi, B.S. (2021). Analysis of economic structure in water buffalo breeding by geographical regions in Turkey. *Buffalo Bulletin*, 40 (1): 135–150.

Khan, M.Z., Khan, A., Xiao, J., Ma, Y., Ma, J., Gao, J., Cao, Z. (2020). Role of the JAK-STAT pathway in bovine mastitis and milk production. *Animals*, DOI:10.3390/ani10112107

Khatib, H., Maltecca, C., Monson, R.L., Schutzkus, V., Rutledge, J. J. (2009). Monoallelic maternal expression of STAT5A affects embryonic survival in cattle *BMC Genetics*, DOI:10.1186/1471-2156-10-13.

Kıyıcı, J.M., Arslan, K., Akyüz, B., Kaliber, M., Aksel, E.G., Çınar, M.U. (2018). Relationships between polymorphisms of growth hormone, leptin and myogenic factor 5 genes with some milk yield traits in Holstein dairy cows. *International Journal of Dairy Technology*, DOI: 10.1111/1471- 0307.12539

Kıyıcı, J.M., Akyüz, B., Kaliber, M., Arslan, K., Aksel, E.G., Çınar, M.U. (2020). Association of GH, STAT5A, MYF5 gene polymorphisms with milk somatic cell count, EC and pH levels of Holstein dairy cattle. *Animal Biotechnology*, DOI: 10.1080/10495398.2020.1800483.

Kocaman, İ., Kurç, H.C. (2020). Research on the determination of heat and water vapor emissions of Anatolian water buffaloes under indoor environmental conditions. *Turk J Vet Anim Sci.* 44: 656-661

- Koçak, S., Tekerli, M., Çelikeloğlu, K., Erdoğan, M., Bozkurt, Z., Hacan, Ö. (2019). An investigation on yield and composition of milk, calving interval and repeatabilities in riverine buffaloes of Anatolia. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 29(3): 650 – 656.
- Kul, E., Filik, G., Şahin, A., Çayıroğlu, H., Uğurlutepe, E., Erdem, H. (2018). Effects of some environmental factors on birth weight of Anatolian Buffalo calves. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6(4): 444-446
- Kumar, M., Ratwan, P. (2016). Genetic variability and significance of *STAT* gene in dairy animals. *Journal of Dairy Science and Technology*, 5 (3): 1 – 6.
- Lee, S., Kelleher, S.L. (2016). Biological underpinnings of breastfeeding challenges: the role of genetics, diet, and environment on lactation physiology. *AJP Endocrinol Metab*, 311: E405–E422.
- Li, S., Huang, S., Qiao, S., Jiang, J., Shi, D., Li, X. (2018). Cloning and functional characterization of *STAT5a* and *STAT5b* genes in buffalo mammary epithelial cells. *Animal Biotechnology*. 31 (1): 59 – 66.
- Mintoo, A.A., Zhang, H., Chen, C., Moniruzzaman, M., Deng, T., Anam, M., Huque, Q.M.E., Guang, X., Wang, P., Zhong, Z., Han, P., Khatun, A., Awal, T.M., Gao, Q., Liang, X. (2019). Draft genome of the river water buffalo. *Ecology and Evolution*, 9: 3378 – 3388.
- Mohanty, S.K., Yagiz, K., Pradhan, D., Luthringer, D.J., Amin, M.B., Alkan, S., Cinar, B. (2017). *STAT3* and *STAT5A* are potential therapeutic targets in castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget*, 8 (49): 85997 – 86010.
- Naveed, M., Nadeem, A., Javed, M., Bhutta, M.F., Khalid, R.B. (2021). Evolutionary divergence of Signal Transducer and Activator of Transcription 5A (*STAT5A*) gene in riverine buffalo. *Pakistan J. Zool.*, 53 (4): 1459 – 1465.
- Ouerghi, S., Jemmali, B., Trab, I., Gara, A.B., Rekik, B. (2017). Identification of polymorphism at the *STAT5* locus in dairy cows in Tunisia. *Journal of New Sciences*, 1 (3): 11 – 14
- Öner, Y., Yılmaz, O., Okut, H., Ata, N., Mecitoğlu, G.Y., Keskin, A. (2017). Associations between *GH*, *PRL*, *STAT5A*, *OPN*, *PIT-1*, *LEP* and *FGF2* polymorphisms and fertility in Holstein-Friesian heifers. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 23 (4): 527 – 534.
- Öz, S., Alkoyak, K., Küçükersan, S. (2021). Effects of calving year, season, and age on some lactation traits of Anatolian buffaloes reared at farmer conditions in Turkey. *Ankara Univ Vet Fak Derg*. 69 (2): 157-162.
- Raven, L.A., Cocks, B.G., Goddard, M.E., Pryce, J.E., Hayes, B.J. (2014). Genetic variants in mammary development, prolactin signalling and involution pathways explain considerable variation in bovine milk production and milk composition. *Genetics Selection Evolution*, 46: 29. <http://www.gsejournal.org/content/46/1/29>.
- Regalado, N.G.M., Valdovinos, M.A.A., Garcia, J.G., Rivera, T.D., Chipres, D.R.S., Posadas, M.V. (2020). Effect of *COQ9* and *STAT5A* polymorphisms on reproductive performance in a Holstein cow herd in Mexico. *Anim Reprod.*, DOI: 10.1590/1984-3143-AR2020-0039.
- Salem, M. M. I., Thompson G., Chen, S., Pereira, A., Carvalheira, J. (2018). Linkage Disequilibrium and Haplotype Block Structure in Portuguese Holstein Cattle. *Czech J. Anim. Sci.*, 63 (2): 61–69

- Sarıözkan, S. (2011). Türkiye’de manda yetiştiriciliğinin önemi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 17 (1): 163 – 166.
- Schennink, A., Bovenhuis, H., Kloosterziel, K.M., Arendonk, J.A.M., Visker, M.H.P.W. (2009). Effect of polymorphisms in the FASN, OLR1, PPARGC1A, PRL and STAT5A genes on bovine milk-fat composition. *Animal Genetics*, 40: 909 – 916.
- Selvaggi, M., Albarella, S., Dario, C., Peretti, V., Ciotola, F. (2017). Association of STAT5A gene variants with milk production traits in Agerolese cattle. *Biochem Genet*, 55: 158 – 167.
- Shi, M., Li, Z., Miao, Z., Guo, Y., Yi, L. (2019). Interleukin-15 inhibits adipogenic differentiation of cattle bone marrow-derived mesenchymal stem cells via regulating the crosstalk between signal transducer and activator of transcription 5A and Akt signalling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 517 (2): 346 – 352.
- Silveira, P.A.S., Butler, W.R., Silva, T.C., Barros, C.C., Correa, M.N., Schneider, A. (2019). Association of polymorphisms in the IGF-I, GHR and STAT5A genes with serum IGF-I concentration and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Animal Reproduction Science*, DOI: 10.1016/j.anireprosci.2019.106206.
- 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 (2): 49 – 58.
- Soysal, M.İ., Genç, S., Aksel, M., Ünal, E.Ö., Gürcan, E.K. (2018). Effect of environmental factors on lactation milk yield, lactation length and calving interval of Anatolian Buffalo in Istanbul. *Journal of Animal Science and Products (JASP)*, 1 (1): 93 – 97.
- Şahin, G. (2015). Türkiye zirai hayatında manda (*Bubalus bubalis*) yetiştiriciliği ve manda ürünlerinin değerlendirilmesi. *İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Coğrafya Dergisi*. 31: 14 – 40.
- Tekerli, M., Kucukkebabcı, M., Akalın, N. H., Kocak, S. (2001). Effects of environmental factors on some milk production traits, persistency and calving interval of Anatolian buffaloes. *Livestock Production Science* 68: 275–281.
- Tekerli, M. (2015-2019). Manda Yıldızı Veri Kayıt, Hesap ve Proje Takip Programı. Ver. 2019, 5.00 Akademik. Afyon Kocatepe Üniversitesi. Afyonkarahisar.
- Tekerli, M., Altuntaş, A., Birdane, F., Sarımeahmetoğlu, O., Doğan, İ., Bozkurt, Z., Erdoğan, M., Çelik, H. A., Koçak, S., Gürler, Z., Bülbül, T., Kabu, M., Çelikeloğlu, K. (2016). Farklı Bölge Orijinli Anadolu Mandalarından Oluşturulan Bir Sürüde Verim Özellikleri, Beden Ölçüleri ve Biyokimyasal Polimorfizm Yönünden İslah Olanaklarının Karşılaştırmalı Belirlenmesi: Laktasyon Özellikleri ve Genetik Polimorfizm. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.*, 56 (1): 7–12.
- Tong, J.J., Thompson, I.M., Zhao, X., Lacasse, P. (2017). Effect of 17 β -estradiol on milk production, hormone secretion, and mammary gland gene expression in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 101 (3): 2588 – 2601.
- Toparlsan, E., Mercan, L. (2018). Türkiye yerli manda popülasyonlarında yapılan moleküler genetik çalışmalar. *Akademia Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi, ICAE 2018 Özel Sayı*, 146-158.

- Turan, A., Yalçintan, H., Osman, A., Ekiz, B. (2021). Effects of gender and slaughter age on meat quality of Anatolian water buffaloes. *Tropical Animal Health and Production*, DOI: 10.1007/s11250-021-02835-8.
- Warnes, G. R. (2003). The genetics package. *R news*, 3(1), 9-13.
- Yılmaz, A., Ocak, E., Köse, Ş. (2017). A research on milk yield, milk composition and body weights of Anatolian buffaloes. *Indian J. Anim. Res.*, 51 (3) : 564 – 569.
- Zhang, Y., Colli, L., Barker, J.S.F. (2020). Asian water buffalo: Domestication, history and genetics. *Animal Genetics*, 51 (2): 177 – 191.
- Zhao, W., Xing, Y., Ye, C., Qiu, Y., Li, Y., Liu, X., Wang, M., Bi, C., Song, D., Shao, R. (2020). The novel quinolizidine derivate IMB-HDC inhibits STAT5a phosphorylation at 694 and 780 and promotes DNA breakage and cell apoptosis via blocking STAT5a nuclear translocation. *Acta Pharmacologica Sinica*, (2020) 41 (5): 686 – 697.