

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI**

**SAKIZ, AKKARAMAN ve İVESİ IRKI
KOYUNLARDA PROLAKTİN RESEPTÖR (*PRLR*)
GENİ POLİMORFİZMİ**

DOKTORA TEZİ

Özge ÖZMEN

ELAZIĞ - 2010

ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Emine ÜNSALDI

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Veteriner Fakültesi Zootečni
Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Metin BAYRAKTAR

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. İbrahim ŞEKER (1.Danışman) **Prof. Dr. Okan ERTUĞRUL** (2.Danışman)

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Okan ERTUĞRUL

Prof. Dr. Metin BAYRAKTAR

Prof. Dr. Hakan BULUT

Doç. Dr. İbrahim ŞEKER

Yrd. Doç. Dr. Ercan KURAR

Selma Özmen ve Ahmet Özmen'e ithaf edilmiştir.

TEŞEKKÜR

Bana bu konuda çalışma olanağı sağlayan ve emek veren danışmanım Doç. Dr. İbrahim Şeker'e, bugünlere gelmemi sağlayan ve beni yetiştiren Prof. Dr. Okan Ertuğrul'a, yaptıkları katkılardan dolayı Prof. Dr. Metin Bayraktar'a ve Prof. Dr. Hakan Bulut'a, ayrıca projenin maddi olarak desteklenmesi sırasında sağladıkları katkılardan dolayı FÜBAP'a ve TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin sonuçlandırılmasında büyük katkıları bulunan, her konuda yardımcı olan Prof. Dr. Nurten Akarsu ve Doç. Dr. Hilal Özdağ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Sonuçların analiz edilmesinde ve tezimin yazımında çok büyük emeği olan, benden desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Emel Özkan'a teşekkür ederim.

Laboratuar çalışmalarım boyunca bana yardımcı olan, laboratuarlarını benimle paylaşan arkadaşlarım Arş. Gör. Bengi Çınar Kul ve Arş. Gör. Özgecan Korkmaz Ağaoğlu'na teşekkürlerimi sunarım.

Biyoteknoloji Enstitüsündeki laboratuar çalışmalarım sırasınca benden çok gayret ve emek sarf eden desteğini benden sakınmayan değerli arkadaşım Nilgün Tekin'e ayrıca teşekkür ederim.

Bana olan inancını yitirmeyen ve her konuda destek olan Yrd. Doç. Dr. Selim Kul'a teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca tezin her aşamasında yardımı dokunan, emeği geçen burada ismini anmadığım aileme, arkadaşlarıma, meslektaşlarıma ve hocalarıma teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren annem Selma Özmen'e ve babam Ahmet Özmen'e minnet duygularımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Genel Bilgiler	10
3.1.1. Prolaktin	10
3.1.1.1. Prolaktinin Moleküler Biyoloji ve Fonksiyonu	10
3.1.1.1.1 Prolaktin Sekresyonu, Geni ve Yapısı	10
3.1.1.1.2. Prolaktinin İzofomları	11
3.1.1.1.3. Prolaktinin Biyolojik Fonksiyonları	11
3.1.2. Prolaktin Reseptörü (PRLR)	12
3.1.2.1. Prolaktin Reseptör Yapısı	12
3.1.2.1.1. Ekstraselüler Alan (ECD)	13
3.1.2.1.2. Transmembran Alan (TMD)	14
3.1.2.1.3. İntraselüler (Sitoplazmik) Alan (ICD)	15
3.1.2.2. Prolaktin Reseptörünün Bağlanması ve Reseptör Aktivasyonu	16
3.1.2.3. <i>PRLR</i> Vücutta Dağılımı	18
3.1.3. Prolaktin Reseptör Sinyal İletim Yolu	18
3.1.3.1. JAK-STAT İletim Yolu	18
3.2. Literatür Bilgisi	23
3.3. DNA Dizi Analizi ve Kullanılan İstatistiksel Analizler	33
3.3.1. DNA Dizi Analizi	33
3.3.2. Kullanılan İstatistiksel Analizler	35
3.3.2.1. Komşu Birleştirme Ağacı Metodu	36
3.3.2.2. Kimura İki Parametre Uzaklık Metodu	37
3.3.2.3. Uyumsuzluk Dağılımı	39
3.3.2.4. Nötralite Testleri	46
3.3.2.4.1. Fu and Li's D Testi	47
3.3.2.4.2. Fu and Li's F Testi	47
3.3.2.4.3. Tajima's D Testi	48
3.3.2.4.4. Fu's Fs Testi	48
3.3.2.5. Nükleotid Farklılığı	48
3.3.2.6. Moleküler Varyans Analizi	49

3.3.2.7. F İstatistikleri	51
3.3.2.8. SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant).....	52
3.4. Araştırmanın Önemi ve Amacı	52
4. GEREÇ ve YÖNTEM	56
4.1. Gereç	56
4.2. Yöntem	57
4.2.1. DNA Örnekleri ve DNA İzolasyonu	57
4.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	59
4.2.3. Agaroz Jel Elektforezi ve Bantların Gözlenmesi	61
4.2.4. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizm Analizi	62
4.2.5. PCR Ürününün Pürifikasyonu	65
4.2.6. Zincir Sonlanma Reaksiyonu	66
4.2.7. Etanol Presipitasyonu	67
4.2.8. DNA Dizi Analizi	68
4.2.9. DNA Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	70
4.3. İstatistiksel Analizler	72
4.3.1. Komşu Birleştirme Ağacı Metodu	72
4.3.2. Uyumsuzluk Dağılımı	72
4.3.3. Nötralite Testleri	72
4.3.4. Nükleotid Farklılığı	72
4.3.5. Moleküler Varyans Analizi ve F İstatistikleri	72
4.3.6. SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant).....	72
5. BULGULAR	73
5.1. DNA İzolasyonu ve PCR	73
5.2. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi Analizi	77
5.3. DNA Dizi Analizi	77
5.4. Komşu Birleştirme Ağacı ve Network Analizi	85
5.5. Uyumsuzluk Dağılımı	91
5.6. Nötralite Testleri	97
5.7. Moleküler Varyans Analizi ve F İstatistikleri	98
5.8. SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant).....	100
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	101
6.1. DNA İzolasyonu ve PCR	101
6.2. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi	101
6.3. DNA Dizi Analizi	102
6.4. Komşu Birleştirme Ağacı ve Network Analizi	107
6.5. Uyumsuzluk Dağılımı	108

6.6. Nötralite Testleri	108
6.7. Moleküler Varyans Analizi ve F İstatistikleri	110
6.8. SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant).....	111
7. KAYNAKLAR	113
8. ÖZ GEÇMİŞ	120

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Kimura ve Jukes-Cantor nükleotid substitüsyon modelleri	38
Tablo 2. Sakız, Akkaraman ve İvesi ırkı koyunlara ait kan örneklerinin alındığı iller ve örnek sayıları	57
Tablo 3. Kandan izole edilen DNA örneklerine uygulanan PCR için reaksiyon koşulları	60
Tablo 4. Primer 1, primer 2 ve primer 3 için kullanılan PCR bileşenleri	60
Tablo 5. Kullanılan primer A için PCR bileşenleri	61
Tablo 6. PCR analizi için kullanılan koyun <i>PRLR</i> geni primerleri	61
Tablo 7. Uygulanan gümüş boyama yönteminde kullanılan çözeltiler	63
Tablo 8. Zincir sonlanma reaksiyonu için kullanılan bileşenler	66
Tablo 9. Kullanılan primer A ve primer 3 için sekans PCR koşulları	67
Tablo 10. Sakız, Akkaraman ve İvesi ırklarında primer A için elde edilen haplotip sayıları ve buna yol açan mutasyon noktaları	79
Tablo 11. <i>PRLR</i> primer A için gözlenen haplotipler	80
Tablo 12. Primer A için Sakız, Akkaraman ve İvesi ırklarında gözlenen haplotip dağılımı ve nispi haplotip frekansları	81
Tablo 13. Sakız, Akkaraman ve İvesi ırklarına ait primer 3 için elde edilen haplotipler	82
Tablo 14. <i>PRLR</i> primer 3 için gözlenen haplotipler ve amino asit değişiklikleri	83
Tablo 15. Primer 3 için Sakız, Akkaraman ve İvesi ırklarında gözlenen haplotip dağılımı ve nispi haplotip frekansları	84
Tablo 16. Primer A ve primer 3 için haplotip ve grup dağılımları ile haplotipleri gösteren örnekler	92
Tablo 17. Primer A ve primer 3 için grup A ve grup B'ye uygulanan nötralite test sonuçları ve farklılık değerleri	97
Tablo 18. Primer A için, ırkların ikili karşılaştırılması sonucunda hesaplanan F_{ST} değerleri ve önemlilik düzeyleri	99
Tablo 19. Primer 3 için ırkların ikili karşılaştırılması sonucunda hesaplanan F_{ST} değerleri ve önemlilik düzeyleri	99
Tablo 20. <i>PRLR</i> geni primer 3'e ait amino asit substitüsyonları için fenotip etkilenme tahminleri.....	100

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. <i>PRLR</i> soluble (insan) ve membran (rat) izoformlarının şematik gösterimi	14
Şekil 2. Uzun <i>PRLR</i> sitoplazmik alanının yapı-fonksiyon ilişkisi	15
Şekil 3. Prolaktin Reseptör (<i>PRLR</i>) aktivasyonu	17
Şekil 4. JAK/STAT yolunun aktivasyonu	21
Şekil 5. Prolaktin Reseptör geni sinyal iletim yolunun şematik gösterimi	22
Şekil 6. Koyun 16. kromozom sitogenetik ve radiation hybrid haritası ve <i>PRLR</i> geninin lokalizasyonu	24
Şekil 7. İnsan <i>PRLR</i> geninin ekzon yapısı	25
Şekil 8. Koyun <i>PRLR</i> geni ekzon 10 bölgesinin amino asit dizisi	25
Şekil 9. 39 bp insersiyon bölgesini içeren s- <i>PRLR</i> ve l- <i>PRLR</i> cDNA'nın şematik gösterimi ve alternatif splay's bölgesinin s- ve l- <i>PRLR</i> oluşturması	27
Şekil 10. 5' ekzon bölgesinden 39 bp insersiyon ayrımını gösteren koyun, keçi ve sığıra ait intron 1 bölgesinin sekans hizalanması	29
Şekil 11. Uyumsuzluk grafiğinin çizimi	40
Şekil 12. Farklı zamanlarda genişleme yaşanan populasyonların uyumsuzluk dağılımları.	40
Şekil 13. Uyumsuzluk dağılımında ani demografik büyüme modeli	41
Şekil 14. Beraberinde götürme	44
Şekil 15. Seçici Süpürme	45
Şekil 16. AMOVA analizi için oluşturulan gruplar	51
Şekil 17. Kanların alındığı koyun ırkları ve koyunların yetiştirildikleri iller	56
Şekil 18. Elde edilen stok DNA'ların % 1'lik agaroz jel görüntüsü	74
Şekil 19. PCR için dilüe edilen DNA'ların % 1'lik agaroz jel görüntüsü	74
Şekil 20. PCR sonunda elde edilen primer 1'e ait 215 bp'lik bölgenin % 2'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü	75
Şekil 21. PCR sonunda elde edilen primer 2' ye ait 176 bp'lik bölgenin % 2'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü	75
Şekil 22. PCR sonunda elde edilen primer 3' e ait 267 bp' lik bölgenin % 2' lik agaroz jel elektroforez görüntüsü	76
Şekil 23. PCR sonunda elde edilen primer A' ya ait 391 bp'lik bölgenin % 2' lik agaroz jel elektroforez görüntüsü	76

Şekil 24. Primer 3 için Sakız ırkına ait örneklerin SSCP sonucu elde edilen jel fotoğrafı	77
Şekil 25. Uygulanan DNA dizi analizi çalışmalarına ait elektroferogram örneği	78
Şekil 26. Primer A için Sakız, Akkaraman ve İvesi ırklarında gözlenen haplotip dağılımları	81
Şekil 27. Primer 3 için Sakız, Akkaraman ve İvesi ırklarının haplotip dağılımları	84
Şekil 28. Akkaraman, İvesi ve Sakız ırklarının referans sekansla birlikte primer A için çizilen bootstrap konsensus komşu birleştirme ağacı	86
Şekil 29. Akkaraman, İvesi ve Sakız ırklarının referans sekansla birlikte primer 3 için çizilen bootstrap konsensus komşu birleştirme ağacı	87
Şekil 30. Primer A bölgesinin haplotip yapılarının network analiz sonuçlarına ait grafik	89
Şekil 31. Primer 3 haplotip yapılarının network analiz sonuçlarına ait grafik	90
Şekil 32. Primer A için elde edilen komşu birleştirme ağacı (radiation stili) ve gözlenen gruplar	93
Şekil 33. Primer 3 için elde edilen komşu birleştirme ağacı (radiation stili) ve gözlenen gruplar	94
Şekil 34. Hem sabit (I) hem de populasyon genişlemesini ifade eden (II) primer A için grupların (Grup A ve Grup B) gözlenen ve beklenen uyumsuzluk dağılım grafikleri ...	95
Şekil 35. Hem sabit (I) hem de populasyon genişlemesini ifade (II) eden primer 3 için grupların (Grup A ve Grup B) gözlenen ve beklenen uyumsuzluk dağılım grafikleri ...	96

1. ÖZET

Bu çalışma, Türkiye yerli koyun ırklarından Sakız, Akkaraman ve İvesi'lerde prolaktin reseptör (*PRLR*) geninin polimorfizmlerinin incelenmesi amacıyla yapılmıştır. Araştırmada, her ırktan 50 baş olmak üzere toplam 150 baş koyundan alınan kan örnekleri kullanılmıştır. Kan örnekleri fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi ile DNA izolasyonunu takiben, örneklerle dört primer çifti kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR: Polymerase Chain Reaction) gerçekleştirilmiştir. Sonrasında, DNA dizi analizi primer A (intron 1) için 100, primer 3 (ekzon 10) için ise 100 örnek olmak üzere toplam 200 örneğe uygulanmıştır. Primer A için örneklerin tamamında 6 farklı haplotip belirlenmiş olup, Akkaraman ırkı için en fazla haplotip 2 gözlenirken, İvesi ırkı için en fazla haplotip 4 belirlenmiştir. Sakız ırkı için ise en fazla gözlenen haplotip 6 olmuştur. Primer 3 için ise referans dizi hariç 7 farklı haplotip tespit edilmiştir. Bu haplotiplerden; Sakız ırkı için en çok haplotip 5, Akkaraman ve İvesi Irkları için en çok haplotip 3 bulunmuştur. Akkaraman ve İvesi ırkında ise haplotip 4-8 saptanmamıştır. Primer 3 için tespit edilen varyasyonlar; A14T *Gln* --> *Leu*; G160A *Asp* --> *Asn*; G166A *Glu*-->*Lys*; A167T *Glu*-->*Val*; A176T *His*--> *Leu*; G206A *Ser* --> *Asn* ; G208A *Gly*-->*Arg*; amino asit değişimine yol açarken; A2T, A81G, A138G, C186T, T207C ise herhangi bir amino asit değişimi yapmamıştır.

Sonuç olarak, bu araştırmada Sakız, Akkaraman ve İvesi ırkı koyunlarda *PRLR* geninin primer A ve primer 3 için hem ırklar arası hem de ırk içinde polimorfik olduğu ortaya konulmuştur. Özellikle tespit edilen haplotipler bakımından hem primer A hem de primer 3 için Akkaraman ve İvesi ırkının

birbirlerine benzediği, Sakız ırkının ise daha farklı bir varyasyona sahip olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Koyun, *PRLR*, Prolaktin reseptör geni, polimorfizm

2. ABSTRACT

Prolactin Receptor (*PRLR*) Gene Polymorphism in Chios, Akkaraman and Awassi Sheep Breeds

The objective of the present study was to determine the polymorphism in prolactin receptor (*PRLR*) gene in Chios, Akkaraman and Awassi which are native sheep breeds in Turkey. Fifty blood samples for each of Chios, Akkaraman, and Awassi ewes, with a total of 150 samples were used. Following the DNA isolation by phenol-chloroform extraction method *PRLR* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) by using four primer pair. Then, a total of 200 amplicons (100 for primer A (intron 1) and 100 for primer 3 (exon 10)) were subjected to DNA sequence analysis. For primer A, 6 different haplotypes were determined. The most common haplotypes were haplotype 2 for Akkaraman, and haplotype 4 for Awassi. The most common haplotype determined in Chios breed was haplotype 6. For Primer 3, 7 different haplotypes (except for reference haplotype) were obtained. The most common haplotype was haplotype 5 for Chios breed and haplotype 3 for Akkaraman and Awassi. Haplotype 4-8 were not detected in either Akkaraman and Awassi breeds. Variations determined for primer 3 which were A14T *Gln* --> *Leu*; G160A *Asp* --> *Asn*; G166A *Glu*-->*Lys*; A167T *Glu*-->*Val*; A176T *His*--> *Leu*; G206A *Ser* --> *Asn* ; G208A *Gly*-->*Arg* led to changes in amino acids, but no changes for amino acid in A2T, A81G, A138G, C186T, T207C was determined.

As a result, both inbred and interbreed variations for *PRLR* gene polymorphisms were found in Chios, Akkaraman, and Awassi ewes as detected by primer A and primer 3. It was particularly noted that Akkaraman and Awassi

were similar to each other in terms of both primer A and primer 3 haplotypes whereas Chios breed had a different variation.

Keywords: Ewe, *PRLR*, Prolactin receptor gene, polymorphism

3. GİRİŞ

Birçok ülkede olduğu gibi Türkiye’de de koyun yetiştiriciliği önemli bir ekonomik faaliyettir. Türkiye, 24.504.000 baş yerli, 971.000 baş Merinos ırkı olmak üzere toplam 25.475.000 baş koyun varlığı ile Dünya sıralamasında sekizincidir. Ayrıca, yıllık 782.587 ton süt üretimi ile Türkiye’deki toplam süt üretiminin % 6.35’ini koyun sütü oluşturmaktadır. Bunun yanında, koyun yetiştiriciliği yıllık kesilen 6.456.552 baş koyundan elde edilen 118.075 ton koyun eti, yaklaşık altıbuçuk milyon adet deri ve 46.774 ton yapağı üretimi ile önemli bir yere sahiptir (4).

Türkiye’de koyunculuk daha çok ekstansif özellik göstermekte ve koyun popülasyonunun yaklaşık % 96’sını verimleri düşük yerli koyunlar, % 4’ünü merinos ve melezleri oluşturmaktadır (4). Verimleri düşük yerli koyun ırklarının verimlerinin artırılması ancak hayvanların genetik yapılarının ve verimlerini etkileyen çevre faktörlerinin iyileştirilmesiyle mümkün olabilmektedir. Bu nedenle çiftlik hayvanlarında ekonomik değeri olan verim özelliklerinde başarılı ıslah çalışmalarının yapılabilmesi için bu hayvanların genetik yapılarının iyi bilinmesi gerekmektedir (15). Hayvanların genetik yapılarının iyileştirilmesi için yapılacak olan ıslah çalışmalarında başarı damızlığı istenilen sayıda hayvan ayrılabilmesine ve damızlığı ayrılan hayvanlar arasında istenilen verim yönündeki üstün nitelikli hayvanların oranının arttırılmasına bağlıdır. Bu durum, o sürüde ya da popülasyondaki hayvanların döl veriminin yüksek olmasıyla ve bir doğuma düşen yavru sayısının fazla olmasıyla sağlanabilmektedir. Döl veriminin yüksek olması ayrıca besiye alınacak kuzu sayısını artırdığı gibi seleksiyonda çok önemli bir yeri

olan seleksiyon yoğunluğunun da artırılmasına imkân verebilmektedir. Böylece yüksek düzeyde döl verimi seleksiyona tabi tutulan özelliklere ait genetik ilerlemenin daha yüksek düzeyde gerçekleşmesine katkıda bulunmaktadır (1).

Çiftlik hayvanlarında ekonomik özellikli verimler küçük etkili çok sayıda gen tarafından belirlenmektedir. Bu verimler kantitatif bir özellik taşımaktadır. Döl verimi için de bu durum aynen geçerlidir. Ancak döl veriminin fenotipik dağılımı kalitatif özelliklere benzer ve kesiklidir (68). Eşikli karakterler olarak da ifade edilen buna benzer özellikler, çevre faktörlerinden çok daha yüksek düzeyde etkilenmektedirler. Bu yüzden damızlık seçiminde duyarlılık oldukça düşük olmaktadır. Bunun sonucunda genetik ilerleme yavaş gerçekleşmektedir. Bu olumsuzlukla birlikte, döl verimini kapsayan seleksiyon uygulamalarında bu özellik çoğunlukla diğer verimlerle birlikte ele alınarak yıllık yaklaşık % 1-2'lik genetik ilerleme söz konusu olabilmektedir (13).

Genetik iyileştirmenin sağlanabilmesinin temel dayanağı genetik varyasyondur. Populasyonların verim kabiliyetlerinin istenilen yönde geliştirilebilmesine ilişkin ayrıntılar seçilecek yöntemlere ışık tutmaktadır. Bu konuda başlıca; (a) Irklar arası genetik varyasyonu kullanmak, (b) Irklar içi genetik varyasyonu kullanmak, (c) Major genlerden yararlanmak, şeklinde farklı yaklaşımlardan söz etmek mümkündür (42). Yukarıda ifade edilen üç yaklaşımdan ilk ikisi dünyada çok uzun yıllardır hayvan yetiştiriciliği ve ıslahında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.

Evcil hayvanların verim özellikleri poligenik olmakla birlikte kimi major gen etkilerinin de (poligenler + major gen) söz konusu olduğuna ilişkin bilgiler ilgi çekici boyutlara ulaşmıştır (41,42). Hayvan yetiştiriciliğinde verim özellikleri için "major genler" olarak isimlendirilen büyük etkili genlerin tespiti ve seleksiyon uygulamalarında kullanımıyla genetik ilerleme oranının artırılması mümkün

olabilmektedir. Bu bağlamda büyük bir potansiyelin varlığından söz etmek mümkündür.

Major genler, bir çift alel tarafından determine edilmekte ve basit Mendel kalıtım özellikleri göstermektedir (17). Major genler, diğer genetik iyileştirme yöntemlerine nazaran daha bilinçli bir şekilde ve daha kolay ve hızlı bir genetik ilerleme sağlanmasına imkan tanımaktadır. Özellikle çiftlik hayvanlarında ticari karakterler üzerinde büyük etkiye sahip birkaç major gen belirlenmiştir. Bunlara koyunda ovulasyon oranını etkileyen *Booroola* (*FecB*), et verimini etkileyen *callipyge*, sığırdaki et verimini etkileyen *double muscling* ve süt verimini etkileyen *weaver* genleri, tavuklarda ısıya toleransı etkileyen çıplak boyun ve vücut büyüklüğünü etkileyen cücelik genleri, keçide süt akış oranını etkileyen gen ve domuzdaki et üretimi kalitesini etkileyen *halothane sensitivity* ve et kalitesini etkileyen *RN* (*Rendement Napole*) genleri belli başlı örnekler olarak verilebilir (18).

Koyunlarda major genlere ilişkin çalışmalarda ağırlığı döl verimine ilişkin genler oluşturmaktadır. Döl verimine ilişkin major genlerin belirlenmesi ve genotip ayrımları kızgınlıktan sonraki yedinci günde ovaryumlardaki korpus luteumların laparoskopi vasıtasıyla sayılması sonucu yapılmaktadır. Bu genler etkilerini her bir kızgınlık döngüsünde ovulasyon oranını ve buna bağlı olarak doğumdaki yavru sayısını artırarak göstermektedirler (18).

Major genlerin ovulasyon oranı üzerine etkilerini, folliküler gelişim mekanizmaları sırasında gösterdiği düşünülse de bu etki mekanizmaları tam olarak açıklanamamıştır (49). Follikülün olgunlaşması ile granuloza hücreleri tarafından LH (Luteinizan Hormon) ve Prolaktin için plazma membran reseptörlerine gereksinim duyulmaktadır (2). Ancak, burada sorulması gereken temel sorular

şunlardır: Ovaryumlardaki folliküllerin çıkışını kontrol eden sinyaller hangileridir? Ovulatör folliküller nasıl seçilir? Folliküler dominanslık nasıl sağlanır? Genetik çalışmalar bu soruları hedef almıştır ve bu anlamda en yoğun olarak incelenen döl verimi geni *BMPR-IB* olmuştur (18,49).

Booroola (BMPR-IB) geninin tanımlanmasından sonra diğer ırklarda da çoklu doğuma neden olan genlerin araştırılması hız kazanmış ve *Booroola* dışında döl verimi üzerinde büyük etkiye sahip major genler bazı koyun ırklarında da saptanmıştır (23,57). Bu ırklar ve alellerin isimleri şu şekildedir, Merinos, Garole ve Javanese ırkında *BMPR-IB* geni (6.kromozom), *FecB^B* aleli, Romney ırkında *BMP-15* geni, *FecX^I* aleli ve *FecX^H* aleli, Belclare ırkında *BMP-15* geni (X kromozomu), *FecX^B* aleli, Cambridge ve Belclare ırkında *BMP-15* geni, *FecX^G* aleli ve yüksek fertilitite (*GDF9*) geni (5. kromozom), *FecG^H* aleli, Coopworth ırkında *FecX2^W* aleli, Lacaune ırkında *FecL^L* aleli (11. kromozom), Icelandic ırkında *FecI^I* aleli, olarak sıralanabilir (57).

Bunlara ilaveten Cambridge ve Belclare ırkında heterozigotlarda ovulasyon oranını artıran ve homozigotlarda infertiliteye yol açan *GDF9* (Growth Differentiation Factor 9) geni (X kromozomunda) bulunmuştur (35).

Koyun yetiştiriciliğinde döl verimi performansı ve özellikle bir batında doğan kuzu sayısı verimlilik açısından çok büyük bir öneme sahiptir. Ancak, koyunlarda bir batında doğan kuzu sayısının kalıtım derecesinin düşük (0.00-0.40), bu özelliğin yalnızca tek cinsiyette ifade ediliyor olması ve bu özelliğin değerinin hayvanın cinsel olgunluk yaşına ulaşmasına kadar tespit edilemiyor olması seleksiyon uygulamalarında büyük zorluklar oluşturmaktadır (1,44).

Yaklaşık son 30 yıllık süreçte moleküler biyolojinin gelişimi, çiftlik hayvanlarının seleksiyonu ve genetik ilerlemesi için umut verici yeni yaklaşımlar

getirmiştir. Farklı genotiplere ait DNA'daki polimorfizmi ortaya koyan DNA markerleri; bireysel tanımlama, ebeveyn tayini ve genetik hastalıkların kontrolünde yaygın bir uygulama alanı bulmuştur. DNA markerlerinin asıl kullanım alanları kalıtım derecesi düşük, ölçülmesi zor ya da pahalı, tek cinsiyette gözlenebilen, ileri yaşlarda ya da kesim sonrası ölçülebilen özellikleri kapsayan Marker Destekli Seleksiyon (Marker Assisted Selection, MAS) uygulamaları için söz konusu olabilmektedir (44,45,48). Moleküler tekniklerin kullanılmasıyla birlikte yetiştiricilikte kullanılmakta olan klasik ıslah metotlarının yukarıda ifade edilen bazı sınırlamalarının önüne geçilebileceği umut edilmektedir (47).

Koyun popülasyonlarında 1980 yılından itibaren yapılan çalışmalar, genom analizleri üzerine yoğunlaşmış, major genlerin kalıtım özellikleri incelenmiş ve bu gibi çalışmalar sonucunda major genlerin döl verimi performansını önemli ölçüde artırma potansiyelinin olduğu bildirilmiştir (57).

Çiftlik hayvanlarında gen düzeyinde döl verimini artırmaya ve çoklu doğum özelliği ile ilişkili olabilecek genleri incelemeye yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Bu amaçla, özellikle domuzlarda yoğunlaşan çalışmalara son yıllarda diğer çiftlik hayvanları da eklenmiştir. Bunlardan öncelikli olarak koyunlarda *Booroola (FecB)* genotipinin çoklu doğumla ilişkilerini inceleyen çalışmalar öne çıkmıştır. Çoklu doğum özelliği, döl verimi ve diğer verim özellikleri ile henüz bazıları aday gen (döl verimine etkisinin varlığı henüz kesinleşmemiş) düzeyinde bazıları ise etkisi daha açık olarak ortaya konulmuş olan birçok geni kapsayan bilimsel araştırmalar bütün hızıyla sürdürülmektedir. Bu kapsamda araştırma konusu olan genler başlıca; *BMPR-IB (Booroola, FecB)*, *BMP-15 (Inverdale, Hana genotipleri)*, *GDF-9 (Growth Differentiation Factor-9)*, *ESR-1 (Estrogen Receptor-1)*, *ESR-2 (Estrogen*

Receptor-2), *INHBA* (*Inhibin Beta A*), *FSH-β* (*Follicle-Stimulating Hormone*), *MTNRIA* (*Melatonin*) ve *PRLR* (*Prolaktin Reseptör*) genleridir.

3.1. Genel Bilgiler

3.1.1. Prolaktin (*PRL*)

Prolaktin birçok farklı endokrin aktiviteyi kapsayan ön hipofiz bezi peptid hormonudur ve reproduktif performans için gereklidir. Bu faaliyetini reseptörleri aracılığıyla yapar (12).

3.1.1.1. Prolaktinin Moleküler Biyolojisi ve Fonksiyonu

3.1.1.1.1. Prolaktin Sekresyonu, Geni ve Yapısı

Prolaktin, en çok ön hipofiz bezinin laktotrofik hücreleri vasıtasıyla salgılanır ve sentezlenir. Ön hipofiz bezine ilaveten, *PRL* geninin beyinin çeşitli bölgeleri, ovaryum, plasenta, uterus, desidua, miyometriyum, gözyaşı bezleri, timus, dalak, lenfositler ve kemik iliğinin lenfoid hücreleri, meme epitel hücreleri ve tümörler, deri fibroblastları ve ter bezlerindeki ifadesi doğrulanmıştır. Bu sayede *PRL*, seruma ilaveten serebrospinal sıvı, amniyotik sıvı, gözyaşı, süt, foliküler sıvı ve ter gibi çeşitli sıvı kısımlarında ifade edilebilir. Prolaktinin memelilerde doğum sonrası laktasyonun başlaması ve sürdürülmesinden başlıca sorumlu hormon olmasının yanı sıra, 300'den fazla biyolojik aktivitesi bulunmaktadır. Prolaktin reseptörü, *PRLR* geni tarafından kodlanır, aynı sekans bölgelerini içeren büyüme hormonu/prolaktin reseptör gen ailesinin üyesidir (12,16,32,72). İlk olarak, *PRL* 1969 yılında tanımlanmış ve koyun *PRL* geninin amino asit dizisi belirlenmiştir. 1970 yılından sonra yaşanan hızlı gelişmeler ve klonlama teknolojisi ile birçok türün *PRL* cDNA'sının nükleotid dizisi belirlenmiştir (12, 40).

3.1.1.1.2. Prolaktin İzofomları

23 kDa'luk *PRL*, ön hipofiz bezinde bulunan en büyük protein olmasına rağmen, birçok memelide varyantları saptanmıştır. Transkripsiyondan sonra, *PRL* geninin öncül mRNA'ları alternatif splays (seçici kesilme) oluşumuna katılabilirler ve farklı büyüklüklerde proteinler ve DNA dizisi üretebilirler (40). Alternatif splays mekanizmasını destekleyici bir kanıt olarak ön hipofiz bezinde 137 amino asitlik (aa) prolaktin varyantı saptanmıştır. Ancak alternatif splays mekanizması prolaktin varyantlarının temel kaynağı değildir (28). Alternatif splays'a ilaveten proteolitik ayrılma da *PRL* varyantlarının oluşumuna yol açabilir ve 14, 16 ve 22 kDa'luk *PRL* formları oluşabilir. Dahası, amino asit zincirindeki post-translasyonel modifikasyonlar birçok izofomların oluşmasına yol açabilir ki bunlar polimerizasyon, fosforilasyon, glikosilasyon, sülfasyon ve deamidasyonu içerir. Bu bantların moleküler ağırlığı 24 ve 27 kDa arasında bulunmuştur. Bunlar sırasıyla non-glikozile ve glikozile *PRL* izofomlarına karşılık gelmektedir. Bu farklı izofom oranları embriyonun gelişim aşaması ve yetişkinlerin fizyolojik durumlarıyla değişiklik göstermiştir ve total *PLR* seviyesi ile ilişkilidir (40,66).

3.1.1.1.3. Prolaktinin Biyolojik Fonksiyonları

Prolaktin öncelikle, tavşanda meme bezlerinin gelişimini ve laktasyonu stimüle etme aktivitesiyle dikkat çekmiştir. Daha sonra çeşitli omurgalılarda birtakım ilave aktiviteler bu hormonun etkisine bağlanmıştır. Bazı araştırmacılar bu biyolojik fonksiyonları; su ve elektrolit dengesi, büyüme ve gelişme, endokrinoloji ve metabolizma, beyin ve davranış, üreme, immonoregülasyon ve koruma olarak kategorize etmişlerdir (21,28).

Prolaktin ayrıca, meme epiteli, pankreatik beta hücreleri, adipositler ve T-lenfositleri gibi farklı hücre tiplerinin proliferasyonunu düzenler (40).

3.1.2. Prolaktin Reseptörü (*PRLR*)

3.1.2.1. Prolaktin Reseptör Yapısı

Prolaktin reseptörü, tek membran-bağlayıcı proteindir ve sınıf 1 sitokin reseptör üst ailesi üyesidir. Prolaktin ve büyüme hormonu reseptörleri çok az homoloji (% 30) göstermelerine karşın, birçok ortak yapısal ve fonksiyonel özellik sergilerler.

Ratlarda, üç *PRLR* izoformu saptanmıştır. Bunlar; kısa (291 aa), orta (393 aa) ve uzun (591 aa) formlardır. Farede bir uzun ve üç kısa izoform saptanmıştır, kısa form sadece sitoplazmik ucun C-ucunda az sayıda amino asit farklılığı göstermektedir.

Çoğu türde, *PRLR*’nin birçok izoformu saptanmıştır.

Reseptörün ;

- Uzun (long-*PRLR*, *l-PRLR*, 85-90 kDa),
- Orta
- Kısa (short-*PRLR*, *s-PRLR*) formları, alternatif sprints’den

kaynaklanmaktadır.

Prolaktin reseptör geninin transkripsiyonel regülasyonu üç farklı organ-spesifik promotor bölgesi tarafından düzenlenmektedir. Promotor I, gonadlar için spesifiktir, Promotor II, karaciğer için ve Promotor III ise geneldir yani hem gonadlar hem de nongonadal dokularda mevcuttur. Farklı dokularda çok sayıda *PRLR* izoformları tanımlanmıştır. Bu izoformlar, farklı *PRLR* promotorlarının

alternatif başlangıç alanlarında transkripsiyonun başlangıcından, kodlanan ve kodlanmayan ekzon transkriptlerinin alternatif splaylarından sorumludur. Bu izoformlar yapı ve uzunlukları bakımından değişiklik göstermelerine karşın sitoplazmik alanları ve ekstraselüler alanları aynıdır (28).

PRLR, 3 alandan ibarettir;

- Ekstraselüler alan (ECD- extracellular domain),
- Transmembran alan (TMD- transmembrane domain)
- İntraselüler alan (ICD- intracellular domain) (11).

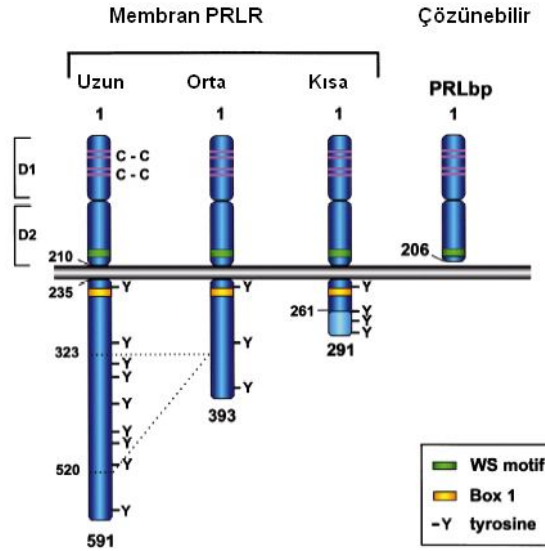
Ayrıca, ekstraselüler alanda (ECD) çözülebilir form da tanımlanmıştır. Membran-bağlayıcı *PRLR* ilaveten bu çözülebilir izoformun (*PRL* bağlayıcı protein ya da *PRLbp*) mRNA'nın alternatif splayları sonucu mu meydana geldiği yoksa membran bağlayıcı *PRLR*'nin proteolitik olayları sonucunda mı meydana geldiği bilinmemektedir. Ancak her durumda, izoform yapısı ne olursa olsun, ekstraselüler bağlanma alanı aynıdır (28).

3.1.2.1.1. Ekstraselüler Alan (ECD)

Sitokin reseptörleri arasındaki sekans benzerliklerinin çoğu ekstraselüler alanları içinde bulunur. Genellikle bu alan yaklaşık 200 aa'lık bir alandan oluşur ve sitokin reseptör homoloji (CRH) bölgesi olarak gösterilir. Bu CRH bölgeleri yaklaşık 100 aa'lık iki alt alana ayrılabilir. Bu alanlar D1 ve D2 olarak isimlendirilir ve herbiri fibronektin tip III (glikoprotein) modülünde benzerlikler gösterir (12).

Bazı sitokin reseptörleri ilave bilgiler içermesine rağmen, ligand interaksiyonlarını öncelikli olarak korunmuş fibronektin benzeri bilgi alanları vasıtasıyla sürdürüyor görünmektedir. Ratlarda ve insanlarda, izofom yapısı (Şekil

1) ne olursa olsun *PRLR* ekstraselüler alanı 210 amino asitlik terminal rezidüyü ihtiva etmektedir (12).



Şekil 1. *PRLR* soluble (insan) ve membran (rat) izoformlarının şematik gösterimi (12)

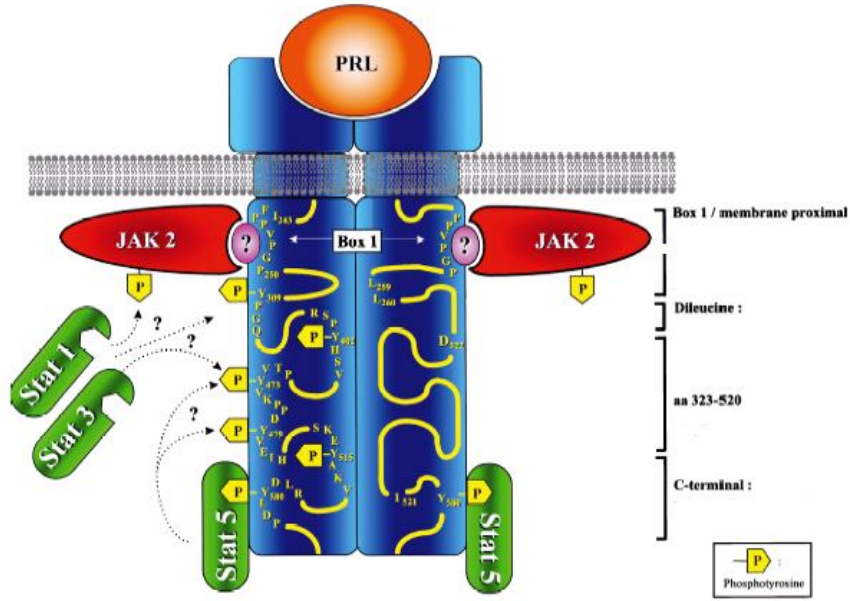
Ekstraselüler alan sitokin reseptöründe iki yapı bulunmaktadır (Şekil 1). İlki N'-ucunda, alt-alan D1 de iki çift disülfid-bağlı sisteinler (Cys51-Cys62; hPRLR); ikincisi C'-ucunda, alt-alan D2'nin proksimal-membran bölgesinde bulunan "WS motif" olarak adlandırılan (Trp-Ser-herhangi bir aa-Trp-Ser) pentapeptid'dir. Bunların *PRLR*'ne bağlanma ve *PRL* vasıtasıyla aktivasyonun gerçekleşmesinde fonksiyonları vardır (12).

3.1.2.1.2. Transmembran Alan (TMD)

Bütün sitokin reseptörleri gibi, *PRLR* de tek-geçiş transmembran zincirine sahiptir. Transmembran alan 24 aa uzunluğundadır (rat *PRLR*'de 211-234 aa). Reseptörün fonksiyonel aktivitesinde bu bölgenin bağlantısı bilinmemektedir (12).

3.1.2.1.3. İntraselüler (Sitoplazmik) Alan (ICD)

Sitokin reseptörünün, sitoplazmik alanı ekstraselüler alana göre çok daha sınırlı sekans homolojisi göstermektedir. Bu bölgede Box1 ve Box2 olarak adlandırılan nispeten korunmuş 2 bölge bulunur. Box1 prolinden oldukça zengin 8 aa'den oluşmuş proksimal membran bölgesidir ve hidrofobik yapı gösterir (Şekil 1, Şekil 2) (12).



Şekil 2. Uzun *PRLR* sitoplazmik alanının yapı-fonksiyon ilişkisi (12)

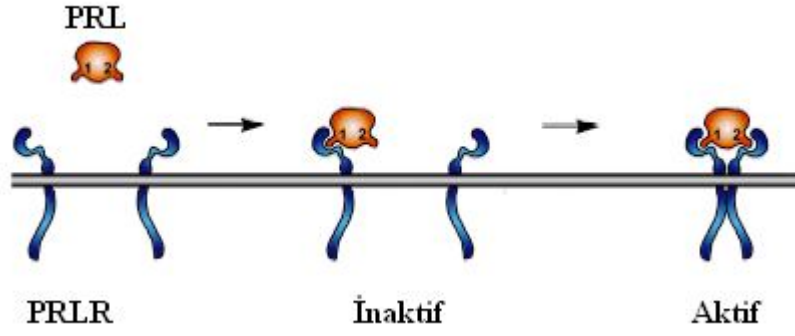
Box1 alanı içinde prolin rezidülerinin belirli yapısal özelliklerinden dolayı korunan P-x-P (x: her hangi bir aa) motifinin, transfer edilen molekülleri bağlayan belirli alanları içerdiği varsayılmaktadır. Varsayılan ikinci bölge Box2'dir. Bu bölge Box1'e göre çok daha az korunmuş bir bölgedir ve sırasıyla hidrofobik, negatif yüklü (polar/asidik), daha sonra pozitif yüklü (polar/bazik) alanlardan ibarettir (288-298 aa) (12).

Box1 bütün *PRLR* membran izoformlarında korunurken, Box 2 kısa izoform yapısında bulunmaz. Yapılan son çalışmalar, kısa *PRLR*'nin sitoplazmik alan reseptör internalizasyonu, yani hücrenin reseptörü içine alması için iki motifin gerekli olduğunu göstermiştir. Bunlardan ilki dileucine motifidir (259-260 aa), ikincisi tetrapeptid'dir (276-279 aa). İlginç bir şekilde uzun *PRLR* izoformu, kısa olana göre daha az internalizasyon etkinliğine sahiptir (12).

3.1.2.2. Prolaktin Reseptörünün Bağlanması ve Reseptör Aktivasyon

WS motif ve iki çift sisteini içeren sitokin reseptör ekstraselüler alanının bazı özelliklerini hedef alan iki mutasyonel çalışma uygulanmıştır. Büyüme hormonunda uygulanan benzer çalışmalarla uyumlu olarak, bu sisteinlerden herhangi birindeki mutasyon, reseptörün yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin etkilenmesine yol açmıştır. Sisteinleri bağlayan disülfid köprüleri muhtemelen bağlanma alanlarını içermektedir (Şekil 1, Şekil 3).

Hem büyüme hormon reseptör'ü (*GHR*) hem de *PRLR*'de WS motifinin yapısal özellikleri açıkça belirlenmesine karşın, WS motifi bağlayıcı arayüzden uzakta yerleşim göstermektedir. Bu bölgede oluşan mutasyon, bağlanma affinitesine zarar verir. Gerçekten de çeşitli sitokin reseptörleri üzerine yapılan çalışmalar, WS motifinin bağlanmasından ziyade, doğru bağlanma ve hücrel bilgi akışı için gerekli olduğunu göstermektedir.



Şekil 3. Prolaktin Reseptör (*PRLR*) aktivasyonu [Prolaktin Reseptörü (*PRLR*), Prolaktin (*PRL*)-başlatıcı dimerizasyonu vasıtasıyla aktive olur. İlk önce, hormon (*H*) reseptörün bağlanma alanı-1 vasıtasıyla reseptör (*R*) ile etkileşime geçer ve inaktif $H_1:R_1$ kompleksini oluşturur. Daha sonra hormon, bağlanma alanı-2 ile ikinci reseptörüne bağlanır, bu da reseptör dimerizasyonunu ve aktif $H1:R2$ kompleksini oluşturur.] (12)

Sitokin reseptörlerinde korunan bu özelliklere ilaveten ayrıca, *PRLR* bağlayıcılarının, *PRLR*'ne ait iki triptofanı (Trp 72 ve Trp 139) içerdiği ileri sürülmüştür. Bu hipotez, *hGH* – *hGHbp* ve *hGH* – *hPRLbp* iki homolog kompleksin, 3D yapısıyla doğrulanmıştır. Bu iki triptofanın, *PRL/GH* ailesinde ligand-reseptör interaksiyonunun spesifik özelliklerini gösterdiği ileri sürülmüştür. Bu *PRL* reseptörleri memelilerin farklı dokularında çok geniş olarak dağılmıştır ve gen ekspresyon seviyesine ilaveten izoform tipleri de fizyolojik duruma göre değişmektedir. Örneğin ratlarda, hem kısa hem de uzun *PRLR* transkripsiyonu 16 farklı dokuda belirgin şekilde görülmektedir. Buna karşın uzun form 14 farklı dokuda ifade edilmektedir. Dahası, *PRLR* kısa form mRNA seviyesi, diöstrustaki hayvanlarla karşılaştırıldığında, proöstrustaki hayvanların karaciğerinde yaklaşık olarak iki kat daha fazladır ve ovaryum ile uterusda uzun form ekspresyonu, proöstrustaki hayvanlarda diöstrustakilere göre daha yüksektir (12).

3.1.2.3. *PRLR*'nün Vücutta Dağılımı

Prolaktin bağlanma alanları ya da reseptörleri birçok hücre ve dokuda tespit edilmiştir. Reseptör kısa ve uzun formlarının ekspresyonları, östrus siklusu, gebelik ve laktasyon aşamalarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Omurgalılarda prolaktin reseptörleri ya da bağlanma alanları oldukça geniş dağılıma sahiptir (12).

3.1.3. Prolaktin Reseptör Sinyal İletim Yolu

3.1.3.1. JAK-STAT İletim Yolu

Protein kinazlar, sinyal iletimi sırasında protein fosforilasyonunu/aktivasyonunu sağlarlar. Protein kinazlar membran yerleşimli olanlar ve sitoplazmik tirozin kinazlar olarak iki ana gruba ayrılırlar.

Jasus Family Kinase'lar (JAK), sitoplazmik protein kinazlar arasında yer almaktadır. Dinlenme halindeki hücrelerde bu proteinler sitoplazmada inaktif halde bulunurlar. Büyüme faktörleri veya sitokinlerle hücrenin uyarılmasından sonra aktif hale gelen bu proteinler, sitoplazmadaki veya nukleustaki hedeflerine yönelirler (24).

JAK/STAT yolu, protein tirozin kinazlarla transkripsiyon faktörlerinin daha hızlı etkileşimini sağlayan iletim yoludur. Burada reseptörün fosforilasyonu doğrudan transkripsiyon faktörünün yerleşimini ve fonksiyonunu etkiler. Bu işlemde anahtar proteinler STAT proteinleridir. STAT'lar SH2 alanları olan transkripsiyon faktör ailesidir. Uyarılmamış hücrede sitoplazmada inaktiftirler. Sitokin reseptörleri uyarılınca bunlar SH2 alanından reseptöre bağlanır. Takiben, reseptör olmayan JAK ailesinden proteinler STAT'ların fosforilasyonunu sağlar. Fosforilasyon bunların

dimerleşmesine yol açar ve nukleusa girerek orada hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır (12).

JAK Ailesi: *PRLR*'nin sitoplazmik son ucu, izoform yapısı ne olursa olsun, kinaz aktivitesini içeren enzimatik aktivite için herhangi bir sekansdan yoksundur. Bu durum şu ana kadar bütün sitokin reseptörleri için doğrulanmıştır. 1990'ların başında, yeni bir protein kinaz ailesi tanımlanmıştır. Bunlara, iki kinaz benzeri ailenin varlığına dayanarak Janus Kinaz yani JAK denilmiştir (12).

JAK ailesinin dört üyesi bulunmaktadır. Bunlar; JAK1, JAK2, JAK3, Tyk2'dir. Bütün sitokin reseptörleri hücre içine hormon sinyallerinin aktarımında JAK'lardan birini ya da bunların kombinasyonunu kullanmaktadır.

PRLR-JAK2 interaksyonu, *PRLR* sitoplazmik alanının (ICD) proksimal-membran bölgesini oluşturur. Bu bölge, prolin rezidülerinden (I²⁴³, F²⁴⁴, P²⁴⁶, V²⁴⁷, P²⁴⁸, G²⁴⁹, P²⁵⁰ rat *PRLR*) oldukça zengin olan Box1 olarak gösterilen alanı içerir (Şekil 1) (12).

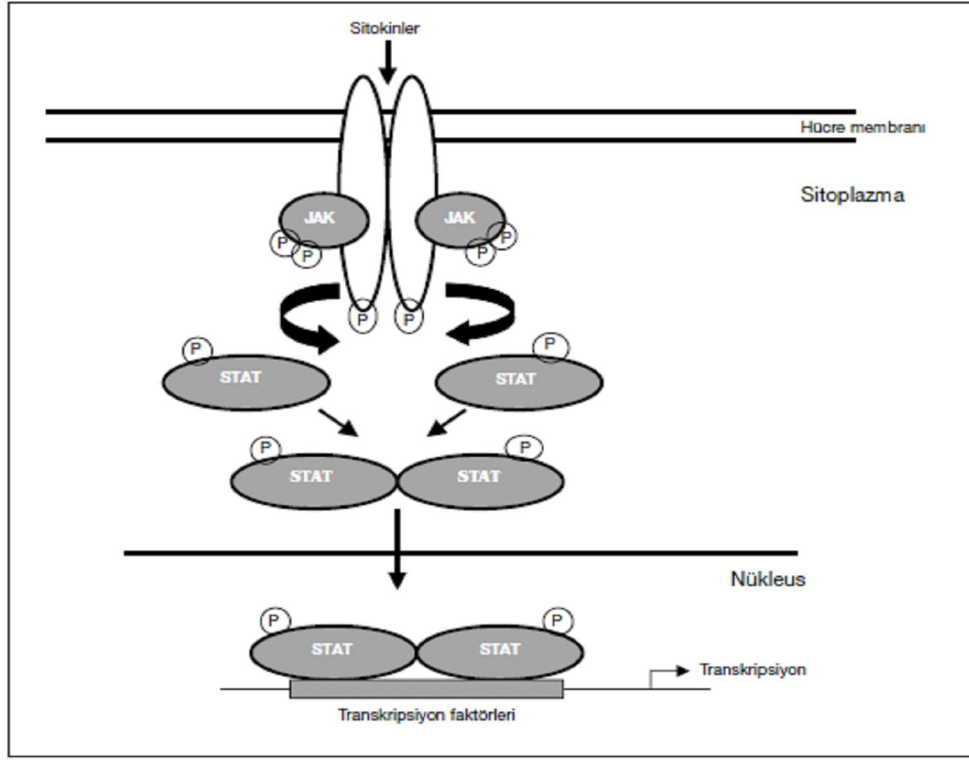
Ayrıca, P-x-P motifi şeklinde kısaltılan ikinci prolinin izomerizasyonunun, reseptör aktivasyonunda "açma/kapama" düğmesi şeklinde bir regülasyon sistemini sağladığı düşünülmektedir (12).

STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) Proteinleri: STAT yaklaşık 90-100 kDa'luk sitoplazmik protein ailesindendir ve sitokin reseptör sinyallerindeki ilişkisi son dört yıl içinde belirlenmiştir. STAT gen ailesinin sekiz üyesi bulunmaktadır. Bunlar, STAT1 (α ve β), STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT6 (ya da IL-4 STAT) ve dSTAT'dır (24).

Sitokin aracılı STAT aktivasyonunun aşamaları şu şekilde sıralanmaktadır: Sitokin, hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanır. Daha sonra, oligomerizasyon gerçekleşir. Bu oligomerizasyon, reseptör ile ilişkili olan JAK proteinlerini çapraz fosforilasyon ile aktive eder. Bu bölgeler sitoplazmadaki inaktif STAT proteinlerinin reseptör ile etkileşmesine imkan sağlar. STAT proteinleri daha sonra homodimer ya da heterodimer oluşturmak üzere reseptörlerden ayrılarak hücre çekirdeğine gelirler ve DNA üzerinde özgül cevap elemanı dizileri ile etkileşerek hedef genlerin transkripsiyonunu uyarırlar (Şekil 4) (24).

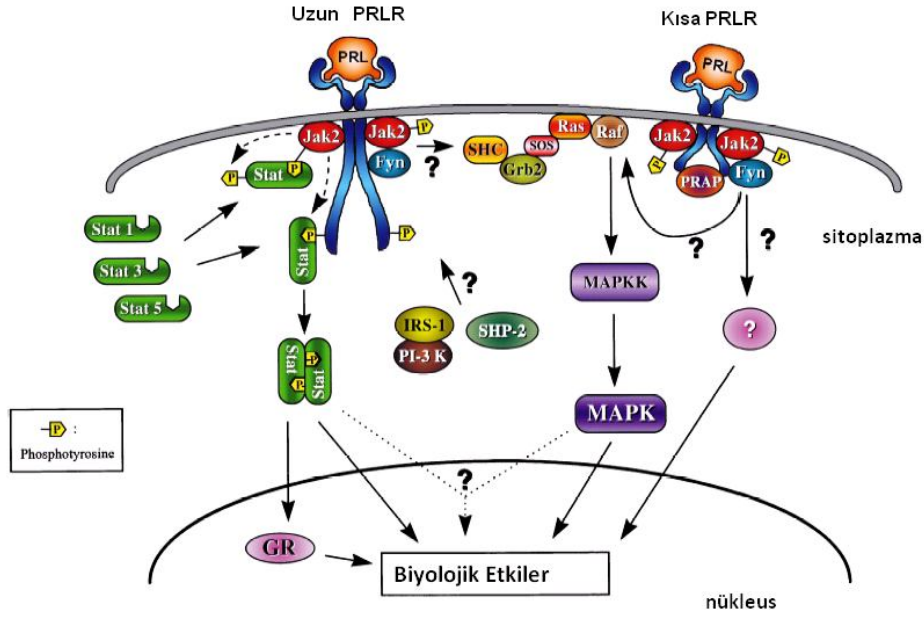
STAT proteinlerinin yapısında yer alan bölgelerin işlevleri şöyledir:

1. Oligomerizasyon bölgesi: Diğer proteinler ile etkileşir, STAT tetrameri oluşumunu sağlar.
2. DNA bağlanma bölgesi: DNA ya özgü bağlanmadan sorumludur, ligand uyarısına karşı özgül sinyal oluşumunu sağlar.
3. SH2 bölgesi: STAT-reseptör, STAT-JAK ve STAT-STAT etkileşimlerinden sorumludur.
4. C'-terminal ucu: Transkripsiyonel aktivitenin özgünlüğü ve kontrolünden sorumludur.
5. Tirozin aminoasiti: N'-ucundan yaklaşık 700 aminoasit uzaklıktadır. Tirozin fosforilasyonu, bütün STAT proteinlerinin DNA ya bağlanma aktivitelerini düzenler (24).



Şekil 4. JAK/STAT yolunun aktivasyonu (24)

PRL, transmembran *PRLR*'ne hormonun bağlanmasıyla aktif hale gelen sinyal aktarım yolu vasıtasıyla hedef hücreler üzerine etkisini gösterir. Sitokin reseptör ailesinin bir üyesi olarak, *PRLR* JAK/STAT yolunu kullanır. Jasus Kinaz, tirozin kinaz protein ailesine benzer, buna karşın transkripsiyonun sinyal iletim sistemi (transducer) ve aktivatörleri (STAT) proteinlerdir ki bunlar transkripsiyon faktörleri olarak aktivasyon yolu üzerinde bulunurlar (12).



Şekil 5. Prolaktin Reseptör geni sinyal iletim yolunun şematik gösterimi (Uzun ve Kısa rat *PRLR* izoformları gösterilmiştir. *PRLR* STAT1, STAT3 ve başlıca STAT5 tarafından aktive edilir. Glukokortikoid reseptör (GR) ile STAT5 interaksyonu sözkonusudur. Kısa *PRLR* izoformunun STAT yoluyla aktive olup olmadığı henüz bilinmemektedir.) (12)

PRLR'ne bağlanan *PRL*, JAK2 ile birlikte aktif kompleks yapısını oluşturur. JAK2 aktive edildikten sonra, *PRLR* intraselüler alanı üzerinde bulunan tirozin rezidüleri fosforile olur. Bu fosforile tirozin rezidüleri STAT proteinleri için bağlanma alanları olarak davranırlar ki bu STAT proteinleri de fosforile olur.

Aktive edilen (fosforile olmuş) STAT'lar daha sonra, reseptörden ayrılır ve heterodimer ya da homodimer yapıları oluşturur (STAT 1/1, STAT 3/3, STAT 5/5, STAT 1/3). STAT dimerleri daha sonra nükleus içine transloke olur ve gen promotorleri üzerindeki spesifik duyarlı elementlere [GAS (Gamma-Activated Sequence) ya da interferon] bağlandıktan sonra hedef gen transkripsiyonunu regüle

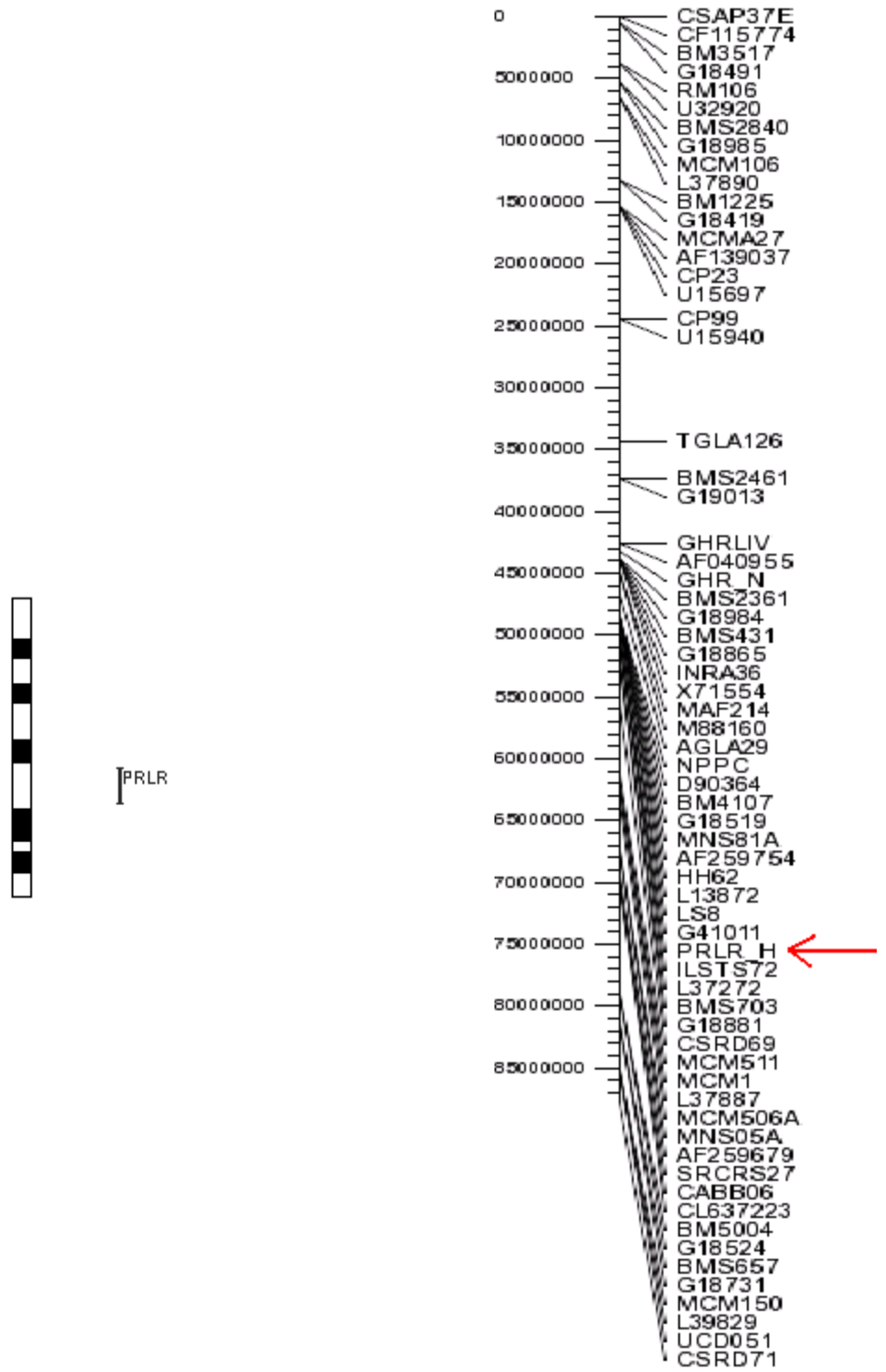
eder. Bütün sitokin reseptörleri hücre içindeki hormonal sinyallere uyum sağlamak için bir ya da birkaç JAK'la ve STAT 'la birlikte çalışır (Şekil 5) (12).

3.2. Literatür Bilgisi

Çiftlik hayvanlarında, prolaktin ve *PRLR* genlerinin döl verimi ve çoklu doğum özellikleri ile ilişkilerinin incelendiği çalışmalar başta domuz olmak üzere diğer türlerde de önem kazanmaya başlamıştır. Bunun başlıca sebebi, prolaktin ve *PRLR* genlerinin sahip olduğu kendine has özellikleridir.

Homozigot *PRLR* mutant yapıdaki farelerde, embriyonik implantasyonun başarısızlığı, düzensiz siklus göstermeleri, fertilizasyon oranının azalması ve yetersiz embriyonik gelişimden dolayı kısırılık söz konusu olmaktadır (8,12, 34, 53). Ayrıca, *PRLR* mutant fareler zayıf anasal davranış gösterirler (46). Bu özellikler, *PRLR* genini üreme özellikleri için kuvvetli bir aday gen haline getirmiştir.

Prolaktin reseptör geni domuzda (76) ve koyunda 16. kromozomda (Şekil 6) (38) haritalanmıştır. *PRLR* geni koyunda ve insanda 10 ekzon (Şekil 7), sığırlarda ise 9 ekzondan ibarettir. Koyun ekzon 10 bölgesinin uzunluğu 1746 bp iken amino asit dizisinin uzunluğu 581'dir (Şekil 8). Bu bölgede 25-237 (213aa) pozisyonlar ekstraselüler alanı, 238-258 (21aa) pozisyonlar transmembran alanı, 259- 581 (323aa) pozisyonlar ise intraselüler (sitoplamik) alanı oluşturmaktadır.



Şekil 6. Koyun 16. kromozom sitogenetik ve radiation hybrid haritası ve *PRLR* geninin lokalizasyonu (3)



Şekil 7. İnsan *PRLR* geninin ekzon yapısı (TM: Transmembran alan) (11)

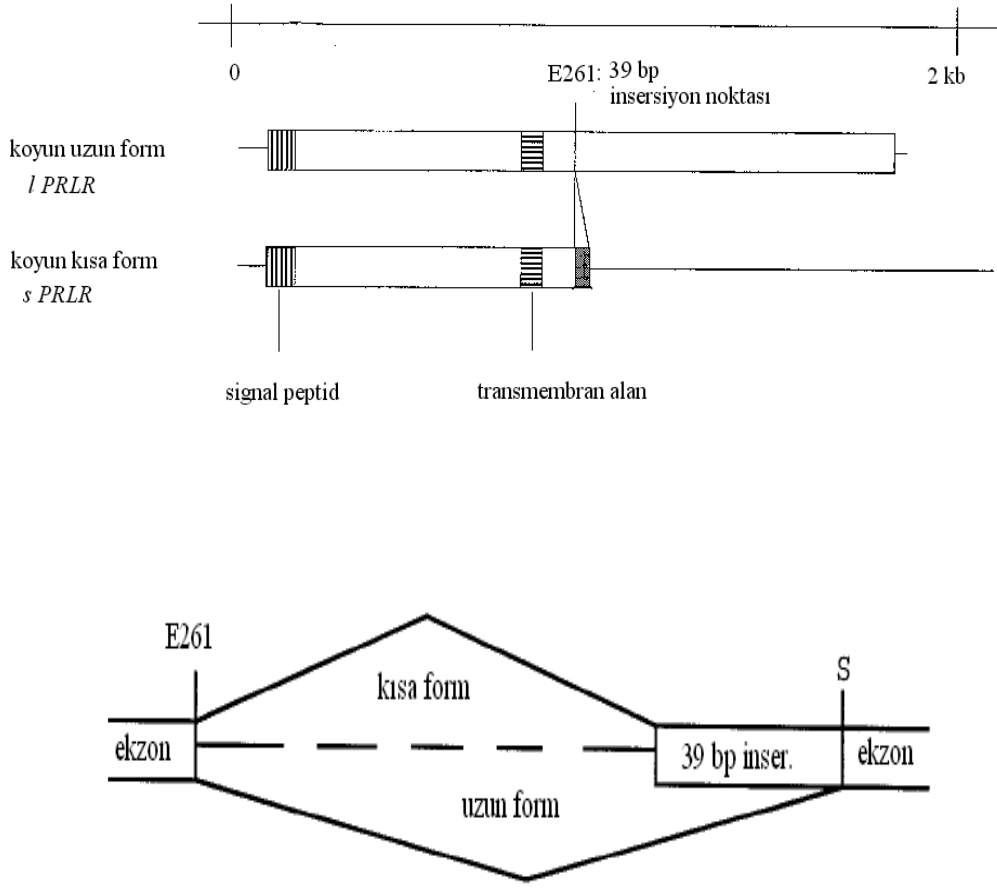
10	20	30	40	50	60	
MKENAASRVL	FILLFLFAS	LLNGQSPPEK	PKLIKCRSPG	KETFTCWWEF	GADGGLPTNY	
70	80	90	100	110	120	ECD
TLTYRKEGET	LIHECPDYKT	GGPNSCYFSK	KYTSIWKMYV	ITVSAINQMG	ISSSDPLYVD	
130	140	150	160	170	180	
VTYIVEPEPP	VNLTLELKHP	EDRKPYLWIK	WSPPTLTDVK	SGWFSIQYEI	RLKPEKATDW	
190	200	210	220	230	240	
ETHFAPKLTQ	LKIFNLYPGQ	KYLVQIRCKP	DHGYWSEWSP	ESFIQIPNDF	PVKDTSMWIF	TMD
250	260	270	280	290	300	
VGVLSAVICL	IMVWAVALKG	YSMVTCILPP	VPGPKIKGFD	IHLLEKKGKSE	ELLRALESQD	
310	320	330	340	350	360	
FLPTSDCEDL	LMEFIEVDDS	EDQHLMPPHS	KEHMEQGVKP	MHLDPDTS	RGSCDSPSL	
370	380	390	400	410	420	
SEKCDEPQAY	PSKFHIPEGP	EKLEDPETNH	TCLQAPQSTS	GEGKIPYFLA	NGPKSSTWPF	
430	440	450	460	470	480	ICD
PQPPSLYSPR	YSYHNIADV	ELALGMAGTT	ATLLDQTDQH	AFKPSKTIET	GGEGKAAKQS	
490	500	510	520	530	540	
ESEGYSEPD	QDMAWPLLQD	KTPLFSAKPL	EYVEIHKVSQ	DGVLALFPKQ	NEKVDAPETS	
550	560	570	580			
KEYSKVSRVT	DSNILVLIPD	LQAQNLTLL	ESAKKAPPAL	P		

Şekil 8. Koyun *PRLR* geni ekzon 10 bölgesinin amino asit dizisi. (ECD: Ekstraselüler Alan, TMD: Transmembran Alan, ICD: İntraselüler Alan.)

Koyun *l-PRLR* ve *s-PRLR* tam sekans dizisini belirleyen ve bu iki formun alternatif splays mekanizmasıyla oluştuğunu ilk kez bildiren araştırmacılar, Bignon ve ark. (10) olmuştur. Araştırmalarında, *s-PRLR* ve *l-PRLR* arasındaki tek farkın sitoplazmik alanın başlangıcından itibaren, 39 bp'lik insersiyonun, sırasıyla varlığı ve yokluğu olduğunu belirlemişlerdir. Böylece 39 bp'lik insersiyon *s-* ve *l-PRLR* transkriptlerinin birbirinden ayrılmasını sağlarken bu transkriptlerin oluşumunu alternatif splays vasıtasıyla açıklamışlardır (Şekil 9).

Bignon ve ark. (10) yaptıkları araştırmada, 39 bp'lik insersiyonun doğrudan ekzonun 3' ucuyla bağlantılı olduğunu ve ekzonun 5' ucundan 800 bp'lik intron ile ayrıldığını göstermiştir. Böylece iki (*s-PRLR* ve *l-PRLR*) formun oluşmasına yol açan alternatif splaysın, bir 5' ve iki 3' alanı ile tek bir intronu kullandığını bildirmişler ve bunu sekans analizi ile doğrulamışlardır.

Koyun genomunda 39 bp insersiyon muhtelif ekzonlar içinde ayrılmamış ise bunun nedeni, 39 bp insersiyonun direk olarak ekzonu 3' ucu ile bağlantılı olmasıdır. Alternatif splays bölgesinin doğru organizasyonu bu şekilde açıklanmaktadır (10).



Şekil 9. 39 bp insersiyon bölgesini içeren s- *PRLR* ve l- *PRLR* cDNA'nın şematik gösterimi ve alternatif splicing bölgesinin s- ve l- *PRLR* oluşturması (10)

Prolaktinin hedef genlere sinyal iletiminde sadece *l-PRLR* fonksiyoneldir. Buna istinaden farklı türlerde s ve *l-PRLR* dizileri incelenmiş ve *l-PRLR* formunun iyi korunduğu, *s-PRLR* formunun ise ayrılma noktasının ötesinde (E216) iyi korunmadığı Bingon ve ark. (10) tarafından saptanmıştır. Bu durum *s-PRLR* formunun işlevsel olarak önemli olmadığını ya da fonksiyonunun türden türe değişiklik gösterdiğini düşündürmüştür. Ayrıca bu genomik yapının ruminantlarda

benzer olup olmadığını araştırmışlar ve koyun ve keçi dizilerinin aynı olduğunu, fakat sığır genomunda 290 bp'lik bir insersiyon sonucu daha büyük bir fragmentin amplifiye olduğunu açıklamışlardır. Koyun için açıklanan alternatif splayın keçi ve sığır için de geçerli olduğunu ve bu üç türde de 39 bp'lik insersiyon dizisinin yüksek derecede korunduğunu ve *s- PRLR* 3' ayrılma noktasının aynı olduğunu bildirmişlerdir (Şekil 10) .

PRLR geniyle ilgili olarak yapılan çalışmalar özellikle domuzlar üzerinde yoğunlaşmış, genin polimorfizmleri yanında çoklu doğum ve diğer döl verimi özellikleri ile ilişkileri araştırılmıştır. Yapılan araştırmalardan bazıları kısaca aşağıda özetlenmiştir.

Domuz *PRLR* geninde (457 bp) ilk olarak Vincent ve ark. (76) tarafından PCR ürününün *AluI* enzimi ile kesiminde Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) polimorfizmi saptanmıştır.

Isler ve ark. (36) domuzlarda *PRLR* genini üreme bileşenlerini etkileyen potansiyel bir aday gen olarak araştırmışlar ve “B” alelinin her bir uterus boynuzundaki fötüs sayısını, ortalama fötüs ağırlığını ve toplam fötüs ağırlığını etkilediğini ($P < 0.1$) tespit etmişlerdir.

Birkaç ticari domuz hattında A aleli ile yavru sayısı arasında pozitif ilişkinin varlığı gösterilmiştir (73,75).

Drogemuller ve ark. (25) farklı domuz ırklarında *ESR*, Retinol Binding Protein (*RBP4*) ve *PRLR* aday genlerinin yavru sayısı üzerine etkilerini inceledikleri araştırmada, *PRLR* geni için “A” alelinin frekansını Alman Landrace ırkında 0.40 ve Duroc ırkında 0.82 bulmuşlardır. Duroc ırkında bütün doğumlarda alelik değişiminin etkisini canlı doğan yavru sayısı için 0.71 ($P = 0.05$) olarak bildirmişlerdir.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
ovine	GATTGTGATGT	TCATCTGCTG	GAGGTAAGTG	CCAGGGTGA	GACTGTCTTG	TGACTTGCCG	CTGTGTAAAT	GTCACTTTTA	CACATGTGCA	CACCAACCCC	ATCAGTGCAG	TCTGGCTA-G	CTTGCCCATC
caprine	GATTGTGATGT	TCATCTGCTG	GAGGTAAGTG	CCAGGGTGA	GACTGTCTTG	TGACTTGCCG	CTGTGTACTT	GTCACTTTTA	CACATGTGCA	CACCAACCCC	ATCAGTGCAG	TCTGGCTA-G	CTTGCCCATC
bovine	GATTGTGATGT	TCATCTGCTG	GAGGTAAGTG	CCAGGGTGA	AACTGTATTG	TGACTTGCCG	CTGTGTAAAT	GTCACTTTTA	CACATGTGCA	CACCAACCCC	ATCAGTGCAG	TCTGGCTAAG	CTTGCCCATC
ovine	CATGGCTGGT	TGTCCCTCCC	TTTCAGCAGG	GGTGTTCACA	GAAGATGTG	AGAGGCATGA	GGGTAAATAC	TGTCACTAAG	CGTCAGAGGG	CAATGAAAGA	AAGCCAAAGA	AACACCAGCA	CACAGG----
caprine	CATGGCTGGT	TGTCCCTCCC	TTTCAGCAGG	GGTGTTCACA	GAAGATGTG	AGAGGCATGA	GGGTAAATAC	TGTCACTAAG	CGTCAGAGGG	CAATGAAAGA	AAGCCAAAGA	AACACCAGCA	CACAGG----
bovine	CATGGCTGGT	TGTCCCTCCC	TTTCAGCAGG	GGTGTTCACA	GAAGATGTG	AGAGGCATGA	GGGTAAATAC	TGTCACTAAG	CGTCAGAGGG	CAATGAAAGA	AAGCCAAAGA	AACACCAGCA	CACATAGCAA
ovine	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
caprine	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
bovine	TOCTTGTGCG	TTAGCTGCTG	CTAAGTTGCT	TCAGTCTGTG	CCGACTCTGT	GCTACCCCAT	AGACGCGCAG	CCACCCAGGT	CCCCCGTCCC	TGGGATTTCT	CAGGCCAAGA	CACGTGAAGT	GGTTGCCATT
ovine	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
caprine	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
bovine	GCCTTCTCCA	ATGTATGAAA	GTGAAAAGTG	AAAGTGAAGT	CGCTCAGTTG	TGTCGGACTC	TTAGCCACCC	CATGGACTGA	AGCCCCACCAG	GCTCCTCCAT	CTATGGGATT	CTCCAGGCAA	GAGTACTGGA
ovine	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
caprine	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
bovine	GTGAGTGGC	ATTGCTTCT	CCAGCAATGC	TTGTAGGTT	TATCAAAATC	GTTCATAAGC	CGTATCATAA	ACATTTTATA	CAAAATAATCA	GTTGAGAAAG	TGGGTGAATA	TTTGATGAAT	ACAAAAGAGT
ovine	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
caprine	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
bovine	GACCTTCCAC	CAGCCCTCT	TCCATCAGAC	TTTGGTGTAA	GCTCTCAGTT	GAATGTTCTC	TACATAAGGC	CATAGTAACA	GCATATCTTA	CTGCAATTTT	TTGCTCAGTT	TGAGTGCTC	AGCTAACACT
caprine	GACCTTCCAC	CAGCCCTCT	TCCATCAGAC	TTTGGTGTAA	GCTCTCAGTT	GAATGTTCTC	TACATAAGGC	CATAGTAACA	GCATATCTTA	CTGCAATTTT	TTGCTCAGTT	TGAGTGCTC	AGCTAACACT
bovine	GACCTTCCAC	CAGCCCTCT	TCCATCAGAC	TTTGGTGTAA	GCTCTCAGTT	GAATGTTCTC	TACATAAGGC	CATAGTAACA	GCATATCTTA	CTGCAATTTT	T-GCTCAGTT	TG-AGTGCTC	AGCTAACACT
ovine	GGCTCAGTAC	AAGGGAGCTG	GTATTGTGCA	GAGCCCATTT	AGACAGATTG	AAGTGGGAAT	TAAATTTAAG	TGTTTCCGAAT	AAAAAGAGGG	GTTAGAACAT	TTTACATTTC	TCTGCAGGTT	GAAGTACATA
caprine	GGCTCAGTAC	AAGGGAGCTG	GTATTGTGCA	GAGCCCATTT	AGACAGATTG	AAGTGGGAAT	TAAATTTAAG	TGTTTCCGAAT	AAAAAGAGGG	GTTAGAACAT	TTTACATTTC	TCTGCAGGTT	GAAGTACATG
bovine	GGCTCAGTAC	AAGGGAGCTG	GTATTGTGCA	GAGCCCATTT	AGACAGATTG	AAGTGGGAAT	TAAATTTAAG	TGTTTCCGAAT	AAAAAGAGGG	GTTAGAACAT	TTTACATTTC	TCTGCAGGTT	GAAGTACATA
ovine	TTAATAGTTT	CGAATTGACC	TTTCACTTAA	CATGGAGGTA	TATAAAGCA	GTIACCTACT	CATTATGTCA	CTTGACATCA	GCCTCTGTGA	GGCCAAAAGC	ACAAGATTGT	GAAGAAGTCA	TCCAGGGGAA
caprine	TTAATAGTTT	CGAATTGACC	TTTCACTTAA	CATGGAGGTA	TATAAAGCA	GTIACCTACT	CATTATGTCA	CTTGACATCA	GCCTCTGTGA	GGCCAAAAGC	ACAAGATTGT	GAAGAAGTCA	TCCAGGGGAA
bovine	TTAATAGTTT	CGAATTGACC	TTTCACTTAA	CATGGAGGTA	TATAAAGCA	GTIACCTACT	CATTATGTCA	CTTGACATCA	GCCTCTGTGA	GGCCAAAAGC	ACAAGATTGT	GAAGAAGTCA	TCCAGGGGAA
ovine	TTTATCTGTA	TGGAGTTTAC	TTTGATTGCA	GATATCACAG	CCTTCTCGCC	TTGTGTCTGT	GTITTAATAG	AAGGGC	-----	-----	-----	-----	-----
caprine	TTTATCTGTA	TGGAGTTTAC	TTTGATTGCA	GATATCACAG	CCTTCTCGCC	TTGTGTCTGT	GTITTAATAG	AAGGGC	-----	-----	-----	-----	-----
bovine	TTTATCTGTA	TGGAGTTTAC	TTTGATTGCA	GATATCACAG	CCTTCTCGCC	TTGTGTCTGT	GTITTAATAG	AAGGGC	-----	-----	-----	-----	-----

Şekil 10. 5' ekzon bölgesinden 39 bp insersiyon ayrımını gösteren koyun, keçi ve sığira ait intron 1 bölgesinin sekans hizalanması (39 bp'lik insersiyonu oluşturan baz dizisi 3 türü de içine alacak şekilde kare parantez ile belirtilmiştir. Horizontal ok işaretleriyle ifade edilen intron başında ve sonunda bulunan GT ve AG dinükleotidleridir) (10)

Putnova ve ark. (58) yaptıkları çalışmada domuz *PRLR* geninde *HpaII* restriksiyon endonukleaz enzimi ile yeni bir polimorfizimi saptamışlar ve bunun ilk doğumdaki yavru sayısını etkilediğini bildirmişlerdir.

Van Rens ve Van Der Lende (74), 77 baş Large White X Meishan F₂ melez domuzlarda farklı *PRLR* genotiplerinin yavru sayısı ile ilişkisini AA, AB, BB genotipine sahip domuzlar için toplam doğan yavru sayısını sırasıyla 11.4±0.7, 10.8±0.6 ve 8.8±0.9; canlı doğan yavru sayısını ise sırasıyla 11.1±0.6, 10.5±0.6 ve 8.7±0.9 olarak bildirmişlerdir.

Korwin-Kossakowska ve ark. (44) tarafından Prolaktin ve *PRLR* genleri domuzlarda üreme özellikleri için aday gen olarak incelenmiştir. Prolaktin geninin, domuzlarda ikinci ve daha sonraki doğum kayıtları dikkate alınarak yapılan incelemede, toplam doğum sayısı, canlı doğan yavru sayısı ve 21 günlük yaştaki yavru sayısı üzerine önemli etkisinin olduğu ($P \leq 0.01$) tespit edilmiştir. Prolaktin reseptör geninin ilk doğumunu yapan dişi domuzlar için canlı doğan yavru sayısı üzerine etkisi de önemli ($P < 0.05$) bulunmuştur.

Van Rens ve ark. (73) domuzlardaki ovulasyon oranının *PRLR* genotipi ile ilişkili olarak önemli derecede etkilendiğini tespit etmişlerdir. Araştırmada, dişi domuzlarda farklı *PRLR* genotiplerinin yavru sayısı bileşenlerine etkilerini incelemişler, AA genotipine sahip dişiler (21.5 ± 0.9), BB genotipli dişilere (18.7 ± 0.6) göre önemli düzeyde ($P < 0.05$) yüksek ovulasyon oranına sahipken, AB genotipli dişilerin (20.0 ± 0.5) orta düzeyde ovulasyon oranı gösterdiklerini saptamışlardır.

Terman (71) *PRLR* ve Leptin (*LEP*) genlerinin Polonya Large White x Landrace melez domuzlarda genotip ve yavru sayısı arasındaki ilişkilerini incelemiştir. *PRLR* geni için A aleli frekansı 0.62, B aleli frekansı ise 0.38 bulunmuştur. Araştırmada toplam doğan yavru sayısı, canlı doğan yavru sayısı ve sütten kesilen yavru sayısı incelenmiştir. Araştırma sonucunda ilk doğumunu yapan dişilerde farklı *PRLR* genotipini taşıyan dişiler arasında istatistiksel olarak önemli ($P \leq 0.01$) farklılıkların olduğu bulunmuştur. Daha sonraki doğumlarda ise, AA genotipini taşıyan dişiler AB ve BB genotipli dişilerle kıyaslandığında daha fazla yavru sayısına sahip olmuş, ancak bu farklılıklar istatistikî olarak önemli bulunmamıştır.

Kmieć ve Terman (43) erkek domuzlarda *PRLR* geninde genotip ile bazı üreme özellikleri arasındaki olası ilişkileri ortaya koymak amacıyla yaptıkları çalışmalarında farklı ırklardan toplam 229 domuz kullanılmışlardır. Araştırmada, *PRLR* genindeki polimorfizm, spesifik primerler ve *AluI* restriksiyon enzimleri kullanılarak PCR- RFLP metodu ile belirlenmiştir. Çalışma sonunda AA, AB ve BB genotipinin frekansı sırasıyla 0.45, 0.35 ve 0.20 olarak saptanmıştır. Ayrıca, *PRLR* genotipi ile ejakülasyon hacmi, sperm konsantrasyonu, canlı sperm yüzdesi ve ejakülasyondaki canlı sperm sayısı arasında ilişkiler bulunmuştur ($P<0.01$).

Wang ve ark. (77) Beijing Black domuz ırkında *PRLR* ve *BF (Properdin)* genotiplerinin yavru sayısına etkilerini araştırmışlardır. *PRLR* geni için A alelinin frekansını 0.25, B alelinin frekansını 0.75 olarak hesaplamışlardır. İlk doğumda AA genotipli dişilerin AB ve BB genotipli dişilere göre daha fazla yavru sayısına sahip olduğunu (toplam doğan yavru sayısı, canlı doğan yavru sayısı) ortaya koymuşlar, ancak bu farklılığın istatistiki olarak önemli olmadığını açıklamışlardır. Daha sonraki doğumlarda ise *PRLR* geni için AA genotipi ile AB genotipi ve AA genotipi ile BB genotipini taşıyan dişiler arasında önemli ($P<0.05$) farklılıklar tespit edilmiştir.

Domuzlardan başka, sığır, keçi ve koyunlar üzerinde yapılan araştırmalar da bildirilmiştir. Bunlardan, sığırlarda *PRLR* gen polimorfizmini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada 9. intronda A→C Single-Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi; SNP) belirlenmiştir. Polish Black ve Polish White ırklarında farklı aleler belirlenmiş ancak, bu genotiplerin süt verimi ile ilişkisi önemli bulunmamıştır (14).

PRLR geninin polimorfizmi ve bazı verim özellikleri ile ilgili özellikle keçi ve koyunlarda yapılan çalışmalar sadece birkaç yıllık geçmişe sahiptir.

Zhang ve ark. (78) *PRLR* genini Jining Grey keçilerinde çoklu doğum için aday gen olarak çalışmışlardır. Hem çoklu doğum oranı yüksek ırklarda (Jining Grey keçisi) hem de düşük ırklarda (Liaoning Kaşmir keçisi, Boer keçisi ve Ankara keçisi) tek nükleotid polimorfizmini, PCR-Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP; Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi) metoduyla saptamak amacıyla, *PRLR* geninin ekzon 10 ve 3' untranslated region (UTR) bölgesine spesifik beş primer dizayn etmişlerdir. Yalnızca Primer 1, primer 2 ve primer 4 ile amplifiye edilen bölgeler polimorfizm göstermiştir. Primer 1 için hem Jining Grey hem de Liaoning Kaşmir keçisinde iki genotip (AA ve AB), Ankara keçisi için iki genotip (AA ve AC) ve Boer keçisi için sadece bir genotip (AA) saptanmıştır. Primer 2 bölgesi için Jining Grey, Liaoning Kaşmir ve Boer keçilerinde iki genotip (DD ve DE) belirlenirken Ankara keçisinde yalnızca bir genotip (DD) görülmüştür. Primer 4 bölgesi için ise Jining Grey keçilerinde iki genotip (FF ve FG), Liaoning Kaşmir keçilerinde iki genotip (FF ve GG), Boer keçisinde bir genotip (FF) ve Ankara keçisinde üç genotip (FF, FG ve GG) belirlenmiştir.

PRLR geninde, Mu ve ark. (50) Kısa Kuyruklu Han, Dorset, Suffolk ve Dorset koyunları ile Kısa Kuyruklu Han koçlarının F₁ melezlerinde SSCP metodu ile SNP saptamışlar ve üç primer kullandıkları çalışmada her bir primer için üç genotip (AA, AB, BB) belirlemişlerdir. Primer 1 için, AA genotipi dört koyun ırkında da saptanırken, AB genotipi Kısa Kuyruklu Han Koyunu, Dorset ve Suffolk koyun ırklarında, BB genotipi ise sadece Dorset koyun ırkında kaydedilmiştir. Primer 2 için, hem AA hem de AB genotipi dört ırkta da belirlenmiş, buna karşın BB genotipi Suffolk ırkında görülmüştür. Primer 3 için, 3 genotip de (AA, AB ve BB) dört koyun popülasyonunda tespit edilmiştir. Araştırmada üç primer çifti bakımından, dört

koyun ırkı için de A alelinin frekansı B alelinin frekansından önemli düzeyde yüksek bulunmuştur.

Chu ve ark. (19) Kısa Kuyruklu Han koyunlarında *PRLR* geni ekzon 10 ve intron 1 için üç primer çiftini PCR amplifikasyonu için tasarlamışlar, bu gen bölgesinde PCR-SSCP vasıtasıyla SNP saptamışlardır. *PRLR* geninin yavru sayısı ile ilişkilerinin araştırılması sonunda üç primer çiftinin üç genotipi (AA, AB ve BB) belirlediği, *PRLR* geninin Kısa Kuyruklu Han koyunları için ya çoklu doğumu etkileyen major bir gen ya da bu gibi genlerle yakın bağlantılı bir gen olduğu bildirilmiştir.

3.3. DNA Dizi Analizi ve Kullanılan İstatistiksel Analizler

3.3.1. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi, DNA'yı oluşturan nükleotid baz diziliminin belirlenmesinde kullanılan yöntemdir. Manuel DNA baz dizileme yöntemlerinden biri olan Sanger Yöntemi, Sanger ve ark. (63) tarafından geliştirilmiştir. Yöntem dideoksi zincir terminasyonu esasına dayanmaktadır.

Yöntemin temeli DNA polimerazın dNTP'lerin (deoksiribonükleozit trifosfat) yanı sıra deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri de (dideoksiribonükleozit trifosfat) substrat olarak kullanabilmesine dayanır. Sentezlenen DNA'ya bir ddNTP'nin katılması 3' pozisyonunda OH grubu olmadığı için sentezi durdurur. Dizi analizi yapılırken dört ayrı reaksiyon karışımı hazırlanır. Her bir karışım kalıp DNA zinciri, bir primer, dNTP'lerin dördü ve az miktarda ddNTP'lerden birini içerir. Özgül zincir sonlanması için her bir reaksiyonda farklı bir ddNTP bulunur. Reaksiyonların her birinde çok az miktarda modifiye nükleotid kullanıldığı için yeni zincir sentezi rastgele sonlanarak

bir dizi DNA fragmenti meydana gelir. Reaksiyonlar sonucu elde edilen DNA parçalarına elektroforez uygulanarak jel üzerinde yanyana yürütülür. Uygulanan elektrikselsel alanın etkisi ile DNA parçacıkları en kısıası en önde olmak üzere jel üzerinde bir merdiven görüntüsü oluşturur. İşaretleme yöntemine göre jel üzerinde, tespit edilen parçacıklar reaksiyon karışımına konulan ddNTP' nin tipine göre okunur (6,45).

İnsan Genom Projesi gibi büyük projeler çok sayıda DNA dizi analizi yapılmasını gerektirmiştir ve bu yoğun çalışma yükü ise otomasyonu kaçınılmaz hale getirmiştir. Otomatik analizde de Sanger'in enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi kullanılmıştır.

Bu yöntem üç temel basamaktan oluşmaktadır:

1. PCR
2. Zincir Sonlanma Reaksiyonu
3. Kapiller Elektroforez

Bu basamakların kolay ve basit bir prosedür içermesi ve bu sayede sağladığı hızlı mutasyon tespit imkanı yöntemin en önemli avantajıdır. Az miktarda kandan elde edilen DNA ile başlayan prosedürün tümü PCR amplifikasyonu ve direk dizileme yapılmasını içermektedir (22).

Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. Söz konusu DNA'nın bulunduğu jelmatriks bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA'ya bağlanan floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir detektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen

veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır (6,62).

Otomatik kapiller jel elektroforez dizileme yöntemi, manuel yöntemlere göre daha ucuz, az iş zamanı gerektiren ve daha uzun DNA baz dizisi okuma imkanı sağlayan bir yöntemdir. Kapiller elektroforez, elektroforetik hareket kabiliyeti, faz ayrımı ve moleküler boyuttaki farklılıklara bağlı olarak elektrokinetik ayırım yapan bir tekniktir. Bu elektrokinetik ayırım iki ucu açık dış yüzeyi slika ile kaplı iç çapı yaklaşık 25- 75 µm olan ve 15 – 100 cm uzunluğunda, silindirik kapillerlerde yapılır. Sistem ince slika kapiller boru, iki elektrolit kapiller haznesi, bir yüksek voltaj güç kaynağı ve dedektörden oluşmaktadır, elde edilen veriler işlem sonrası bilgisayar vasıtasıyla toplanıp depolanmaktadır. Kapiller, elektrotları ve tamponu içeren iki cam hazne arasına yerleştirilmiş olup, kapiller jel ile dolduktan sonra çok az miktarda örnek kapillerin bir ucuna elektrokinetik ve hidrodinamik teknikle yüklenir. Ayırım yüksek voltaj uygulanarak sağlanır (7,55).

Otomatik kapiller jel elektroforezin en önemli dezavantajı ise yöntemin hassasiyetinden dolayı optimizasyon sırasında yaşanan problemlerdir.

3.3.2. Kullanılan İstatistiksel Analizler

Sakız, Akkaraman ve İvesi ırkı koyunlarda *PRLR* geninin farklı aleller taşıyıp taşımadığını ve polimorfik bir yapı gösterip göstermediğini tespit etmek için, koyun *PRLR* geninde otomatik kapiller jel elektroforezi yöntemi ile DNA dizi analizi yapılmıştır ve aşağıdaki analizler uygulanmıştır.

3.3.2.1. Komşu Birleştirme Ağacı [Neighbor Joining (NJ) Tree] Metodu

Komşu birleştirme ağacı metodu, en basit genetik uzaklık metodlarından biridir. Bu metod, birbirine en yakın-ilişkili sekansı seçer ve sonra, bir sonraki en uzak sekansı ağacın üçüncü dalı olarak ekler, böylece total ağaç uzunluğu minimize edilmiş olur (33).

Komşu birleştirme ağacı genetik uzaklıkların görsel olarak belirtilmesi amacı ile çizilebilmektedir. Komşu birleştirme ağacı metoduna göre çizilen ağaç, 10 yıl öncesine kadar çok kullanılan Alel Paylaşım Uzaklıkları Metodu (UPGMA; Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) metoduna göre daha çok tercih edilen bir metottur. Bunun nedeni UPGMA metodunda, populasyonların evrim zamanı her populasyon için aynı kabul edilip ağaç ona göre çizilmektedir. Ancak populasyonların birey sayıları farklı olduğundan aynı zaman aralığında farklı miktarlarda değişim olduğu düşünülmektedir (54).

UPGMA ağacı, ağacın dalları boyunca değişiklik hızının sabit olduğunu varsayar ve bu nedenle hesaplamaları yaparken ağacın kökünü de (root-ortak ata) hesaplar. Komşu birleştirme ağacı ise ağacın dalları boyunca değişiklik hızının farklı olabileceğini kabul eder, bu nedenle ağacın kökünü hesaplamaz (5).

Filogenetik ağaçlar çizilirken "bootstrap" (bağla-çöz) işlemi yapılabilir. Bu işlem, program tarafından çizilen tek bir ağacın dallarının düzeni, 1000 tekrar boyunca hangi dalların en çok aynı gruplamayı verdiği ile ilişkilidir. Seç bağla testinde, bilgisayar mevcut veri setinden tekrarlı örnekleme yoluyla yeni bir veri seti oluşturur. Örneğin çalışmada 300 baz çiftlik bir dizi bulunuyorsa bilgisayar bu pozisyonlardan birini rastgele seçmek ve bunu yeni veri setinde ilk öge olarak kullanmakla seç bağla testine başlar. Daha sonra, rastgele seçtiği bir pozisyon, yeni veri setinin ikinci veri noktasını oluşturur (ikinci veri noktasının birincisinin aynı

olma şansı 1/300'dür). Bilgisayar orijinal verinin rastgele bir örneklemesini temsil eden, 300 baz çifti içeren yeni bir veri seti oluşturuncaya kadar bu işleme devam eder. Sonra, bu yeni veri seti filogeniyi hesaplamak için kullanılır. Bu işlem tekrarlamak suretiyle yeniden örneklenmiş veri setinden oluşan ağaçlarda belli bir dalın açığa çıkma yüzdesi %50, %80 ya da %100 şeklinde ortaya koyulabilir. Seç bağla tahmininde bir dal ne kadar çok kere açığa çıkarsa, bu dalın gerçekte var olduğu konusundaki güven artmaktadır. Eğer bir dal için seç bağla desteği az ise örneğin %50 nin altında ise ağacın bu kısmındaki dallanma modelinin belirlenemediği sonucuna varılacaktır ve bunun sonucunda program çizdiği ağaçta bu dalı tek düğümden çok çatallı (belirsizlik noktası) olarak verecektir (29).

3.3.2.2. Kimura İki Parametre Uzaklık [Kimura-Two Parameter (Kimura-2P) Distance] Metodu

Nükleotid substitüsyon (yerine geçme) sayısının tahmini için matematiksel bir modelin kullanımına ihtiyaç duyulmuştur. Bu nedenle, birçok araştırmacı farklı substitüsyon modelleri geliştirmiştir.

En basit nükleotid substitüsyon modellerinden biri Jukes ve Cantor's tarafından geliştirilmiştir. Bu model herhangi bir nükleotid substitüsyonunun eşit frekansta meydana geldiğini varsaymaktadır. Ancak bu birçok durumda gerçeği yansıtan bir varsayım değildir. Çünkü, moleküler analiz sonuçları transisyon mutasyonları oranının transversiyon mutasyonları oranına göre daha yüksek olduğunu göstermektedir (Tablo 1) (51).

Tablo 1. Kimura ve Jukes-Cantor nükleotid substitüsyon modelleri (51)

	A	T	C	G
(A) Jukes-Cantor model				
A	-	α	α	α
T	α	-	α	α
C	α	α	-	α
G	α	α	α	-
(B) Kimura model				
A	-	β	β	α
T	β	-	α	β
C	β	α	-	β
G	α	β	β	-

Bu gözlemle ilgili önde gelen hipotez, transisyonların DNA sentezi sırasında sarmal oluşumunda çok daha az kesintiye neden oldukları ve dolayısıyla bu mutasyonların hata olarak algılanması ve derhal düzeltilmesi olasılığının az olduğudur (29). Bu gerçeği dikkate alarak Kimura, 2P metodunu geliştirmiştir. Bu model de, her bir alanda her bir yılda meydana gelen transisyonel substitüsyon oranının (α), transversiyonel substitüsyon oranından (2β) farklı olduğu varsayılmaktadır. Bu nedenle her bir bölgede her bir yılda total substitüsyon oranı (r), $\alpha + 2\beta$ ile belirtilmiştir (Tablo 9). Bu model geliştirildiğinde her bir bölgedeki nükleotid substitüsyon sayısı şu şekilde ifade edilir:

$$d = -(1/2)\ln (1-2P-Q) - (1/4)\ln (1-2Q)$$

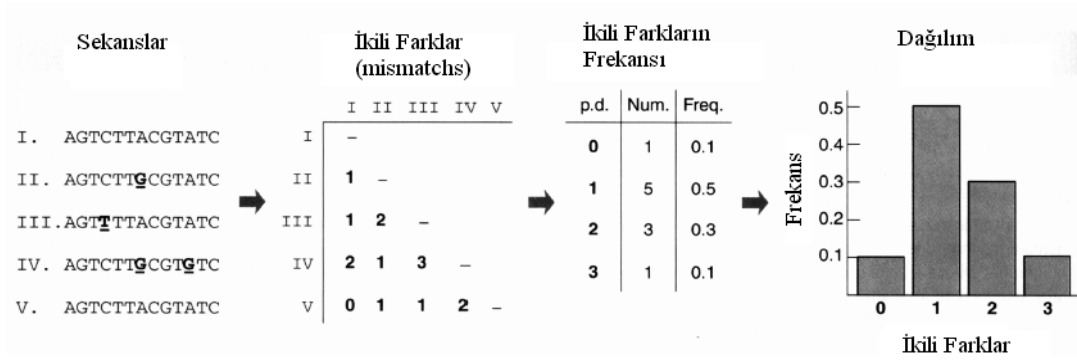
Burada P ve Q sırasıyla transisyon ve transversiyondan kaynaklanan iki sekans arasındaki orandır (51).

3.3.2.3. Uyumsuzluk (Mismatch) Dağılımı

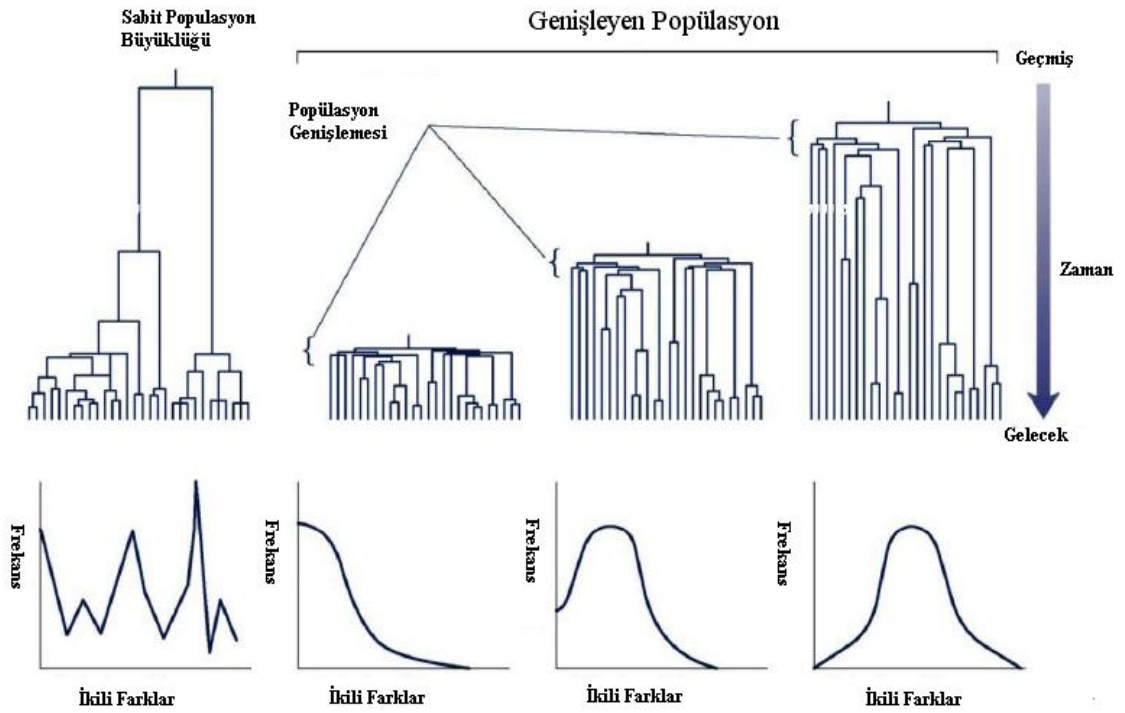
Populasyon içi genetik çeşitliliğin belirlenmesi için birçok ölçüt vardır. Uyumsuzluk dağılımı yöntemi populasyon içi genetik varyasyonu kullanarak populasyonun geçmişi hakkında (örn. Populasyon genişlemesi, yaşı) bilgiler vermektedir.

Uyumsuzluk dağılımı, haplotip çiftleri arasında gözlenen farklılık sayısının frekans dağılımını gösteren grafiksel bir yöntemdir. Populasyonların geçmişteki büyüklükleri hakkında çalışılan lokusa dayalı olarak, ani büyüme gösterip göstermedikleri ya da bir seleksiyon baskısı altında genişleyip genişlemedikleri hakkında bilgi vermektedir (Şekil 11) (39,65). Bu dağılım, populasyon büyüklüğünün uzun periyotlar boyunca sabit kalması söz konusu olmuş ise genellikle multimodal şeklindedir, ancak populasyon büyümesi hızlı gerçekleşmiş ya da seleksiyon baskısı altında genişlemiş ise genellikle unimodal dağılım şeklindedir (60,67).

Sabit populasyon büyüklüğüne sahip populasyonlarda, genişleyen populasyonlara göre bireyler arasında daha fazla mutasyon paylaşılmaktadır. Daha eski zamanda gerçekleşen populasyon genişleme olaylarında daha fazla miktarda mutasyon populasyondaki bireyleri ayırmada görev alır. Uyumsuzluk dağılımı ile gözlenen populasyon genişlemesinin yaşı tahmin edilebilir. Dağılım ortalamasının y-ekseninden uzaklaşması populasyon genişlemesinin daha eski bir tarihte gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 12) (39).



Şekil 11. Uyumsuzluk grafiğinin çizimi (39)

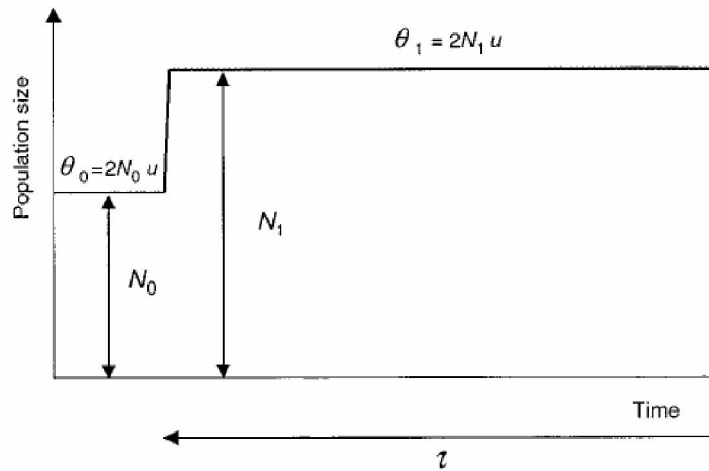


Şekil 12. Farklı zamanlarda genişleme yaşanan popülasyonların uyumsuzluk dağılımları (39)

Uyumsuzluk dağılım grafiğinin oluşturulmasında DnaSP 5 (61) yazılımı kullanılmıştır. DnaSP, sabit popülasyonlarda beklenen değerleri ve gözlenen ikili nükleotid bölge farklılıklarını ve dağılımlarını (örneğin sabit popülasyon büyüklüğü) ve genişleyen ya da azalan popülasyonlarda beklenen değerleri ve gözlenen ikili nükleotid bölge farklılıklarını ve dağılımlarını gösterir. Bu model (infinite site model) üç parametreyi esas alır: Theta initial (θ_0 , popülasyonun büyüme ya da azalmasından önceki theta değeri), Theta final (θ_1 popülasyonun büyüme ya da azalmasından sonraki theta değeri) ve Tau (τ ; mutasyonal zaman birimlerinde büyüme ya da azalma tarihi) (59). Bu model t nesil önce, N_0 başlangıç büyüklüğünde olan popülasyon eşitliğinin aniden yeni N_1 büyüklüğüne ulaştığını ve bu büyüklükte kaldığını varsaymaktadır (Şekil 13) (65).

Theta (beklenen nükleotid farklılık) değeri; $\theta=2Nu$ (nükleer, diploid genetik lokuslar için bu parametre $4Nu$ şeklindedir) olarak formüle edilir.

$\theta_0 = 2N_0u$, $\theta_1 = 2N_1u$, $\tau = 2ut$ formüllerdeki N popülasyon büyüklüğünü, t jenerasyon zamanını ve u her bir jenerasyonda ve her bir sekanstaki toplam mutasyon oranını ifade etmektedir (65).



Şekil 13. Uyumsuzluk dağılımında ani demografik büyüme modeli (65)

Uyumsuzluk dağılımlarında elde edilen unimodal ve multimodal dağılım arasındaki farkı belirlemede ise "Reggadness: r_g " istatistiği kullanılmaktadır. "Reggadness" istatistiği komşu iki tepe arasındaki farkın kareleri toplamına eşittir; (39)

$$r = \sum_{i=1}^{d+1} (x_i - x_{i-1})^2$$

Formüldeki d aleller arasındaki en büyük farkı, x ise alelik değişim frekansını ifade etmektedir. Bu indeks, sabit popülasyonlarda gözlenen multimodal dağılımlarda, hızlı büyüyen popülasyon (unimodal) dağılıma göre daha büyük değerler (sekans verileri için 0.03'den büyük) alır (39).

Bununla birlikte reggadness istatistiği popülasyon genişlemesini belirlemede çok güçlü bir istatistik metodu değildir. Popülasyon geçmişini ortaya çıkarmak için sadece uyumsuzluk dağılımlarına bakmak yeterli değildir (59). Gözlenen genetik varyasyon biçimi popülasyon genişlemesi dışında başka bir nedenle de ortaya çıkmış olabilir. Bu sebeple genetik varyasyonu kullanarak popülasyon geçmişi ile ilgili bilgiye ulaşmaya çalışırken popülasyonun seçilime uğrayıp uğramadığını belirlememiz gerekir (5). Bu amaçla nötralite testleri uygulanır.

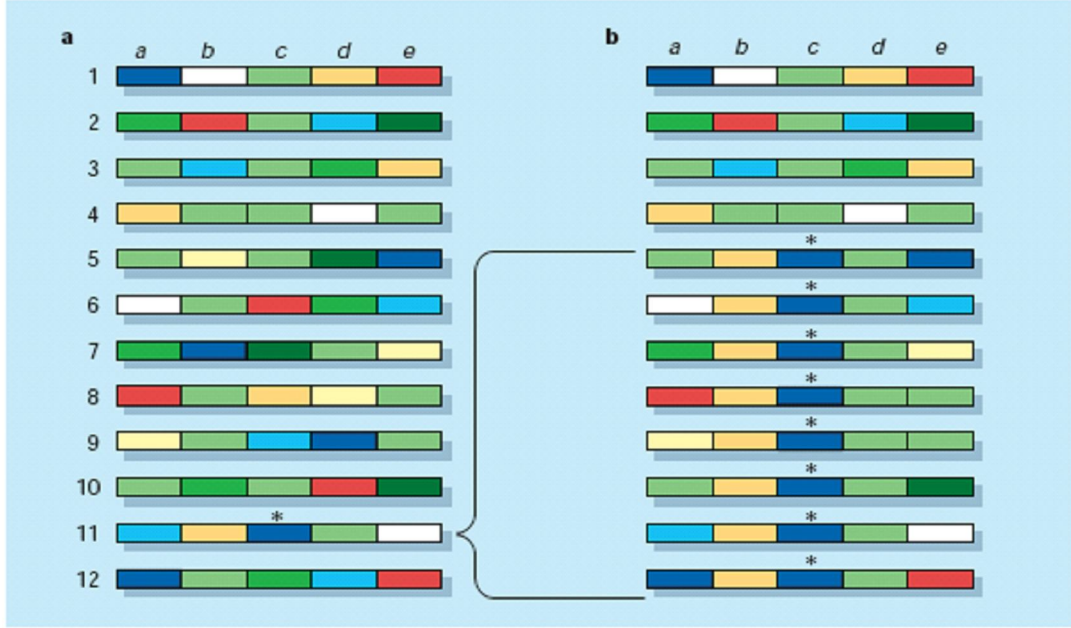
Kimura, amino asit dizi farklılaşmasının gözlenen modellerini açıklamak amacıyla, Moleküler Evrimin Nötral Teorisini formüle etmiştir. Bu teori, popülasyonlarda sabitlenen baz değişimlerinin çoğunun uyum gücü açısından nötr olduğunu ve DNA dizileri düzeyindeki evrimde, genetik sürüklenmenin baskın olduğunu iddia eder. Genetik sürüklenme, kısaca bir popülasyonda kuşaktan kuşağa,

tamamen şansa bağlı olaylar sonucu genlerin alel frekanslarının değişimi olarak tanımlanır (29).

Amino asit dizi değişimleri ile sonuçlanmayan DNA dizi değişimleri suskun bölge (veya sinonim) baz değişimleri olarak adlandırılır; bir amino asit değişimi ile sonuçlanan dizi değişimleri ise değiştirici baz (veya sinonim olmayan) değişimleri şeklinde adlandırılmaktadır. Nötral teoriye göre suskun bölge baz değişimleri, değiştirici baz değişimlerinden daima çok daha yaygın olmalıdır. Bu öngörü, çok sayıda değiştirici baz değişimlerinin zararlı olduğu ve böylece negatif seleksiyon yoluyla ayıklandığı önermesinden çıkarılır (29).

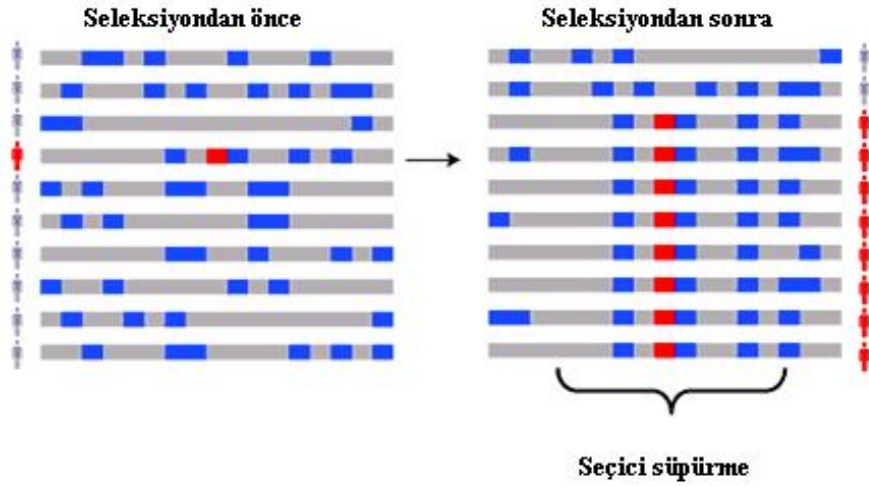
Suskun baz değişimleri üzerine işleyen seçilim mekanizmaları seçici süpürme, beraberinde götürme ve arka plan seçilimi fenomenleri ile açıklanmaktadır (29).

Beraberinde götürme, yakın bağlantıya sahip olunan diğer bir lokus üzerinde olan seçilim nedeniyle bir alelin frekansındaki değişim olarak da tanımlanmaktadır. Beraberinde götürme, belirli bir amino asit yer değişimi üzerine çok güçlü bir pozitif seçilim olduğunda meydana gelebilmektedir. Avantajlı mutasyon sıklığı artırırken (Şekil 14), nötr ya da avantajlı bölgeye oldukça yakın bağlantılı az zararlı mutasyonlar da, avantajlı lokuslarla birlikte sıklığını artıracaktır (29).



Şekil 14. Beraberinde götürme (a, bir kromozom üzerinde bulunan 5 geni (a-e) ve bunların 12 değişik varyasyonunu (1-12) ifade etmektedir. Her bir gen farklı varyasyona sahiptir ve bunlar farklı renklerle ifade edilmiştir. b, Pozitif seleksiyon meydana geldiğinde (asteriksle ifade edilmiştir) frekansını artıracaktır, sadece mavi ile ifade edilen c geni yüksek frekansa sahip olmakla kalmayacak, aynı zamanda yeşil ile ifade edilen d geni ve sarı ile ifade edilen b genlerinin de frekansı artacaktır) (20)

Pozitif seçilim sonucu olarak mutasyona uğrayan DNA bölgesinin yakın komşu kısımlarında genetik varyasyonun azalması ise seçici süpürme (Şekil 15) olarak tanımlanır (39).



Şekil 15. Seçici Süpürme [Nötral seleksiyon altında, yeni faydalı mutasyonun popülasyondaki frekansı artar. Şekilde, seleksiyondan önce ve sonra kromozom boyunca polimorfizm gösteren seleksiyona uğrayan aleller gösterilmektedir. Atasal (yabanıl) aleller gri renkte, değişen (atasal olmayan, mutant) aleller ise mavi renkte gösterilmiştir. Pozitif seleksiyona uğrayan yeni alellin (kırmızı renkte) frekansı arttığı zaman kromozom üzerinde bununla yakın bağlantılı alel de frekansını artıracak ve seçici süpürme meydana gelecektir] (64)

Arka plan seçilimi ise beraberinde götürme ile aynı modele yol açan karşıt süreçtir. Arka plan seçilimi avantajlı mutasyonlar için olan pozitif seçimden daha ziyade, zararlı mutasyonlara karşı oluşan negatif seçim sonucu oluşmaktadır. Beraberinde götürmedeki gibi, rekombinasyonun az olduğu bölgelerde oluşur. Buradaki temel düşünce, zararlı mutasyonlara karşı oluşan seçilimin, yakından bağlantılı nötr yer değiştirmelerini ayıkladığı ve azaltılmış bir polimorfizm düzeyi ürettiğidir. Her ne kadar beraberinde götürme ve arka plan seçilimi olarak adlandırılan süreçler tam olarak ayırt edilemeseler de, en azından bazı durumlarda etkileri ayırt edilebilir. Bir popülasyon içerisinde, bazen avantajlı bir mutasyon hızla süpürülürken, beraberinde götürme polimorfizmde çarpıcı bir azalmaya yol açar. Arka plan seçilimi ise, popülasyondaki bireyleri sık rastlanılan zararlı mutasyonlar tarafından ayıklarken, polimorfizmde yavaş ve kararlı bir düşüşe neden olur.

Günümüzde fikir birliği, bağlantılı bölgelerdeki azaltılmış polimorfizmin en çarpıcı örneklerinden beraberinde götürme sorumlu tutulurken (örneğin, dizi varyasyonlarının tümünden ayıklandığı yerlerde) arka plan seçilimi bu kadar aşırı olmayan durumlardan sorumlu tutulmaktadır (29).

3.3.2.4. Nötralite testleri

Populasyondaki nükleotid sekans varyantları arasındaki doğal seleksiyonun varlığının nasıl belirleneceği, moleküler populasyon genetiğinin önemli bir konusudur. Populasyondaki polimorfizm modelleri sadece mutasyonla, rastgele sürüklenmeyle değil aynı zamanda seleksiyonla da oluşmaktadır. Sekans tekniklerindeki hızlı artış ile DNA seviyesindeki polimorfik verilerin değerlendirilmesinde çarpıcı gelişmeler yaşanmıştır. Bu nedenle, geçmişte meydana gelen seleksiyon etkisinin belirlenmesi için güçlü bir teste büyük bir ihtiyaç duyulmuştur (30).

Populasyon geçmişindeki seleksiyon etkisi nasıl test edilir? Bunun için birçok metot bulunmaktadır. Bunlar genel olarak nötral evrim altında gözlenen ve beklenen farklılık gibi bazı özellikleri karşılaştırmaktadır. Bu metotlar ayrıca "nötralite testleri" olarak bilinmektedir (39). Nötral teori, doğal seçim olmaksızın DNA dizi değişim hızı ve modellerini tanımlar ve DNA dizileri düzeyindeki evrimde, genetik sürüklenmenin baskın olduğunu iddia eder. Bireyler arasında homolog DNA dizileri karşılaştırıldığında ve gözlenen farklılıklar açıklanmak istendiğinde rutin olarak nötral teori sıfır hipotez (null hypotheses) olarak kullanılır. Eğer gerçekte gözlenen değişimler nötral teorinin öngörülerinden farklıysa (dizi değişiminin sürüklenme yoluyla olduğunu ileri süren sıfır hipotezi çürütülmüş ise) ve sözü edilen dizinin organizma için fonksiyonel öneme sahip olduğu önermesi savunulabiliyorsa, doğal

seçilimin moleküler evrime neden olduğu konusunda inandırıcı kanıtlar vardır, çünkü bu durumda nötral teorisinin sıfır hipotezi çürütülmüştür (29).

Sekans bilgisini kullanan ve bu temele dayanan istatistikler üç temel grup da değerlendirilir bunlar; Sınıf I, Sınıf II ve Sınıf III ile ifade edilir. Sınıf I istatistikleri, mutasyon frekansı (segregating site) bilgisini kullanmaktadır. Tajima's D , Fu and Li's D^* ve F^* ve F istatistik testleri bu sınıfta bulunmaktadır. Tajima's D , Fu and Li's D^* ve F^* istatistikleri sadece tür içi (interspesifik) veri bilgisini kullanır. Sınıf II istatistikleri, haplotip dağılım bilgisini kullanmaktadır, Fu's F_s testi bu grupta yer almaktadır. Sınıf III istatistikleri ise, ikili farklar dağılımını kullanmaktadır. Uyumsuzluk dağılımı bu sınıfa dahildir (59).

3.3.2.4.1. Fu and Li's D^* Testi

D^* testi istatistiği η_s (sekanslar arasında sadece bir kez görülen mutasyonlar) ve η (toplam mutasyon sayısı) arasındaki farka dayanır (30).

3.3.2.4.2. Fu and Li's F^* Testi

F^* testi istatistiği ise η_s (sekanslar arasında sadece bir kez görülen mutasyonlar; singleton) ve k (sekanslar arasındaki ortalama farklı nükleotid sayısı) arasındaki farklılığa dayanarak hesaplanır (30).

Fu and Li's D^* ve F^* değerlerinin negatif olması yüksek miktarda ender gözlenen haplotip varlığı ve populasyon genişlemesi ya da arka plan seçilimi olarak yorumlanmaktadır (5).

3.3.2.4.3. Tajima's D Testi

D testi 1989 yılında Japon araştırmacı Tajima tarafından oluşturulan ve bütün mutasyonların doğal seçim ile oluştuğu hipotezini test etmek için kullanılan bir metottur. D testi segregasyon alanları sayısı (S) ile farklı nükleotid sayısı (π) arasındaki farkı esas alır (69).

Tajima's D negatif değer almış ise yeni mutasyonların yüksek miktarda gözleendiğini ve seçici süpürme ya da populusyon genişlemesini, pozitif değer ise yeni mutasyonların çok az miktarda gözleendiğini, populusyon azalması ve dengeli seçilimi ifade etmektedir (5).

3.3.2.4.4. Fu's Fs Testi

Fs testi istatistikleri, Theta (Θ) değeri esas alınarak, haplotip dağılımı bilgisini kullanır. Fu'nun Fs testi istatistikleri populusyon büyümesi, beraberinde götürme ve özellikle arka plan seçimini içeren populusyon genetik modelleri için nötrallite testleri arasında en güçlü istatistiksel metottur. Fu's Fs'in negatif değer alması yüksek miktarda ender gözenlenen haplotip varlığını ve populusyon genişlemesini ya da beraberinde götürmeyi ifade etmektedir (31).

Eğer Fu's Fs değeri önemli buna karşın D* ve F* değerleri önemsiz ise bu durum populusyon büyümesine ya da genişleme aralığına işaret eder (30).

3.3.2.5. Nükleotid Farklılığı (π)

Sekans verileri için populusyondaki polimorfizmi belirlemenin en uygun ölçümü nükleotid farklılığıdır (π). Nükleotid farklılığı, rastgele seçilen iki sekans arasında her bir alanda gözlenen nükleotid farklılığının ortalama sayısıdır. Sekans

dizisinden rastgele çekilmiş, aynı nükleotidin iki kopyasından birinin diğerinden farklı olabilme olasılığını tanımlar (39).

Hesaplamalar DnaSP bilgisayar programı vasıtasıyla yapılmıştır. Bu hesaplamalar Nei'nin (52) iki farklı eşitliğine (I; 10.5 ve II; 10.6) göre yapılmıştır:

$$(I) \quad \pi = n/(n-1) \sum x_i x_j \pi_{ij}$$

ve

$$(II) \quad \pi = \sum x_{ij} / n_c$$

Bu eşitliklerde; n sekans sayısı,

x_i ve x_j sırasıyla i . ve j . sekans frekansları,

π_{ij} bunlar arasındaki farklı nükleotidlerin oranını,

n_c karşılaştırılan toplam sekans sayısını ifade etmektedir.

3.3.2.6. Moleküler Varyans Analizi (AMOVA)

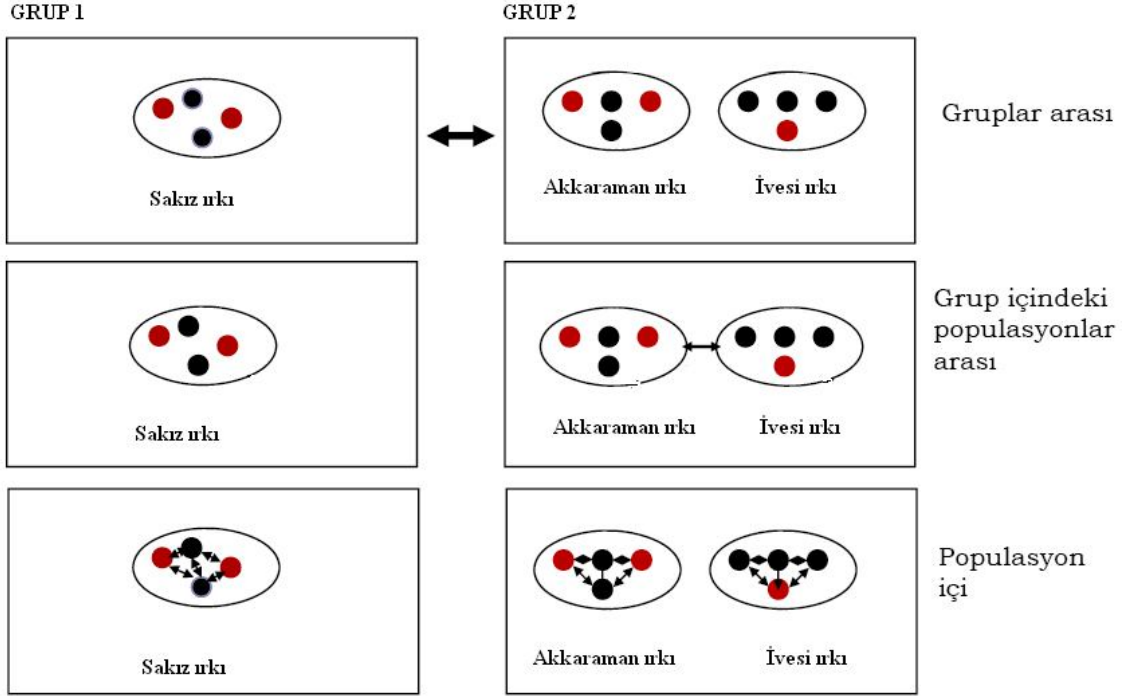
Varyasyon analizi (ANOVA) populasyonların sadece ortalama gen frekanslarını karşılaştırdığı bundan dolayı da alel frekansları ve aleller arası farklılıklarla yani mutasyonlarla ilgili verilerin analizinde yetersiz kaldığından Excoffier ve ark. (27) tarafından moleküler varyans analizi (AMOVA) geliştirilmiştir. Farklı moleküler verilerden elde edilen analizlerde (RFLP, AFLP, DNA sekans verileri) bu metot kullanılabilir. Moleküler varyans analizi bir tür içindeki moleküler varyasyonu incelemek için kullanılmaktadır.

Moleküler varyans analizi toplam genetik varyasyonu şu bölümlere ayırarak incelemektedir; populasyonlardaki gruplar arası, gruplar içindeki populasyonlar arası ve bir populasyon içindeki bireyler arası (54).

AMOVA analizi 1 ve 0 değerlerinden oluşturulan matrislerden türetilen Euclidean uzaklıkları kullanılarak yapılmaktadır. Bu türetilen uzaklık değerleri normal dağılıma benzemektedir. Bu nedenle, normal dağılım göstermesi için veriler tekrar tekrar seçilerek permütasyona tabi tutulur (27,54). Her bir permütasyonda örnek sayısı sabit olmak koşulu ile populasyonun her bir bireyi rastgele seçilmektedir. Bu permütasyon işlemi birçok kez tekrarlanmakta ve en sonunda normal dağılım elde edilmektedir. Daha sonra hipotez testi yapılarak tekrar örnekleme sonucunda elde edilen dağılım test edilmektedir.

Bu test metodunda bireylerin haplotiplerinin rastgele seçildiğı, bağımsız olduğı ve populasyonda örneklenen bireyler arası akrabalık olmadığı ve bu populasyonlarda serbest aşım uygulandığı kabul edilmektedir. Bu nedenle eğer bir populasyonda serbest aşım yoksa ve populasyonda akrabalı yetiştirme varsa heterozigotluk azalacaktır (54).

AMOVA analizi için iki grup oluşturulmuştur. Daha önce yapılan analizler sonucu Akkaraman ve İvesi ırkının Sakız ırkından belirgin şekilde farklılaştığı dikkate alınarak Sakız ırkı birinci grup, Akkaman ve İvesi ırkı ikinci grup olarak gruplandırılmıştır. Bu gruplar içinde Sakız, Akkaraman ve İvesi ırklarının her biri ayrı ayrı bir populasyonu oluşturmaktadır (Şekil 16).



Şekil 16. AMOVA analizi için oluşturulan gruplar

3.3.2.7. F İstatistikleri

Wright'ın F istatistik değerleri, genetik varyasyonu; toplam populasyonlar, alt populasyonlar ve bireyler bazında incelemektedir. Aynı ırkın farklı populasyonları arasındaki genetik çeşitliliği incelemek ve populasyonlar ya da ırklar arası farkı tanımlayabilmek için fiksasyon indeksleri kullanılabilir. Bu indeksler Wright tarafından geliştirilmiş olup sembolleri F_{IT} , F_{IS} ve F_{ST} 'dir. F_{IT} ; populasyon seviyesinde rastgele birleşen iki gametin ortak atadan gelme ihtimalini belirler. Populasyonların akrabalı yetiştirme katsayısı olarak tanımlanabilir. F_{IT} toplam populasyon üzerinden Hardy-Weinberg dengesinden sapmaların ölçümüdür. F_{IS} ; alt populasyonlarda görülen ortalama akrabalık katsayısıdır. F_{ST} ; alt populasyonlar arasında bulunan genetik farklılıkların ölçümü için belirlenen bir değerdir. Bir lokus açısından toplumları karşılaştırmada kullanılır. Alt populasyonlardan rastgele ele

alınan iki gametin müşterek atadan gelme ihtimali olup alt populasyonlar arasındaki genetik farklılığın ölçüsüdür. 0 ila 1 arasında bir değer alır. Belirlenen değer 1'e ne kadar yakın ise alt populasyonlar müşterek atadan oldukça uzaktır denilebilir.

Eğer F_{ST} değeri;

0 – 0.05: küçük bir genetik farklılaşma;

0.05 – 0.15: orta düzeyde farklılaşma;

0.15 – 0.25: büyük bir genetik farklılaşma

> 0.25: çok büyük bir genetik farklılaşmanın mevcut olduğu söylenebilir.

F_{ST} değeri küçük olduğu zaman populasyonların arasındaki varyasyonun küçük olduğu söylenebilir. Yani iki populasyon birbirine genetik olarak benziyor demektir (54).

3.3.2.8. SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant)

Meydana gelen amino asit değişimlerinin fenotipe etkisini değerlendirmek amacıyla SIFT (56) analizi yapılmıştır.

SIFT amino asit substitüsyonlarının protein fonksiyonunu etkileyip etkilemediğini ve böylece fenotipi değiştirip değiştirmediğini sekans homolojisini kullanarak tahmin eder. Önemli amino asitlerin protein ailesi içinde iyi korunmuş olduğunu varsayarak, burada meydana gelecek değişikliklerin zararlı olacağını öngörmektedir (56).

3.4. Araştırmanın Önemi ve Amacı

Türkiye'deki koyun varlığı içinde Akkaraman ve İvesi ırkları önemli bir yere sahiptir. Bunlardan Akkaraman ırkı toplam koyun varlığı içinde % 45.8'lik payıyla birinci sırada yer alır ve bu ırkın ikiz doğum oranı % 20-30'dur. İvesi ise özellikle

Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yetiştiriciliği yapılan sütçü özelliklere sahip bir koyun ırkıdır. Türkiye'deki toplam koyun varlığının % 6.4'ünü oluşturur, ikiz doğum oranı % 10-20'dir. Türkiye'de yetiştirilen koyun ırklarından biri olan Sakız ise, sütçü bir ırktır ve diğer yerli ırklarla karşılaştırıldığında döl verimi oldukça yüksektir. Genelde bir batında ikiz ya da üçüz doğururlar. Bir doğumda 4, 5, 6 ve 7 kuzu doğuran koyunlara da rastlanmaktadır (1). Sakız ırkının bu çoklu doğurma özelliği bu ırkın da diğer türlerde veya ırklarda bildirilmiş olan çoklu doğuma neden olan genleri ya da bu genler ile ilişkili olabilecek başka genleri taşıma olasılığını güçlendirmektedir (57).

Yukarıdaki literatür bildirişlerden de anlaşılacağı üzere, *PRLR* geni ile çoklu doğum özelliği ve diğer bazı üreme özellikleri arasındaki ilişkilerin araştırıldığı çalışmalar çoğunlukla çiftlik hayvanlarından domuzlarda gerçekleştirilmiş olup, koyun ve sığır türlerinde yapılan çalışmalar çok sınırlı sayıda kalmıştır. Özellikle, Türkiye'deki koyun ırkları için *PRLR* geninin polimorfizmlerinin veya bu gen ile çeşitli verim özelliklerinin ilişkilerinin incelendiği çalışmalara yapılan literatür taramalarında ulaşamamıştır. Bu nedenle, koyunlarda çoklu doğumu etkileyen major bir gen ya da bu gibi genlerle yakın bağlantılı bir gen olabileceği ifade edilen *PRLR* geni bakımından Türkiye'deki mevcut potansiyelin ortaya konulmasının hayvan yetiştiriciliği ve ıslahı için yararlı olabileceği düşünülmektedir. Bunun için, öncelikle koyun ırklarında ve sonrasında diğer çiftlik hayvanlarında *PRLR* geni ve diğer aday genlerin polimorfizmlerinin ve çeşitli verim özellikleriyle ilişkilerinin çalışılmasının önemli olduğu gerçeğinden hareketle, bu sürece *PRLR* geninin bazı Türkiye yerli koyun ırklarında polimorfizmlerinin incelenmesinin olumlu katkı sağlayabileceği umut edilmektedir.

Ayrıca, değişik hayvan türleri için döl verimi üzerine etkili olduğu birçok araştırmada ifade edilmiş olan *PRLR* geninin polimorfizminin Türkiye'deki Sakız, Akkaraman ve İvesi ırklarında moleküler düzeyde incelenmesi ve sonrasında bu polimorfizmlerin tespit edilebilmesi halinde özellikle çoklu doğum, diğer bazı döl verimi özellikleri ve süt verim özellikleri ile aralarındaki ilişkileri de inceleyen çalışmaların yapılabilmesi söz konusu olabilecektir. Bu sayede bu ırklar için yapılacak yetiştiricilikte moleküler destekli ıslah programlarının uygulanabilmesi olası hale gelebilecektir.

Koyun yetiştiriciliğinde değişik ırklarda uygulanan farklı yetiştirme programlarında dölverimi için major genlerden yararlanma imkânları bu gibi projelerden elde edilen bulgular sayesinde belki de daha da artacaktır. Özellikle bu alanda araştırmalardan elde edilecek sonuçların etkili ve olumlu şekilde sahaya aktarılması söz konusu olabilirse, damızlık işletmeleri veya koyun yetiştiricileri değişik ırklarda dölverimi yönünden major genleri taşıyan, DNA testine tabi tutulmuş hayvanlar arasından kendi yetiştirme koşullarına en uygun ve istedikleri oranda etkiyi sağlayacak olanları seçebilme şansını yakalayabileceklerdir. Bunun yanı sıra bu genleri taşıyan hayvanların yetiştiricilikte kullanılması ile işletmede sıfat döneminde flaşing uygulamasına gerek kalmadan yavru oranında bir artış olacağından yem giderlerinin düşürülmesi açısından da bir fayda sağlanacaktır.

Ayrıca, hastalık ve karakterlerin genetik düzeyde incelenmesi insanlar ve hayvanlar için alternatif teşhis, tedavi ve korunma yöntemlerinin geliştirilmesine ve hayvansal ürünlerinin daha verimli ve ekonomik üretilmesine olanak sağlar. Bu araştırmadan elde edilecek verilerin, karşılaştırmalı genom çalışmaları yardımıyla ekonomik değeri olan diğer türlerin döl verimi çalışmalarında da kullanılabileceği ayrıca, bu araştırma sayesinde oluşturulacak alt yapı ve bilgi teknolojisinin özellikle

tıp alanında insanların fertilite sorunlarının çözümlmesine yönelik alternatif tedavi yöntemleri oluşturulmasına da katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma, yukarıda ifade edilmeye çalışılan bazı kısa vadeli bazı da uzun vadeli beklentiler şeklinde değerlendirilebilecek hedeflere ulaşmaya yönelik bir başlangıç olarak, Türkiye’de toplam koyun varlığı içindeki önemleri ve verim özellikleri yönünden öne çıkmış olmaları nedeniyle Sakız, Akkaraman ve İvesi ırkı koyunlarda *PRLR* geninin polimorfizmlerinin incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Gereç

Araştırmada, farklı işletmelerdeki Sakız, Akkaraman ve İvesi ırkı koyunlardan alınan, her bir ırktan 50'şer adet olmak üzere toplam 150 adet kan numunesi kullanılmıştır (Tablo 2). Her bir koyundan 2 ml kan alınmıştır. Toplanan bu kan örnekleri, DNA izolasyonları gerçekleştirilinceye kadar – 20 °C' de muhafaza edilmiştir.

Çalışma kapsamında toplanan kanların alındığı koyun ırkları ve koyunların yetiştirildikleri iller (Şekil 17) ile toplanan kan örneklerinin sayıları (Tablo 2) aşağıda verilmiştir.



Şekil 17. Kanların alındığı koyun ırkları ve koyunların yetiştirildikleri iller

Tablo 2. Sakız, Akkaraman ve İvesi ırkı koyunlara ait kan örneklerinin alındığı iller ve örnek sayıları

Koyun İrkları	Kan Örneği Sayısı	Kan Örneklerinin Alındığı İller
Sakız	30	Çanakkale (Ayvacık)
	10	Çanakkale (Bayramiç)
	10	İzmir (Ödemiş)
Akkaraman	20	Kırşehir
	13	Kayseri
	17	Konya
İvesi	10	Gaziantep ve Kilis
	10	Elazığ
	10	Şanlıurfa (Merkez)
	20	Şanlıurfa (Ceylanpınar Tar. İşlt.)

4.2. Yöntem

4.2.1. DNA Örnekleri ve DNA İzolasyonu

Tüm kan örneklerinin DNA izolasyonu “fenol-kloroform ekstraksiyon” yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (62). DNA izolasyonunda uygulanan işlemler sırasıyla aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

- 1 ml kan 0.05 ml Etilendiamin tetraasetikasit (EDTA) (0.5 M; pH 8.0) içeren falkon tüpe koyularak, 2X lysis buffer (10X lysis solusyonu: 770 mM NH_4Cl , 46 mM KHCO_3 , 10 mM EDTA) ile 5 ml’ye tamamlanmıştır.
- 10 dk boyunca tüpler alt üst edilerek iyice karıştırılmış ve 30 dk buzun içinde bekletilmiştir.
- Tüpler 10 dk santrifüj edilmiştir (3000 rpm, + 4 °C).
- Supernatant fazı atılmış ve pelete 0.3 ml salt/EDTA (75 mM NaCl, 25 mM EDTA) eklenerek vortekslenmiştir.

- 0.03 ml % 10 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) solusyonu ve 15 µl proteinase-K (10 mg/ml) eklenmiş ve örnekler 55 °C’ de 3 saat etüvde bekletilmiştir.
- Bekleme süresi bittiğinde 0.3 ml fenol (pH 8.0) eklenmiştir. Tüpler 20 sn oldukça sert bir şekilde çalkalanmış, sonra yumuşak bir şekilde 5 dk boyunca ters yüz edilmiştir.
- Daha sonra tüpler 10 dk santrifüj edilmiştir (3000 rpm, + 4 °C).
- Supernatant fazı temiz ve uygun şekilde etiketlenmiş yeni eppendorf tüpe transfer edilmiş, üzerine 0.3 ml fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) ilave edilmiştir. Tüpler 20 sn oldukça sert bir şekilde çalkalanmış, sonra yumuşak bir şekilde 5 dk boyunca ters yüz edilmiştir.
- Sonra tüpler 10 dk santrifüj edilmiştir (3000 rpm, + 4 °C).
- Supernatant fazı steril ve uygun şekilde etiketlenmiş eppendorf tüpe aktarılmıştır.
- Üzerine iki katı kadar – 20 °C’ de soğutulmuş %95 etanol eklenmiştir. Tüpler sert bir şekilde sallanmış ve yoğunlaşarak çöken DNA ucu kesik pipet ucuyla alınarak etanol içeren eppendorf tüpe aktarılmıştır. Karışım, bir gece – 20 °C’ de bekletilmiştir.
- Eppendorf tüpler 10000 rpm’de, 10 dk santrifüj edilip, santrifüj sonrası alkol dikkatli şekilde dökülmüş ve kalan alkol 10’luk pipet ucu kullanılarak dikkatlice alınmıştır.
- Bu işlemlerin ardından tüpler laminal flowda kurumaya bırakılmış, alkol tamamen uçtuktan sonra 50 µl 10mM Tris HCl (pH 8.0) eklenerek sulandırma yapılmıştır.
- Elde edilen DNA’ların saflığının kontrol edilmesi için Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı’nda bulunan NanoDrop

spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Elde edilen A260-A280 değerleri 1.8 – 2.0 arasında bulunmuştur.

DNA izolasyon işleminin başarılı olup olmadığını kontrol etmek için 2 µl stok DNA, 3 µl 6X loading buffer (bromophenol blue boyası) ve 3 µl dH₂O karıştırılarak jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Örnekler % 1' lik agaroz jelde 100 V' da 20 dk elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Elektroforez sonunda DNA izolasyonunun başarılı olup olmadığı ise ultraviyole ışık altında yapılan görüntüleme sisteminde örneklerin yüklendiği kuyucuklarda parıldama görülüp görülememesiyle değerlendirilmiştir. Şayet parıldama tespit edilmiş ise işlemin başarılı olduğu sonucuna varılmıştır. Daha sonra bu stok DNA'lerden PCR için 1/10 oranında sulandırma yapılmıştır. Yapılan sulandırmaların da PCR için uygun olup olmadığını değerlendirmek amacıyla yine örnekler % 1' lik agaroz jelde yürütülmüş, kuyucuklarda ultraviyole görüntüleme sisteminde parıldama görüldüğünde yapılan işlem başarılı olarak değerlendirilmiştir.

4.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Bu çalışmada elde edilen DNA örneklerinin PCR ile amplifikasyonu için 50 µl'lik karışım hazırlanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu için sağlanan reaksiyon koşulları Tablo 3'de sunulmuştur.

Tablo 3. Kandan izole edilen DNA örneklerine uygulanan PCR için reaksiyon koşulları

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	94	5 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	
Bağlanma	60	30 sn	30
Uzama	72	1 dk	
Son uzama	72	10 dk	1

Primerler, ilgili firmaya 100 nmol olarak sipariş verilmiş, uygun şekilde sulandırılmaları yapıldıktan sonra, Forward ve Reverse primerlerlerin her biri 10 pmol/μl konsantrasyonunda kullanılmıştır. Çalışmada 4 primer çifti kullanılmış ve kolaylık sağlaması açısından primer 1, primer 2, primer 3 ve primer A miks şeklinde hazırlanmıştır. Bölgenin PCR ile çoğaltılmasında kullanılan bileşenler her bir primer çifti için Tablo 4 ve 5’de ve *PRLR* genine ait kullanılan primerlerin baz dizilimleri ise Tablo 6’da verilmiştir. Hazırlanan PCR stok karışımı 0.2 ml’lik tüplere belirtilen miktarda konulmuştur.

Tablo 4. Primer 1, primer 2 ve primer 3 için kullanılan PCR bileşenleri

	PCR bileşimine koyulan miktar (μl)	Stok Konsantrasyon
10X Buffer	5.0	10X PCR Buffer
MgCl₂	5.0	25 mM
200 mM her bir dNTP	2.0	10 mM
Primer (Forward ve Reverse)	1.0	10 pmol/μl
Taq DNA Polimeraz	0.2	5 U/ μl
DNA (50 ng)	1.0-2.0	
dH₂O	34.8-35.8	

Tablo 5. Primer A için kullanılan PCR bileşenleri

	PCR bileşimine koyulan miktar (μ l)	Stok Konsantrasyon
10X Buffer	5.0	10X PCR Buffer
MgCl₂	6.0	25 mM
dNTP	2.0	10 mM
Primer (Forward ve Reverse)	1.0	10 pmol/ μ l
Taq DNA Polimeraz	0.2	5 U/ μ l
DNA	1.0-2.0	
dH₂O	34.8-35.8	

Tablo 6. PCR analizi için kullanılan koyun *PRLR* geni primerleri

Primerler	Büyüklüğü baz çifti (bp)	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
Primer 1	215	CATCTGCTGGAGGTAAGTC	TTCATTGCCCTCTGACGCTT
Primer 2	176	TGTCAGTAAGCGTCAGAGGC	GGCTGGTGGAAGGTCACTCTT
Primer 3	267	ACACATGGAGCAAGGCGTG	GGGAAAGGCCATGTGGAAG
Primer A	391	CATCTGCTGGAGGTAAGTGC	GGCTGGTGGAAGGTCACTCTT

4.2.3. Agaroz Jel Elektroföresi ve Bantların Gözlenmesi

Araştırmada elektroföres çözeltisi olarak tris boric acid EDTA (TBE) kullanılmıştır. Agaroz jel ise % 0.05 ethidium bromide içerecek şekilde, % 2 yoğunlukta hazırlanmıştır. Agaroz jel tekneye hava kabarcığı olmayacak şekilde döküldükten sonra jel tarağı yerleştirilmiş ve jelin katılaşması beklenmiştir. Daha sonra jel, elektroföres tankına yerleştirilmiş ve jelin üstünü tamamen örtecek kadar 1X TBE eklenmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünler kuyucuklara yüklenmeden önce parafilm kesilmiştir. Bu parafilm üzerine kuyucuklara yüklenecek örnek sayısı kadar yükleme çözeltisi (loading buffer), her örnek için 3'er µl olacak şekilde otomatik pipetle koyulmuştur. İki µl yükleme çözeltisinin üzerine örnekler için PCR ürünlerinden 5 µl eklenerek agaroz jelin kuyucuklarına yüklenmiştir. Elektroforez 15 dk 120 V elektrik akımı uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

Elektroforez işlemi sonucunda jel teknesi içindeki jel, tanktan alınarak ultraviyole ışık altında incelenmiştir.

4.2.4. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (SSCP) Analizi

Araştırmada SSCP analizi için her bir PCR ürününden 2 µl alınmış ve 2 µl formamide buffer (% 98 formamide, % 0.025 bromphenol blue, % 0.025 xylen cyanol, 10 mM EDTA pH 8.0) ile karıştırılmıştır. Daha sonra 94 °C'de 10 dk denatürasyon sağlanmıştır. Denatürasyondan hemen sonra örnekler buz üstüne alınmıştır. Sonuçlar, PAGE ile görüntülenmiştir. Poliakrilamid jel % 12 oranında hazırlanmıştır. Jel kompozisyonu; 3 ml akrilamid solüsyonu (akrilamid/bisakrilamid 39:1), 1 ml 10X TBE, 6 ml deionize su, 75 µl Amonyum Persülfat, 10 µl Tetramethylethylenediamine (TEMED) şeklindedir.

Poliakrilamid jelin polimerizasyonundan sonra örnekler kuyucuklara yüklenmiş ve jel 100 V'da 16–17 saat yürütülmüştür. Bantlar gümüş boyama metodu ile görünür hale getirilmiştir. Gümüş boyama yönteminde kullanılan çözeltiler Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Uygulanan gümüş boyama yönteminde kullanılan çözeltiler

Kullanılan çözeltiler	
% 10 asetik asit solusyonu	% 10 ethanol solusyonu
100 ml Asetik Asit	10 ml Asetik Asit
100 ml Ethanol	200 ml Ethanol
1800 ml dH ₂ O	1800 ml dH ₂ O
10X AgNO₃ solusyonu	Geliştirici (developer) solusyonu
8.3 g AgNO ₃	9 g NaOH
500 ml dH ₂ O	300 ml dH ₂ O
	420 µl Formaldehit

Gümüş boyama prosedürü ise aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir (9):

İlk olarak jel 10 dk % 10 asetik asit solüsyonunda bekletilmiş, bu aşamadan sonra, % 10' luk ethanol solüsyonu ile 5 dk yıkanmıştır. Daha sonra ethanol solüsyonu uzaklaştırılmış ve jel 1X gümüş nitrat solüsyonunda 25 dk bekletilmiştir. Yirmibeş dakika sonunda jel 90 sn deiyonize suda yıkanmış ve bantlar görününceye kadar geliştirici solüsyonda (0.75 M NaOH ve % 37 formaldehid) tutulmuştur. Sonrasında, jel görüntüleme sisteminde beyaz ışık altında fotoğraflanmıştır.

Bu araştırmanın planlanıp, yazımı aşamasındaki mevcut koşullar nedeniyle (proje bütçesinin ve süresinin sınırlı olması, örneklerin DNA dizi analizi için birim maliyetinin o tarihlerde oldukça yüksek olması gibi) *PRLR* genine ait polimorfizmlerin yerli koyun ırklarımızdan Sakız, Akkaraman ve İvesi ırklarında üç farklı primer çifti kullanılarak incelenmesi amacıyla DNA izolasyonu, takibinde PCR işlemleri ve sonrasında SSCP yönteminden yararlanmak öngörülmüştür. Bu kapsamda, yukarıda açıklandığı şekilde kan örneklerinin DNA izolasyonları yapılmış ve bu DNA'lar kullanılarak *PRLR* genine ait intron 1 ve ekzon 10

bölgesine spesifik üç çift primerin PCR için optimizasyonu başarılı şekilde gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon sonrası bu primerlerin (primer 1, primer 2 ve primer 3) Sakız, Akkaraman ve İvesi ırkı koyunlar için her bir ırktan 50'şer adet olmak üzere toplam 150 adet örneğinin PCR uygulaması tamamlanarak bir sonraki metot olan yukarıda açıklandığı şekilde SSCP için deneme çalışmaları yapılmıştır. Ancak, yapılan denemeler sonucu her yürütme sonunda farklı motifler elde edilmiştir. Elde edilen motiflerin kontrol örnekleriyle doğrulanması ise tam olarak sağlanamamıştır. Çünkü bu çalışmada ele alınan *PRLR* geni ile ilgili benzer uygulamalar, dünyada daha önce Çin'deki yerli koyun ırkında (Kısa Kuyruklu Han koyunu) yapılmış ve bu araştırma sonuçları doktora tezi için referans olarak kullanılmıştır. Dolayısıyla, SSCP metoduyla elde edilen genotipleri belirlerken, kontrol grubu olarak Kısa Kuyruklu Han koyun ırkına ait DNA örneğine ihtiyaç duyulmuştur. Kontrol grubu olmadan yapılacak genotiplendirmeler ise hatalı ve tartışmalı sonuçlar verebileceği endişesi taşımaktadır. Bu olumsuz durumun önüne geçebilmek için her jel yüklemede, referans alınan makalede genotiplendirilmesi yapılmış kontrol örneklerinin de yüklenmesi düşünülmüştür ancak makalenin yazarlarından Kısa Kuyruklu Han koyun ırkına ait DNA örneğinin temin edilmesi konusunda olumlu bir cevap alınamamıştır. Ayrıca, ilgili kontrol örnekleri kullanılarak SSCP metodu ile genotipler belirlenebilse dahi, genotiplendirme yapıldıktan sonra bu genotipleri oluşturan mutasyonların ve polimorfizme neden olan olası baz değişimlerinin ortaya konulabilmesi için genom bankalarındaki referans dizi ile elde edilen dizilerin, DNA dizi analizi metodu kullanılarak ortaya konulması zorunlu hale gelmiştir

Bu durum, örneklere ait SSCP sonuçlarının tartışmaya açık olacağı endişesini ortaya çıkarmıştır. Ortaya çıkan bu durum ile ilgili olarak, aynı zamanda Fırat

Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP) tarafından 1502 nolu doktora tezi projesi olarak ta desteklenmiş olan bu çalışmaya ek ödenek için, FÜBAP'a başvurulmuş, ancak bütçe yetersizliği nedeniyle talebimiz uygun görülmemiştir. Bu süreçte projede geline son noktada, araştırma sonuçlarının sağlıklı, güvenilir ve tartışmaya açık olmaması amacıyla örneklerin polimorfizmlerinin incelenmesinin DNA dizi analizi metodu ile yapılmasının uygun olacağı kanaatine varılmıştır. Bütün olumsuz koşullara rağmen, mevcut olan bütün imkânlar zorlanmış, örneklerin DNA dizi analizi metodu ile değerlendirilmesi yoluna gidilmiştir.

4.2.5. PCR Ürününün Pürifikasyonu

Hazır kit kullanılarak (Gene Clean Turbo for PCR MP, Cat# 1103600) yapılan bu protokol, PCR ürününü primerler, nükleotidler ve tuzdan uzaklaştırabilmek amacıyla uygulanmıştır. Hazır kitin içinde üç farklı tampon/buffer bulunmaktadır. İlgili protokol aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

- 1 volüm PCR ürünü, 5 volüm buffer solusyonu ile karıştırılmıştır.
- Bu karışım spin column tüplerinin içine konulmuştur. Spin column tüpleri de 2 ml'lik toplama tüplerine (collection tube) yerleştirilerek 14 000 rpm'de 5 sn santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası toplama tüpleri boşaltılmış ve spin column tüpleri tekrar içlerine yerleştirilmiştir. İçlerine 300 µl PCR yıkama buffer eklenerek tekrar 14 000 rpm'de 5 sn santrifüj edilmiş ve toplama tüpleri santrifüj işleminden sonra boşaltılmıştır.
- 14 000 rpm'de 4 sn santrifüj uygulanmıştır.

- Spin column tüpleri 1.5 ml hacimdeki eppendorf tüplerinin içine yerleştirildikten sonra 17 µl elution buffer tüplerin tam ortasına gelecek şekilde eklenmiştir.

- Tüpler 5 dk oda ısısında inkübe edildikten sonra 14 000 rpm'de 30 sn santrifüj edilen pürifiye PCR ürünü zincir sonlanma reaksiyonu için hazır hale getirilmiştir.

4.2.6. Zincir Sonlanma Reaksiyonu

Zincir sonlanma reaksiyonu, pürifiye PCR ürününün, dNTP ve ddNTP içeren hazır kitler (Beckman Coulter DTCS Quick Start) ile incelenecek DNA bölgesinin floresanlı nükleotidlerle işaretlenmesi ve otomatik kapiller jel elektroforez cihazında görüntülenmesi esasına dayanır (6). Bu reaksiyon için hazırlanan bileşenler aşağıda sunulmuştur (Tablo 8).

Tablo 8. Zincir sonlanma reaksiyonu için kullanılan bileşenler

Maddeler	Miktar (µl)
Premix	4
Betain	2
Primer (1.6 pmol)	1
Pürifiye PCR ürünü	1
dH ₂ O	2
Toplam hacim	10

Yukarıda Tablo 8’de verildiği şekilde hazırlanmış olan reaksiyon Tablo 9’da gösterildiği koşullarda amplifiye edilmiştir. Amplifiye edilen ürünler bu işlemde hemen sonra etanol presipitasyonu işlemine tabi tutulmuştur.

Tablo 9. Kullanılan primer A ve primer 3 için sekans PCR koşulları

Sıcaklık ° C	Süre
96	3 dk
96	20 sn.
58	20 sn.
60	4 dk.
10	~

4.2.7. Etanol Presipitasyonu

Araştırmada etanol presipitasyon işlemleri aşağıdaki sırayla gerçekleştirilmiştir:

- 1.5 ml lik eppendorf tüplerine 1 µl 125 mM EDTA (pH 8.0) koyulup, bunun üzerine 10 µl PCR ürünü koyulmuş ve daha sonra da üzerine 1 µl Sodyum asetat eklenmiştir.
- Tüpler kapatılıp vortekslelendikten sonra buz üzerinde duran tüplerin içine 35 µl % 100 etanol eklenmiş ve tekrar vortekslenmiştir.
- Sonra 15 dk oda ısısında inkübe edilmiştir.
- 15 dk sonunda örnekler 14 000 rpm’de 20 dk + 4 °C’de santrifüj edilmiştir.

- Santrifüj sonunda süpernatant yavaşça dökülmüş ve üzerine % 70'lik etanolden 130 µl koyulmuştur.
- Tüpler bir kez alt üst edildikten sonra 14 000 rpm'de 10 dk + 4 °C'de santrifüj edilmiştir.
- Son iki aşama tekrarlanmıştır.
- Tüpler 14 000 rpm'de 45 sn, + 4 °C'de santrifüj edildikten sonra kalan etanolü uçurmak için 10 dk kapakları açık bırakılmıştır.
- Etanolden tamamen uzaklaştırılmış örneklerin üzerine 20 µl formamide eklenmiş ve vortekslenmiştir.
- Ürünler kapiller elektroforez cihazına yüklenmek üzere eppendorf tüpünün cidarı iyice sıvanacak şekilde pipete edilmiştir.
- Her bir örnekten 20 µl olacak şekilde 96'lık platelere yüklenmiş ve bu örneklerin üzerine mineral yağ damlatılmıştır.
- Örnekler otomatik kapiller elektroforez cihazına (Beckman Coulter CEQ 8000) konularak DNA dizi analizi işlemi gerçekleştirilmiştir.

4.2.8. DNA Dizi Analizi

Bu çalışmada, *PRLR* geni için intron 1 ve ekzon 10 bölgesine ait 3 farklı primer tasarlanmıştır. Dolayısıyla 150 bireye ait kan numunesinin 3 farklı primer kullanılarak yükseltgenmesi planlanmıştır ki bu da 450 reaksiyonu kapsamaktadır. Ancak, açıklandığı gibi SSCP analizi sonucu elde edilen verilerin güvenilir olmayacağı gerçeği nedeniyle örneklerin analizi DNA dizi analizi metodu ile yapılmıştır. Bunun için de mümkün olduğunca çok örneğin DNA dizi analizinin yapılabilmesinin yararlı olacağı anlaşılmıştır. Bu noktadan hareketle araştırmadaki

örnekler için uygulanan DNA dizi analizinde oluşacak masrafları azaltmak amacıyla 1. intron bölgesinde primer 1 ve primer 2 için yeni tasarlanmış olan primerin (Forward: CATCTGCTGGAGGTAAGTGC, Reverse: AAGAGTGACCTTCCACCAGCC) 391 bp tek bir bölge halinde yükseltgenmesi sağlanmış, bu yeni primere Primer A denilmiştir (Tablo 5). Primer 3 için (276 bp) aynı koşullar sürdürülmüştür. Bu uygulama sayesinde DNA dizi analizi için toplam reaksiyon sayısı 300'e (primer 1 ve 2 için 150 örnek, primer 3 için 150 örnek) indirilmiş ve maliyetin de bu sayede azaltılması amaçlanmıştır. Bunlardan ancak 100 örnek primer A ve 100 örnek de primer 3 için olmak üzere toplam 200 örnek sekanslanabilmiştir. Buna göre primer A için 29 adet Sakız, 34 adet Akkaraman, 36 adet İvesi ırkına ait örnekler olmak üzere toplam 99 örnek başarılı bir şekilde sekanslanırken, primer 3 için sekanslanan 100 adet örnekten ancak 61'in de başarılı sonuç alınabilmiştir. Primer 3 için sekanslanan örnek sayısı ise ırk dağılımına göre; 18 adet Akkaraman, 28 adet Sakız, 15 adet İvesi şeklinde gerçekleşmiştir.

Araştırmada Sakız, Akkaraman ve İvesi ırkı koyunlara ait kan örnekleri kullanılarak koyun *PRLR* geninde polimorfizmlerin incelenmesi amacıyla oluşturulan primer A (intron 1) ile primer 3 (ekzon 10) kullanılmıştır. Uygulanan optimizasyon çalışmaları sırasında her iki primer için de Reverse primerlerden daha iyi okuma sağlanmış ve dizi reaksiyonu Reverse primerler ile gerçekleştirilmiştir.

Pürifiye PCR ürününün dNTP ve ddNTP içeren hazır Beckman Coulter DTCS Quick Star kiti ile incelenecek DNA bölgesinin floresanlı nükleotidlerle işaretlenmesi amacıyla uygulanan zincir sonlanma reaksiyonunda kullanılan premix miktarı protokolde önerilen miktar yerine 4 µl'ye düşürülmüş ve dizileme yapılabilmektedir. Bu sayede en yüksek maliyeti oluşturan DTCS Quick Star kitin

kullanım miktarının yarıya indirilmesi ile dizileme maliyeti büyük miktarda azaltılmıştır.

DNA baz dizileme reaksiyonu sonucu elde edilen elektroferogramlarda zayıf sinyaller ya da karmaşık sinyaller alındığı durumlarda, zincir sonlanma reaksiyonunda kullanılan PCR ürünü miktarı artırılarak sonuca gidilmiştir. Aynı şekilde GC'den zengin gen bölgesi için denatürasyon ısısı 96–98 °C de tutulmuştur. Manipulasyon hatalarından kaynaklanan sorunlar ise reaksiyonların tekrar tekrar yapılması ile giderilmeye çalışılmıştır.

Kapiller elektroforezin çalışması süresince her bir sekans reaksiyonuna ait baz dizisine ait veriler otomatik olarak bilgisayarda depolanmış ve bir sonraki uygulamalar için hazır hale getirilmiştir.

DNA dizi analizinde kullanılan her bir ddNTP farklı floresan boya ile boyanma özelliğine sahiptir. Bunlardan, ddCTP mavi, ddTTP kırmızı, ddATP yeşil ve ddGTP siyah renktedir, bu sayede elektroferogramda elde edilen pikler farklı renkleri ile birbirinden ayrılmaktadır. Sonuçlar bu renk dizilimine göre tespit edilmiştir.

4.2.9. DNA Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Haplotipik (tek bir kromozomda yer alan ve birbirine yakın lokuslarda bulunan alel kompleksleri bir haplotip olarak adlandırılır) ya da genotipik lokuslar kullanarak elde edilen moleküler verilerin irdelenmesi, en uygun metotları seçerek evrimsel ilişki ağacı ya da network analizleri yapmak için çeşitli yazılımlar kullanılmaktadır. Bu analiz yazılımlarının kullanılabilmesi için elde edilen veriler ile programlara uygun bir girdi dosyası hazırlanması ihtiyacı söz konusu olmaktadır.

Araştırmada rneklerin DNA dizi analizleri sonunda elde edilen bütün sekanslar, her bir bireyin aynı lokusuna ait Reverse primerler ile elde edilen dizilerin kromatogramlarının incelenmesi ve her bir birey için ilgili bölgenin en ortak dizilerinin oluşturulması amacıyla Bioedit programı kullanılarak referans diziyle hizalanmıştır. Bu işlemler primer A ve primer 3 için ayrı ayrı uygulanmıştır. Hizalanan dizilerin baştan aynı hizadaki baz ile başlayıp sondan aynı hizadaki baz ile bitmesi gerektiğinden, fazlası olan diziler başlangıç ve sondan kesilmiştir. Bu şekilde aynı uzunluğā getirilen diziler fasta formatında kaydedilerek istenilen istatistik programları ile analize hazır hale getirilmiştir. Yukarıda belirtildiğı şekilde kapiller elektroforez cihazında uygulanan DNA dizi analizi işlemi sonrası elde edilen sonuçlar, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> veri tabanında değerdendirilerek, analiz edilen koyun *PRLR* gen bölgesi normal gen dizisi ile kıyaslanmış ve mutasyon analizleri yapılmıştır.

Ayrıca, Sakız, Akkaraman ve İvesi ırklarında *PRLR* geninin farklı aleller taşıyıp taşımadığını incelemek için genin fonksiyonel bölümlerinin dizilenmesi sonucu elde edilen sekanslar vasıtasıyla, ırk içi ve ırklar arası varyasyonun belirlenmesine yönelik DnaSP 5 (61) bilgisayar programında analiz edilmiş, her bir ırka ait haplotip yapısı ortaya çıkarılmıştır. Araştırma kapsamında incelenen örneklerin sekans analizleri, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

4.3. İstatistiksel Analizler

4.3.1. Komşu Birleştirme Ağacı Metodu

Bu metot, genetik uzaklıkların görsel olarak belirtilmesi amacıyla uygulanmıştır.

Sekans verilerinin komşu birleştirme ağacı Kimura-two parameter (Kimura-2P) modeline dayanarak, MEGA 4 (70) yazılımı kullanılarak oluşturulmuştur.

4.3.2. Uyumsuzluk (Mismatch) Dağılımı

Uyumsuzluk dağılım grafiğinin oluşturulmasında DnaSP 5 (61) yazılımı kullanılmıştır.

4.3.3. Nötralite Testleri

Nötralite testleri ile ilgili bütün hesaplamalar DnaSP 5 programı (61) ile yapılmıştır.

4.3.4. Nükleotid Farklılığı

Sekans verilerine ait nükleotid farklılığının hesaplanmasında DnaSP 5 (61) yazılımı kullanılmıştır.

4.3.5. Moleküler Varyans Analizi ve F İstatistikleri

Moleküler varyans analizleri ve F istatistikleri Arlequin ver. 3.0 (26) programı kullanılarak yapılmıştır.

4.3.6. SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant)

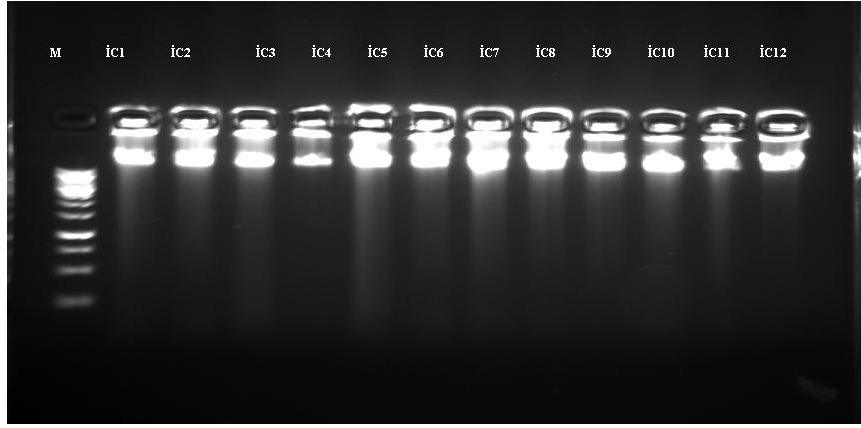
SIFT analizleri Pauline ve Henikoff (56)'un bildirdiği şekilde uygulanmıştır.

5. BULGULAR

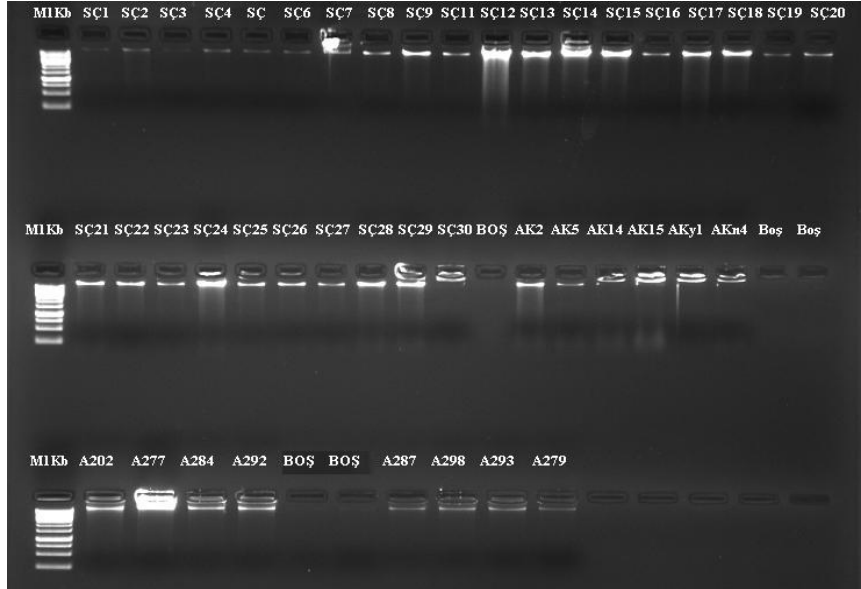
5.1. DNA İzolasyonu ve PCR

Araştırmanın daha önceki gereç ve yöntem kısmında da belirtildiği gibi toplam 150 adet kan örneğinin "fenol kloroform DNA izolasyon" protokolüne göre DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonunun başarılı olup olmadığını değerlendirmek üzere izolasyondan sonra örnekler, %1'lik agaroz jelde 30 dk elektroforez işlemine tabi tutulmuş ve bu süre sonunda ethidium bromid'e bağlanan DNA'ların floresan parıldama vermesi ile izolasyonun başarısı doğrulanmıştır (Şekil 18,19). Daha sonra bu stok DNA'lardan PCR için 1/10 oranında sulandırma yapılmıştır. Bu amaçla 5 µl stok DNA üzerine 50 µl dH₂O eklenmiştir. Aynı şekilde yapılan sulandırmaların PCR için uygun olup olmadığının değerlendirilebilmesi için örnekler % 1' lik agaroz jelde yürütülmüş, ultraviyole görüntüleme sisteminde kuyucuklarda parıldama görüldüğünde işlemin başarılı olduğu sonucuna varılmıştır.

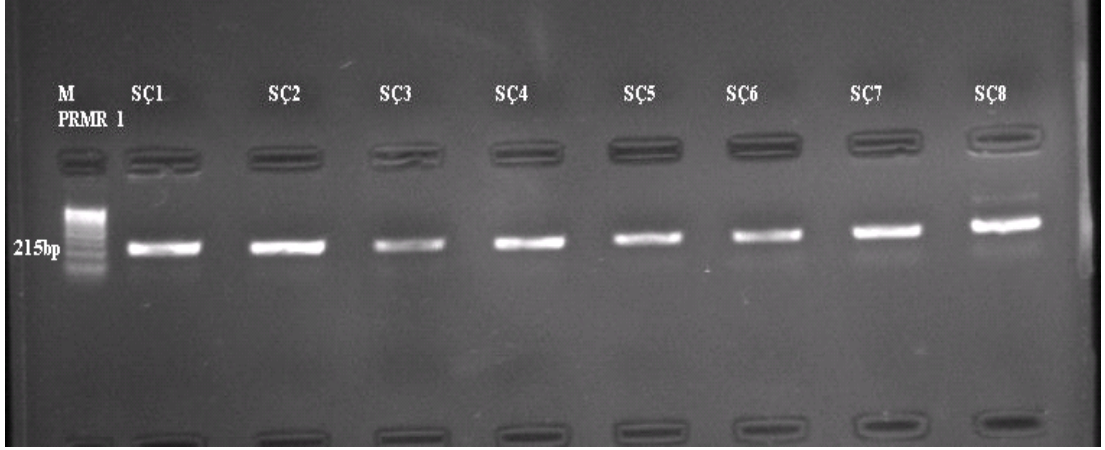
Örneklere ait kanlardan elde edilen DNA'lar ile yapılan PCR'ın başarısı ise PCR sonunda elde edilen amplikonların % 2' lik agaroz jel elektroforezinde primer 1 çifti için 215 bp, primer 2 çifti için 176 bp, primer 3 çifti için 267 bp ve primer A çifti için ise 391 bp' lik tek bantların gözlenmesi ile doğrulanmıştır. Elde edilen bantlar Şekil 20-23'de gösterilmiştir.



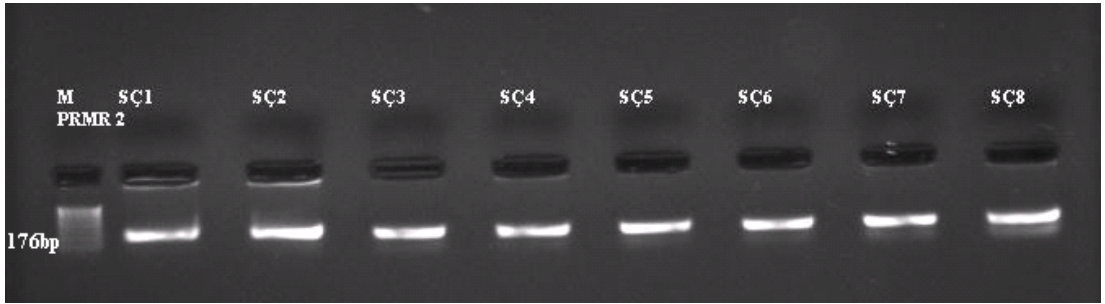
Şekil 18. Elde edilen stok DNA'ların % 1'lik agaroz jel görüntüsü (M: 1Kb DNA ladder, İC: İvesi-Ceylanpınar 1-12 numaralı örnekler)



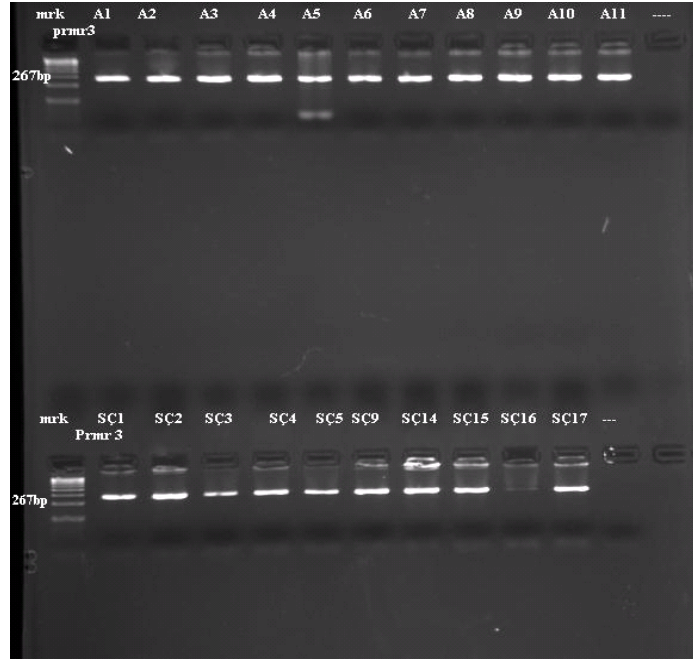
Şekil 19. PCR için dilüe edilen DNA'ların % 1'lik agaroz jel görüntüsü (M: 1Kb DNA ladder, SÇ: Sakız-Çanakkale 1-30; AK: Akkaraman-Kırşehir; AKy: Akkaraman-Kayseri; A202,A277,A284,A292,A287,A298,A293,A279: Akkaraman-Konya örnekleri)



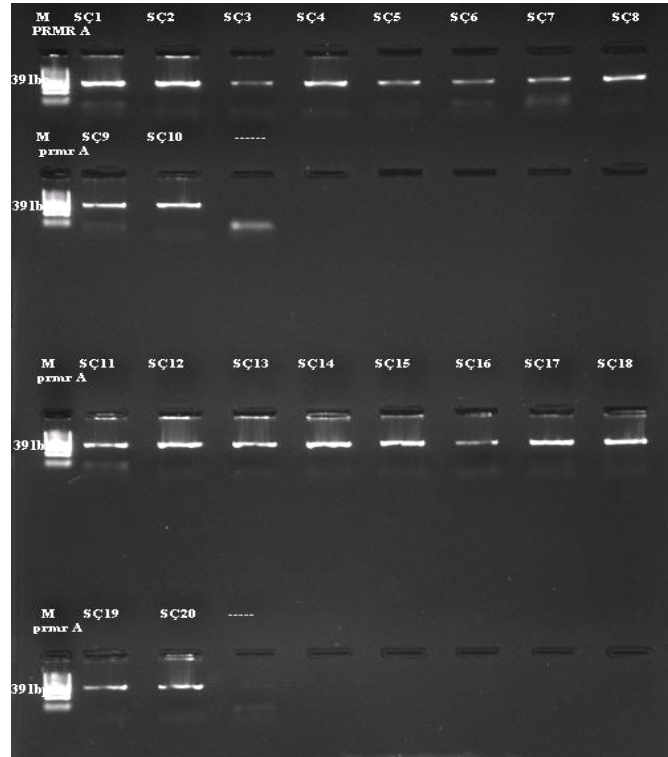
Şekil 20. PCR sonunda elde edilen primer 1'e ait 215 bp'lik bölgenin % 2'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bp'lik DNA Marker, SÇ: Sakız-Çanakkale)



Şekil 21. PCR sonunda elde edilen primer 2' ye ait 176 bp'lik bölgenin % 2'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bp lik DNA Marker, SÇ: Çanakkale'den alınan Sakız ırkına ait örnekler)



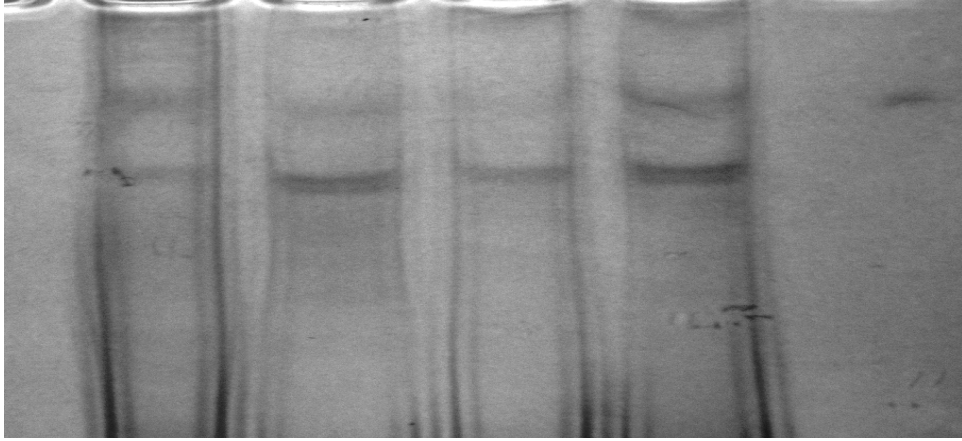
Şekil 22. PCR sonunda elde edilen primer 3' e ait 267 bp' lik bölgenin % 2' lik agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bp'lik DNA Marker, SÇ: Sakız-Çanakkale, A: Akkaraman, (--): negatif kontrol)



Şekil 23. PCR sonunda elde edilen primer A' ya ait 391 bp'lik bölgenin % 2' lik agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bp' lik DNA Marker, SÇ: Sakız-Çanakkale, (--) : negatif kontrol)

5.2. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (SSCP) Analizi

Poliakrilamid Jel elektroforezi (PAGE) sonucu elde edilen, ancak genotiplendirilmede kullanılmayan jel örneği Şekil 24’de gösterilmiştir.

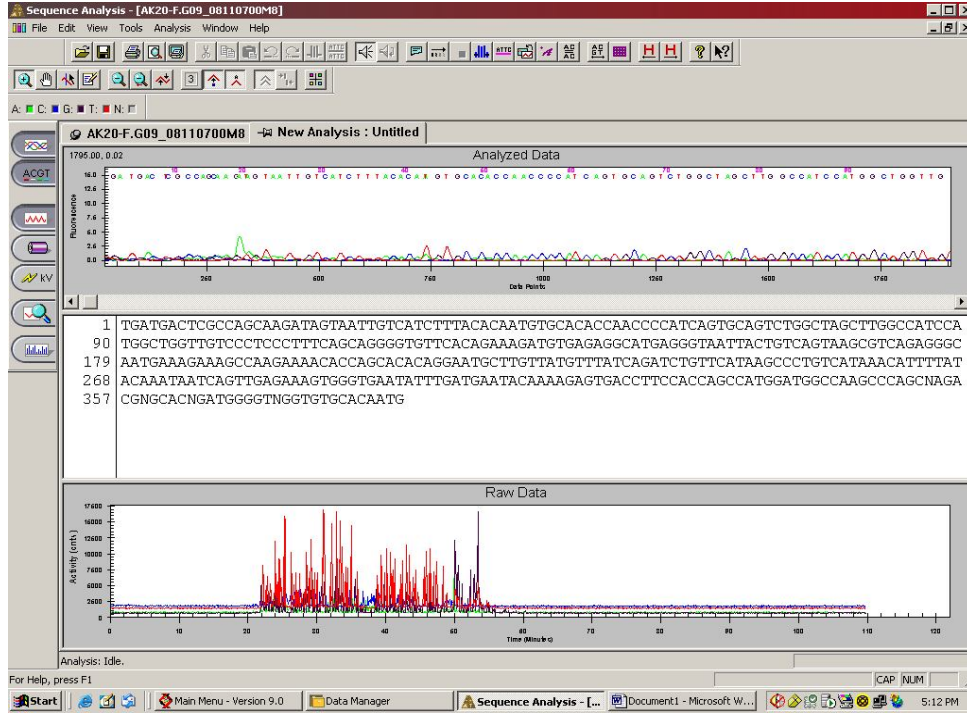


Şekil 24. Primer 3 için Sakız ırkına ait örneklerin SSCP sonucu elde edilen jel fotoğrafı

5.3. DNA Dizi Analizi

PRLR geninde primer A ve primer 3’de, her bir örnek için sekans maliyetinin yüksek olması ve gerekli bütçenin sağlanamaması nedeniyle tek okuma yapılmıştır. Uygulanan optimizasyon çalışmaları sırasında her iki primer için de Reverse primerlerden daha iyi okuma sağlanmış ve dizileme reaksiyonu Reverse primerler ile tamamlanmıştır.

Kapiller elektroforezin çalışma süresince her bir sekans reaksiyonuna ait DNA baz dizisi verileri (Şekil 25) otomatik olarak bilgisayarda depolanmış ve bir sonraki uygulamalara hazır hale getirilmiştir.



Şekil 25. Uygulanan DNA dizi analizi çalışmalarına ait elektroferogram örneği

Otomatik kapiller jel elektroforezi DNA baz dizilemesinde büyük kolaylıklar ve avantajlar sağlamasına karşın, yöntemin hassas olmasından dolayı bazı zorlukları da içinde barındırmaktadır. PCR pürifikasyonunda, etanol presipitasyonunda, PCR ürününün dizileme döngü reaksiyonunda (sekans PCR) ve kullanılan DNA miktarında optimizasyon yapılması gerekmektedir. Bunlara rağmen sonuç alınamayan örnekler üzerinde tekrar tekrar çalışılmış ancak zaman, kimyasal madde ve iş gücü sınırları nedeniyle dizi okunması tamamlanamayan örneklerin incelenmesi daha sonraki bir sürece ertelenmek zorunda kalınmıştır.

Araştırmada primer A bölgesi için tüm koyun ırklarında 6 farklı haplotip belirlenmiştir (Tablo 10). Bu haplotipleri oluşturan varyasyonlar Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 10. Sakız, Akkaraman ve İvesi ırklarında primer A için elde edilen haplotip sayıları ve buna yol açan mutasyon noktaları (haplotip 1: referans diziyi ifade etmektedir)

	Absolute Position									
1 Hap 1	c	a	g	c	c	c	c	a		
2 Hap 2	.	.	.	.	.	t	.	.		
3 Hap 3	t	.	.	.	.	t	.	.		
4 Hap 4	.	.	a	.	.	t	.	.		
5 Hap 5	t	.	a	.	.	t	.	.		
6 Hap 6	.	c	.	t	g	t	t	g		

Primer A için en fazla gözlenen haplotip H2, en az görülen ise H5 olmuştur. Akkaraman ırkında haplotip 1, 2, 3 ve 4; İvesi ırkında haplotip 1, 2, 3, 4, 5; sakız ırkında ise haplotip 1, 3, 4, 6 gözlenmiştir. Bu haplotiplerden haplotip 6 sadece Sakız ırkında belirlenmiştir (Tablo 12). Haplotip 1 referans dizisinde (AF042358) içinde olduğu ve herhangi bir mutasyon içermeyen dizidir. Buna göre Akkaraman ırkında 2, İvesi ırkında 1 ve Sakız ırkında 2 birey (toplam 5 hayvan) bu haplotipe dahildir. Irkların haplotip dağılım grafiği Şekil 26’da gösterilmiştir.

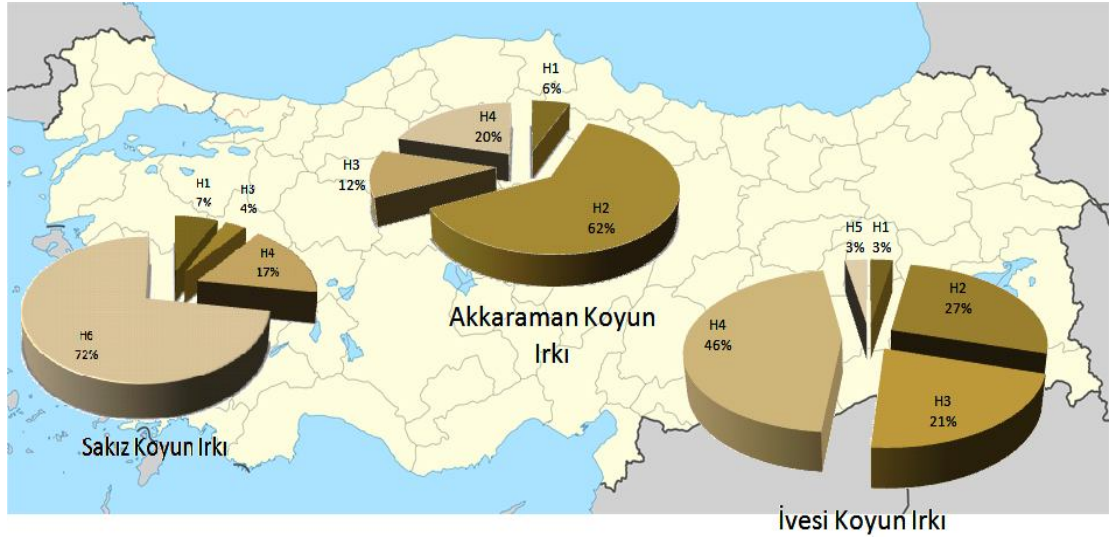
Tablo 11. *PRLR* primer A için gözlenen haplotipler. H: haplotipi ifade etmektedir (H1: referans dizi)

Nükleotid pozisyonu (Nt)	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
	4	5	2	2	2	2	2	3
	9	8	0	3	4	7	8	0
			1	4	2	2	1	0
H1	C	A	G	C	C	C	C	A
H2	C	A	G	C	C	T	C	A
H3	T	A	G	C	C	T	C	A
H4	C	A	A	C	C	T	C	A
H5	T	A	A	C	C	T	C	A
H6	C	C	G	T	G	T	T	G

İrklar bazında haplotipleri taşıyan hayvan sayıları ve nispi frekansları Tablo 12’de gösterilmiştir.

Tablo 12. Primer A için Sakız, Akkaraman ve İvesi ırklarında gözlenen haplotip dağılımı ve nispi haplotip frekansları (H: haplotipi ifade etmektedir)

Haplotipler	Akkaraman İrki (n: 34)	Frekans	İvesi İrki (n: 36)	Frekans	Sakız İrki (n: 29)	Frekans	T oplam (n: 99)
H1	2	0.0588	1	0.027	2	0.0690	5
H2	21	0.6180	10	0.270	-	-	31
H3	4	0.1180	8	0.216	1	0.0345	13
H4	7	0.2060	17	0.459	5	0.1720	29
H5	-	-	1	0.027	-	-	1
H6	-	-	-	-	21	0.7240	21



Şekil 26. Primer A için Sakız, Akkaraman ve İvesi ırklarında gözlenen haplotip dağılımları (H: Haplotip)

Araştırmada, primer 3 bölgesinde koyun ırklarının tamamında referans dizi hariç 7 farklı haplotip belirlenmiştir (Tablo 13). Varyasyon noktaları ve amino asit değişimleri Tablo 14’de gösterilmiştir.

Tablo 13. Sakız, Akkaraman ve İvesi ırklarına ait primer 3 için elde edilen haplotipler (H1: referans diziyi ifade etmektedir)

	Absolute Position													
1	Hap 1	a	a	a	a	g	g	a	a	c	g	t	g	
2	Hap 2	t	.	g	g	.	a	.	.	.	.	.	.	
3	Hap 3	t	.	g	g	.	.	.	.	.	.	.	.	
4	Hap 4	t	.	.	g	a	.	.	t	t	a	c	a	
5	Hap 5	t	.	.	g	a	.	.	t	t	a	c	.	
6	Hap 6	t	.	.	g	a	.	t	t	t	a	c	.	
7	Hap 7	t	t	.	g	a	.	.	t	t	a	c	.	
8	Hap 8	t	t	.	g	a	.	.	t	t	a	c	a	

Primer 3'e ait 8 haplotipten H1 referans diziyi (AF041257) içermektedir. Diğer haplotiplerin koyun ırklarına göre dağılımı ise; Akkaraman ve İvesi ırkında haplotip 2 ve 3; Sakız ırkında ise haplotip 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 şeklinde gözlenmiştir. En fazla gözlenen haplotip H3, en az gözlenen ise H6 olmuştur (Tablo 15).

Tablo 14. *PRLR* primer 3 için gözlenen haplotipler ve amino asit değişiklikleri (Sadece varyasyon gösteren amino asit değişimleri tabloda gösterilmiştir. H: Haplotipi ifade etmektedir.)

Irklar	Nükleotid pozisyonu (Nt)	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
		2	1	8	1	1	1	1	1	1	2	2	2
			4	1	3	6	6	6	7	8	0	0	0
					8	0	6	7	6	6	6	7	8
	AA		Q			D	E	E	H		S		G
	değişikliği		1			1	1	1	1		2		2
			4			6	6	6	7		0		0
			L			0	6	7	6		6		8
						N	K	V	L		N		R
Referans	H1	A	A	A	A	G	G	A	A	C	G	T	G
Akkaraman ve İvesi	H2	T	A	G	G	G	A	A	A	C	G	T	G
Akkaraman ve İvesi	H3	T	A	G	G	G	G	A	A	C	G	T	G
Sakız	H4	T	A	A	G	A	G	A	T	T	A	C	A
Sakız	H5	T	A	A	G	A	G	A	T	T	A	C	G
Sakız	H6	T	A	A	G	A	G	T	T	T	A	C	G
Sakız	H7	T	T	A	G	A	G	A	T	T	A	C	G
Sakız	H8	T	T	A	G	A	G	A	T	T	A	C	A

Irklar bazında haplotipleri taşıyan hayvan sayıları ve nispi frekansları Tablo 15’de, ırkların haplotip dağılım grafikleri ise Şekil 27’de gösterilmiştir.

Tablo 15. Primer 3 için Sakız Akkaraman ve İvesi ırklarında gözlenen haplotip dağılımı ve nispi haplotip frekansları (H: haplotipi ifade etmektedir)

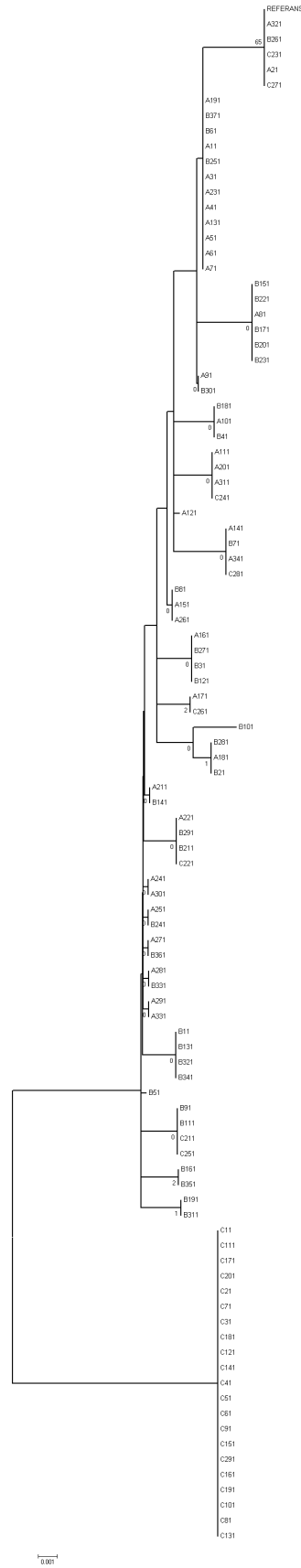
Haplotipler	Akkaraman İrki (n:18)	Frekans	İvesi İrki (n: 15)	Frekans	Sakız İrki (n: 28)	Frekans	Toplam (n: 61)
H2	9	0.5	7	0.467	1	0.0357	17
H3	9	0.5	8	0.533	2	0.0714	19
H4	-	-	-	-	2	0.0714	2
H5	-	-	-	-	12	0.4290	12
H6	-	-	-	-	1	0.0357	1
H7	-	-	-	-	8	0.2860	8
H 8	-	-	-	-	2	0.0714	2



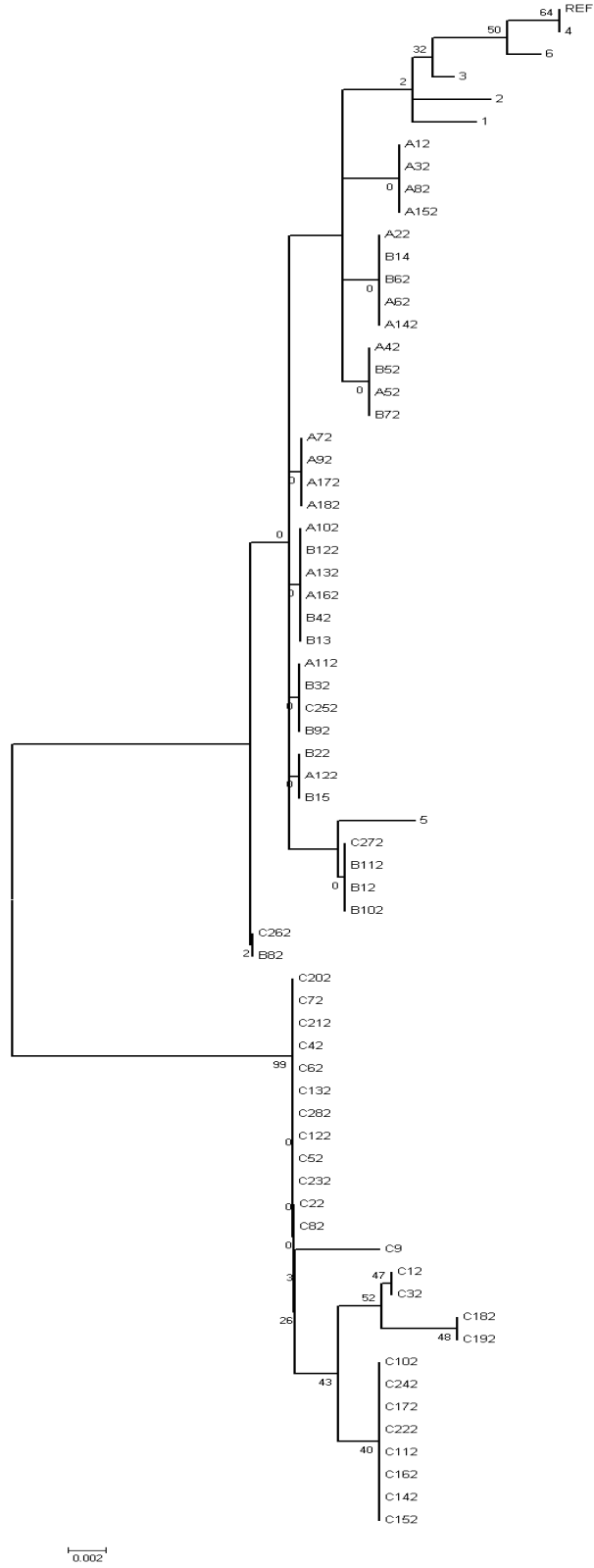
Şekil 27. Primer 3 için Sakız, Akkaraman ve İvesi ırklarının haplotip dağılımları (H: Haplotip)

5.4. Komşu Birleştirme Ağacı ve Network Analizi

Hem primer A bölgesi hem de primer 3 için haplotipler arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılmasında Kimura 2P modelini esas alan komşu birleştirme ağacı metodu kullanılmıştır. Primer A ve primer 3 için filogenetik ağaçlar çizilirken "bootstrap" (bağla-çöz) testi yapılmıştır (Şekil 26,27) yani ağaç çizim işlemi bilgisayar programında bootstrap değeri 1000 kere tekrar edilmiştir. Sekanslar arasında karşılaştırma yapmak ve bölgenin daha ayrıntılı incelemesini sağlamak amacıyla elde edilen veriler yaban koyunu *PRLR* genine ait baz dizileri ile de kıyaslanmak istenmiştir ancak böyle bir çalışma yapılmadığından, istenilen baz dizisine ulaşamamış ve sekanslar bu farklılaşmayı tespit etmek amacıyla karşılaştırılamamıştır. Primer 3 için Rusya, Finlandiya ve Polonya koyun ırklarına ait sekanslar (NCBI erişim numarası: FJ901296, FJ901297, FJ901298, FJ901299, FJ901300 ve FJ901301) karşılaştırma yapmak için kullanılmıştır. Sakız ırkı ile Akkaraman ve İvesi ırkının birbirinden farklılaştığı gözlenmiştir (Şekil 28,29). Primer 3 için çizilen filogenetik ağaca dahil edilen Rusya, Finlandiya ve Polonya yerli koyun ırklarının Akkaraman ve İvesi ırkıyla aynı grup içinde yer aldığı, Sakız ırkından ise farklılaştığı gözlenmiştir.

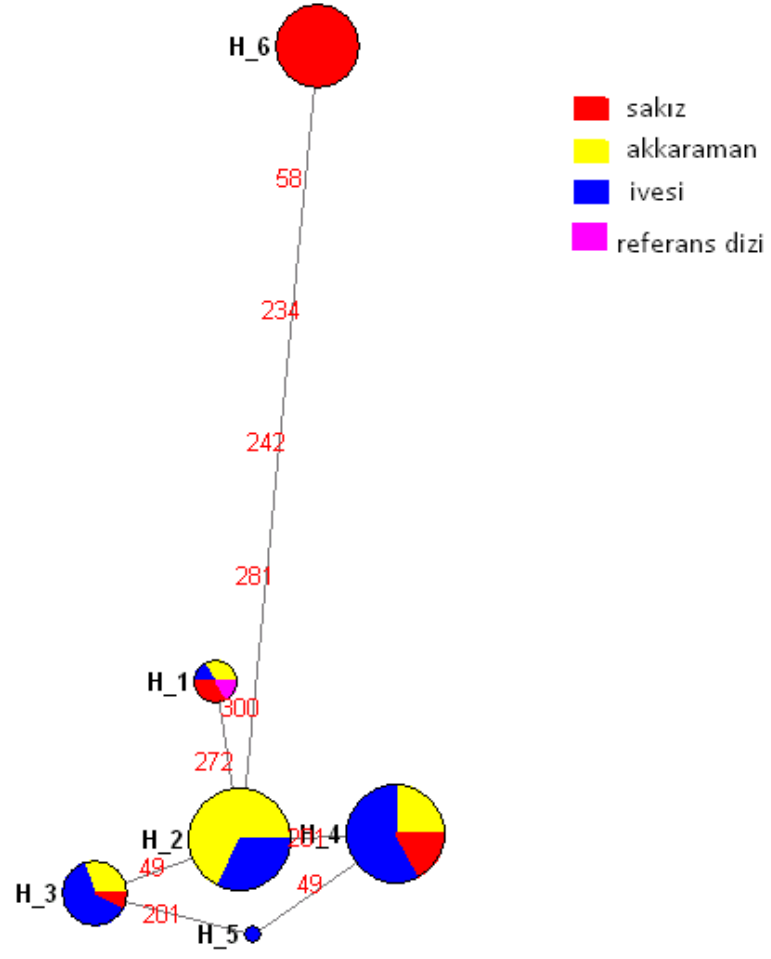


Şekil 28. Akkaraman, İvesi ve Sakız ırklarının referans sekansla birlikte primer A için çizilen bootstrap konsensus komşu birleştirme ağacı [Primer A için harflerin temsil ettikleri popülasyonlar ‘A’ Akkaraman (örn A1.1) , ‘B’ İvesi (örn B2.1) ve ‘C’ Sakız (örn. C3.1) şeklinde ifade edilmiştir.]

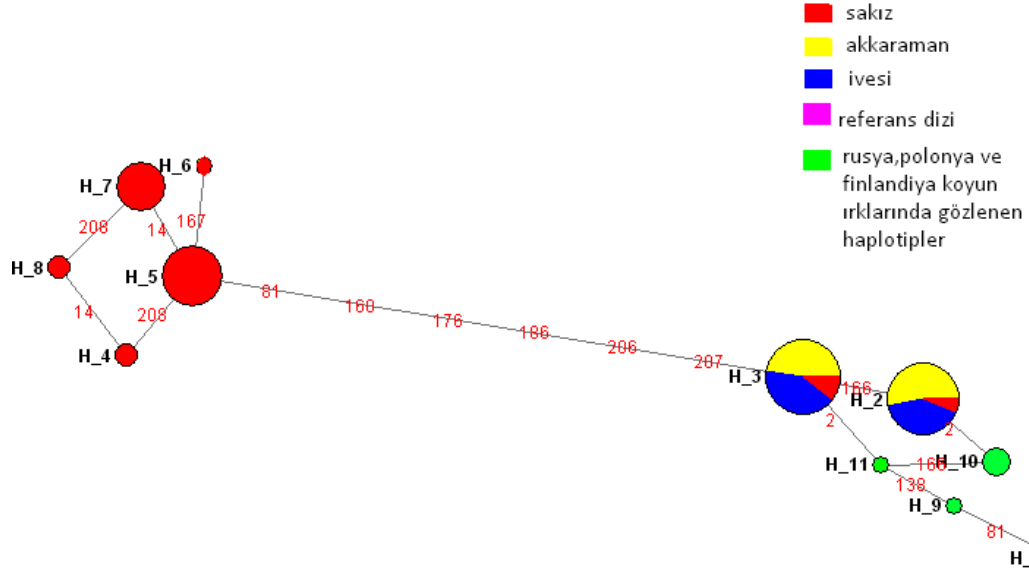


Şekil 29. Akkaraman, İvesi ve Sakız ırklarının referans sekansla birlikte primer 3 için çizilen bootstrap konsensus komşu birleştirme ağacı [1, 2, 3, 4, 5 ve 6; Rusya, Finlandya ve Polonya yerli ırklarında bulunan haplotipleri ifade etmektedir. (Primer 3 için harflerin temsil ettikleri popülasyonlar ‘A’ Akkaraman (örn A1.2) , ‘B’ İvesi (örn B2.2) ve ‘C’ Sakız (örn. C3.2) şeklinde ifade edilmiştir.]

Sakız, Akkaraman ve İvesi ırkını içeren koyun populasyonları evrimsel biçimlerin görsel hale getirilmesi ve verilerin derinlemesine incelenmesi amacıyla network bilgisayar yazılımı ile analiz edilmiştir ve verilerin daha derinlemesine inceleme imkânı sağlamıştır (Şekil 30,31). Elde edilen sonuca göre, primer A için en yaygın gözlenen haplotip H2'dir. Haplotipler arasındaki ilişkiye göre de haplotip 1 haplotip 2 ile tek baz değişimiyle; haplotip 3 ve haplotip 4 ile 2 baz değişimiyle; haplotip 5 ile 3 baz değişimi; haplotip 6 ile de 6 baz değişimi ile ayrılmaktadır (Şekil 30). Primer 3 için en yaygın gözlenen haplotip H3'dür; bu bölgede ise haplotip 1, haplotip 2 ile 4; haplotip 3 ile 3; haplotip 5 ile 7; haplotip 4, haplotip 6 ve haplotip 7 ile 8; haplotip 8 ile de 9 baz değişimiyle ayırım göstermiştir (Şekil 31).



Şekil 30. Primer A bölgesinin haplotip yapılarının network analiz sonuçlarına ait grafik (Haplotipler; H_1, H_2, H_3, H_4, H_5, H_6 ve mutasyon noktaları; 49,58, 201, 234, 242, 272, 281 ve 300 olarak ifade edilmiştir. H_1 referans dizi)



Şekil 31. Primer 3 haplotip yapılarının Network analiz sonuçlarına ait grafik (Haplotipler; H_1, H_2, H_3, H_4, H_5, H_6, H_7, H_8, H_9, H_10, H_11 mutasyon noktaları; 13, 68, 80, 137, 159, 165, 175, 185, 205, 206, 207 olarak ifade edilmiştir. H_1 referans diziyi ifade etmektedir. H_9, H_10, H_11 ve H_1 haplotipleri Rusya, Polonya ve Finlandiya koyun ırklarında gözlenen haplotiplerdir.)

5.5. Uyumsuzluk (Mismatch) Dağılımı

Uyumsuzluk dağılımlarında ve elde edilen radiation ağaçlarda (Şekil 32,33) hem primer A için hem de primer 3 için iki temel grubun olduğu belirlenmiştir. Hangi ırkların hangi haplotipleri taşıdığı ve elde edilen gruplar Tablo 16’da gösterilmiştir. Buna göre her iki bölge için her iki temel grubun da ayrı ayrı uyumsuzluk dağılımları analiz edilmiştir.

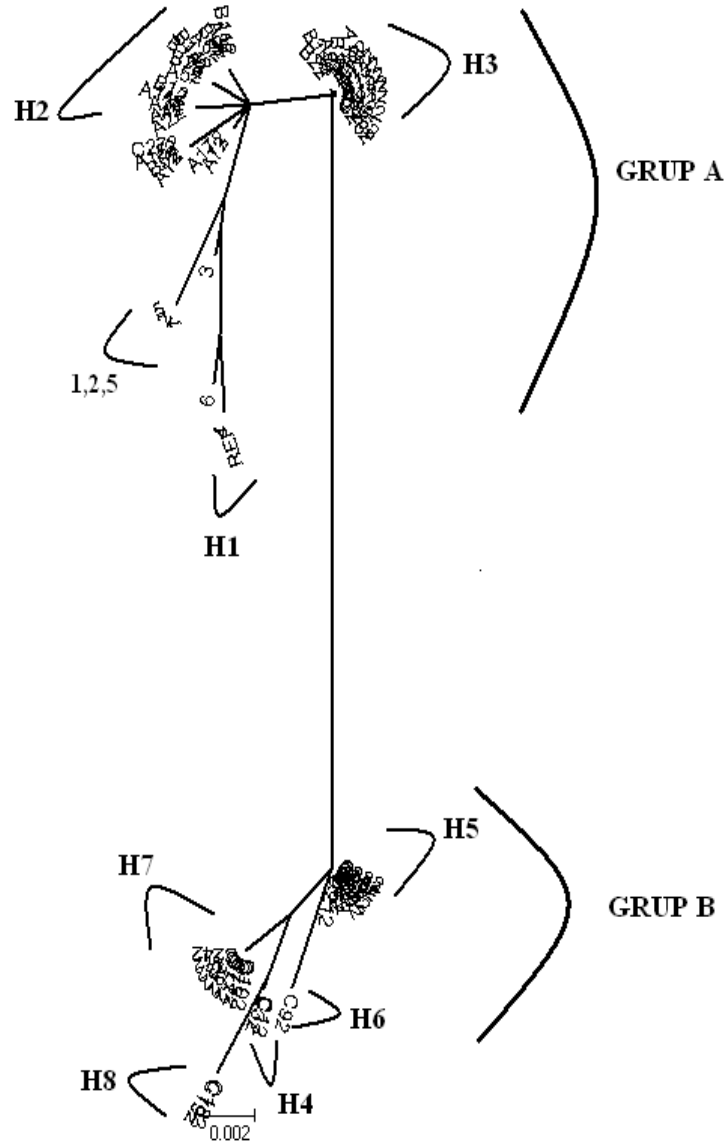
Bu araştırmada primer A ve 3 için elde edilen uyumsuzluk dağılımları sırasıyla Şekil 34 ve 35’deki grafiklerde sunulmuştur. Bu grafiklerde gözlenen uyumsuzluk dağılımları beklenen dağılımlar ile karşılaştırılmıştır. Üst (I) grafiklerde beklenen eğri varsayılan sabit populasyon büyüklüğüne göre çizilmiştir; buna karşın alttaki grafiklerde ise (II) beklenen eğriler populasyon büyümesi varsayımı altında çizilmiştir.

Araştırmada hem primer A hem de primer 3 için elde edilen uyumsuzluk dağılımları her iki grup için de populasyon büyümesine işaret etmektedir.

Tablo 16. Primer A ve primer 3 için haplotip ve grup dağılımları ile haplotipleri gösteren örnekler

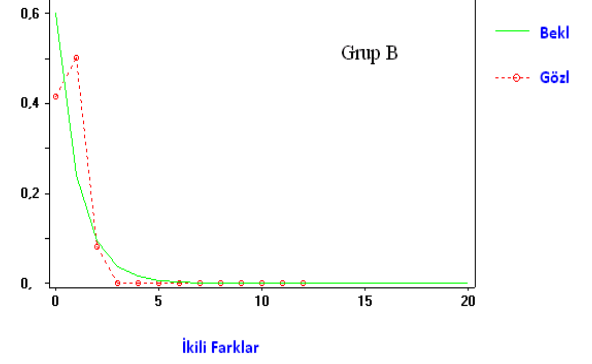
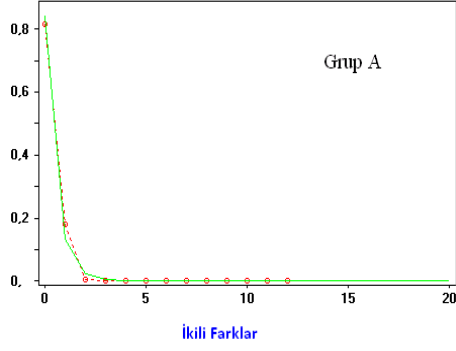
PRİMER 3			
	Haplotip	n	Örnek Adı
Grup A	H1	1	Referans dizi
	H2	17	A1,A2,A3,A4,A5,A6,A8,A14,A15,B1,B5,B6,B7,B10,B11,B14,C27
	H3	19	A7,A9,A10,A11,A12,A13,A16,A17,A18,B2,B3,B4,B8,B9,B12,B13,B15,C25,C26
Grup B	H4	2	C1, C3
	H5	12	C2,C4,C5,C6,C7,C8,C12,C13,C20,C21,C23,C28
	H6	1	C9
	H7	8	C10,C11,C14,C15,C16,C17,C22,C24
	H8	2	C18,C19
PRİMER A			
Grup B	H6	21	C1-20,C29
	H1	5	A2,A32,B26,C23,C27
Grup A	H2	31	A1,A3,A4,A5,A6,A7,A9,A12,A13,A15,A19,A21,A23,A24,A25,A26,A27,A28,A29,A30,A33,B5,B6,B8,B14,B24,B25,B30, B33,B36,B37
	H3	13	A8,A14,A18,A34,B2,B7,B15,B17,B20,B22,B23,B28,C28
	H4	29	A10,A11,A16,A17,A20,A22,A31,B1,B3,B4,B9,B11,B12,B13,B16,B18,B19,B21,B27,B29,B31,B32,B34,B35,C21,C22,C24,C25,C26
	H5	1	B10

A: Akkaraman ırkı, B:İvesi ırkı, C: Sakız ırkına ait örnekleri ifade etmektedir

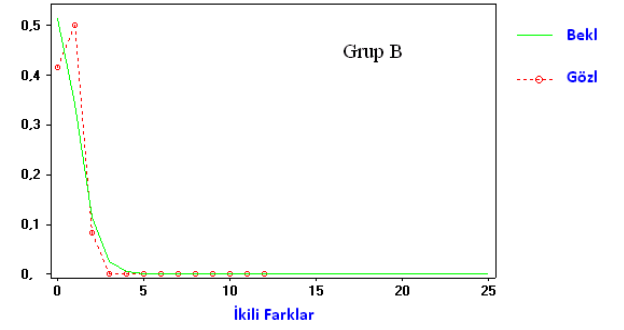
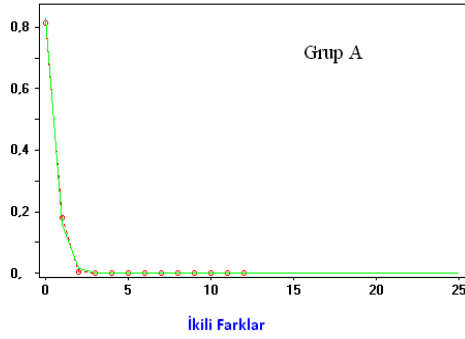


Şekil 33. Primer 3 için elde edilen komşu birleştirme ağacı (radiation stili) ve gözlenen gruplar (H1 haplotip 1; H2 haplotip 2; H3 haplotip 3; H4, haplotip 4; H5 haplotip 5; H6 haplotip 6; H7 haplotip 7; H8 haplotip 8'i ifade etmektedir. 1, 2, 3, 4, 5, 6 ise Rusya, Finlandya ve Polonya yerli ırklarında bulunan haplotipleri ifade etmektedir)

I)

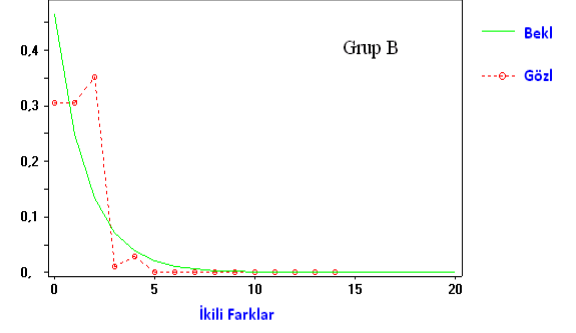
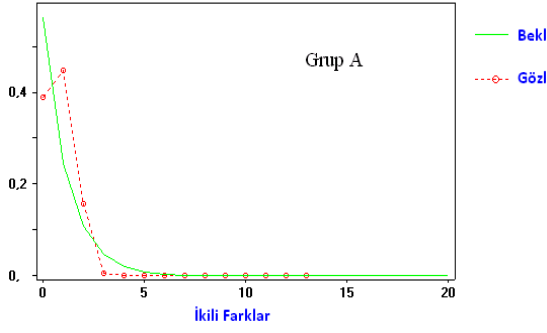


II)

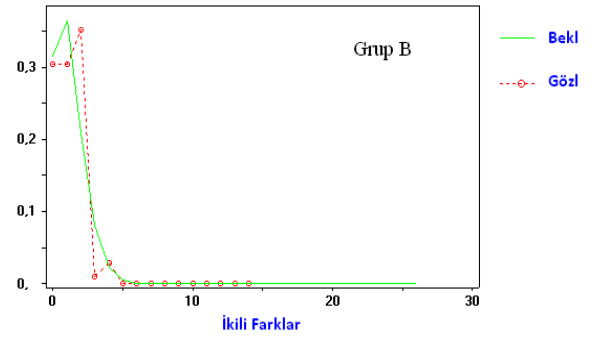
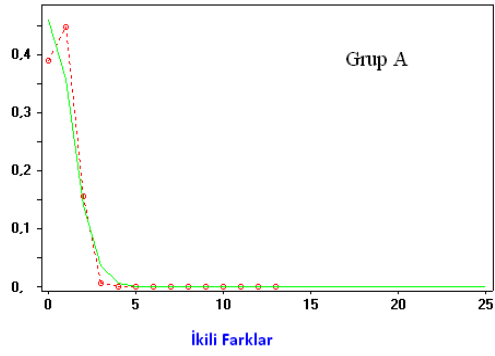


Şekil 34. Hem sabit (I) hem de populasyon genişlemesini ifade eden (II) primer A için grupların (Grup A ve Grup B) gözlenen ve beklenen uyumsuzluk dağılım grafikleri

I)



II)



Şekil 35. Hem sabit (I) hem de populasyon genişlemesini ifade (II) eden primer 3 için grupların (Grup A ve Grup B) gözlenen ve beklenen uyumsuzluk dağılım grafikleri

5.6. Nötralite Testleri

Populasyonların geçmişi hakkında daha ayrıntılı bilgi sahibi olmak için yapılan nötralite test sonuçları Tablo 17’de gösterilmiştir.

Her iki primer için haplotip farklılığı (Haplotype diversity; Hd) yüksek nükleotid farklılığı (Nucleotide diversity, π) düşüktür. Primer A için grup A da nötralite test sonuçları (Tajima’s D, Fu and Li’s D and F, Fu’s Fs) pozitifdir. Primer 3 için grup A ve grup B ve primer A için grup B’de nötralite test sonuçları negatif bulunmuştur (Tablo 17).

Tablo 17. Primer A ve primer 3 için grup A ve grup B’ye uygulanan nötralite test sonuçları ve farklılık değerleri

	Primer A Grup B	Primer A Grup A	Primer 3 Grup B	Primer 3 Grup A
Haplotip Sayısı	1	5	5	3
Nükleotid Farklılığı (π)	0.00063	0.00219	0.00348	0.00515
Haplotip Farklılığı (Hd)	0.186	0.584	0.610	0.695
Theta (Θ_w)	0.55590	0.60570	0.79450	1.19773
Tajima’s D	- 1.51414	0.18769	- 0.04533	- 0.09643
Fu & Li’s F*	- 2.21420	0.75032	- 0.18302	- 0.60514
Fu & Li’s D*	- 2.08204	0.84631	- 0.20284	- 0.70220
Fu’s Fs	- 1.920	0.171	- 1.486	- 0.955
Raggedness (rg)	0.4322	0.1894	0.1099	0.1195

5.7. Moleküler Varyans Analizi (AMOVA) ve F İstatistikleri

Genetik varyasyonun ırklar arasında ve ırklar içerisinde nasıl dağıldığını görmek için iki grup oluşturularak moleküler varyans analizi (AMOVA) yapılmıştır.

Araştırma sonuçları incelendiğinde, primer A için toplam genetik varyasyonun % 65.40'ı gruplar arasında, % 33.14'ü populasyonlar içinde, % 1.47'sinin grup içindeki populasyonlar arasında olduğu gözlenmiştir. Irklar arası farklılığın istatistiki olarak önemli olup olmadığı F_{ST} değerleriyle hesaplanmıştır. Buna göre elde edilen sonuç Sakız ırkının, Akkaraman ve İvesi ırkından önemli derecede farklılaştığını ($P<0.001$) (Tablo 18); Akkaraman ve İvesi ırkları arasında ise orta düzeyde genetik farklılaşmanın olduğunu göstermektedir.

Primer 3 için toplam genetik varyasyonun % 19.20'si populasyonlar içinde, % -0.57'si gruplar içi populasyonlar arasında, % 81.37'nin gruplar arasında olduğu gözlenmiştir. Irklar arası farklılığın istatistiki olarak önemli olup olmadığı F_{ST} değerleriyle hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre Sakız ırkının, Akkaraman ve İvesi ırkından önemli derecede farklılaştığını ($P<0.001$), Akkaraman ve İvesi ırkları arasında ise önemli bir genetik farklılaşmanın olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 19).

Tablo 18. Primer A için, ırkların ikili karşılaştırılması sonucunda hesaplanan F_{ST} değerleri ve önemlilik düzeyleri

	Sakız	İvesi	Akkaraman
Sakız	0.00000	-	-
İvesi	0.62790***	0.0000	-
Akkaraman	0.63278***	0.09512	0.0000

($P < 0.001$)

Tablo 19. Primer 3 için ırkların ikili karşılaştırılması sonucunda hesaplanan F_{ST} değerleri ve önemlilik düzeyleri

	Sakız	İvesi	Akkaraman
Sakız	0.00000	-	-
İvesi	0.77152***	0.00000	-
Akkaraman	0.78055***	- 0.02923	0.0000

($P < 0.001$)

5.8. SIFT (Sorting Intolerant Fom Tolerant)

Elde edilen bulgular Tablo 20 'de gösterilmiştir. Buna göre Q336L ve E387V amino asit yer değişimleri protein fonksiyonunu etkilediği varsayılmaktadır. Bu substitüsyonlar ise sadece Sakız ırkına ait örneklerde gözlenmektedir.

Tablo 20. *PRLR* geni primer 3'e ait amino asit substitüsyonları için fenotip etkilenme tahminleri.

SIFT			
	Prediction	Score	MSC
Q336L	Affect protein function	0.01	3.45
D385N	Tolerated	1.00	3.45
E387K	Tolerated	0.15	3.45
E387V	Affect protein function	0.03	3.45
H390L	Tolerated	1.00	3.45
S400N	Tolerated	0.54	3.45
G401R	Tolerated	0.34	3.47

6. TARTIşMA ve SONUÇ

Bu araştırmada Sakız, Akkaraman ve İvesi ırk koyunlarda *PRLR* geninin polimorfizmleri incelenmiştir. Bu amaçla koyunlardan alınan kan örneklerine sırasıyla DNA izolasyonu, PCR, SSCP ve DNA dizi analizi yöntemleri uygulanmıştır. DNA dizi analizi sonrası elde edilen sekans verileri komşu birleştirme ağacı (NJ), network analizi, uyumsuzluk dağılımı, nötralite testleri, AMOVA ve F istatistikleri yapılarak değerlendirilmiştir.

6.1. DNA İzolasyonu ve PCR

Kan örneklerinin "Fenol-Kloroform Ekstraksiyon" yöntemiyle DNA izolasyonu ve hemen arkasından uygulanan polimeraz zincir reaksiyonları ilgili protokollere göre başarılı şekilde gerçekleştirilmiştir.

6.2. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi

Uygulanan SSCP metodunda elde edilen sonuçlar örneklerin genotiplendirilmesinde kullanılamamıştır. Çünkü yapılan denemeler sonucu her yürütme sonunda farklı motifler elde edilmiştir. Elde edilen motiflerin kontrol örnekleriyle doğrulanması yapılamamıştır. Kontrol örnekleri ile doğrulanarak genotiplendirme yapılabilse dahi SSCP'nin tartışmaya açık ve güvensiz bir metot olduğu bilinmektedir. Bu yöntemle genotiplendirmeler yapıldıktan sonra, bu genotipleri oluşturan mutasyonların ve polimorfizme neden olan olası baz değişimlerinin DNA dizi analizi metodu kullanılarak belirlenmesi gerekmektedir.

6.3. DNA Dizi Analizi

Araştırmada, primer A için tüm ırklar bakımından 6 farklı haplotip tespit edilmiştir. Bu haplotipler; Haplotip 2: C272T, Haplotip 3: C49T, C272T, Haplotip 4: G201A, C272T, Haplotip 5: C49T, G201A, C272T, Haplotip 6: A58C, C234T, C242G, C272T, C281T, A300G şeklinde gerçekleşmiştir. Her bir ırk için yapılan değerlendirmede ise, Akkaraman ırkı için en fazla haplotip 2 (% 62) gözlenirken, haplotip 5 ve 6 hiç tespit edilmemiştir. İvesi ırkı için en fazla haplotip 4 (% 46) belirlenmiş, haplotip 6 hiç gözlenmemiştir. Sakız ırkı için ise en fazla gözlenen haplotip 6 (% 72) olmuştur. Irklar arasında yapılan karşılaştırmalarda ise özellikle, haplotip 6'nın Akkaraman ve İvesi ırklarında ortak olarak hiç bir örnekte saptanmamış olmasına rağmen, Sakız ırkında ise en çok belirlenen haplotip olması dikkat çekici ve önemli bir varyasyon olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca bu durumu destekler nitelikte, haplotip 2'nin Akkaraman ve İvesi ırklarında gözlenip Sakız ırkında hiç tespit edilmemiş olması da önemli bir bulgu olarak değerlendirilmektedir.

Araştırmada Sakız, Akkaraman ve İvesi ırklarına ait primer 3 bölgesinde referans dizi hariç 7 farklı haplotip tespit edilmiştir. Elde edilen haplotiplerdeki varyasyonlar; Haplotip 2: A2T, A81G, A138G, G166A, Haplotip 3: A2T, A81G, A138G, Haplotip 4: A2T, A138G, G160A, A176T, C186T, G206A, T207C, G208A, Haplotip 5: A2T, A138G, G160A, A176T, C186T, G206A, T207C, Haplotip 6: A2T, A138G, G160A, A167T, A176T, C186T, G206A, T207C, Haplotip 7: A2T, A14T, A138G, G160A, A176T, C186T, G206A, T207C, Haplotip 8: A2T, A14T, A138G, G160A, A176T, C186T, G206A, T207C, G208A, olarak belirlenmiştir. Irk içi yapılan değerlendirmede, Sakız ırkı için en fazla bulunan haplotipler haplotip 5 (% 43) ve haplotip 7 (% 29) olmuştur. Akkaraman ve İvesi

ırkı için sadece haplotip 2 (sırasıyla % 50, % 47) ve 3 (sırasıyla % 50, % 53) tespit edilmiştir. Irklar arasında yapılan karşılaştırmalarda özellikle, Akkaraman ve İvesi ırklarında haplotip 2 ve haplotip 3'ün benzer sayılarda tespit edilmiş olması ve diğer haplotiplerin hiç gözlenmemiş olması ortak bir sonuç olarak değerlendirilmektedir. Bunun yanında, Sakız ırkında en çok haplotip 5 ve haplotip 7'nin belirlenmesi ve bu haplotiplerin Akkaraman ve İvesi ırkında hiç gözlenmemiş olması dikkat çekici ve kaydadeğer bir bulgu olarak değerlendirilmektedir. Gözlenen varyasyonlar; A14T *Gln* --> *Leu*, G160A *Asp* --> *Asn*, G166A *Glu*-->*Lys*, A167T *Glu*-->*Val*, A176T *His*--> *Leu*, G206A *Ser* --> *Asn*, G208A *Gly*-->*Arg* amino asit değişimine yol açarken; A2T, A81G, A138G, C186T, T207C ise herhangi bir amino asit değişimi olmamıştır.

Her iki primer bölgesi için de yukarıda ifade edilmiş olan bulgular, araştırmada kullanılmış olan ırklar bakımından *PRLR* geninin dikkate değer düzeyde polimorfizmlere sahip olabileceğini göstermiştir. Bu araştırma bulgularına benzer şekilde, koyunlarda *PRLR* geninde ırklar arası ve ırk içi düzeyde polimorfizmlerin bulunduğu farklı koyun ve keçi ırklarında yapılmış bazı araştırmalarda da bildirilmiştir. Bu araştırmalarda; *PRLR* geninde, Mu ve ark. (50) Kısa Kuyruklu Han, Dorset, Suffolk ve Dorset koyunları ile Kısa Kuyruklu Han koçlarının F₁ melezlerinde SSCP metodu ile SNP saptamışlar, üç primer kullandıkları çalışmada her bir primer için üç genotip (AA, AB, BB) belirlemişlerdir. Primer 1 için, AA genotipi dört koyun ırkında da saptanırken, AB genotipi Kısa Kuyruklu Han Koyunu, Dorset ve Suffolk koyun ırklarında, BB genotipi ise sadece Dorset koyun ırkında kaydedilmiştir. Primer 2 için, hem AA hem de AB genotipi dört ırkta da belirlenmiş, buna karşın BB genotipi Suffolk ırkında görülmüştür. Primer 3 için, 3 genotip de (AA, AB ve BB) dört koyun popülasyonunda tespit edilmiştir.

Araştırmada üç primer çifti bakımından, dört koyun ırkı için de A alelinin frekansı B alelinin frekansından önemli düzeyde yüksek bulunmuştur.

Diğer bir çalışmada Chu ve ark. (19) Kısa Kuyruklu Han koyunlarında *PRLR* geni ekzon 10 ve intron 1 içinde üç primer çiftini PCR amplifikasyonu için dizayn etmişler, bu gen bölgesinde PCR-SSCP vasıtasıyla SNP saptamışlardır. *PRLR* geninin yavru sayısı ile ilişkilerinin araştırılması sonunda üç primer çiftinin üç genotipi (AA, AB ve BB) belirlediği saptanmıştır. Üç primer çifti için sırasıyla “A” alelinin frekansı 0.96, 0.79, 0.68 ve “B” alelinin frekansı 0.04, 0.21, 0.32 bulunmuştur. Sırasıyla AA genotipinin frekansı 0.93, 0.62, 0.51, AB genotipinin frekansı 0.06, 0.34, 0.34 ve BB genotipinin frekansı 0.01, 0.04, 0.15’dir. BB ya da AB genotipine sahip Kısa Kuyruklu Han koyunları AA genotipine sahip olanlardan daha fazla kuzulama oranına sahip olmuşlardır. İntron 1 bölgesi için geliştirilen 176 bp’lık primer 2 kullanılarak SSCP analizleri ile tespit edilen mutasyonun kesin lokalizasyonunun saptamak için uyguladıkları DNA dizi analizlerinde BB genotipinin AA genotipinden iki baz değişimi (T84C ve T174G) sonucu ayrıldığını ortaya koymuşlardır. *PRLR* geninin Kısa Kuyruklu Han koyunları için ya çoklu doğumu etkileyen major bir gen ya da bu gibi genlerle yakın bağlantılı bir gen olduğu bildirilmiştir. Bu araştırmacılar primer 2 için AA ve BB genotipleri arasında farklılığa yol açan varyasyonu T84C baz değişimi olarak bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada ise Chu ve ark. (19) belirttiği noktanın bir baz ilerisinde, çalışılan bütün ırklarda (Sakız, Akkaraman, İvesi) C272T baz değişimi saptanmıştır.

Zhang ve ark.’nın (78) döl verimi yüksek (Jining Grey keçisi) ve düşük (Liaoning Kaşmir keçisi, Boer keçisi ve Ankara keçisi) keçi ırklarında *PRLR* geninin olası etkisini bir aday gen olarak PCR-SSCP metoduyla araştırmışlardır. *PRLR*

geninin ekzon 10 ve 3' UTR (untranslated region) bölgesine spesifik beş primer dizayn etmişlerdir. Bu çalışmada *PRLR* genine ait ekzon 10 ve 3' UTR bölgesinin nükleotid sekansı ilk kez birleştirilerek yayınlanmıştır. Elde edilen bu sekans 1.118 bp uzunluğunda olup, koyun (% 98.33), sığır (% 93.92) ve insan (% 74.52) *PRLR* geni ile homoloji göstermiştir. Yalnızca primer 1, primer 2 ve primer 4 primerleri ile amplifiye edilen bölgeler polimorfizm göstermiştir. Primer 1 için hem Jining Grey hem de Liaoning Kaşmir keçisinde iki genotip (AA ve AB), Ankara keçisi için iki genotip (AA ve AC) ve Boer keçisi için sadece bir genotip (AA) saptanmıştır. AB ve AA genotiplerinin DNA baz dizilimlerinin elde edilmesi sonucu iki mutasyonun (186G-->A ve 220T-->C) bu iki genotip ayrımından sorumlu olduğu gözlenmiştir. Bunlardan ilki (186G-->A) Asp-->Asn amino asit değişikliğine yol açarken ikincisi (220T-->C) Leu-->Pro amino asit değişikliğine neden olmuştur. AA genotipinin AC genotipinden farklılaşmasına neden olan sadece bir mutasyon noktası (140A-->G) bulunmuş ancak bu da herhangi bir aa değişikliğine yol açmamıştır. Primer 2 bölgesi için Jining Grey, Liaoning Kaşmir ve Boer keçilerinde iki genotip (DD ve DE) belirlenirken Ankara keçisinde yalnızca bir genotip (DD) saptanmıştır. DD ve DE genotiplerinin sekans dizilimlerinin karşılaştırılması sonucu iki mutasyonun (52G-->A ve 122G-->A) varlığı ortaya konulmuştur. Bunlardan ilki herhangi bir amino asit değişimine yol açmazken ikincisi Arg-->Gly değişimine neden olmuştur. Primer 4 bölgesi için ise Jining Grey keçilerinde iki genotip (FF ve FG), Liaoning Kaşmir keçilerinde iki genotip (FF ve GG), Boer keçisinde bir genotip (FF) ve Ankara keçisinde üç genotip (FF, FG ve GG) belirlenmiştir. DD ve DE genotiplerinin sekans dizilimlerinin karşılaştırılması sonucu bir mutasyonun (143A-->G) varlığı ortaya konulmuştur. Bu mutasyonun Met-->Val amino asit değişimine yol açtığı belirlenmiştir.

Iso Touru ve ark. (37) yaptıkları çalışmada Rusya, Finlandiya ve Polonya'ya ait 6 farklı koyun ırkında (Romanov, Wrzosowka, Dagestan, Andi, Finnsheep, Alandsheep) *PRLR* geni ekzon 10 bölgesini sekanslamışlar ve bu ırklara ait 6 farklı haplotip belirlemişlerdir. Yapılan bu çalışmada bu haplotipler network analizinde ve elde edilen filogenetik ağaçta Akkaraman ve İvesi ırkları ile aynı grup içinde bulunmuştur. Akkaraman ve İvesi ırklarında bulunan haplotip 2'den A2T farklılığı ile ayrılmışlardır. A2T varyasyonu Akkaraman ve İvesi ırklarında gözlenirken, Rusya, Finlandiya ve Polonya yerli ırklarında bulunmamıştır. Buna karşın A81G, A138G ve G166A varyasyonları ortak olarak tespit edilmiştir. Araştırmacıların (37), Rusya, Finlandiya ve Polonya koyun ırklarında buldukları E387K amino asit değişimi, bu araştırmadaki Akkaraman ve İvesi ırklarında gözlenirken, Sakız ırkında belirlenmemiştir. Sakız ırkı *PRLR* ekzon 10 bölgesi için Akkaraman ve İvesi ırkından farklılaşmasının yanı sıra Polonya, Rusya ve Finlandiya koyun ırklarıyla da farklılık göstermiştir.

Yine *PRLR* geninin polimorfizmleri ve bazı özellikler ile ilişkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, PCR, SSCP ve SNP metodu gibi farklı metotlardan yararlanılarak, sığırlarda (14) ve domuzlarda (25, 36, 43, 58, 71, 73, 74, 77) bu araştırmada elde edilmiş olan varyasyonları destekleyici sonuçlar bildirilmiştir.

Bu araştırmada DNA dizi analizi sonucu elde edilen sekanslar sırasıyla komşu birleştirme ağacı, network analizi, uyumsuzluk dağılımı, nötralite testleri, AMOVA ve F istatistikleri uygulanarak analiz edilmiştir.

6.4. Komşu Birleştirme Ağacı ve Network Analizi

Bu metotlar genetik uzaklıkların görsel olarak belirtilmesi amacıyla uygulanmıştır.

Elde edilen sonuçlar ve gözlenen haplotip farklılıkları nedeniyle sekanslar filogenetik olarak incelenmiştir.

Her iki primer için de elde edilen komşu birleştirme ağaçlarında Sakız ırkına ait sekansların Akkaraman ve İvesi ırkından farklılaştığı gözlenirken, bootstrap değerleri düşük bulunmuştur (Şekil 26,27). Bu da elde edilen bu ağacın topolojik olarak güvenilirliğini azaltmaktadır.

Verilerin derinlemesine incelemesine olanak tanımak ve populasyonların evrimsel biçimlerinin görsel hale getirilmesi amacıyla network analizi uygulanmıştır.

Yapılan network analizi primer 3 için Iso-Touru ve ark. (37) tarafından belirtilen Rusya, Finlandiya ve Polonya yerli koyun ırkları ile birlikte uygulanmıştır. Buna göre, haplotip 1 (NCBI erişim numarası: FJ901299), haplotip 9 (NCBI erişim numarası: FJ901296, FJ901297, FJ901300), haplotip 10 (NCBI erişim numarası: FJ901298) ve haplotip 11(NCBI erişim numarası:FJ901301) Iso-Touru ve ark. (37) tarafından belirtilen Rusya, Finlandiya ve Polonya yerli koyun ırklarında bulunan haplotiplerdir. Bu haplotipler Akkaraman ve İvesi ırklarında bulunan haplotip 2'den A2T farklılığı ile ayrılmışlardır. A2T varyasyonu Akkaraman ve İvesi ırklarında gözlenirken, Rusya, Finlandiya ve Polonya yerli ırklarında belirlenememiştir. Buna karşın, A81G, A138G ve G166A varyasyonları ortak olarak tespit edilmiştir. Haplotip 1 yapılan analizde hiçbir varyasyonu içermeyen referans diziye ifade etmektedir. Akkaraman, İvesi ve Sakız ırklarında gözlenen haplotiplerden hiç biri referans diziye dahil olmamışken, FJ901299 bu haplotipe dahil bulunmuştur. Sakız

ırkı için elde edilen haplotipler hem Akkaraman ve İvesi ırklarından hem de yukarıda belirtilen Rusya, Finlandiya ve Polonya yerli ırklarından ayrı olarak bulunmuştur. Araştırmada elde edilen network analiz sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde filogenetik bulgularla uyum içerisinde gözlenmiştir.

6.5. Uyumsuzluk Dağılımı Analizi

Uyumsuzluk dağılımı, popülasyon geçmişi hakkında bilgi sahibi olmak için uygulanmıştır. Araştırmada elde edilen uyumsuzluk dağılımında gözlenen ve beklenen dağılımlar birbiri ile uyumlu olduğundan dolayı primer A ve 3 için bu dağılımlar her iki grup için de popülasyon büyümesini ifade etmektedir.

Primer 3 için grup B'ye ait grafiklerde gözlenen eğrinin beklenenden sapma gösterdiği izlenmektedir (Şekil 33). Bu durum primer 3 grup B'nin kendi içinde 2 grup daha oluşturduğunu göstermektedir. Elde edilen primer 3 radiation ağaçta (Şekil 31) bu bulguyu destekler niteliktedir. Örnek sayısının artırılması mümkün olabilseydi bu durumun daha net gözlenebileceği düşünülmektedir.

6.6. Nötralite Testleri

Popülasyon geçmişindeki seleksiyon etkisini test etmek amacıyla Tajima's D, Fu and Li's D^* ve F^* testleri ve Fu's F_s testleri yapılmıştır. Nötralite testlerinden Tajima's D değeri, segregating alanların sayısı ile ikili farkların ortalama sayısı arasındaki farkı karşılaştırmaktadır. Nötralite altında, Tajima's D değerinin sıfır (0) olduğu varsayılır, pozitif seleksiyon altında ise Tajima's D değeri negatiftir ve bu nadir polimorfizmlerin fazla olduğunu ifade eder. Ayrıca negatif Tajima D değeri popülasyon genişlemesinden de kaynaklanıyor olabilir. Eğer, orta frekansa genetik varyantlarda dengeli seçim sağlanmışsa, Tajima's D değeri pozitifdir.

Fu ve Li's D^* ve F^* testleri de yukarıda açıklanan beklentiler içinde hesaplanmıştır.

Mevcut haplotip sekansları kullanılarak haplotip farklılığı (H_d), nükleotid farklılığı (π) ve Watterson's theta (Θ_w) değerleri hesaplanmıştır. P_i sekanslar arasındaki farklı nükleotidlerin ortalama sayısını temel alırken, theta ise sekansdaki segregating alanların (hizalanmış tüm sekans setleri içinde farklı nükleotid alanların sayısı) toplam sayısını esas almaktadır.

Bu araştırmada, primer A grup B ve primer 3 grup A ve B için haplotip farklılığı yüksek, nükleotid farklılığı düşük bulunmuştur. Bu durum, populasyon büyümesinin varlığını göstermektedir. Zaten bu tespit ilgili nötralite test sonuçlarıyla da doğrulanmıştır.

Nötralite test sonuçlarına göre Primer A bölgesi Grup B ve Primer 3 bölgesi Grup A ve Grup B için negatif değer alan Tajima's D değeri yeni mutasyonların yüksek oranda gözlemlendiğini ve seçici süpürme ya da populasyon genişlemesini; Negatif değer alan Fu and Li's D^* , Fu and Li's F^* değerleri yüksek miktarda ender haplotip gözlemlendiğini ve populasyon genişlemesi ya da arka plan seçilimi, negatif değer alan Fu's F_s değeri ise yüksek miktarda yeni ortaya çıkan haplotiplerin olduğunu ve populasyon genişlemesini ya da beraberinde götürmeyi ifade etmektedir.

Elde edilen nötralite değerleri ile uyumsuzluk dağılım grafiklerinin birlikte değerlendirilmesi sonucu Primer A bölgesi grup B ve Primer 3 bölgesi grup A ve grup B için populasyon genişlemesinin olabileceği ve koyun *PRLR* geni için negatif değer alan nötralite testi sonuçlarına dayanarak pozitif seleksiyonun söz konusu olabileceği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte elde edilen negatif nötralite test sonuçlarına göre populasyon genişlemesi değil de seçici süpürme, arka plan seçilimi

ve beraberinde götürme olgularının söz konusu olup olmadığını incelemek için incelenen lokusa yakın olan bağlantılı lokusların ve bölgenin daha geniş ayrıntılı incelemesinin yapılması gerekmektedir.

Primer A bölgesi grup A da haplotip farklılığı yüksek nükleotid farklılığı düşüktür, bu durum popülasyon büyümesini düşündürmektedir. Ancak nötralite test değerleri (Tajima's D, Fu and Li's D and F, Fu's Fs) pozitifdir. Iso-Touru ve ark. (37)'nın benzer şekilde pozitif değerde buldukları nötralite test sonuçları, çiftlik hayvanları gibi insan eliyle seleksiyona tabi tutulan popülasyonların, nötralite testleri için gerekli olan sabit popülasyon büyüklüğü ve rastgele çiftleşme beklentilerini karşılamadıkları, bu nedenle pozitif Tajima's D değerinin türlerin ya da ırkların gerçek dengeli seçiliminden ziyade bu popülasyonların demografik geçmişinden dolayı meydana gelmiş olabileceği şeklinde değerlendirilmektedir. Aynı tespitler yapılan bu çalışma için geçerliliğini korumaktadır. Bu sebeptendir ki doğru yorumların yapılabilmesi için popülasyonların demografik geçmişlerinin araştırılması ve buna yönelik çalışmaların yapılması yerinde olacaktır.

6.7. Moleküler Varyans Analizi (AMOVA) ve F İstatistikleri

Moleküler varyasyonu incelemek amacıyla AMOVA analizi uygulanmıştır. Bu analiz için 1. Grup; Sakız ırkı ve 2. Grup Akkaraman ve İvesi ırkı olacak şekilde gruplar oluşturulmuştur. Akkaraman ve İvesi ırkının bir grup olarak birlikte ele alınmasının nedeni daha önce belirtildiği şekilde, incelenen gen bölgesi bakımından göstermiş oldukları benzerliktir. Ayrıca bu gruplar içinde Sakız, Akkaraman ve İvesi ırklarının her biri ayrı ayrı bir popülasyonu oluşturmaktadır.

Moleküler varyans analizi sonuçları değerlendirildiğinde primer A için en fazla genetik varyasyon % 65.40'la iki grup arasında, en düşük genetik varyasyon

ise % 1.47 ile grup içindeki populasyonlar arasında (Akkaraman ve İvesi) belirlenmiştir. Primer 3 için de benzer şekilde bulunan bu varyasyonlarda da en fazla genetik varyasyon % 81.37 ile gruplar arasında gözlenirken, grup içi populasyonlar arası genetik varyasyon yüzde sıfır (% -0.57) olarak bulunmuştur. Bu durum Akkaraman ve İvesi ırkı arasında genetik çeşitliliğin olmadığına işaret etmektedir.

Irklar arası farklılığın istatistiki olarak önemli olup olmadığını değerlendirmek için yapılan F_{ST} istatistiği ile elde edilen sonuçlar daha önce yapılan test sonuçlarını destekler nitelikte bulunmuştur. Buna göre primer A için Sakız ırkı ile Akkaraman ve İvesi ırkları arasında çok büyük genetik farklılaşmanın ($P<0.001$), Akkaraman ve İvesi ırkları arasında ise orta düzeyde bir genetik farklılaşmanın olduğu tespit edilmiştir. Primer 3 için ise Sakız, Akkaraman ve İvesi ırkları arasında elde edilen F_{ST} değerleri primer A ile karşılaştırıldığında nispeten daha yüksek bulunmuştur ($P<0.001$). Ayrıca primer 3 için Akkaraman ve İvesi ırkları arasında genetik farklılaşmanın olmadığı gözlenmiştir.

6.8. SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant)

SIFT sonuçlarına göre gözlenen iki amino asit substitüsyonu fenotipte değişime yol açmaktadır. Bu substitüsyonların Sakız ırkında gözlenmesi de bu ırkın incelenen diğer iki ırktan farklılaştığını destekler niteliktedir. Ayrıca Sakız ırkının *PRLR* geni için çoklu doğum özelliğini araştırmaya değer kılmalıdır.

Sonuç olarak bu araştırmada, öncelikle koyunlarda *PRLR* genindeki polimorfizmin incelenmesi için uygulanmış olan yöntemlerin metodolojik olarak uygun ve yeterli olabileceği anlaşılmaktadır. Bu anlamda metodolojik bir çalışma niteliği de taşıyan bu araştırmanın başarılı şekilde neticelendirildiği

düşünülmektedir. Diğer taraftan, koyunlarda *PRLR* geni için daha önce yapılmış çalışmalarda, önce PCR-SSCP veya SNP ile polimorfizmler belirlenmiş, sonrasında yalnızca polimorfizm belirlenen örneklerde DNA dizi analizleri yapılmış olmasına rağmen, bu çalışmada farklı olarak polimorfizmler, doğrudan DNA dizi analizi ile ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bu açıdan bu araştırmada elde edilen verilerin koyunlarda yapılmış diğer çalışma sonuçlarına göre daha açıklayıcı nitelikte olduğu düşünülmektedir. Bu araştırmada, DNA dizi analizi gibi oldukça güvenilir, sağlıklı bir yöntemle Sakız, Akkaraman ve İvesi ırklarında *PRLR* geninin hem primer A hem de primer 3 için ırk içi ve ırklar arası polimorfik olduğu ortaya konulmuştur. Özellikle, Sakız ırkının hem primer A hem de primer 3 için birçok haplotip bakımından Akkaraman ve İvesi ırkından dikkate değer düzeyde farklı bir varyasyona sahip olduğu gözlenmiştir. Araştırma kapsamında yapılan bir dizi istatistiksel analizler (Network, AMOVA, F istatistikleri) sonucunda da bu durumu destekleyici bulgular elde edilmiştir.

Bu çalışmanın sonuçları dikkate alınarak özellikle *PRLR* genin çoklu doğum, diğer bazı döl verimi ve süt verim özellikleriyle ilişkilerinin ortaya konulmasının yararlı olacağı umut edilmektedir. Ayrıca bu verim özellikleriyle ilişkili olabilecek başka gen/genler veya aday gen/genlerin de dahil edildiği daha kapsamlı araştırmaların yürütülmesinin gerekli olduğu kanaatine varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Akçapınar H. (2000). Koyun Yetiştiriciliği, Yenilenmiş 2. Baskı. İsmat Matbaacılık, Ankara.
2. Alaçam E. (2002). Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite. Medisan yayıncılık, Ankara.
3. Anonim . (2009). Erişim: <http://www.thearkdb.org/> . Erişim tarihi: 15.12.2009
4. Anonim. (2007). Türkiye İstatistik Kurumu. Erişim: (<http://www.tuik.gov.tr>). Erişim tarihi: 19.4.2007.
5. Anonim. (2008). TÜRKHAYGEN Projesi Populasyon Genomiği Çalıştayı II. Notları. ODTÜ, Ankara.
6. Anonim. (2009) Erişim : (http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_sekansteknikleri.pdf Erişim tarihi: 24.5.2009.
7. Aşcıoğlu F, Koluçık ST, Çetinkaya Ü, Akyüz F. (2002). Kapiller elektroforez teknolojisinin klinik ve adli amaçlı DNA analizlerinde kullanımı. Adli Tıp Derg 16 (2): 88-93.
8. Baran N, Kelly PA, Binart N. (2002). Characterization of a prolactin-regulated gene in reproductive tissues using the prolactin receptor knockout mouse Mol Biol Reprod 66: 1210-1218.
9. Bassam BJ, Anolles GC, Gresshoff PM. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal Biochem 196: 80-83.
10. Bignon C, Binart N, Ormandy C, Schuler LA, Kelly PA, Djiane J. (1997). Long and short forms of the ovine prolactin receptor: cDNA cloning and genomic analysis reveal that the two forms arise by different alternative splicing mechanisms in ruminants and in rodents. J Mol Endocrinol 19 (2):109–120.
11. Bogorad RL, Courtillot C, Mestayer C, Bernichtein S, Harutyunyan L, Jomain JB, Bachelot A, Kuttann F, Kelly PA, Goffin V, Tourine P and Bening Breast Diseases Study Grup. (2008). Identification of a gain of function mutation of the prolactin receptor in women with benign breast tumors. PNAS 105 (38): 14533-14538.

12. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 19: 225-268.
13. Bradford GE. (1985). Selection for Litter Size. In: R.B. Land and D.W. Robinson (Ed.), *Genetics of Reproduction in Sheep*, Butterworth, London.
14. Brym P, Kaminski S, Wojcik E. (2005). Polymorphism within the bovine prolactin receptor gene (*PRLR*). *Animal Science Papers and Reports* 23 (1): 61-66.
15. Bulut Z. (2004). Türkiye’deki bazı koyun ırklarının genetik yapılarının mikrosatellitlerle incelenmesi. Doktora Tezi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
16. Cassy S, Charlier M, Belair L, Guilmot M, Charron G, Bloch B, Djiane J. (1998). Developmental expression and localization of the prolactin receptor (*PRLR*) gene in ewe mammary gland during pregnancy and lactation: Estimation of the ratio of the two forms of *PRLR* messenger ribonucleic acid. *Biol Reprod* 58: 1290-1296.
17. Cemal İ, Karaca O, Atay O. (1996). Koyunlarda döl verimine etkili major genler. *YYÜ Zir Fak Der* 6: 31-48.
18. Cemal İ. (1996). Çiftlik hayvanlarında major genler: bunların belirlenmesi, transferi ve endüstriyel kullanımı. Yüksek Lisans Tezi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
19. Chu MX, Mu YL, Fang L, Ye SL. (2007). Prolactin receptor as a candidate gene for prolificacy of Small Tail Han sheep. *Animal Biotechnology* 18:65-73.
20. Clark AG. (2002). *Malaria variorum*. *Nature* 418: 283-285.
21. Clevenger CV, Freier DO, Kline JB. (1998). Prolactin receptor signal transduction in cells of the immune system. *J Endocrinol* 157: 187-197.
22. Çilingir O. (2001). Hemofili B hastalarında faktör IX genindeki mitasyonların dizi analizi yöntemi ile ortaya konması. Doktora Tezi. Osman Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
23. Davis GH. (2005). Major genes affecting ovulation rate sheep. *Genet Sel Evol* 37 (1): 11-23.
24. Doğan AL, Güç D. (2004). Sinyal iletim mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi* 35: 34-42.

25. Drogemuller C, Hamann H, Distl O. (2001).Candidate gene markers for litter size in different german pig lines. *J Anim Sci* 79 (10): 2565–2570.
26. Excoffier L, Laval G, Schneider S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
27. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction DNA. *Genetics* 131: 479-491.
28. Freeman ME, Kanyinska B, Lerant A, Nagy G. (2000). Prolactin: Structure, function and regulation of secretion. *Physiological Reviews* 80 (4): 1523-1585.
29. Freeman S, Heron JC. (2002). *Evrimsel Analiz. (Editörler). Çıplak B, Başıbüyük HH, Karaytuğ S, Gündüz İ. Palme Yayıncılık. Ankara.*
30. Fu YX, Li WH. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693-709.
31. Fu YX. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
32. Goffin V, Kelly PA. (1997). The Prolactin/Growth hormone receptor family: Structure/function relationships. *Jour Mam Gland Biol and Neo* 2 (1): 7-17.
33. Gökçek Ç. (2005). Mitochondrial DNA (mtDNA) sequence analyses of Kangal dogs in Turkey. Yüksek Lisans Tezi. ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
34. Grosdemouge I, Bachelot A, Lucas A, Baran N, Kelly PA, Binart N. (2003). Effects of deletion of the prolactin receptor on ovarian gene expression. *Reprod Biol Endocrinol* 1:12.
35. Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen P, Mullen M, Davis GH, Powel R, Galloway SM. (2004). Mutations in the genes for oocyte-derived factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction* 70: 900-909.
36. Isler BJ, Irvin KM, Rothschild MF, Evans GJ. (2000). Association between the prolactin receptor gene and reproductive components in swine. 27th International Conference on Animal Genetics, Minneapolis, USA.

37. Iso Touru T, Kantanen J, Li MH, Gizejewski Z, Vilkki J. (2009). Divergent evolution in the cytoplasmic domains of *PRLR* and *GHR* genes in Artiodactyla. BMC Evolutionary Biology 9:172.
38. Jenkins ZA, Henry HM, Sise JA, Montgomery GW. (2000). Follistatin (FST), growth hormone receptor (GHR), and prolactin receptor (*PRLR*) genes map to the same region of sheep chromosome 16. Anim Genet 31: 280.
39. Jobling MA, Hurles ME, Tyler-Smith C. (2004). Human evolutionary genetics. Origins, peoples and disease. Taylor and Francis Group. New York.
40. Kang Z. (2006). Prolactin receptor gene expression in poultry lymphoid tissues during embryogenesis and post-hatch period. (Master of Science). The University of Guelph. Canada.
41. Karaca O, Aygün T, Cemal İ, Bingöl M. (1998). Koyunlarda döl veriminin genetik ıslahında fizyolojik ölçütler. Ege Bölgesi I. Tarım Kongresi. 7-11 Eylül. Aydın.
42. Karaca O, Kaymakçı M, Vanlı Y. (1992). Koyunlarda döl veriminin genetiği ve yeni yaklaşımlar. YYÜ Zir Fak Der 2: 138-157.
43. Kmiec M, Terman A. (2006). Associations between the prolactin receptor gene polymorphism and reproductive traits of boars. J Appl Genet 47: 139-141.
44. Korwin-Kossakowska A, Kamyczek M, Cieślak D, Pierzchala M, Kuryl J. (2003). Candidate gen markers for reproductive traits in Polish 990 pig line. J Animal Breed Genet 120: 181-191.
45. Kozanoğlu H. (2002). Hayvan ıslahı ve genetiğinde kullanılan moleküler teknolojiler. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. İzmir.
46. Lucas BK, Ormandy CJ, Binart N, Bridges RS, Kelly PA. (1998). Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. Endocrinol 139: 4102-4107.
47. Madeja Z, Adamowicz T, Chmurzynska A, Jankowski T, Melonek J, Switonski M, Strabel T. (2004). Short Communication: Effect of leptin gene polymorphisms on breeding value for milk production traits. J Dairy Sci 87: 3925-3927.
48. Marle-Köster EV, Nel LH. (2003). Genetic markers and their application in livestock breeding in South Africa: A Review. South Africa Journal of Animal Science 33: 1-10.
49. Montgomery GW, Galloway SM, Davis GH, McNatty KP. (2001).

Genes Controlling ovulation rate in sheep. *Reproduction* 121: 843-852.

50. Mu YL, Chu MX, Su SH, Fang L, Ye SC. (2006). PCR-SSCP Analysis on prolactin receptor gene in sheep. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica* 10: 956-960.

51. Nei M, Kumar S (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

52. Nei M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.

53. Ormandy CJ, Camus A, Barra J, Damotte D, Lucas B, Buteau H, Edery M, Brousse N, Babinet C, Binart N, Kelly PA. (1997). Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev* 11: 167-178.

54. Özkan E. (2005). Türkiye’de yetiştirilen yerli ve kültür sığır ırklarının genetik yapılarının mikrosatellitler ile incelenmesi. Doktora Tezi. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Tekirdağ.

55. Patrinos GP, Ansorge W. (2005). *Molecular Diagnostics*. Elsevier Academic Press. London.

56. Pauline CN, Henikoff S. (2003). SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acid Research*. 31: 3812-3814.

57. Polat YÖ. (2006). Sakız koyun ırkında BMPR-IB geninde çoklu doğuma neden olabilecek FecB aleli varlığının PCR-RFLP yöntemiyle araştırılması. Doktora Tezi. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Bursa.

58. Putnová L, Knoll A, Dvořák J, Čepica S. (2002). A new *HpaII* PCR-RFLP within the porcine prolactin receptor (*PRLR*) gene and study of its effect on litter size and number of teats. *J Animal Breed Genetic* 119: 57-63.

59. Ramos-Onsins SE, Rozas J. (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol Biol Evol* 19 (12):2092-2100.

60. Rogers AR, Harpending H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9 (3):552-569.

61. Rozas J, Sanchez DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19 (18): 2496- 2497.

62. Sambrook J, Russell DW. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New

York.

63. Sanger F, Nicklen S, Coulson R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. PNAS 74 (12): 5463-5467.
64. Schaffer S, Sabetti P. (2008). Evolutionary adaptation in the human lineage. Nature Education 1(1).
65. Schneider S, Excoffier L. (1999). Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise difference when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. Genetics 152: 1079-1089.
66. Shirota M, Banville D, Ali S, Jolicoeur C, Boutin JM, Edery M, Djiane J, Kelly PA. (1990). Expression of two forms of prolactin receptor in rat ovary and liver. Mol Endocrinol 4: 1136-1143.
67. Slatkin M, Hudson RR. (1991). Pairwise comparison of mitochondrial DNA sequence in stable and exponentially growing populations. Genetics 129: 555-562.
68. Sönmez R, Kaymakçı M. (1987). Koyunlarda döl verimi. EÜ Zir Fak Yay No:404.
69. Tajima F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123. 585-589.
70. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599.
71. Terman A. (2005). Effect of polymorphism of prolactin receptor (*PRLR*) and leptin (*LEP*) genes on litter size in Polish pigs. J Anim Breed Genet 122: 400-404.
72. Tzeng SJ, Linzer DI. (1997). Prolactin receptor expression in the developing mouse embryo. Mol Reprod Dev 48:45-52.
73. van Rens BT, Evans GJ, van der Lende T. (2003). Components of litter size in gilts with different prolactin receptor genotypes. Theriogenology 59: 915-926.
74. van Rens BT, van der Lende T. (2002). Litter size and piglet traits of gilts with different prolactin receptor genotypes. Theriogenology 57 (2):883-893.
75. Vincent AL, Evans G, Short TH, Southwood OI, Plastow GS, Tuggle CK, Rothschild MF. (1998). The prolactin receptor gene is associated with increased litter size in pigs. Proceeding 6th world congress on genetics applied to livestock production.

Armidale. 27: 15-18.

76. Vincent AL, Wang L, Tuggle CK, Robic A, Rothschild MF. (1997). Prolactin receptor maps to pig chromosome 16. *Mamm Genome* 8: 793-794.

77. Wang X, Wang L, Luo Reng Z, Sun S. (2008). Analysis of *PRLR* and *BF* genotypes associated with litter size in Beijing Black pig population. *Agricultural Science in China*. 7 (11): 1374-1378.

78. Zhang GX, Chu MX, Wang JY, Fang L, Ye SC. (2007). Polymorphism of exon 10 of prolactin receptor gene and its relationship with prolificacy of Jining Grey goats. *Yi Chuan* 29 (3): 329-336.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Ankara'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Ankara'da tamamladı. 2002 yılında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesinden mezun oldu. 2004 yılında Fırat Üniversitesi Zootekni Anabilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak atandı. Halen aynı görevi sürdürmektedir.