

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MANDA STAT5A GENİNİN BİR BÖLÜMÜNDEKİ
POLİMORFİZMLERİN BELİRLENMESİ**

Emsal İBİŞ

**MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Metin ERDOĞAN

Bu tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 16.SAĞ.BİL.28 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez No: 2017 - 013

2017- AFYONKARAHİSAR

KABUL VE ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü
Medikal Biyoloji ve Genetik Programı
çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07 / 06 / 2017



Prof. Dr. Cevdet UĞUZ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Jüri Başkanı



Doç. Dr. Özgecan KORKMAZ AĞAOĞLU
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Üye



Doç. Dr. Metin ERDOĞAN
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye

Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Emsal İBİŞ' in
“**Manda STAT5A Geninin Bir Bölümündeki Polimorfizmlerin Belirlenmesi**”
başlıklı tezi / / 2017 günü saatda Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav
Yönetmeliği' nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Abdullah ERYAVUZ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Sağlıklı ve zinde bir yaşam sürdürmek yaşayan tüm canlıların en büyük hedefidir. Bu sağlıklı yaşamı sürdürebilmek ise ancak sağlıklı bir beslenme ile mümkün olmaktadır. İnsan vücudundaki hücrelerin çalışarak fonksiyonlarını kusursuz bir şekilde yerine getirebilmesi vücuda alınan besin maddelerinin özelliklerine bağlıdır. Son dönemde artan hastalıklarla birlikte doğal yolla üretilen organik ürünlere talep oldukça artmıştır. Benzer şekilde artan nüfus ile birlikte mevcut hayvansal ve tarımsal ürünler ihtiyacı karşılayamaz duruma gelmiştir. Bu amaçla da özellikle bitkisel ve hayvansal üretim yapan canlılar üzerine yapılacak genetik çalışmalar bu ihtiyaçları karşılamak açısından büyük önem taşımaktadır. Süt üreten hayvanlardan Anadolu mandası ürünlerinin birçok avantajı bulunması ve zor koşullarda bile yetiştirilebilmesi nedeniyle Türkiye' de manda yetiştiriciliği yaygınlaştırılmaya çalışılmaktadır. Bu çalışma, mandalarda büyüme ve gelişme ile süt verimine etkisi olduğu bilinen STAT5A genindeki polimorfizmleri belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Bu çalışmanın çıkış sürecinde bana gerekli tüm desteği veren ve yol gösteren, tecrübeleriyle ve bilgileriyle akademik hayatıma ışık tutan değerli hocam ve tez danışmanım Doç. 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 Doç. Dr. Mine DOSAY AKBULUT' a, “Mandaların Halk Elinde Islahı Projesi” kapsamında toplanan kan örneklerini kullanmama izin veren Prof. Dr. Mustafa TEKERLİ' ye ve bölümümün tüm değerli hocalarına en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında beni destekleyen babam Nail İBİŞ' e, eğitimim için her fedakarlığı sağlayan, gece gündüz demeden çalışan, bu günlere gelmemde büyük emeği olan ancak zamansız ayrılığıyla sadece kalbimde yaşatabildiğim canım annem Hatice İBİŞ' e, her konuda bana yardımcı olan ve bilgileriyle bana sürekli katkıda bulunan, beni motive eden sevgili kardeşim Yrd. Doç. Dr. Osman İBİŞ' e ve ailesine, enerjisiyle hayatıma neşe katan kız kardeşim Emel İBİŞ' e en içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Kabul ve Onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Tablolar	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Manda (Bubalus Bubalis)	2
1.1.1. Mandaların Yayılışı ve Yaşam Alanları	4
1.1.2. Mandalardan Elde Edilen Ürünler ve Özellikleri	5
1.2. Sinyal Mekanizmaları	7
1.2.1. STAT Gen Ailesi	11
1.2.2. STAT Gen Yapısı ve Aktivasyonu	14
1.2.3. STAT5A Gen Özellikleri	20
1.2.4. Çiftlik hayvanı Yetiştiriciliğinde STAT5A Geninin Etkileri ...	23
1.3. DNA Polimorfizmi	27
2. GEREÇ VE YÖNTEM	30
2.1. Materyal	30
2.1.1. Hayvan Materyali	30
2.1.2. Kullanılan Teknik Aletler	30
2.1.2.1. PCR Cihazı	30
2.1.2.2. Yatay Elektroforez Sistemi	31
2.1.2.3. Jel Görüntüleme Sistemi	31
2.1.2.4. DNA Dizileme Cihazı	32
2.2. Metot	32

	<u>Sayfa</u>
2.2.1. Örneklerin Toplanması ve Saklanması	32
2.2.2. DNA İzolasyonu	33
2.2.3. Primer Tasarımı	33
2.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	34
2.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi	34
2.2.6. DNA Dizileme Analizi	35
2.2.7. İstatistik Analizi	36
3. BULGULAR	37
4.TARTIŞMA	41
5. SONUÇ	45
ÖZET	46
SUMMARY	47
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	55

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALL	Akut Lenfoblastik Lösemi
DBD	DNA Bağlanma Alanı
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotit Fosfat
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EPO	Eritropoietin
FAK	Fokal Adezyon Kinazı
GH	Growth Hormon
GM-CSF	Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
IFN	İnterferon
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
RFLP	Restriksiyon Arttırılmış Polimorfik DNA
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SH₂	SRC Homology Domain 2
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
SOCS	Sitokin Sinyalleri Baskılayıcı
STAT	Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü
TAD	Trans Aktivasyon Alanı
TPO	Trombopoietin
TYK	Tirozin Kinaz

ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. 1. Anadolu Mandası	3
Şekil 1. 2. Mandaların Gruplandırılması	3
Şekil 1. 3. JAK' ların aracılık ettiği sinyal yolları	8
Şekil 1. 4. JAK / STAT sinyalizasyonu	9
Şekil 1. 5. A). Sitokin-STAT sinyalizasyonunun özgüllüğü	11
B). Bir aile üyesinin silindikten sonra değiştirilen STAT sinyal şebekeleri	11
Şekil 1. 6. STAT Proteinlerinin Yapısı	12
Şekil 1. 7. STAT Transkripsiyon Faktörleri Ailesinin Üyeleri	15
Şekil 1. 8. STAT Kristal Protein Yapısı	16
Şekil 1. 9. JAK/ STAT Aktivasyonu	17
Şekil 1. 10. Prolaktin (Prl) - Jak2- Stat5a / b sinyal yolağı	18
Şekil 1. 11. STAT aktivasyon mekanizmalarındaki değişiklikler	19
Şekil 1. 12. JAK/STAT5 Yol Sinyalizasyon Şeması	22
Şekil 1. 13. Sığır STAT5A Geninin Polimorfizm Haritası	25
Şekil 2. 1. PCR Cihazı	30
Şekil 2. 2. Elektroforez Sistemi	31
Şekil 2. 3. Jel Görüntüleme Sistemi	31
Şekil 2. 4. DNA Dizi Analiz Cihazı	32
Şekil 3. 1. Gradient PCR Agaroz Jel Elektroforezi görüntüsü.....	37
Şekil 3. 2. PCR ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi görüntüsü.....	37
Şekil 3. 3. STAT5A geninin 6-9. eksonları arasındaki SNP'lere ait pik görüntüsü	38
Şekil 3. 4. Ekzon 8'de tespit edilen polimorfik bölge.....	39

TABLULAR

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. 1. Farklı hayvan türlerindeki süt içerikleri (%)	6
Tablo 1. 2. Manda ve sığır etinin içerikleri (100 gr)	6
Tablo 1. 3. STAT' ların alımına aracılık eden sitokin reseptörleri.....	10
Tablo 1. 4. Prolaktin yolağındaki STAT genlerin süt bileşenlerine etkisi	24
Tablo 1. 5. Jersey ırkında STAT5A polimorfizminin süt ve süt bileşenlerine etkisi	26
Tablo 2. 1. Çalışmada kullanılan Primerler	34
Tablo 3. 1. Anadolu Mandası STAT5A geninin 6 – 9. ekzonlar arasında tespit edilen SNP'ler, allel frekansları ve heterozigotluk değerleri	39

1. GİRİŞ

Manda, insanların yüzyıllar boyunca süt, et ve deri gibi çeşitli ürünlerinden faydalandığı, farklı ve zor çevre şartlarına uyum yeteneği yüksek, hastalıklara karşı oldukça dayanıklı bir hayvan türüdür. Yapay ürün kullanımına bağlı hastalıkların artmasıyla birlikte günümüzde organik ürünlere talep oldukça artmaktadır. Bu durumun bir sonucu olarak da zor ve kısıtlı şartlarda yetiştirilmeye uygun bir hayvan türü olan mandanın, kalitesi düşük kaba ve ucuz yemleri tüketerek, hayvansal ürüne dönüştürmesi nedeniyle yetiştiriciliği yaygınlaştırılmaya çalışılmaktadır (Şahin ve ark., 2013). Manda sayısı son yıllarda hızla düşmüş ve günümüzde belirli bölgeler dışında yetiştiriciliği yapılmamaktadır. Bunun en temel nedenleri arasında manda yetiştiriciliğine gereken önemin verilmemesi gelmektedir. Manda popülasyonundaki bu azalma, Türkiye için yerli gen kaynaklarının korunması bakımından kaygı verici boyutlara ulaşmıştır (Soysal ve ark., 2005). Türkiye’de sığır altfamilyasından gelen evcil büyükbaş hayvanlar grubundan olan mandalardaki genler üzerine çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır. Manda sütünün az kolesterol ve zengin içeriğe sahip olması, manda etinin ise az yağlı ve diyeteye uygun olması ve diğer büyükbaş hayvanlarla kıyaslandığında yetiştirilme maliyetinin daha düşük olması nedeniyle Türkiye’de manda yetiştiriciliği yaygınlaştırılmaya çalışılmaktadır.

Manda yetiştiriciliğinde ve verimli ürün alınmasında genetik faktörler önemli etkiye sahiptir. Çok sayıda genin kontrolünde olan süt verim özellikleri, ekonomik önemi nedeniyle süt veren hayvanlarda oldukça önem arz etmektedir. (Dario ve Selvaggi, 2011). Raven ve ark. (2014) yaptıkları çalışmalarda süt verim özellikleri üzerine etkili olan genleri belirlemişlerdir. Bu genler arasında Sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü olarak görev yapan STAT5A geni hücre içerisinde birçok hayati göreve sahip olmasının yanısıra, süt verimi gibi faktörleri de etkilediğinden; manda yetiştiriciliğinde süt verim özellikleri için önemli bir bileşen durumundadır. Yapılan çalışmalar sonucunda meme bezi faktörü olarak bilinen sinyal dönüştürücüsü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT)’ın; prolaktin sinyallemesinin hücre içi bir aracısı olduğu ve süt protein genlerinin transkripsiyonunu aktive edebileceği keşfedilmiştir. STAT5 bu önemli rolü nedeniyle süt üreten hayvanlarda;

süt üretim özellikleri için umut verici olmaktadır (Liu ve ark., 2012; Paramitasari ve ark., 2015).

Sonuç olarak, süt veriminin ve kompozisyonun geliştirilmesi yetiştiriciler için büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, hayvancılıkta üretim ile önemli ölçüde ilişkili olan moleküler belirteçler, geleneksel ıslah stratejileri aracılığıyla evcil hayvanların genetik gelişiminde ve buna bağlı olarak süt veriminin ve içeriğinin zenginleştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

1. 1. Manda (*Bubalus bubalis*)

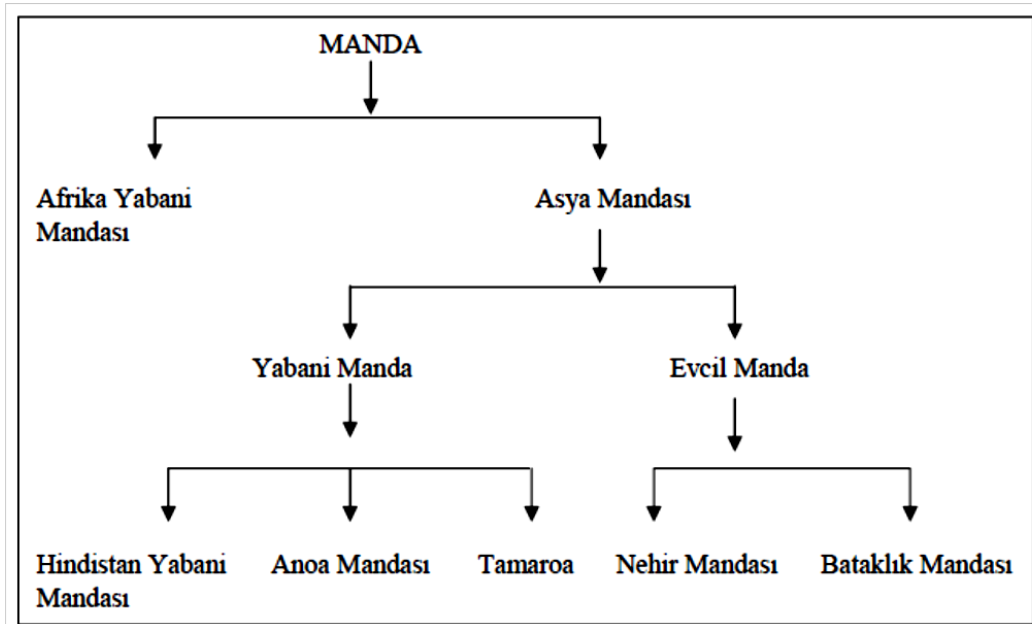
Manda, Boynuzlugiller (Bovidae) ailesinin içinde yer alan bir tür olan sığırgiller alt familyasında bulunan bir canlıdır. Mandalar kendi arasında Asya mandası (*Bubalus bubalis*) ve Afrika mandası (*Syncerus caffer*) olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Günümüzde bulunan evcil mandalar, yaklaşık 5000 yıl önce evcilleştirilmiş olan Yabani Asya Mandası (*Bubalus arnee*)'ndan köken almaktadır. Ancak, günümüzde bu mandalar sayıları azalmakta olan ve tehlike sınırına gelmiş türler listesinde yer almaktadır (Michelizzi ve ark., 2010; Şahin, 2015).

Evcil mandalar (*Bubalus bubalis*), Nehir ve Bataklık mandası olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Bu iki grup arasında verim özellikleri, kromozom sayısı, beden yapısı ve yetiştiricilikteki önemleri açısından farklılıklar bulunmaktadır (Küçükkebabçı ve Aslan, 2002). Bu grubun üyelerinden Bataklık mandaları daha çok Çin'de ve Güneydoğu Asya'da yetiştirilmektedir. Bu manda türü sıklıkla pirinç tarlalarını sürmek için kullanılmaktadır. Ancak, süt üretimi amacıyla kullanılmak için uygun yapıya sahip değildir. Bu grubun diğer üyesi Nehir mandaları ise daha çok süt ve et üretimi için yetiştirilmektedir. Bu mandaların kökenleri Hindistan'dır. Türkiye'de yetiştirilmekte olan ve Anadolu mandası olarak adlandırılanlar, nehir mandalarının bir alt grubu olan Akdeniz mandalarından köken almaktadır (Atasever ve Erdem, 2008; Soysal, 2013). Sitogenetik araştırmalar, nehir mandalarının 25 kromozom çiftine sahipken, bataklık mandalarının 24 kromozom çiftine sahip olduğunu göstermiştir (Michelizzi ve ark., 2010). Manda, günümüzde birçok

hayvansal ürün elde etmek amacıyla, önemli bir üretim kolunu oluşturmaktadır (Atasever ve Erdem, 2008).



Şekil 1. 1. Anadolu Mandası



Şekil 1. 2. Mandaların gruplandırılması (Atasever ve Erdem, 2008)

1. 1. 1. Mandaların Yayılışı ve Yaşam Alanları

Manda popülasyonunun büyük kısmı (yaklaşık %96.4) Asya kıtasında bulunmaktadır. Manda başta süt olmak üzere, et, deri ve iş gücünden yararlanmak amacıyla yetiştirilmektedir. Mandalar, zor ve kısıtlı çevre koşullarında yetiştirilebilen, düşük kaliteli ve ucuz kaba yemleri değerlendirebilen oldukça uyumlu hayvanlardır (Sarıözkan, 2011). Evcilleştirilmesi yaklaşık olarak 5000 yıl önce gerçekleşmiş olan manda İngilizce’de “water buffalo” olarak adlandırılmaktadır. Tamamına yakını Asya kıtasında bulunsa da, dünya genelinde 40’a yakın ülkede yetiştiriciliği yapılmaktadır (Nanda ve Nakao, 2003; Çelik, 2015). Bu ülkeler arasında Güneydoğu Asya, Güney Amerika, Kuzey Afrika, Fransa dışındaki tüm Akdeniz ülkeleri, Balkan ülkeleri ve bazı Orta Avrupa ülkeleri ve Avustralya’da bulunmaktadır (Atasever ve Erdem, 2008).

Nehir mandaları, 3000-6000 yıl önce evcilleştirildiğinden, çok fazla nüfusa sahip ülkelerde süt, et ve çekiş gücü kullanılan hayvanlar olarak ekonomik öneme sahiptir. Pleistosen çağında, Bubalus güney Asya’dan Avrupa’ya dağıtılmıştır. Indus vadisindeki mühürler yaklaşık 5000 yıl önce manda ıslahına işaret etmektedir. M.Ö. 2500-2100 yıllarına ait eski yazı ve heykellerde mandaların yetiştirildiği anlaşılmaktadır. Mandalar, 9. yüzyılda Arap istilacıları tarafından et, süt ve çekiş gücünden yararlanmak amacıyla Hindistan’dan Mısır’a getirilmiştir. Daha sonra ortaçağda hacılar ve haçlılar tarafından Mısırdan Avrupa’ya götürülmüştür. Mandaların altıncı yüzyılda Orta Avrupa’dan veya yedinci yüzyılda Arap fetihleriyle Tunus üzerinden İtalya’ya getirildiği düşünülmektedir (Nanda ve Nakao, 2003; Michelizzi ve ark., 2010).

Mandalar genellikle tropik ve subtropikal ormanlarda, ıslak çayırlarda ve bataklıklarda bulunmaktadır. Karasal canlılar olmasına rağmen, serinlemek için çamur havuzlarına veya nehirlere dalarak vakit geçirmektedirler. Mandaların yaşam alanlarını, genellikle nehirler, dereler, çamur bataklıkları, uzun boylu otlar, yeterli içecek, yiyecek ve ağaçlar bulunan bölgeler içermektedir. Dünyada 161 milyon Asya, 3,7 milyon Afrika, 3,3 milyon Güney Amerika ve geri kalanı Avrupa ve Avustralya’da dağıtılan 168 milyondan fazla nehir mandası bulunmaktadır. Nehir

mandaları, dünya süt ihtiyacının % 5'inden fazlasını sağlamaktadır. Manda sütü, inek sütüyle kıyaslandığında daha az su ve daha fazla yağ, laktoz, protein ve mineral içermektedir. Yine benzer şekilde manda eti, inek etiyle kıyaslandığında da benzer bir tada sahipken manda etinin sığır etinden daha az yağ ve kolesterol içerdiği tespit edilmiştir (Michelizzi ve ark., 2010). Mandalar Hindistan'ın önde gelen süt üreticilerinden biri olmakta ve Hindistan'daki sütlerin % 55'i manda tarafından üretilmektedir (Javed ve ark., 2011).

1. 1. 2. Mandalardan Elde Edilen Ürünler ve Özellikleri

Günümüzde, kimyevi madde ve hormon kullanılmaksızın, doğal yolla üretilen besinlere olan talep her geçen gün artmaktadır. Manda yetiştiriciliği, bu doğal yolla üretilen hayvansal besinler için önemli bir üretim dalını oluşturmaktadır. Çünkü manda diğer çiftlik hayvanlarıyla kıyaslandığında yetiştirici açısından birçok avantaja sahiptir. Bu avantajlar arasında, zor çevre koşullarında yetiştirilebilmesi, düşük kaliteye sahip yemleri değerlendirerek süt ve ete dönüştürebilmesi, hastalıklara karşı dayanıklı olması, sütünün ve etinin içeriğinin daha sağlıklı olması sayılmaktadır (Şahin ve ark., 2013). Bu avantajları nedeniyle sosyo-ekonomik düzeyi düşük yetiştiriciler içinde uygun bir çiftlik hayvanı olmaktadır (Küçükkebabçı ve Aslan, 2002).

ABD' de mandadan elde edilen hayvansal ürünler üzerinde yapılan araştırmalarda manda etinin sığır etinden %40 daha az kolesterol, %12 daha az yağ, %55 daha az kalori, %11 daha fazla protein ve %10 daha fazla mineral içermesi nedeniyle manda etinin daha sağlıklı olduğu bildirilmektedir (Sarıözkan, 2011). Manda sütünün ise sığır sütüne göre daha fazla yağ ve protein içermekte olduğu, daha düşük oranda kolesterol ve daha yüksek oranda vitamin içerdiği bildirilmiştir (Şekerden ve ark., 1999; Küçükkebabçı ve Aslan, 2002). Ayrıca, manda sütünün bileşiminde bulunan laktoferrin proteininin antibakteriyel etkisi nedeniyle daha az bakteri içerdiği de tespit edilmiştir (Küçükkebabçı ve Aslan, 2002). Manda sütünün rengi inek sütüne kıyasla daha beyaz bir renge sahiptir. Bunun nedeni mandaların yeşil meralarla aldıkları karotenin tamamını A vitaminine çevirmeleridir. Hayvansal

üretim açısından manda sütü genellikle tereyağı, kaymak ve yoğurt üretiminde kullanılmaktadır. Bazı ülkelerde özellikle İtalya’da manda sütünden Mozzarella peyniri yapılmaktadır (Çetinkaya ve ark., 2011). Manda eti ve sütünün diğer hayvanlarla kıyaslaması Tablo 1. 1. ve Tablo 1. 2. 'de gösterilmektedir.

Manda derisi oldukça kalın bir yapıya sahiptir. Bu özelliği sayesinde deri sanayisinde üretilen ve kalın deriden yapılan çanta ve ayakkabı gibi ürünlerde oldukça talep görmektedir (Şahin ve ark., 2013).

Tablo 1. 1. 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

Tablo 1. 2. Manda ve sığır etinin içerikleri (100 gr) (Atasever ve Erdem, 2008)

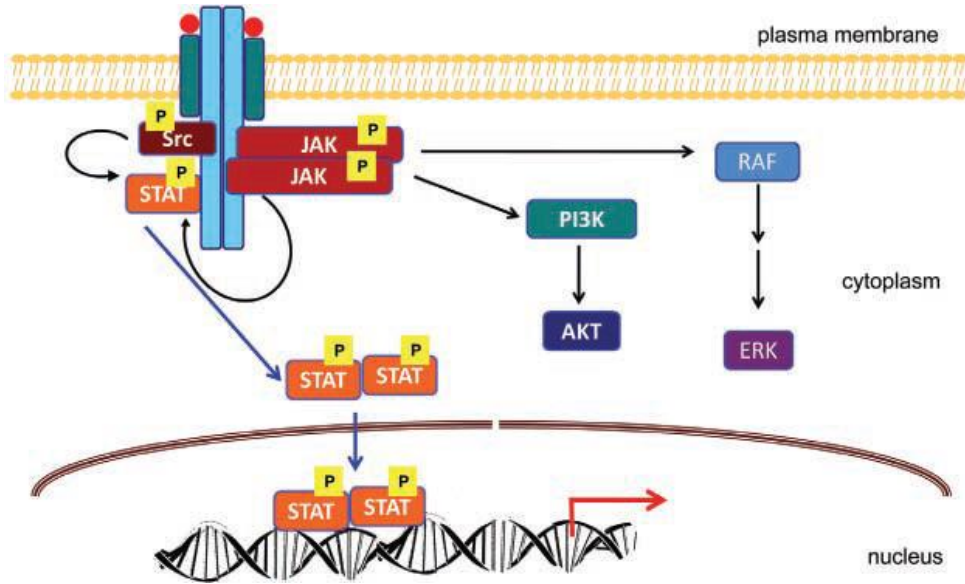
Bileşen	Manda	Sığır
Kalori (kcal)	131.0	289.0
Protein (gr)	26.8	24.0
Yağ (gr)	1.8	21.0
Kolesterol (gr)	61.0	90.0
Mineral (mg)	641.8	584.0
Vitamin (mg)	21.0	18.5

1. 2. Sinyal Mekanizmaları

Sinyal ileti sistemi, vücutta bulunan sağlıklı bir hücrenin fonksiyonlarını tamamlayabilmesi için gerekli iletişimden sorumludur. Bu sistem sayesinde hem hücre içerisinde bulunan tüm yapıların birbirleriyle haberleşebilmesi ve çalışmalarının düzenlenmesi, hem de hücrenin diğer hücrelerle haberleşebilmesi sağlanmaktadır. Yaşamın sağlıklı ve sorunsuz bir şekilde devam ettirilebilmesi için bu sistemin düzenli bir şekilde çalışması gerekmektedir. Hücre içerisinde, hücre zarından başlayan ve DNA’da son bulan bir haberleşme ağı bulunmaktadır. Bu ağda bulunan her bir işlem basamağı hem yukarı yönlü (upstream) hemde aşağı yönlü (downstream) elemanlar tarafından kontrol edilmekte ve her iki yönde iletişim gerçekleşmektedir (Saydam, 2017). Gelişme, homeostaz ve hücrenel yaşam süresi için belirli bir yanıt üretmek gerekmekte, bu yanıtın üretilmesi içinde bir hücrenin dışından çeşitli elemanlar yoluyla gelen bilginin hücre içi yapılara iletilmesi zorunlu olmaktadır (Arbouzova ve Zeidler, 2006).

İnsan Genom Projesi’nin verilerine göre, insan genomunda bulunan yaklaşık 32.000 genin %20’si sinyal iletiminde görev alan proteinleri kodlamaktadır. Bu proteinler arasında hücre membranında yerleşen reseptörler, G- proteinleri ve sinyal ileten enzimler yer almaktadır (Jensen ve Hunter, 2001). Bu proteinlerden protein kinazlar, sinyal iletimi sırasında proteinlerin fosforile hale getirilerek aktive olmasını sağladıkları için önemli bir yere sahiptir. Protein kinazlar da kendi arasında membran yerleşimli olanlar ve sitoplazmik tirozin kinazlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Dinlenme durumundaki hücrelerde protein kinazlar, sitoplazmada inaktif halde bulunmaktadır. Sitokinler, reseptörler yada hormonlar tarafından hücrenin uyarılması ile bu proteinler aktif hale gelmektedir. Aktifleşen proteinler sitoplazmadaki veya çekirdekteki hedeflerine yönelmektedirler (Doğan ve Güç, 2004).

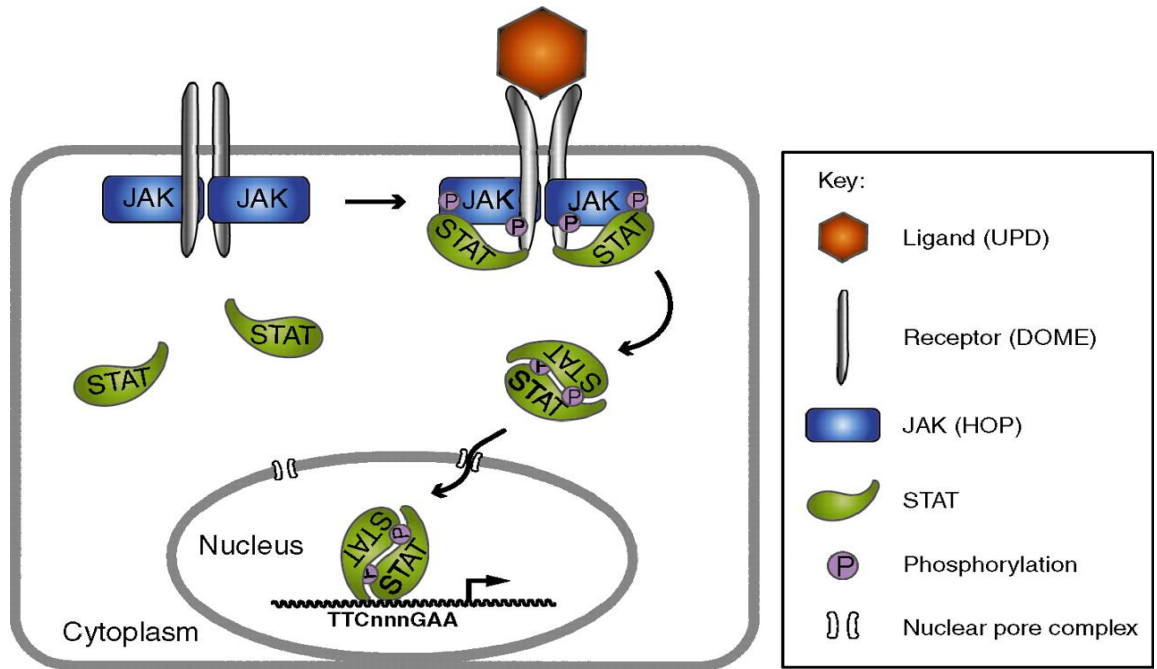
Sitokinler olarak adlandırılan polipeptid ailesi, hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol etmektedir. Sitokinler arasında interlökinler (IL' ler), interferonlar (IFN' ler), koloni uyarıcı faktörler, eritropoietin (EPO) ve trombopoietin (TPO) bulunmaktadır. Bu sitokin reseptörlerinin sinyal iletimini JAK ailesinin üyeleri aracılığıyla yaptıkları gösterilmiştir (Flisikowski ve ark., 2003). Sitokin reseptörleri, sitoplazmik bir kinaz alanından yoksun olmakta ve sinyal transdüksiyonunun başlatılması için JAK ailesi tirozin kinazların üyelerine ihtiyaç duymaktadır. Günümüzde sitokinlerin 50'den fazla üyesi için önemli sinyalleri dönüştüren JAK1, JAK2, JAK3 ve TYK2 (Tirozin Kinaz) tespit edilmiştir. JAK1, JAK2 ve TYK2 her hücrede eksprese edilirken; JAK3'ün ekspresyonu hematopoietik, lenfoid ve vasküler düz kas hücreleri ile endotelyumdan eksprese edilmektedir (Pauku ve Silvennoinen, 2004; Schindler ve Plumlee, 2008).



Şekil 1. 3. JAK' ların aracılık ettiği sinyal yolları (Jatiani ve ark., 2011)

Janus Kinaz / Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü (JAK / STAT) yolağı hücrelerin çoğalması, sağlıklı bir şekilde yaşamlarının sürdürülmesi ve programlı hücre ölümünün düzenlenmesinde görev alan en önemli sinyal iletim yollarındandır. JAK kinazlar ilk olarak reseptörler tarafından aktive edilmektedir.

Aktive edilen JAK kinazlar da STAT proteinlerinin fosforilasyonuna neden olmaktadır. STAT proteinlerinin yapısında bulunan SH2 ucu, başka bir STAT proteinine bağlanmayı sağlamaktadır. Bunun bir sonucu olarak iki STAT proteini birbirine bağlanmakta ve reseptörden ayrılmaktadır. Reseptörden ayrılan ve birbirine bağlanan bu yapıya STAT dimeri adı verilmektedir. STAT dimerleri hücre çekirdeğine doğru göç etmekte, sitokine cevap veren hedef genin promoter bölgesindeki DNA sekanslarına bağlanarak, gen ekspresyon değişikliklerine neden olmaktadır (Yu ve Jove, 2004). Ayrıca, STAT dimerleri yapmış oldukları sinyal iletimi ile malignitede ekspresyon artışı gösteren genlerin de aktive edilmesine neden olmaktadır. Aktif hale gelmiş STAT' lar çok önemli mekanizmaların düzenlenmesinden sorumludurlar. Bu mekanizmalar arasında hücre çoğalması, anjiogenezi uyarma ve hücreleri bağışıklık sisteminden koruma gibi önemli görevleri bulunan bazı proteinlerin ekspresyonları bulunmaktadır. Bu nedenle de; STAT' ların anormal aktivasyonları genellikle hücresel değişime neden olmaktadır (Kaymaz ve ark., 2013). STAT' lar önce IFN bağımlı transkripsiyon faktörleri olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, memeli STAT familyasının yedi üyesinin, 50 ligand için yaşamsal sinyalleri dönüştürdüğü bilinmektedir (Kisseleva ve ark., 2002).



Şekil 1. 4. JAK / STAT sinyalizasyonu (Arbouzova ve Zeidler, 2006)

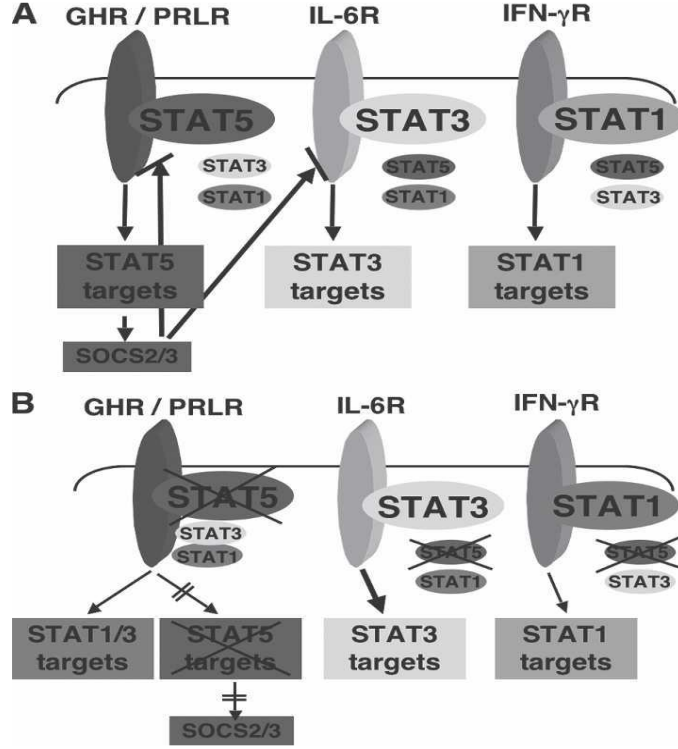
JAK-STAT bileşenleri bulunmayan insanlar ve fareler arasındaki fenotipik benzerlikler, JAK' ların ve STAT' ların işlevlerinin memelilerde büyük oranda korunmuş olduğunu düşündürmektedir (Casanova ve ark., 2012). Bugüne kadar STAT' ler, tirozin fosforilasyonu ile aktive olduğu bildirilen tek transkripsiyon faktörüdür (Donohue ve ark., 2010). JAK kinazlara ilaveten, bir başka tirozin kinaz da sitokin ve büyüme faktörü reseptörleri tarafından aktive edilmektedir. Ancak, bu kinazların STAT' ları doğrudan aktifleştirebileceği halen belirsizliğini korumaktadır (Pauku ve Silvennoinen, 2004). STAT' ların alınma aracılık eden sitokin reseptörleri Tablo 1.3'de verilmiştir.

Tablo 1. 3. STAT' ların alınma aracılık eden sitokin reseptörleri (Kisseleva ve ark., 2004)

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

Hücreye spesifik sitokin sinyalleri, en azından kısmen, bir hücre üzerinde ortaya çıkan reseptörlerden ve onunla karşılaştığı ligandlardan sonuçlanmaktadır. Her bir ligand, aynı kökenli reseptörüne bağlanmakta ve daha sonra belirli bir hedef gen setini indükleyen belirli bir STAT molekülünü harekete geçirmektedir. Hedef genlerden bazıları reseptörlerden gelen sinyaller üzerinde negatif bir geri bildirim

düzenlemesi yapan SOCS proteinlerini kodlamaktadır. STAT aile üyelerinden biri eksikse, daha önce orijinal üye tarafından işgal edilen diğer aile üyelerinin reseptör bölgelerine bağlanarak uygun olmayan aktivasyonlar meydana gelebilmektedir (Hennighausen ve Robinson, 2008).



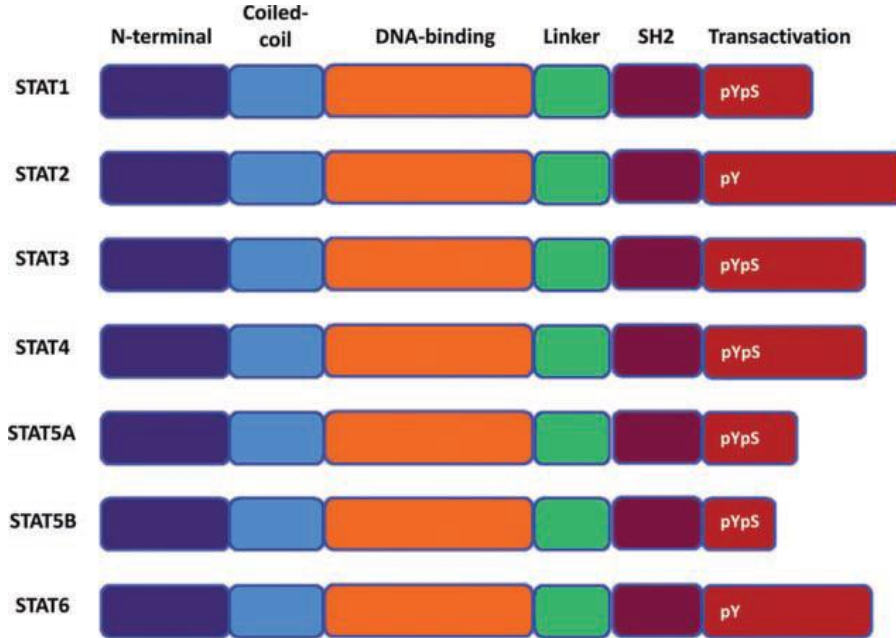
Şekil 1. 5. A) Sitokin-STAT sinyalizasyonunun özgüllüğü. B) Bir aile üyesinin silindikten sonra değiştirilen STAT sinyal şebekeleri (Hennighausen ve Robinson, 2008).

1. 2. 1. STAT Gen Ailesi

STAT proteinleri ilk kez 1990'lı yılların başında DNA bağlayıcı proteinlerin bir üyesi olarak tanımlanmıştır (Ihle, 1996; Ihle, 2001). STAT' lar, geniş bir yelpazedeki hormonların, sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin hedef gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini dönüştüren ve düzenleyen latent sitoplazmik transkripsiyon faktörleridir (Bromberg ve ark., 1999; Chaix ve ark., 2011). Hedef hücrelerdeki çeşitli peptid hormonları ve sitokinlerin etkilerine aracılık eden, yedi üyeli bir hücre içi faktör

ailesine aittir (Dario ve ark., 2009). Günümüzde, çeşitli sitokinlerin farklı STAT proteinlerini aktive ettikleri bilinmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda memeli hücrelerinde STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b ve STAT6 olmak üzere yedi STAT proteini tanımlanmıştır (Doğan ve Güç, 2004). Genellikle STAT proteinleri Janus kinazları ile birlikte sitokinlerin hücresel yapılara sinyal iletmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Goldammer ve ark., 1997).

STAT ailesi geninin, omurgalıların evrimleşmesinin başlangıcında, bir dizi gen ve kromozom çoğalması yoluyla tek bir atasal STAT geninden geldiği düşünülmektedir (Ambrosio ve ark. 2002; Crispi ve ark., 2004). Çünkü memeli STAT5 genleri, böceklerde bulunan tek STAT ortologlarına çok benzemektedir (Davey ve ark., 1999). İnsan genomunda, yedi adet STAT ailesi üyesi üç küme halinde organize olmaktadır (Ambrosio ve ark. 2002). Bu gen kümeleri içindeki ayrıntılı yapı belirsizliğini korumaktadır (Davey ve ark., 1999).



Şekil 1. 6. STAT proteinlerinin yapısı (Jatiani ve ark., 2011)

Farelerde gen hedefleme çalışmalarında STAT1 proteini interferonlara bozulan yanıtlar ve tümörlere duyarlılık artışına neden olmaktadır. STAT2 proteini

eksikliğinde de interferonlara yanıtların bozulduğu ve bazı dokularda STAT1 ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. STAT3 proteini eksikliğinde embriyonik ölümler şekillenmekte, dokularda hücre sağ kalımının bozulmasına ve patojenlere verilen yanıtın bozulmasına neden olmaktadır. STAT4 proteini eksikliğinde IL-12 yanıtının kaybolması nedeniyle Th1 farklılaşmasında bozulma şekillenmektedir. STAT5A proteini eksikliğinde PRL yanıtının kaybedilmesi nedeniyle engellenmiş meme bezi gelişimi tespit edilmiştir. STAT5B proteini eksikliğinde GH yanıt kaybı nedeniyle büyüme bozulmaktadır. STAT6 proteini eksikliğinde IL-4 yanıt kaybı nedeniyle bozulmuş Th2 farklılaşması gözlenmiştir (Pauku ve Silvennoinen, 2004).

Her bir STAT geni farklı işlevler göstermektedir. STAT1 tümör baskılayıcı gen olarak işlev görürken, özellikle STAT3 ve STAT5 kontrolsüz çoğalan, apoptoza uğramayan, immun sistemden kaçan ve anjiogenezi uyaran tümör hücrelerinde yüksek oranda ifade edilmektedir (Yu ve Jove, 2004; Liang ve ark., 2009). STAT3 ve STAT5 farklı hücrelerde hücre çoğalması ve programlı hücre ölümünü düzenlemektedir. Bu iki üyenin bazı hematolojik hastalıklarda anormal düzeyde aktifleştiği ve lösemi oluşumunda da rol oynadığı bilinmektedir (Kaymaz ve ark., 2013). Meme epitelinin oluşumu için STAT5A, büyüme hormonuna cevap için STAT5B gerekmektedir (Bromberg ve ark. 1999). Özellikle STAT5'nin, bağışıklık sisteminde, meme gelişim, hematopoez, saç büyümesi, yağ dokusunun depolanması ve gebelik rolleri gibi önemli görevleri olduğu saptanmıştır (Davey ve ark., 1999).

STAT familyası proteinleri arasında STAT5A ve STAT5B, en yakın iki STAT proteindir. Diğer transkripsiyon faktörleri ve yardımcı faktörlerle birlikte, hedef genlerin bir sitokine özgü biçimde ekspresyonunu düzenlemektedirler (Lin ve Leonard, 2000).

1. 2. 2. STAT Gen Yapısı ve Aktivasyonu

STAT, hedef hücrelerdeki çeşitli peptit hormonları ve sitokinlerin hareketlerine aracılık eden 7 transkripsiyon faktöründen oluşan bir aileden oluşmaktadır (Flisikowski ve Zwierzchowski, 2003). STAT ailesinin tüm üyeleri oldukça korunmuş bir moleküler yapıya sahip olmakta; 750-850 aminoasitten oluşan proteinler olarak tanımlanmaktadır (Paukku ve Silvennoinen, 2004; Hennighausen ve Robinson, 2008).

Her bir STAT proteinin altı fonksiyonel korunmuş bölgesi bulunmaktadır (Şekil 3). Bunlar; bir aminoterminal bölge (NH₂), bunu takiben bir sarılı bobin bölgesi (coiled-coil), bir DNA bağlama alanı (STAT2 hariç) (DBD), bir bağlayıcı bölge (LK), bir SH2 alanı, amino terminusundan yaklaşık 700 amino asitlik bir korunmuş tirozin kalıntısı, ve bir karboksil terminal transaktivasyon bölgesidir (TAD) (Lin ve Leonard, 2000; Yu ve Jove, 2004).

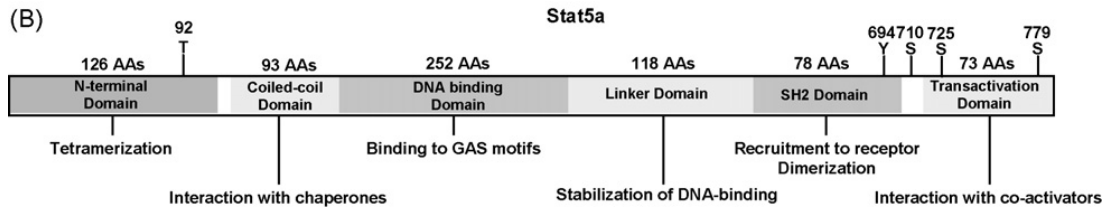
Aminoterminal bölge, 125 amino asitten oluşmakta ve fosforile edilmemiş STAT' lar arasında dimer oluşumunu teşvik etmektedir. STAT' ların istirahat durumunda "kapalı" bir konformasyonda kalmasını sağlamakta, aynı zamanda teslimat ve ardından reseptördeki STAT çiftlerinin aktivasyonunu kolaylaştırmaktadır. Sarılı bobin bölgesi, çekirdekten lateral çıkıntı yapan potansiyel olarak dinamik dört helezon demetinden oluşmaktadır. Bu alan, düzenleyici proteinlerle ilişkili olmakta, nükleer ithalat ve ihracat sürecinin kontrolünde rol oynamaktadır (Schindler and Plumlee, 2008). DNA bağlanma bölgesi de iyi korunmuştur ve DNA'ya sağlıklı bir bağlanma gerçekleşmesini sağlamaktadır. Bağlayıcı bölge (LK), aktif dimerleşmeyi yapısal olarak DNA bağlama motifine çevirmektedir. Araştırmalar aynı zamanda, sürekli bazal nükleer ihracat sürecini de düzenlediğini göstermektedir. SH2 bölgesi, en çok korunan motif olarak tanımlanmaktadır. Reseptör zincirlerine spesifik alımın yanı sıra aktif STAT dimerlerin oluşumuna aracılık etmektedir. STAT- reseptör, STAT- JAK ve STAT- STAT etkileşimlerinden sorumludur. C- terminal ucu, 5-7 özgül karboksi terminal aminoasitleriyle birlikte genellikle 700. aminoasit kalıntısı yakınında korunmuş bir tirozinden oluşmaktadır. Transkripsiyonel aktivitenin kontrol edilmesiyle görevlidir.

Tirozin aminoasiti, karboksi ucunda bulunmakta, STAT familyası üyeleri arasındaki uzunluk ve sekans açısından oldukça değişkenlik göstermektedir. Tirozinlerin fosforile edilmesinden ve bütün STAT proteinlerinin DNA'ya bağlanma aktivitelerinin düzenlenmesinden sorumludur (Doğan ve Güç, 2004; Schindler and Plumlee, 2008).

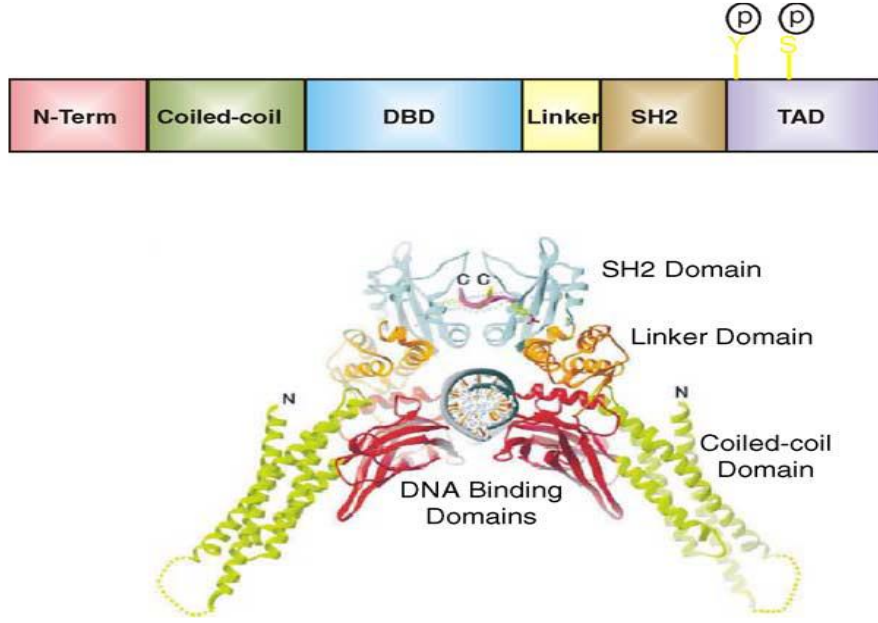
(A)

Stats	Amino Acids	Chromosome	Homology (%)	Structure
Stat1	750	2	93	1 Y701 S727 750 N D L SH2 TA
Stat2	846	12	64	1 Y690 851 N L SH2 TA
Stat3	769	17	99	1 Y705 S727 770 N D L SH2 TA
Stat4	748	2	94	1 748 N D L SH2 TA
Stat5a	794	17	96	1 Y694 S725 S779 794 N D L SH2 TA
Stat5b	787	17	96	1 Y699 S730 786 N D L SH2 TA
Stat6	847	12	85	1 Y641 848 N D L SH2 TA

(B)



Şekil 1. 7. STAT transkripsiyon faktörleri ailesinin üyeleri (Liao ve ark., 2010).

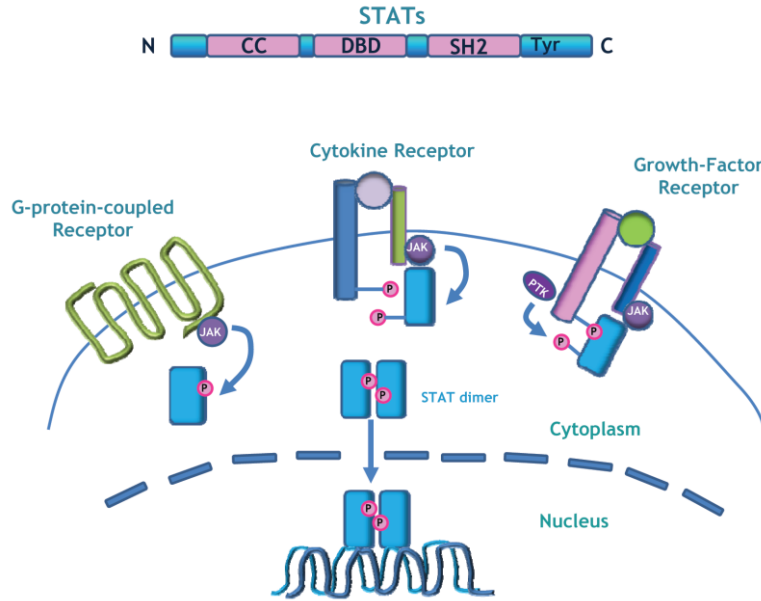


Şekil 1. 8. STAT kristal protein yapısı (Pauku ve Silvennoinen, 2004).

STAT proteinleri sitokin, büyüme faktörü veya peptid reseptörlerinden aldıkları sinyaller ile aktive olan ve bu sinyalleri çekirdeğe ileten sessiz (latent) sitoplazmik transkripsiyon faktörleri olarak fonksiyon görmektedirler. Aktive olduklarında önce fosforillenerek, sonra da dimerleşerek çekirdeğe yönelmekte ve hedef genin promoter bölgesine bağlanarak gen ekspresyon değişikliklerine neden olmaktadır (Yu ve Jove, 2004). STAT proteinleri, duyarlı genlerinin akış yönünde bulunan aynı kökenli tepki elementlerine bağlanarak bazal transkripsiyonel mekanizmalarla etkileşebilmekte ve böylece transkripsiyonu düzenlemektedirler (Saydam, 2017). STAT' lar esas olarak Jak kinazlar tarafından tirozin fosforilasyonu yoluyla aktive edilmekte, nükleer translokasyona ve hedef gen ekspresyonunun düzenlenmesine yol açmaktadır (Pauku ve Silvennoinen, 2004). Reseptör / JAK kompleksine bağlandıktan sonra, STAT molekülleri kendiliğinden fosforile edilmekte ve dimerleşmektedirler. Dimerler çekirdekte birikmekte, spesifik DNA elementlerini tanımak suretiyle transkripsiyonu etkinleştirmektedirler (Bromberg ve ark. 1999; Arbouzova ve Zeidler 2006). STAT proteinlerinin aktivasyonu, hücre çoğalması, hayatta kalma, farklılaşma ve gelişme de dahil olmak üzere kritik hücresel işlevleri kontrol eden genlerin sentezlenmesine neden olmaktadır. Anormal STAT protein aktivasyonu lösemi ve diğer kanserlerde bulunmuş ve STAT

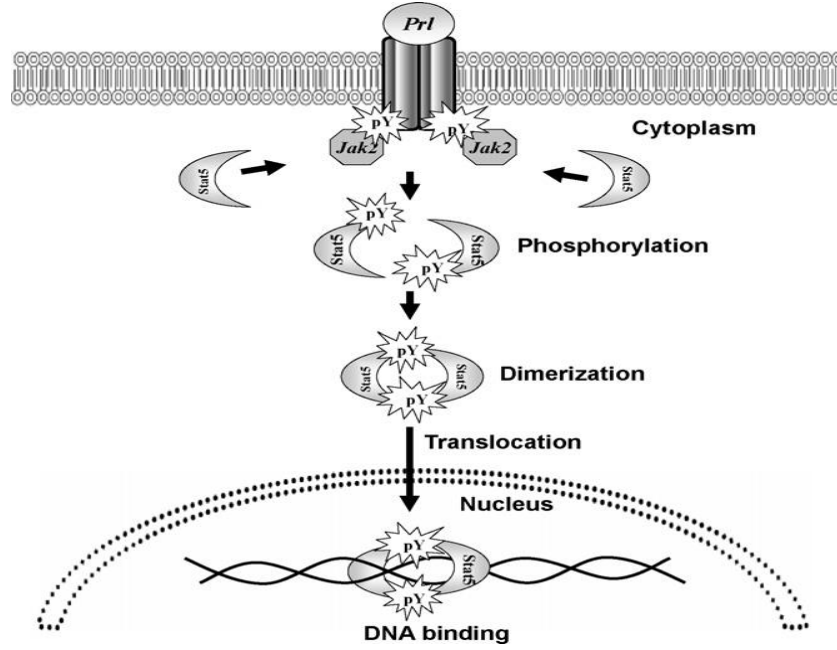
aktivasyonunun neoplaziye katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Chaix ve ark., 2011). STAT' lar nadiren mutasyona uğramakla birlikte sıklıkla aşırı eksprese edilmekte ve hiper aktivasyona uğramaktadır. Anormal aktivasyonları bundan kaynaklanmaktadır (Moriggl ve ark., 2005).

Büyüme hormonu (BH) kendi reseptörüne bağlanmakta, reseptöre bağlı JAK2'yi harekete geçirmekte ve kendisi ile BH reseptörü içinde tirozinleri fosforile etmektedir. Bu tirozinler, sinyal transduserleri ve aktive edicilerin transkripsiyon ailesinin (STAT) üyeleri de dahil olmak üzere, bir dizi sinyal proteinleri için bağlanma alanları oluşturmaktadır (Herrington ve ark., 2000).



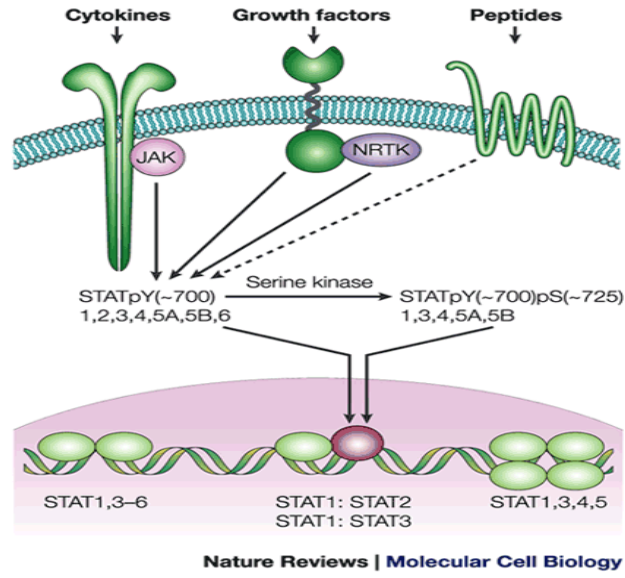
Şekil 1. 9. JAK/ STAT Aktivasyonu (Donohue ve ark., 2010)

PRL tarafından aktive edilen en önemli STAT üyesi STAT5'dir. STAT5'nin iki formunun (STAT5A ve STAT5B) PRL sinyalizasyonunu dönüştürdüğü (Şekil 1.11) bilinmektedir (Frasor ve Gibori, 2003).



Şekil 1. 10. Prolaktin (PRL) - JAK2- STAT5A / B sinyal yolağı (Liao ve ark., 2010)

Uyarı yokluğunda, STAT proteinlerin bir monomerik form olarak sitozolde saklı bir halde bulunduğu düşünülmektedir. Sitoplazmadaki STAT proteinlerinin tam yeri bilinmemektedir. Sitokinlerin uyarımı sonrasında ya yapısal olarak reseptörlerle bağlantılı olan ya da reseptörlere alınan JAK kinazları, STAT proteinleri için yerleştirme yerleri olarak hizmet eden reseptör üzerindeki tirozin kalıntılarını fosforile etmektedirler (Lin ve Leonard, 2000). Tirozin fosforilasyonu sonrasında, STAT proteinleri üzerindeki fosfotirozin tortuları, bir başka STAT proteininin SH2 alanı için yerleştirme yerleri olarak görev yapmaktadır. Böylece STAT' lar, homo-veya heterodimerize olabilmekte ve çekirdeğe translokasyon yapmaktadırlar (Lin ve Leonard, 2000; Frasor ve Gibori, 2003). Fosforile olan STAT proteinleri çekirdeğe taşınmakta, spesifik DNA elementlerini bağlamakta ve doğrudan kopyalama yapmaktadırlar (Darnell ve ark.,1994).



Şekil 1. 11. STAT aktivasyon mekanizmalarındaki değişiklikler (Levy ve Darnell, 2002)

Sitokinlerin aracılık ettiği STAT aktivasyonunun aşamaları şu şekilde sıralanmaktadır. Öncelikle, sitokin hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanmakta ve bir alt birim oluşmaktadır. Daha sonra oligomerizasyon gerçekleşmektedir. Bu oligomerizasyon, reseptör ile ilişkili olan JAK proteinlerinin çapraz fosforilasyon ile aktive edilmesine neden olmaktadır. Aktive hale gelen JAK proteinleri de reseptörün fosforilasyonuna yol açmaktadır (Bowman ve ark., 2000). Reseptör üzerinde bulunan bu fosforile bölgeler sitoplazmada inaktif halde bulunan STAT proteinlerinin reseptör ile etkileşmesine imkan sağlamaktadır. STAT proteinleri daha sonra reseptörden ayrılmakta ve birbirleri ile homodimer veya heterodimer oluşturmaktadır. Dimerleşen STAT proteinleri hücre çekirdeğine gelmekte ve DNA üzerindeki promoter bölgelerle etkileşerek hedef genlerin transkripsiyonunu uyarmaktadırlar (Doğan ve Güç, 2004).

STAT' ların hücre için önemli rolleri olması nedeniyle, kontrol etmek için de çok sayıda düzenleyici mekanizmanın varlığı bilinmektedir. Bu düzenleyiciler pozitif regülatörler olarak adlandırılan yol sinyalizasyonunun transdüksiyonu için aktivitesi

gerekenler ve sinyal verme gücünü azaltmak için davranan negatif regülatörler olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Temel olarak STAT sinyallerinin sona erdirilmesinin defosforilasyon ile mümkün olduğu gösterilmiştir. Bu aynı zamanda STAT proteinlerinin ubiquitin / proteasom aracılı bozunumuyla veya proteinlerin SOCS (Sitokin sinyalleri Baskılayıcıları) ailesi tarafından aracılık edilen daha klasik bir negatif geri besleme döngüsüyle doğrudan inhibisyon yoluyla da sağlanabilmektedir (Lin ve Leonard, 2000). Özellikle omurgalılarda, SOCS proteinlerinin JAK / STAT yol sinyalizasyonunu birkaç farklı mekanizmayla baskıladığı bildirilmiştir (Davey ve ark., 1999; Schindler ve Plumlee, 2008). SOCS' un PRL Reseptörü yoluyla STAT5 aktivasyonunu dengelediği gösterilmiştir. SOCS eksikliği STAT5A' nın hızla aktivasyonuna ve hızlandırılmış alveolar çoğalmaya ve farklılaşmaya yol açmaktadır (Hennighausen ve Robinson, 2008).

1. 2. 3. STAT5A Gen Özellikleri

STAT5, transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesidir ve prolaktinden süt protein genlerine sinyal iletiminde merkezi bir rol oynamaktadır (Brym ve ark., 2004). STAT5, büyüme hormonu (BH) ve prolaktin (PRL) 'nin hedef genler üzerindeki etkisinin ana aracısı olarak da bilinmektedir. İlk olarak meme bezinde keşfedilmiş ve başlangıçta meme bezi faktörü olarak tanımlanmıştır. Prolaktin sinyalizasyonunun hücre içi aracı olarak önemli bir rol oynamakta ve prolaktine yanıt olarak süt protein genlerinin transkripsiyonunu aktive etmektedir. STAT5 faktörleri, glukokortikoid ve insülin için reseptörlerle etkileşim kurmakta ve fonksiyonel olarak sinerjikleşmektedir (Davey ve ark., 1999; Flisikowski ve Zwierzchowski, 2003; Dario ve ark., 2009).

Koyunlarda başlangıçta tek bir STAT5 geni tespit edilmiştir. Daha sonra fare, insan, sıçan ve sığır hücrelerinde iki farklı fakat kromozomal olarak bağlantılı genler tarafından kodlanan iki STAT5 (STAT5A ve STAT5B) formları tespit edilmiştir. STAT5A ve STAT5B, büyüme hormonu tarafından regüle edilen genlerin

transkripsiyonel aktivasyonuna katılımı yoluyla büyüme hormonu sinyalizasyonuna güçlü bir biçimde katılmaktadır (Dario ve ark., 2009).

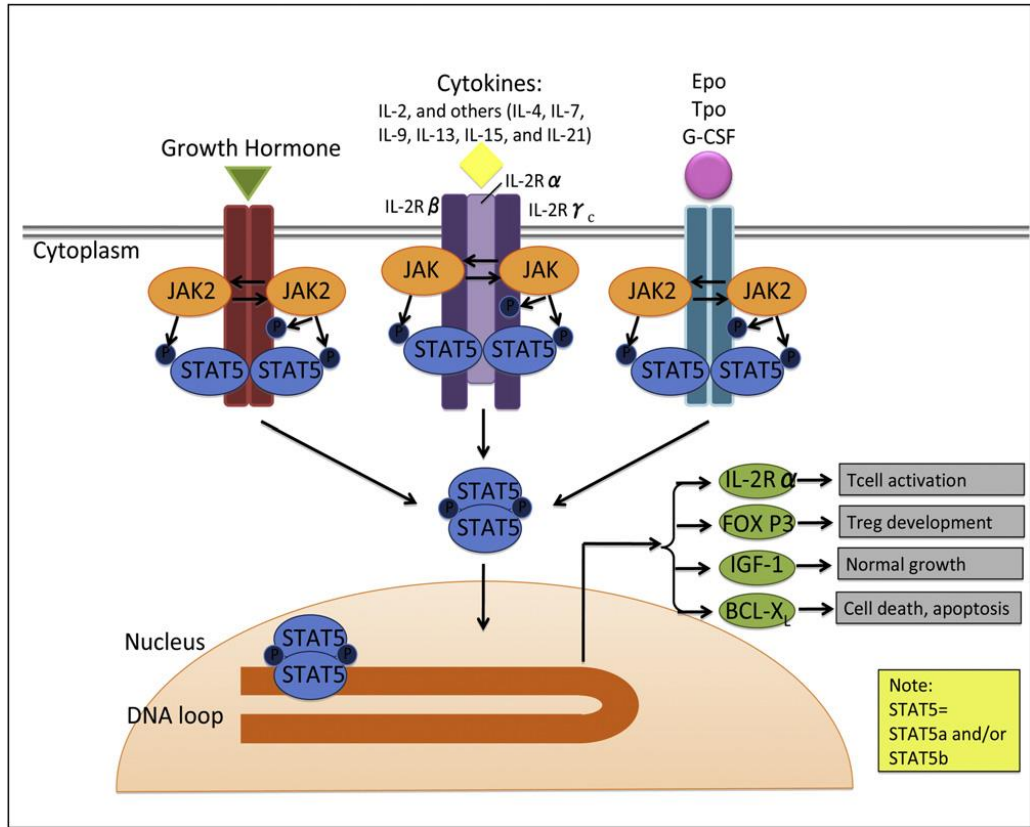
Her bir STAT5'in başta bağışıklık sistemi olmak üzere, hematopoez, büyüme ve meme gelişimiyle ilgili farklı biyolojik fonksiyonları bulunmaktadır (Ambrosio ve ark. 2002). STAT5 sırasıyla laktasyon ve büyümenin temel düzenleyicilerinden olan prolaktin ve büyüme hormonu sinyallerini yönlendiren bir transkripsiyon faktörüdür. Bu nedenle, STAT5A geni, çiftlik hayvanlarındaki kantitatif nitelikler için bir aday belirteç olmaktadır (Flisikowski ve ark., 2004). STAT5, B ve T lenfosit gelişiminde de çok önemli bir rol oynamaktadır. STAT5, hem lenfoid hücrelerin çoğalması hem de hayatta kalmasını düzenlemektedir. İnsanlarda Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)'li hastalarda yapılan çalışmalar STAT5 aktivasyonunun yükseldiğini göstermektedir (Harris and Farrar, 2012). STAT5 çoğalma, farklılaşma ve apoptoz dahil çeşitli hücresel süreçlerde de önemli bir rol oynamaktadır. STAT5'in hatalı regülasyonu tümörlerde olduğu gibi kronik veya akut miyeloid lösemili hastalarda da gözlemlenmektedir (Buitenhuis ve ark., 2004)

STAT5 polipeptidleri tipik olarak homeostatik koşullar altında sitoplazmiktir ve durgun biçimde bulunmaktadır. Onların aktivasyonu, oldukça korunmuş C-terminal tirozin fosforilasyonundan kaynaklanmakta ve dimer çifti oluşumuna ve nükleer translokasyona izin vermektedir (Grimley ve ark., 1999).

Bu ailenin iki üyesi STAT5A ve STAT5B, interlökinler, eritropoietin, büyüme hormonu ve prolaktin gibi sitokinlerin çok fazla çeşitleri tarafından aktive edildikleri için ön plana çıkmaktadır. STAT5 vasıtasıyla sitokin sinyalizasyonunun bozulması, karaciğer fonksiyon bozukluğu, gebelik sırasında meme gelişiminin eksikliği, bozuk bir bağışıklık sistemi ve bozulmuş eritropoez gibi farklı hücrelere özgü etkiler ile sonuçlanmaktadır. Moleküler düzeyde STAT5; hücre çoğalması, farklılaşma ve hayatta kalma ile bağlantılıdır (Hennighausen ve Robinson, 2008). STAT5A çoğunlukla meme dokusundan eksprese edilirken, STAT5B diğer dokulara kıyasla iskelet kaslarında yüksek oranda eksprese edilmektedir. Gebelik sırasında alveollerin çoğalması ve farklılaşması esas olarak prolaktin (PRL) tarafından

STAT5A ile kontrol edilmekte, vücut büyümesi ve T hücrelerinin gelişimi ve genişlemesi ise esas olarak STAT5B ile kontrol edilmektedir (Metser ve ark., 2016).

STAT5A eksikliği olan farelerde, meme bezi gelişimi ve emzirme ağır şekilde bozulmuştur ve bu farelerde lenfematopietik kusurlar görülmüştür (Davey ve ark., 1999). STAT5A / 5B az eksprese olan farelerde yapılan bir başka çalışmada Epo, GM-CSF, IL-2 ve GH' yi içeren bir dizi sitokine yanıtın bozulduğu belirlenmiştir. Ayrıca, bu fare embriyolarında şiddetli anemi de görüldüğü bildirilmiştir (Socolovsky ve ark., 1999; Ambrosio ve ark. 2002).



Şekil 1. 12. JAK / STAT5 yolağı sinyalizasyon şeması (Nadeau ve ark., 2011)

Farelerde STAT5A eksikliğinde çok fazla T-hücre si fonksiyonel defekti görülmektedir. Bu durum Epo' ya, GM-CSF 'ye ve IL-2'ye yanıt vermemekle sonuçlanmaktadır. Bu nedenle, STAT5A geni bağışıklık yetersizliğine neden olan hastalıklar için bir aday gen olarak düşünülmektedir (Ambrosio ve ark. 2002).

1. 2. 4. Çiftlik Hayvanı Yetiştiriciliğinde STAT5A Geninin Etkileri

Prolaktin (PRL), meme bezi gelişimini ve laktogenezi uyarmaktadır. Prolaktinin reseptörüne (PRLR) bağlanması STAT proteinlerinin fosforilasyon ve aktivasyonuna yol açmakta ve bu da spesifik genlerin ekspresyonunu teşvik etmektedir. Sığırlarda bildirilen 14 önemli süt proteini bulunmaktadır. Bunlardan STAT1, süt proteini sentezi ve yağ metabolizması üzerine etkiliyken, STAT5A süt kompozisyonu üzerine etkili olmaktadır (Singh ve ark., 2014). STAT5A ve STAT5B, gebelik sırasında meme dokusundaki süt proteini gen ekspresyonu ve epitelyal hücre farklılaşmasında transkripsiyon faktörü olarak önemli bir rol oynamaktadır (Liu ve ark., 1997). STAT5A'nın prolaktin ile birlikte çeşitli hormonların etkisine aracılık ettiği de bilinmektedir (Goldammer ve ark., 1997). İneklerin meme epitel hücrelerindeki süt protein genlerinin ekspresyonu çoğunlukla STAT5A transkripsiyon faktörünün aracılık ettiği ve prolaktinin hareketiyle düzenlenmektedir. Sığır STAT5A gen dizisi üzerinde yapılan çalışmalarda özellikle laktasyon döneminde STAT5A geni ve süt verimi ve süt bileşenleri arasında önemli farklılıklar bulunmuştur (Flisikowski ve Zwierzchowski, 2003; Brym ve ark., 2004).

STAT5A'nın meme bezindeki bir başka önemi memeye özgü süt protein genlerinin prolaktin kaynaklı ekspresyonunu uyaran bir transkripsiyon faktörü olarak orijinal görevine yansıtılmasıdır. Bununla birlikte yapılan çalışmalar sonucunda STAT5A'nın yokluğu, meme alveolar gelişiminin ve süt salınımının zayıflamasına neden olduğunu göstermiştir. STAT5A eksikliği laktasyon için gerekli olan prolaktin bağımlı meme bezi gelişiminin kaybına neden olmaktadır (Ihle, 2001; Hennighausen ve Robinson, 2008).

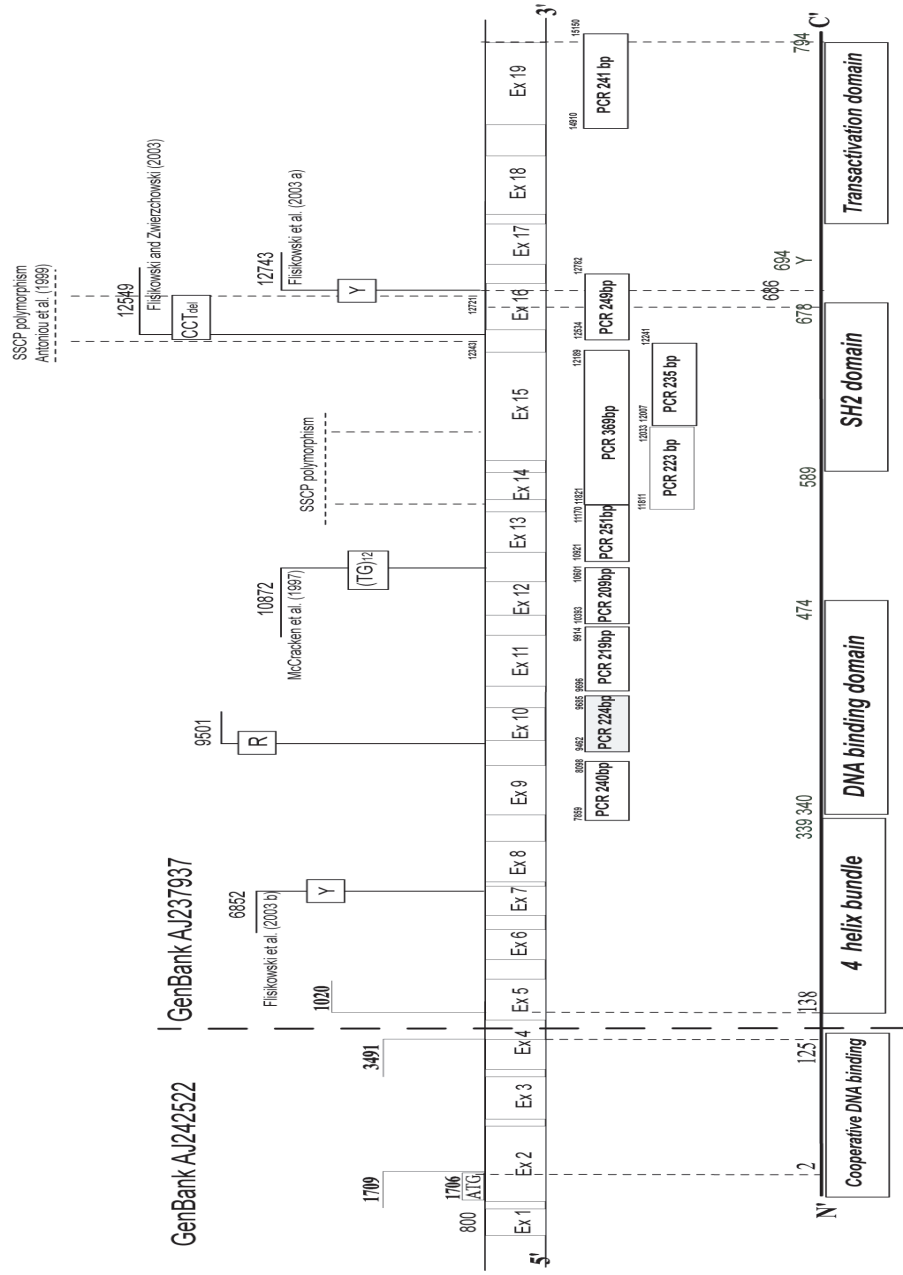
Raven ve ark. (2014) meme gelişimi, prolaktin sinyalizasyonu ve involüsyon yollarında genetik varyasyonlar üzerine yaptıkları çalışmalarda sığırlardaki STAT genlerinin süt üretimi ve bileşiminde önemli etkilere sahip olduğunu (Tablo 1.4) bulmuşlardır. Özellikle, STAT5A içindeki SNP'lerin süt kompozisyonu üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğunu in vitro olarak da doğrulamışlardır.

Tablo 1. 4. Prolaktin yolağındaki STAT genlerin süt bileşenlerine etkileri (Raven ve ark., 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

Khatib ve ark. (2009) yaptıkları çalışma da STAT5A'nın embriyonik yaşam süresini ve gelişim evresini de etkilediğini bulmuşlardır. Ayrıca, buldukları sonuçlarla STAT5A'nın insan ve hayvanlardaki diğer doğurganlık özelliklerini etkileyen bir aday gen olduğunu ileri sürmüşlerdir. STAT5A' nın 8. eksonunda buldukları SNP153137 (G/C) polimorfiziminin, incelenen tüm SNP' lere kıyasla, embriyonik hayatta kalma ve döllenme oranında önemli bir değişkenlik ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda tanımlanan tüm polimorfizimler Şekil 6' da verilmiştir. Mutasyon tipi bir harf sembolüyle işaretlenmiştir (Y = C veya T, R = A veya G), (TG)₁₂ = TG tekrar polimorfizmi, CCTdel = CCT silme, Ex = ekzon).



Şekil 1. 13. Sığır STAT5A geninin polimorfizm haritası (Brym ve ark., 2004)

Mccracken ve ark. (1997) yaptıkları çalışmada STAT5A geninin 12. intronun da çeşitli uzunluklarda TG tekrarları bulmuşlardır. Antoniou ve ark. (1999), sığır STAT5A proteininin SH2 alanını kodlayan gen parçasında iki SSCP varyantı bildirmişlerdir. Flisikowski ve Zwierzchowkk (2002), ekson 7'de yeni bir SSCP polimorfizmi tespit etmişlerdir. Flisikowski ve Zwierzchowkk (2003) tarafından yapılan başka bir çalışmada intron 15'de bir CCT delesyonu belirlenmiştir (Brym ve ark., 2004).

Brym ve ark. (2004)'nın Jersey ineklerinde yaptıkları çalışmada GG genotipli ineklerle karşılaştırıldığında, AA ve AG genotipindeki ineklerin daha yüksek protein içeriği gösterdiği, GG genotipli ineklerin ise daha yüksek süt verimine sahip oldukları saptanmıştır (Tablo 1.5).

Tablo 1. 5. Jersey ırkında STAT5A polimorfizminin süt ve süt bileşenlerine etkisi (Brym ve ark., 2004).

Laktasyon	Genotip	N	Süt (kg)	Yağ (kg)	Yağ (%)	Protein (kg)	Protein (%)
1	9501AA	41	3857.85	221.56	5.76	149.80	3.89
1	9501AG	78	3914.44	216.99	5.58	153.22	3.90
1	9501GG	19	4272.74	229.79	5.42	156.84	3.68
	Total	138	3946.96	220.10	5.61	152.70	3.87
2	9501AA	25	4167.88	248.32	5.98	163.48	3.93
2	9501AG	42	4419.14	244.21	5.56	175.78	3.98
2	9501GG	14	4594.86	248.21	5.45	174.50	3.82
	Total	81	4371.96	246.17	5.67	171.76	3.94

Khatib ve ark. (2008)'nın yaptıkları bir araştırmada STAT5A ve embriyonik hayatta kalma ile anlamlı ilişkiler bulunmuştur. STAT5A' nın embriyo ölümünde 2 mekanizma ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir. Bu mekanizmalardan birincisi sperm faktörlerini içeren ön döllenme mekanizmasıdır ve döllenme oranının düşmesine neden olmaktadır. İkincisi, erkek pronükleus ve oosit arasında uyumsuzluğa neden olan bir post-fertilizasyon mekanizmasıdır ve bu da embriyonun blastosist evresi öncesinde ölmesine neden olmaktadır. Teglund ve ark., (1998)' nın yapmış oldukları fare çalışmaları, STAT5A' nın hem süt üretimi hem de doğurganlıkla ilişkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca STAT5' in yokluğu küçük boyutlu veya eksik korpora luteasının bir sonucu olarak dişilerde infertiliteye yol açmaktadır.

1.3. DNA Polimorfizmi

Evrimsel süreçte dünyada bulunan tüm türlerin birbirinden farklı hale gelmesi ve bir türün ırkları arasındaki farklılıkları genetik çeşitlilikten kaynaklanmaktadır. Bu farklılıklara yol açan genetik çeşitliliğin en önemli nedenlerinden bir tanesi de polimorfizmlerdir (Ahmadian ve ark, 2000; Ekmekçi ve ark., 2008).

Polimorfizm, DNA dizilerindeki nükleotitlerde görülen değişimler olarak tanımlanmaktadır. Polimorfik DNA dizileri bir proteinin yapısında değişiklik yapmayan farklılıklar olarak da tanımlanmaktadır. Genetik terminolojide doğal popülasyonların polimorfik olduğu söylenmektedir (Goodenough and levine, 1975; Turner ve ark., 2004; Utine ve utine, 2012;).

İnsanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde popülasyonu oluşturan her üyede nükleotid dizileri aynı değildir ve birçok polimorfizmleri içermektedir. Bu polimorfizmler; restriksiyon parçası uzunluk polimorfizmleri (RFLP' leri), kısa ardışık tekrarları (mikrosatellitler, STR) ve tek nükleotit polimorfizmlerini (SNP' leri) içermektedir (Bardakçı ve ark., 2013).

Restriksiyon parçası uzunluk polimorfizmleri (RFLP), DNA üzerindeki mutasyonları tespit etmek amacıyla kullanılmaktadır. Mutasyonlar sonucunda restriksiyon enziminin kesme bölgesi yok olmakta veya yeni kesme bölgesi oluşmaktadır. Yapılan işlem sonucunda DNA, restriksiyon enzimleri ile kesildiği zaman farklı uzunlukta DNA parçaları oluşmakta ve bu parçaların uzunluklarına bakılarak analiz yapılmaktadır (Anonim, 2013). Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi, genetik çeşitlilik ve çeşitli organizma grupları arasındaki evrimsel ilişkinin incelenmesinde, gen haritalamalarının çıkartılmasında ve yakın akraba ilişkilerinin araştırılmasında kullanılmaktadır (Filiz ve koç, 2011; Bardakçı ve ark., 2013).

Kısa ardışık tekrarlar (STR), CACACA gibi kısa tekrarlı dizilerden oluşmaktadır ve bunlara mikrosatellitler adı verilmektedir. Tekrar birimleri 1-13 nükleotit uzunluğunda olabilmekte ve genellikle 5-20 kez tekrarlanmaktadır. Mikrosatellitler eş baskın yapıya sahip olmakta ve çoğunlukla moleküler bir belirteç olarak kullanılmaktadırlar (Anonim, 2013).

Tek nükleotit polimorfizmi (SNP), bir genomda DNA dizisi içerisinde yer alan tek bir nükleotidde (A, G, C veya T) oluşan değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. Nokta mutasyonları olarak da adlandırılmaktadır. Örneğin; GGATTCT dizisinin GGATCCT dizisine dönüşmesi tek nükleotid polimorfizmi olarak adlandırılmaktadır. SNP' ler sıklıkla iki allel içermekte ve DNA üzerinde protein kodlayan veya kodlamayan tüm bölgelerde bulunmaktadır (Bardakçı ve ark., 2013). SNP' ler, hastalık genlerinin belirlenmesi, klinik genetik testler, adli tıp alanında heterozigotluk kaybının belirlenmesi için bağlantı çalışmalarında kullanılmaktadır (Ahmadian ve ark., 2000) İnsan genomunda büyük kısmı tek nükleotid (C, T, G, A) düzeyinde olmak üzere (insanda on milyon kadar) birçok gen polimorfizmi bulunmaktadır. Tek nükleotid değişimlerini içeren bu genler, toplumda % 1'den daha fazla sıklıkta bulunan allel genler olarak tanımlanmaktadır. Dünyada yaşayan insanların her birinin DNA'sı % 99.9 oranında benzerlik göstermektedir. Geriye kalan % 0.1' lik fark ise bireylerin fenotipik ve genotipik farklılıkların sorumlusu olarak görülmektedir. Tek nükleotid polimorfizmleri insan genomunda

ortalama her 1000 nükleotidde bir görülen ve oldukça sık rastlanılan DNA dizi değişimleridir. (Ekmekçi ve ark., 2008; Bardakçı ve ark., 2013). SNP' ler bitkilerde dahil olmak üzere hemen hemen her canlı türünde görülmektedir (Filiz ve Koç, 2011).

Bu araştırma da, mandalardaki STAT ailesinde önemli bir yere sahip olan STAT5A geninin 6–9. eksonları arasındaki bölgedeki polimorfizmler belirlenecek ve ıslah çalışmalarında kullanımı konusunda bir ön bilgi sağlanmış olacaktır.

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun (AKUHADYEK) 49533702/122 sayılı izni alınarak yapılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Hayvan Materyali

Araştırmada, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel M¼d¼rl¼đ¼ tarafından Afyonkarahisar ilinde y¼r¼t¼len Mandaların Halk Elinde Islahı Projesi kapsamında 96 adet Anadolu Mandası malağıdan alınan kan ¼rnekleri kullanılmıştır.

2.1.2. Kullanılan Teknik Aletler

2.1.2.1. PCR Cihazı

STAT5A gen b¼lgelerinin ¼ođaltılması ve sekans PCR'ı amacıyla Applied Biosystem Veriti 96-Well Thermal Cycler PCR cihazı kullanılmıştır.



şekil 2.1. PCR Cihazı

2. 1. 2. 2. Yatay Elektroferez Sistemi

Kandan izole edilen DNA ve PCR ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla Thermo midicell primo EC 320 ve EC 330 elektroferez jel sistemleri kullanılmıştır.



Şekil 2. 2. Elektroferez Sistemi

2. 1. 2. 3. Jel Görüntüleme Sistemi

DNA izolasyonu ve PCR işlemi sonucunda elde edilen ürünlerin elektroferez cihazındaki agaroz jelde yürütülmesinin ardından, bu ürünlerin görüntülenmesi Vilber Lourmat BIO-VISION jel görüntüleme sistemi kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 2. 3. Jel Görüntüleme Sistemi

2. 1. 2. 4. DNA Dizileme Cihazı

PCR işlemi sonucunda çoğaltılan DNA'ların baz dizilimlerini belirlemek amacıyla Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzer cihazı kullanılmıştır.



Şekil 2.4. DNA Dizi Analiz Cihazı

2.2. Metod

2. 2. 1. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından Afyonkarahisar ilinde yürütülen Mandaların Halk Elinde Islahı Projesi kapsamında 96 adet Anadolu Mandası malağının *Vena jugularis*'inden alınan kan örnekleri, DNA izolasyonuna kadar, Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında, -20 C'de cryo tüplerde saklanmıştır.

2. 2. 2. DNA İzolasyonu

Kandan DNA izolasyonu spin kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 1.5 ml'lik eppendorf tüplere 10 µl Proteinaz-K (20mg/ml) konulmuştur. Daha sonra tüplere 200 µl kan örnekleri eklenmiştir. Karışımın üzerlerine 200 µl ekstraksiyon çözeltesi eklenerek 15 sn. kuvvetlice vortekslenip, 56°C'de 15 dk. etüvde bekletilmiştir. Etüvden çıkartılınca kapaktaki damlaları uzaklaştırmak için kısa süreyle santrifüj edilmiştir. Daha sonra üzerlerine 210 µl binding buffer eklenerek 15 sn vortekslenmiş, kapaktaki damlaları uzaklaştırmak için kısa süreyle santrifüj edilmiş ve lizatlar spin kolon tüplerine aktarılmıştır. Ardından, tüplerin kapakları kapatılarak 6.000 rpm'de 1dk santrifüj edilerek, toplama tüpünün altındaki sıvı kısım dökülmüştür. Daha sonra, spin kolonların üzerine 650 µl yıkama solüsyonu-I eklenip 6.000 rpm'de 1dk santrifüj edilerek toplama tüpünün altındaki sıvı kısım atılmıştır. Spin kolonlara 500 µl yıkama solüsyonu-II eklenerek 6.000 rpm'de 1dk santrifüj edilmiştir ve aynı şekilde toplama tüpünün altındaki sıvı kısım dökülmüştür. Sonrasında spin kolonlara tekrar 250 µl yıkama solüsyonu-II eklenerek 14.000 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir. Spin kolon yeni eppendorf tüplere aktarılmış ve üzerlerine 200 µl TE buffer (10mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0) solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir. Bekleme süresi bittikten sonra tüpler 8.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiş ve kullanılmak üzere -20 C'de saklanmıştır.

2. 2. 3. Primer Tasarımı

Primerler NCBI'dan elde edilen STAT5A gen dizinden (NW_005784710.1) yararlanılarak ve FastPCR Professional 6.1.2 paket programı (Kalendar ve ark., 2009) kullanarak tasarlanmıştır. Primerler arasındaki dimer ve hairpin oluşup oluşmadığı aynı program ile kontrol edilmiştir. Çalışmada kullanılan primerler Tablo 2.1.'de gösterilmektedir.

Tablo 2. 1. Çalışmada kullanılan primerler

F1 (STAT5A_F11159)	5'-TCCTCCAGCTCAGTTTGCCCA-3'
R1 (STAT5A_R12162)	5'-TCTGCCAGATGATCTCCGCCA-3'
F2 (STAT5A_F11950)	5'-TTGGAAGGCAGGGCATCTCTGC-3'
R2 (STAT5A_R12879)	5'-CAGCGTACTTGCGGGTGTTC-3'

2. 2. 4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Primerin bağlanma sıcaklığının (Melting Temperature, T_m) belirlenmesi amacıyla gradient PCR uygulanmıştır. Bu amaçla F1-R1 primerleri için örnek başına 4,35 µl ultra distile su, 1,0 µl 10xPCR, 0,7 µl MgCl (50mM), 2,2 µl 5Q solüsyonu (Qiagen) 0,2 µl dNTP, 0,25 µl forward 1 (10 pmol), 0,25 µl reverse 1 (10 pmol), 0,05 µl Platinum Taq polimeraz (Invitrogen) ve 1 µl DNA koyularak toplam hacim 10 µl olacak şekilde PCR karışımı hazırlanmıştır. F2-R2 primerleri için ise örnek başına 6,90 µl ultra distile su, 1,0 µl 10xPCR, 0,4 µl MgCl (50 mM), 0,2 µl dNTP, 0,25 µl forward 2 (10 pmol), 0,25 µl reverse 2 (10 pmol), 0,05 µl Platinum Taq polimeraz ve 1 µl DNA koyularak toplam hacim 10 µl olacak şekilde PCR karışımı hazırlanmıştır. PCR cihazı sırasıyla 94 °C' de 2 dk, 94 °C' de 45 sn, 52-62 °C' de 30 sn, 72 °C' de 1 dk ve 72 °C' de 10 dk çalışacak ve 35 döngü yapacak şekilde ayarlanmıştır.

2. 2. 5. Agaroz Jel Elektrofrez

DNA izolasyonu ve PCR ürünlerini görüntülemek amacıyla (% 1'lik) agaroz jeli hazırlanmıştır. Jeli hazırlamak için 1 gr Agaroz tozu ve 100 ml TAE (Tris- Asetat- EDTA) solüsyonu karıştırılarak mikrodalga fırında eritilmiştir. Erimiş jelin içerisine 1 µl RedSafe boya solüsyonu eklenmiştir. Elde edilen karışım ılık bir hale geldiğinde elektrofrez tepsisine dökülmüştür. Hazırlanan jel katılması amacıyla 30 dk oda

ısısında, 30 dk' da buzdolabı içerisinde +4 derecede bekletilmiştir. Daha sonra elektroforez tarakları tepside uzaklaştırılmış ve tepsi elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tanka jelin üzerini geçecek miktarda TAE (Tris- Asetat- EDTA) solüsyonu ile doldurulmuştur. Her bir kuyucuğa 8,5 µl yükleme boyası (Loading Dye) ve 2,5 µl PCR ürünü içeren karışım konulmuştur. Yükleme işleminin ardından cihaz çalıştırılarak örnekler 90 V' da 30 dk boyunca jelde yürütülmüştür. Daha sonra jel Vilber Lourmat BIO-VISION jel görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülenmiştir. Görüntünün olduğu bantlar pozitif, görüntünün olmadığı bantlar ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

2. 2. 6. DNA Dizilime Analizi

Elde edilen PCR ürünlerinin baz dizilimini öğrenmek ve polimorfizmleri tespit etmek amacıyla DNA Dizilime Analizi yapılmıştır. PCR ürünlerinin temizlenmesi amacıyla PCR tüpü içerisine 4 µl PCR ürününün, 0,5 µl Exonuclease-1 (Thermo, EN0582) ve 1,0 µl FastAP (Thermo, EF0652) eklenmiştir. Hazırlanan karışım PCR cihazına konularak 37 °C ' de 15 dakika, 85 °C ' de 15 dakika olacak şekilde ayarlanmıştır. Böylelikle, PCR ürünlerinin içerisinde bulunan primerler, dNTP'ler ve tek zincirli yapılar uzaklaştırılmıştır.

Sekans PCR amacıyla PCR pleytine örnek başına 5,5 µl 1xSB solüsyonu (sequencing buffer), 1 µl BigDye solüsyonu, 2,5 µl primer (F veya R) (1 pmol) ve 1 µl temizlenmiş PCR ürünü ilave edilmiştir. Hazırlana karışım PCR cihazına konulmuştur. PCR Cihazı 96 °C ' de 2 dakika 1 döngü, 96 °C ' de 10 saniye, primerin bağlanma derecesinde 15 saniye ve 60 °C ' de 4 dakika olmak üzere 35 döngülük olacak şekilde PCR cihazı ayarlanmıştır.

Sekans PCR sonucu elde edilen ürünler etanol presipitasyon yöntemi ile temizlenmiştir Bu amaçla her bir örnek için 50 µl Etanol (% 98) ve 2 µl 3M Sodyum Asetat (NaOAc, pH 5,07) içeren bir solüsyon hazırlanmıştır. Sekans PCR ürünlerinin bulunduğu her kuyucuğa 52 µl hazırlanan bu karışımdan eklenmiştir. Pleyt sealing

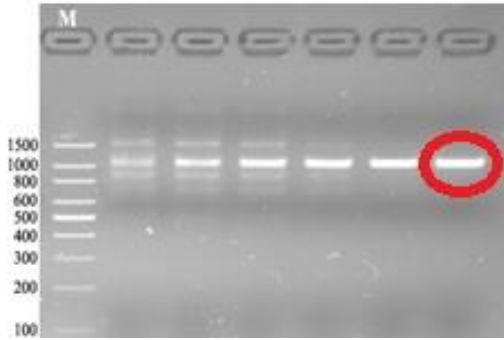
ile kaplanmış ve hafifçe 10-15 saniye kadar vortekslenmiştir. Daha sonra 40 dakika boyunca -20 °C bekletilmiştir. Bu sürenin bitiminde alınarak 30 dakika boyunca +4 °C' de 4600 rpm' de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında alınarak üstteki sealing çıkartılmış, pleyt bir peçetenin üzerine ters çevrilerek santrifüj cihazına yerleştirilmiş ve 700 rpm' de 1 dakika boyunca santrifüj edilerek pleyt içerisindeki fazla sıvı atılmıştır. Bu işlem sonrasında pleyt alınarak her bir kuyucuğa % 70' lik etanolden 70 µl eklenmiş ve üstü sealing ile kaplanmıştır. 15- 20 saniye boyunca kuvvetlice vortekslenmiştir. Arkasından 10 dakika boyunca +4 C' de en yüksek devirde santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında alınarak üstteki sealing çıkartılmış, pleyt bir peçetenin üzerine ters çevrilerek santrifüj cihazına yerleştirilmiş ve 700 rpm' de 1 dakika boyunca santrifüj edilerek pleyt içerisindeki fazla sıvı atılmıştır. Pleyt oda sıcaklığında ve karanlık bir yerde içinde ki etanolün uçurulması amacıyla 60 dakika bekletilmiştir. Bu işlemin arkasından her bir kuyucuğa 15 µl Hi-Di Formamide eklenmiş ve pleyt tekrar sealing ile kaplanmış, kuvvetlice vortekslenmiş ve 1300 rpm' de kısa bir santrifüj yapılmıştır. Daha sonra üstteki sealing çıkartılmış, pleyt septa ile kapatılmış ve DNA Dizi Analiz Cihazına yüklenmiştir.

2.2.7. İstatistik Analiz

Yapılan DNA dizileme analizi sonucunda elde edilen sonuçların düzenlenmesi Sequencher 5.4.1 paket programı ile yapılmıştır. Düzenlemeleri yapılan tüm örnekler BioEdit programında hizalanarak polimorfik olan SNP'ler belirlenmiştir. STAT5A genindeki allel frekansları ve heterozigotlukların hesaplanmasında GENETIX (4.05.02) bilgisayar programı (Belkhir ve ark., 1996) kullanılmıştır. Beklenen ve gözlenen heterozigotluk değerleri arasındaki karşılaştırma X^2 testi ile yapılmıştır.

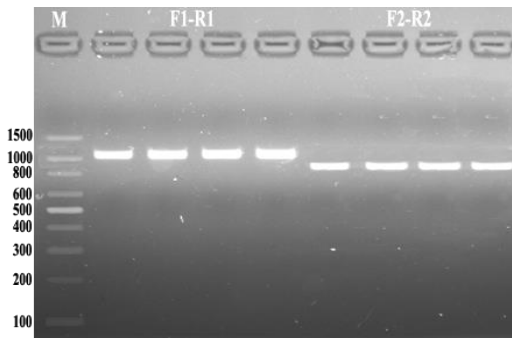
3. BULGULAR

STAT5A geni toplamda 21064 bazdan oluşmaktadır. Bu araştırmada 11160-12880. bazlar arasında bulunan 1720 baz uzunluğundaki 6. ekzon ve 9. ekzon arasındaki bölge çalışılmıştır. Bu amaçla iki farklı primer karışımı kullanılmıştır. Primer karışımı-1 (STAT5A_F11159 ve STAT5A_R12162) ile 1003 baz çifti (bp), Primer karışımı-2 (STAT5A_F11950 ve STAT5A_R12879) ile 929 bp uzunluğundaki bölge çoğaltılmıştır.

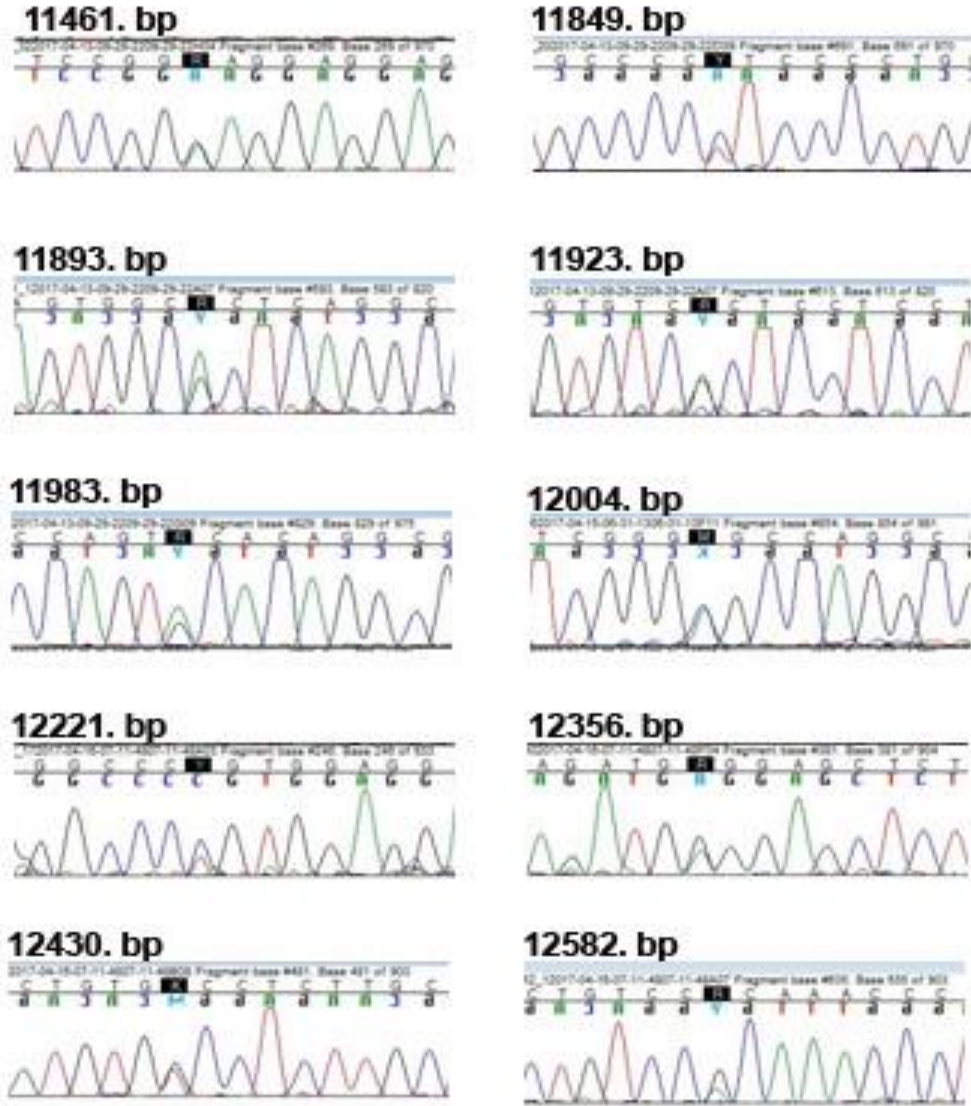


Şekil 3. 1. Gradient PCR Agaroz Jel Elektrofrez görüntüsü

Yapılan gradient PCR sonucunda STAT5A_F11159 ve STAT5A_R12162 primerleri için en ideal T_m derecesi 58 °C, STAT5A_F11950 ve STAT5A_R12879 primerleri için de 62 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 3.1). Tüm örneklerin PCR'ları bu T_m derecelerine göre yapılmış ve PCR sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel elektrofrez görüntüsü Şekil 3.2'de verilmiştir.

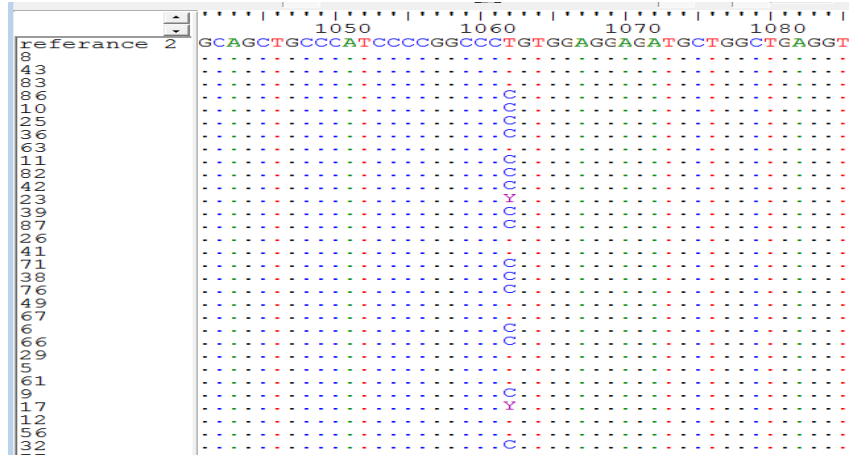


Şekil 3. 2. PCR ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrez görüntüsü



Şekil 3. 3. STAT5A geninin 6-9. eksonları arasındaki SNP'lere ait pik görüntüsü

Yapılan DNA dizi analizinin sonucunda elde edilen diziler Sequencher 5.4.1 bilgisayar programı ile düzenlenmiş ve BioEdit bilgisayar programı ile de hizalanmıştır (Şekil 3. 2. ve Şekil 3. 3.). İntron ve ekzonlarda belirlenen polimorfik bölgeler, alleller, allel frekansları (X_i) gözlenen (H_o) ve beklenen (H_e) heterozigotluk ile F_{IS} değerleri Tablo 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3. 4. Ekzon 8’de tespit edilen polimorfik bölge

Tablo 3.1. Anadolu Mandası STAT5A geninin 6 – 9. ekzonlar arasında tespit edilen SNP’ler, allel frekansları ve heterozigotluk değerleri

SNP	Allel	X_i	H_o	H_e	F_{IS}
11461	G	0.9792	0.0417	0.0408	-0.016
	A	0.0208			
11849	T	0.5104	0.4792	0.4998	0.046
	C	0.4896			
11893	G	0.4948	0.7604	0.4999	-0.517
	A	0.5052			
11923	G	0.4271	0.7500	0.4894	-0.529
	A	0.5729			
11983	G	0.6510	0.5938	0.4544	-0.302
	A	0.3490			
12004	C	0.1771	0.2708	0.2914	0.076
	A	0.8229			
12221	T	0.4688	0.0625	0.4980	0.876
	C	0.5313			
12356	G	0.9063	0.0833	0.1699	0.513
	A	0.0938			
12430	G	0.8802	0.1354	0.2109	0.362
	T	0.1198			
12582	G	0.7708	0.4583	0.3533	-0.293
	A	0.2292			

STAT5A geninin 8. ekzonunun g+12221. baz bölgesinde belirlenen C/T polimorfizmi, protein sentezinde herhangi bir değişikliğe neden olmamaktadır. DNA dizisindeki CCT ve CCC kodonları prolin amino asitini kodlamaktadır.

Yapılan khi-kare (X^2) analizi sonucunda gözlenen ve beklenen heterozigotluk frekansları arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($P<0,001$). Bu analizin sonucunda araştırılan bu popülasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olmadığı tespit edilmiştir. STAT5A genindeki SNP'ler bakımından gözlenen genotip frekanslarının Hardy-Weinberg oranlarından ortalama sapmalarının bir ölçüsü olan F_{IS} değeri bazı SNP bölgesinde negatif çıkmıştır. Bu durumun homozigotların frekansının yüksek olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4. TARTIŞMA

STAT5A geni, meme bezlerinden süt salgısını uyarıcı hormon olarak görev yapan prolaktinden süt protein genlerine sinyal ileten bir gen olarak tanımlanmaktadır. STAT5A'nın yokluğunda, meme alveolar gelişiminin ve süt salınımının zayıflaması gibi olumsuz etkiler görülmektedir. Ayrıca, STAT5A eksikliğinde meme bezi gelişiminde bozukluklar meydana gelmektedir (Ihle, 2001; Hennighausen ve Robinson, 2008). Bunun bir sonucu olarak da süt verimi azalmakta ve sütün besleyici özelliği zayıflamaktadır. Süt verimini arttırabilmek ve içeriğini zenginleştirebilmek için sütçü hayvanlarda STAT5A geniyle ilgili çalışmaların artırılması gerekmektedir. İnsan, sığır, fare ve koyunlarda STAT5A ile ilgili yapılan çalışmalarda SNP' ler tespit edilmiştir. Gen üzerinde bulunan bu SNP' lerin bazılarının süt kompozisyonu üzerine etkileri olduğu saptanmıştır. Ancak, mandalar üzerine yapılan çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır. Kale ve Yadav (2012), Murrah mandaları üzerine yaptıkları çalışma sınırlı çalışmalardan birini oluşturmaktadır.

Mccracken ve ark. (1997), sığırlarda yaptıkları çalışmada STAT5A geninin 12. intronun da çeşitli uzunluklarda TG tekrarları bulmuşlardır. Antoniou ve ark. (1999), sığır STAT5A proteininin SH2 alanını kodlayan gen parçasında iki SSCP varyantı bildirmişlerdir.

Teglund ve ark., (1998)' nin yapmış oldukları fare çalışmaları, STAT5A' nın hem süt üretimi hem de doğurganlıkla ilişkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, STAT5' in yokluğunun dişilerde infertiliteye yol açtığı bildirilmiştir.

Flisikowski ve Zwierzchowkk (2002), ekson 7'de yeni bir SSCP polimorfizmi tespit etmişlerdir. Flisikowski ve Zwierzchowkk (2003) tarafından yapılan başka bir çalışmada intron 15'de bir CCT delesyonu belirlenmiştir.

Brym ve ark. (2004)'nin Jersey ırkı ineklerde yaptıkları çalışmada GG genotipli ineklerle karşılaştırıldığında, AA ve AG genotipindeki ineklerin daha yüksek protein içeriği gösterdiği, GG genotipli ineklerin ise daha yüksek süt verimine sahip oldukları saptanmıştır. Flisikowski ve ark., (2004) yaptıkları çalışmada; STAT5A'nın transaktivasyon bölgesi SH2 için ekson 16'da 12743. baz çiftinde T→C polimorfizmi bulmuşlardır. Bu polimorfizmin STAT5A DNA bağlama

özelliklerini değiştirdiği gösterilmiştir, STAT5A geninin ekson 16'sındaki C→T polimorfizminin sığırdaki bazı süt özelliklerinin değişmesine neden olan bir mutasyon olduğu düşünölmektedir.

Khatib ve ark., (2009), yaptıkları çalışma da STAT5A'nın embriyonik yaşam süresini ve gelişim evresini de etkilediğini bulmuşlardır. Ayrıca, buldukları sonuçlarla STAT5A'nın insan ve hayvanlardaki diğer doğurganlık özelliklerini etkileyen bir aday gen olduğunu ileri sürmüşlerdir. STAT5A' nın 8. eksonunda buldukları g.153137 G>C polimorfizminin, incelenen tüm SNP' lere kıyasla, embriyonun hayatta kalması ve döllenme oranıyla önemli bir ilişki olduğunu tespit etmişlerdir. Anadolu Mandalarında yapılan bu araştırma da ise 8. ekzonda polimorfizm belirlenememiştir.

Selvaggi ve ark. (2009) İtalyan Brown sığırı üzerinde yaptıkları çalışmada STAT5A geninin 7. ekzonu içinde 6853 pozisyonunda C→T polimorfizmi bulmuşlardır. Özellikle CT genotipindeki ineklerin CC genotipindekilere oranla daha az süt verdikleri bildirilmiştir. CC genotipindeki ineklerden elde edilen süt, protein açısından daha zengin (% 0.19) ve dolayısıyla laktasyon boyunca CC genotipindeki ineklerden elde edilen protein miktarı, CT genotipindekilerden daha yüksek bulunmuştur. Anadolu Mandalarında yapılan bu çalışmada 7. ekzonunda g.12221 C>T polimorfizmi belirlenmiştir Ancak, belirlenen bu polimorfizm aynı amino asiti kodladığı için protein sentezinde herhangi bir değişikliğe neden olmamaktadır.

Raven ve ark., (2014) yaptıkları çalışmalarda sığırlardaki STAT genlerinin süt üretimi ve bileşiminde önemli etkilere sahip olduğunu bulmuşlardır. Özellikle, STAT5A içindeki SNP' lerin süt kompozisyonu üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğunu in vitro olarak da doğrulamışlardır. STAT5A geninin süt kompozisyonunda yağ yüzdesi, süt miktarı, protein yüzdesi ve protein miktarı üzerine etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Selvaggi ve ark. (2016) Agerollü sığırlarında STAT5A gen varyantlarının süt üretim özellikleriyle ilişkisi üzerine yaptıkları bir başka çalışmada, genotipler arasında önemli farklılıklar bulmuşlardır. TT genotipindeki inekler, TC genotipindekilere oranla daha yüksek yağ ve protein içerikli süt vermektedirler. He ve ark. (2012)'da sığır STAT5A geninin A9501G noktasında buldukları mutasyonunun Çin Holstein ineklerinde süt verimi, süt protein verimi ve yağ yüzdesiyle ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Kale ve Yadav (2012), Murrah mandaları üzerine yaptıkları çalışmada STA5A geninin 15. intron, 14. ekson, 7. ekson, 16. ekson ve 9. intron bölgelerini analiz etmişlerdir. Çalışmalarında 7. eksonunda tespit ettikleri polimorfizmin 305 günlük süt verimi üzerinde (% 5 seviyesinde) belirgin bir etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Yaptığımız çalışmada Anadolu Mandalarında 7. eksonda herhangi bir polimorfizme rastlanmamıştır.

Yukarıda belirtilmiş olan farklı hayvan türleri üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda STAT5A geninde bulunan SNP' lerin süt verimi, süt kompozisyonu, döllenme ve embriyonik yaşam süresi üzerine etkili olduğu kanıtlanmıştır. Bu çalışmada, Afyonkarahisar bölgesinde yetiştirilen 96 baş malağın STAT5A genindeki 6.- 9. ekzonlar arasındaki bölge incelenmiştir. Yapılan analizlerde STAT5A geninin 8. eksonunda, 12221. baz bölgesinde, C / T polimorfizmi bulunmuştur. Bu polimorfizmin protein kodlamasında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir. İntronlarda belirlenen 9 SNP ile verimler arasındaki ilişkinin araştırılmasının manda ıslah çalışmalarına katkısı olacağı düşünülmektedir. Manda STAT5A geninde yapılan çalışmaların sınırlı sayıda olması ve bulunan polimorfizmler nedeniyle bu çalışma önem arz etmektedir. STAT5A geninin fonksiyonu göz önünde bulundurulduğunda; bu genin süt kompozisyonu üzerine etkilerinin ayrıntılı bir şekilde tespit edilebilmesi için daha kapsamlı bir araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. STAT5A geninin tamamının ve ilişkili genlerin SNP' ler açısından incelenmesinin süt verimi, süt kompozisyonu ve manda ıslahı çalışmaları üzerine katkısı olacağı düşünülmektedir. Giderek daha sağlıklı ve daha kalabalık bir hal alan Dünya nüfusunun, artan organik ürün talebini karşılayabilmek ve daha

sağlıklı bir düzeye getirebilmek için manda ve diğer çiftlik hayvanları üzerine yapılacak genetik çalışmaların arttırılması gerekmektedir.

5. SONUÇ

STAT5A geni transkripsiyon ailesinin bir üyesidir ve prolaktinden süt proteini genlerine sinyal iletiminde merkezi bir role sahiptir. Ayrıca, yapılan çalışmalarda meme bezinin gelişiminde de etkili olduğu bulunmuştur. Bu fonksiyonlarının dışında dölleme ve embriyonik yaşam süresi ile bağlantısı olduğu da düşünülmektedir. Son dönemlerde yapay ürünlerinin kullanılmasıyla artan hastalıklarla mücadele etmek için doğal besinlere olan talep artmış durumdadır. Bu doğal besinlerden birisi olan sütün daha verimli alınabilmesi ve besleyicilik değerinin artırılabilmesi için STAT5A geni aday gen konumunda görülmektedir. Ancak, şimdiye kadar STAT5A geni üzerine yapılan çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır. Özellikle, sığır sütüne oranla daha besleyici özelliğe sahip olan manda sütünün artırılması ve içeriğinin zenginleştirilmesi amacıyla yapılan genetik çalışmalar yok denecek kadar az miktarda bulunmaktadır.

Daha önce sığırlar, koyunlar ve fareler üzerinde yapılan az sayıdaki çalışmalarda STAT5A genindeki SNP'lerin süt kompozisyonu üzerine etkileri kanıtlanmıştır. Mandalarda bulunan STAT5A geninin de incelenmesinin ve SNP'lerin belirlenmesinin süt verimine ve sütün besleyici özelliğine katkıda bulunacağı düşünülmektedir. Bu amaçla, STAT genlerinde daha kapsamlı ve verimlerle ilişkilendirilen, sahaya yönelik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

ÖZET

Manda STAT5A Geninin Bir Bölümündeki Polimorfizmlerin Belirlenmesi

Bu araştırmada Afyonkarahisar bölgesinde yetiştirilen 96 adet Anadolu mandasından alınan kan örnekleri kullanılmıştır. Çalışmada süt verimi ve süt kompozisyonu ile ilgili olan STAT5A geninde bulunan polimorfizmler saptanmaya çalışılmıştır.

Yapılan alışmalar sonucunda STAT5A geninin 8. ekzonunda 12221. baz bölgesinde C / T polimorfizmi tespit edilmiştir. Bu polimorfizmin protein sentezini değiştirmediği bulunmuştur. Ancak STAT5A geninin memeli canlılarda süt verimi ve süt kompozisyonu üzerine etkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu gendeki diğer bölgelerin incelenmesi ve SNP' lerin tespit edilebilmesi için daha uzun süreli ve daha kapsamlı bir çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Mandalarda bu gen üzerine yapılan çalışmaların kısıtlı olması sebebiyle bulgularımızı kıyaslayacak belgeler bulunamamıştır. Manda yetiştiriciliğinin yaygınlaştırılması ve süt verimlerinin arttırılabilmesi için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Manda, STAT5A, Polimorfizm, Süt Kompozisyonu

SUMMARY

Determination of polymorphism in partial of the Buffaloes STAT5A gene

In this study, were used blood samples from 96 Anatolian water buffaloes grown in Afyonkarahisar region. The study attempted to detect polymorphisms in the STAT5A gene, which are related to milk yield and milk composition.

As a result of the work done, C / T polymorphism was detected at base 12221 in the 8th exon of the STAT5A gene. This polymorphism was found not to alter protein synthesis. However, it is known that the STAT5A gene is effective on milk production and milk composition in mammalian living. Therefore, is needed a longer and more comprehensive study to examine the other regions of this route and identify the SNPs. Due to the limited work on this gene in the water buffaloes, we have not found any documents to compare our findings. Much more work is needed to expand buffalo farming and increase milk yields.

Keywords: Water Buffaloes, STAT5A, Polymorphism, Milk Composition

KAYNAKLAR

- AHMADIAN A., GHARIZADEH B., GUSTAFSSON A. C., STERKY F., NYREN P., UHLEN M., LUNDEBERG J. (2000). Single-Nucleotide Polymorphism Analysis by Pyrosequencing. *Analytical Biochemistry*, **280**, 103-110 (2000)
- AMBROSIO R., FIMIANI G., MONFREGOLA J., SANZARI E., FELICE N. D., SALERNO M. C., PIGNATA C., URSO M. D., URSINI M. V. (2002). The structure of human STAT5A and B genes reveals two regions of nearly identical sequence and an alternative tissue specific STAT5B promoter. *Gene*, **285**: 311-318
- ANONİM (2013). Türk Hematoloji Derneği, Genetik Terimler Sözlüğü. s: 22-48
- ARBOUZOVA N., ZEİDLER M. P. (2006). JAK/STAT signalling in Drosophila: insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development*, **133**:2605-2616
- ATASEVER S., ERDEM H. (2008). Manda Yetiştiriciliği ve Türkiye'de ki Geleceği, *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*, **23**(1): 59-64
- BELKHİR K., BORSA P., CHIKHI L., GOUDET J., BONHOMME F. (1996). GENETIX 4.00 Windows™ Software for Population Genetics, Laboratoire Genome, Populations, Intereactions, University of Montpellier, France.
- BOWMAN T., GARCÍA R., TURKSON J., JOVE R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene*, **19**: 2474 - 2488
- BROMBERG J. F., WRZESZCZYNSKA M. H., DEVGAN G., ZHAO Y., PESTELL R. G., ALBANASE C., DARNELL J. E. (1999). Stat3 as an Oncogene. *Cell*, **98**: 295 - 303
- BROWN T. A., Çeviri: BARDAKÇI F., YENİDÜNYA A. F., YILMAZ N. (2013). Gen Klonlama ve DNA Analizi: Giriş, Nobel Yayınevi, s: 261- 376
- BRYM P, KAWINSKI S., RUSE 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**(4): 445-452
- BUIÏTENHUIS M., COFFER P. J., KOENDERMAN L. (2004). Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **36**: 2120–2124
- CASANOVA J. L., HOLLAND S. M., NOTARANGELO L. D. (2012). Inborn Errors of Human JAKs and STATs. *Immunity*, **36**: 515-528

- CHAIX A., LOPEZ S., VOÏSSET E., GROS L., DUBREUÏL P., SEPULVEDA P. D. (2011). Mechanisms of STAT Protein Activation by Oncogenic KIT Mutants in Neoplastic Mast Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **286** (8): 5956-5966
- CRÍSPÍ S., SANZARÍ E., MONFREGOLA J, FELÍCE N. D., FİMİANÍ G., AMBROSÍO R., URSO M. D., URSÍNÍ M. V. (2004). Characterization of the human STAT5A and STAT5B promoters: evidence of a positive and negative mechanism of transcriptional regulation. *FEBS Letters*, **562**: 27-34
- ÇELİK, Ş. (2015), Türkiye’de Büyükbaş Hayvan Sayıları ve Nüfus Arasındaki Nedensellik İlişkisi, *Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, **5** (1): 80-93
- ÇETİNKAYA N., GENÇ B., SALMAN M. (2011). Samsun İli Manda Yetiştiriciliği, Samsun Sempozyumu.
- DARIO C., DARIO M., CIOTOLA F., PERETTI V., CARNICELLA D., SELVAGGI M. (2009). Analysis of STAT5A/AvaI Gene Polymorphism in Four Italian Cattle Breeds. *Biochem Genet.*, **47**: 671-679
- DARİO C., SELVAGGİ M. (2011). Study on the STAT5A/AvaI polymorphism in Jersey cows and association with milk production traits. *Mol Biol Rep*, **38**: 5387–5392
- DARNELL J. E., KERR I. M., STARK G. R. (1994). JAK-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins. *Science*, **264** (5164): 1415-1421
- DAVEY H. W., WİLKİNS R. J., WAXMAN D. J. (1999). HUMAN GENETICS ’99: SEXUAL DEVELOPMENT STAT5 Signaling in Sexually Dimorphic Gene Expression and Growth Patterns. *Am. J. Hum. Genet.*, **65**: 959–965
- DOĞAN A.L., GÜÇ D. (2004). Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser, *Hacettepe Tıp Dergisi*, **35**: 34-42
- DONOHUE T. S., FASANO A., SMİTH A., ZHAO A. (2010). Enteric pathogens and gut function: Role of cytokines and STATs. *Gut Microbes*, **1**(5): 316-324
- EKMEKÇİ A., KONAÇ E., ÖNEN H. İ. (2008). Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık. *Marmara Medical Journal*, **21**(3): 282-295
- FİLİZ E., KOÇ İ. (2011). Bitki Biyoteknolojisinde Moleküler Markörler. *GOÜ, Ziraat Fakültesi Dergisi*, **28**(2): 207-214
- FLISIKOWSKI K., SZYMANOWSKA M., ZWIERZCHOWSKI L. (2003). The DNA- Binding Capacity of Genetic Variants of the Bovine STAT5A Transcription Factor. *Cellular & Molecular Biology Letters*, **8**: 831 – 840

- FLISIKOWSKI K., ZWIERZCHOWSKI L. (2003). Polymerase chain reaction-heteroduplex (PCR-HD) polymorphism within the bovine STAT5A gene. *J. Appl. Genet.*, **44(2)**: 185-189
- FLISIKOWSKI K., STRZALKOWSKA N., SLONIEWSKI K., KRZYZEWKI J., ZWIERZCHOWSKI L. (2004). Association of a sequence nucleotide polymorphism in exon 16 of the *STAT5A* gene with milk production traits in Polish Black-and White (Polish Friesian) cows. *Animal Science Papers and Reports*, **22(4)**: 515-522
- FRASOR J., GIBORI G. (2003). Prolactin regulation of estrogen receptor expression. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **14(3)**: 118-123
- GOLDAMMER T., MEYER L., SEYFERT H.M., BRUNNER R.M., SCHWERIN M. (1997). *STAT5A* encoding gene maps to Chromosome 19 in cattle and goat and to Chromosome 11 in sheep. *Mammalian Genome 8, Brief Data Reports*, 705-706
- GOODENOUGH U., LEVINE R. P. (1975). *Genetics*, Published by Holt, Reinhart and Winston, pp: 761
- GRIMLEY P. M., DONG F., RUI H. (1999). Stat5a and Stat5b: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **10**: 131-157
- HARRIS L. M. H., FARRAR M. A. (2012). The role of STAT5 in lymphocyte development and transformation. *Current Opinion in Immunology*, **24**: 146-152
- HE X., CHU M. X., QIAO L., HE J. N., WANG P. Q., FENG T., DI R., CAO G. L., FANG L., AN Y. F. (2012). Polymorphisms of *STAT5A* gene and their association with milk production traits in Holstein cows. *Mol Biol Rep*, **39**:2901–2907
- HENNIGHAUSEN L., ROBINSON G.W. (2008). Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors *STAT5A* and *STAT5B*. *Genes & Development*, **22**: 711-721
- HERRINGTON J., SMIT L.S., SCHWARTZ J., SU C.C. (2000). The role of STAT proteins in growth hormone signaling. *Oncogene*, **19**: 2585- 2597
- HWA V., NADEAU K., WIT J. M., ROSENFELD R. G. (2011). *STAT5b* deficiency: Lessons from *STAT5b* gene mutations. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **25**: 61–75
- IHLE J.N. (1996). STATs: Signal Transducers and Activators of Transcription. *Cell*, **84**: 331–334
- IHLE J.N. (2001). The Stat family in cytokine signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, **13**: 211–217

- JATIANI S. S., BAKER S. J., SILVERMAN L. R., REDDY E. P. (2011). JAK/STAT Pathways in Cytokine Signaling and Myeloproliferative Disorders: Approaches for Targeted Therapies. *Genes & Cancer*, **1(10)**: 979–993
- JAVED R., GAUTAM S. K., VIJH R. K., TANTIYA M. S. (2011). Characterization of PRLR and PPARGC1A genes in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Genetics and Molecular Biology*, **34(4)**: 592-594
- JENSEN P. B., HUNTER T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*, **411**: 355 - 365
- 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.
- KAYMAZ B.T., ÇETİNTAŞ V.B., KOSOVA B. (2013). İnsan T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi Hücrelerinin Kapsaisin ile İndüklenmiş Apoptozunda Rolü Olabilecek JAK/STAT Sinyal İletim Yolağı Elemanlarının Gen Ekspresyon Profillerinin Belirlemesi. *Kafkas J Med Sci.*, **3(3)**: 129–135
- KHATİB H., MONSON R. L., SCHUTZKUS V., KOHL D. M., ROSA G. J. M., RUTLEDGE J. J. (2008). Mutations in the *STAT5A* Gene Are Associated with Embryonic Survival and Milk Composition in Cattle. *J. Dairy Sci*, **91**:784–793
- KHATİB H., MALTECCA C., MONSON R.L., SCHUTZKUS V., RUTLEDGE J. J. (2009). Monoallelic maternal expression of *STAT5A* affects embryonic survival in cattle *BMC Genetics*, **10**: 13
- KISSELEVA T., BHATTACHARYA S., BRAUNSTEİN J., SCHİNDLER C. W. (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, **285**: 1–24
- KÜÇÜKKEBABÇI M., ASLAN S. (2002). Evcil Dişi Mandaların Üreme Özellikleri, *Lalahan Hay. Arast. Enst. Derg.*, **42 (2)**: 55 - 63
- LEVY D. E., DARNELL J. E. (2002). STATs: transcriptional control and biological impact. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **3**: 651-662
- LIANG Q. C., XIONG H., ZHAO Z. W., JIA D., LI W. X., QIN H. Z., DENG J. P., GAO L., ZHANG H., GAO G. D. (2009). Inhibition of transcription factor *STAT5b* suppresses proliferation, induces G1 cell cycle arrest and reduces tumor cell invasion in human glioblastoma multiforme cells. *Cancer Letters*, **273**: 164–171

- LIAO Z., LUTZ J., NEVALAINEN M. T. (2010). Transcription factor Stat5a/b as a therapeutic target protein for prostate cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **42**: 186–192
- LIBRADO P., ROZAS J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25(11)**: 1451–1452
- LIN J.X., LEONARD W.J. (2000). The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene*, **19**: 2566- 2576
- LIU X., ROBINSON G.W., WAGNER K., GARRETT L., BORIS A.W., HENNIGHAUSEN L. (1997) ; STAT5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes & Development*, **11**:179-186
- LIU X. F., LI M., LI Q. Z., LU L. M., TONG H. L., GAO X. J. (2012). Stat5a increases lactation of dairy cow mammary gland epithelial cells cultured in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal*, **48**: 554–561
- McCRACKEN J. Y., MOLENAAR A. J., SNELL R. J., DAVEY H. W., WILKINS R. J. (1997). A polymorphic TG repeat present within the bovine STAT5A gene. *Animal Genetics*, **28**: 453- 461
- METSER G., SHIN H.Y., WANG C., YOO K.H.Y., OH S., VILLARINO A.V., OSHEA J. J., KANG K., HENNIGHAUSEN L. (2016). An autoregulatory enhancer controls mammary-specific STAT5 functions. *Nucleic Acids Research*, **44 (3)**: 1052-1063
- MICHELLIZZI V. N., DODSON M. V., PAN Z., AMARAL M. E. J., MICHAL J. J., McLEAN D. J., WOMACK J. E., JIANG Z. (2010). Water Buffalo Genome Science Comes of Age. *International Journal of Biological Sciences*, **6 (4)**: 333-349
- MORIGGL R., SEXL V., KENNER L., DUNTSCH C., STANGL K., GINGRAS S., HOFFMEYER A., BAUER A., PIEKORZ R., WANG D., BUNTING K. D., WAGNER E. F., SONNECK K., VALENT P., IHLE J. N., BEUG H. (2005). Stat5 tetramer formation is associated with leukemogenesis. *Cancer Cell*, **7**: 87-99
- NADEAU K., HWA V., ROSENFELD R. G. (2011). STAT5b Deficiency: An Unsuspected Cause of Growth Failure, Immunodeficiency, and Severe Pulmonary Disease. *The Journal of Pediatrics*, **158 (5)**: 701-708
- NANDA A.S., NAKAO T. (2003). Role of buffalo in the socioeconomic development of rural Asia: Current status and future prospectus. *Animal Science Journal*. **74**: 443–455
- NEFF M. M., TURK E., KALISHMAN M. (2002). Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. *Trends in Genetics*, **18 (12)**: 613-615

- PARAMITARASI K., SUMANTRI A., JAKARIA C. (2015). The Genetic Variability of Prolactin and Signal Transducers and Activators of Transcription 5A (STAT5A) Genes in Bali Cattle, *Media Peternakan*, **38 (1)**: 1-11
- PAUKKU K., SILVENNOINEN O. (2004). STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **15**: 435–455
- 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**: 1-29
- ROZAS J., SANCHEZ J. C., MESSEGUER X., ROZAS R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, **19(18)**: 2496–2497
- SARIOZKAN S. (2011). Türkiye’de Manda Yetiştiriciliği’nin Önemi. *Kafkas Üniv. Vet. Fakültesi Dergisi*, **17 (1)**: 163-166
- SAYDAM G. (2017). Hematolojik Malignitelere Sinyal İletim Sistemleri. Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi , Temel Moleküler Hematoloji Kursu, s: 49-60. <http://www.thd.org.tr/thdData/userfiles/file/guraysaydam.pdf> (Erişim tarihi: 28.01.2017)
- SCHINDLER C., PLUMLEE C. (2008). İnterferonlar ve the JAK-STAT pathway. *Semin Cell Dev Biol.* **19(4)**: 311–318
- SELVAGGI M., DARIO C., NORMANNO G., CELANO G. V., DARIO M. (2009). Genetic polymorphism of STAT5A protein: relationships with production traits and milk composition in Italian Brown cattle. *Journal of Dairy Research*, **76**: 1-5
- SELVAGGI M., ALBARELLA S., DARIO C., PERETTI V., CIOTOLA F. (2016). Association of STAT5A Gene Variants with Milk Production Traits in Agerolese Cattle. *Biochem Genet.*
- SİNGH U., DEB R., ALYETHODI R. R., ALEX R., KUMAR S., CHAKRABORTY S., DHAMA K., SHARMA A. (2014). Molecular markers and their applications in cattle genetic research: A review. *Biomarkers and Genomic Medicine*, **6**: 49-58
- SOCOLOVSKY M., FALLON A. E. J., WANG S., BRUGNARA C., LODISH H. F. (1999). Fetal Anemia and Apoptosis of Red Cell Progenitors in Stat5a^{-/-}, 5b^{-/-} Mice: A Direct Role for Stat5 in Bcl-XL Induction, *Cell*, **98**: 181-191
- SOYSAL M.İ., KÖK S., GÜRCAN E. K. (2005). Mandalarda Alyuvar Potasyum Polimorfizmi Üzerine Bir Araştırma, *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, **2 (2)**: 189-193

- SOYSAL M.İ. (2013). Anatolian Water Buffaloes Husbandry in Turkey. *Buffalo Bulletin*, **32 (Special Issue 1)**: 293-309
- ŞAHİN A., ULUTAŞ Z., YILDIRIM A. (2013). Türkiye ve Dünya’da Manda Yetiştiriciliği. *Gaziosmanpaşa Journal of Scientific Research*, **8**: 65-70
- ŞAHİN G. (2015). Türkiye Zirai Hayatında Manda (*Bubalus bubalis*) Yetiştiriciliği ve Manda Ürünlerinin Değerlendirilmesi, *İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Coğrafya Dergisi*, **31**: 17-38
- ŞEKERDEN Ö., ERDEM H., KANKURDAN B., ÖZLÜ B. (1999). Anadolu Mandalarında Süt Kompozisyonunu Etkileyen Faktörler ve Süt Kompozisyonunun Laktasyon Dönemlerine Göre Değişimi. *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences*, **23**: 505-509
- TEGLUND S., MCKAY C., SCHUETZ E., DEURSEN J. M., STRAVOPODİS D., WANG D., BROWN M., BODNER S., GROSVELD G., IHLE J. N. (1998). Stat5a and Stat5b Proteins Have Essential and Nonessential, or Redundant, Roles in Cytokine Responses. *Cell*, **93** : 841 - 850
- TURNER P. C., MCLENNAN A. G., BATES A. D., WHITE M. R. H., Çeviri: KONUK M. (2004). Moleküler Biyoloji, Nobel Akademik Yayıncılık, s: 90
- UTİNE C. A., UTİNE G. E. (2012). Oftalmolojide Genetik I – Temel Kavramlar. *Turkish journal of ophthalmology*, **42**: 370-377
- YU, H., JOVE R. (2004). The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer*, **4 (2)**: 97-105

ÖZGEÇMİŞ

Araştırmacı 1982 Yozgat doğumludur. İlköğrenimini Yozgat, Şefaati, İbrahimhacılı Köyü İlköğretim okulunda, orta ve lise öğrenimini Ankara'da tamamlamıştır. 1999-2003 yılları arasında Akdeniz üniversitesi Akseki Sağlık Yüksekokulu hemşirelik bölümünü dereceyle bitirmiştir. 9 yıl kadar Sağlık Bakanlığına bağlı hastanelerde ve UMKE(Ulusal Medikal Kurtarma Ekibi) de görev almış, 2013 yılı itibariyle de Dumlupınar Üniversitesi Gediz Sağlık Hizmetleri MYO'n da öğretim görevlisi olarak çalışmaya başlamıştır. İlk yüksek lisans eğitimine 2011 yılında Yalova Üniversitesi Sosyal Hizmet Anabilim dalında başlamış ve 2014 yılında bitirmiştir. İkinci yüksek lisans eğitimine 2015 yılında Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim dalında başlamış ve halen devam etmektedir.