

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI



**CWC15 GEN MUTASYONU SIKLIĞININ VE İNFERTİLİTE
İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

MELİH SERCAN USTAOĞLU

Danışman

Doç. Dr. SERBÜLENT YİĞİT

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.TIP.1904.22.006 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Melih Sercan USTAOĞLU tarafından, **Doç. Dr. Serbülent YİĞİT** danışmanlığında hazırlanan “**CWC15 GEN MUTASYONU SIKLIĞININ VE İNFERTİLİTE İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI** ” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 21.8.2023 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Akın TEKCAN Amasya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	<input type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Prof. Dr. Gülay ÇİFTÇİ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı	<input type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye (Danışman)	Doç. Dr. Serbülent YİĞİT Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veterinerlik Genetiği Anabilim Dalı	<input type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Doç. Dr. Şengül TURAL Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	<input type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Dr.Öğr.Üyesi Zülfinaz Betül ÇELİK Samsun Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	<input type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır

07/06/ 2023

Melih Sercan USTAOĞLU

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: CWC15 GEN MUTASYONU SIKLIĞININ VE İNFERTİLİTE İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 20.06.2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 11

Tek kaynak oranı : % 4 çıkmıştır.

21 /06/ 2023

Doç. Dr. SERBÜLENT YİĞİT

ÖZET

CWC15 GEN MUTASYONU SIKLIĞININ VE İNFERTİLİTE İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Melih Sercan USTAOĞLU
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı
Doktora, Ağustos/2023
Danışman: Doç. Dr. Serbülent YİĞİT

CWC15 geni mRNA splicing’de görev alan ve mRNA’nın olgunlaştırılmasını sağlayan protein kompleksi içinde yer alan bir proteini kodlar. CWC15 geninde meydana gelen mutasyon embriyonik gelişmeyi olumsuz etkiler. Tez çalışmamızda Jersey ırkı sığırlarda CWC15 geninde meydana gelen Tek Nükleotid Polimorfizmi" (Single Nucleotide Polymorphism) olan JH1’in fertiliteye olumsuz etkisi incelendi. Ülkemizde az sayıda olan jersey işletmelerinden alınan 172 Jersey sütünden/tükürüğünden alınan numuneler, Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonrası Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP-PCR) ve DNA dizileme kullanılarak popülasyon içerisinde JH1 taşıyıcı frekansı tespiti ile popülasyon taraması ve JH1’in infertilite ile ilişkisi tespit edildi. Hiçbir dışlanma kriteri kullanılmadan sürü içerisinde rastgele seçilen hayvanlardan alınan örnekler ve hayvanların kayıt sisteminden edinilen veriler kullanılarak çalışma yürütüldü. Sonuç olarak 172 Jersey sığırından 9 adet (%5,23) JH1 taşıyıcısı tespit edildi. JH1’in fertilitayla ilişkisi bulundu, fakat istatistiki açıdan anlamlı bir sonuç ($P>0,05$) ortaya çıkmadı. JH1 neden olduğu erken embriyonik ölümler ekonomik kayba yol açtığından, ithal Jersey spermalarında ve dişi hayvanlarda taramanın yapılması JH1’in tüm popülasyonda frekansının artmasının önüne geçmekte yardımcı olabilir.

Anahtar Sözcükler: CWC15 geni, JH1, PCR-RFLP, DNA dizileme.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE FREQUENCY OF CWC15 GENE MUTATION AND ITS ASSOCIATION WITH INFERTILITY

Melih Sercan USTAOĞLU
Ondokuz Mayıs University
Institute of Graduate Studies
Department of Medical Biology
Ph.D., August/2023
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Serbülent YİĞİT

The CWC15 gene encodes a protein that plays a role in mRNA splicing and facilitates the maturation of mRNA. Mutations occurring in the CWC15 gene can have negatively impact on embryonic development. In this study, we investigated the detrimental effect of a Single Nucleotide Polymorphism (SNP) called JH1, located in the CWC15 gene, on fertility in Jersey cattle. Samples were collected from 172 Jersey cows obtained from a limited number of Jersey farms in our country, including milk and saliva samples. The frequency of JH1 carriers and its association with infertility were determined through population screening using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) and DNA sequencing techniques. The study was conducted using randomly selected animals from the herd, without employing any exclusion criteria, and data obtained from the animal recording system. As a result, 9 out of 172 Jersey cows (5.23%) were identified as JH1 carriers. Although a correlation between JH1 and fertility was found, there was no statistically significant ($P>0.05$). Due to the economic loss caused by early embryonic deaths attributed to JH1, screening of imported Jersey semen and female animals can help prevent the increase of JH1 frequency in the entire population.

Keywords: CWC15 gene, JH1, PCR-RFLP, DNA sequencing.

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Jersey ırkı sığır, meslek yaşamım boyunca hep büyük önem verdiğim bir ırktır. Ancak son zamanlarda yavru veriminde yaşanan düşüş nedeniyle yetiştiricilikte terk edilmeye başlandı. Bununla birlikte, bu ırkın bölge coğrafyasına adaptasyon yeteneği oldukça yüksektir. Bu özellik, ırkın yetiştirilmesine tekrar ilgiyi artırma yönünde gerekli çalışmaların yapılması ile teşvik edilmelidir.

Doktora eğitimim öncesi ve sırasında verdiği tavsiyelerle hayatıma dokunan ve bir danışmandan öte yol gösterici olarak ufkumu genişleten, uzun ve zorlu doktora eğitimim ve doktora tez araştırmasının planlanması ve yürütülmesi sırasında engin bilgi ve tecrübesiyle her daim yanımda olan ve desteğini, sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen kıymetli hocam danışmanım Sayın Doç. Dr. Serbülent YİĞİT'e minnettarlığımı sunar, sonsuz teşekkür ederim.

Tez izleme komitemde bulunan ve katkılarını esirgemeyen kıymetli hocalarım sayın Prof. Dr. Gülay ÇİFTÇİ'ye ve Sayın Doç. Dr. Sengül TURAL'a, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Nurten KARA , Sayın Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ'e , Sayın Dr. Öğretim Üyesi Mehmet Alper ARSLAN'a ve Araş. Gör. Hilal KOYUNCU'ya, arkadaşlarım Tuba KESKİN'e ve Mehti GADİMZADE'ye, Ondokuz Mayıs Üniversitesi KİTAM'dan Öğ. Görevlisi Dr. Eda UĞURTAY'a, ayrıca Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesin den Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ'ye ve Patoloji ABD'de Araş. Gör. Nilüfer KURUCA'ya ve Vet. Hekim Muhamet Taha KAYA'ya ve Amasya Üniversitesi Suluova Meslek Yüksekokulundan Dr. Öğr. Üyesi Şirin OBA'ya ve Dr. Öğr. Üyesi İnci Bahar ÇINAR'a doktora sürecimde destekleri için , ayrıca örneklerin teminde bana destekleri için Vet. Hekim Serdar BİLGİN'e ve örnekleri aldığımız işletmeye ve çalışanlarına, doktora tez projesini PYO.TIP.1904.22.006 proje numarası ile destekleyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında olduğu gibi doktora tez çalışmalarım da desteğini esirgemeyen, sevgili eşim Dr. Vet. Hekim Gülsüm USTAOĞLU'na, biricik oğlum Çınar USTAOĞLU'na, yaşamımda hep arkamda olduklarını bildiğim ve tez çalışmalarım esnasında da başta oğlumun bakımı olmak üzere pek çok durumda arkamda olan canım annem ve babam Sevgül-İlhami USTAOĞLU, manevi desteklerini her daim hissettiren, yanımda bulunarak tezimin yazımında büyük katkı sağlayan değerli annem ve babam Zehra-Cahit ÇELİK'e, tecrübesine ve bilgisine sürekli olarak başvurduğum ve hep desteğini hissettiğim değerli kardeşim Dr. Öğr. Üyesi Semih Serkan USTAOĞLU'na, candan teşekkürlerimi sunarım.

Melih Sercan USTAOĞLU

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI.....	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Jersey Irkı	3
2.1.2. Türkiye’de Jersey Yetiştiriciliği	5
2.2. Fertilite	6
2.3 CWC15 Geni	9
2.4 Sığırlarda CWC15 Geni Mutasyonu	14
2.5 Jerseylerde CWC15(JH1) Gen Mutasyonu	15
2.6. Doğurganlık Kayıtları.....	16
2.7 Literatür Özeti	17
3. YÖNTEM.....	19
3.1.Kullanılan Cihazlar.....	19
3.2. Kullanılan Solüsyonlar ve Tamponlar.....	19
3.2.1. Etidiyum Bromür Solüsyonu	19
3.2.2. Elektroforez Tamponun Hazırlanması.....	20
3.2.3. Agaroz Jel (% 1.25 'lik)	20
3.2.4. dNTP Çalışma Solüsyonu.....	20
3.2.5. Primer Stoklarının Hazırlanması	20
3.2.6. EDTA Solüsyonunun Hazırlanması	21
3.2.7. 5XTBE (Tris-Borat-EDTA) Tamponu	21
3.3. Örnek Toplama.....	21
3.3.1 Süt Numunelerinin Toplanması.....	21
3.3.2 Tükürük Örneklerinin Toplanması	22
3.4 Numunelerden DNA eldesi	22
3.5. DNA Ekstraksiyonu.....	22
3.6. PCR Aşaması.....	23
3.7. Agaroz Jel Elektroforezi.....	26
3.8. PCR Ürünlerinin Kontrolü	27

3.9.RFLP PCR.....	28
3.10. DNA Dizi Analizi.....	30
3.11. İstatistik Analizi.....	31
4 BULGULAR	32
4.1 Araştırma Grubuna Ait Bulgular	32
4.2. DNA'nın Kalitatif Tayini	33
4.3. PCR-RFLP Analizi.....	34
4.4. DNA Dizi Analizi.....	35
4.5. İstatistiksel Analiz Bulguları	36
5.TARTIŞMA	38
6. SONUÇ VE ÖNERİ	46
KAYNAKLAR.....	48
EKLER.....	56
Ek 1 Etik Kurul Kararı	56
ÖZ GEÇMİŞ.....	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
µg	: Mikro gram
Bç	: Baz çift
BLAD	: Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency
BTA15	: Bos taurus autosome 15
C	: Sitozin
cRNA	: Tamamlayıcı RNA
CVM	: Complex Vertebral Malformation
dATP	: Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	: Deoksitosin trifosfat
ddATP	: Didesoksi Adenozin trifosfat
ddCTP	: Didesoksi Sitidin trifosfat
ddGTP	: Didesoksi Guanozin trifosfat
ddNTP	: Dideoksiribonükleotid trifosfatları
ddTTP	: Didesoksi Timidin trifosfat
dGTP	: Deoksiguanozin trifosfat
dH ₂ O	: Distile Su
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
dTTP	: Deoksitimidin trifosfat
EDTA	: Etilendiamintetra asetik asit
EtBr	: Ethidium bromür
Gr	: Gram
HCl	: Hidroklorik asit
HF	: Holstein Friesian
HH	: Holstein haplotipi
Kg	: Kilogram
M	: Marker
Mb	: Mega baz
Mg	: Miligram

MgCl ₂	: Magnezyum Klorü
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Mesenjer RNA
NAGP	: Ulusal Hayvan Germplazma Programı
NaOH	: Sodyum hidroksit
nm	: Nanometre
NTC	: NineTeen Complex
°C	: Santigrat derece
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyon
PCR-RFLP	: Kısıtlama fragmanı uzunluk polimorfizmi
PRP19C	: PRP19 kompleksi
RJA ve HS	: Royal Jersey Ziraat ve Bahçe Derneği
RNA	: Ribonükleik Asit
Rnase	: Ribonükleaz
Rpm	: Dakika başına devir
Sn	: Saniye
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
snRNA	: Küçük nükleer RNA
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
T	: Timin
T-ARMS-PCR	: Tetra primer Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi
TBE	: Tiris Borat
TPE	: Tiris Fosfat
U	: İnternasyonel Ünite
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
µl	: Mikrolitre
\$: ABD Doları

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Prp19 kompleksi (Prp19 C), birçok farklı hücresel süreçte işlevleri (Chanarat & Sträßer, 2013).	10
Şekil 2.2. NTC/PRP19 C 'nin görevleri(Chanarat & Sträßer, 2013)	11
Şekil 2.3. PRP19 kompleksinin splicing mekanizmasındaki görevi (Chanarat & Sträßer, 2013).....	12
Şekil 2.4. CWC15 geninin <i>Homo sapiens</i> ve <i>Bos taurus</i> ile karşılaştırılmış şekli (NCBI, 2023a).....	13
Şekil 4. 1. %2,5'lik agaroz jelde yürütülen CWC15 geninin PCR sonrası bant örnekleri (marker 100bç DNA markırı kullanılmıştır.....	33
Şekil 4. 2. %2,5 'lik agaroz jelde yürütülen CWC15 geninin kesim sonrası bant örnekleri (N=Normal C=Mutant).....	34
Şekil 4.3. DNA dizi analizi sonucu normal genotip	35
Şekil 4.4. DNA dizi analizi ile elde edilen tek nükleotid polimorfizim.	36

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1. CWC15 geninde JH1 mutasyonunun bulunduğu bölümü içine alan 340bç'lik kısmı içeren primerler	24
Tablo 3.2. JH1 mutasyonu için PCR reaksiyon karışımı	25
Tablo 3.3. CWC15 geni Termal cycler'da PCR için ısı devri	26
Tablo 3.4. Her bir örnek için hazırlanan RFLP karışımı	30
Tablo 4.1. Örneklerin yaşlara göre dağılımı	32
Tablo 4.2. Örneklerin doğum sayısı dağılımı	32
Tablo 4.3. Örneklerin servis periyotlarının dağılımı	33
Tablo 4.4. CWC15 geni PCR/RFLP sonuçları	34
Tablo 4.5. Gruplara ayrılmalarına göre sığırların JH1 mutasyon genotip dağılımı.....	37

1.GİRİŞ

Jersey sığır ırkının kökeni İngiltere ve Fransa arasındaki Manş Denizi'nin Fransa kıyılarındaki en güneydeki bir ada olan Jersey adasıdır. Irk taksonomik olarak, *Bos taurus barchiceros* içerisinde yer alır. Jersey sığırları, Jersey adasında ana yetiştiricilik ürünü olarak 1771 yılından bu yana kaydedilmiştir (Becker, 1973). Bu ırk, dünya genelinde 82 ülkede aktif olarak yetiştirilmektedir. Jersey sığırlarının adaptasyon kabiliyeti, çeşitli iklim ve coğrafi bölgelerde yetiştirilmesine olanak sağlamıştır. Jersey ırkı 1958 yılında Samsun Kara Köy harasına Amerika'dan getirilmiştir (Kul, 2013; Osmanağaoğlu, 2006). Bu yörenin seçilmesinin kritik nedenlerinden biri de Jerseylerin ana vatanı ile Karadeniz bölgesinin iklim koşullarının örtüşmesi olmuştur. Ülkemize getirildikten sonra, bölgede halk elinde ıslah amacıyla doğal çiftleşme veya inseminasyon yoluyla saf ırk ya da melez ırklar yetiştirilmeye başlanmıştır (Ünalın & Cankaya, 2010).

CWC15 geni, DNA'dan transkript edilen mRNA'nın olgunlaşmasını sağlayan spliceosome kompleksine dahil olan Q2KJD3 adlı proteinin sentezlenmesini sağlar. CWC15 gen mutasyonu; Jersey ırkı sığırlarda VanRaden ve arkadaşları (2011) tarafından keşfedilen ve inseminasyon sonrası 60. günden sonra embriyo kaybıyla gebeliğin sonlanmasına neden olan tek nükleotid polimorfizmi (SNP) olarak tanımlanmıştır (P. VanRaden, Olson, Null, & Hutchison, 2011). JH1 adı verilen mutasyon, CWC15 genindeki bir yüksek etkili STOP-gain mutasyonudur. Bu mutasyon, CWC15 gen ürünündeki 54. amino asit olan Arjinin 'in yerine, 3. ekzonda bulunan sitozin nükleotidinin timine dönüşmesiyle birlikte STOP kodonunun oluşmasına neden olur (Sonstegard et al., 2013). CWC15 geninde meydana gelen JH1 mutasyonu taşıyıcılığı fenotipik olarak belirlenmemektedir. Bu durum özellikle inseminasyonda eş seçilimi yapılırken, hem taşıyıcı-taşıyıcı eşleştirmeleri ile erken embriyonik ölümlere, hem de taşıyıcı-normal eşleştirmeleri ile popülasyonda taşıyıcı frekansının artmasına neden olabilmektedir (Sonstegard et al., 2013). Bireylerin JH1 taşıyıcılıkları sadece genotipik incelemeler sayesinde belirlenebilmektedir.

ABD Jersey popülasyonunda %20-25 oranında yaygın gözlenen (Zhang et al., 2015) bu mutasyonun ülkemizde de frekansının belirlenip; gerekli tedbirlerin alınması gerekmektedir. Çünkü ABD'de Jerseylerdeki bu haplotipe bağlı infertilite, bakım maliyetleri vb. nedenlerle meydana gelen ekonomik kayıp 2.900.390 \$ olarak

belirlenmiştir (Cole, Null, & VanRaden, 2016). Ekonomik kayıpların yaşanmaması adına, popülasyonda bulunan dişi Jerseyler ile spermaları kullanılan boğaların genotiplendirilmesi yapılarak taşıyıcı hayvanların tespit edilmesi gerekmektedir.

Çalışmamız; Türkiye’de süttten DNA izolasyonuna yönelik bir çalışma olması, ülkemizde bulunan Jersey ırklarında CWC15 geni JH1 mutasyonunun taranmasının yapılacağı ilk çalışma olması, belirlenen hedef dizide meydana gelmiş olabilecek yeni mutasyon dağılımı için ışık tutacak olması ve Türkiye’de bulunan Jersey ırklarında CWC15 geni JH1 mutasyonunun tespiti durumunda infertilite ile ilişkisinin analiz edildiği ilk çalışma olması açısından özgün değere sahiptir.

Bu tez çalışmasının temel amacı, ülkemizdeki sığırlardan elde edilen süt örneklerinin DNA'sından yola çıkarak, PCR-RFLP ve DNA dizileme yöntemleriyle CWC15 (JH1) mutasyonunun sıklığının kesin bir şekilde tespit edilmesi ve bu mutasyonun yaygınlığının belirlenmesidir. Bunun yanı sıra, çalışmanın hedefleri arasında Jersey sığırlarında embriyo kaybına neden olan bu heterozigot mutasyonun tanımlanması, seçilen popülasyon içindeki akrabalık ilişkilerinin ve mutasyonun dağılımının değerlendirilmesi, DNA dizileme ile hedeflenen bölgede olası yeni mutasyonların tespit edilmesi ve bunların oranının belirlenmesi yer almaktadır. Ayrıca, Jersey popülasyonundan alınan örneklerle, mutasyon ile infertilite arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi ve heterozigot dişilerdeki servis periyodunun belirlenmesi, taşıyıcı dişilerde servis periyodu uzunluğunun istatistiksel olarak analiz edilmesi gibi çalışma hedefleri de bulunmaktadır. Bu şekilde, bu çalışma Jersey sığır yetiştiriciliği alanında önemli bilimsel ve pratik bilgiler sunmayı amaçlamaktadır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Jersey Irkı

Jersey sığır ırkının kökeni, İngiltere ve Fransa arasındaki Manş Denizi'nin Fransa kıyılarının en güneydeki adalarından biri olan Jersey adasıdır. Irk taksonomik olarak; *Bos taurus barchiceros* içerisinde yer alır. 1771 yılında Jersey sığır ırkı, ana yetiştiricilik ürünü olarak kaydedilmiştir ve bu tarihten itibaren Jersey Adası'nda yaygın bir şekilde yetiştirilmeye başlanmıştır. Süt ırkı sığırlarının sahip olduğu fiziksel özelliklerin ve verim özelliklerinin benzerliği, Jerseylerin süt verim özellikli bir ırk olduğunu göstermiştir. 1763 yılında ada konseyinin yürürlüğe koyduğu ırk korunumu ile ilgili yasalar sayesinde, Jersey sığır ırkının bölgede kalması sağlanmıştır ve ırk oluşumu desteklenmiştir. 200 yıl boyunca yürürlükte olan yasalar ile izolasyon devam etmiştir. Jersey sığırları yalnızca fiziksel kondisyon durumuyla değil, aynı zamanda sütünün rengi, besleyici içeriği ve tereyağının eşsiz özellikleriyle ünlü bir ırktır (Becker, 1973). Jersey sığırlarının saf bir ırk olmasını sağlamak amacıyla kurulan ve Jerseylerin tüm bilgilerini kaydeden bir kuruluş olan Royal Jersey Ziraat ve Bahçe Derneği (RJA ve HS)" adında bir organizasyon bulunmaktadır. 1833'te kurulan kuruluşun hedefi, Jersey sığır ırkının sayısal verilerini kaydetmek ve adanın sığırlarının iyileştirilmesine yönelik çalışmalar yapmaktır. Kuruluş sayesinde 3 Mart 1866 yılında, ilk ırk kontrol verileri oluşturulmuştur (RJA, 2014). Böylece, adada yetiştirilen bütün Jersey sığırları popülasyonunun soyağacı net bir biçimde dernek sayesinde elde edilebilmiştir. Irkın saflığının korunması amacıyla, adaya başka ırka ait süt sığırları girişi engellenmiştir. Özellikle süt sığırları için soy hattını güçlendirmeyi amaçlayan bazı ülkeler, Jersey sığırlarının ithalatına büyük ilgi göstermişlerdir. Bu nedenle 1873 ile 1879 arasındaki dönemde Amerika, Yeni Zelanda, İngiltere ve Fransa'ya toplamda 7330 baş Jersey sığırları ihraç edilmiştir. İzolasyonun devamı 21. yüzyıla kadar sürmüştür (Becker, 1973). 21. yüzyıla kadarki süreçte dernek, ırkın saflığını sağlayacak bütün tedbirleri ve kayıtları almıştır. 2008 yılına kadar geçen sürede, yetiştirilen sığırlara kapalı bir yetiştiricilik politikası uygulanmış; adaya dışarıdan jersey sığırları girişine izin verilmemiştir. Jersey adasında yetiştiricilik yapılan hayvanların popülasyonları ve ihraç edilen hayvan popülasyonları arasındaki verim farkları, adadaki yetiştiriciler tarafından fark edildikten sonra, genetik yapının gelişmesi için kapalı yetiştiricilik uygulamasına son vermek amacıyla, 2008 yılında yeni bir yasa çıkarılmıştır. Bu yasa ile 219 yıllık izolasyon sona erdirilmiştir (RJA,

2014). Uygulanan 219 yıllık tecrit, ada sığırlarının genetik çeşitliliğinin azalmasına neden olmuştur. Fakat izolasyonun ortadan kalkması ile adaya getirilecek olan genetik çeşitliliğin; saf Jersey sığırlarının genetik yapısını korumak amacıyla 1960 yılından bu güne kadar yetiştirilmiş 450'den fazla olan ada boğalarından toplanan sperm, hem RJA&HS hem de Ulusal Hayvan Germplazma Programı (NAGP) kapsamında sperm dondurma merkezleri saklanmıştır (RJA, 2014). Bu amaçla adada var olan sığırların verim özelliklerini uluslararası yetiştiricilerin düzeyine çıkartmak için ithal sperma kullanımına başlanmıştır. Aynı zamanda adadaki yetiştiriciler tarafından Jersey soy gen havuzunun korunması için gerekli tedbirler alınmıştır (JerseyCanada, 2019; RJA, 2014).

Jersey ırkı, adaptasyon yeteneği sayesinde dünya genelinde 82 ülkede yetiştiriciliği yapılan bir sığır ırkıdır. Küçük yapılı olmasına rağmen ortalama 410 kg canlı ağırlığa sahip olan ırk; süt verimi açısından diğer süt sığır ırklarına oranla en yüksek verime sahip ırkların başında gelmektedir. Bu özellikleri sayesinde Jersey ırkı, birçok iklim ve coğrafik bölgede yetiştirilebilmektedir (OklahomaStateUniversity, 2008). Irk, diğer sütçü ırklara nazaran %18 oranında daha fazla üretkenlik yaşam süresine sahiptir (Jersey, 2014).

Jersey sığırı, Holstein sığırlarına kıyasla üreme özellikleri açısından (buzağılama süresi, süt verimliliği, erken doğum yaşları ve toplam doğum sayısı gibi) daha yüksek bir performansa sahiptir. Holstein ırkı ile karşılaştırıldığında, Jersey ırkı daha yüksek bir üreme verimliliği gösterir. Buzağılama aralığı, gün açık kalma süresi, ilk doğum yaşına ve yaşam boyu doğan buzağı sayısı gibi üreme özellikleri Jersey sığırlarında daha yüksek seviyededir (Jersey, 2014). Jersey sığırının Amerika Birleşik Devletleri'ne girişi, süt ve tereyağı üretimi için yoğun ticari tarım sistemleri altında hayvan ıslahı odaklı gerçekleşmiştir. Buna karşın, Jersey Adası'nda sığırlar daha küçük ölçekli meraya dayalı çiftçilik sistemleri içinde yetiştirilmiştir. Adada 2013 yılında, 24 çiftlikte toplamda 5.195 hayvan (3.000 sağmal ineği ve sürü büyüklüğü 122 inek) bulunmaktadır (RJA, 2014). 2014 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde, yaklaşık olarak 272.000 adet Jersey sığıra rastlanmaktadır ve ortalama bir sürüdeki inek sayısı 290'dır. Jersey Adası'ndaki inekler yıllık ortalama 5.043 kg süt üretirken, Birleşik Devletlerdeki Jersey'ler ise 8.150 kg süt üretmektedir (AJC.U.S..Jersey, 2014).

2.1.2. Türkiye’de Jersey Yetiştiriciliği

Dünyada pek çok ülkede saf ırkı bulunan ya da melezleri yetiştirilen Jersey ırkı, 1958 yılında Samsun Kara Köy Harası’na Amerika Birleşik Devletleri’nden getirilmiştir (Kul, 2013; Osmanağaoğlu, 2006). Bu bölgenin seçilmiş olmasının önemli sebeplerden biri, Jerseylerin doğdukları bölgedeki iklim koşullarının Karadeniz bölgesiyle benzerlik göstermesidir. Karaköy harasına getirilen hayvanlar; yöre halkına satılmış ve tabi ya da inseminasyon yöntemi ile ülkemizde hem saf Jersey ırkı sığırlar hem de melezleri yetiştirilmeye başlanmıştır. Geçmişte, saf ve melez Jersey sığırlarının toplam sayısı yaklaşık 900.000 baş iken (Ünalın & Cankaya, 2010); son zamanlarda toplam sayının düşmesine bağlı olarak bu sayı 59.615’e gerilemiştir (TÜRKVET, 2023).

İrk, süt üretimi için yetiştirilen ırklar arasında en küçük vücut yapısına sahip olanıdır. Ülkemiz koşullarında, yetişkin ineklerin canlı ağırlığı 350-400 kg arasında değişirken, boğaların canlı ağırlığı 600-650 kg arasındadır. Avrupa kökenli olan bu ırk, Amerikan Jerseyleri ile karşılaştırıldığında; daha küçük vücut yapısına sahiptir. Jerseyler, süt üretimi için yetiştirilen ırkların tüm özelliklerini sergilemektedir. Süt bezleri ve bağlantıları, sütçü ırklar arasında eşsiz özelliklere sahiptir. Baş yapısının oldukça küçük olması, narin kemik yapısı, uzun bacakları ve geniş süt memeleriyle öne çıkmaktadır Jersey ırkı inekler, ufak yapılı, meralardan oldukça iyi derecede yararlanabilen, sütteki yağ, protein ve kuru madde oranı yüksek olan, bakımı, beslemesi ve süt üretimi ekonomik olan bir ırktır (Gürses, Bayraktar, & Şimşek, 2014). Çok ağır olmayan beden yapısı sayesinde, tırnak problemleri nadir görülmektedir. Türün süt verim özellikleri, ülkemiz koşullarında ortalama olarak 3-4 bin litre arasında değişse de diğer ülkelerde yıllık 6-7 bin litre süt verimi kaydedilmektedir. Sütteki protein oranı yaklaşık %3,5-3.6 arasında değişirken; yağ oranı ise %5-6 arasında değişebilmektedir. Yağ ve protein açısından zengin olduğu gibi, kalsiyum açısından da oldukça zengindir. Yerli ırklarla melezleme yapılarak, verim özellikleri yüksek bir ırk oluşturulmaya çalışılmaktadır ve bu amaçla özellikle Avustralya’da Holstein’ler ile melezleme yapılmaktadır.

2.2. Fertilité

Süt sığırı yetiştiriciliğinin temel sistemi, damızlık üretim esasına dayanmaktadır. Fakat süt işletmelerinin daha çok süt üretimine odaklanmış olmaları sebebiyle, işletmelerin yaptıkları seleksiyon süt verimi üzerine kurulmaktadır. Seleksiyonun tek yönlü olması, sürülerin üreme performanslarını negatif yönde etkilemektedir. Düşük üreme performansı ise, süt endüstrisinin sürdürülebilirliğini olumsuz etkilemektedir. Gelişen genomik teknoloji desteğiyle, seleksiyonda görülen olumsuzluklar son yıllarda giderilmeye çalışılmaktadır. Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları ile doğurganlık özelliklerinin genetik mimarisi çözülmeye başlanmıştır (Ma, Cole, Da, & VanRaden, 2019).

Üreme özellikleri çoklu genetik doğası nedeniyle genom çapında ilişkilendirme çalışmalarında istenilen düzeyde fayda sağlanamamıştır. Süt üretimindeki artış Holstein dişilerinde gebelik performansını olumsuz yönde etkilemiştir (De Vries & Veerkamp, 2000; Hayes, Bowman, Chamberlain, & Goddard, 2009; Royal et al., 2000)

Sığırlarda damızlık verim özelliklerinin değerlendirilmesi için geliştirilen sistem, gebe kalma tarihi ile doğum tarihi arasındaki gün farkı olarak hesaplanan açık günler temeline dayanmaktadır (P. VanRaden et al., 2004).

Doğurganlık özellikleri düşük bir kalıtsallığa sahip olması nedeniyle, rutin olarak değerlendirilmemiştir. Ayrıca verim özellikleri ile doğurganlık arasında var olan negatif kolerasyon belirlenmiştir (Dematawewa & Berger, 1998). Freeman ve ark. (1986) yaptıkları çalışmada, verim özellikleri lehine yapılan seçimlerin üreme aleyhine bir gidişat sergileyeceği yönünde görüşlerini bildirmişlerdir. Bu durum, üreme performansını artırmak için farklı teknikler geliştirilmesine neden olmuştur (Freeman, 1986). Östurus belirteçleri ve senkronizasyon yöntemleri üreme performansını artırmak için geliştirilmiş olsa da üreme performansının her geçen gün düşmesi genetik seçilime ihtiyaç olduğunu göstermiştir (Lucy, 2001).

Gebelik oranı parametresi her 21 günde bir oluşan gebe kalma şansını temsil eden sistem içerisinde ne kadar kısa sürede gebeliğin oluştuğunu ölçmektedir. Yani toplam sürüde gebe kalanlar ile gebe olmayanların oranıyla üreme başarısı karşılaştırılmaktadır. Gebelik oranı yüksek olması tercih nedeni olmakla birlikte, yetiştiricinin seçimini yönlendirmektedir (P. VanRaden et al., 2004).

Açık gün sayısı içerisinde gönüllü bekleme süresi olarak tanımlanan ve doğum sonrası değişiklik olan sistemlerde ve organların fizyolojik formlarına geri dönmesi için tanınan ve inspeksiyonun olmadığı laktasyonun ilk günlerini içeren bir süredir. Açık gün süresi (ya da gönüllü bekleme süresi) sürülere ve mevsime bağlı olarak değişiklik gösterebilmekte; fakat bu değişiklik az ise genetik değerlendirmeyi etkilememektedir (P. VanRaden et al., 2004). Bu eğilim ancak son zamanlarda dengelenmekte ve gelişmeye başlamaktadır (García-Ruiz et al., 2016). Holstein ineklerde başarılı gebe kalma, 50 yıl öncesine göre günümüzde yaklaşık 50 gün daha uzun süre gerektirmektedir (-%1 yavru gebelik oranı = +4 gün açık) (P. VanRaden et al., 2004)

Fertilitenin düşük kalıtsallık sergilediğinin (Jiang et al., 2017; Kadarmideen, Thompson, Coffey, & Kossaibati, 2003) belirlenmesiyle birlikte, süt verimi ile arasında negatif bir ilişkiye ve yanlış seleksiyonun da fertilitate azalmasına neden olduğu ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak, üremedeki genetik etki kabul görmüştür (Kadarmideen et al., 2003; Peñagaricano & Khatib, 2012; Veerkamp & Beerda, 2007; Walsh, Williams, & Evans, 2011).

Boğalar, damızlık süt ineklerinde doğurganlığı etkileyen önemli bir faktördür. Süt sığırlarında sürü yönetimi son 20 yılda; senkronizasyon protokollerinin gelişmesi, beslenme ve bakım şartlarının iyileştirilmesi ve yakın süreçte doğurganlığın ve uzun ömür özellikleri bakımından genetik seleksiyonun tercih edilmesi ile önemli ölçüde ilerlemiştir (Rezende, Dietsch, & Peñagaricano, 2018). Seleksiyona rağmen üreme verimliliği optimalin altında kalmış durumdadır. Tüm bunların sonucu olarak, süt endüstrisi ekonomik kayıplarla karşı karşıya kalmıştır (Inchaisri, Jorritsma, Vos, Van der Weijden, & Hogeveen, 2010). Buna rağmen; boğa infertilitesi, damızlık verimin düşmesinde genetik göz ardı edilmektedir. Süt sığırlarında damızlık verim başarısızlığının önemli yüzdesinin boğa subfertilitesinden kaynaklanabileceği, bazı çalışmalar (R. Amann & DeJarnette, 2012; DeJarnette et al., 2004) neticesinde ortaya çıkmıştır. Bu nedenle süt endüstrisi boğa fertilitatesini göz ardı etmemelidir (R. P. Amann, Saacke, Barbato, & Waberski, 2018; Taylor, Schnabel, & Sutovsky, 2018).

Boğa fertilitatesinde, genelde sperm morfolojisi, sperm konsantrasyonu ve sperm motilitesi gibi semene ait kalite özellikleri kullanılarak değerlendirilmektedir (DeJarnette et al., 2004). Ancak sperm kalitesi özellikleri damızlıklar arasındaki döl

verim özelliklerinde gözlenen farkların bir kısmını açıklayabilmektedir (Parkinson, 2004).

Jersey sığır ırkında, boğaların fertilité düşüşünün altında yatan genomik yapının nedeni hakkında yeterli bilgi yoktur. Jersey ırkı genel olarak holstein ırkına göre gebe kalma oranı daha yüksek olmasına rağmen; üreme performansları holsteinlerin altında kalmaktadır (Norman, Wright, Hubbard, Miller, & Hutchison, 2009).

Sığırlarda birkaç zararlı çekinik faktör incelenerek, tanımlanmış ve rapor edilmiştir. İlk keşfedilen 12 haplotipten 5 tanesi homozigot olma oranı çok yüksek hesaplanmış olmasına rağmen; homozigotluğa hiç rastlanmamıştır. Bu haplotiplere kaynak haplotip olarak adlandırılır ve kaynak ataya kadar izlenebilir. Tahmin edilen en yüksek homozigotluk gözlenmeyen haplotipler, embriyo kaybının nedeni olarak incelenmişlerdir. ABD'de gebelik oranında, spontan düşükler başarısız olarak değerlendirilirken; inseminasyon sonrası östurus gözlenmemesi değerlendirmesi yapan başka ülkelerde düşükler başarılı olarak nitelendirilmektedir (P. VanRaden, Null, Olson, & Hutchison, 2011).

Akrabalı yetiştirme depresyonu; doğurganlık, vücut yapısı, fertilité ve yetiştirme için uygunluk gibi nicel bir özellik için popülasyon değeri ortalamasının düşmesi olarak tanımlanmaktadır. Akrabalı yetiştirme depresyonu, insanlar da dahil olmak üzere birçok türde problemler oluşturduğu uzun zamandır bilinmektedir (Bittles & Black, 2010; Kristensen & Sørensen, 2005; Leroy, 2014). Akrabalı yetiştiriciliğin yol açtığı sorunların bilinmesi genetik temelinin çözülmesine yardımcı olmamaktadır (Ferenčaković, Sölkner, Kapš, & Curik, 2017).

Boğalarda düşük sperm kalitesi gibi üreme sorunlarına yol açan yüksek oranda akrabalı yetiştirme boğalarda infertiliteye neden olmaktadır (Aurich, Achmann, & Aurich, 2003; Margulis & Walsh, 2002; Van Eldik et al., 2006; Wildt, Baas, Chakraborty, Wolfle, & Stewart, 1982). Maximini ve ark. (2011) yaptıkları çalışmayla, sperm kalitesi analizleri ve pedigrî verilerini kullanarak akrabalı yetiştirme depresyonunun boğa fertilitésini etkilediğini göstermişlerdir. Kantitatif semen kalite özeliği olan semen hacmi, toplam spermatozoa sayısı, canlı sperm yüzdesi ve sperm hareketleri üzerindeki akrabalı yetiştirme depresyonunun olumsuz etkisini göstermişlerdir (Maximini, Fuerst-Waltl, Gredler, & Baumung, 2011).

2.3 CWC15 Geni

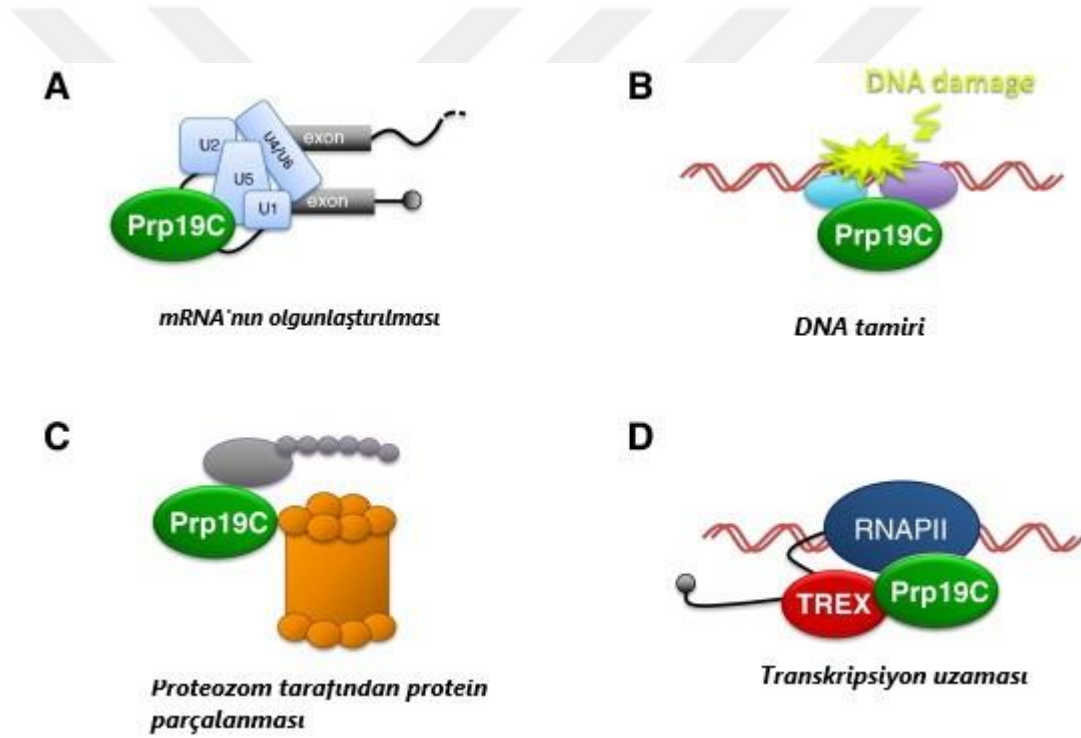
CWC15 geni, sığırların genomunda 15. kromozom üzerinde yaklaşık 15.704.925 bazdan 15.713.955 baz aralığında yer alan ve toplamda yaklaşık 9.017 baz çifti uzunluğunda olan bir geni ifade eder. Bu gen, toplamda 7 ekzon ve 6 intron içeren bir yapıya sahiptir. Bu genin transkript ürünü, 231 amino asit uzunluğundaki Q2KJD3 proteinini kodlar ve bu protein, PRP19 kompleksinin merkez çekirdeğinde önemli bir rol oynar (NCBI, 2023b). PRP19 proteini, bu kompleksin bileşimine katılarak mRNA olgunlaştırma süreçlerinde kritik bir işlev üstlenir. Bu bağlamda, CWC15 geni ve ürünü olan Q2KJD3 protein, hücrel olgunlaştırma mekanizmalarının düzenlenmesinde hayati bir rol oynar (Will & Lührmann, 2011).

RNA splicing, ökaryotlarda gen ekspresyonundaki temel mekanizmalardan biridir. mRNA olgunlaştırılması olarak tanımlanan RNA splicing, beş adet küçük nükleer RNA'dan ve çok sayıda proteinin bir araya gelerek oluşturduğu spliceosome olarak tanımlanan ribonükleoprotein komplekstir (Chen & Cheng, 2012).

Pre-mRNA'nın splicing'i spliceosome adı verilen ribonükleoprotein partikülü üzerinden gerçekleşen iki transesterifikasyon reaksiyonudur (Brody & Abelson, 1985; Grabowski, Seiler, & Sharp, 1985). Spliceosome 5 adet snRNA (U1, U2, U4, U5 ve U6) ve birçok protein faktöründen oluşmaktadır. Protein faktörleri, snRNA'ların sırasıyla ve uygun olarak pre-mRNA'ya birleşmektedir. İşlem sırasında ve sonrasında sırası ile faktör ve snRNA'lar sistemden ayrılarak eski hallerine dönüşmeleri sağlanmaktadır (Brow, 2002; Wahl, Will, & Lührmann, 2009). Prp19 kompleksi (NTC nineteen coplex), U1, U4 ün spliceosome yapısından ayrıldıktan sonra oluşuma katılan ve reaksiyon bitene kadar da yapıda kalan proteindir. U5 ve U6'nın spliceosome'a bağlı kalabilmesi NTC'ye bağlıdır (Chan, Kao, Tsai, & Cheng, 2003). NTC 8 adet protein kompleksinden oluşmaktadır ve bunlardan biri olan Prp19 proteindir (Hogg, McGrail, & O'Keefe, 2010; Tarn et al., 1994). Prp19'da CWC15 proteini yer almaktadır (Chen & Cheng, 2012).

NTC/Prp19C, spliceosome'da katalitik aktivasyon sırasında aktivite gösteren protein kompleksleri olarak keşfedilmiştir. Kompleks *Saccharomyces cerevisiae*'de transkripsiyonda görev aldığı ve yüksek ökaryotlarda genom bakımında rol oynadığı ortaya konulmuştur. Sonuç olarak tüm türlerde aynı işleve sahip olması, korunmuş bir kompleks olduğu sonucuna varılmasını sağlamıştır (Chanarat & Sträßer, 2013).

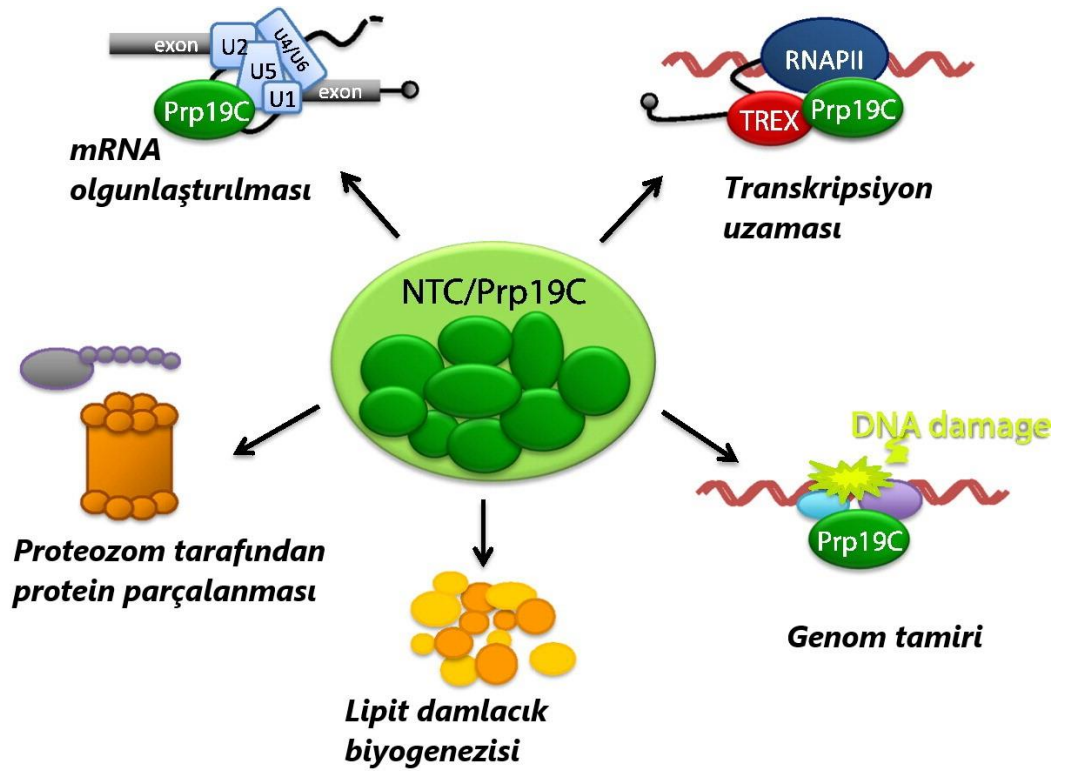
NTC veya Prp19C olarak anılan bu yapı, ismini kurucusu olan Prp19 proteininden almaktadır. *Saccharomyces cerevisiae*'de sekiz adet çekirdek ve ilişkili 19'a kadar proteinden oluşmaktadır. Prp19; bitkiler ve hayvanlar gibi yüksek ökaryotlarda otuzdan fazla proteinden oluşmaktadır (Koncz, Dejong, Villacorta, Szakonyi, & Koncz, 2012; Will & Lührmann, 2011). Prp19 kompleksi (Prp19 C), birçok farklı hücresel süreçte işlev görmektedir. (A) NTC/Prp19C ilk olarak snRNP olmayan bir ekleme kompleksi olarak tanımlanmıştır (Hogg et al., 2010). Bununla birlikte, son çalışmalar, kompleksin (B) genom bakımında (Henriques, JoséVicente, da Silva, & Schenberg, 1989), (C) proteazom tarafından protein bozunmasında (Sihn, Cho, Lee, Lee, & Kim, 2007) ve (D) transkripsiyon uzamasında da (Cho et al., 2007) kritik roller oynadığını ortaya koymuştur (Şekil 2.1) (Chanarat & Sträßer, 2013).



Şekil 2.1. Prp19 kompleksi (Prp19 C), birçok farklı hücresel süreçte işlevleri (Chanarat & Sträßer, 2013).

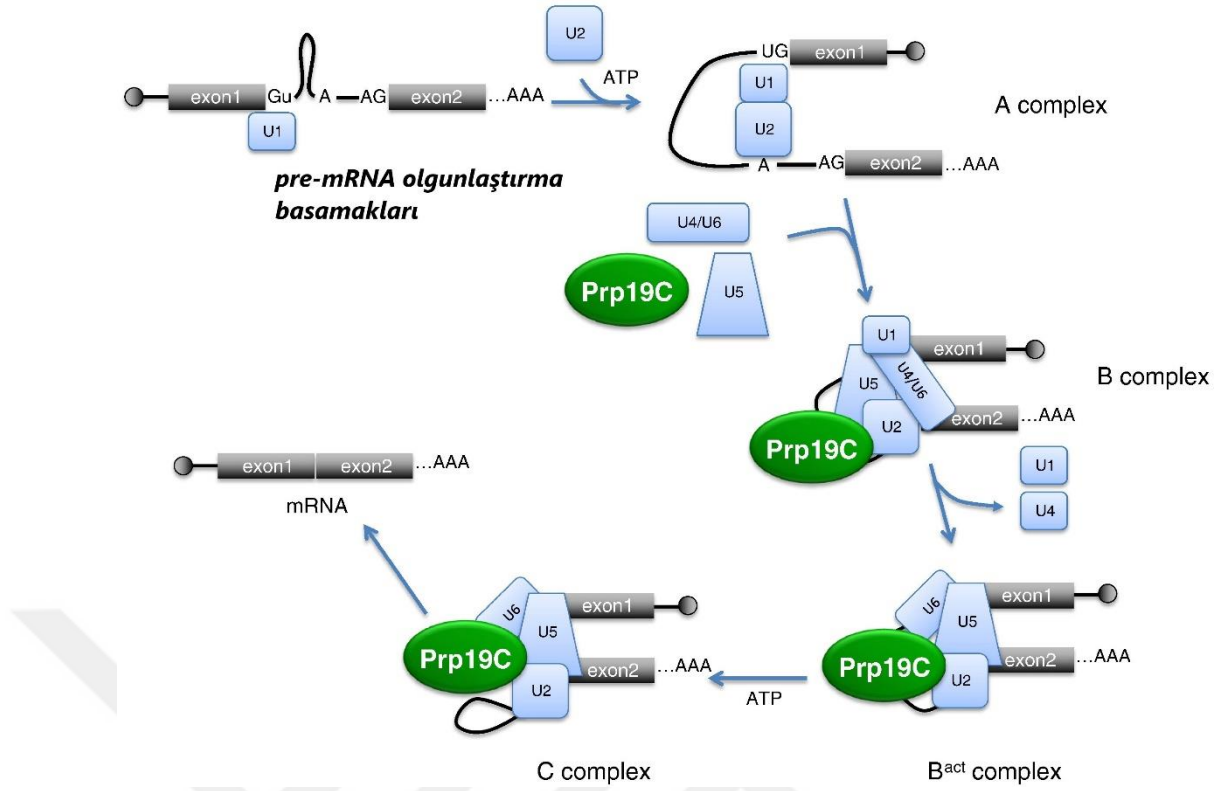
Ek olarak, NTC/Prp19C, lipid damlacık biyogenezinde işlev görmektedir. NTC/Prp19C'nin en iyi açıklanmış rolü, splicing işleviyle ilgilidir (Yin, Zhu, & Shen, 2012). Splicing, intronların bu işlemle inanılmaz bir hassasiyetle çıkarıldığı, gen ifadesinde kritik bir adımdır. Prp19C NTC/Prp19C işlevi, temel spliceozom konformasyonlarının oluşumunu ve ilerlemesini düzenleyerek splicing reaksiyonu için

hayati önem taşımaktadır. Prp19, DNA hasarına karşı artmış hassasiyete neden olan mutasyonlar için taramalarda tanımlanmıştır ve NTC/Prp19C'nin doğrudan genom bakımından bir işlevi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca ilk kanıtlar, NTC/Prp19C'nin proteinlerin proteazom tarafından doğrudan bozulmasındaki işlevini göstermektedir. İlginç bir şekilde, bir raporda fare Prp19'un başka bir metabolik süreç olan lipid damlacığı oluşumunda bir işlevi bulunmuştur (Cho et al., 2007). Son olarak, NTC/Prp19C, transkripsiyon uzama sürecinde işlev görür ve bu nedenle gen ifadesinin iki aşaması için önemlidir (Chanarat & Sträßer, 2013) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. NTC/PRP19 C 'nin görevleri(Chanarat & Sträßer, 2013)

Prp19 kompleksi, spliceosome'un kataliz işlemleri sırasında geçirdiği konformasyonel değişimleri kolaylaştıran ekleme makinasının korunmuş temel bir parçası olduğu düşünülmektedir. Prp19 kompleksinin çekirdek proteinleri olan CWC15 ve CDC5L'nin varlığı belirlenmiştir (Van Maldegem et al., 2015) (Şekil 2.3).



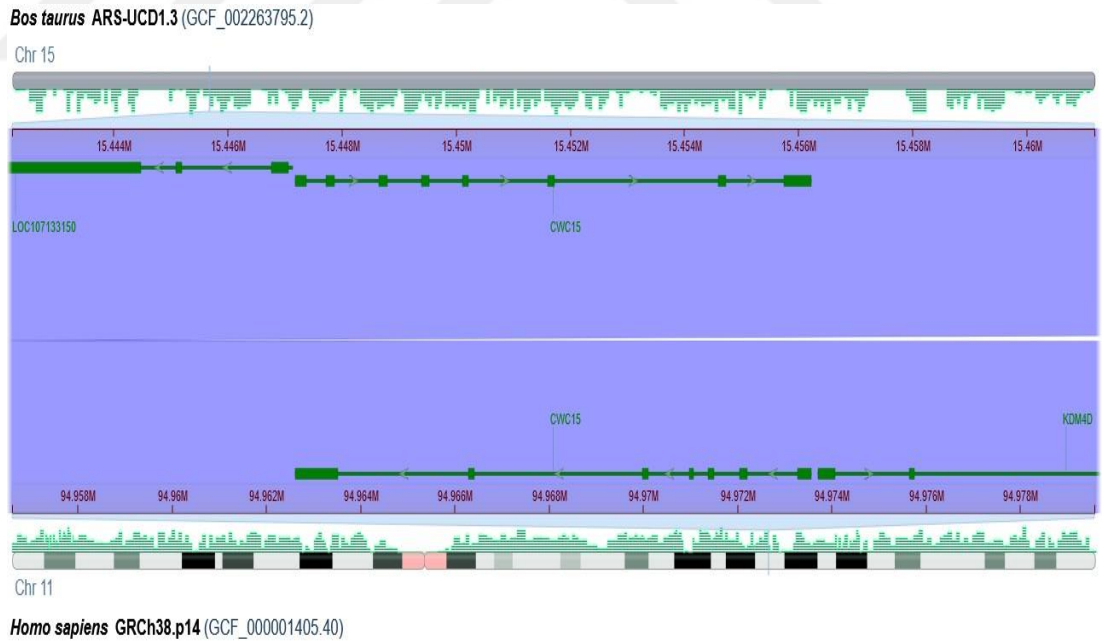
Şekil 2.3. PRP19 kompleksinin splicing mekanizmasındaki görevi (Chanarat & Sträßer, 2013).

Prp19 kompleksi, özgün olarak dört korunmuş proteinden oluşan bir çekirdek (Makarova et al., 2004) ve insanlarda PRPF19, CDC5L, PLRG1 ve SPF27 ile CTNNBL1 ve CWC15'i içeren bir alt kompleksten oluşan, splicing mekanizmasıyla ilişkili zorunlu çoklu protein bileşenidir. Bunun yanı sıra, HSP7C şaperon proteini (HSPA8 geni tarafından kodlanır) de bu kompleksin bir parçasıdır (Chanarat & Sträßer, 2013) ve çekirdek snRNP bileşenlerinin kataliz ve geri dönüşümünün birkaç adımını iletir ve bu nedenle splicing için gereklidir (Bessonov et al., 2010). Çekirdek kompleksin her bileşeninin kesin rolü henüz belirsizdir (Chan et al., 2003), ancak bütün olarak spliceosomun olgunlaşması sırasında gerçekleşen dinamik konformasyon yeniden düzenlemelerini kolaylaştıran bir rol oynadığı düşünülmektedir (Maeder & Guthrie, 2008; Wahl et al., 2009).

CWC15, Prp19 kompleksin yapısına bağlı olmaksızın stabildir (Herud, Weijers, Lau, & Jürgens, 2016). CWC15 in hücre devamlılığı için hayatidir, ancak etki alanı veya işlevi henüz belirlenmemiştir. CWC15, insanlarda NTC'nin ayrılmaz bir parçası diğer türlerde NTC ile ilişkilidir. CWC15'in splicing'deki önemli rolü ile uyumlu olarak CWC15 mutant embriyolar da erken kayıplar yaşanmaktadır. CWC15 ilk olarak

mayalarda ve insanlarda spliceosome ile ilişkili bir protein olarak tanımlanmıştır. Fakat ileri çalışmalar sonucunda CWC15 spliceosome'da daha merkezi bir rol oynadığı ortaya çıkmıştır (Nguyen et al., 2016; Shi, 2017). Yapılan kapsamlı analizler filogenetik analizler sonunda CWC15'in evrimsel olarak korunduğu bulunmuştur (Slane et al., 2020).

CWC15, ökaryotlarda evrensel bir şekilde ifade edilen yüksek oranda korunmuş bir splay faktörünü kodlamaktadır. CWC15, öncelikle maya ve insan hücrelerinde bir spliceosome la ilişkili bir protein olarak tanımlanmıştır. Sonraki cryoEM çalışmaları, onu spliceosomen çekirdek makinesinin içine yerleştirmiştir. Titiz filogenetik analizler sonucunda, CWC15'in tüm ökaryotlarda evrimsel olarak korunmasını ortaya çıkarmıştır. Bitkiler ve hayvanlar arasında CWC15 proteini farklılaşmış gibi görünmektedir; ancak kladları ayıran belirli aminoasit dizileri bulunmaktadır. Bununla birlikte, protein homologlarının özellikle N- ve C- terminal bölümlerindeki önemli alanlar korunmuştur, bu da CWC15'in tüm ökaryotlarda splay somla birlikte önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (Slane et al., 2020). Şekil 2.4'te insan ve sığır genomlarının karşılaştırıldığı şekil yer almaktadır.



Şekil 2.4. CWC15 geninin *Homo sapiens* ve *Bos taurus* ile karşılaştırılmış şekli (NCBI, 2023a)

2.4 Sığırlarda CWC15 Geni Mutasyonu

Sığır genom projeleri kapsamında, tek genli (Mendelian) mutasyonlar tespit edilmiştir (Daetwyler et al., 2014; Fries & Ruvinsky, 1999). Kazein varyantları gibi bazıları faydalı olmakla birlikte (Bovenhuis, Van Arendonk, & Korver, 1992), çoğu bu tür mutasyonlar zararlı etkilere sahiptir (Agerholm, 2007; Gentile & Testoni, 2006). Dominant mutasyon taşıyıcıları, fenotipik olarak tespit edilebildiğinden dolayı sürüden rahatlıkla ayıklanabilirler. Resesif mutasyonların heterozigot taşıyıcıları fenotipte tespit edilemez, bu yüzden fark edilmeleri zordur; bununla birlikte, küçük bir popülasyonun varlığını sürdürmesi kaçınılmazdır (Biscarini et al., 2016). Homozigot bireylerin fenotipik seçim veya doğal seçimle oluşumu, bu tür hayvanlarda neredeyse hiç görülmez ve homozigot mutasyonlar popülasyon içinde yaygın olarak dağılmaz. Ancak, verim özellikleri için seçilmiş olan taşıyıcı boğalar, mutasyonun popülasyonda yayılmasına neden olabilir ve ilgili genetik bozukluk daha büyük bir sorun haline gelebilir Sütçü ırklarda özellikle damızlık sığır endüstrisinde, akraba yakınlığının artışı, ırkın kurucu hayvan sayısının düşüklüğü, sınırlı sayıda etkili damızlık hayvanın bulunması ve yaygın olarak kullanılan suni tohumlamanın etkileri gibi faktörler, tüm modern sığır ırklarının resesif genetik bozukluklara karşı özellikle hassas hale gelmesine katkıda bulunur. Bu nedenle, bu durum popülasyon için kritik bir öneme sahiptir (Pausch et al., 2015). Sığır türlerinde bazı tehlikeli resesif genetik bozukluk örnekleri arasında uzun bir süredir bilinen BLAD (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency) (Shuster, Kehrlı Jr, Ackermann, & Gilbert, 1992) ve CVM (Complex Vertebral Malformation) (Thomsen et al., 2006) gibi mutasyonlar bulunur. Ayrıca, Jersey sığırlarında da son zamanlarda tespit edilen mutasyonlar, BTA15 üzerinde yer alan CWC15 geninde meydana gelir (haplotip JH1) (Sonstegard et al., 2013).

VanRaden ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan bir araştırmada; Brown Siwiss (1 adet), Holstein(3 adet) ve Jersey(1 adet) ırklarında olmak üzere üç farklı süt sığır ırkında infertiliteye yol açan beş farklı genetik yapının varlığı tespit edilmiştir (P. VanRaden, K. Olson, et al., 2011). Sonstegard ve arkadaşları (2013) Jersey ırkına ait JH1 haplotipi, *Bos taurus* otozom (BTA) 15. kromozomun 11 ile 19 Mb arasındaki bir bölgesinde bulunur ve fertilité üzerinde önemli derecede olumsuz etkisi olduğu saptanmıştır. Taşıyıcılık oranı yüksek olan bazı sürülerde (%13,4), bu haplotipi taşıyan homozigot bireylere bu durum, CWC15 geninin hücre fonksiyonları için kritik bir rol

oynadığını göstermektedir. *Bos tarus* otozom (BTA) 15. kromozom üzerinde bulunan CWC15 (JH1) geninde tek bir nükleotit değişimi meydana gelmektedir (Sonstegard et al., 2013). CWC15 gen ürünü, DNA'dan üretilen mRNA'nın olgunlaşmasını sağlayan spliceosome yapısına katılan Q2KJD3 adlı proteinin sentezini sağlar (Uniprot, 2023). CWC15 genindeki mutasyon, ilgili proteinin normal işlevini yerine getiremediği için spliceosome görevini tamamlamayacak ve olgun mRNA oluşturamayacaktır. CWC15 geni, en yoğun olarak plasenta ve uterusun plasenta ile bağlantı noktası olarak adlandırılan bölgede ifade edilmektedir (Lynn et al., 2008).

Sığırlarda keşfedilen bu tür haplotiplerin CWC15 geni gibi genel özellikleri, tek bir yüksek etkili STOP-gain mutasyonu oluşturmalarıdır. CWC15 gen ürününe bulunan Arjinin amino asidinin yerine, 3. ekzonda bulunan sitozin nükleotidinin timine dönüşmesiyle STOP kodonu oluşur. Bu durumda, normalde 231 amino asitten oluşan protein dizisi, 54 amino asitten oluşan bir anlamsız protein şeklinde meydana gelir. CWC15 geni, erken embriyonik dönemde ifade edilen bir gen olduğundan, mutasyon sonucu oluşan mutant protein embriyonik ölümlere neden olur (Sonstegard et al., 2013). CWC15 Knock-out farelerde erken embriyonik kayıpların olduğu kanıtlanmıştır. Heterozigot bireyler mutasyonun yayılmasında etkili rol oynarlar (Duan, Zhang, Zhu, & Li, 2010).

2.5 Jerseylerde CWC15(JH1) Gen Mutasyonu

CWC15 (JH1) gen mutasyonu, tek bir kaynak ataya dayanır. CWC15 mutasyonu Jersey ırkından olan 1962 doğumlu Observer Chocolate Soldier (ABD kayıt numarası 596832) isimli boğada tespit edilmiştir (P. VanRaden, K. Olson, et al., 2011). Observer Chocolate Soldier'ın 1458 dişi yavrusunun %50'sinin genetik olarak taşıyıcı olmasına rağmen, bu yavrular normal fenotipik özelliklere sahip olmuşlardır. Bu yavruların özellikle yüksek süt verim özelliğine sahip olmaları boğanın inseminasyonda kullanımını artırmıştır. Boğadan doğan dişi sığırların, aynı yıl içinde başka boğalardan doğan dişi sığırlara kıyasla ortalama olarak 764 lt daha fazla süt ürettiği belirtilmiştir. Bu durum, Chocolate Soldier'ın 50.000 dişi 2. jenerasyon yavrusu ve tespit edilen 200.000'den fazla 3. jenerasyon yavrusunun doğmasına yol açarak Jersey ırkında mutasyonun yayılmasını sebep olmuştur. Ek olarak, bu boğadan doğan ve damızlık olarak kullanılan ilk jenerasyonda 47 erkek boğa ve ikinci jenerasyonda ise 251 erkek boğa kaydedilmiştir (Cole et al., 2016). Bir başka araştırmada, Observer Chocolate Soldier (ABD kayıt numarası 596832) tarafından üretilen spermilerin kullanılmasıyla

dünyaya gelen 107 Jersey boğası, sperm üretiminde kullanılmış ve bu da mutasyonun yayılmasına ekstra bir katkı sağlamıştır (P. VanRaden, K. Olson, et al., 2011). 1980'lere kadar mutasyon yayılımı istikrarlı bir şekilde artarak yaklaşık olarak %20-25 seviyelerine kadar ulaşmıştır. Bu hızlı yayılımın sebepleri arasında, boğanın dişi yavrularının yüksek verim özelliklerine sahip olması, inseminasyonun popüler hale gelmesi ve boğa spermelerinin ülke çapında daha yaygın şekilde dağıtılması yer almaktadır. Normal çiftleşmelerde 1 dişiye yapılan altı milyar sperm aktarılırken, inseminasyonda aynı miktar sperm ile yüzlerce dişi Jersey'e uygulanabilmektedir. Bu durum, CWC15 mutasyonuna sahip spermelerin daha fazla yayılmasına yol açmaktadır (P. VanRaden, K. Olson, et al., 2011; Zhang et al., 2015).

CWC15 mutasyonuna yönelik yapılan araştırmalar sonucunda, ABD'de kısa bir süre içinde ne kadar hızlı yayılabildiği gözlemlenmiştir. İnseminasyon sürecinde heterozigot boğaların bilinçsizce kullanılmasının artması, mutasyonun daha fazla yayılmasına ve hatta ABD sınırlarını aşarak dünya genelinde yayılmasına yol açmıştır. Çin'de yapılan bir araştırmada, 449 adet damızlık Jerseyde %6.9 oranında mutasyon saptanmıştır. Aynı çalışmada, ABD spermalarının kullanıldığı 9 adet damızlık boğada yapılan analizler sonucunda, 5 tanesinde heterozigot CWC15 gen mutasyonu tespit edilmiştir (Zhang et al., 2015).

2.6. Doğurganlık Kayıtları

VanRaden ve ekibi (2011) tarafından gerçekleştirilen çalışma, normal boğalar ve normal boğaların dişi yavrularının çiftleştirilmelerinin 290.373 adet veri kaydının analizi sonucunda %37,0 düzeyinde bir gebelik başarı oranı gözlemlenmiştir (P. VanRaden et al., 2004). Ancak CWC15(JH1) mutasyonuna sahip heterozigot boğaların dişi yavrularıyla eşleştirilen diğer CWC15(JH1) mutasyonlu heterozigot boğaların 52.449 doğurganlık kaydı analiz edilmiş ve %33,3 düzeyinde bir gebelik başarı oranı tespit edilmiştir. Gebelik oranında gözlenen %3,7±0.2'lik düşüş, JH1'in beklenen %4,6'luk azalma ile yaklaşık olarak uyumlu olduğunu göstererek, embriyonik ölüme neden olan bir resesif gen mutasyonunun varlığını doğrulamıştır (Sonstegard et al., 2013). Heterozigot boğaların normal boğaların dişi yavrularıyla gerçekleştirdiği 57.523 çiftleşme sonucunda, potansiyel olarak maternal JH1 kalıtımına sahip heterozigot annelerin etkisiyle gebe kalma başarı oranı %0,7±0.2'lik hafif bir düşüşle %36,3 olarak tespit edilmiştir. Bu çiftleşmeler, hamileliğin ilk üç ayını başarıyla

geçenler olarak kabul edilmiştir (Sonstegard et al., 2013; P. VanRaden, K. Olson, et al., 2011).

JH1 kökenli embriyonik kayıpların, gebeliğin erken döneminden (<60 gün) önce meydana geldiği bilinmektedir. Yapılan analizler, inseminasyon sonrası gebeliğin 60. gününden sonra gebelik kayıplarının artmadığını ortaya koymuştur (P. VanRaden, D. Null, et al., 2011). Bu bulgu, embriyonik kayıpların çoğunun gebeliğin 60. gününden önce gerçekleştiğini göstermektedir.

2.7 Literatür Özeti

Harhay ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan çalışmalarında; bir sığır gen ekspresyonu atlası, yeni ayırt edici doku özelliklerini ve genom açıklamasını iyileştirmeye yönelik kanıtları ortaya koymuşlardır. Bu çalışma; sığır gen atlası olarak, bugüne kadar herhangi bir çiftlik hayvanı genomunun en derin ve en geniş transkriptom araştırmasıdır. Farklı konularda tanımlanan sens ve antisens transkript tag profillerindeki ortaklıklar ve varyasyonlar, gen ekspresyonu, doku ve gen fonksiyonu arasındaki ilişkinin incelenmesini kolaylaştırmaktadır (Harhay et al., 2010).

Wiggans ve arkadaşları 2016 yılında yapmış oldukları çalışmalarında, süt sığırlarının genomik değerlendirmesinde kullanılan tek nükleotid polimorfizmlerinin sayısının artırılmasını hedefleyen kapsamlı bir çalışma gerçekleştirmişlerdir (Wiggans et al., 2016).

2020 yılında Kumar ve arkadaşları tarafından, Holstein Friesian sığırlarında öldürücü Holstein haplotip 1, 3 ve 4'ün tespiti için PCR tabanlı testlerin geliştirilmesiyle ilgili çalışma gerçekleştirilmiştir. Holstein haplotipi (HH) 1, 3 ve 4, dünya çapında Holstein Friesian (HF) sığırlarında erken embriyonik kayıplardan sorumlu olan ölümcül mutasyonlardır. Bu çalışma ile sırasıyla HH1, 3 ve 4'ün taranması için PCR bazlı üç test tetra Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi PCR, PCR primer kaynaklı kısıtlama analizi ve PCR kısıtlama fragman uzunluğu polimorfizmi teknikleri geliştirilmiştir ve doğrulanmıştır. Tarama sırasında, 60 HF boğadan altısının üç mutasyondan biri için taşıyıcı olduğu bulunmuştur. Bu PCR tahlilleri yüksek oranda doğru olup; tekrarlanabilmektedir ve HF sığırlarında haplotiplerin taranması için kullanılabilir (Kumar et al., 2020).

Wu ve arkadaşları (2020), Nordic Red ve Danish Jersey sığırlarında doğum öncesi ölümden sorumlu yeni haplotipler ile ilgili bir çalıma gerçekleştirmişlerdir ve buna göre tespit edilen bu haplotiplerin taşıyıcı durumu, popülasyondaki öldürücü alellerin frekanslarını azaltmak ve riskli çiftleşmelerden kaçınmak için boğaları seçmek için kullanılabilceği sonucuna varmışlardır (Wu, Mesbah-Uddin, Gulbrandtsen, Lund, & Sahana, 2020).

Sonstegard ve arkadaşları 2013 yılında, Jersey sığırlarında azalan üreme verimliliği ile ilişkili CWC15'te nonsens bir mutasyonun tanımlanması ile ilgili önemli sonuçları olan bir çalışmayı gerçekleştirmişlerdir (Sonstegard et al., 2013).

Zhang ve arkadaşları tarafından 2015 yılındaki çalışmalarında bir polimeraz zincir reaksiyonu ve Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP) deneyi ile Jersey sığırlarında JH1 genetik kusur taşıyıcılarının taranmasıyla ilgili önemli sonuçlar elde etmişlerdir (Zhang et al., 2015).

Kumar ve arkadaşları (2021), Jersey sığırlarında embriyonik ölümle ilişkili JH1 mutasyonunun taranması için alternatif PCR deneyleri üzerine çalışmışlardır. CWC15 genindeki bir stop-gain ölümcül mutasyonu olan Jersey haplotipi (JH1), Jersey sığırlarında embriyonik kayıplara neden olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Sığırlarda JH1'in taranması için Amplifikasyon Dirençli Mutasyon Sistemi (T-ARMS-PCR) ve Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi (PCR-RFLP) kullanan iki PCR bazlı analiz geliştirilmiştir. Tarama sırasında, 30 Hintli Jersey boğasından yedisinin, ülkede ilk kez mutant JH1 alelinin taşıyıcıları olduğunu belirlemişlerdir. Bu PCR testlerinin ekonomik, hızlı ve doğru olması ve Jersey sığırlarında JH1 taşıyıcılarının taranması ve çapraz doğrulanması için ayrı ayrı veya kombinasyon halinde kullanılabilir özelliğe sahip olduğunu göstermişlerdir (Kumar et al., 2020).

3. YÖNTEM

3.1.Kullanılan Cihazlar

- 1.PCR Cihazı (Px2 Thermo cycle)
- 2.Elektroforez Tankı
- 3.Elektroforez Güç Kaynağı (MULT-MIXER)
- 4.Jel Görüntüleme Sistemi (BIO RAD chemiDoc MP)
- 5.Bilgisayar (Hp)
- 6.Hassas Terazi (METTLER TPLEDO)
- 7.Mikrosantrifüj (BECKMAN COULTER)
- 8.Vorteks
- 9.Mikropipet Seti
- 10.Otoklav
- 11.Buzdolabı
- 12.Mikrodalga Fırın
- 13.PCR Tüpü
14. Steril Eldiven
- 15.pH metre
- 16.İsıtıcı (Biosan)
- 17.Sim tüp

3.2. Kullanılan Solüsyonlar ve Tamponlar

3.2.1. Etidiyum Bromür Solüsyonu

18.16 gram sodyum etilentriaminetetraasetat ($\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 80 mililitre distile su içinde manyetik karıştırıcı kullanılarak homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Çözünmenin gerçekleşebilmesi için 2 gram sodyum hidroksit (NaOH) karışıma eklenerek (pH:8) ayarlanmıştır. pH ayarı hidroklorik asit (HCl) kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve distile su eklenerek toplam hacim 100 mililitreye tamamlanmıştır. Oluşturulan EDTA çözeltisi, 121°C 20 dakika boyunca otoklavlanmış olup; oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.2.2. Elektroforez Tamponun Hazırlanması

EDTA (Etilendiamin Tetra Asetik Asit) solüsyonu hazırlanması- 100 ml, 0.5M: Hassas bir terazi kullanılarak 18,16 gram EDTA tartılmıştır ve 80 ml saf suya eklenerek çözülmüştür. Yaklaşık olarak 2 gram NaOH çözeltiye ilave edildi ve toplam hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. pH değeri, pH metre kullanılarak 8'e ayarlanmıştır ve son olarak otoklavlanarak steril hale getirilmiştir.

Tris-Borik Asit-EDTA (5xTBE) solüsyonu hazırlanması: Bir miktar saf suya, 27,5 gram Borik asit ve 54 gram Tris içeren EDTA çözeltisinden 20 ml alınarak eklenip çözülmüştür; sonrasında toplam hacim 1 litreye tamamlanmıştır.

Tris-Borik Asit-EDTA (1xTBE): 5x TBE tamponundan 200 ml alınarak 800 ml distile su ile seyreltilerek 1x TBE çözelti hazırlanmıştır.

3.2.3. Agaroz Jel (% 1.25 'lik)

2,5 gram agaroz, 100 ml 1XTBE çözeltisiyle erlenmayer içerisinde karıştırılıp mikrodalga fırında 2 dakika 800 santigrat derecede ısıtılmıştır. Hafif soğuması beklenerek 0.4 mikrolitre Etidyum Bromür eklenip hızlı bir şekilde iyice karıştırılmış ve yükleme yapılacak tarakları hazırlanmış olan kasete dökülerek; sertleştikten sonra +4 derecede bekletilmiştir.

3.2.4. dNTP Çalışma Solüsyonu

100 milimolar (mM) Adenin, Timin, Sitozin ve Guanin nükleotidlerinden her birinden 25 mikrolitre (μ l) alınarak; 25 milimolar (mM) konsantrasyonda 100 mikrolitre (μ l) dNTP ara stoğu hazırlanmıştır. 25 mM ara stoğundan 100 μ l alınıp 250 μ l steril distile suyla karıştırılarak toplamda 350 μ l ve 10 milimolar (mM) konsantrasyonda dNTP çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.

3.2.5. Primer Stoklarının Hazırlanması

CWC15 geninin primerleri: 100 pmol ana stoktan çalışma solüsyonu, konsantrasyonu 10 pmol olacak şekilde distile suyla 10 kat sulandırılmıştır.

Son hacim hazırladıktan sonra 2 dakika santrifüj yapılmıştır ve 3 saat boyunca manyetik karıştırıcıda 37 °C bekletilip; beklemeden sonra tekrar 2 dakika santrifüj yapılmıştır.

3.2.6. EDTA Solüsyonunun Hazırlaması

18.16 gram $\text{Na}_2 \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 80 ml distile su içinde manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırılmıştır. Çözünme sağlanabilmesi için 2 gram NaOH çözeltiye eklenmiştir (pH: 8). pH ayarı HCl kullanılarak yapılmış ve distile suyla 100 mililitreye tamamlanmıştır. Hazırlanan EDTA çözeltisi otoklavlanmış (121°C-20 dakika) ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.2.7. 5XTBE (Tris-Borat-EDTA) Tamponu

54 gr Trisma Base 27.5 gr Broik asit ve 20 ml EDTA 500 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Homojen olunca distile su ile 1 litreye tamamlanarak çözülmüş ve çözelti oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.3. Örnek Toplama

Çalışmamızda Ege Bölgesinde yer alan Jersey işletmesinden örneklerimiz toplandı. İşletmeden, Jerseylerin pedigri bilgilerinin yanı sıra; servis periyotları, kaç doğum yaptığı, kaçınıcı tohumlamada gebeliğin oluştuğu, gebeliğin tespit edilmediği, ediliyorsa eğer erken embriyo kaybı yaşayıp yaşamadığı, gebelik tohumlama oranları gibi veriler alınmıştır. Bu verilerle çalışma sonrası uyum değerlendirilmiştir. Seçilen sürüde, *Brucella abortus*, şap, metritis ve endometritis gibi embriyo kaybına neden olan, polikistik over ve kalıcı corpus luteum vb. infertiliteye yol açan hastalıkların dışlandığı damızlık hayvanlardan numune alınmıştır. Bu amaçla bilgileri edinilmiş toplamda 172 inekten 15ml süt alınmıştır.

3.3.1 Süt Numunelerinin Toplanması

Meme temizliğinin yapılması alınacak numunenin kontaminasyonun önlenmesi için önemlidir. Su ile ilk yıkama işlemi gerçekleştirildikten sonra meme nemli temiz bir bez ile silinir ve ardından bir kâğıt havlu ile kurulanır. Meme temizliği sonrası elle sağılan ineklerden (n=108) 15 ml süt örnekleri alınmıştır. Kontaminasyon oluşmaması için, memeden gelen ilk süt sağılıp atılmıştır. Ardından gelen kısım örnek toplama kaplarına alınmıştır. Alınan süt numuneleri soğuk zincirle laboratuvara getirilmiştir ve işleme tabi tutulana kadar +4 °C' de muhafaza edilmiştir

3.3.2 Tükürük Örneklerinin Toplanması

Padoklara konulan hayvanlar kilit yöntemi ile sabitlendiler. Örnek toplanacak sığırlara sabah öğünleri verilmeden önce numune alındı. Bu sayede ağız içi bir nebze daha temiz oldu. Ağız içleri normal içme suyu ile yıkandı. Sonrasında steril swap, yanak bölgesin ve dil altı mukozasına 4-5 kez çevirerek sürüntü tükürük örnekleri toplandı (Alhaddad et al., 2019; Richards et al., 1993). Swaplar daha sonrası için kullanılmak üzere izotonik solüsyonu içeren swap tüplerine pamuk kısmı sıvının altında kalacak şekilde iyice kapatılarak önce +4°C'e sonra da -20°C'ye konularak DNA ekstraksiyonu yapılan güne kadar bu sıcaklıkta saklandı.

3.4 Numunelerden DNA eldesi

Çiğ sütün doğal bileşenlerinden bir bölümü çoğunlukla polimorf nükleer lökositler, makrofajlar, lenfositler ve az sayıda meme epitel hücrelerini içeren somatik hücrelerdir (Boutinaud & Jammes, 2002). Sütteki somatik hücre sayısı; tür, ırk, süt verimi, laktasyon evresi, sağım hijyeni, stres ve bireysel yatkınlıklar gibi birçok faktörden etkilenir (Rupp, Boichard, Bertrand, & Bazin, 2000). Sağlıklı ineklerde 1 ml sütteki somatik hücre sayısı 2×10^4 ila 2×10^5 arasında değişmektedir (Pantoja, Hulland, & Ruegg, 2009). Sütte bulunan somatik hücreler hayvanın DNA'sını elde etmek için yeterlidir. Bu durum; hayvanı huzursuz ve rahatsız eden kan alma uygulamaları yapılmadan, günlük rutini içerisinde olan sağım sırasında sütün alınarak hücre temini için imkân yaratmaktadır.

3.5. DNA Ekstraksiyonu

Laboratuvarda soğuk zincir ile getirilen süt numunelerinin işlem basamakları aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

1. 15 ml çiğ süt/tükürük, 7.000 devirde 10 dakika (4°C) santrifüj edilmiştir. Süt yağının ve süt proteinlerinin çoğu süpernatantla uzaklaştırılmıştır ve pelette kalan somatik hücreler ayrılmıştır. Bu peletler 2 ml steril tüplere aktarılmıştır. 5.000 devirde 3 dakika (4°C) santrifüj edilmiştir ve süpernatant tekrar atılmıştır.

2. Pelet, 1 ml tampon (15 mM Tris-HCl (pH 7,4-7,6), 25 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 15 mM Na₂HPO₄, 2,5 mM EDTA, %1 sakkaroz) ile yıkanmıştır. Bu karışım, 5.000 devirde 3 dakika (4°C) santrifüj edilerek, süpernatantı çıkarılmıştır ve berrak bir süpernatant elde edilene kadar bu adım tekrarlanmıştır.

3. Süpernatantı atılmış 200 µl örneği 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarılmıştır.
4. Örneğin üzerine 20µl proteinaz K eklenmiştir.
5. Karışımın üzerine 20µl RNase A eklenerek bu karışımın karışması amacıyla kısa süre vortekslenmiştir ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
6. Karışımın üzerine 200 µl PureLink Genomic/Lysis Binding Buffer eklenmiştir ve homojen bir solüsyon elde edilene kadar vortekslenmiştir. Bu karışım, 55°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.
7. Toplam 440 µl olan karışımın üzerine 200 µl %100 ethanol eklenerek 5 saniye vortekslenmiştir.
8. Yaklaşık 640 µl homojen karışım PureLink Spin Columna aktararak 10.000xg de 1 dakika santrifüj edilmiştir. DNA filtrede kalmıştır; altta kalan karışım dökülmüştür ve yeni bir collection tube takılmıştır.
9. Filtrenin üzerine 500 µl ilk yıkama solüsyonu (Wash Buffer) ilave edilerek; 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Alttaki karışım dökülmüştür ve yeni bir collection tube takılmıştır.
10. Filtrenin üzerine Wash Buffer II solüsyonundan 500 µl eklenerek, maksimum hızda 3 dakika santrifüj edilmiştir. Sipin columnu kuruması ve alkolden arındırılması sağlanmıştır.
11. Sipin columnu yeni 1,5 ml'lik steril ependorfa alınmıştır ve üzerine 25-200 µl PureLink Genomic Elution Buffer eklenmiştir.
12. 1 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonra 1 dakika maksimum hızda santrifüj edilerek altta 100 µl DNA çözeltilisinin sızması sağlanmıştır.
13. Elde edilen ürünler PCR aşamasında kullanılıncaya kadar -20°C' de derin dondurucuda saklanmıştır.

3.6. PCR Aşaması

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), özel bir moleküler teknoloji yöntemi olup; spesifik DNA dizilerini *in vitro* DNA sentezi yoluyla üssel olarak çoğaltmak için kullanılmaktadır. Bu yöntem üç ana adımdan oluşur. İlk aşamada DNA'nın yüksek sıcaklıkta çözülmesi (Denatürasyon), ikinci aşamada çoğaltılması hedeflenen bölgeye

spesifik olarak tasarlanmış iki sentetik oligonükleotid primerin bağlanması (Hibridizasyon) ve son aşama olan üçüncü aşamada ise ısıya dayanıklı (termostabil) bir DNA polimeraz enzimi ile primer uçlarından hedef bölgenin sentezlenmesi (Polimerizasyon) ile gerçekleşmektedir. Bu döngü defalarca tekrarlanmaktadır. Her döngüde sentezlenen yeni DNA iplikçikleri, sonraki adımlarda DNA sentezinin hedefi olarak kullanılmaktadır (Henson ve French, 1993). PCR işlemi, sıcaklık ayarlarının otomatik olarak kontrol edildiği özel cihazlar olan termal cyclerde gerçekleştirilmektedir. Örnek DNA, spesifik hedef bölgeye uygun sentetik primerler, ısıya dayanıklı *Taq* veya benzer bir polimeraz enzimi, deoksiribonükleotit trifosfat (dNTP), tampon solüsyonu ve genellikle Mg^{+2} gibi divalent katyonlar içeren bir çalışma karışımı oluşturulmaktadır ve PCR tüplerine konulmaktadır. PCR cihazında, çoğaltılacak DNA bölgesine özgü sıcaklık ve döngü sayısı parametreleriyle işlem gerçekleştirilir (Sambrook & Russell, 2001). Bu tez çalışmasında, CWC15 genin JH1 polimorfizminin tespiti için klasik PCR yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem için kullanılan primerler Tablo 3.1'de belirtilmiştir.

Örnek DNA'sı eklenmeden önce PCR master miksi hazırlanmıştır ve her bir örnek için bu mixten 23 μ l örnek sayısına göre ayrı ayrı 0,5 ml'lik tüplere aktarılmıştır, üstüne her bir örnek için 3 μ l olacak şekilde DNA pipet yardımı ile dağıtılmıştır. Hedef genin mutasyona özgü bölgesinin eldesi için aşağıda belirtilen primer çiftleri kullanılmıştır.

Tablo 3.1. CWC15 geninde JH1 mutasyonunun bulunduğu bölümü içine alan 340bç'lik kısmı içeren primerler

Polimorfizm	Kullanılan Primerler
JH1	Forward primer 5' TCTGCTTTAGGGACTGAGGATGAAGTTGC 3' Reverse primer 5' GCTTTCACCCACATTTAAAAGCAAACAAA 3'

Klasik PCR reaksiyonu için, son reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde şu bileşenler kullanılmıştır: 1U *Taq DNA Polimeraz* (Gene All, Lot: TQ016A28007), 0.2 mM dNTP karışımı (Thermo Scientific, 25 mM), 1X *Taq Reaction Buffer* (Gene All Lot: TB016G15000). Primerler, hedeflenen konsantrasyonları 0.8 pmol olacak şekilde ayarlanarak kullanılmıştır. Ek olarak, 3 µl genomik DNA örneği eklenmiş ve toplam hacim 25 µl'ye tamamlanması için gereken miktarda dH₂O ilave edilmiştir. PCR bileşenleri ve miktarları, ayrıntılı bir şekilde Tablo 3.2'te belirtilmiştir.

Hedef DNA bölgesinin çoğaltılması amacıyla, toplam hacmi 25 µl olacak olan PCR reaksiyonunda; genomik DNA'dan 50-100 ng, her bir primerden (ileri ve geri) 10 pmol, her bir dNTP den 200 µM, 10 x PCR tampon çözeltisinden (buffer) 2,5ml, 1,5 µl MgCl₂ ve 1 µl *Taq DNA* polimeraz enziminden de 1U (ünite) kullanılmıştır. Bu miktarlar steril suyla örnek başına 25 µl ye tamamlanacak şekilde ilave yapılarak gerçekleştirilmiştir. PCR'ı için her bir örnek başına oluşturulan reaksiyon karışımı Tablo 3.2 dedir.

Tablo 3.2. JH1 mutasyonu için PCR reaksiyon karışımı

PCR Bileşeni (Stok)	CWC15 (µl/Tüp)	
10X PCR Buffer	2.5 µl	1X PCR Buffer
dNTP mix (10mM)	1 µl	0.2mM
Forward Primer (20pmol)	1 µl	5pmol
Reverse Primer (20pmol)	1 µl	5pmol
<i>Taq DNA Polimeraz</i> (2.5U/µl)	0.4 µl	1U
Genomik DNA	2 µl	
Steril distile su	17.1µl	

Termal cycler’de PCR için ısı döngüsü ise genel olarak Tablo 3.3’te gösterilmiştir.

Tablo 3.3. CWC15 geni Termal cycler’da PCR için ısı devri

İşlem	Sıcaklık(°C)	Süre(sn)	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	95°C	5 dk	1
Denatürasyon	94°C	45 sn	
Bağlanma	60°C	45 sn	35 döngü
Uzama	72°C	45 sn	
Son uzama	72°C	5 dk	1

3.7. Agaroz Jel Elektroforezi

Genellikle DNA fragmanlarını ayırıştırmak için agaroz jelleri kullanılmaktadır. Bu jellerin konsantrasyonu, farklı uzunluktaki DNA fragmanları arasındaki mesafeyi belirlemektedir. DNA fragmanlarının hareketi, jeldeki agaroz konsantrasyonuna, DNA fragmanlarının konformasyonuna, akımın kuvvetine ve tamponların iyonik kuvvetine bağlıdır. Küçük DNA molekülleri, agaroz jeldeki küçük kanallardan daha hızlı göç etmektedir. Bu nedenle, daha uzun DNA moleküllerinden daha uzağa yerleşmektedir. Jel konsantrasyonu, kanal çapını belirlediği için düşük konsantrasyonlu jeller, büyük DNA fragmentlerinin daha iyi ayrılmasını sağlarken; yüksek konsantrasyonlu jeller küçük DNA fragmanlarının daha iyi ayrılmasını kolaylaştırmaktadır (Lee & Bahaman, 2010).

Bu çalışma, CWC15 genini PCR reaksiyon ürünleri, içinde Bromofenol mavisi ve gliserol (BBF, Lot: OLB00) bulunan yükleme ve takip tamponu ile %2,5'lik agaroz jelde gerçekleştirilmiştir.

%2,5'lik agaroz jel hazırlamak için, hassas terazide 2.5 gr agaroz (Invitrogen, Lot:0000186100) tartılmıştır ve erlenmayer içerisine konulmuştur. Üzerine 100 ml 1X TBE (200 ml 5xTBE + 800 ml distile su) eklenerek karıştırılmıştır. Bu karışım, mikrodalga fırında 2-3 dakika ısıtılarak agarozun tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Çözelti tamamen çözüldükten sonra homojen hale gelmesi için oda sıcaklığında hafifçe soğumaya bırakılmıştır. Hafifçe soğuyan çözeltiliye, DNA'nın jel görüntüleme cihazında görünmesini sağlamak amacıyla yaklaşık 3 µl etidyum bromid ilave edilmiştir. Jel kasetinin iki kenarını kapatmak için kullanılan kalın lastik bariyerler kasete takılmıştır ve PCR ürünlerinin yükleneceği kuyucukların oluşması için kasete taraklar yerleştirilmiştir. Hazırlanan agaroz çözeltisi jel kasetine dökülerek yaklaşık 20 dakika donması için bekletilmiştir.

Hazırlanan %2,5'lik agaroz jelde, öncelikle taraklar çıkarılmıştır ve jel kaseti elektroforez tankına yerleştirilmiştir. CWC15 geninin 340bç'lik bölgesi için yapılan PCR reaksiyonlarının her birinden, jelde takip etmek ve ürünlerin jel kutucuklarına yerleşmesini sağlamak amacıyla 10 µl alınarak yaklaşık 1 µl jel yükleme tamponuyla karıştırılmıştır ve jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Elektroforez tankında, DNA'nın (-) kutuptan (+) kutba doğru göç etmesini sağlayan ve elektriksel ortam için gereken 1X TBE çözeltisi bulunan kapak kapatılmıştır, elektrik bağlantıları yapılmıştır ve güç kaynağından 150 Volt sabit elektrik verilerek DNA'yı yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri, yaklaşık 30 dakika boyunca marker eşliğinde yürütülmüştür. Marker olarak GeneAll GENESTATM 100bç DNA Ladder kullanılmıştır.

3.8. PCR Ürünlerinin Kontrolü

CWC15 gen bölgeleri ile ilgili PCR ürünlerinin oluşumunu kontrol etmek için yürütme işleminden sonra jel UV ışık altında (300 nm dalga boyunda) incelenmiştir. Daha sonra UV transilüminatörde PCR ürünlerinin fotoğrafı çekilerek kaydedilmiştir.

3.9.RFLP PCR

PCR amplikonlarında mutasyonların belirlenmesi için altın standart yöntem doğrudan dizi analizidir. Ancak, özellikle büyük ölçekli uygulamalarda tüm PCR amplikonlarının dizilenmesi maliyetli, zahmetli ve zaman alıcı olacaktır (Gulija, Ivancic-Jelecki, Šantak, & Forcic, 2011). Bu nedenle PCR RFLP yöntemi maliyet etkin bir yöntem olmasından dolayı daha sık kullanılan bir yöntemdir (Al-Shuhaib, Al-Lamy, Al-Tayy, Al-Thuwaini, & Radhi, 2018; Bai et al., 2019; Vielmo et al., 2019).

Değerli bir nokta, bu teknikte tür içi varyasyonun belirlenmesi ve tür tanımlama/farklılaştırma amacıyla kullanılmış olmalarıdır. PCR amplifikasyonu ile mitokondriyal D-loop, ribozomal bölgeler veya diğer genetik lokusların korunmuş bölgeleri hedef alınarak birçok organizma tür düzeyinde ayırt edilebilir (Kim & Kim, 2018; Sivaraman et al., 2018). PCR-RFLP'nin genetik spektrum açısından daha sınırlı olduğu söylenebilir. Bununla birlikte, PCR-RFLP düşük maliyeti ve gelişmiş ekipman gerektirmemesi nedeniyle dünya genelinde araştırmacıların ilgisini çekmektedir (Rasmussen, 2012).

PCR-RFLP, Botstein ve arkadaşları (1980) tarafından geliştirilen ve kırılmış amplifikasyon polimorfik sekansı olarak da bilinen bir tekniktir (Botstein, White, Skolnick, & Davis, 1980). Bu yöntemde, PCR ile elde edilen bir amplikon, belirli bir restriksiyon enzimi tarafından tanıma bölgesi olarak bilinen benzersiz bir restriksiyon enzimi kesim bölgesinde işlenir ve farklı boyutlarda birkaç DNA parçası oluşturur. Sonrasında, sindirilmiş amplikonlar bir jel üzerine yerleştirilir ve elektrik alan uygulanır. Farklı boyuttaki bantlar jel üzerinde farklı mesafelerde hareket eder.

PCR-RFLP'nin en büyük avantajı basitliğidir. Bu yöntem, moleküler biyoloji alanında kolaylıkla uygulanabilir. Ancak, PCR-RFLP'nin sınırlamaları vardır. Bu yöntem, sadece belirli bir restriksiyon enzimi tanıma bölgesiyle sınırlıdır ve diğer dizileri göz ardı eder, başka bir restriksiyon enzimi ile çift sindirim yapılarak problem elemine edilebilir. Bu nedenle, PCR-RFLP'nin ana sınırlamaları, belirli bir restriksiyon enzimine ihtiyaç duyması ve aynı anda birden fazla SNP hedeflendiğinde tam varyasyonun zorlukla belirlenmesidir. Bu sorun kısmen iki enzimin aynı reaksiyon karışımında kullanılmasıyla çözülebilir (Shirasawa, Hirakawa, & Isobe, 2016).

Örneklerin işlenmesi için gereken süre iki aşamaya ayrılır: ampliconların restriksiyon enzimi tarafından *in vitro* sindirimi ve elektroforez. Restriksiyon enzimi ile sindirimde, kullanılan enzim türüne bağlı olarak değişen inkübasyon süreleri gereklidir. Örneğin, *Hinfi* gibi bazı enzimler için inkübasyon süresi 30 dakika iken, genellikle tüm enzimlerin hedef tanıma dizilerini sindirmek için gereken standart inkübasyon süresi 60 dakikadır. Bununla birlikte, inkübasyon süresi gece boyunca (yaklaşık 17 saat) uzatılabilir. Endonükleazlarla uzun süreli inkübasyon nedeniyle PCR-RFLP, bu durumlarda zaman alıcı bir yöntem olarak kabul edilebilir (Fitarelli-Kiehl et al., 2016).

PCR-RFLP yönteminde ampliconların boyutu, kullanımını sınırlamaz. Bu, PCR-RFLP'nin ampliconun fiziksel özelliklerine dayanmadığından kaynaklanır. Bunun yerine, tanıma dizisinin varlığı veya yokluğu tek kısıtlayıcı adımdır; aksi takdirde, hedeflenen restriksiyon enzimi, ilgili ampliconun uzunluğuna dikkat etmez. PCR-RFLP genellikle yatay bir agaroz jel üzerinde gerçekleştirilir. Ancak, başarılı bir PCR-RFLP için yüksek bir amplicon konsantrasyonu gereklidir (Hashim & Al-Shuhaib, 2019) çünkü agaroz jel, yüksek çözünürlüklü poliakrilamid jellere kıyasla ayırtmak için sınırlı bir kapasiteye sahiptir. PCR-RFLP, poliakrilamid jel üzerinde gerçekleştirilebilir ve ampliconlar yüksek hassasiyetli gümüş boyama kitleri ile tespit edilebilir (Highsmith Jr, 2006).

Çalışmamızda kullanılan *TaqI* RFLP enzimi, T[^]CGA bölgelerini tanıır ve kendi tamponunda en iyi 65°C'de kesmektedir. FastDigest Tamponunu kullanarak en iyi 65°C'de 10–15 dakikada çoğaltılan DNA kesilmektedir. Biz çalışmamızda her bir örnek için PCR ürününden 10 µl, 10X FastDigest Bufferdan 2,5 µl, 10X FastDigest Green Buffer Tamponununun 2,5 µl ve steril sudan 10 µl olacak şekilde total 25 µl'lik bir karışım hazırladık. RFLP için her bir örnek başına oluşturulan reaksiyon karışımı Tablo 3.4'dedir. Bu karışımı 65 derece 15 dakika beklettik ve ardından 10 µl'sini %3 lük agaroz jelde yürüttükten sonra görüntüledik.

Tablo 3.4. Her bir örnek için hazırlanan RFLP karışımı

RFLP Bileşenleri (Stok)	CWC15 (µl/Tüp)
PCR ürünü	10 µl
10X FastDigest Bufferdan	2,5 µl
10X FastDigest Green Buffer Tamponunundan	2,5 µl
<i>Taq</i> I RFLP enzimi	0,5 µl (5U)
Steril su	9,5 µl
Total	25 µl

3.10. DNA Dizi Analizi

Yapılan PCR sonucu elde edilen CWC15 geninin ilgili kısmının, DNA dizi analizinde kullanabilmek amacıyla primer artıklarından ve geri kalan bütün DNA fragmentlerinden ayrılması için saflaştırılma işlemi uygulanmıştır.

Başlangıçta diziler kalıp DNA boyunca tek yönlü primer ile sentezi tek bir yönde gerçekleştirilir. Daha sonra sentez sırasında ortama dideoksiriboz şekeri ihtiva eden nükleotidler reaksiyona katılır. Dideoksiribozun özeliği; 3' ucunda bulunan OH⁻ grubu yerine sadece H⁺ atomunu ihtiva etmesidir. Dideoksiribozun bu özeliğinden dolayı 3' ucuna yeni bir nükleotid bağlanması engellenir. Bu da sonuç olarak; 5'->3' yönünde ilerleyen polimeraz reaksiyonunun ddNTP' lerin bağlandığı noktada uzama reaksiyonunun sonlanmasına neden olmaktadır. Bu prensip ile saflaştırılan PCR ürününü, deoksiribonükleotid trifosfatları (dNTP – dATP, dGTP, dTTP, dCTP) DNA polimeraz, primerini, dideoksiribonükleotid trifosfatları (ddNTP- ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP) koyarak reaksiyon başlatılmıştır. Eklenen ddNTP'ler radyoaktif olarak işaretlenerek; genel olarak ddATP için yeşil, ddGTP için siyah, ddTTP için kırmızı ve ddCTP için mavi ışığa elde edilmek üzere renkler seçilmiştir.

Sonrasında, Termal cycluser cihazı 95°C' de 30 saniye, 50°C' de 10 saniye ve 60°C' de 4 dakika 30 döngü olacak şekilde ayarlanmıştır. Her bir döngüde DNA polimeraz kalıp DNA'yı 5'->3' yönünde ddNTP ekleyene kadar sentezlemiştir.

ddNTP eklendikten sonra DNA polimeraz DNA uzamasını sonlandırmıştır. Bir sonraki aşamada aşağıdaki adımlar takip edilmiş olup; elde edilen ürünleri saflaştırmak amacıyla pürifikasyon işlemi uygulanmıştır:

1. 15 µl'lik PCR reaksiyon ürününe 5 µl (125 mM EDTA), 60 µl (%100 etil alkol) ilave edilmiştir.
2. 15 dakika plate oda sıcaklığında vortekslenmiştir.
3. Platedeki PCR ürünleri 2.000 devirde 30 dakika santrifüj edilmiştir.
4. Platedeki süpernatant kısım atık kabına boşaltılmıştır.
5. Platedeki kuyucukların üzerine 20 µl %70'lik etil alkol ilave edilerek, vortekslenmiştir.
6. Platedeki PCR ürünleri 2.000 devirde 15 dakika santrifüj edilmiştir.
7. Platedeki etil alkol atık kabına boşaltılarak; boş plate 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
8. Her bir örneğin üzerine 20 µl yükleme solusyonu (sample loading solution) eklenmiştir.

Bu çöküntü formamid içeren bir solüsyonda çözdürülerek dizileme cihazına kolonda yürütülmek amacıyla yüklenmiştir. Kolonda yürütülürken daha az sayıda nükleotidin dizilendiği baz dizilerinin kolondan çıkışı daha hızlı olduğu için, hızlı olanın reaktifinin ışınımı gerçekleştiğinden; daha önce açıkça belirtilen renklerden hangisi algılanırsa o ddNTP'nin piki gerçekleşmiştir. Bu şekilde elde edilen PCR ürününün dizisi okunmuş olarak kabul edilmektedir (Karacan & Olgun, 2009).

3.11. İstatistik Analizi

Çalışmada verilerin değerlendirilmesinde, istatistiksel analiz için Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 22.0 IBM (NY, ABD) kullanılmıştır. Kategorik değişkenler yüzde frekans olarak ifade edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Grup karşılaştırmalarında kategorik değişkenler için ki-kare testi, sürekli değişkenler için bağımsız örneklem t testi kullanılmıştır.

4 BULGULAR

4.1 Araştırma Grubuna Ait Bulgular

Bu tez çalışmasında, CWC15 geninin 340bç'lik bölümü içerisinde JH1 mutasyonunun sıklığı PCR-RFLP ve DNA dizileme yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Çalışma kapsamında Jersey sürüsünden alınan 172 süt/ağız mukozası sürüntüsü örneği ile çalışılmıştır. Çalışma grubunun yaş dağılımı Tablo 4.1' de, çalışma grubunun doğum sayıları Tablo 4.2'de ve Tablo 4.3'de çalışma grubu hayvanlarının servis periyotlarının dağılımı verilmiştir.

Tablo 4.1. Örneklerin yaşlara göre dağılımı

Yaş	Sıklık (n)	Oran (%)
6-12 ay	6	3,75
1yaş	33	20,625
2yaş	18	11,25
3yaş	103	70,625

Tablo 4.2. Örneklerin doğum sayısı dağılımı

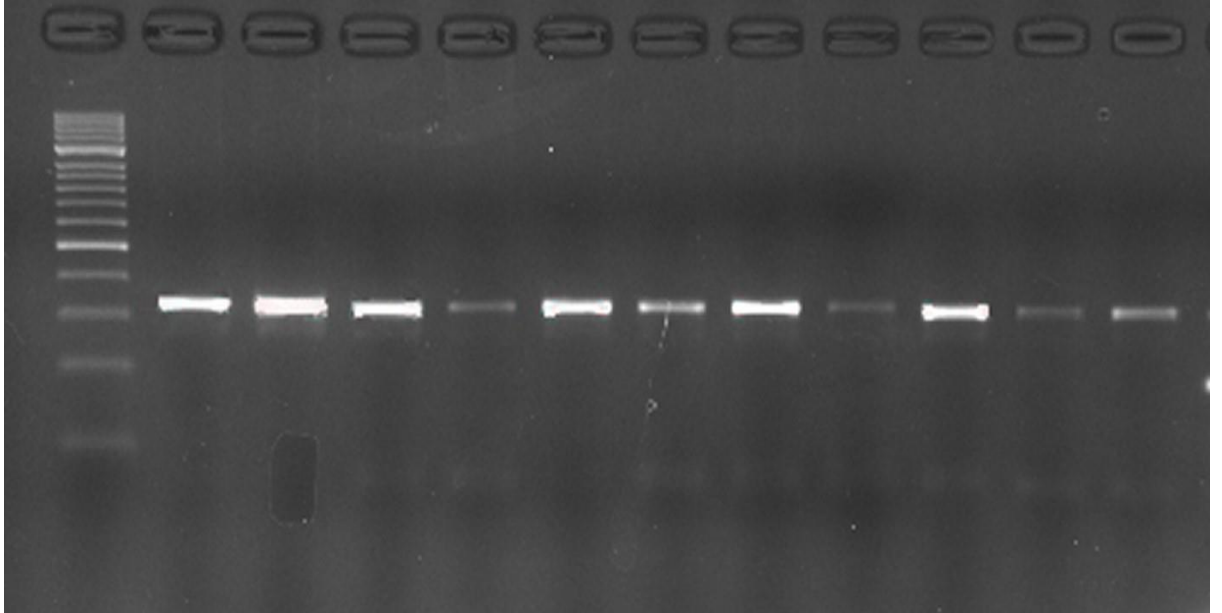
Doğum sayısı	Sıklık(n)	Oran (%)
Hiç doğum yapmayanlar	33	19,9
1 doğum yapanlar	57	34,3
2 doğum yapanlar	76	45,8

Tablo 4.3. Örneklerin servis periyotlarının dağılımı

Grup kategorileri	Gruplar
Açıkta geçen gün 3lü	0-90 : n=96
	90-180: n=37
	180- ... : n=33
Açıkta geçen gün 5li	0-90: n=96
	90-150: n=31
	151-210: n=17
	211-270: n=13
	271-... : n=11

4.2. DNA'nın Kalitatif Tayini

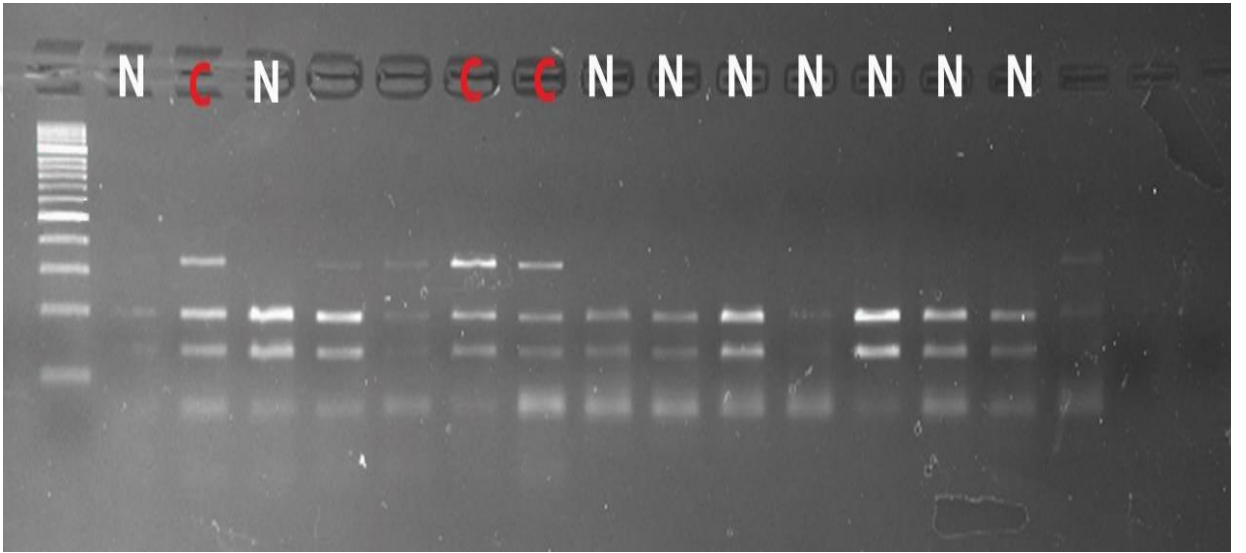
CWC15 geninin 340 bç'lik DNA fragmenti PCR ile *in vitro* koşullarda elde edilmiştir. PCR 'da çok sayıda kopyası elde edilen DNA fragmenti %2,5'lik agaroz jelde 150 V'de 30 dakika yürütülerek UV ışık ile tespit edilmiştir. Jele yüklenen PCR ürünlerinin sonuçlarının değerlendirilmesi için ilk kuyuya 100bç'lik marker kullanılmıştır. PCR sonucunun jel görüntüsü Şekil 4.1' de verilmiştir.



Şekil 4. 1. %2,5'lik agaroz jelde yürütülen CWC15 geninin PCR sonrası bant örnekleri (marker 100bç DNA markırı kullanılmıştır).

4.3. PCR-RFLP Analizi

PCR ile çoğaltılan ürünler PCR-RFLP yöntemi kullanılarak *Taq*I restriksiyon enzimine tabi tutulmuştur. Ürünler tekrar %2,5'lik agaroz jelde 150 V'de 30 dakika yürütülerek UV ışık ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda normal fenotipli bireylerde 2 fragment (137-203bç) oluşurken; heterozigot mutant alleli taşıyan bireylerde 3 fragment (137-203 ve 340bç) olduğu gözlenmiştir. PCR-RFLP sonucun değerlendirilmesi için 100bç DNA marker'ı kullanılmıştır. PCR-RFLP sonucunun jel görüntüsü Şekil 4.2' de verilmiştir.



Şekil 4. 2. %2,5 'lik agaroz jelde yürütülen CWC15 geninin kesim sonrası bant örnekleri (N=Normal C=Mutant)

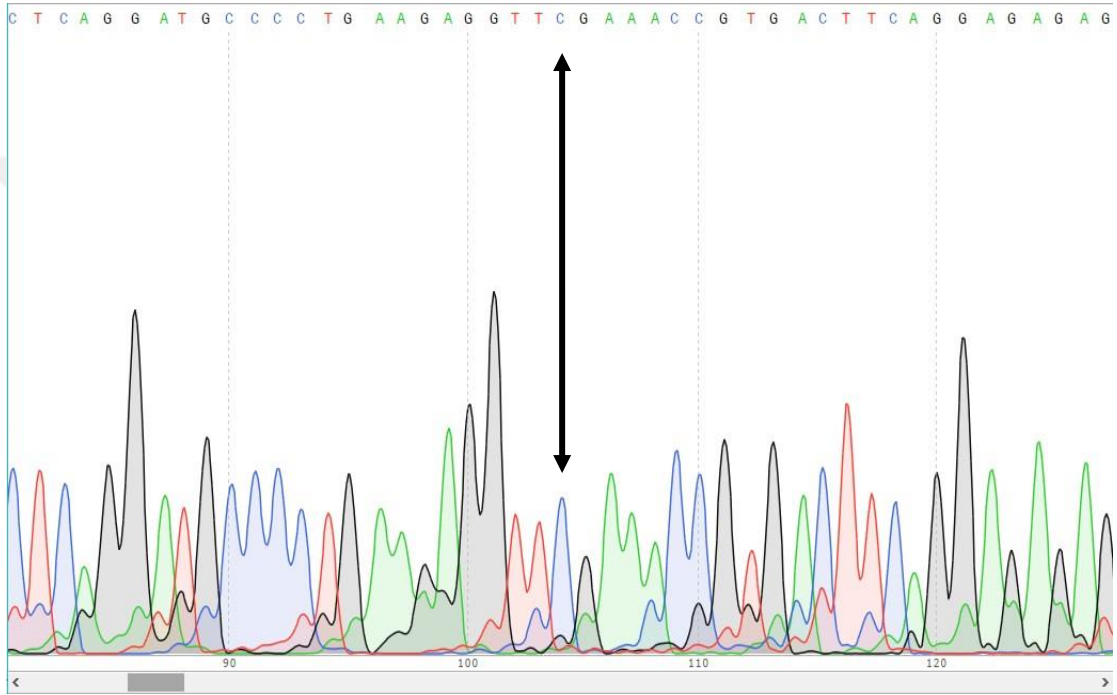
Araştırmamızda 172 örnekte 9 adet mutant birey (%5,23) bulunmuştur. Bu sonuçlar Tablo 4.2' de gösterilmiştir.

Tablo 4.4. CWC15 geni PCR/RFLP sonuçları

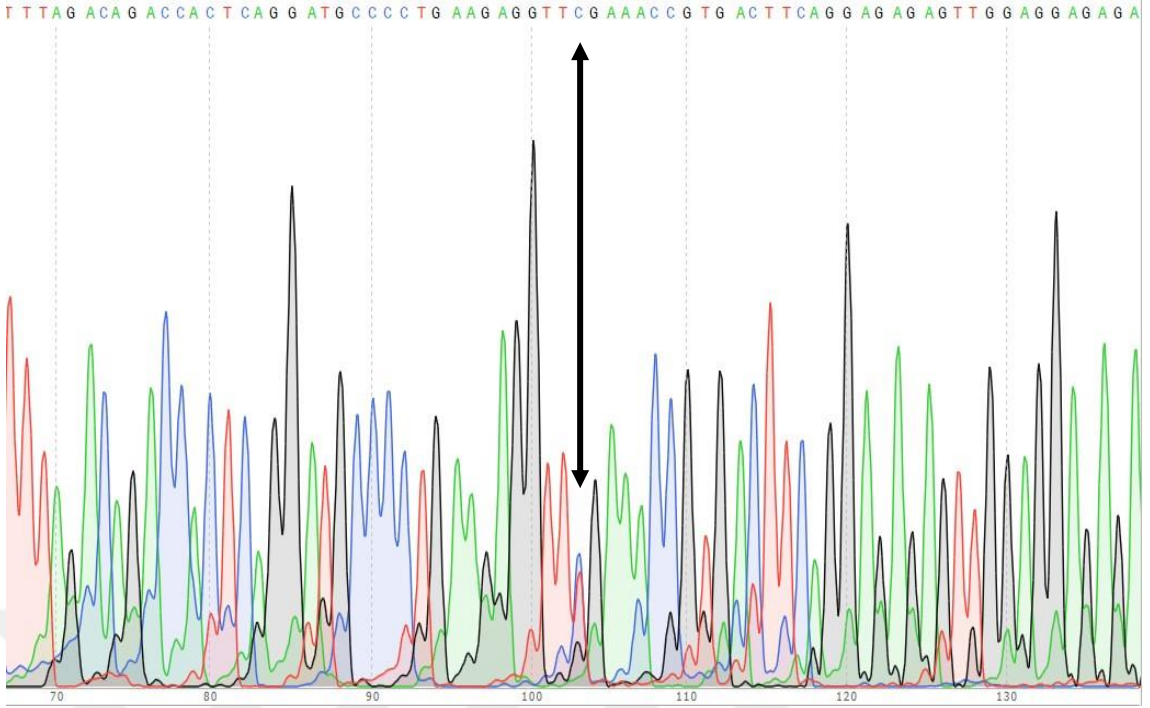
	Sıklık (n)	Total (%)
Heterozigot mutant	9	5,23
Homozigot normal	163	94,77
Total	172	100.0

4.4. DNA Dizi Analizi

CWC15 geninin 3. ekzonda yer alan ve 54. aminoasit olan Arjinin'i kodlayan kodonda meydana gelen SNP sonrası bu kodonun stop kodonuna dönüşmesine neden olan C/T dönüşümü DNA dizi analizi ile bulunmuştur. Elde edilen tüm DNA dizi analizi sonuçlarımız PCR-RFLP sonuçlarımız ile uyumludur. DNA dizi analizi sonuçları Şekil 4.3' te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. DNA dizi analizi sonucu normal genotip



Şekil 4.4. DNA dizi analizi ile elde edilen tek nükleotid polimorfizm.

4.5. İstatistiksel Analiz Bulguları

Çalışmaya 1 yaşında olan 32 (%19,28), 2 yaşında olan 18 (%10,84) ve 3 yaşında olan 116 (%69,88) toplam 172 Jersey sığırı dahil edilmiştir. Bu sığırlar açıkta geçen gün sayısına göre önce 3, sonra 5 gruba ayrılmıştır. Gruplara ayrılmalarına göre sığırların JH1 mutasyon genotip dağılımı Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.5. Gruplara ayrılmalarına göre sığırların JH1 mutasyon genotip dağılımı

Grup kategorileri	Gruplar	JH1 mutasyon n=172		p
		Normal	Heterozigot	
Açıkta geçen gün 3lü	0-90: 1 n=96 (%)	93 (96.88)	3 (03.13)	>0.05
	90-180: 2 n=37 (%)	35 (94.59)	2 (05.41)	
	180- : 3 n=33 (%)	29 (87.88)	4 (12.12)	
Açıkta geçen gün 5li	0-90: 1 n=96 (%)	93 (96.88)	3 (03.13)	>0.05
	90-150: 2 n=31 (%)	29 (93.55)	2 (06.45)	
	151-210: 3 n=17 (%)	16 (94.12)	1 (05.88)	
	211-270: 4 n=13 (%)	11 (84.62)	2 (15.38)	
	271- : 5 n=11 (%)	10 (90.91)	1 (09.09)	

Açıkta geçen gün 3lü gruplar arasında gün sayısı arttıkça; JH1 mutasyon heterozigot genotipli sığırların oranının arttığı saptanmıştır (Tablo 4.5). Açıkta geçen gün 5li gruplar arasında en düşük JH1 mutasyon heterozigot genotipli sığır oranı 0-90:1 grubunda saptanmıştır (Tablo 4.5). Ancak, hem açıkta geçen gün 3lü gruplar arasında hem de açıkta geçen gün 5li gruplar arasında JH1 mutasyon genotip dağılımında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 4.5).

JH1 mutasyonlu normal genotipli sığırların yaş başına ortalama gebelik sayısı 0.44 ± 0.26 iken JH1 mutasyonlu heterozigot genotipli sığırların yaş başına ortalama gebelik sayısı 0.33 ± 0.24 ile daha düşük bulunmuştur. Ancak istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0.05$).

5.TARTIŞMA

VanRaden ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan çalışmada; Holstein, Jersey ve Brown Swiss ırklarında, yüksek popülasyon frekansına sahip ancak hiçbir zaman homozigot olmayan haplotipleri incelenmiştir ve beş yeni resesif kusur keşfedilmiştir. Kullandıkları yöntemle, etkilenmiş embriyolardan genetik mutasyona ait verilere ulaşılamazken; fenotipik olarak normal bireylerden elde edilen genotiplerden haplotip kusurlara ulaşılmıştır. Geçmişte ölümcül resesifler fenotip ortaya çıktıktan sonra araştırılarak belirlenmiştir; fakat embriyo kaybına neden olan sorunlar fenotip ve soy verileri olsa bile tespit edilemeyebilir. Embriyo kaybını tespit edebilmek için genomik veriye ihtiyaç vardır. VanRaden ve arkadaşları ortaya koydukları yeni yöntem ile genomik veriden popülasyonda yaygın olan ancak canlı hayvanlarda hiçbir zaman homozigot olmayan ölümcül resesiflerin haplotiplerinin keşfedilebileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca normal fenotipli bireylerden bu tür kusurların eski stratejilere göre daha iyi tespit edilebildiği keşfedilmiştir (Charlier et al., 2008; Fukuyama et al., 2010; Khatib, Maltecca, Monson, Schutzkus, & Rutledge, 2009; Lander & Botstein, 1987; Remington & O'Malley, 2000). Haplotipler, Fortran programının findhap.f90 (P. M. VanRaden, 2011) versiyon 2'si kullanılarak elde edilmiştir. İlk versiyon (Paul M VanRaden, O'Connell, Wiggans, & Weigel, 2011) ile karşılaştırıldığında, birden fazla segment uzunluğu kullanılarak doğruluk artırılmış, popülasyon ve soy haplotipleri genotiplenmiş büyükbaba/büyükanne haplotipleri üzerinden kontrol edilmiştir (P. VanRaden, K. Olson, et al., 2011).

Sonstegard ve arkadaşları (2013) çalışmalarında, UMD 3.1 haritalamasında 11.439.502 ile 16.147.383 bç arasında yer alan bölgede B.T.A 15 üzerinde 5Mb'lık aralığı JH1 aralığı olarak belirlemişlerdir (Bioinformatics & Biology, 2010). Bu bölge üzerinde Ulusal Süt Veri tabanının (ABD) 15 SNP bölgesi içerdiği tespit edilmiştir. Bunlardan sadece bir tanesinin JH1 ile uyumlu olduğunu, 14 tanesinde hiçbir gen ifadesinin yer almadığını saptamışlardır (Sonstegard et al., 2013).

Sonstegard ve arkadaşları (2013) CWC15'te etkili bir SNP olan JH1'in tespitini DNA dizileme metoduyla gerçekleştirmişlerdir. Hayvanların tüm genom yeniden dizilemesini Illumina HiSeq 2000 kullanılarak üretici protokolleri doğrultusunda uygulamışlardır (Illumina Inc., San Diego, CA). Çift uçlu dizileme kütüphanelerini, semenden elde edilen ve Covaris S1 ultra-sonikatör (Covaris, Woburn, MA) kullanarak yaklaşık 300 bç'ye kesilen 5 µg genomik DNA'dan hazırlamışlardır.

Dizileme için boğaları, alternatif (JH1 taşıyıcısı olmayan) haplotipin çeşitliliğini en üst düzeye çıkarmak ve JH1 haplotipine sahip hayvanlar arasındaki ilişkileri en aza indirmek amacıyla seçmişlerdir. Sperm, Cooperative Dairy DNA Deposu'ndan (Beltsville, MD) temin etmişlerdir. Her dizileme kütüphanesi bir akış hücresinde tek bir kanala yüklenmiş ve dizi verisi 2×100 bç olarak üretilmiştir. İlk dizi işleme ve baz çağrısı işlemleri Illumina CASAVA v.1.8.2 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hizalanmış diziler, BTA15 şüpheli bölgesindeki dizi varyasyonlarını belirlemek için kullanılmıştır. SAMtools utility mpileup (Li, 2011a, 2011b) kullanılarak BTA15'teki tüm SNP'ler ve INDEL'ler tanımlanmış ve çıkarılmıştır. Bölgedeki varyantlar standart VCF formatında (Danecek et al., 2011) çıktı olarak verilmiştir. Dizileme yapılan hayvanlar genotiplendirme ile JH1 heterozigotları olarak kategorize edildiğinden, aday varyantlar her lokusta tüm bireyler için heterozigot olacak şekilde filtrelenmiştir (Sonstegard et al., 2013).

Zhang ve arkadaşları (2015) JH1 haplotipin tespiti için ilk kez RFLP-PCR yöntemini kullanmışlardır. Genomik DNA, bir ticari kit kullanılarak sığır genomunu elde etmişlerdir. B. taurus UMD3.1 genom montajındaki (<http://www.ensembl.org/>) CWC15 DNA dizisi ve NEBcutter yazılımı kullanılarak JH1 mutasyonunu tespit etmek için uygun bir restriksiyon enzimi (*TaqAI*) seçmişlerdir. Daha sonra, JH1 taşıyıcılarının belirlenmesi için polimeraz zincir reaksiyonu ve restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP) kullanılan bir yöntem geliştirmişlerdir. PCR amplifikasyonu ile CWC15 genini (1246bç) çoğaltmışlardır. PCR amplifikasyonu ile elde edilen 1246 bç uzunluğundaki bu geni, *TaqAI* restriksiyon enzimine tabi tutmuşlardır. Restriksiyonda normal allellerde enzim geni 2 noktadan keser ve sonuç olarak 3 bölge oluşur. Mutant allellerde ise enzim geni tek noktadan kestiği için sadece 2 bölge oluşturur. Normal allelde 129,402 ve 715 bç'lik parçalar, mutant allelde ise 402 ve 844 bç'lik fragmentler oluştuğunu ortaya koymuşlardır. Bu nedenle heterozigot bireylerin elektroforezinde 4 parçalı bölge gözlemlenmektedir (Zhang et al., 2015).

Zhang ve arkadaşları (2015) buldukları bu yöntemin geçerliliğini 3 farklı metot kullanarak doğrulamışlardır. Bu metotlardan ilki; PCR-RFLP yöntemi ile belirlenen taşıyıcı bireyler (8 adet taşıyıcı) ile normal bireyleri (13 adet taşıyıcı olmayan) DNA dizileme yöntemini kullanarak PCR-RFLP ile karşılaştırılmasıdır. Tahmin edildiği gibi ilgili bölgelerde taşıyıcı olan bireylerin sonuçlarında (C/T) pikleri görülürken, normal bireylerde sadece (C) piklerinin görülmesi yönteme doğruluğunu kanıtlar nitelik kazandırmıştır. İkinci metotta; 5 adet taşıyıcı 4 adet normal olduğu bilinen ABD

boğalarının sonuçlarını, yeni geliştirilen PCR-RFLP yöntemini uygulayarak kıyaslamışlardır. Üçüncü olarak; PCR-RFLP ile belirlenen 3 pozitif ve 3 negatif örneği, SNP çip tabanlı analiz ile genetik olarak ayırmışlardır. Sonuç olarak, PCR-RFLP verilerinin, diğer testlerle uyumlu bir görünüm sergilediğini ortaya koyarak PCR-RFLP metodunun, JH1 mutasyonunun taranması için etkili ve ekonomik bir metot olduğunu bildirmişlerdir (Zhang et al., 2015).

Huson ve arkadaşları (2020) yaptıkları çalışmada, 49 Jersey adasında dünyaya gelen ırk boğasının semeninden QIAGEN Gentra Puregene kiti kullanılarak genomik DNA izole edilmiş ve standart proteinaz K ve fenol ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak izolasyon yapılmıştır (QIAGEN, 2015). Bu hayvanlar, Illumina BovineHD Beadchip kullanılarak genotiplendirilmiştir. Ada Jerseylerinde JH1 resesif haplotip genotipi araştırılmıştır. Bu araştırma da amaç, kapalı popülasyon içinde JH1 mutasyonunun varlığını ve varsa frekansını belirlemektir. 49 Island Jersey'in DNA'sı, Geneseek tarafından daha önceden geliştirilen SEQUENOM iPLEX Gold protokolü kullanılarak CWC15 geninde mutasyon (Sonstegard et al., 2013) olasılığı için analizi gerçekleştirilmiştir (Huson et al., 2020).

Kumar ve arkadaşları (2021) tarafından, SNP çip setleri ve uzun PCR amplifikasyon tabanlı testler kullanılarak keşfedilmiş olan JH1 haplotipinin taramasında, Tetra primer Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi (T-ARMS-PCR) ve restriksiyon fragment uzunluğu polimorfizmi (PCR-RFLP) kullanılarak iki PCR tabanlı analiz bir başka PCR-RFLP yöntemi olarak geliştirilmiştir. Yapmış oldukları çalışmada yeni bir primer seti kullanarak PCR yöntemini uygulamışlardır. Bu yöntemlerin doğruluğunu kanıtlamak için de DNA dizileme yöntemi kullanılmıştır (Kumar et al., 2021).

Zhang ve arkadaşlarının (2015) kullandıkları primer ile CWC15 geninin 1246 bp uzunluğunun tamamını PCR ile üretirken, Kumar ve arkadaşları (2021) kullandıkları primer ile sadece mutant bölgeyi de içerecek şekilde 340 bp'lik optimum boyutta PCR ürünü elde etmişlerdir. PCR-RFLP yöntemi için *TaqI* restriksiyon enzimi kullanılarak 340bp'lik bölgeyi fragmentlerine ayırmışlar ve %2,5'lik elektroforezde incelemişlerdir. Restriksiyon sonrası taşıyıcı bireylerin tanınmasını sağlayan 137, 203 ve 340bp uzunluğunda fragmentler elde etmişlerdir. Sonuçlarını Zhang ve arkadaşlarının yapmış oldukları PCR-RFLP protokolüyle karşılaştırmışlardır (P. VanRaden, K. Olson, et al., 2011). Zhang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada PCR ürününe *TaqI* restriksiyon enzimi ile muamele edildikten

sonra heterozigot bireylerde dört farklı fragment (-129, 402, 715 ve 844 baz çifti uzunluğunda) oluşurken (Zhang et al., 2015), Kumar ve arkadaşları (2021) uyguladıkları yeni protokolde, üç farklı fragment (137, 203 ve 340bp uzunluğunda) oluştuğunu bildirmişlerdir. Değiştirilmiş PCR-RFLP yöntemi ile bölgeyi hassas bir şekilde amplifiye etmiş ve heterozigot bireylerin daha hızlı ve kolay analiz edilebilmesini sağlamışlardır. Sonuç olarak Kumar ve arkadaşları ortaya koydukları metodun, daha kolay ve ekonomik olarak daha uygun olduğunu belirtmişlerdir (Kumar et al., 2021).

Genel itibariyle DNA eldesi için kan örneği kullanılan yöntemlerin haricinde, çalışmamızda hayvan refahına daha uygun olan ve alınırken hayvanda stres oluşturmayan süt örneklerinden elde edilen somatik hücrelerden DNA eldesi tercih edilmiştir. Ayrıca laktasyonda olmayan veya doğum yapmamış hayvanlardan DNA eldesi, swap yardımı ile ağız içi mukozadan sürüntü alınması yoluyla ve tükürük ile sağlanmıştır. Çalışmamızda Kumar ve arkadaşlarının (2021) kullanmış oldukları PCR-RFLP yöntemi maliyeti düşük ve etkili bir belirleme yöntemi olarak tercih edilmiştir. Kumar ve arkadaşlarının (2021) teşhis metodlarından biri olan yöntemi aynı primerleri kullanarak 340 bp'lik PCR ürünü, %2,5'lik jel elektroforez ile kesinleştirilmiştir. Restriksiyon enzimi olarak *TaqI* restriksiyon enzimi ile 137, 203 ve 340 bazlık fragmentler elde edilmiştir. 340bp'lik bu kısımda başka SNP'lerin varlığının tespit edilebilmesi için DNA dizileme yöntemi kullanılmıştır. Uygun maliyetli ve çözüm odaklı bu sistem mutasyonu bulma konusunda başarılı olmuştur (Kumar et al., 2021).

VanRaden ve arkadaşlarının (2011) çalışmalarının sonucunda, 11 adet haplotipte 7 ila 90 birey arasında homozigotluk beklenmesine rağmen, homozigotluk görülmemiştir. Hem kendi ırklarında en yüksek frekansa sahip olan hem de hiçbir zaman homozigot gözlenmeyen haplotipleri öncelikli olarak incelemişlerdir. Genomik verilerin eldesi ile popülasyonda mutasyonu homozigot olarak taşıyan bireylerin olmadığı bu tür kusurların fark edilmesinin mümkün olacağını belirtmişlerdir. Eğer ki yeterince büyük bir popülasyonda genetik tarama yapılırsa homozigot bireylerin beklentinin çok altında, hatta sıfır olmasının tesadüf olamayacağı sonucuna ulaşmışlardır. Basit bir resesif durum için beklenen gebe kalma oranındaki azalma, inekler için ortalama gebe kalma oranından ve sekizde birlik bir ölüm oranından hesaplanır. Kusurlu 11 haplotip içinde 5'inin fenotipik veri tabanında gebe kalma oranı üzerinde önemli negatif etkilerini doğrulamıştır. Bu haplotiplerin gebe kalma üzerine

etkileri ortalama 3.0-3,7 puan arasındaydı. Holstein ırkı için bu azalma 3.9 puan (31/8), Jersey ırkı için ise 4.6 puan (37/8) olarak hesaplanmıştır (P. VanRaden, K. Olson, et al., 2011).

Sonstegard ve arkadaşları (2013); JH1 taşıyıcı boğaların, JH1 taşıyıcı boğalardan olan inekler ile eşleşmelerinden elde edilen 52.449 doğurganlık verisini incelediklerinde gebe kalma başarısını %33,3 olarak belirlemişlerdir. Taşıyıcı olmayan boğalar ile taşıyıcı olmayan ineklerin eşleşmelerinde 290.373 kayıt incelediklerinde de gebe kalma oranını %37 olarak tespit etmişlerdir. Düşüşün bu denli az olmasını soyağacı kayıt hatalarından kaynaklanabileceğini, $3,7 \pm 0,2$ oranında görülen gebelik oranındaki azalmanın, JH1'in ölümcül resesif olduğunu doğruladığını ve bu sonucun beklenen %4,6'lık azalmaya (P. VanRaden, K. Olson, et al., 2011) yaklaşık olarak uyumlu olduğunu bildirmişlerdir. Taşıyıcı olmayan boğaların dişi yavruları ile JH1 taşıyıcı boğaların eşleşmesinden elde edilen 57.523 kayıta %36,3 doğum oranı bulunmuştur. $0,7 \pm 0,2$ 'lik hafif bir azalmanın, JH1 taşıyan annelerin maternal JH1 mirası ile ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Sonstegard et al., 2013).

VanRaden ve arkadaşları (2011), yeni defektler için her bir ırkta mevcut popülasyondaki seçkin hayvanların %2,7 ila %20,7'sinin taşıyıcı olduğunu, her bir ırkta tespit edilemeyecek kadar düşük frekansta birçok ek ölümcül defekt bulunabileceğini ve ayrıca Jersey ırkında bulunan JH1 haplotipinin, son 40 yılda taşıyıcı sıklığının %20 ila %25 arasında olduğunu bildirmişlerdir (P. VanRaden, K. Olson, et al., 2011).

Sonstegard ve arkadaşları (2013), JH1 taşıyıcı boğaların dişi yavrularıyla JH1 taşıyıcı boğanın eşleştirilmesinden elde edilen kayıtlardaki 1612 ölü doğumu incelendiğinde altmışıncı günden sonra gebelik kaybının olmadığını tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, bu durumu erken embriyonik ölümlerle JH1 mutasyonunu ilişkilendirmişlerdir (Sonstegard et al., 2013).

Zhang ve arkadaşları (2015) yapmış oldukları çalışmada; Çin'e Avustralya'dan ithal edilen 449 sığırdan 31 adet (%6,9) heterozigot birey bulmuşlardır. Amerika popülasyonunda %20-25 arasında gözlenen bu orandan daha düşük izlenmiştir. 31 heterozigot taşıyıcı bireyden 20'sinin baba boğasının soyunun ABD boğalarına dayandığını soy incelemelerinde tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, ABD boğalarının Avustralya sığır popülasyonu üzerinde yüksek etkileşimi olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada, 17 taşıyıcı ata sahip olanların soy hattını Observe Chocolate Soldier'a

kadar takip etmişlerdir. Observe Chocolate Soldier'in torunu olan Soldierboy Boomer Sooner of CJ'nin JH1'in en büyük yayılma sorumlusu olduğu bulgusuna ulaşmışlardır. Zhang ve arkadaşları (2015) köken ataya kadar, JH1'in izlenmesi konusunda önemli araştırmalar gerçekleştirmişlerdir (Zhang et al., 2015).

Kumar ve arkadaşları (2021) PCR temelli iki yöntem kullanarak; bu iki yöntemi dizileme yöntemi ile karşılaştırarak doğruluklarını ispatlamışlardır. Araştırmada 30 adet Hindistan Jersey boğasından kan örnekleri alınarak çalışılmıştır. JH1 taraması için bu genotipleme testlerini kullanarak, 30 Hint Jersey boğasından 7 adetinin taşıyıcı (%23,3) olduğu tespit edilmiştir. Bu çift testlerle belirlenen rastgele seçilen JH1 taşıyıcıları ve normal örnekler (taşıyıcı olmayanlar) doğrudan dizileme ile doğrulanmıştır. JH1 yüksek frekanslı (%6,9-%23,4) olduğu bildirilen, yoğun olarak kullanılan köken atalardan kaynaklanmaktadır. Ancak bu seçilimin süt özellikleriyle ilişkili olmadığı tespit edilmiştir. Hindistan'da yerli ırkların Jersey boğaları ile melezleme yoluyla verim özellikleri arttırılmaya çalışılmaktadır. Ülkede kayıtlı 23,6 milyon Jersey melezi bulunmaktadır. Son 20 yılda bu melez popülasyonu sayısı hızla artmaktadır. Kullanılan ata boğanın sayısının azlığı popülasyonun genetik alt yapısının daralmasına neden olmuştur. Sonuç olarak bu durumun, melez popülasyonunda mutant zararlı allelin frekansını artırabileceği düşünülmektedir (Kumar et al., 2021).

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçta toplam 172 örnek içerisinde 9 adet JH1 haplotip taşıyıcısı (%5,23) PCR-RFLP yöntemi ile belirlenmiştir. 172 örneğin PCR sonuçlarından DNA dizileme yöntemi ile dizilenmiştir ve iki yöntem kıyaslanmıştır. Sonuçlarımız Zhang ve arkadaşları (2015) ve Kumar ve arkadaşları (2021) ile uyumluluk göstermiştir. Fakat elde ettiğimiz hayvan verileri yeterince kapsamlı olmadığı için haplotipin fertilizasyon ile ilgili ilişkisi anlamlı bulunamamıştır ($P>0,005$).

Ayrıca çalışmamızda 9 adet JH1 haplotip taşıyıcı hayvanın soy hatlarını incelediğimizde iki taşıyıcı bireyin aynı boğanın kızları olduğu belirlenmiştir. Ebeveyn genotip verilerine sahip olmadığımız için kesinlik olmamakla birlikte, bu iki taşıyıcı kardeşin bu genetik mirası babalarından aldıkları yüksek ihtimaldir. İncelemelerde elde ettiğimiz bir diğer bulgu ise; bir taşıyıcı örneğimiz de, aynı boğadan fakat farklı annelerden dünya ya gelmiş ve homozigot normal olan birden fazla birey olduğu belirlenmiştir. Ebeveyn genotiplerine sahip olmadığımızı dan dolayı kesinlik olamamakla birlikte, bu genetik mirası bu taşıyıcı annesinden aldığı yüksek ihtimal olarak görülmektedir.

Örneklem popülasyonumuzda yer alan hayvanların en fazla 3 yaş üstü olması ve bu duruma bağlı olarak doğum sayılarının az olması elde edilen verilerin sınırlanmasına neden olmaktadır. Örneklem sayısının ve doğum sayısının arttığı popülasyonlarda yapılacak bir çalışma daha anlamlı sonuçlar verecektir.

Cole ve arkadaşları (2016) çalışmalarında Holstein ırkları için 10, Ayrshire ırkları için 1, Brown Swiss ırkları için 5 ve Jersey ırkları için 2 adet haplotipin varlığı keşfetmişlerdir. Toplam 18 haplotipin, bu ırkların sahip olduğu süt, süt yağı, süt protein verimi, somatik hücre sayısı, verimli yaşam süresi, doğum oranı ve düve gebe kalma oranı gibi verim özellikleri üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada özellikle bu ırklarda karşılaşılan ve özellikle erken embriyonik ölümlere neden olan bu haplotipler için homozigot bireylerin varlığını ortaya koymuşlardır. Farklı yöntemlerle yapılan çalışmaların tamamında bu tür erken embriyonik ölümlere sebep olan haplotipler için homozigot mutant allel taşıyan sığırlara rastlamamışlardır (VanRaden, Sonstegard, Zhang, Kumar vb). Bununla birlikte homozigot mutant allelin varlığının, düşük yoğunluklu genotiplemeyle dayalı tahmin hatalarından kaynaklandığını açıklamışlardır. Yapılan bu çalışma sayesinde; Jerseylerde JH1 taşıyıcıları için fenotipik etki ile ilişkilendirilmemesine karşın, süt yağ ve proteini, yaşam süresi, dişi yavru doğum oranı, inek gebe kalma oranı ve düve gebe kalma oranında direkt genetik etki üzerinde anlamlı sonuçlar bulmuşlardır (Cole et al., 2016). Bu sonuçların Sonstegard ve arkadaşları'nın (2013) yaptıkları çalışmayla tutarlı olduğunu belirtmişlerdir (Sonstegard et al., 2013).

Fertilizasyonun etkilendiği bu tür haplotipler farklı ırklarda da görülmektedir. Özellikle bu haplotiplerin Holstein ırklarında çeşitli verim özelliklerinde fenotipik olarak olumlu veya olumsuz etkileri gözlemlenmiştir. Colle ve arkadaşları ırka özgü haplotipleri taşıyan boğalardan, Ayrshire ve Jersey taşıyıcı boğaların normal boğalara göre daha fazla yaşam boyu net ekonomik değere sahip olduklarını bulmuşlardır. Fakat bu fark anlamlı bulunmamıştır. Bu durum Brown Swiss ve Holstein ırkı haplotip taşıyıcı boğalarda tam tersi olarak belirtilmiştir (Cole et al., 2016).

Wu ve arkadaşları.(2020) tarafından yapılan çalışmayla, Jerseylerde 12 adet homozigot eksik bölge tespit edilmiştir. Bunların özellikle 3 tanesinin inseminasyon sonrası tekrar östurus göstermeleri üzerinde olumsuz etkileri varken, 9 tanesinin tekrar östurus göstermelerinde etkisi olmadığını tespit etmişlerdir. Böylelikle 9 haplotipin erken embriyonik kayıplara neden olmadığını kanıtlamışlardır (Wu et al., 2020).

Jersey sığır ırkında gözlenen CWC15 gen mutasyonu, doğum sonrası ölüm oranı değerlendirilmesinde kullanılmamaktadır. Çünkü homozigot resesifliğe bağlı erken embriyonik kayıp oluşmazsa, heterozigot taşıyıcı olarak doğan buzağılar bile yaşamını sürdürebilmektedir (Sonstegard et al., 2013; P. VanRaden, K. Olson, et al., 2011). Farklı ırklara ait bazı haplotiplerde orta ve ileri geç gebelik dönemlerinde buzağı kayıplarının varlığını belirlemişlerdir. Bu kayıpların da, ineklerin infertilite dolayısı ile sürüden çıkartılması ve buzağılamalar arası sürenin uzun olması nedeniyle ekonomik maliyetleri arttırdığını bildirmişlerdir. CWC15 dışındaki diğer haplotiplerin bazılarında doğurganlık oranındaki azalmanın beklenenden az olmasının nedeni olarak, buzağının doğumunun gerçekleşmesi, fakat buzağının 48 saat içerisinde ölmesinden kaynaklanmakta olduğunu görmüşlerdir (P. VanRaden, K. Olson, et al., 2011).

Elde edilen sonuçların, literatürle yer alan Zhang ve arkadaşları (2015) ve kumar ve arkadaşlarının elde ettikleri mutasyon oranıyla uyumlu olduğu gözlemlenmektedir. Fakat VanRaden ve arkadaşları (2011) ve Sonstegard ve arkadaşlarının (2013) elde ettikleri JH1 taşıyıcıları ile servis periyodu uzunluğu arasında istatistiki açıdan anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Bunun nedeni, toplam ve toplamın içerisinde heterozigot örneklem sayısının yetersiz olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durum aynı zamanda çalışmanın sınırlılığı olarak da değerlendirilmektedir. Sonuç olarak, heterozigot örneklem sayısının sınırlı olması, çalışmanın sonuçlarını daha kapsamlı ve genel geçerli hale getirmek adına önemlidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİ

Jersey ırkı bugün dünyanın 80 ülkesinde üretimi devam eden sütçü bir ırktır. Farklı iklim koşullarına uyum sağlaması ırkın tercih edilmesinin nedenidir.

Yaptığımız çalışmada JH1 haplotipi ile infertilite arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bunun nedeni; verilerimizin ve örneklem büyüklüğümüzün yeterli olmamasından kaynaklanmaktadır. Fakat yapılan çalışmalarda JH1 haplotipi ile infertilite arasında anlamlı ilişkiler bulunmuştur.

Jerseylerdeki bu haplotiplere bağlı infertilite, bakım maliyetleri vb. nedenlere meydana gelen ekonomik kayıp 2.900.390 \$ olarak bulmuşlardır (Cole et al., 2016).

Çalışmamızda kullanılan sürüde hayvanların açıkta geçen gün ortalamaları çok yüksektir. Bu durum sadece JH1 mutasyonuna bağlı değildir. İnseminasyonda yapılan hatalar, çeşitli hastalıklar, bakım besleme hataları ve hayvanın normal fizyolojisine bağlı olarak vb. nedenlerle açıkta geçen süre uzayabilmektedir. Ayrıca JH1 taşıyıcı dişi taşıyıcı bir boğa ile eşleştirilmediği sürece, servis periyodunda JH1 haplotipine bağlı bir uzama söz konusu olmayabilir. Dolayısı ile ülkemize ithal edilen veya yerli jersey spermaları bu haplotip yönünden incelenmeli ve taşıyıcı boğalar ortaya çıkarılmalıdır. Dişi jerseylerinde genotipik verileri elde edilmelidir. Bu sayede taşıyıcı dişi ve taşıyıcı boğa eşleşmelerin önlenmesi sağlanmış olacaktır.

İNseminasyonda kullanılan verim özellikleri yüksek boğa spermalarının sık kullanılması sürü içerisinde endogaminin artmasına ve farklı genetik hastalıkların görülme sıklığının yükselmesine neden olmaktadır. JH1 haplotipi bu tür genetik bir kusurdur. Dolayısı ile aynı boğanın spermalarının kullanım sıklığı sürü içerisinde azaltılmalıdır.

Diğer çalışmalarda JH1 taşıyıcı boğaların spermalarının inseminasyonda kullanılabileceğini belirtmiş olsalar da bu tür taşıyıcı boğalar, popülasyonda taşıyıcı sıklığının artmasına neden olacaktır.

Tez çalışmamız hem ülkemizdeki hem de dünyadaki Jerseyler ve Jerseylerdeki CWC15 (JH1) gen mutasyonu hakkında bilgilendirme açısından önemli bir çalışma olup; bu ırkla ilgili gelecekte yapılacak olan çalışmalara fayda sağlayabilecek büyük bir adımdır.

Ayrıca bu araştırma sonuçlarının, Türkiye'deki Jersey ırkı gen havuzu için bir referans sağlaması ön görülmektedir. Türkiye'de ithal sperma alımları aşamasında ve Türkiye'de yetiştirilen boğalarının CWC15 geni mutasyonu açısından ari olduğu

incelenebilir. Irk ıslahı için Jersey ırkı hakkında alınacak yönetim kararları bu açıdan değerlendirilebilir.



KAYNAKLAR

- Agerholm, J. S. (2007). Inherited disorders in Danish cattle. *Apmis*, *115*, 1-76.
- AJC.U.S..Jersey. (2014). American Jersey Cattle Association. *National All- Jersey Inc. 2014*. Retrieved from Available from: <https://www.usjersey.com/>
- Al-Shuhaib, M. B. S., Al-Lamy, S., Al-Tayy, H., Al-Thuwaini, T. M., & Radhi, A. H. (2018). Single Nucleotide Polymorphism (SNP) of leptin gene in holstein cattle. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, *48*(2), 187-201.
- Alhaddad, H., Maraqa, T., Alabdulghafour, S., Alaskar, H., Alaqeely, R., Almathen, F., & Alhajeri, B. H. (2019). Quality and quantity of dromedary camel DNA sampled from whole-blood, saliva, and tail-hair. *PloS one*, *14*(1), e0211743.
- Amann, R., & DeJarnette, J. (2012). Impact of genomic selection of AI dairy sires on their likely utilization and methods to estimate fertility: a paradigm shift. *Theriogenology*, *77*(5), 795-817.
- Amann, R. P., Saacke, R. G., Barbato, G. F., & Waberski, D. (2018). Measuring male-to-male differences in fertility or effects of semen treatments. *Annual review of animal biosciences*, *6*, 255-286.
- Aurich, C., Achmann, R., & Aurich, J. E. (2003). Semen parameters and level of microsatellite heterozygosity in Noriker draught horse stallions. *Theriogenology*, *60*(2), 371-378.
- Bai, L., Zhou, H., Gong, H., Tao, J., Ma, Q., Ding, W., & Hickford, J. G. (2019). Variation in the ovine KAP8-1 gene affects wool fibre uniformity in Chinese Tan sheep. *Small Ruminant Research*, *178*, 18-21.
- Becker, R. B. (1973). *Dairy cattle breeds. Origin and development*.
- Bessonov, S., Anokhina, M., Krasauskas, A., Golas, M. M., Sander, B., Will, C. L., . . . Lührmann, R. (2010). Characterization of purified human Bact spliceosomal complexes reveals compositional and morphological changes during spliceosome activation and first step catalysis. *Rna*, *16*(12), 2384-2403.
- Bioinformatics, C. f., & Biology, a. C. (2010). Bos taurus assembly. . Retrieved from http://www.cbcb.umd.edu/research/bos_taurus_assembly.shtml.
- Biscarini, F., Schwarzenbacher, H., Pausch, H., Nicolazzi, E. L., Pirola, Y., & Biffani, S. (2016). Use of SNP genotypes to identify carriers of harmful recessive mutations in cattle populations. *BMC genomics*, *17*(1), 1-17.
- Bittles, A. H., & Black, M. L. (2010). Consanguinity, human evolution, and complex diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(suppl_1), 1779-1786.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, *32*(3), 314.
- Boutinaud, M., & Jammes, H. (2002). Potential uses of milk epithelial cells: a review. *Reproduction Nutrition Development*, *42*(2), 133-147.
- Bovenhuis, H., Van Arendonk, J. A., & Korver, S. (1992). Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits. *Journal of dairy science*, *75*(9), 2549-2559.
- Brody, E., & Abelson, J. (1985). The " Spliceosome": Yeast Pre-Messenger RNA Associates with a 40 S Complex in a Splicing-Dependent Reaction. *Science*, *228*(4702), 963-967.
- Brow, D. A. (2002). Allosteric cascade of spliceosome activation. *Annual review of genetics*, *36*(1), 333-360.

- Chan, S.-P., Kao, D.-I., Tsai, W.-Y., & Cheng, S.-C. (2003). The Prp19p-associated complex in spliceosome activation. *Science*, 302(5643), 279-282.
- Chanarat, S., & Sträßer, K. (2013). Splicing and beyond: the many faces of the Prp19 complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(10), 2126-2134.
- Charlier, C., Coppieters, W., Rollin, F., Desmecht, D., Agerholm, J. S., Cambisano, N., . . . Fasquelle, C. (2008). Highly effective SNP-based association mapping and management of recessive defects in livestock. *Nature genetics*, 40(4), 449-454.
- Chen, H.-C., & Cheng, S.-C. (2012). Functional roles of protein splicing factors. *Bioscience reports*, 32(4), 345-359.
- Cho, S. Y., Shin, E. S., Park, P. J., Shin, D. W., Chang, H. K., Kim, D., . . . Song, M. J. (2007). Identification of mouse Prp19p as a lipid droplet-associated protein and its possible involvement in the biogenesis of lipid droplets. *Journal of Biological Chemistry*, 282(4), 2456-2465.
- Cole, J., Null, D., & VanRaden, P. (2016). Phenotypic and genetic effects of recessive haplotypes on yield, longevity, and fertility. *Journal of dairy science*, 99(9), 7274-7288.
- Daetwyler, H. D., Capitan, A., Pausch, H., Stothard, P., Van Binsbergen, R., Brøndum, R. F., . . . Grohs, C. (2014). Whole-genome sequencing of 234 bulls facilitates mapping of monogenic and complex traits in cattle. *Nature genetics*, 46(8), 858-865.
- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., . . . Sherry, S. T. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156-2158.
- De Vries, M., & Veerkamp, R. (2000). Energy balance of dairy cattle in relation to milk production variables and fertility. *Journal of dairy science*, 83(1), 62-69.
- DeJarnette, J., Marshall, C., Lenz, R., Monke, D., Ayars, W., & Sattler, C. (2004). Sustaining the fertility of artificially inseminated dairy cattle: the role of the artificial insemination industry. *Journal of dairy science*, 87, E93-E104.
- Dematawewa, C., & Berger, P. (1998). Genetic and phenotypic parameters for 305-day yield, fertility, and survival in Holsteins. *Journal of dairy science*, 81(10), 2700-2709.
- Duan, J., Zhang, J., Zhu, S., & Li, Y. (2010). Expression of a Cwc15 ortholog gene mED1 in the early embryonic development of mice. *Chinese J Biochem Mol Biol*, 26, 637-642.
- Ferenčaković, M., Sölkner, J., Kapš, M., & Curik, I. (2017). Genome-wide mapping and estimation of inbreeding depression of semen quality traits in a cattle population. *Journal of dairy science*, 100(6), 4721-4730.
- Fitarelli-Kiehl, M., Macedo, G. S., Schlatter, R. P., Koehler-Santos, P., Matte, U. d. S., Ashton-Prolla, P., & Giacomazzi, J. (2016). Comparison of multiple genotyping methods for the identification of the cancer predisposing founder mutation p. R337H in TP53. *Genetics and molecular biology*, 39, 203-209.
- Freeman, A. (1986). *Genetic control of reproduction and lactation in dairy cattle*. Paper presented at the Proc. 3rd World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod. XI.
- Fries, R., & Ruvinsky, A. (1999). *The genetics of cattle*: CAB International.
- Fukuyama, S.-i., Morino, H., Miyazawa, H., Tanaka, T., Suzuki, T., Kohda, M., . . . Hagiwara, K. (2010). *A quantitatively-modeled homozygosity mapping algorithm, qHomozygosityMapping, utilizing whole genome single nucleotide polymorphism genotyping data*. Paper presented at the BMC bioinformatics.

- García-Ruiz, A., Cole, J. B., VanRaden, P. M., Wiggans, G. R., Ruiz-López, F. J., & Van Tassell, C. P. (2016). Changes in genetic selection differentials and generation intervals in US Holstein dairy cattle as a result of genomic selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(28), E3995-E4004.
- Gentile, A., & Testoni, S. (2006). Inherited disorders of cattle: a selected review. *Slov vet res*, *43*(1), 17-29.
- Grabowski, P. J., Seiler, S. R., & Sharp, P. A. (1985). A multicomponent complex is involved in the splicing of messenger RNA precursors. *Cell*, *42*(1), 345-353.
- Gulija, T. K., Ivancic-Jelecki, J., Šantak, M., & Forcic, D. (2011). Comparative analysis of CE-SSCP to standard RFLP-CE-FLA method in quantification of known viral variants within an RNA virus quasispecies. *Electrophoresis*, *32*(14), 1852-1859.
- Gürses, M., Bayraktar, M., & Şimşek, Ü. G. (2014). Jersey ırkı sığırların süt ve döl verim özellikleri üzerine bazı çevre faktörlerinin etkileri. *FÜ Sağlık Bil Vet Derg*, *28*(3), 137-143.
- Harhay, G. P., Smith, T. P., Alexander, L. J., Haudenschild, C. D., Keele, J. W., Matukumalli, L. K., . . . Bridges, S. M. (2010). An atlas of bovine gene expression reveals novel distinctive tissue characteristics and evidence for improving genome annotation. *Genome Biology*, *11*, 1-18.
- Hashim, H. O., & Al-Shuhaib, M. B. S. (2019). Exploring the potential and limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP for SNP detection: A review. *Journal of applied biotechnology reports*, *6*(4), 137-144.
- Hayes, B. J., Bowman, P. J., Chamberlain, A. J., & Goddard, M. E. (2009). Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. *Journal of dairy science*, *92*(2), 433-443.
- Henriques, J. A. P., JoséVicente, E., da Silva, K. V. C. L., & Schenberg, A. C. G. (1989). PSO4: a novel gene involved in error-prone repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/DNA Repair*, *218*(2), 111-124.
- Herud, O., Weijers, D., Lau, S., & Jürgens, G. (2016). Auxin responsiveness of the MONOPTEROS-BODENLOS module in primary root initiation critically depends on the nuclear import kinetics of the Aux/IAA inhibitor BODENLOS. *The Plant Journal*, *85*(2), 269-277.
- Highsmith Jr, W. E. (2006). Electrophoretic methods for mutation detection and DNA sequencing. In *Molecular diagnostics: for the clinical laboratorian* (pp. 85-109): Springer.
- Hogg, R., McGrail, J. C., & O'Keefe, R. T. (2010). The function of the NineTeen Complex (NTC) in regulating spliceosome conformations and fidelity during pre-mRNA splicing. *Biochemical Society Transactions*, *38*(4), 1110-1115.
- Huson, H. J., Sonstegard, T. S., Godfrey, J., Hambrook, D., Wolfe, C., Wiggans, G., . . . VanTassell, C. P. (2020). A Genetic investigation of island jersey cattle, the foundation of the jersey breed: comparing population structure and selection to Guernsey, Holstein, and United States jersey cattle. *Frontiers in Genetics*, *11*, 366.
- Inchaisri, C., Jorritsma, R., Vos, P. L., Van der Weijden, G., & Hogeveen, H. (2010). Economic consequences of reproductive performance in dairy cattle. *Theriogenology*, *74*(5), 835-846.
- Jersey, U. N. A. J. I. (2014). American Jersey cattle association. *Reynoldsburg:[Google Scholar]*.
- JerseyCanada. (2019). Guelph,Canada.: Jersey History. ON: Jersey

- Jiang, J., Shen, B., O'Connell, J. R., VanRaden, P. M., Cole, J. B., & Ma, L. (2017). Dissection of additive, dominance, and imprinting effects for production and reproduction traits in Holstein cattle. *BMC genomics*, *18*, 1-13.
- Kadarmideen, H. N., Thompson, R., Coffey, M. P., & Kossaibati, M. A. (2003). Genetic parameters and evaluations from single-and multiple-trait analysis of dairy cow fertility and milk production. *Livestock Production Science*, *81*(2-3), 183-195.
- Karacan, & Olgun, G. (2009). Türkiye'deki Apodemus mystacinus (Mammalia: Rodentia)'un mtDNA (sitokrom B ve kontrol bölgesi) RFLP ve DNA dizi analizi.
- Khatib, H., Maltecca, C., Monson, R. L., Schutzkus, V., & Rutledge, J. J. (2009). Monoallelic maternal expression of STAT5A affects embryonic survival in cattle. *BMC genetics*, *10*(1), 1-10.
- Kim, J.-Y., & Kim, D.-K. (2018). 종합효소연쇄반응-단일가닥입체형태다형태 방법을 이용한 미토콘드리아 D-고리에서의 CA 디뉴클레오티드 반복수의 결정.
- Koncz, C., Dejong, F., Villacorta, N., Szakonyi, D., & Koncz, Z. (2012). The spliceosome-activating complex: molecular mechanisms underlying the function of a pleiotropic regulator. *Frontiers in plant science*, *3*, 9.
- Kristensen, T. N., & Sørensen, A. C. (2005). Inbreeding—lessons from animal breeding, evolutionary biology and conservation genetics. *Animal science*, *80*(2), 121-133.
- Kul, E. (2013). Jersey sığırlarında sür insülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I) konsantrasyonu ile doğrusal puanlama özellikleri, süt somatik hücre sayısı ve verim özellikleri arasındaki ilişkiler.
- Kumar, A., Gupta, I., Mohan, G., Vineeth, M., Jayakumar, S., & Niranjan, S. (2020). Development of PCR based assays for detection of lethal Holstein haplotype 1, 3 and 4 in Holstein Friesian cattle. *Molecular and cellular probes*, *50*, 101503.
- Kumar, A., Gupta, I. D., Mohan, G., Vineeth, M., Jayakumar, S., Kataria, R. S., & Niranjan, S. K. (2021). Alternate PCR assays for screening of JH1 mutation associated with embryonic death in Jersey cattle. *Molecular and cellular probes*, *55*, 101688.
- Lander, E. S., & Botstein, D. (1987). Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science*, *236*(4808), 1567-1570.
- Lee, S., & Bahaman, A. (2010). Research Note Modified gel preparation for distinct DNA fragment analysis in agarose gel electrophoresis. *Tropical Biomedicine*, *27*(2), 351-354.
- Leroy, G. (2014). Inbreeding depression in livestock species: review and meta-analysis. *Animal genetics*, *45*(5), 618-628.
- Li, H. (2011a). Improving SNP discovery by base alignment quality. *Bioinformatics*, *27*(8), 1157-1158.
- Li, H. (2011b). A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*, *27*(21), 2987-2993.
- Lucy, M. (2001). Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *Journal of dairy science*, *84*(6), 1277-1293.

- Lynn, D. J., Winsor, G. L., Chan, C., Richard, N., Laird, M. R., Barsky, A., . . . Shah, N. (2008). InnateDB: facilitating systems-level analyses of the mammalian innate immune response. *Molecular systems biology*, 4(1), 218.
- Ma, L., Cole, J., Da, Y., & VanRaden, P. (2019). Symposium review: Genetics, genome-wide association study, and genetic improvement of dairy fertility traits. *Journal of dairy science*, 102(4), 3735-3743.
- Maeder, C., & Guthrie, C. (2008). Modifications target spliceosome dynamics. *Nature structural & molecular biology*, 15(5), 426-428.
- Makarova, O. V., Makarov, E. M., Urlaub, H., Will, C. L., Gentzel, M., Wilm, M., & Lührmann, R. (2004). A subset of human 35S U5 proteins, including Prp19, function prior to catalytic step 1 of splicing. *The EMBO Journal*, 23(12), 2381-2391.
- Margulis, S. W., & Walsh, A. (2002). The effects of inbreeding on testicular sperm concentration in *Peromyscus polionotus*. *Reproduction, Fertility and Development*, 14(1), 63-67.
- Maximini, L., Fuerst-Waltl, B., Gredler, B., & Baumung, R. (2011). Inbreeding depression on semen quality in Austrian dual-purpose simmental bulls. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(1), e102-e104.
- NCBI. (2023a). Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/cgv/browse/GCF_002263795.2/GCF_000001405.40/27935/9913#NC_037342.1:15442224-15461178/NC_000011.10:94956608-94979571/size=10000
- NCBI. (2023b). CWC15 spliceosome associated protein homolog [*Bos taurus* (cattle) Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/535258>
- Nguyen, T. H. D., Galej, W. P., Fica, S. M., Lin, P.-C., Newman, A. J., & Nagai, K. (2016). CryoEM structures of two spliceosomal complexes: starter and dessert at the spliceosome feast. *Current opinion in structural biology*, 36, 48-57.
- Norman, H., Wright, J., Hubbard, S., Miller, R., & Hutchison, J. (2009). Reproductive status of Holstein and Jersey cows in the United States. *Journal of dairy science*, 92(7), 3517-3528.
- OklahomaStateUniversity, B. o. R. (2008). *Breeds of Livestock*. Stillwater, OK:
- Osmanağaoğlu, Ş. (2006). KARAKÖY TARIM İŞLETMESİ'NİN TARIHSEL GELİŞİMİ.
- Pantoja, J., Hulland, C., & Ruegg, P. (2009). Somatic cell count status across the dry period as a risk factor for the development of clinical mastitis in the subsequent lactation. *Journal of dairy science*, 92(1), 139-148.
- Parkinson, T. (2004). Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. *The Veterinary Journal*, 168(3), 215-229.
- Pausch, H., Schwarzenbacher, H., Burgstaller, J., Flisikowski, K., Wurmser, C., Jansen, S., . . . Fries, R. (2015). Homozygous haplotype deficiency reveals deleterious mutations compromising reproductive and rearing success in cattle. *BMC genomics*, 16, 1-13.
- Peñagaricano, F., & Khatib, H. (2012). Association of milk protein genes with fertilization rate and early embryonic development in Holstein dairy cattle. *Journal of dairy research*, 79(1), 47-52.
- Rasmussen, H. B. (2012). Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis-valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting. In *Gel electrophoresis-principles and basics*: InTechopen.

- Remington, D. L., & O'Malley, D. M. (2000). Whole-genome characterization of embryonic stage inbreeding depression in a selfed loblolly pine family. *Genetics*, *155*(1), 337-348.
- Rezende, F., Dietsch, G., & Peñagaricano, F. (2018). Genetic dissection of bull fertility in US Jersey dairy cattle. *Animal genetics*, *49*(5), 393-402.
- Richards, B., Skoletsky, J., Shuber, A. P., Balfour, R., Stern, R. C., Dorkin, H. L., . . . Klinger, K. W. (1993). Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. *Human molecular genetics*, *2*(2), 159-163.
- RJA, a. H. (2014). *Royal Jersey Agriculture and Horticultural Society*.
- Royal, M., Darwash, A., Flint, A., Webb, R., Woolliams, J., & Lamming, G. (2000). Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Animal science*, *70*(3), 487-501.
- Rupp, R., Boichard, D., Bertrand, C., & Bazin, S. (2000). Overview of milk somatic cell counts in French dairy cattle breeds. *Productions Animales*, *13*(4), 257-267.
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. (Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York).
- Shi, Y. (2017). Mechanistic insights into precursor messenger RNA splicing by the spliceosome. *Nature reviews Molecular cell biology*, *18*(11), 655-670.
- Shirasawa, K., Hirakawa, H., & Isobe, S. (2016). Analytical workflow of double-digest restriction site-associated DNA sequencing based on empirical and in silico optimization in tomato. *DNA research*, *23*(2), 145-153.
- Shuster, D. E., Kehrl Jr, M. E., Ackermann, M. R., & Gilbert, R. O. (1992). Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(19), 9225-9229.
- Sihn, C.-R., Cho, S. Y., Lee, J. H., Lee, T. R., & Kim, S. H. (2007). Mouse homologue of yeast Prp19 interacts with mouse SUG1, the regulatory subunit of 26S proteasome. *Biochemical and biophysical research communications*, *356*(1), 175-180.
- Sivaraman, B., Jeyasekaran, G., Shakila, R. J., Alamelu, V., Wilwet, L., Aanand, S., & Sukumar, D. (2018). PCR-RFLP for authentication of different species of processed snappers using mitochondrial D-loop region by single enzyme. *Food Control*, *90*, 58-65.
- Slane, D., Lee, C. H., Kolb, M., Dent, C., Miao, Y., Franz-Wachtel, M., . . . Bayer, M. (2020). The integral spliceosomal component CWC15 is required for development in Arabidopsis. *Scientific reports*, *10*(1), 1-13.
- Sonstegard, T. S., Cole, J. B., VanRaden, P. M., Van Tassell, C. P., Null, D. J., Schroeder, S. G., . . . McClure, M. C. (2013). Identification of a nonsense mutation in CWC15 associated with decreased reproductive efficiency in Jersey cattle. *PloS one*, *8*(1), e54872.
- Tarn, W. Y., Hsu, C. H., Huang, K., Chen, H. R., Kao, H.-Y., Lee, K.-R., & Cheng, S. C. (1994). Functional association of essential splicing factor (s) with PRP19 in a protein complex. *The EMBO Journal*, *13*(10), 2421-2431.
- Taylor, J. F., Schnabel, R. D., & Sutovsky, P. (2018). Genomics of bull fertility. *animal*, *12*(s1), s172-s183.
- Thomsen, B., Horn, P., Panitz, F., Bendixen, E., Petersen, A. H., Holm, L.-E., . . . Bendixen, C. (2006). A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene,

- encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. *Genome research*, 16(1), 97-105.
- TÜRKVET, G. (2023). Retrieved from [Available from: <http://www.turkvvet.gov.tr>].
- Ünalın, A., & Cankaya, S. (2010). Genetic parameters and correlations for lactation milk yields according to lactation numbers in Jersey cows. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16(6), 995-1000.
- Uniprot. (2023). UniProtKB- Q2KJD3 (CWC15_BOVIN). Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q2KJD3/entry>
- Van Eldik, P., Van Der Waaij, E., Ducro, B., Kooper, A., Stout, T., & Colenbrander, B. (2006). Possible negative effects of inbreeding on semen quality in Shetland pony stallions. *Theriogenology*, 65(6), 1159-1170.
- Van Maldegem, F., Maslen, S., Johnson, C. M., Chandra, A., Ganesh, K., Skehel, M., & Rada, C. (2015). CTNNB1 facilitates the association of CWC15 with CDC5L and is required to maintain the abundance of the Prp19 spliceosomal complex. *Nucleic acids research*, 43(14), 7058-7069.
- VanRaden, P., Null, D., Olson, K., & Hutchison, J. (2011). Reporting of haplotypes with recessive effects on fertility. *Interbull Bulletin*(44).
- VanRaden, P., Olson, K., Null, D., & Hutchison, J. (2011). Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *Journal of dairy science*, 94(12), 6153-6161.
- VanRaden, P., Sanders, A., Tooker, M., Miller, R., Norman, H., Kuhn, M., & Wiggans, G. (2004). Development of a national genetic evaluation for cow fertility. *Journal of dairy science*, 87(7), 2285-2292.
- VanRaden, P. M. (2011). findhap.f90. Accessed May 25, 2011. . Retrieved from <http://aipl.arsusda.gov/software/findhap>.
- VanRaden, P. M., O'Connell, J. R., Wiggans, G. R., & Weigel, K. A. (2011). Genomic evaluations with many more genotypes. *Genetics Selection Evolution*, 43, 1-11.
- Veerkamp, R., & Beerda, B. (2007). Genetics and genomics to improve fertility in high producing dairy cows. *Theriogenology*, 68, S266-S273.
- Vielmo, A., Pena, H. F. J., Panziera, W., Bianchi, R. M., De Lorenzo, C., Oliveira, S., . . . de Barros, C. S. L. (2019). Outbreak of toxoplasmosis in a flock of domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*) and guinea fowl (*Numida meleagris*). *Parasitology Research*, 118, 991-997.
- Wahl, M. C., Will, C. L., & Lührmann, R. (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*, 136(4), 701-718.
- Walsh, S., Williams, E., & Evans, A. (2011). A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal reproduction science*, 123(3-4), 127-138.
- Wiggans, G., Cooper, T., VanRaden, P., Van Tassell, C., Bickhart, D., & Sonstegard, T. (2016). Increasing the number of single nucleotide polymorphisms used in genomic evaluation of dairy cattle. *Journal of dairy science*, 99(6), 4504-4511.
- Wildt, D., Baas, E., Chakraborty, P., Wolfle, T., & Stewart, A. (1982). Influence of inbreeding on reproductive performance, ejaculate quality and testicular volume in the dog. *Theriogenology*, 17(4), 445-452.
- Will, C. L., & Lührmann, R. (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(7), a003707.
- Wu, X., Mesbah-Uddin, M., Guldbbrandtsen, B., Lund, M. S., & Sahana, G. (2020). Novel haplotypes responsible for prenatal death in Nordic Red and Danish Jersey cattle. *Journal of dairy science*, 103(5), 4570-4578.

- Yin, J., Zhu, J. M., & Shen, X. Z. (2012). New insights into pre-mRNA processing factor 19: a multi-faceted protein in humans. *Biology of the Cell*, 104(12), 695-705.
- Zhang, Y., Guo, G., Huang, H., Lu, L., Wang, L., Fang, L., . . . Zhang, S. (2015). Screening for JH1 genetic defect carriers in Jersey cattle by a polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assay. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(5), 596-599.



EKLER

Ek 1 Etik Kurul Kararı



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu

Sayı : E-68489742-604.02.03-238753
Konu : 20/04/2022 tarihli dilekçeniz hk.

DOÇ.DR. SERBÜLENT YİĞİT

20/04/2022 tarihli dilekçenizde “CWC15 gen mutasyonu sıklığının ve infertilite ile ilişkisinin araştırılması” konulu çalışmanız Hayvan Deneyleeri Etik Kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair Yönetmeliğin 8. Maddesi k bendine (1- Teşhis ve tedavi amaçlı klinik uygulamalar. 2- Ölü hayvan veya dokusu, mezbaha materyalleri, atık fetuslar ile yapılan prosedürler. 3- Süt sağma. 4- Dışkı veya altlık örneği toplama. 5- Sürüntü ile örnek alma.) göre HADYEK iznine tabi değildir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Mustafa AYYILDIZ
HADYEK Başkanı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu : 87TT-E8Y1-0KPZ Belge Doğrulama Adresi : <https://ebysorgu.omu.edu.tr>

Adres: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Rektörlüğü

Telefon No :

e-Posta :

Fax No :

İnternet Adresi :

Bilgi İçin : Hayriye ÇELİK

Veri Giriş Personeli

Telefon No:



ÖZ GEÇMİŞ

Sinop Atatürk Süper Lisesi'ni bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Veteriner Hekimliği bölümünden 02.07.2010 tarihinde mezun oldu. 2011 yılında serbest kliniğini açtı. 2012 yılında Amasya Üniversitesi Suluova Meslek Yüksekokulunda Öğretim görevlisi olarak çalışmaya başladı. 2017 yılında OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalında Doktora programına girdi. Mezuniyetinden bu yana Öğretim Görevlisi olarak görev yaptı. Orta derecede İngilizce bilmektedir (Yökdil:66,25,). Deney hayvanları kullanım sertifikası gibi sertifikalara sahiptir. Temel ilgi alanları, sinema müzik ve kitaplardır. (03.07.2023).

İletişim Bilgileri

ORCID ID : <https://orcid.org/0000-0001-9380-446X>

Yayınlar:

1. Ustaoglu, M. S., Yigit, S., & Kaya, M. T. (2023). Distribution of the 23-bp polymorphism of the prion protein gene in Jersey cattles in Turkey. *Journal of Experimental and Molecular Biology*.
2. YİĞİT, S., YILDIZ, S., & USTAOĞLU, M. S. (2023). EFFECTS OF LONG NONCODING RNAs ON ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA. *International Academic Research and Reviews in Health Sciences*, 161.
3. Ustaoglu Melih Sercan, Yiğit Serbülent (2022). Cwc15 Gen Mutasyonunun Jerseylerde Fertilizasyon Etkisi. Middle East International Conference On Contemporary Scientific Studies-V11, 537-548. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:8136661)
4. Güncel Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Çalışmaları IV, Bölüm Adı:(Odontojenik Kistler Ve Tümörlerin Neoplastik Karakterlerini Değerlendirme Belirteçler) (2023)., YILDIZ SERKAN, USTAOĞLU MELİH SERCAN, YİĞİT SERBÜLENT, Akademisyen Yayınevi Bilimsel Araştırmalar Kitabı, Editör:Hüsnü Ümit LÜLEYAP, Basım Sayısı:1, Sayfa Sayısı 107, ISBN:978-625-399-130-2, Türkçe(Bilimsel Kitap), (Yayın No: 8296257)
5. INTERNATIONAL RESEARCH IN HEALTH SCIENCES, 2023, Bölüm adı:(Cancer and MicroRNA: An Overview of Human and Canine Mammary Tumors)

(2023)., USTAOĞLU MELİH SERCAN, YİĞİT SERBÜLENT, PLATANUS PUBLISHING, Editör:Doç.Dr. Dilek ATİK, Basım sayısı:1, Sayfa Sayısı 398, 2. 2ISBN:978-625-6971-13-4, İngilizce(Bilimsel Kitap), (Yayın No: 8279476)

