



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**TÜRKİYE'DE YETİŞTİRİLEN BAZI SIĞIR IRKLARINDA
YENİ NESİL SEKANS ANALİZİ İLE
TOLL BENZERİ RESEPTÖR (TLR) 2, 4 VE 6
GEN BÖLGELERİNDEKİ VARYASYONLARIN
İNCELENMESİ**

Nüket BİLGEN

**GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Okan ERTUĞRUL**

2015- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE’DE YETİŞTİRLEN BAZI SIĞIR IRKLARINDA
YENİ NESİL SEKANS ANALİZİ İLE
TOLL BENZERİ RESEPTÖR (TLR) 2, 4 VE 6
GEN BÖLGELERİNDEKİ VARYASYONLARIN
İNCELENMESİ**

Nüket BİLGEN

**GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Okan ERTUĞRUL**

**Bu tez Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından
13B3338011 ve TÜBİTAK 2214-A Programı 1059B141400991 nolu projeler ile desteklenmiştir.**

2015 - ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Genetik Doktora Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: / /2015

Jüri Başkanı

Jüri

Jüri

Jüri

**Jüri
(Raportör)**

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Hastalıklara Karşı Vücudun Savunma Mekanizmaları	3
1.1.1. Doğal Savunma Faktörleri	4
1.1.2. Doğal Direnç (Innate Immunity)	5
1.2. Toll Benzeri Reseptörler (TLR)	7
1.2.1. Toll Benzeri Reseptörler Ligand Tanıma Domaini (LRR Domain)	10
1.2.2. Toll Benzeri Reseptörler; Sitoplazmik Sinyal Domaini Toll/İnterleukin-1 Reseptör Domain (TIR Domain)	11
1.3. Sığırlarda TLR Gen Ailesi	12
1.3.1. TLR1 Ailesi	12
1.3.2. TLR4 Ailesi	13
1.3.3. İncelenen TLR Gen Bölgelerinin Genomik Organizasyonu ve Protein Yapısı	14
1.4. İncelenen Sığır Irkları	17
1.4.1. Yerli Kara Sığır Irkı	17
1.4.2. Güney Anadolu Kırmızısı Sığır Irkı	18
1.4.3. Doğu Anadolu Kırmızısı Sığır Irkı	19
1.4.4. Boz Sığır Irkı	20
1.4.5. Holştayn Sığır Irkı	21
1.5. Biyoinformatik Analizler: Dosya Formatları, Program ve Yazılımlar	22
1.5.1. SAM (Sequence Alignment/Map) Dosya Formatı	22
1.5.2. BAM (Binary Alignment/Map) Dosya Formatı	24
1.5.3. VCF (Variant Call Format) Dosya Formatı	24

1.5.4. Bütünleştirici Genomik Görüntüleme (Integrative Genomics Viewer, IGV)	24
1.5.5. SAM Tools ve BAM Tools	25
1.5.6. Picard Tools	26
1.5.7. Genome Analysis Tool Kit (GATK)	26
1.5.8. Shapeit ve Phase	26
1.5.9. Snpsift ve Snpeff	27
1.5.10. Ensembl Varyant Etki Tahmin Edicisi	27
1.5.11. Network Programı	27
2. GEREÇ VE YÖNTEM	28
2.1. DNA Ekstraksiyonu, DNA Yoğunluğu, Saflığı ve Bütünlüğünün Kontrolü	28
2.2. Gen Bölgelerinin Yükseltgenmesi	29
2.3. Data Analizi	33
3. BULGULAR	36
3.1. DNA Ekstraksiyonu, DNA Yoğunluğu, Saflığı ve Bütünlük Kontrolü Bulguları	36
3.2. Gen Bölgelerinin PZR Sonuçları	39
3.3. Bütünleştirici Genomik Görüntüleme (Integrative Genomics Viewer, IGV) ile Analiz Öncesi Ham Dataların İnceleme Bulguları	39
3.4. TLR2, TLR4 ve TLR6 Gen Bölgelerinin UMD3.1 ve Bos taurus 4.6.1 İncelemesi	43
3.5. Filtreleme ve İncelenen Genlerin Analiz Bulguları	43
3.5.1. Yerli Kara Sığır Irkı TLR2, TLR4 Ve TLR6 Tüm Gen Analizi Bulguları	45
3.5.2. Doğu Anadolu Kırmızısı Sığır Irkı TLR2, TLR4 Ve TLR6 Tüm Gen Analizi Bulguları	46
3.5.3. Güney Anadolu Kırmızısı Sığır Irkı TLR2, TLR4 Ve TLR6 Tüm Gen Analizi Bulguları	48
3.5.4. Boz Sığır Irkı TLR2, TLR4 Ve TLR6 Tüm Gen Analizi Bulguları	50
3.5.5. Holştayn Sığır Irkı TLR2, TLR4 Ve TLR6 Tüm Gen Analizi Bulguları	52
3.5.6. Tüm Bireylerin TLR2 ve TLR4 Ekzon Varyantları Haplotip Bulguları	54
4. TARTIŞMA	61
4.1. YNS'de Yükseltgenemeyen Bölgeler, Analiz Dışı Bırakılan Birey ve Filtrelenen Varyantlar	62

4.2. Transisyon/Transversiyon (Ti/Tv) Oranı	63
4.3. TLR2, TLR4 ve TLR6 Belirlenen Varyasyonlarının Karşılaştırması	64
4.4. TLR2, TLR4 ve TLR6 Ekzon Haplotiplerinin Karşılaştırması	71
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	73
ÖZET	75
SUMMARY	76
KAYNAKLAR	77
ÖZGEÇMİŞ	89

ÖNSÖZ

Doğal direncin anahtar molekülü olan Toll proteininin memeli genomunda homologları olan Toll benzeri reseptörler (Toll like receptors, TLR) belirlenmelerinden bu yana hastalıklara direnç ve duyarlılık üzerine yapılan immunogenetik çalışmalarında incelenmektedirler. TLR2, TLR4 ve TLR6 proteinleri hücre yüzeyine eksprese olan reseptörlerdir ve bu reseptörler kendi aralarında heterodimer ya da homodimer oluşturarak mikroorganizmaların patojen ilişkili moleküler örüntülerini (Pathogen associated molecular patterns, PAMP) tanımak üzere özelleşmişlerdir. Bu reseptörleri belirleyen gen bölgelerinde bulunan varyasyonların PAMP'ların tanınmasında dolayısıyla direnç ve duyarlılıkla ilişkilendirilmiştir. Örneğin, TLR2 gen bölgesinde bulunan amino asit değişimlerini *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) enfeksiyonuna karşı duyarlılıkla (Mucha ve ark., 2009), TLR4 gen bölgesinde bulunan varyantlar mastite karşı duyarlılıkla ve TLR6 geni ise sığırlarda tüberküloz direnci ile ilişkilendirilmiş aday genlerdir (Song ve ark., 2014). Yerli kara, Doğu Anadolu Kırmızısı, Güney Anadolu Kırmızısı, Boz ırkı sığırlar Türkiye yerli gen kaynakları arasında olup hastalıklara karşı dirençli olduğu bilinen ve Holştayn sığır ırkı ise hastalıklara duyarlı olduğu bilinen sığırlardır. Bu çalışmada incelenen ırklar ve literatürde yer alan direnç ve duyarlılıkla ilişkilendirilmiş varyantların karşılaştırılması yapılmış ve yeni varyantlar belirlenerek literatüre katkı yapılması sağlanmıştır. Ayrıca incelenen genlerin ekzonları için haplotipler belirlenmiş ve ırklar arası paylaşılan haplotipler ve ırklara özgü haplotipler incelenmiştir. Çalışmada kullanılan yöntem ile tüm gen bölgelerindeki varyantların belirlenmesi sağlanmış ve ileride yapılacak ilişkilendirme çalışmalarında yararlanılabilecek güvenilirlik derecesi yüksek veriler elde edilmiştir.

İlk önce her adımda bana olan güveni ve sevgisini üzerimden eksik etmeyen tez danışmanım Prof. Dr. Okan ERTUĞRUL'a, tezimin değerli jüri üyeleri Prof. Dr. K. Serdar DİKER, Prof. Dr. Aydın GÜZELOĞLU, Doç. Dr. Bilal AKYÜZ, Prof. Dr. Cevdet UĞUZ, Yrd. Doç. Dr. Bengi ÇINAR KUL ve Yrd. Doç. Dr. Özge ÖZMEN'e katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Hem hocalarım hem arkadaşlarım olan tezin her aşamasında maddi manevi desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Bengi ÇINAR KUL, Prof. Dr. Oğuz KUL'a ve anlayışından dolayı sevgili Kayra KUL'a sonsuz teşekkür ederim. *Siz olmadan başaramazdım...*

Çalışmalarımın uygulama aşamasında laboratuvar desteğini esirgemeyen Uzm. Mol. Bio. Haldun DOĞAN ve özellikle Bio. Fatih POSUK, Bio. Tuğba ERİBOL ve Bio. Aytuna CERCİ olmak üzere INTERGEN ekibine çok teşekkür ederim.

Sevgili çalışma arkadaşlarım Veteriner Hekim M. Yenal AKKURT, Veteriner Hekim M. Cevat TEMİZKAN'a, Laborant Beylan SAĞLAM'a ve özellikle tezimin son aşamasındaki format düzeltmeleri için Birol KALENDER'e sabrından dolayı çok teşekkür ederim.

Sevgili ailem, annem Emine BİLGEN, babam İzzet BİLGEN, ablam Buket BİLGEN ve eşi Kürşad KANDEMİR'e bana her zaman inandıkları ve destekledikleri için sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca sevgili arkadaşlarıma hayatımın bir parçası oldukları ve zor zamanlarımda yanımda oldukları için sonsuz teşekkür ederim.

I want to thank especially to Prof. Dr. Dirk WERLING *You inspired me on working TLRs with your studies and gave me the chance working with you and your team. You are my idol!* I also want to thank Werling's team, Dr. Amanda GIBSON, Sally WOODMAN, my dearest friend Kata TOMBACZ and Dr. Victoria OFFORD (AKA: the bionformation goddess!) *Without you I could not do the data analysis and come this far... Thank you!*

SİMGELER VE KISALTMALAR

µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
A	: Adenin Nükelotit
A	: Alanin, ala
BAM	: Binary Alignment/Map
bç	: Baz çifti
BT A	: Sığı r kromozomu
C	: Sitozin Nükelotit
CYS	: Sistein,
C°	: Santigrat Derece
CLR	: C-tipi Lektin Reseptörler (C-type Lectin Receptors)
CNV	: Kopya Sayısı Değişimi (Copy Number Variants)
CpG	: CpolyG
D	: Aspartik asit, asp
DAK	: Doğu Anadolu Kırmızısı
DAMP	: Damage Associated Molecular Patterns
ddH ₂ O	: Didisitle Su
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
dNTP	: Dinükleotid tri fosfat
DP	: Okuma derinliği
dsRNA	: Double strand RNA
E	: Glütamik asit, glu
EAM	: Eritrosit Antijen M
ECD	: Extra cellular domain
EtBr	: Etidyum Bromür
F	: Fenilalanin, phe
FS	: Fisher'ın kesinlik testi filtresi
GLY	: Glisin,
G	: Guanin Nükelotit
GAK	: Güney Anadolu Kırmızısı
GATK	: Genome Analysis Tool Kit yazılımı
gr	: Gram
H	: Histidin, his
HOL	: Holştayn
HSP	: Heat shock proteins
I	: İzolösin, ile
IGV	: Integrative Genomics Viewer
IL-1R	: Memeli interleukin-1 reseptör
InDel	: İnsersiyon ve Delesyon

IU	: Internasyonel Unite
K	: Lizin, lys
kb	: Kilo baz
L	: Lösin, leu
LPS	: Lipopolisakkarit
LRR	: Leucine rich repeat
LTA	: Lipoteikhoik
M	: Metiyonin, met
MALP-2	: Makrofaj Etkinleştirici Lipopeptid-2
MHC	: Major Histocompatibility
MJ	: Median Joining
mm	: Milimetre
MQ	: Mapping Quality
N	: Asparajin, asn
ng	: Nanogram
NK	: Natural Killer
NLR	: NOD-benzeri reseptörler
nmol	: Nanomol
ns	: Nonsinonim
P	: Prolin, pro
PAMP	: Pathogen-Associated Molecular Pattern
PGN	: Peptidoglikan
PPR	: Koyun keçi vebası
PrP ^{sc}	: Prion protein scrapie
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Q	: Glütamin, gln
QD	: Derinlik Kalitesi
R	: Arjinin, arg
RSV	: Respiratory syncytial virus
S	: Serin, ser
SAM	: Sequence Alignment/Map
sn	: Saniye
sin	: Sinonim
SNV	: Tek Nükleotit Varyantı (Single Nucleotide Variants)
sp.	: Species
ssRNA	: Single strand RNA
THR	: Treonin
T	: Timin Nükelotit
TIR	: Toll/interleukin-1 reseptör domain
TLR	: Toll Benzeri Reseptör (Toll like receptor)
TM	: Trans membran
Ts/Tv	: Transisyon/Transversiyon

V	: Valin, Val
VCF	: Varyant Çağrısı Formatı (Variant Calling Format)
VEP	: Variant Effect Predictor
W	: Triptofan, Trp
Y	: Tirozin, Tyr
YK	: Yerli Kara
YNS	: Yeni Nesil Sekans Analizi (Next Generation Sequence Analysis)

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	İmmun yanıt aşamaları (Janeway, 2006)	4
Şekil 1.2.	Toll Like Reseptör domainlerinin yerleşimi (Smith ve ark., 2012)	9
Şekil 1.3.	Omurgalılarda TLR aileleri. Her aile farklı renk ile gösterilmiştir (Roach ve ark., 2005).	10
Şekil 1.4.	Yerli Kara Sığırı	17
Şekil 1.5.	Güney Anadolu Kırmızısı Sığırı	18
Şekil 1.6.	Doğu Anadolu Kırmızısı Sığırı	19
Şekil 1.7.	Boz Sığırı	20
Şekil 1.8.	Holştayn Sığırı	21
Şekil 2.1.	TLR2 gen bölgesi primerlerinin IGV de gösterimi (Alt satırlarda bulunan kırmızı dikey çizgiler ileri yönlü, mavi çizgiler geri yönlü oligonükleotitlerdir.)	30
Şekil 2.2.	TLR4 gen bölgesi primerlerinin IGV de gösterimi (Alt satırlarda bulunan kırmızı dikey çizgiler ileri yönlü, mavi çizgiler geri yönlü oligonükleotitlerdir.)	31
Şekil 2.3.	TLR6 gen bölgesi primerlerinin IGV de gösterimi (Alt satırlarda bulunan kırmızı dikey çizgiler ileri yönlü, mavi çizgiler geri yönlü oligonükleotitlerdir.)	32
Şekil 3.1.	Yerli Kara Sığır örneklerine ait EtBr ile boyanmış %1'lik agaroz jel görüntüsü. (YK1-YK21, sıra sonraların 1kb DNA ladder)	36
Şekil 3.2.	YK8 nolu bireye ait EtBr ile boyanmış %1,5'lik. tüm bölgelerin agaroz jel görüntüsü (Sıra sonraların 100bp plus DNA ladder)	39
Şekil 3.3.	IGV Analiz öncesi ham datanın incelenmiştir. Kullanıcı ara yüzde örnek adı bölümü, kaplam görseli bölümü, gen bilgisi bölümü, okumaların görselleştirildiği bölüm bulunmaktadır.	40
Şekil 3.4.	PZR ile yükseltgenemeyen bölgenin IGV görünümü.	40

Şekil 3.5.	IGV ham data analizi detaylı görüntü. Kaplam görselinin bulunduğu bölgede farklı renklerle referanstan farklı olan bazlar gösterilmektedir. Aynı şekilde okuma görselinde de bu bazlar belirtilmektedir. Ayrıca InDel bölgeleri de bu bölgelere baz ataması yapılamadığı için çizgi ile gösterilmektedir.	41
Şekil 3.6.	DAK örneklerinin ham datalarında okuması olmayan bölgelerin IGV’de görüntülenmesi	42
Şekil 3.7.	IGV ile .bam ve .vcf dosyalarının incelenmesi	44
Şekil 3.8.	YK ırkında Transisyon ve transversiyon sonuçları.	45
Şekil 3.9.	YK ırkında Nonsinonim varyasyonların neden olduğu amino asit geçişleri.	46
Şekil 3.10.	DAK ırkında Transisyon ve transversiyon sonuçları.	47
Şekil 3.11.	DAK ırkında Nonsinonim varyasyonların neden olduğu amino asit geçişleri.	48
Şekil 3.12.	GAK ırkında Transisyon ve transversiyon sonuçları.	49
Şekil 3.13.	GAK ırkında Nonsinonim varyasyonların neden olduğu amino asit geçişleri.	50
Şekil 3.14.	BOZ ırkında Transisyon ve transversiyon sonuçları.	51
Şekil 3.15.	BOZ ırkında Nonsinonim varyasyonların neden olduğu amino asit geçişleri.	52
Şekil 3.16.	HOL ırkında Transisyon ve transversiyon sonuçları.	53
Şekil 3.17.	HOL ırkında Nonsinonim varyasyonların neden olduğu amino asit geçişleri.	54
Şekil 3.18	TLR2 MJ ağacı.	56
Şekil 3.19.	TLR4 MJ ağacı.	57

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	TLR2, TLR2/1 TLR4 ve TLR2/6'nın bilinen ligandları ve hücre içi adaptör proteinleri	14
Çizelge 1.2.	Genom versiyonlarına göre incelenen gen bölgelerinin yerleşim aralığı	15
Çizelge 1.3.	TLR2, TLR4 ve TLR6 proteinlerinin domain bilgileri	16
Çizelge 1.4.	FLAG değerleri ve yorumlanması	23
Çizelge 1.5.	CIGAR değerleri ve yorumlanması	23
Çizelge 2.1.	PZR'da kullanılan kimyasalların konsantrasyon ve miktarları	29
Çizelge 2.2.	PZR protokolü	29
Çizelge 2.3.	TLR2 gen bölgesinin yükseltgenmesinde kullanılan oligonükleotitler	30
Çizelge 2.4.	TLR4 gen bölgesinin yükseltgenmesinde kullanılan oligonükleotitler	31
Çizelge 2.5.	TLR6 gen bölgesinin yükseltgenmesinde kullanılan oligonükleotitler	32
Çizelge 2.6.	Analizde kullanılan komutların aşamaları	34
Çizelge 3.1.	İncelenen Sığır ırklarının DNA saflık kontrolleri ve miktar sonuçları	36-38
Çizelge 3.2.	YNS verisi olmayan bölgeler	42
Çizelge 3.3.	YK sığır ırkında incelenen gen bölgelerinde belirlenen varyantlar	45
Çizelge 3.4.	YK sığır ırkında belirlenen varyantların tip ve bölgeye göre etkileri	45
Çizelge 3.5.	DAK sığır ırkında incelenen gen bölgelerinde belirlenen varyantlar	47
Çizelge 3.6.	DAK sığır ırkında belirlenen varyantların tip ve bölgeye göre etkileri	47
Çizelge 3.7.	GAK sığır ırkında incelenen gen bölgelerinde belirlenen varyantlar	49
Çizelge 3.8.	GAK sığır ırkında belirlenen varyantların tip ve bölgeye göre etkileri	49
Çizelge 3.9.	BOZ sığır ırkında incelenen gen bölgelerinde belirlenen varyantlar	50
Çizelge 3.10.	BOZ sığır ırkında belirlenen varyantların tip ve bölgeye göre etkileri	51
Çizelge 3.11.	HOL sığır ırkında incelenen gen bölgelerinde belirlenen varyantlar	52
Çizelge 3.12.	HOL sığır ırkında belirlenen varyantların tip ve bölgeye göre etkileri	53

Çizelge 3.13.	Ekzonlarda belirlenen varyant ve haplotipler sayısı	54
Çizelge 3.14.	TLR2, TLR4 ve TLR6 gen bölgelerinde belirlenen haplotipler	55
Çizelge 3.15.	TLR2 referans protein domainlerine (NP_776622.1) göre sinonim ve nonsinonim varyasyon bilgisi	58
Çizelge 3.16.	TLR4 referans protein domainlerine (NP_776623.5) göre sinonim ve nonsinonim varyasyon bilgisi	59
Çizelge 3.17.	TLR6 referans protein domainlerine (NP_001001159.1) göre sinonim ve nonsinonim varyasyon bilgisi	60

1. GİRİŞ

Bir hücre yüzey reseptör protein olan Toll, ilk olarak *Drosophila melanogaster* sineklerinde keşfedilmiştir. *Drosophila* larvalarında Toll proteini dorsal-ventral yönlendirmeyi sağlarken (Stein ve ark., 1991) ergin sineklerde mantar enfeksiyonuna karşı savunmada görev almaktadır (Lemiatre ve ark., 1996). 1990'lı yıllarda bu proteinin homoloğu memelilerde de belirlenmiş ve Toll Benzeri Reseptörler (Toll Like Receptors, TLR) adı verilmiştir (Medzhitov ve Janeway, 1997). TLR'ler doğal direncin evrimsel olarak korunmuş örüntü tanıma molekülleridir ve patojenlerin belirlenmesinde ve yangı yanıtının oluşturulmasında anahtar role sahiptirler (Werling ve ark., 2009). İnsan ve farede 13 tane TLR belirlenmiştir (Tabeta ve ark., 2004; Andreda ve ark., 2013), sığırlarda ise 10 adet TLR (TLR1-TLR10) bulunmaktadır (Hopkins ve Sriskandan, 2005). TLR bölgelerinde belirlenen varyasyonlar ile ilgili olarak yapılan çalışmalara göre, bu gen bölgelerinde bulunan varyantların hayvanlarda hastalıklara direnç ve duyarlılık karakteri ile ilişkilendirilebileceği bildirilmiştir (Leveque ve ark., 2003; Shinkai ve ark., 2006; Jan ve ark., 2008; Bhide ve ark., 2009; Mucha ve ark., 2009). Çiftlik hayvanlarının hastalıklara dirençli olması sağlıklı hayvanlar-sağlıklı insanlar yani "tek sağlık" ilkesinin temelini sağladığı gibi dirençli hayvanlar ile hastalıklardan kaynaklanan ekonomik kayıplarda önlenebilecektir.

Sığırlarda hastalıklara direnç / duyarlılık, verim özellikleri karakterleri açısından belirgin bir varyasyon bulunmaktadır. Bu karakterlerle ilgili olarak ilişkilendirme çalışmaları başta biyokimyasal polimorfizm üzerine yapılmıştır. Örneğin kan grubu polimorfizmi ile süt verimi ilişkilendirilmeye çalışılmış ve Eritrosit Antijen M taşımayan (EAM[']) sığırlarda yüksek süt verimi arasında ilişki ortaya konulurken, EAM₁ ve EAM₂, allellerini taşıyan bireylerin ise mastite karşı duyarlı olabilecekleri ileri sürülmüştür (Larsen, 1985). Ancak belirlenen bu ilişkilerin genetik alt yapı, çevre koşulları gibi değişken faktörlerden etkileniyor olması, sığırlarda yapay seleksiyonun uzun sürmesi gibi nedenlerle farklı sığır popülasyonlarında uygulanabilir bulunmamıştır. Direnç/duyarlılık olgusunu inceleyen immünogenetik alanının gelişimi; direnç ve verim özellikleri arasında

negatif korelasyon olması nedeniyle genetiğin diğerk alt dallarından daha yavaş bir gelişme göstermiştir (Bishop ve ark., 2010). Ancak moleküler biyolojik yöntemlerin gelişmesi, genom boyu analize olanak sağlayan araçların yaygın olarak kullanıma girmesiyle birlikte, belirteç temelli seleksiyon yöntemleri uygulanabilir hale gelmiştir. Bu sayede DNA belirteçleri kullanılarak dirençli/duyarlı bireyler arasındaki genetik varyasyonun ortaya konmasında, değişen gen ifadelerinin belirlenmesi ile konaklar arasındaki dirençlilik olgusunun varyasyonu araştırılabilir hale gelmiştir.

Yaşam bilimlerinde tekli nükleotit varyantlarının (SNV) belirlenmesi ile ilgili çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Poligenik, aditif etki ve genomik SNV etkileri birlikte değerlendirildiğinde sığır ırklarında ilgili fenotipik karakterde görülen genetik varyasyon %71-85'i SNV etkisi ile açıklanabilmektedir (Jensen ve Omadsen, 2012). Yeni nesil sekans analizleri (YNS) SNV'ler, kısa insersiyon ve delesyonlar (InDel), kopya sayısı değişimleri (CNV) gibi genetik varyasyonların belirlenmesi ile de fenotipte görülen farklılıkların genetik temellerinin açıklanması mümkün hale gelmiştir (Baes ve ark., 2014).

Yerli ırklar önemli gen kaynaklarıdır. Genel olarak bu ırklar yapay seleksiyon baskısı altında olmadığı için genetik çeşitliliklerini koruyabilmişlerdir. Türkiye yerli sığır ırklarından Yerli Kara (YK), Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK), Güney Anadolu Kırmızısı (GAK), Boz ırklarının mastit, tüberküloz ve kene kaynaklı kan parazitlerine karşı dirençli olduğu bilinmektedir (Özdemir ve Doğru, 2009). Diğer taraftan süt ve et verimi gibi kantitatif karakterler yönünden yapay seleksiyon baskısı altında olan kültür ırkları ise hastalıklara duyarlı hale gelmişlerdir (Ingvarsen ve ark., 2003).

Bu araştırmada hastalıklara dirençli olduğu bilinen Türkiye yerli ırkları (YK, DAK, GAK, BOZ) ile kültür ırkı (Holştayn) sığırlarında TLR2, TLR4 ve TLR6 gen bölgelerindeki varyasyonların karşılaştırılması, haplotiplerin ve direnç ile ilişkili aday varyasyonların belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.1. Hastalıklara Karşı Vücutun Savunma Mekanizmaları

Organizma, hastalıklara neden olan, bakteri, virüs ve kanser hücreleri gibi etkenlerin sürekli kuşatması altında olan bir kale gibidir. Hastalık etkenlerine karşı konak savunması immunité (*immunis*) olarak adlandırılır ve bu kelime ilk kez eski Roma döneminde ‘herhangi bir hizmetten ari olmak’ anlamında kullanılmıştır. Günümüzde ise, tıp terimi olarak hastalıktan ari olmak anlamına gelmektedir (Elgert, 2009).

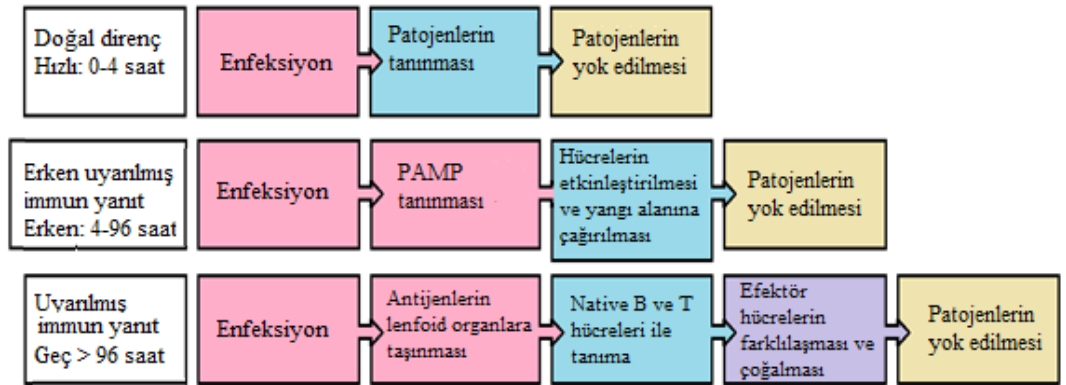
Hayvan vücudu yaşamayı sürdürebilmek için gereksinim duyduğu birçok bileşeni içinde bulundurmaktadır. Nemli, sıcak ve besin maddeleri içeren bir ortamdır. Dolayısıyla mikroorganizmalar bu ortamı işgal etmek ve besin maddelerinden yararlanmak isterler (Tizard, 2009). Bir hayvan öldüğünde mikrobiyal saldırının büyüklüğü açıkça görülebilmektedir. Hayvan öldükten birkaç saat sonra, mikroorganizmalar dokuları istila etmeye başlarken, sağlıklı ve canlı dokular mikrobiyal saldırılara karşı daha dirençlidir ve canlılığın hayatta kalabilme becerisi de bu dirence bağlıdır. Bu direnç birbirine sıkı sıkıya bağlı farklı savunma mekanizmalar bütününden oluşmaktadır (Tizard, 2009).

Omurgalı hayvanlar immun sistemi oluşturan hücre ve moleküller ile bağışıklık kazanabilirler. Konak tarafından oluşturulacak güçlü bir bağışıklık, ancak, savunma hücrelerinin işbirliği ve patojen spesifik yeni hücre ve moleküllerin üretilmesi ile sağlanabilir (Tizard, 2009). Vücuttaki tüm bu aktiviteler, ‘*immun yanıt*’ olarak bilinmektedir (Kawai ve Akira, 2010). İmmun yanıt; vücuda bakteri, virüs, parazit ya da mantar gibi yabancı bir organizma girdiğinde, konak ya özgün olmayan şekilde enfeksiyöz etkenleri temizler ya da o organizmaya özgün hücre ve mediyatörlerden oluşan immun yanıt üretir (Elgert, 2009).

İmmun sistem; vücudu enfeksiyonlardan korumak için bir bütün halinde işleyen; savunma hücreleri, doku ve organlardan oluşmuş bir ağdır ve fiziksel, biyolojik ve kimyasal çoklu savunma mekanizmasına sahiptir (Tizard, 2009). Bu savunma mekanizmaları, birbiriyle örtüşen ve ardışık bariyerlerden oluşur ve vücudun ilk fiziksel bariyer savunmasından geçmeyi başarabilen mikroorganizma ileri aşamada daha güçlü bir savunma ile karşılaşmaktadır (Şekil 1.1). En basit anlamda, immun sistem vücuda giren patojenleri dost ya da düşman olarak tanımlamakta, dost olanlara geçiş izni verirken, düşman olanları arayıp yok etmek

üzere programlanmıştır. Bunun da ötesinde, immun sistem, tekrarlayan hastalık etkenlerini hatırlayabilir ve ilkinde göre daha kısa sürede gelişen patojen spesifik konak immun yanıtı ile, herhangi bir klinik bulgu görülmeden hastalıklar engellenebilir.

Vücudun patojen organizmalara ilk yanıtı kan, hücre dışı sıvılar ve epitel hücre salgıları ile olmaktadır ve bu humoral doğal direnç olarak da bilinmektedir. Bu yolla patojen yok edilebilir ya da etkisi zayıflatılabilir. Yanıtın ikinci aşamasında doğal direnç sistemi hücreleri, patojen ilişkili moleküler örüntüleri (Pathogen-Associated Molecular Pattern, PAMP) tanırlar ve enfeksiyonu ortadan kaldıracak farklı yolları kullanmak üzere aktive olurlar. İlk iki yanıt kendi başına immünolojik bir hafıza oluşturamaz. Bir mikroorganizma bu iki aşamayı da geçerse, immun yanıtın üçüncü aşaması olan uyarlamalı bağışıklık etkinleşir. Uyarlamalı bağışıklık sayesinde lenfositler özgün olarak bu patojene karşı harekete geçer ve vücudun bu patojene karşı hayat boyu bağışıklık kazanmasını sağlayacak hafıza hücreleri oluşturur (Janeway ve ark., 2006).



Şekil 1.1. İmmun yanıt aşamaları (Janeway ve ark., 2006).

1.1.1. Doğal Savunma Faktörleri

Vücudun en etkili savunma sistemi, mikroorganizmaların vücuda girişinin engellenmesidir. Bu bariyerler olmadan etkili bir savunma neredeyse mümkün değildir. Sağlam deri mikrobiyal saldırılara karşı önemli bir bariyerdir ve ancak hasar görmüşse yangı şekillenebilir. Yara iyileşme mekanizması ile de bu bariyerin sağlam ve hızlı bir şekilde onarılması sağlanır. Vücudun diğer yüzeyleri mukoza ve

serozalarla örtülüdür ve ilk fiziksel bariyeri oluştururlar. Bununla birlikte, patojenlerin vücuda giriş yaptığı başlıca yollardan solunum ve sindirim sistemi basit fiziksel savunma sistemlerine sahiptir (Diker, 1998). Örneğin, üst solunum yolları ve büyük bronşlarda bulunan mukosilier sistem yabancı partiküllerin tutularak saatte 0.1 mm hızla geriye doğru itilmesini sağlar. Bu nedenle, 100 μm 'den büyük partiküller üst solunum yollarında tutulurken, 1-10 μm arasındakiler ise muköz membranlara yapışarak uzaklaştırılırlar (Janeway ve ark., 2006). Dolayısıyla, akciğer alveollerinde hastalık oluşturabilen mikroorganizmaların çapları çoğunlukla 1 μm 'den küçüktür. Bu basit fiziksel savunma mukozaların temizlenmesini de kapsamaktadır. Örneğin öksürme, hapşırma, yüzeyledeki mukus akışı, sindirim sistemi için kusma, ishal ve üriner sistem için ise idrar akışı bu temizliği sağlamaktadır. Deri üzerindeki ve bağırsaklarda normal flora potansiyel saldırganları dışlayabilmektedir. Bunun yanında normal flora mikroorganizmaları, bu yüzeylelerden girmeye çalışan uyum sağlayamamış patojen organizmaları yenebilmektedir (Janeway ve ark., 2006).

1.1.2. Doğal Direnç (Innate Immunity)

Fiziksel bariyerler mikroorganizmaların vücuda girişini engellemek için hayati öneme sahip olsa da her zaman çok etkili olmayabilirler. Mikroorganizmaya maruz kalma süresi, mikroorganizmanın vücuda girmedeki kararlılığı ile fiziksel bariyerler aşılabilmektedir. Buna rağmen canlılar sürekli hasta olmazlar, çünkü mikroorganizma saldırısı hastalığa sebep olamadan engellenebilir. Bu engelleme *doğal direnç* sayesinde şekillenmektedir (Janeway ve ark., 2006). Hayvan vücudunun, doğal savunma mekanizmasını, mikrobiyal invazyonun olduğu bölgeye karmaşık reaksiyonlar ile yönlendirmesine *yangı* adı verilmektedir. Yangı sırasında, mikrobiyal invazyon kaynaklı değişimler ya da doku hasarı durumunda kan akışı artar ve patojenleri yok edecek hücrelerin göçü sağlanır (Medzhitov ve Janeway, 1997). Yangı, vücut kendini tehlikede hissettiği zaman gerçekleşmektedir. Tehlikenin hissedilmesi, invaziv bir mikroorganizma ya da ölü ve ölmekte olan hücrelerden salınan uyarı sinyalleri ile olmaktadır. Bu uyarı sinyalleri iki ana grup altında toplanır. Birinci grup ölü ya da ölmekte olan hücrelerden salınan molekülleri kapsamaktadır. Bunlara "*alarmin*" adı verilmektedir. Diğer grup ise invaziv mikroorganizmaların molekül ya da moleküler örüntüleri içermektedir. Bunların

tamamına “*patojen ilişkili moleküler örüntüler*” (PAMP) adı verilmektedir (Medzhitov ve Janeway, 1997). Internal alarminler ve eksternal PAMP’lar, *hasar ilişkili moleküler örtüntüler* (Damage Associated Molecular Patterns, DAMP) olarak adlandırılır ve bunlar vücut savunma sistemi hücreleri tarafından tanınmaktadır (Tizard, 2009).

Çok hücreli organizmalarda bulunan doğal direnç en eski konak savunma sistemidir (Alberts ve ark., 2002). Organizmalarda vücut savunmasının hızlı yanıtı, kendi hücreleri ile patojenler arasındaki ayrımın hızına dayanmaktadır. Bu ayrım örüntü tanıma reseptörleri (Pattern Recognition Receptors, PRR) tarafından mikroorganizmaların hayati fonksiyonları için gerekli olan yapıları kapsayan PAMP’ların tanınmasıyla olmaktadır (Elgert, 2009). Mikroorganizmalar hızlıca çoğalmakta, kolayca mutasyon geçirebilmekte ve bu sayede enfekte bir hayvanın immun yanıt oluşturmaya kadar geçen süre içinde moleküler yapılarını değiştirebilmektedir. Bu nedenle de makrofajlar, dendritik hücreler ve mast hücreleri olası tüm mikrobiyal molekülleri tanımaktansa farklı mikroorganizmalarda bulunan PAMP’ları tanımaktadır. Örneğin invaziv bakterilerin çoğu birleşik karbonhidratlardan oluşan hücre duvarına sahiptir. Gram pozitif bakterilerde bu duvarlar peptidoglikanlar ve ayrıca lipoteikoik asitten oluşmaktadır. Gram negatif bakterilerin hücre duvarı, lipopolisakarit ile kaplı bir peptidoglikandan oluşmaktadır. Aside dirençli bakteriler ise glikolipidler ile kaplıdır. Mayaların mannan-zengin karbonhidrat duvarı bulunmaktadır (Tizard, 2009). PAMP’lar bu şekilde polisakaritler olabileceği gibi patojenin tek zincirli RNA’sı (single strand RNA, ssRNA), çift zincirli RNA’sı (double strand RNA, dsRNA) ya da Sitozin (C) çoklu Guanin (G) (CpolyG, CpG) adacıkları gibi nükleik asidiyle ilişkili örüntüler de olabilmektedir (Kaiser, 2010). Bu moleküllerin hiç biri normal bir hayvan hücresinin yapısında bulunmamaktadır.

Doğal direnç sistemi hücreleri; lenfositler, mast hücreleri, makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler, bazofil ve eozinofil granülositler, doğal öldürücü hücreler (Natural Killer, NK) ve gama/delta T hücreleri olarak sayılabilir. Bu hücrelere ek olarak epitel ve endotel hücreleri de doğal direnç hücreleri arasında yer almaktadır. Bu hücrelerden antijen sunabilen hücreler büyük doku uyuşum

kompleksi (Major Histocompatibility, MHC) ile uyarlanabilir bağışıklık sistemine antijen sunmaktadır (Kaiser, 2010).

Doğal direnç cevabı yıllarca özgün olmayan bariyer-bağışık yanıt olarak değerlendirilmiş ve kazanılmış bağışıklık ortaya çıkmadan önceki ilkel bağışıklık sisteminin filogenetik kalıntısı olduğu düşünülmüştür (Kaiser, 2010). Ancak artık doğal direncin belirli bir patojene özgü olmasa da, belirli patojen gruplarına özgün olduğu ve belirli bir patojen için doğal direncin kazanılmış bağışıklığı yönlendirerek uygun yanıtın ortaya çıkmasını sağladığı bilinmektedir. Omurgalılarda doğal direncin 4 önemli görevi bulunmaktadır;

- 1- Enfeksiyon ve yangı görülen bölgelere immun hücrelerin çağırılması,
- 2- Komplement kümesinin aktivasyonu ile bakterilerin belirlenmesi, hücrelerin aktive edilmesi ve ölü hücreler ya da antikör komplekslerinin temizlenmesi,
- 3- Dokularda ve organlarda bulunan yabancı bileşenlerin belirlenmesi ve özgün lökositlerce ortadan kaldırılması,
- 4- Antijen sunma olarak bilinen süreç ile uyarlamalı immun sistemin etkinleştirilmesidir.

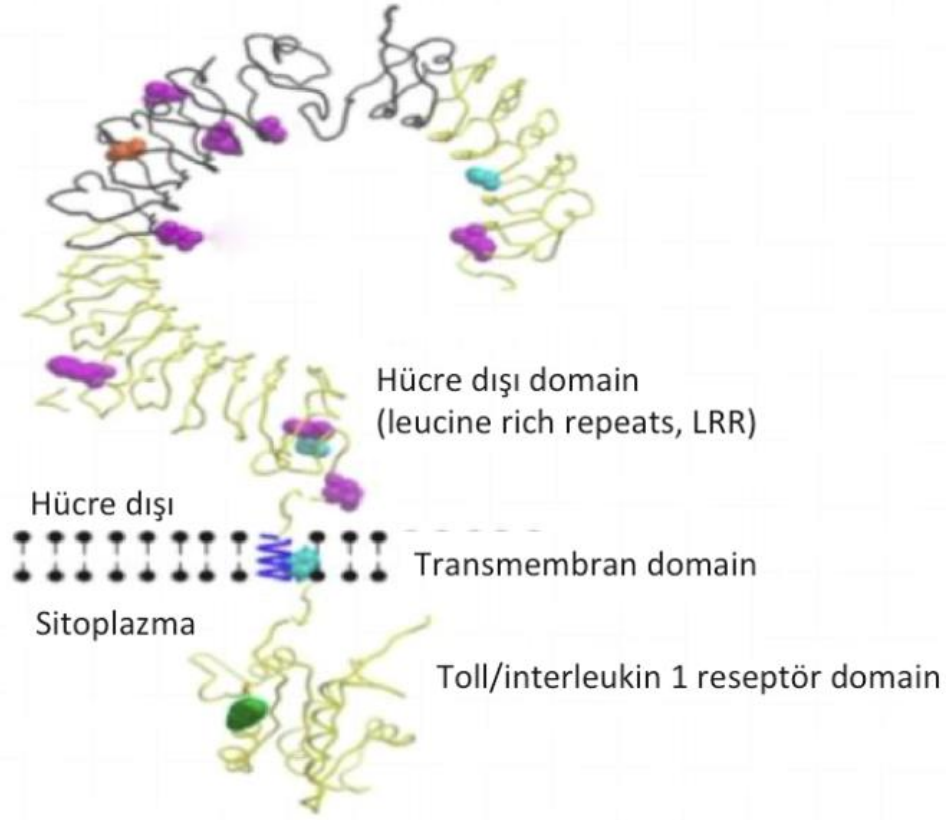
Doğal direncin humoral ve hücrel bileşenlerinin hepsi savunma görevlerinin yerine getirilmesi için gereklidir. Doğal direncin uyarılması ve mikrobiyal ya da vücudun kendi sinyallerinin tanınmasında görevli olan PRR'lerin Toll benzeri reseptörler (Toll Like Receptors, TLR), C-tipi Lektin Reseptörler (C-type Lectin Receptors, CLR), Retinoik Asit-Uyarımlı Gen (Retinoic Acid-Inducible, RIG)-I-benzeri reseptörler (RIG-I Like Receptors, RLR), NOD-benzeri reseptörler (NOD-like Receptors, NLR) olmak üzere 4 ailesi vardır. Bunlar içinde en fazla çalışılmış olan reseptörler Toll Benzeri Reseptörlerdir (Toll Like Reseptörler, TLR) (Akira ve ark., 2006).

1.2. Toll Benzeri Reseptörler (TLR)

TOLL terimi ilk olarak Drosophila larvalarında erken dönemde dorsal/ventral yönlendirmeyi sağlayan hücre yüzey reseptörlerini tanımlamak için kullanılmıştır (Stein ve ark., 1991). Alman bilim insanı Christiane Nüsslein-Volhard bu keşifi yaptığında "TOLL!" (Almanca "Harika!") diye bağırmıştır ve bu harika keşif ile

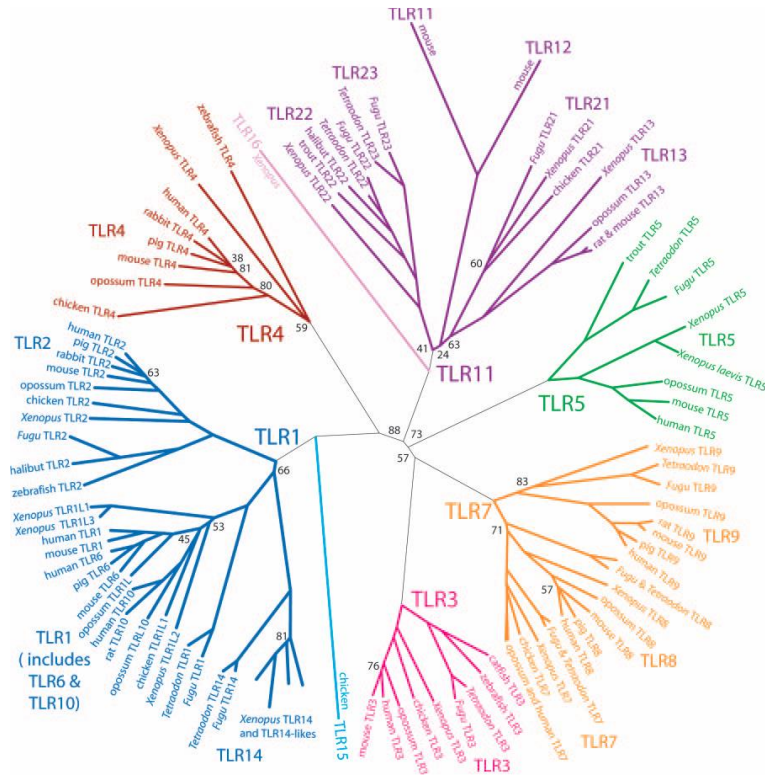
1995 yılı Nobel Ödülünü kazanmıştır. Bir kaç yıl sonra Toll proteinlerinin diğer mikrobiyal bileşenlerle birlikte mantar enfeksiyonlarına karşı savunmada da görev aldıkları belirlenmiştir (Lemiatre ve ark., 1996). Daha sonra memelilerde Toll reseptörlerinin homoloğu belirlenmiş ve Toll Benzeri Reseptörler “Toll like receptors, TLR” olarak adlandırılmıştır (Medzhitov ve Janeway, 1997).

TLR’lerin en etkileyici özelliği, tüm ökaryot hayvan hücrelerinde bu reseptörlerin varlığının belirlenmiş olmasıdır (Roach ve ark., 2005; Wiens ve ark., 2007). Bunun yanında antimikrobiyal savunmada görevli homolog reseptörlerin bitkilerde de buldukları belirlenmiştir (Zipfel ve Boller, 2004). Toll benzeri reseptörler, immun sistem hücrelerinde (Kokkinopoulos ve ark., 2005) ve epitel hücrelerinde (Abreu, 2010) plazma ya da endozomal membranlarda bulunan tip I transmembran proteinlerdir (Takeuchi ve Akira, 2001). TLR proteinleri üç ana domainden oluşmaktadır; ligandların tanınmasında görevli hücre dışı domain (extra cellular domain, ECD), sarmal yapıda transmembran domain (trans membran, TM) ve sitoplazmik sinyal domaini olan Toll/interleukin-1 reseptör domain (Toll/Interleukin-1 receptor, TIR) (Şekil 1.2). TIR domaini filogenetik süreçte korunmuş bir domaindir ve TLR’ler ile etkileşime geçerek doğal direnç sinyal kümesinin oluşmasında görevli olan adaptör proteinlerin de yapısında bulunmaktadır (O’Neill ve ark., 2003; O’Neill ve Bowie, 2007). Buna karşın patojen ligandlarının tanınmasında görevli olan ECD’de varyasyon seviyesi çok yüksektir. Varyasyon özellikle tür spesifik ligand özgünlüğünü sağlayan merkezi lösin aminoasitinden zengin tekrarlar içermektedir (leucine rich repeat, LRR) (Mikami ve ark., 2012). Patojenin tanınmasıyla birlikte hücre dışı ve içinde bulunan bu domainler bir araya gelir ve TLR’ler kendi aralarında ya heterodimer ya da homodimer oluştururlar (Jin ve ark., 2007; Kang ve ark., 2009; Yoon ve ark., 2012)



Şekil 1.2. Toll Like Reseptör domainlerinin yerleşimi (Smith ve ark., 2012).

Omurgalılarda ortak ataya sahip TLR'ler filogenetik olarak 6 aile altında toplanmıştır ve aynı aileden olan TLR'lerin benzer tanıma örüntülerine sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 1.3). Aynı dalda yer alan TLR'lerin en küçük numaralı olanı o dalda yer alan TLR ailesinin ismini oluşturmuştur. TLR1 ailesi TLR1, TLR2, TLR6, TLR10 ve TLR14'ü; TLR7 ailesi TLR7, TLR8 ve TLR9'u; TLR11 ailesi ise TLR11, TLR12, TLR13, TLR21, TLR22, TLR23'ü kapsamaktadır (Roach ve ark., 2005). TLR3, TLR4 ve TLR5 ise sadece kendi homologları ile aynı dalda yer aldığı için ayrı aileleri oluşturmuşlardır (Roach ve ark., 2005).



Şekil 1.3. Omurgalılarda TLR aileleri. Her aile farklı renk ile gösterilmiştir (Roach ve ark., 2005).

Memeli türlerinin 10-15 arası değişen sayıda TLR'ye sahip oldukları düşünülmektedir. İnsanda 11 ve farede 13 adet TLR (TLR1-13) belirlenmiştir (Tabeta ve ark., 2004; Andrade ve ark., 2013). Toll benzeri reseptörler 1, 2, 4, 5, 6 ve 10 hücre yüzeyine ekspresse edilen ve farklı bakteriyel ligandları tanımakla görevli olan proteinlerdir (Hopkins, 2005; Roach ve ark., 2005). TLR3, 7, 8 ve 9 ise endozomal reseptörlerdir ve öncelikli olarak nükleik asitler ve viral molekülleri tanımak için özelleşmiştir (Hopkins, 2005; Roach ve ark., 2005).

1.2.1 Toll Benzeri Reseptörler Ligand Tanıma Domaini (LRR Domain)

Toll benzeri reseptörlerin ligand tanıma domaini lösin amino asidince zengin (Leucine Rich Repeats, LRR) tekrarlar ile karakterizedir (Tauszig ve ark., 2000; Matsushima ve ark., 2007; Kawai ve Akira, 2010). LRR'ler hücrel görevleri ve yerleşimleri farklı olan 60.000 civarında proteinin ana yapısını oluşturmaktadır (Matsushima ve ark., 2007). Bu modüler yapı 20 ile 43 arasında değişen sayıda bileşik hidrofobik lösin amino asidi içermektedir (Offord ve ark., 2010). LRR'ler

beta-alfa saç tokası üniteleridir ve bir araya geldiklerinde at nalı benzeri bir yapı oluşturmaktadır (Matsushima ve ark., 2007). LRR'nin N-terminal ve C-terminal uçları sırasıyla LRRNT ve LRRCT olarak adlandırılmaktadır (Matsushima ve ark., 2007). LRRCT ve LRRNT, proteinin hidrofobik çekirdeğini korunmasını sağlayan disülfid köprüleri oluşturan sistein amino asidince zengin bölgelerdir (Kajava ve ark., 1995). LRR ailesi ile ilgili olarak yapılan çalışmalarla filogenetik koruma oranı yüksek olan 7 alt aile tanımlanmıştır. Bu tekrarların amino asit örüntülerinin iki tipi bulunmaktadır; bunlar sıklıkla görülen 11 rezidülü konsensüs dizisi LxxLxLxxNxL ya da daha az rastlanan 12 rezidü konsensüs dizisi LxxLxLxxCxxL olarak bilinmektedir. Bu dizilerde L lösin, valin, isolösine ve fenilalanin gibi hidrofobik amino asitleri, N asparjin, treonin, serine ya da sisteini, C asparjin, serine ya da sisteini X her hangi bir aminoasiti ifade etmektedir (Kobe ve Kajava, 2001; Matsushima ve ark., 2007). TLR içindeki LRR tekrar sayısı TLR'ye bağlı olarak 16-28 arasında değişmektedir (Matsushima ve ark., 2007). LRR çeşitliliği özellikle PAMP'lara bağlanmada önemli olan LRR10 ile LRR15 arasında şekillenmektedir (Zhou ve ark., 2007).

1.2.2. Toll Benzeri Reseptörler; Sitoplazmik Sinyal Domaini Toll/İnterleukin-1 Reseptör Domain (TIR Domain)

Toll benzeri reseptör hücre içi uzantısı, memeli interleukin-1 reseptör (IL-1R) ve *Drosophila* Toll proteini arasındaki homoloji ile tanımlanmıştır (Tauszig ve ark., 2000). Toll, IL-1R ve hücre içi sinyal adaptörlerinden MyD88 proteinlerinde bulunan 150 amino asitlik korunmuş bu bölge TIR domain olarak adlandırılmaktadır (Rock, 1998). LRR'lere ligandların bağlanması TIR domaine özgü adaptör proteinlerin bağlanmasını tetiklemektedir (O'Neill ve Bowie, 2007). TIR domain aynı zamanda TLR'lerin heterodimer ya da homodimer oluşturmasında da görev almaktadır (Barton ve Medzhitov, 2003). Bu protein ayrıca apoptotik ve mitojenik sinyal yolları için de önemlidir. TLR TIR domaini ve adaptör proteinlerin TIR domainleri bir araya geldiklerinde hücre içi sinyal yolları aktive olmaktadır (Takeda ve Akira, 2004).

1.3. Sığırlarda TLR Gen Ailesi

Sığır TLR genleri ve hastalıklara direnç ile ilgili olarak yapılan çalışmalar halen devam etmektedir (Behl ve ark., 2014; Osvaldova ve ark., 2014; Panigrahi ve ark., 2014; Sheldon, 2014; Swain ve ark., 2014; Vazquez ve ark., 2014; Wong ve ark., 2014). Bu türde TLR gen ailesinin 10 üyesi belirlenmiştir (Jungi ve ark., 2011). Sığır TLR genleri *bovineTLR* olarak adlandırılmaktadırlar ve boTLR1, boTLR2, boTLR3, boTLR4, boTLR5, boTLR6, boTLR7, boTLR8, boTLR9 ve boTLR10 olarak kısaltılmaktadır. McGuire ve ark. (2006) radyasyon hibrit (RH) paneli ile TLR genlerinin genomik organizasyonunun insan ve fare ile benzer olduğu ortaya koymuştur. RH paneline göre, boTLR1, boTLR6 ve boTLR10 sığır 6. Kromozomu (BTA6) üzerinde bulunup, yaklaşık 50 kilo baz (kb)'lık bir gen kümesi oluşturmaktadırlar. BoTLR2, boTLR3, boTLR4, boTLR5 ve boTLR9 sırasıyla BTA17, BTA27, BTA8, BTA16 ve BTA22 üzerinde yer almakta ve 3kb-20kb arası değişen büyüklükte dirler. BoTLR7 ve boTLR8 ise X kromozomu üzerinde bulunmaktadır (McGuire ve ark., 2006). Menzies ve Ingham (2006) sığır TLR genlerinin koyunlarla homolog olduğunu bildirmiştir.

1.3.1. TLR1 Ailesi

TLR1 ailesi boTLR1, boTLR2, boTLR6 ve boTLR10 genlerini kapsamaktadır. TLR1-TLR6 ve TLR10 aynı kromozom üzerinde bulunup bir gen kümesi oluşturmaktadırlar (Opsal ve ark., 2006). Beutler ve Rehli (2002), omurgalılarda korunmuş TIR domain üzerindeki çalışmalarına göre, atasal genden TLR10'un 300 milyon yıl önce, TLR6 ve TLR1'in ise 130 milyon yıl önce meydana gelen bir duplikasyon ile ayrıldıkları ve bu gen kümesini oluşturdukları belirlenmiştir. TLR1 ailesi lipopeptid özellikteki PAMP'ları tanımak için özelleşmiştir. Diğer TLR aileleri gibi güçlü bir seleksiyon baskısı altında evrim geçirmiştir ancak diğer TLR ailelerine kıyasla daha fazla türe özgü adaptasyona sahiptir (Roach ve ark., 2005).

TLR1 ailesi heterodimerik reseptörler olarak fonksiyon göstermektedir (Roach ve ark., 2005). TLR2, ailenin diğer üyeleri (TLR1 ve TLR6) ile heterodimerleşerek PAMP yelpazesini genişletmektedir (Ozinsky ve ark., 2000; Hajjar ve ark., 2001). Gram pozitif bakteriler, immun yanıtı lipopolisakkaritlere (LPS) benzer şekilde

uyarmaktadır (Werling ve Jungi, 2003). Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı peptidoglikana (PGN) gömülü bir şekilde lipoproteinler ve lipoteikhoik asit (LTA) içermektedir. TLR2 yetersizliği olan farelerde ve üretilmiş hücre hatlarında TLR2'nin PGN'a, ve *Mycoplasma* Makrofaj Etkinleştirici Lipopeptid-2 (MALP-2)'ye karşı (Takeuchi ve ark., 1999; Takeuchi ve ark., 2000; Takeuchi, 2001) ve *Mycobacterium tuberculosis* hücre duvarı ana glikolipidi olan lipoarabinomannan'a karşı olan immun yanıtta temel bileşen olduğu bildirilmiştir (Jones ve ark., 2001). Bunun yanında TLR2'nin TLR1 ya da TLR6 ile oluşturduğu heterodimerlerin bakteri, *Mycoplasma* sp., mantar ve virüslerin farklı yapıtaşlarını tanıyabildiği bildirilmiştir. TLR1/TLR2 ve TLR6/TLR2 kompleksleri sırasıyla *Mycoplasma* sp. triasil ve diasil lipoproteinleri tanıyabilmektedir (Ozinskyve ark., 2000; Alexopoulou ve ark., 2001; Morr ve ark., 2002). İnsanlarda yapılan çalışmalar, TLR10'un TLR2 ile dimerleşerek triasil lipoproteinleri tanıyabildiğini göstermiştir (Çizelge 1.1) (Guan ve ark, 2010).

1.3.2. TLR4 Ailesi

Gram-negatif bakterilerin LPS yani endotoksinlerini, *Mycobacterium tuberculosis*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* *Candida albicans* gibi önemli bakteri ve mantarların hücre duvarı yapı taşlarını ve ısı şok proteinleri (heat shock proteins, HSP), fibrinojen gibi hücrel stres faktörlerini tanımada özelleşmiş olan TLR'dir (Lien ve Ingalls, 2002) (Çizelge 1.1). LPS'lerin tanınması TLR4'ün CD14 ve MD2 ile etkileşerek LPS-reseptör kompleksini oluşturmasıyla olmaktadır (Lizundia ve ark., 2008). Sığır türlerinde TLR4'ün polimorfik olduğu ve mastit ilişkili olduğu belirlenmiştir (De Mesquita ve ark., 2012). LPS duyarlı fare hatlarında (C3H/HcJ) TLR4 proteininde prolin amino asidinden histidin amino asidine dönüşüm olduğu belirlenmiş ve bu çalışma ile LPS yanıtında TLR4'ün önemi ortaya konmuştur (Poltorak ve ark., 1998; Qureshi ve ark., 1999). TLR4'ün kendinden ve kendinden olmayan ligandları ayırabildiği bildirilmiştir. Ancak bu ayırımında da CD14-TLR4-MD-2 kompleksinin aktif olup olmadığı bilinmemektedir (Underhill ve Ozinsky, 2002). İnsanlarda TLR4'ün solunum sinsityal virüs (respiratory syncytial virus, RSV) enfeksiyonlarında aktif olduğu bildirilmişken, (Kurt-Jones ve ark., 2000)

sığırlarda RSV enfeksiyonunda TLR4 etkinliği gözlenmemiştir (Lizundia ve ark., 2008).

Çizelge 1.1. TLR2, TLR2/1 TLR4 ve TLR2/6'nın bilinen ligandları ve hücre içi adaptör proteinleri

TLR	Ligand	Adaptör protein
TLR2	Peptidoglikanlar; Lipoproteinler; Lipoteikoik asit; (Gram-pozitif bakteriler) Lipoarabinomannan (Mikobakteriler) Hemaglutinin proteini (Kızamık virüsü) Fosfopolimannan; Glikoruksonil mannan; zimosan; β - glucan (Mantar) tGPI*-mutin (Tripanozoma)	TIRAP ve MyD88
TLR2/1	Triasil lipopeptit (Gram-negatif Bakteri ve mikoplasma)	
TLR2/6	Diasil lipopeptit; Lipoteikoik asit (Mikoplasma, Gram-pozitif bakteri; B grup Strep) Zimosan (<i>S. cerevisiae</i>)	
TLR4	Lipopolisakkarit (Gram (-) bakteriler)	TIRAP, MyD88, TRAM, TRIF

1.3.3. İncelenen TLR Gen Bölgelerinin Genomik Organizasyonu ve Protein Yapısı

Yeni nesil sekans (YNS) ve array-temelli yöntemler ile farklı tip, büyüklük ve yüksek çözünürlükte genomik veriler elde edilebilmektedir. Erişime açık olan veri tabanlarından UCSC sığır türüne ait 6 tane genom versiyonu bulunmaktadır. Bunlar ilan ediliş sırasına göre, Baylor 2.0 (bosTau2), Baylor 3.1 (bosTau3), Baylor 4.0 (bosTau4), *Bos Taurus* UMD3.1 (bosTau6), Baylor Btau 4.6.1 (bosTau7) ve *Bos Taurus* UMD3.1.1 (bosTau8) olarak adlandırılmaktadır (Kent ve ark., 2002). Bunlardan Ensembl ve UCSC veri tabanlarında bulunan sırasıyla UMD3.1 ve *Bos taurus* 4.6.1 güncellenmektedir. UMD3.1/bosTau6 genomu 2.67 milyon baz çiftinden oluşmaktadır (Zimin ve ark., 2009), genomda 19,994 kodlanan, 3,825 kodlanmayan ve 797 pseudo gen bulunmaktadır ve 95,297,241 kısa varyant, 2,581 yapısal varyant tanımlanmıştır (Cunningham ve ark., 2015). *Bos taurus*

4.6.1/bosTau7 Hereford ırkı dişi ve erkek sığırın havuzlanmış tüm genom dizisidir ve 2,98 milyon baz çiftinden oluşmaktadır (Kent ve ark., 2002).

TLR'ler genellikle birkaç adet küçük transle olmayan ekzon ile transle olan bir büyük ekzona sahiptir (Opsal ve ark., 2006). TLR2 gen bölgesi sığırın 17. kromozomunda yer almaktadır ve 13kb büyüklükte protein kodlayan bir gendir (Gene ID: 281534, ENSBTAG00000008008) (Kent ve ark., 2002; Cunningham ve ark., 2015). TLR2 geninin 2 ekzonu bulunmakta ve ters zincirden transkribe olmaktadır bu genden transkribe olan protein 784 amino asitten (aa) oluşmakta, proteinde 19 adet LRR bulunmaktadır (Çizelge 1.3). TLR4 geni 8. kromozomda yer alır ve 11kb büyüklüğündedir (Gene ID: 281536, ENSBTAG00000006240) (Cunningham ve ark., 2015). TLR4 geni anlamlı zincirden transkribe olmaktadır ve TLR ailesinin diğer üyelerinden farklı olarak kodlanan iki küçük ve bir büyük ekzona sahiptir. TLR4 proteini 841aa'ten oluşmakta, proteinde 16 adet LRR bulunmaktadır (Çizelge 1.3). TLR6 ise 6. kromozomda yer almaktadır, 19kb büyüklükte bir gendir (Gene ID: 407237, ENSBTAG00000014031) (Cunningham ve ark., 2015). TLR6'nın 4 ekzonu bulunmaktadır. Ters zincirden transkribe olan TLR6 geninde üretilen protein 793aa'ten oluşmakta ve bu proteinde 19 adet LRR bulunmaktadır (Çizelge 1.3). Bu gen bölgesi aynı zamanda TLR1'in transkribe olan büyük ekzonunu içermektedir. TLR1 proteininin kısa ve uzun olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Uzun TLR1 (TLR1-fl) (Gene ID: 574090), aktif olan ve TLR2 ile heterodimer yapan formudur (Farhat ve ark., 2010). TLR1-fl proteini 727aa'ten oluşmaktadır. Genom versiyonları ve genlerin bu versiyonlara göre farklılık gösteren yerleşim aralığı bilgisi Çizelge 1.2'de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Genom versiyonlarına göre incelenen gen bölgelerinin yerleşim aralığı

Gen ve Chr	Genom versiyonu	Yerleşim aralığı	Kaynak
TLR2	UMD3.1	3.949.710-3.963.032	(Cunningham ve ark., 2015)
Chr17	UMD3.1	3.949.870-3.963.092	(Kent ve ark., 2002)
	<i>Bos taurus</i> 4.6.1	4,298,805-4,312,030	(Kent ve ark., 2002)
TLR4	UMD3.1	108.828.899-108.839.910	(Cunningham ve ark., 2015)
Chr8	UMD3.1	108.828.899-108.839.911	(Kent ve ark., 2002)
	<i>Bos taurus</i> 4.6.1	112.326.488-112.337.501	(Kent ve ark., 2002)
TLR6	UMD3.1	59.687.276-59.706.713	(Cunningham ve ark., 2015)
Chr6	UMD3.1	59.686.794-59.720.509	(Kent ve ark., 2002)
	<i>Bos taurus</i> 4.6.1	60.270.042-60.303.896	(Kent ve ark., 2002)

Çizelge 1.3. TLR2, TLR4 ve TLR6 proteinlerinin domain bilgileri

Domain	TLR2 (aa)	TLR4 (aa)	TLR6 (aa)
LRR1	54..77	55..76	54..77
LRR2	78..101	79..100	78..101
LRR3	102..125	103..124	102..122
LRR4	126..150	127..148	123..147
LRR5	151..175	151..172	148..168
LRR6	176..199	176..197	169..196
LRR7	200..223	205..225	197..219
LRR8	224..250	352..373	220..250
LRR9	251..278	374..394	251..277
LRR10	279..308	400..422	278..303
LRR11	309..337	423..444	304..330
LRR12	338..361	448..469	331..354
LRR13	362..388	472..495	355..378
LRR14	389..414	497..518	379..404
LRR15	415..437	521..542	405..428
LRR16	438..457	545..568	429..449
LRR17	458..478	-	450..473
LRR18	479..500	-	474..495
LRR19	501..524	-	496..519
LRRCT	533..586	579..626	529..582
Trans membran	588..608	633..653	585..605
TIR	640..784	677..815	641..784

1.4. İncelenen Sığır Irkları

Yerli ırklar önemli genetik kaynaklar olarak düşünülse de ekonomik ve tarımsal taleplerdeki değişikliklerden dolayı yok olma tehlikesi altındadırlar (Taberlet ve ark., 2008). Bu ırklar kültür ırklarında olduğu gibi yapay seleksiyon baskısı altında olmadıkları için genetik çeşitliliklerini koruyabilmişlerdir (Medugorac ve ark., 2009). Doktora tez materyali, hastalıklara dirençli olduğu bilinen (Soysal ve ark., 2004; TURKHAYGEN-I) Türkiye yerli sığır ırklarından; Yerli Kara (YK), Güney Anadolu Kırmızısı (GAK), Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK) ve Boz (BOZ) sığır ırkları ile hastalıklara daha duyarlı olduğu bilinen kültür ırklarından Holştayn (HOL) sığır ırklarından oluşmaktadır. Bu sığır ırklarından YK, DAK ve GAK *Bos taurus brachyceros* BOZ ve HOL sığır ırkları ise *Bos taurus primigenus* kökenlidir (Alpan ve Arpacık, 1996).

1.4.1. Yerli Kara Sığır Irkı

Yerli Kara (YK) sığır ırkı, yerli sığır ırkları arasında yayılma alanı en geniş olan ırktır (Alpan ve Arpacık, 1996). Yetiştirildiği yöreye bağlı olarak vücut büyüklükleri değişiklik göstermektedir, örneğin Ankara ve Çankırı'da yetiştirilen Yerli Kara'lar Afyon ve Kütahya civarında yetiştirilenlere göre daha ufak yapıdadırlar (Alpan ve Arpacık, 1996). Adında da belirtildiği gibi don rengi siyahtır (Alpan ve Arpacık, 1996; Mason, 1996) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Yerli Kara sığır (TURKHAYGEN)

İlkel sığırlarda olduğu gibi verim ile ilgili karakterleri zayıftır ancak farklı iklimlere kolaylıkla adapte olabilen, yetersiz beslenmeye dayanıklı ve hastalıklara karşı dirençlidir (Soysal ve ark., 2004). Ankara ilinde, Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü'nde koruma sürüsü bulunmaktadır.

1.4.2. Güney Anadolu Kırmızısı Sığırırkı

Güney Anadolu Kırmızısı (GAK) sığırırkının yayılma alanı Toros Dağlarının güneyinde kalan Akdeniz Bölgesi ve Güney Doğu Anadolu Bölgesidir. Sadece Türkiye'nin değil, Suriye, Lübnan, Irak, Ürdün ve İsrail'in de yerli ırkı olarak bilinmektedir (Alpan ve Arpacık, 1996). Yetiştirildikleri yöreye göre Kilis Sığırırkı (Gaziantep), Şam Sığırırkı (Şam) ve Beyrut Sığırırkı (Lübnan) gibi varyeteleri bulunmaktadır (Alpan ve Arpacık, 1996). En çok görülen don rengi tarçındır (Şekil 1.5). En belirgin fiziksel özelliği sağrı yüksekliğinin cidago yüksekliğinden fazla olmasıdır.



Şekil 1.5. Güney Anadolu Kırmızısı Sığırırkı (TURKHAYGEN)

Sıcak iklim koşullarına karşı dayanıklı, kene kaynaklı parazitlere ve hastalıklara karşı doğal dirençli olduğu bilinen bir sığırırkıdır (Orman ve ark., 2005). Yerli ırklar arasında süt verimi en yüksek olan ırktır (Alpan ve Arpacık, 1996; Orman ve ark., 2005; Yılmaz ve ark., 2012).

1.4.3. Doğu Anadolu Kırmızısı Sığırırkı

Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK) sığırırkı, Kafkasya'dan köken alan (Mason, 1996) ve Doğu Anadolu'da yetiştirilen, bu yörenin soğuk iklimine dirençli, dağlık alanların yetersiz besinlerine adapte olmuş bir ırktır (Özdemir ve Doğru, 2009). Yerli Kara ırkından sonra Türkiye'de yayılma alanı en geniş olan ikinci ırktır (Alpan ve Arpacık, 1996; Yılmaz ve ark., 2012). DAK ırkında renk, açık kırmızıdan koyu kestane rengine kadar değişir, boynuzlar kısa ve öne doğrudur (Alpan ve Arpacık, 1996; Özdemir ve Doğru, 2009). Bedene ait en belirgin özelliği göğüs bölgesinin dar olmasıdır (Alpan ve Arpacık, 1996) (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Doğu Anadolu Kırmızısı Sığırırkı (TURKHAYGEN)

Erzurum ilinde, Doğu Anadolu Kırmızısı Bölgesel Araştırma Enstitüsünde koruma sürüsü bulunmaktadır. Bu ırk özellikle et verimi yönünde yetiştirilmektedir ve yerli ırklar ile karşılaştırıldığında et verim oranı en yüksek olan ırktır. Yaşlı erkekler besiye alındığında günlük ortalama 700 gr ağırlık artışı sağlarlar ve karkas randımanı %53'tür (Alpan ve Arpacık, 1996). Hastalıklar açısından incelendiğinde yaşlı hayvanların özellikle şap gibi viral salgın hastalıklara karşı dirençli olduğu ırkın tescil belgesinde belirtilmiştir (Soysal ve ark. 2004).

kodu ile), YNS cihazına örnekler yüklenirken kullanılan kimlik bilgisi (@ID kodu ile), sekans datasının elde edildiği platform (@PL kodu ile) ve örneğin yüklendiği havuz bilgisi (@SM kodu ile) belirtilmektedir.

Hizalama bölümü ise sorgulanan kalıbın adı (QNAME kodu), bit değerine göre okumaların kombinasyonu (FLAG kodu), hizalamada kullanılan referans sekans adı (RNAME kodu), ilk eşleşen bazın pozisyonu (POS kodu), logaritma 10 ($10\log_{10}$) tabanına göre en yakın tam sayıya değer ataması yapılarak elde edilen haritalama kalitesi (MAPQ kodu), kalıpta sonra gelen sekansın birincil hizalamasının ismi (RNEXT), kalıpta sonra gelen eş okumanın pozisyonu (PNEXT), gözlenen kalıp okuma uzunluğu (TLEN), okuma sekansının bulunduğu bölüm (SEQ), baz kalitesinin belirtildiği bölüm (QUAL) ve CIGAR değeri olmak üzere 11 değişkenden oluşmaktadır (The SAM/BAM Format Specification Working Group, 2015)

QNAME, RNAME, CIGAR, RNEXT değerleri "*", PNEXT, değerleri "0" ile belirtilmişse, ilgili kod açısından bilginin olmadığı anlamına gelmektedir. Bilgi olmadığı durumda sonraki aşamadaki değerler hesaplanamamaktadır. TLEN değerinin 0 olması bu bölge için ileri ya da geri yönlü okumalardan birinin olmadığını göstermektedir. RNEXT için "=" değeri ise RNEXT'in RNAME ile aynı olduğunu belirtmektedir. TLEN tüm okumaların aynı referans diziye hizalandığı durumda işaretlenmemiş gözlenen kalıp uzunluğu soldan ve sağdan hizalanan son bazlar arasındaki mesafeye eşit olması gerekir. FLAG değerleri bilgisayar ve dijital iletişim dilinde "basic unit of information" anlamına gelen Bit değeri cinsinden ifade edilmektedir (Çizelge 1.4). Cigar değeri harfler ile belirtilmektedir (Çizelge 1.5).

Çizelge 1.4. FLAG değerleri ve yorumlanması

Bit değeri	Tanımı
1	0x1 Sekanslanan kalıp sekansta birden çok bölüme sahip
2	0x2 Her segment hizalayıcıya göre düzgün bir şekilde hizalanmış
4	0x4 ⁺ Segment haritalanmamış
8	0x8 Kalıptaki sonra gelen segment haritalanmamış
16	0x10 Sekansın reverse complementi alınmış
32	0x20 Kalıpta sonra gelen sekansın reverse complementi alınmış
64	0x40 Kalıptaki ilk segment
128	0x80 Kalıptaki son segment
256	0x100 İkincil hizalama
512	0x200 Kalite kontrollerini geçemeyen okuma
1024	0x400 PZR ya da okumaya bağlı duplikate
2048	0x800 Tamamlayıcı hizalama
	0x900 == 0 Birincil okuma

⁺ Bit 0x4 okumanın haritalanma bilgisini içerdiği için bu değer olmadığı durumlarda RNAME, POS, CIGAR, MAPQ değerleri için bir varsayım yapılamamaktadır.

Çizelge 1.5. CIGAR değerleri ve yorumlanması

İşlem	BAM	Tanımı
M	0	Hizalama uygundur (Sekans hizalama değeri uygun ya da yanlış olabilmektedir.)
I	1	Referans diziden farklı olarak bir insersiyon olduğunu göstermektedir.
D	2	Referans diziden farklı olarak bir delesyon olduğunu göstermektedir.
N+	3	Referans dizide atlanan bir okuma olduğunu göstermektedir.
S+	4	Soft clipping (SEQ dosyasına göre okumanın kısaltılmasıdır.)
H+	5	Hard clipping (SEQ dosyasında yoksa bu okumanın çıkartılmasıdır.)
P	6	Padding (silent deletion from padded reference)
=	7	Referans sekansa uygunluğu belirtir.
X	8	Referans sekansa yanlış eşleşmeyi belirtir.

⁺ H değeri ilk ve/veya son işlemde verilmektedir. S, H işlemleri arasında değer almaktadır ve CIGAR dizisinin uçlarındadır. mRNA datası dışında N değeri tanımlanmamaktadır, mRNA datasında bu değer intronları belirtmektedir. M/I/S/=/X değerler toplamı SEQ uzunluğuna eşit olmak durumundadır.

1.5.2. BAM (Binary Alignment/Map) Dosya Formatı

BAM dosyası, SAM formatının ikili değer koduna dönüştürülmüş halidir. Temelde aynı dataları içermektedir ve *.sam* dosyasının *.bam* formatına dönüştürülmesi ile bilgisayarda kapladığı alan küçülmektedir (The SAM/BAM Format Specification Working Group, 2015).

1.5.3. VCF (Variant Call Format) Dosya Formatı

YNS analizlerinin ana kullanım amaçlarından biri de popülasyonlarda ve bireylerdeki varyasyonların keşfedilmesidir. Danecek ve ark. (2011) VCF dosya formatını oluşturmuşlardır. Bu dosya tipi ile SNV, insersiyon, delesyon ve yapısal varyantları anotasyon ile birlikte verilebilmektedir (Danecek ve ark., 2011). Bu dosya formatı ilk olarak insan genomundaki varyasyonların gösterilebilmesi için oluşturulmuştur ancak haploid genomlar için de kullanılabilir.

1.5.4. Bütünleştirici Genomik Görüntüleme (Integrative Genomics Viewer, IGV)

YNS dataları, genel olarak büyük datalar olduğundan analizin ana bölümü bilgisayarlar tarafından otomatik şekilde yapılmaktadır ve araştırıcıların bireysel olarak yorumlaması ve karar vermesine açık değildir. Ancak olan bu analizler sonucu elde edilen data hakkında fikir sahibi olmak ve karmaşık biyolojik ilişkilerin kurulabilmesi için görsel veriler ile desteklenmesi gerekmektedir (Thorvaldsdottir ve ark., 2013). YNS datalarının görselleştirilmesinde Tablet (Milne ve ark., 2010), BamView (Carver ve ark., 2010), Savant (Fiume ve ark., 2010) ve Artemis (Rutherford ve ark., 2000) IGV gibi farklı yazılımlar da bulunmaktadır.

Bütünleştirici Genomik Görüntüleme yazılımı, kullanıcı ara yüzü olan ve Windows, Mac ve Linux işletim sistemleri ile uyumlu olarak çalışan bir yazılımdır. IGV kullanıcılara gerçek zamanlı olarak genom verisinde referans genom eşliğinde baz düzeyinde incelemeye olanak sağlamaktadır. YNS, ekspresyon ve kopya sayısı değişimleri gibi array-temelli platformlardan elde edilen datalar incelenebilmektedir. IGV, Kanser Genom Atlası (The Cancer Genome Atlas, TCGA) projesinde kopya sayısı değişimi, ekspresyon, mutasyon ve klinik dataların bütünleştirilmesi ve

görselleştirilmesi amacıyla geliştirilmiştir (Thorvaldsdottir ve ark., 2013). 1000 Genom Projesi ile yapılan işbirliği IGV'nin SAM ve BAM hizalama formatının geliştirilmesini sağlamıştır (Li ve ark., 2009). Ardından yine 1000 genom projesi VCF (Variant Calling Format) dosya formatının görselleştirilmesini sağlamıştır (Thorvaldsdottir ve ark., 2013). IGV indekslenmiş (.bam, .goby), indekslenmemiş (.gff, .bed) ve farklı çözünürlükte (Multiresolution) (.tdf) dosyaları desteklemektedir (Thorvaldsdottir ve ark., 2013). IGV data sağlayıcısında farklı türlere ait genom ve anotasyon bulunmaktadır.

IGV, YNS datasında okumaları farklı renklerde gösterebilmektedir. Örneğin, kromozomlar arası yeniden düzenlenmeler (chromosomal rearrangements), eş okuması başka kromozoma hizalanmış olan okumalar (mate sequence) farklı renklerde, o kromozoma ya da bölgeye ait olan okumalar ise gri renk ile gösterilmektedir. Varyasyon datası (VCF) da IGV ile incelenebilmektedir. Her örneğin genotip bilgisini görselleştirebilmektedir. Pedigri ve aile anotasyonları bu dosyada yer alabilmektedir ve bunlara göre grupları düzenleyip filtreleme imkanı sunmaktadır (Thorvaldsdottir ve ark., 2013).

1.5.5. SAM Tools ve BAM Tools

SAM tools, C komut sisteminde çalışan *.sam* formatındaki hizalama dosya içeriğinin düzenlenmesi, aynı bireye ait farklı dosyaların birleştirilmesi, indekslenmesi ve pozisyona göre hizalamaların elde edilmesi işlemlerinde kullanılmaktadır (Li, 2011). BAM Tools ise bu işlemleri *.bam* dosyalarını okuma, yazma ve işleme için kullanılmaktadır. Bu yazılım C++ program uygulama ara yüzü (Application programming interface, API, C++ API) ve komut sistemi üzerinden çalışmaktadır. C++ API ile çalışan Bam Tools API, komut sistemi ile çalışan Bam Toolkit olarak adlandırılmaktadır (The SAM/BAM Format Specification Working Group, 2015).

1.5.6. Picard Tools

Picard Tools Java komut sistemi üzerinden çalışan yüksek çözünürlüklü data ve bu dataları içeren formatların analizinde kullanılmaktadır (Picard). YNS datalarının referans genoma göre yeniden düzenlenmesi, her okuma ve bu okumaların eşlerinin belirlenmesinde ve duplike okumaların işaretlenmesinde Picard Tools kullanılmaktadır.

1.5.7. Genome Analysis Tool Kit (GATK)

GATK Broad Enstitüsü tarafından Java komut sistemi üzerinden çalışan yüksek çözünürlüklü dataların analizi için geliştirilmiş bir yazılımdır. Özellikle varyantların belirleme ve örneklerin genotiplendirme işlemlerinde kullanılmaktadır ayrıca data kalitesi kontrolleri de bu yazılım ile yapılabilmektedir. YNS data analizlerinde en büyük sorunlardan biri de bilgisayar ortamında geçen işlem zamanıdır. GATK büyük gen bölgelerinin YNS analizinin bireysel bilgisayarlarda yapılabilmesine imkan vermektedir (McKenna ve ark., 2010).

1.5.8. Shapeit ve Phase

Shapeit genotip ya da sekans dosyalarında SNP'lerden iyileştirilmiş haplotiplerin linear komplekslerin oluşturulması, genom boyu ilişkilendirme çalışmalarında kromzomlarda 'phase' işleminin yapılması gibi uygulamalarda kullanılabilen, komut sistemi ile çalışan bir yazılımdır (Delaneau ve ark., 2013). Phase ise, popülasyon genotip datasından elde edilen haplotiplerin Bayesian istatistiksel metodu ile yeniden oluşturulmasını sağlamaktadır. Haplotiplerin gruplandırılması, bireyler arasında paylaşılan haplotiplerin belirlenmesi işlemlerinde kullanılmaktadır (Stephens ve Donnelly, 2003).

1.5.9. SnpSift ve SnpEff

SnpSift ve SnpEff varyant anotasyonu, varyantların etkisini tahmin etmeyi ve filtrelenen varyantların .vcf dosyasından uzaklaştırılması gibi işlemleri komut sistemi üzerinden sağlayan bir yazılımdır (Cingolani ve ark., 2012a; Cingolani ve ark., 2012b). Bu yazılımın farklı organizmaların genomlarına ait varyant veri tabanı bulunmaktadır.

1.5.10. Ensembl Varyant Etki Tahmin Edicisi

Ensembl veri tabanında bulunan referans genomlara göre varyant etkisini tahmin etme ve belirlenen varyantların anotasyonu işlemlerini yapabilen Varyant Etki Tahmin Edici (Variant Effect Predictor, VEP) bir ara yüzü bulunmaktadır. Varyasyonlar etki derecesi, fonksiyon etkisine göre sınıflandırılmaktadır. Etki derecesi ölçülürken düşük, orta ve modifiye edici olarak, fonksiyon ölçülürken de yanlış anlam ve sessiz varyasyonlar olarak ayrılmaktadır.

1.5.11. Network Programı

Network programı, evrimsel analiz ağaçlarının oluşturulmasında kullanılmaktadır. Bu program DNA nükleotit datası, binary kod dosyası, amino asit verisi, enzim kesimi verisi, y kromozomal ve otozomal mikrosatelit verileri ve nükleotit, STR, enzim kesimi verilerini birlikte içeren dosyalar ile çalışma imkanı sağlamaktadır. Network programı altında bulunan merkez birleştirme (Median Joining, MJ) ise tür içindeki filogenilerin ortaya konmasında kullanılmaktadır (Bandelt, 1999).

Türkiye yerli sığır ırkları hastalıklara karşı dirençli olduğu bilinse bile bunun altında yatan genetik mekanizmaya dair yapılmış bir çalışmada bulunmamaktadır ve TLR'ler doğal dirençte görev alan anahtar moleküllerdir. TLR2, TLR4 ve TLR6 gen bölgeleri özellikle bakteriyel enfeksiyonlara karşı dirençte görev almaktadır. Bu gen bölgelerinde hastalıklara karşı dirençli olan yerli ırklar ve hastalıklara karşı duyarlı olan kültür ırklar arasında karşılaştırılması ve farklı varyantların belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada dirençli olduğu bilinen yerli sığır ırklarından Yerli Kara (n=20), Güney Anadolu Kırmızısı (n=20), Doğu Anadolu Kırmızısı (n=20) ve Boz (n=10) ırkı ile hastalıklara duyarlı olduğu bilinen kültür ırkı sığırlardan Holştayn (n=10) sığır ırkı kullanılmıştır. Gruplardaki örnek sayısı belirlenirken önceki yıllarda yapılan benzer çalışmalar değerlendirilmiş ve örnek alınmıştır (Fisher ve ark., 2010; Seabury ve ark., 2010). Kullanılan Türkiye'ye özgü yerli ırk materyalleri ECONOGENE projesi kapsamında, akrabalık olmamasına ve ırk özelliklerini temsil etmelerine dikkat edilerek toplanmıştır. Holştayn sığır ırkından bir bireyin şüpheli pedigri nedeniyle analizden çıkartılmasına karar verilmiş ve bu ırk için 9 örnek çalışılmıştır.

Türkiye yerli sığır ırkları hastalıklara karşı dirençli olduğu bilinse bile bunun altında yatan genetik mekanizmaya dair yapılmış bir çalışmada bulunmamaktadır ve TLR'ler doğal dirençte görev alan anahtar moleküllerdir. TLR2, TLR4 ve TLR6 gen bölgeleri özellikle bakteriyel enfeksiyonlara karşı dirençte görev almaktadır. Bu ırklarda TLR2, TLR4, TLR6 tüm gen bölgelerindeki varyasyonların belirlenmesi, dirençli ve duyarlı ırklar arasında farklılık varsa ortaya konulması, farklılıkların ortaya konması, ırklara özgü haplotiplerin belirlenmesi ve direnç/duyarlılıkla ilişkili aday varyasyonların ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaçla hayvanlardan alınan kanlarda sırasıyla DNA izolasyonu ve gen bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile yükseltgenmesi yapılmış ardından hizmet alımı yolu ile yeni nesil sekans analizi ile gen dizileri elde edilmiştir. Yeni nesil sekans analizleri ile ilgili olarak farklı platformlar bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında Illumina MiSeq Yeni Nesil Sekans Analiz Platformu kullanılmıştır. İncelenen TLR2, TLR4 ve TLR6 gen bölgeleri sırasıyla 13kb, 11kb ve 19kb büyüklüktedir. Bu gen bölgelerindeki tüm varyasyonların ekonomik olarak yüksek kaplam derecesiyle belirlenebilmesi için tezde yeni nesil sekans yöntemi tercih edilmiş ve böylece incelenen gen bölgelerinde güvenilirliği yüksek datalar elde edilmesi hedeflenmiştir. Ardından elde edilen verilerin analizi biyoinformatik yazılımlar kullanılarak yapılmıştır.

2.1. DNA Ekstraksiyonu, DNA Yoğunluğu, Saflığı ve Bütünlüğünün Kontrolü

Kan örneklerinden DNA ekstraksiyonu ticari kit kullanılarak, tüm aşamalar kit protokolüne göre yapılmıştır (*Qiagen, Blood and Tissue DNA extraction kit, Hilden, Germany*). DNA yoğunluğunun ve saflığının kontrolü spektrofotometrik cihaz ile (*Nanodrop C1000, Thermo*) ölçülmüştür. DNA bütünlüğünün kontrolü için DNA'lar 100 Volt elektrik akımı altında Tris Borik Asit EDTA (TBE) çözeltisi içinde Etidyum Bromür (EtBr) ile boyalı %1'lik agaroz jelde 20 dakika (dk) yürütülerek görüntülenmiştir. Ardından PZR işlemlerine geçilmiştir.

2.2. Gen Bölgelerinin Yükseltgenmesi

Yükseltgenecek bölgelerin büyük olması nedeniyle yanlış baz ekleme hata oranı düşük olan bir enzim *Phire II* tercih (*Thermo Scientific*) edilmiştir. Gen bölgelerinin yükseltgenmesi amacıyla önce bu bölgeler için 5kb aralıklarla oligonükleotitler tasarlanmıştır. Yapılan optimizasyon denemesinden özgün bandlar elde edilemediği için bu bölgeler 2-2.5kb büyüklüklere bölünerek ara oligonükleotitler tasarlanmıştır (Çizelge 2.3-2.4). Optimizasyon sonucu tüm kimyasallar ve konsantrasyonları Çizelge 2.1'de bölgelere uygulanan PZR protokolü Çizelge 2.2'de verilmiştir. Oligonükleotitlerin genler üzerindeki yerleşimleri gösterilmiştir (Şekil 2.1-2.3).

Çizelge 2.1. PZR'da kullanılan kimyasalların konsantrasyon ve miktarları

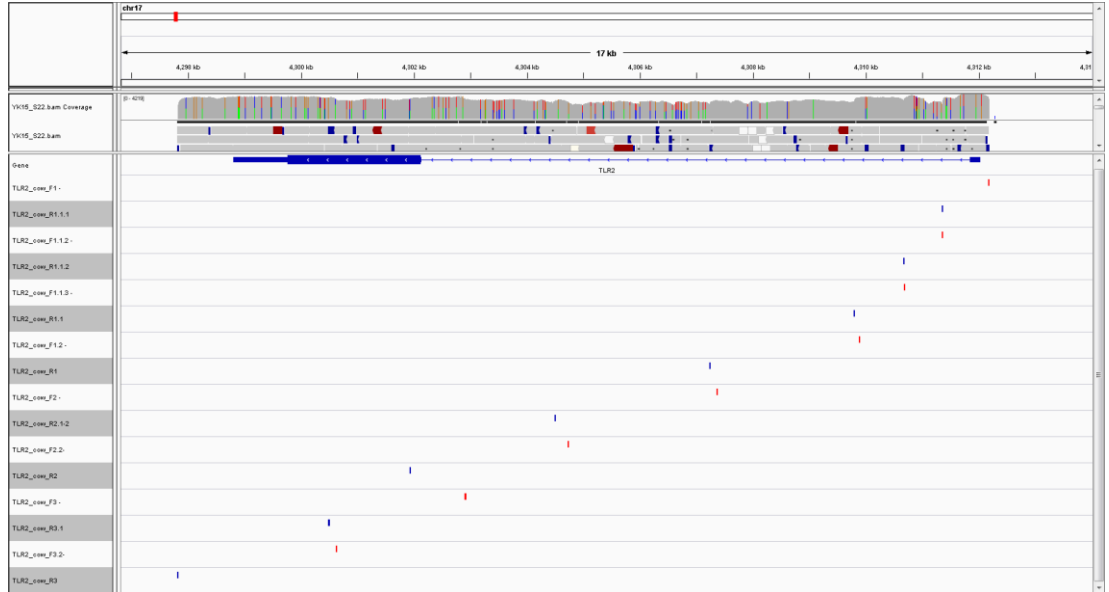
Kimyasal	Konsantrasyon	Miktar (μ l)
Buffer ($MgCl_2$ içeren)	5 X	5
dNTP	200nmol	0,5
İleri yönlü oligonükleotit	10pikomol/ μ l	1
Geri yönlü oligonükleotit	10pikomol/ μ l	1
DMSO	%5	1,25
Phire II taq polimeraz	5IU/ μ l	0,5
DNA	~50ng	1,2
25 μ l'ye ddH ₂ O ile tamamlanmıştır.		

Çizelge 2.2. PZR protokolü

Aşama	Sıcaklık C°	Süre sn	
Denaturasyon ve enzimin aktif hale getirilmesi	95	60	
Denaturasyon	95	10	
Bağlanma	60	10	x4
Uzama	72	20	5
Son uzama	72	60	

Çizelge 2.3. TLR2 gen bölgesinin yükseltgenmesinde kullanılan oligonükleotitler.

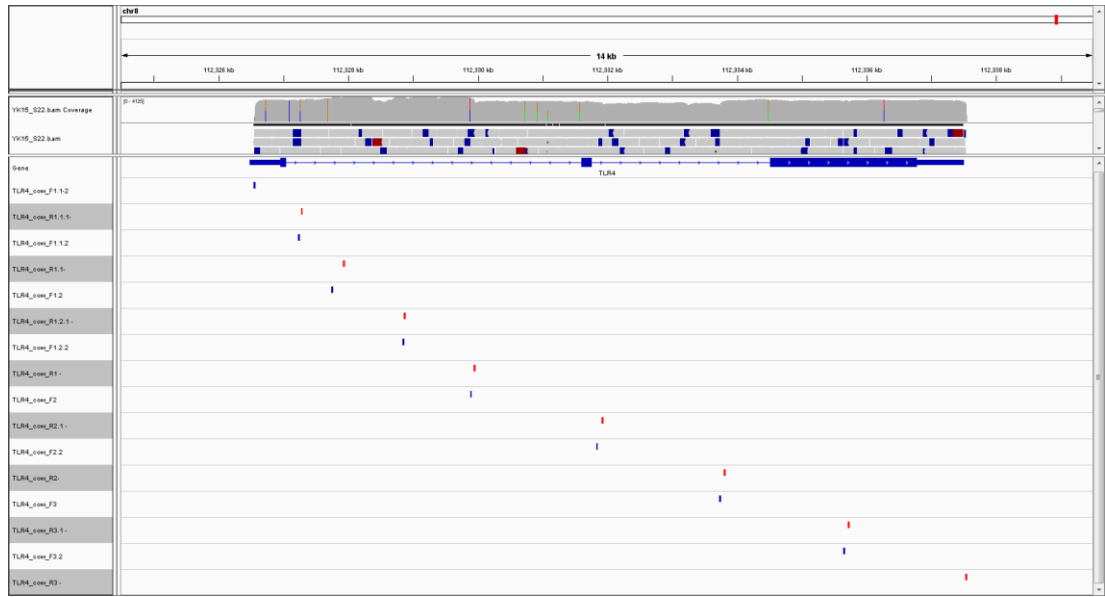
TLR2_cow_F1	TCGTTTCCCTTACAGACACGCTTCA
TLR2_cow_R1.1.1	GATCCTAATTCCTGACCGACGTACC
TLR2_cow_F1.1.2	CCAGGTACGTCGGTCAGGAATTAGG
TLR2_cow_R1.1.2	TCATTTATAGAGGTTCAAAGGGCGTG
TLR2_cow_F1.1.3	GGCTTCACGCCCTTTGAACCTC
TLR2_cow_R1.1	AAAACAATGGAATAATAGCCCCAAAGG
TLR2_cow_F1.2	AGGTCTTTAATGTCTGGAAATGTCTTAGC
TLR2_cow_R1	GAAGACAGCATCATCCTAGGCCTCAG
TLR2_cow_F2	TCTGTGGGTTTCGTGTCTATTGTCTGC
TLR2_cow_R2.1-2	TAAACTTTAGTGTTAAGGCAACCTCGC
TLR2_cow_F2.2	TCTCTTACTTTTTTCGATGATCCAGTGG
TLR2_cow_R2	GACATAGGTGATCTCATTGTTGGACAGG
TLR2_cow_F3	GTGGTCTACCTGTGTTAGTGTTGTTGG
TLR2_cow_R3.1	TGTAAAGGACAGGAAGTCACAGGAGC
TLR2_cow_F3.2	TGCCTCCTTCTTACCCGTGTTATCAG
TLR2_cow_R3	TCTCTCGTTTCCTTCTTCTGAACCTGC



Şekil 2.1. TLR2 gen bölgesi primerlerinin IGV de gösterimi (Alt satırlarda bulunan kırmızı dikey çizgiler ileri yönlü, mavi çizgiler geri yönlü oligonükleotitlerdir.).

Çizelge 2.4. TLR4 gen bölgesinin yükseltgenmesinde kullanılan oligonükleotitler.

TLR4_cow_F1.1-2	AAACGAAAGCAGAAAGCCACAGTTCC
TLR4_cow_R1.1.1	ACATAGCCCAGATGTGGAACAATAGG
TLR4_cow_F1.1.2	CCACTTAGGAATTACATGGGAACTTTAGG
TLR4_cow_R1.1	GCAGGAGAGACATAGAGAGGAGGACAG
TLR4_cow_F1.2	ATGGACTTGACTATTGCTTTGGAAACC
TLR4_cow_R1.2.1	GGACATTAAGGCAAATACAGGGAGTG
TLR4_cow_F1.2.2	TTGCCTCATATAAAGCTCCTCACTCC
TLR4_cow_R1	GAAGACATTTGCTATCAAGTGCTGTGG
TLR4_cow_F2	CTCTAGATGGGGAGCTGATGGGAGTC
TLR4_cow_R2.1	GAGACCTGAAGAAGGGAGATAGCTTGC
TLR4_cow_F2.2	CAGAAAGCCTGATTCATGAGGTCTCC
TLR4_cow_R2	TAGAGAAGCAGAGGATGAAGGTGAAGG
TLR4_cow_F3	ATATTCACATGGCTTGTTGACAACAGG
TLR4_cow_R3.1	GTCAGTTCTGTGAAGATGTCAGGGAGC
TLR4_cow_F3.2	TTCCATGGCATCTTTACTGGCTTAGTC
TLR4_cow_R3	GCCTTCAGGACAGTCATAACGTACTAGG



Şekil 2.2. TLR4 gen bölgesi primerlerinin IGV de gösterimi (Alt satırlarda bulunan kırmızı dikey çizgiler ileri yönlü, mavi çizgiler geri yönlü oligonükleotitlerdir.).

Çizelge 2.5. TLR6 gen bölgesinin yükseltgenmesinde kullanılan oligonükleotitler.

TLR6_cow_F1	TTAAGGGTTTCCAAACACTGTCCAGG
TLR6_cow_R1.1	AGTTCATAATGGCACCATTTCGCTCTG
TLR6_cow_F1.2	GCATTGTGGAAAATATCATCAACTGC
TLR6_cow_R1	ACTGAGCTATCTGTTTGTGATGTGAAGC
TLR6_cow_F2	GCAGTTTTTGTGAGCAGATTTCTGACC
TLR6_cow_R2.1	AATTTCCCATTCCATTTCTAGTTTGTGAG
TLR6_cow_F2.2-2	TTATAACCAGATTAGGCGCTCTAAAACC
TLR6_cow_R2.2-2	CACCAGTTAGCAGTGGACAAGCACAC
TLR6_cow_F3	AATCCACCTAGACTCAAGCCATCCAG
TLR6_cow_R3.1	AGAAACCCGTGAGATGTTTGTGATCC
TLR6_cow_F3.2	TTTAAACGAACCTCATCTCAGGCACG
TLR6_cow_R3	TCTTCACATGTCCCCTCAGATCTCTC
TLR6_cow_F4	GGGCATCTCTGTGAAAGGGTAAGTCC
TLR6_cow_R4.1	AGCCAAATGTGGAAACAAAACACTAGGTG
TLR6_cow_F4.2	TTTCTAGACCTACTCATGTTGCAAATGG
TLR6_cow_R4.2	TACAGAAATGGGCTAATTTGGGATGG
TLR6_cow_F4.3-2	TCTCCATTTCAAATGTGAAACTACAAGG
TLR6_cow_R4.3-2	TCAGTCCTAGCAGAGAAATAGATGAATCC



Şekil 2.3. TLR6 gen bölgesi primerlerinin IGV de gösterimi (Alt satırlarda bulunan kırmızı dikey çizgiler ileri yönlü, mavi çizgiler geri yönlü oligonükleotitlerdir.)

Tüm bölgelerin PZR'ları yapılarak (Şekil 2.4) bireylere ait PZR'lar tamamlanana kadar +4C°'de saklanmıştır. PZR ürünleri 120 Volt elektrik akımı altında TBE çözeltisi içinde EtBr ile boyalı %1,5'lik agarose jelde 20 dakika (dk) yürütülerek görüntülenmiştir. Ardından kalite, kanttite değerlendirmeleri ve standardizasyonları yapılarak her bir birey için ayrı olmak şartıyla havuzlanarak yeni nesil sekans hizmet alımı için İntergen Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi Moleküler Genetik Laboratuvarına gönderilmiştir.

2.3. Data Analizi

IGV programı ile incelenip tekrar edilen aynı bireylere ait YNS yüklemesi sonuçlarının birleştirilmesinde SAM Tools kullanılmıştır. Ayrıca analizin ileri aşamalarından haplotiplerin belirlenmesi sırasında kullanılan yazılım tek örnek adı ile işlem yapabildiği için yine SAM Tools kullanılarak birleştirilmiş .bam dosyalarının başlık bölümleri düzeltilmesinde bu yazılım kullanılmıştır. Tezin datalarında ham dosyanın istatistiklerinin yapılması, indekslenmesi, okumaların filtrelenmesi amacıyla Bam Toolkit kullanılmıştır.

Yapılan ön incelemeler ve IGV ile görüntüleme sonucunda 18 aşamadan oluşan komutların kullanılmasına karar verilmiştir (Çizelge 2.6). Bu komutlarla datalar önce referans genoma göre yeniden düzenlenmiş, TLR2, TLR4 ve TLR6 gen bölgeleri dışında olan ve haritalama kalitesi (Mapping Quality, MQ) 50'nin altında olan okumalar uzaklaştırılmıştır.

Çizelge 2.6. Analizde kullanılan komutların aşamaları

	İşlem
Aşama 1	Picard ReorderSam
Aşama 2.1	Bamtools raw statistics
Aşama 2.2	Bamtools index
Aşama 2.3	GATK DepthOfCoverage (raw)
Aşama 3	Picard FixMates
Aşama 4	Bamtools subsetting and filtering
Aşama 5	Picard MarkDuplicates
Aşama 6	Bamtools filter
Aşama 7	Bamtools index
Aşama 8	Bamtools filtered statistics
Aşama 9	GATK RealignerTargetCreator
Aşama 10	GATK IndelRealigner
Aşama 11.1	GATK BaseRecalibrator pass 1
Aşama 11.2	GATK BaseRecalibrator pass 2
Aşama 12	GATK AnalyzeCovariates
Aşama 13	GATK PrintReads
Aşama 14	GATK DepthOfCoverage (processed)
Aşama 15	GATK HaplotypeCaller
Aşama 16	Snpsift
Aşama 17	Ensembl
Aşama 18	Shapeit
Aşama 19	Phase

InDel varyantlarının belirlenmesi aşamasında GATK, yeniden hizalama hedef üreticisinden (Realigner Target Creator) yararlanılmıştır. Realigner Target Creator, referans data setinin varyant dosyasına göre InDel varyasyonların görülebileceği bölgeleri belirleyerek buna göre yeniden hizalama yapılmıştır.

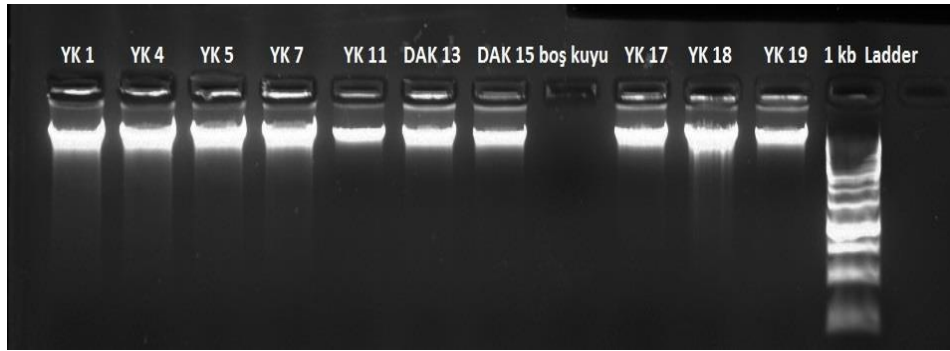
Elde edilen *.vcf* dosyaları önce GATK yazılımı ile ırlara göre birleştirilmiş ve sonra da genotiplendirilmiştir. Elde edilen tüm varyant dosyaları SNV ve InDel varyasyonları içeren dosyalar olmak üzere yine GATK ile ikiye ayrılmıştır. Daha sonra filtreleme aşamasına geçilmiştir. Filtreleme işlemi SNV ve InDel dosyaları için

ayrı ayrı uygulanmıştır. SNV varyantlarında SNV kümesi büyüklüğü (clusterSize), derinlik kalitesi (Depth of Quality, QD), Fisher'in kesinlik testi filtresi (FS), okuma derinliği filtresi (Depth of Position, DP), MQ, referansa göre okuma hatası (ReadPosRankSum) filtresi, InDel varyantlarında ise QD, FS, ReadPosRankSum filtreleri uygulanmaktadır (Van der Auwera ve ark., 2013). Bu işlem ile .vcf dosyasında filtre kolonunda varyantı uygun ise "PASS" uygun değil ise hangi filtreden geçemediğine dair bilgiler sağlanmaktadır. Daha sonra bu dosyalarda filtrelenmiş varyantlar kontrol edilmiş, 'PASS' dışında kalan varyantlar SnpSift ile uzaklaştırılmıştır. Haplotip ham verilerinin oluşturulması amacıyla Shapeit ve haplotip gruplandırması amacıyla Phase kullanılmıştır. Ardından SnpSift ve SnpEff kullanılarak *Bos taurus* 4.6.1 veri tabanına göre anotasyon yapılmıştır. Yeni varyantların kesinleştirilmesi amacıyla alt genom versiyona geçiş UCSC (Kent ve ark., 2002) ile yapılmış ve Ensembl'da (Cunningham ve ark., 2015) varyant etki tahmin edici (Variant Effect Predictor, VEP) yazılımı kullanılarak belirlenen SNV ve InDel yeniden anotasyonları yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. DNA Ekstraksiyonu, DNA Yoğunluğu, Saflığı ve Bütünlük Kontrolü Bulguları

Araştırmada incelenen sığır ırkları kanlarından izole edilen DNA'ların saflık, miktar ve bütünlük kontrolleri yapılmıştır. Örneklerin agaroz jel elektroforez görüntüleri (Şekil 3.1) ve Nano Drop sonuçları aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.1).



Şekil 3.1. Yerli Kara Sığır örneklerine ait EtBr ile boyanmış %1'lik agaroz jel görüntüsü. (YK1-YK21, Her sıranın sonunda 1kb DNA ladder)

Çizelge 3.1. İncelenen Sığır ırklarının DNA saflık kontrolleri ve miktar sonuçları

No	Örnek Adı	DNA Miktarı	260/280	260/230	Materyal
1	HOL4	152,2 ng/μl	1,92	1,88	DNA
2	HOL45	258,1 ng/μl	1,92	1,82	DNA
3	HOL80	257 ng/μl	1,91	1,95	DNA
4	HOL97	130,1 ng/μl	1,91	1,81	DNA
5	HOL99	294,6 ng/μl	1,87	1,97	DNA
6	HOL115	2617,6 ng/μl	1,89	2,21	DNA
7	HOL150	289,7 ng/μl	1,91	1,95	DNA
8	HOL157	279,2 ng/μl	1,91	1,52	DNA
9	HOL160	681,5 ng/μl	1,9	2,03	DNA
10	HOL161	341,5 ng/μl	1,88	2,08	DNA
11	BOZ1	109,9 ng/μl	1,88	1,59	DNA
12	BOZ2	272,7 ng/μl	1,89	2,03	DNA
13	BOZ3	30,8 ng/μl	2,15	0,68	DNA
14	BOZ4	101,3 ng/μl	1,8	1,21	DNA

Çizelge 3.1 Devam ediyor

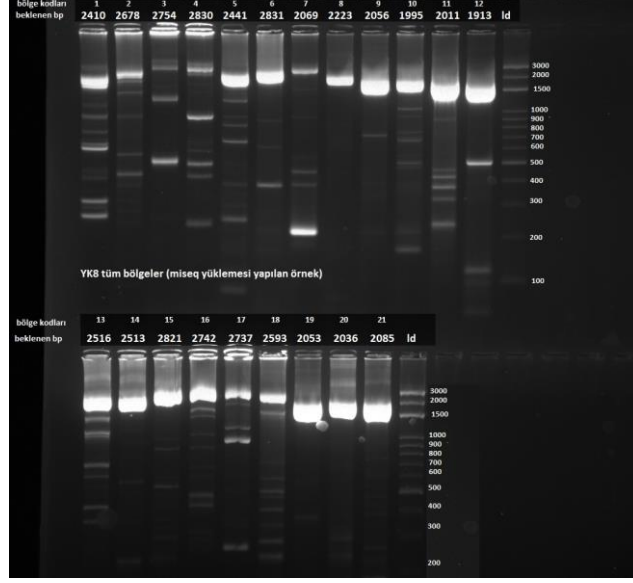
No	Örnek Adı	DNA miktarı	260/280	260/230	Materyal
15	BOZ5	119,4 ng/µl	1,82	1,27	DNA
16	BOZ6	137,7 ng/µl	1,8	1,56	DNA
17	BOZ7	86,6 ng/µl	1,8	1,27	DNA
18	BOZ8	119,9 ng/µl	1,8	1,14	DNA
19	BOZ9	148,1 ng/µl	1,81	1,64	DNA
20	BOZ10	175,9 ng/µl	1,55	0,56	DNA
21	DAK1	27 ng/µl	1,82	0,91	DNA
22	DAK2	59,4 ng/µl	1,9	2,15	DNA
23	DAK3	57,1 ng/µl	1,83	1,64	DNA
24	DAK4	30,3 ng/µl	1,82	1,62	DNA
25	DAK5	51,1 ng/µl	1,91	1,39	DNA
26	DAK6	40,6 ng/µl	1,81	0,96	DNA
27	DAK7	61,7 ng/µl	2,08	1,27	DNA
28	DAK8	41,8 ng/µl	2,01	1,59	DNA
29	DAK9	62,9 ng/µl	1,93	1,46	DNA
30	DAK10	51 ng/µl	1,87	1,5	DNA
31	DAK11	16,6 ng/µl	1,81	1,03	DNA
32	DAK12	41,7 ng/µl	1,96	1,07	DNA
33	DAK13	133,7 ng/µl	1,91	2,54	DNA
34	DAK14	31,5 ng/µl	1,83	1,22	DNA
35	DAK15	260,8 ng/µl	1,62	1,11	DNA
36	DAK16	37,1 ng/µl	1,97	1,18	DNA
37	DAK17	36 ng/µl	1,82	1,28	DNA
38	DAK18	35,9 ng/µl	1,82	1,55	DNA
39	DAK19	133,5 ng/µl	1,72	0,97	DNA
40	DAK20	105,9 ng/µl	1,83	1,46	DNA
41	GAK1	129,6 ng/µl	1,79	1,39	DNA
42	GAK2	204,6 ng/µl	1,84	1,64	DNA
43	GAK3	496,1 ng/µl	1,85	2,28	DNA
44	GAK4	117,5 ng/µl	1,83	1,85	DNA
45	GAK5	144,5 ng/µl	1,89	1,75	DNA
46	GAK6	125,8 ng/µl	1,83	2	DNA
47	GAK7	131,2 ng/µl	1,82	1,81	DNA
48	GAK8	103 ng/µl	1,84	2,21	DNA
49	GAK9	123,1 ng/µl	1,84	2,24	DNA
50	GAK10	70,3 ng/µl	1,79	1,17	DNA
51	GAK11	93,9 ng/µl	1,86	1,7	DNA
52	GAK12	42,3 ng/µl	1,8	0,99	DNA
53	GAK14	71,8 ng/µl	1,94	1,75	DNA
54	GAK15	155,6 ng/µl	1,84	2,13	DNA
55	GAK16	111,3 ng/µl	1,82	2,05	DNA
56	GAK17	60,6 ng/µl	1,82	1,31	DNA

Çizelge 3.1 Devam ediyor

No	Örnek Adı	DNA miktarı	260/280	260/230	Materyal
57	GAK18	226,6 ng/µl	1,84	2,22	DNA
58	GAK19	38,2 ng/µl	2,06	1,42	DNA
59	GAK20	131,6 ng/µl	1,6	0,95	DNA
60	GAK21	104,1 ng/µl	1,8	1,77	DNA
61	YK1	127,2 ng/µl	1,83	2,04	DNA
62	YK2	141,2 ng/µl	1,86	2,09	DNA
63	YK4	32,5 ng/µl	2,04	1,83	DNA
64	YK5	32,6 ng/µl	0,99	0,16	DNA
65	YK6	43,4 ng/µl	1,89	1,83	DNA
66	YK7	28,6 ng/µl	1,86	1,7	DNA
67	YK8	41,4 ng/µl	1,91	1,75	DNA
68	YK9	36,5 ng/µl	1,9	1,49	DNA
69	YK10	53,2 ng/µl	1,87	1,71	DNA
70	YK11	12,6 ng/µl	1,71	0,59	DNA
71	YK12	63,7 ng/µl	1,86	1,84	DNA
72	YK13	90 ng/µl	1,8	1,3	DNA
73	YK14	93,5 ng/µl	1,93	1,61	DNA
74	YK15	74,8 ng/µl	1,84	1,79	DNA
75	YK16	71,2 ng/µl	1,91	1,29	DNA
76	YK17	25,6 ng/µl	1,64	0,45	DNA
77	YK18	9,6 ng/µl	1,53	0,4	DNA
78	YK19	111,4 ng/µl	1,9	1,55	DNA
79	YK20	96,4 ng/µl	1,85	1,99	DNA
80	YK21	49,5 ng/µl	1,8	1,44	DNA

3.2. Gen Bölgelerinin PZR Sonuçları

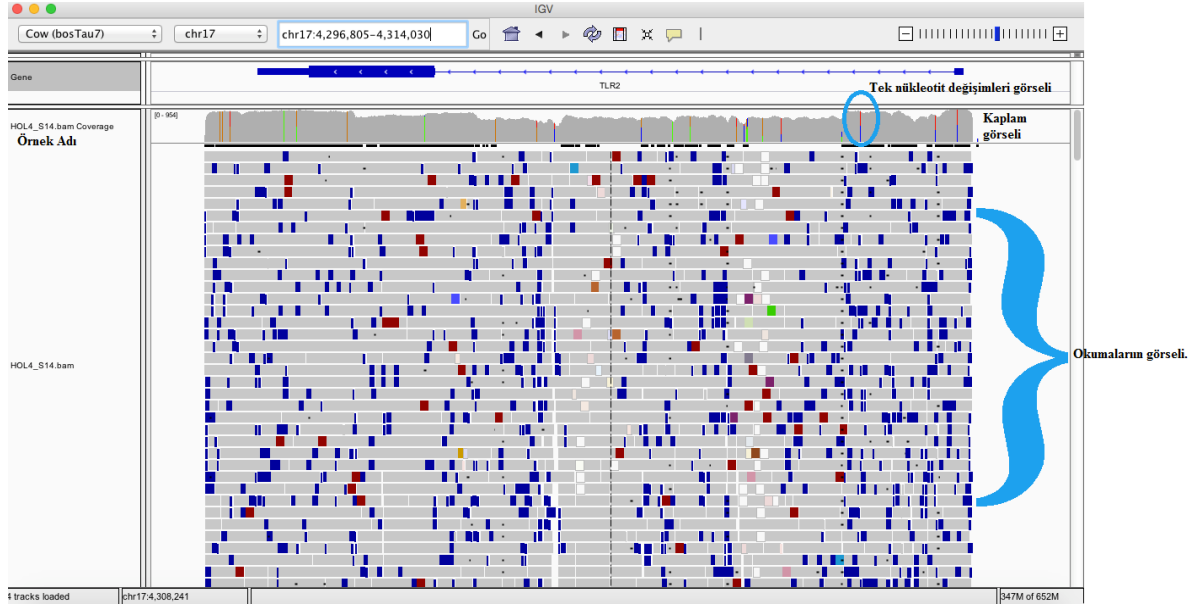
Tüm bölgeler için PZR kurulmuş ve elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü verilmiştir (Şekil 3.2).



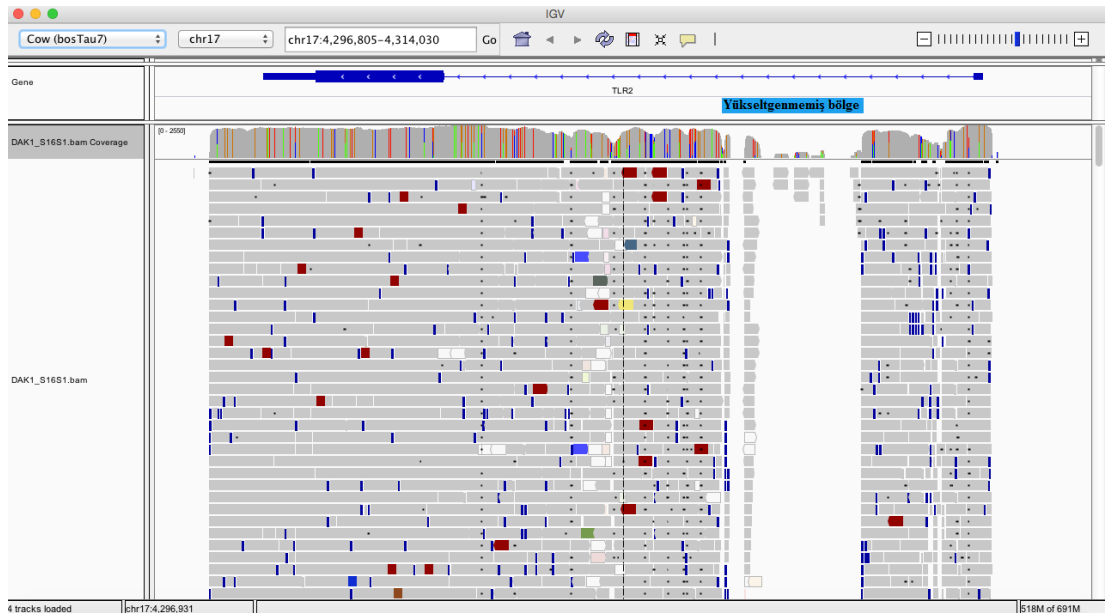
Şekil 3.2. YK8 nolu bireye ait EtBr ile boyanmış %1,5'lik. tüm bölgelerin agaroz jel görüntüsü (Her sıranın sonunda 100bp plus DNA ladder)

3.3. Bütünleştirici Genomik Görüntüleme (Integrative Genomics Viewer, IGV) ile Analiz Öncesi Ham Dataların İnceleme Bulguları

Tez dataları analizden önce IGV programı ile incelenmiştir. Bu incelemeye göre eksik okumaların tekrarlanması sağlanmıştır. Aynı zamanda farklı renkler ile uygun olmayarak haritalanmış okumalar belirlenmiştir (Şekil 3.3). IGV ile yapılan ön incelemede PZR'da özgün bandı elde edilememiş ya da zayıf bant olduğu için kapsam derecesi düşük bölgeler belirlenmiştir (Şekil 3.4). Bu bölgelerin PZR ve YNS aşamaları tekrarlanarak elde edilen *.bam* dosyaları örneklere göre SAM tools yazılımı ile birleştirilmiş ve başlık (header) düzenlemesi yapılmıştır.

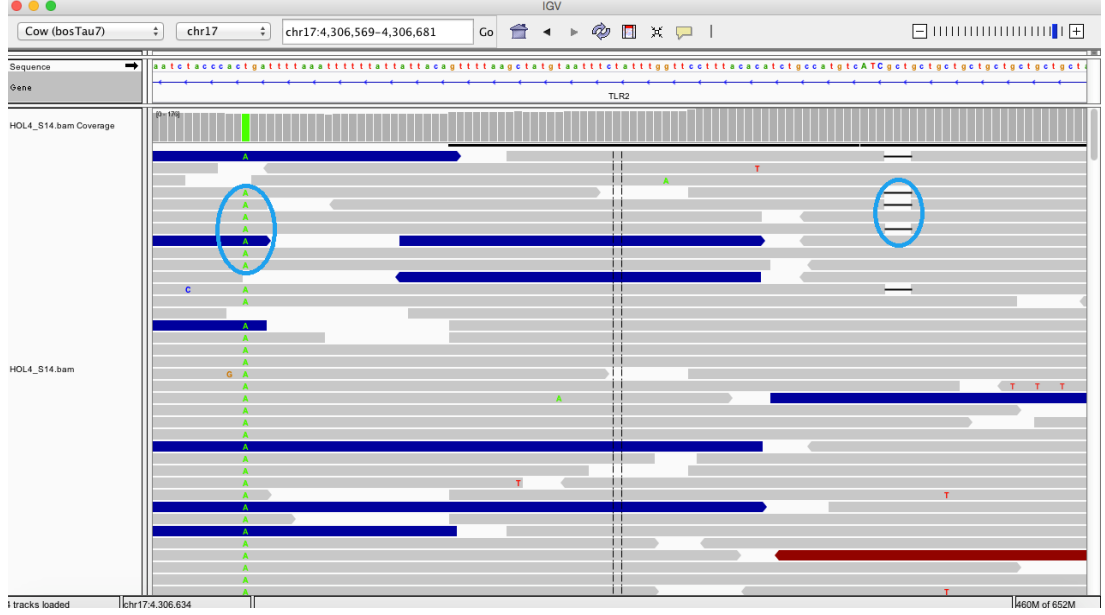


Şekil 3.3. IGV Analiz öncesi ham data incelemesi. IGV kullanıcı ara yüzünde örnek adı bölümü, kaplam görseli bölümü, gen bilgisi bölümü, okuların görselleştirildiği bölüm bulunmaktadır.



Şekil 3.4. PZR ile yükseltgenemeyen bölgenin IGV görünümü.

IGV ara yüzünde genomda baz düzeyine incek kadar büyütme yapılabilmektedir. Bu sayede okumalardaki baz değişimleri ve InDel varyasyonlar detaylı olarak incelenebilmektedir (Şekil 3.5)

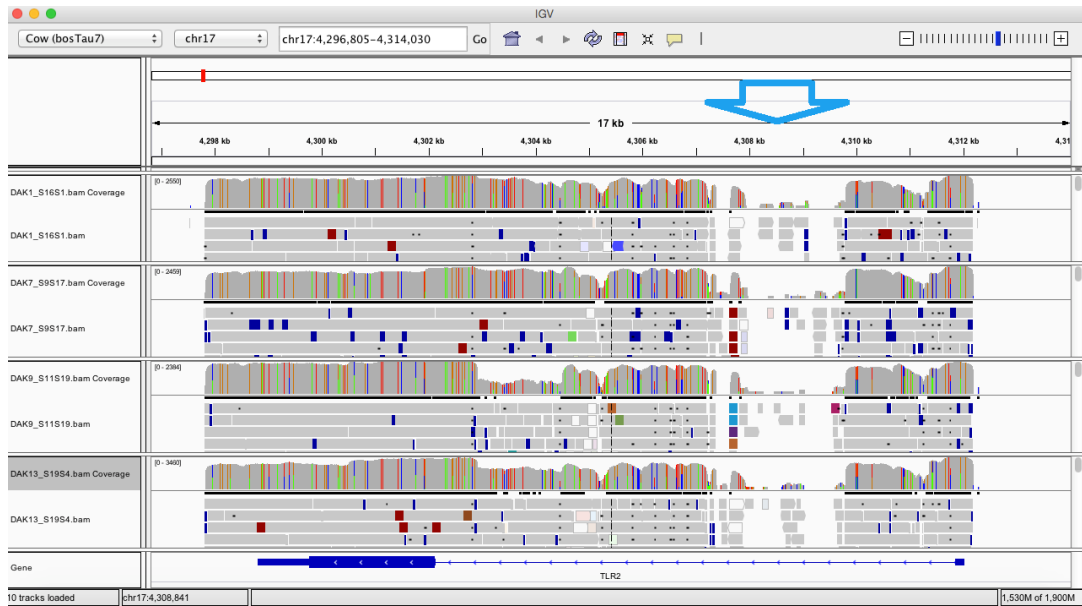


Şekil 3.5. IGV ham data analizi detaylı görüntüsü. Kaplam görselinin bulunduğu bölgede farklı renklerle referanstan farklı olan bazlar gösterilmektedir. Aynı şekilde okuma görselinde de bu bazlar belirtilmektedir. Ayrıca InDel bölgeleri de bu bölgelere baz ataması yapılamadığı için çizgi ile gösterilmektedir.

Tezde incelenen 80 bireyden 11'inde TLR2 gen bölgesi intronunda 2.683bç ve 600bç, bir bireyde TLR4 gen bölgesinde 600bç ve yine bir bireyde TLR6 gen bölgesinde 1500bç'lik bölgeler yükseltgenememiştir. Bu bölgelerin YNS analizinin tekrarlanması amacıyla yeni primerler tasarlanmış, bölgelerde farklı enzimler denenmiş ancak başarılı olunamamıştır (**Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**) (Şekil 3.6).

Çizelge 3.2. YNS verisi olmayan bölgeler

Birey	Okuması olmayan bölge	Gen	Bölge %GC	Gen %GC
YK8	2490 bç	TLR2	52	44
BOZ1	672 bç		75	
BOZ2				
GAK17				
GAK7	2632 bç		43	
GAK10				
DAK1				
DAK7				
DAK9				
DAK13				
H161				
YK8	1193 bç	TLR4	47	42
BOZ 7	2258 bç	TLR6	44	40



Şekil 3.6. DAK örneklerinin ham datalarında okuması olmayan bölgelerin IGV’de görüntülenmesi

3.4. TLR2, TLR4 ve TLR6 Gen Bölgelerinin UMD3.1 ve *Bos taurus* 4.6.1 İncelemesi

TLR2 gen bölgesi USCC ve Ensembl UMD3.1 versiyonları arasında başlangıç bazı açısından 160bç, bitiş açısından 60bç farklılık göstermektedir. Tez datalarının hizalandığı genom versiyonu *Bos taurus* 4.6.1'e göre ise, Ensembl ile karşılaştırıldığında 349.095bç başlangıçtan, 348.998bç genin bitişinden farklılık olduğu göze çarpmaktadır. Benzer şekilde Ensembl veri tabanına göre TLR2 gen bölgesinde tanımlanmış 1098 tane varyasyon varken *Bos taurus* 4.6.1'e göre 253 varyasyon tanımlanmıştır.

TLR4 gen bölgesi USCC ve Ensembl UMD3.1 versiyonları arasında bitiş açısından 1bç farklılık göstermektedir. Tez datalarının hizalandığı genom versiyonu *Bos taurus* 4.6.1'e göre ise, Ensembl ile karşılaştırıldığında 3.493.589bç başlangıçtan, 3.497.591bç genin bitişinden farklılık olduğu göze çarpmaktadır. Benzer şekilde Ensembl veri tabanına göre TLR4 gen bölgesinde tanımlanmış 805 tane varyasyon varken *Bos taurus* 4.6.1'e göre 116 varyasyon tanımlanmıştır.

TLR6 gen bölgesi USCC ve Ensembl UMD3.1 versiyonları arasında başlangıçtan 782bç, bitişten 13.796bç farklılık göstermektedir. Tez datalarının hizalandığı genom versiyonu *Bos taurus* 4.6.1'e göre ise, Ensembl ile karşılaştırıldığında 582.766bç başlangıçtan, 597.183bç genin bitişinden farklılık olduğu göze çarpmaktadır. Benzer şekilde Ensembl veri tabanına göre TLR6 gen bölgesinde tanımlanmış 1924 tane varyasyon varken *Bos taurus* 4.6.1'e göre 416 varyasyon tanımlanmıştır.

3.5. Filtreleme ve İncelenen Genlerin Analiz Bulguları

Analiz sonrası yapılan incelemelerde elde edilen VCF dosyasındaki varyantların doğruluğu kontrol edilmiştir. Bu amaçla tüm bireylerin *.vcf* dosyası ve analiz sonunda yanlış okumaların uzaklaştırılmış olduğu *.bam* dosyaları IGV programı ile açılarak incelenmiştir. Buna göre baz değişimlerinin ve InDel'lerin doğru olup olmadıkları göz ile kontrol edilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. IGV ile .bam ve .vcf dosyalarının incelenmesi

SNV ve InDel dosyalarında filtreleme işlemi için GATK tarafından da önerilen kriterler seçilmiştir. SNV dosyası için; ClusterSize=3, QD<1,5, FS filter>60, DP<10, MQ<50 ve ReadPosRankSum<-8,0. InDel dosyası için; QD<1,5, FS>200 ve ReadPosRankSum<-20,0. Filtreleme işlemleri sonucunda SNV için GAK ırkında 38 adet, BOZ'da 27, DAK'da 21, YK'da 6 ve HOL ırkında 6 SNV SNV kümesi ve okuma derinliği kalitesinden dolayı filtrelenmiştir. InDel'ler içinse GAK ve YK ırklarında 5'er adet, DAK, BOZ ve HOL ırklarında ise 2'şer adet InDel okuma derinliğinden dolayı filtrelenmiştir.

Filtre kriterlerinden geçemeyen varyantlar IGV'de incelenerek elemenin doğru olup olmayacağına karar verilmiştir. Buna göre, GAK ırkında 9 adet, BOZ ırkında 8 adet, DAK ırkında 6 adet, HOL ırkında 3 adet ve YK ırkında 1 adet SNV'nin elenmesine karar verilmiştir. InDel varyantları içinse HOL ırkından 2 tane ve YK ırkından bir tane InDel varyantı elenirken diğer ırklarda eleme yapılmamıştır. Ardından her ırkın SNV ve InDel .vcf dosyalarında ilgili varyantın SnpSift ile uzaklaştırılmış ve anotasyon aşamasına geçilmiştir. Anotasyon için, elde edilen .vcf dosyalarındaki varyant pozisyonları UCSC (Kentve ark., 2002) veri tabanı kullanılarak *Bos taurus* 4.6.1'den referans genom olan UMD3.1'e uyarlanmıştır (Cunninghamve ark., 2015).

3.5.1. Yerli Kara Sığır Irkı TLR2, TLR4 Ve TLR6 Tüm Gen Analizi Bulguları

Yerli kara sığır ırkına ait 20 bireyden elde edilen SNV ve InDel varyasyonlarında genomlar arası geçiş sırasında SNV dosyasından 10 tane, InDel dosyasında ise 2 varyant UMD3.1'de pozisyon açısından tanımlanmadığı için elenmiştir. YK ırkında 360 tane SNV'nin Ensembl VEP'e göre; 334 tanesi bilinen, 26 tanesi yeni varyant belirlenmiştir. Belirlenen 38 InDel varyasyon için ise 16 tanesi bilinen 22 tanesi yeni varyant tanımlanmıştır. InDel varyantlarının hepsinin intronda yer aldığı görülmüştür (Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4).

Çizelge 3.3. YK sığır ırkında incelenen gen bölgelerinde belirlenen varyantlar

Bölge	SNV	Yeni SNV	InDel	Yeni InDel
TLR2	133	11	12	12
TLR6	209	14	23	9
TLR4	18	1	3	1

Çizelge 3.4. YK sığır ırkında belirlenen varyantların tip ve bölgeye göre etkileri

SNV'ler için;	
Varyasyon tipi ve görüldüğü bölge	Oran, %
Downstream	8
İntron	73
Ekzon	13
Nonsinonim	6
Sinonim	7
Upstream	1
3' UTR	4
5' UTR	5
InDel varyasyonlar için	
Intron	Oran, %
Intron	100

SNV transisyon/transversiyon (Ts/Tv) oranı SnpEff yazılımı ile %2.3 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.8).

Transitions	3,045
Transversions	1,293
Ts/Tv ratio	2.355

Şekil 3.8. YK ırkında Transisyon ve transversiyon sonuçları.

Nonsinonim varyasyonlar sonucunda ortaya çıkan amino asit değişimlerinin SnpEff sonucu Şekil 3.9’da verilmiştir. TLR2 gen bölgesinde 13 adet, TLR4 gen bölgesinde 1 adet ve TLR6 gen bölgesinde 10 adet nonsinonim varyant olduğu belirlenmiştir.

	A	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V
A	4																
D		1	1			1					2						
E		1	2										1				
F				3					1								
G					1										1		
H						3							2				
I							2										2
K								2									
L									1								
M																	
N											1				1		
P												1					
Q													1				
R					1	1		1						1			
S	1											1			2		
T	1						1			2							
V	1						1										2

Şekil 3.9. YK ırkında Nonsinonim varyasyonların neden olduğu amino asit geçişleri.

3.5.2. Doğu Anadolu Kırmızısı Sığır Irkı TLR2, TLR4 Ve TLR6 Tüm Gen Analizi Bulguları

Doğu Anadolu Kırmızısı sığır ırkına ait 20 bireyden elde edilen SNV ve InDel varyasyonlarında genomlar arası geçiş sırasında SNV dosyasından 11 tane, InDel dosyasında ise 3 varyant UMD3.1’de pozisyon açısından tanımlanmadığı için elenmiştir. DAK ırkında 463 tane SNV’nin Ensembl VEP’e göre; 440 tanesi bilinen, 23 tanesi yeni varyant belirlenmiştir. Belirlenen 49 InDel varyasyon için ise 30 tanesi bilinen 19 tanesi yeni varyant tanımlanmıştır. InDel varyantlarının hepsinin intronda yer aldığı görülmüştür (Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6).

Çizelge 3.5. DAK sığır ırkında incelenen gen bölgelerinde belirlenen varyantlar

Bölge	SNV	Yeni SNV	InDel	Yeni InDel
TLR2	153	17	16	13
TLR6	230	5	28	14
TLR4	80	1	5	3

Çizelge 3.6. DAK sığır ırkında belirlenen varyantların tip ve bölgeye göre etkileri

SNV'ler için;	
Varyasyon tipi ve görüldüğü bölge	Oran, %
Downstream	
İntron	76
Ekzon	13
Nonsinonim	6
Sinonim	7
Upstream	-
3' UTR	3
5' UTR	1
InDel varyasyonlar için	
Intron	Oran, %
İntron	100

SNV Ts/Tv oranı SnpEff yazılımı ile %2.4 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.10).

Transitions	3,068
Transversions	1,245
Ts/Tv ratio	2.4643

Şekil 3.10. DAK ırkında Transisyon ve transversiyo sonuçları.

Nonsinonim varyasyonlar sonucunda ortaya çıkan amino asit değişimler Şekil 3.11'de verilmiştir. İncelenen gen bölgeleri açısından bakıldığında, TLR2 gen bölgesinde 16 adet, TLR4 gen bölgesinde 6 adet ve TLR6 gen bölgesinde 9 adet nonsinonim varyant olduğu belirlenmiştir.

	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W
A	3			1															
C		1																	
D				1			1					1							
E			1	2										1					
F					4					1									
G						3											1		
H							4							2					
I								2										2	
K									1										
L										1									
M																			
N									1			2				1	1		
P													2						
Q														3					
R		1				1	1	1						1	2				
S	1											1	1			3			
T	1							1			2								
V	1							2										2	
W										1									

Şekil 3.11. DAK ırkında Nonsinonim varyasyonların neden olduğu amino asit geçişleri.

3.5.3. Güney Anadolu Kırmızısı Sığır Irkı TLR2, TLR4 Ve TLR6 Tüm Gen Analizi Bulguları

Güney Anadolu Kırmızısı sığır ırkına ait 20 bireyden elde edilen SNV ve InDel varyasyonlarında genomlar arası geçiş sırasında SNV dosyasından 10 tane, InDel dosyasında ise 4 varyant UMD3.1'de pozisyon açısından tanımlanmadığı için elenmiştir. GAK ırkında 520 tane SNV'nin Ensembl VEP'e göre; 452 tanesi bilinen, 68 tanesi yeni varyant belirlenmiştir. Belirlenen 61 InDel varyasyon için ise 22 tanesi bilinen 39 tanesi yeni varyant tanımlanmıştır. InDel varyantlarının 1 tanesinin TLR6 geninin downstream bölgesinde, diğerlerinin intronda yer aldığı görülmüştür (Çizelge 3.7 ve Çizelge 3.8).

Çizelge 3.7. GAK sığır ırkında incelenen gen bölgelerinde belirlenen varyantlar

Bölge	SNV	Yeni SNV	InDel	Yeni InDel
TLR2	155	13	15	12
TLR6	285	52	38	24
TLR4	80	2	8	3

Çizelge 3.8. GAK sığır ırkında belirlenen varyantların tip ve bölgeye göre etkileri

SNV'ler için;	
Varyasyon tipi ve görüldüğü bölge	Oran, %
Downstream	7
İntron	77
Ekzon	12
Nonsinonim	5
Sinonim	7
Upstream	1
3' UTR	3
5' UTR	1
InDel varyasyonlar için	
	Oran, %
İntron	98
	2

SNV Ts/Tv oranı SnpEff yazılımı ile %2.4 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.12).

Transitions	3,795
Transversions	1,527
Ts/Tv ratio	2.4853

Şekil 3.12. GAK ırkında Transisyon ve transversiyon sonuçları.

Nonsinonim varyasyonlar sonucunda ortaya çıkan amino asit değişimleri Şekil 13'de verilmiştir. İncelenen gen bölgeleri açısından bakıldığında, TLR2 gen bölgesinde 17 adet, TLR4 gen bölgesinde 2 adet ve TLR6 gen bölgesinde 9 adet nonsinonim varyant olduğu belirlenmiştir.

	A	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W
A	5																	
D		1	1			1					2							
E		1	2										1					
F				4					1									
G					2										2			
H						4							2					
I							2										2	
K								2						1				
L									2									
M																		
N											2				1			
P												2						
Q													3					
R					1	1		1					1	2				1
S	1															4		
T	1						1			2								
V	1						1											2
W									1									

Şekil 3.13. GAK ırkında Nonsinonim varyasyonların neden olduğu amino asit geçişleri.

3.5.4. Boz Sığır Irkı TLR2, TLR4 Ve TLR6 Tüm Gen Analizi Bulguları

Boz sığır ırkına ait 10 bireyden elde edilen SNV ve InDel varyasyonlarında genomlar arası geçiş sırasında SNV dosyasından 10 tane, InDel dosyasında ise 3 varyant UMD3.1’de pozisyon açısından tanımlanmadığı için elenmiştir. BOZ ırkında 423 tane SNV’nin Ensembl VEP’e göre; 401 tanesi bilinen, 22 tanesi yeni varyant belirlenmiştir. Belirlenen 43 InDel varyasyon için ise 13 tanesi bilinen 30 tanesi yeni varyant tanımlanmıştır. InDel varyantlarının 1 tanesinin TLR2 geninin downstream bölgesinde, diğerlerinin intronda yer aldığı görülmüştür (Çizelge 3.9 ve Çizelge 3.10).

Çizelge 3.9. BOZ sığır ırkında incelenen gen bölgelerinde belirlenen varyantlar

Bölge	SNV	Yeni SNV	InDel	Yeni InDel
TLR2	187	16	16	13
TLR6	179	5	21	13
TLR4	57	1	6	4

Çizelge 3.10. BOZ sığır ırkında belirlenen varyantların tip ve bölgeye göre etkileri

SNV'ler için;	
Varyasyon tipi ve görüldüğü bölge	Oran, %
Downstream	7
İntron	76
Ekzon	13
Nonsinonim	6
Sinonim	8
Upstream	-
3' UTR	3
5' UTR	-
InDel varyasyonlar için	
	Oran, %
İntron	98
Down stream gen varyantı	2

SNV Ts/Tv oranı SnpEff yazılımı ile %2.4 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.14).

Transitions	1,715
Transversions	709
Ts/Tv ratio	2.4189

Şekil 3.14. BOZ ırkında Transisyon ve transversiyon sonuçları.

Nonsinonim varyasyonlar sonucunda ortaya çıkan amino asit değişimleri Şekil 3.15'de verilmiştir. İncelenen gen bölgeleri açısından bakıldığında, TLR2 gen bölgesinde 13 adet, TLR4 gen bölgesinde 2 adet ve TLR6 gen bölgesinde 8 adet nonsinonim varyant olduğu belirlenmiştir.

	A	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
A	4																1		
D		1				1					2								
E		1	2																
F				3					1										
G					3										1				
H						3							2						
I							2										2		
K								2											
L									1										
M																			
N											1				1				
P												2							
Q													3						
R				1	1		1							2					
S	1														3				1
T	1						1			2									
V	2						2										2		
W									1										
Y																			

Şekil 3.15. BOZ ırkında Nonsinonim varyasyonların neden olduğu amino asit geçişleri.

3.5.5. Holştayn Sığır Irkı TLR2, TLR4 Ve TLR6 Tüm Gen Analizi Bulguları

Holştayn sığır ırkında incelenen 9 bireyden elde edilen SNV ve InDel varyasyonlarında genomlar arası geçiş sırasında SNV dosyasından 12 tane, InDel dosyasında ise 1 varyant UMD3.1'de pozisyon açısından tanımlanmadığı için elenmiştir. HOL ırkında 234 tane SNV'nin Ensembl VEP'e göre; 230 tanesi bilinen, 4 tanesi yeni varyant belirlenmiştir. Belirlenen 28 InDel varyasyon için ise 18 tanesi bilinen 10 tanesi yeni varyant tanımlanmıştır. InDel varyantlarının hepsinin intronda yer aldığı görülmüştür (Çizelge 3.11 ve Çizelge 3.12).

Çizelge 3.11. HOL sığır ırkında incelenen gen bölgelerinde belirlenen varyantlar

Bölge	SNV	Yeni SNV	InDel	Yeni InDel
TLR2	45	3	6	6
TLR6	155	-	17	3
TLR4	74	1	5	1

Çizelge 3.12. HOL sığır ırkında belirlenen varyantların tip ve bölgeye göre etkileri

SNV'ler için;	
Varyasyon tipi ve görüldüğü bölge	Oran, %
Downstream	3
İntron	80
Ekzon	13
Nonsinonim	5
Sinonim	8
Upstream	-
3' UTR	2
5' UTR	2
InDel varyasyonlar için	
	Oran, %
İntron	100

SNV Ts/Tv oranı SnpEff yazılımı ile %2.3 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.16).

Transitions	905
Transversions	400
Ts/Tv ratio	2.2625

Şekil 3.16. HOL ırkında Transisyon ve transversiyon sonuçları.

Nonsinonim varyasyonlar sonucunda ortaya çıkan amino asit değişimleri Şekil 3.17'da verilmiştir. İncelenen gen bölgeleri açısından bakıldığında, TLR2 gen bölgesinde 4 adet, TLR4 gen bölgesinde 5 adet ve TLR6 gen bölgesinde 3 adet nonsinonim varyant olduğu belirlenmiştir.

	A	C	D	E	F	G	H	I	L	N	P	Q	R	S	T	V
A				1												
C		1														
D			1							1						
E			1	1												
F					1											
G						2										
H							2									
I																1
L									1							
N										1					1	
P											1					
Q												2				
R		1										1	1			
S										1				2		
T								1								
V	1							2								2

Şekil 3.17. HOL ırkında Nonsinonim varyasyonların neden olduğu amino asit geçişleri.

3.5.6. Tüm Bireylerin TLR2 ve TLR4 Ekzon Varyantları Haplotip Bulguları

İncelenen TLR2, TLR4 ve TLR6 gen bölgelerinde belirlenen sinonim ve nonsinonim varyasyonlar Çizelgelerde özetlenmiştir (Çizelge 3.5, Çizelge 3.6, Çizelge 3.7). Bu bölgelerde belirlene varyasyonlara göre haplotipler elde edilmiştir (Çizelge 2.18, Çizelge 2.19).

Çizelge 3.13. Ekzonlarda belirlenen varyant ve haplotipler sayısı

Ekzon	SNV	Haplotip
TLR2	33	36
TLR4	24	25
TLR6	46	98

Belirlenen haplotiplerin ırklar arasındaki paylaşımı ve atasal haplotiplerin belirlenmesi için Network programı ile TLR2 ve TLR4 ekzonlarının MJ ağacı çizdirilmiştir (Şekil 3.18, Şekil 3.19).

Çizelge 3.14. TLR2, TLR4 ve TLR6 gen bölgelerinde belirlenen haplotipler

Irk ve Birey	TLR2 Haplotip	TLR4 Haplotip	TLR6 Haplotip	Irk ve Birey	TLR2 Haplotip	TLR4 Haplotip	TLR6 Haplotip
YK1	(1,2)	(1,1)	(7,95)	GAK1	(1,2)	(1,1)	(5,18)
YK2	(1,2)	(2,3)	(5,21)	GAK2	(2,28)	(1,18)	(11,43)
YK4	(7,23)	(1,7)	(26,80)	GAK3	(1,7)	(1,7)	(28,92)
YK5	(2,28)	(1,7)	(40,14)	GAK4	(7,28)	(3,7)	(36,85)
YK6	(2,23)	(1,7)	(52,74)	GAK5	(1,2)	(1,3)	(69,75)
YK7	(1,2)	(1,7)	(11,51)	GAK6	(7,24)	(3,5)	(56,64)
YK8	(2,28)	(22,24)	(45,83)	GAK7	(17,33)	(1,3)	(61,69)
YK9	(6,24)	(1,9)	(35,70)	GAK8	(2,22)	(3,7)	(63,91)
YK10	(1,2)	(3,7)	(11,43)	GAK9	(9,22)	(3,7)	(88,98)
YK11	(2,25)	(3,7)	(39,81)	GAK10	(17,36)	(10,12)	(76,86)
YK12	(2,4)	(7,9)	(49,81)	GAK11	(2,24)	(7,9)	(46,92)
YK13	(1,2)	(3,7)	(11,51)	GAK12	(1,7)	(11,15)	(65,97)
YK14	(2,24)	(1,1)	(50,82)	GAK14	(2,26)	(1,10)	(27,79)
YK15	(2,28)	(1,3)	(48,82)	GAK15	(8,21)	(1,10)	(59,69)
YK16	(1,2)	(1,2)	(12,42)	GAK16	(1,7)	(5,9)	(66,16)
YK17	(2,23)	(1,10)	(11,51)	GAK17	(19,33)	(1,10)	(20,73)
YK18	(1,2)	(1,7)	(21,38)	GAK18	(9,26)	(1,7)	(24,93)
YK19	(2,3)	(1,9)	(2,32)	GAK19	(2,20)	(8,19)	(25,67)
YK20	(1,2)	(7,9)	(31,90)	GAK20	(2,3)	(1,3)	(10,17)
YK21	(2,23)	(1,10)	(34,71)	GAK21	(2,29)	(1,7)	(37,96)
DAK1	(12,31)	(7,9)	(5,19)	BOZ1	(1,7)	(1,1)	(3,30)
DAK2	(1,7)	(3,7)	(56,73)	BOZ2	(18,34)	(3,7)	(6,22)
DAK3	(6,22)	(1,9)	(11,43)	BOZ3	(15,30)	(1,2)	(8,1)
DAK4	(2,4)	(1,20)	(11,44)	BOZ4	(14,30)	(1,21)	(11,41)
DAK5	(2,4)	(3,7)	(5,54)	BOZ5	(15,30)	(1,1)	(23,90)
DAK6	(6,26)	(17,25)	(11,43)	BOZ6	(1,2)	(7,9)	(11,43)
DAK7	(17,33)	(7,9)	(72,29)	BOZ7	(11,7)	(7,9)	(4,34)
DAK8	(4,7)	(7,9)	(4,62)	BOZ8	(1,7)	(1,1)	(5,15)
DAK9	(16,35)	(7,9)	(11,43)	BOZ9	(13,32)	(1,9)	(11,43)
DAK10	(2,27)	(1,7)	(11,43)	BOZ10	(2,4)	(4,13)	(11,94)
DAK11	(6,26)	(1,2)	(33,84)	HOL4	(1,2)	(1,7)	(11,43)
DAK12	(4,7)	(7,9)	(5,55)	HOL45	(1,2)	(1,10)	(11,47)
DAK13	(12,35)	(6,17)	(78,87)	HOL80	(1,2)	(16,23)	(13,48)
DAK14	(5,10)	(2,3)	(5,54)	HOL97	(1,2)	(1,1)	(11,43)
DAK15	(6,22)	(6,17)	(11,43)	HOL99	(1,2)	(7,9)	(9,58)
DAK16	(4,7)	(1,9)	(11,44)	HOL115	(1,10)	(1,1)	(4,60)
DAK17	(1,2)	(1,7)	(5,53)	HOL150	(1,10)	(14,23)	(11,43)
DAK18	(1,2)	(1,9)	(68,75)	HOL157	(1,6)	(1,1)	(9,57)
DAK19	(1,7)	(1,1)	(9,57)	HOL160	(1,10)	(1,3)	(11,43)
DAK20	(6,24)	(7,9)	(77,89)	HOL161	Analiz dışı		



Şekil 3.18. TLR2 MJ ağacı.

Çizelge 3.15. TLR2 referans protein domainlerine (NP_776622.1) göre sinonim ve nonsinonim varyasyon bilgisi

Domain	TLR2(aa)	YK	DAK	GAK	BOZ	HOL	SNP ID
LRR1	54..77	62 N/N	62 N/N	62 N/N	62 N/N		rs68268249
		63 E/D	63 E/D	63 E/D	63 E/D	63 E/D	rs55617172
		68 G/S	68 G/S	68 G/S	68 G/S		rs68268250
LRR2	78..101						
LRR3	102..125		119W/L	119W/L	119W/L		rs211243949
LRR4	126...150						
LRR5	151..175		152 R/Q	152 R/Q		152 R/Q	rs43706434
LRR6	176..199						
LRR7	200..223		201 S/N			201 S/N	rs110491977
		211 I/V	211 I/V	211 I/V	211 I/V	211 I/V	rs43706433
LRR8	224..250	227 F/L	227 F/L	227 F/L	227 F/L		rs68268251
LRR9-10	251.. 308						
LRR11	309..337				315 R/R		rs68268253
		326 H/Q	326 H/Q	326 H/Q	326 H/Q		rs68343167
LRR12	338..361	337 R/Q	337 R/Q	337 R/Q	337 R/Q		rs68343168
LRR13	362..388						
LRR14	389..414	405 T/M	405 T/M	405 T/M	405 T/M		rs68268255
LRR15	415..437	417 N/S	417 N/S	417 N/S	417 N/S		rs68268256
		436 G/G	436 G/G	436 G/G	436 G/G		rs68268257
LRR16-18	438..500						
LRR19	501..524	502 S/A	502 S/A	502 S/A	502 S/A		rs68268258
				530 A/A			novel
				531 G/S			novel
LRR20	533..586	544 F/F	545 F/F	546 F/F	547 F/F	544 F/F	rs68268259
		563 R/H	563 R/H	563 R/H	563 R/H		rs68268260
		569 H/H	569 H/H	569 H/H	569 H/H	569 H/H	rs41830058
TM	588..608			574 R/W			novel
		593 A/A	593 A/A	593 A/A	593 A/A		rs68268261
		594 A/A	594 A/A	594 A/A	594 A/A		rs68343169
		605 T/M	605 T/M	605 T/M	605 T/M		rs68343170
					634A/V		novel
TIR	640..784		644 F/F				novel
					655 V/A		
		665 H/Q	665 H/Q	665 H/Q	665 H/Q		rs68268263
		675 H/H	675 H/H	675 H/H	675 H/H		rs68343171
		685 I/I	685 I/I	685 I/I	685 I/I		rs68268264
		738 E/Q	738 E/Q	738 E/Q			rs207552166
		738 E/E	738 E/E	738 E/E	738 E/E		rs68268266
ATG16Lmotif	761..778	765 P/P	765 P/P	765 P/P	765 P/P		rs68268267

Çizelge 3.16. TLR4 referans protein domainlerine (NP_776623.5) göre sinonim ve nonsinonim varyasyon bilgisi

Domain	TLR4 (aa)	YK	DAK	GAK	BOZ	HOL	SNP ID
LRR1	55..76						
LRR2	79..100						
LRR3	103..124						
LRR4	127..148						
LRR5	151..172		151 N/T			151 N/T	rs8193049
LRR6	176..197						
LRR7	205..225						
			238 N/K				rs8193050
			276 F/F				rs8193051
			347 A/E			347 A/E	rs8193053
LRR8	352..373						
LRR9	374..394		374 P/P	374 P/P	374 P/P	374 P/P	rs8193054
				381 K/R			rs8193055
				385 L/L			rs8193056
				389 G/G	389 G/G		rs8193057
LRR10	400..422						
LRR11	423..444						
LRR12	448..469						
LRR13	472..495				482 S/Y		novel
LRR14	497..518		507 Q/Q	507 Q/Q	507 Q/Q	507 Q/Q	rs8193059
LRR15	521..542						
LRR16	545..568	552 S/S	552 S/S	552 S/S	552 S/S	552 S/S	rs8193060
LRR17	-						
LRR18	-						
LRR19	-						
LRRCT	579..626			589 S/S			rs8193061
			609 C/C			609 C/C	rs8193062
					622 S/S		rs8193063
			625 N/N			625 N/N	rs8193064
			649 G/G		649 G/G	649 G/G	rs8193065
			640 V/I			640 V/I	rs8193066
Trans membran	633..653						
			664 G/G			664 G/G	rs8193067
		674 T/I	674 T/I	674 T/I	674 T/I	674 T/I	rs8193069
				676 D/D			rs8193070
TIR	677..815						

Çizelge 3.17. TLR6 referans protein domainlerine (NP_001001159.1) göre sinonim ve nonsinonim varyasyon bilgisi

Domain	TLR6 (aa)	AB	EAR	SAR	TG	HOL	SNP ID
LRR_RI	<43..164	37 D/N		37 D/N	37 D/N		
LRR1	54..77	61 Q/Q	61 Q/Q	61 Q/Q	61 Q/Q		rs68268271
LRR2	78..101	87 R/G	87 R/G	87 R/G	87 R/G		rs68268272
LRR3	102..122	116 S/P	116 S/P				
LRR4	123..147	135 D/H	135 D/H	135 D/H	135 D/H		rs520121582
LRR5- LRR6	148..196						
LRR7	197..219	214 D/N 217 A/A	214 D/N 217 A/A	214 D/N 217 A/A	214 D/N 217 A/A	214 D/N	rs43702941 rs68268273
LRR8-LRR12	220.354						
LRR13	355..378	374 D/D			374 D/D	374 D/D	rs68268274
LRR14	379..404	395 T/A 400 K/K	395 T/A 400 K/K	395 T/A 400 K/K	395 T/A 400 K/K		rs68268275 rs211657505
LRR15	405..428	425 S/S	425 S/S	425 S/S	425 S/S		rs68268276
LRR16	429..449						
LRR17	450..473		458 H/H	458 H/H			rs68268277
LRR18	474..495						
LRR19	496..519	505 N/N 526 V/A	505 N/N 526 V/A	505 N/N 526 V/A	505 N/N 526 V/A	526 V/A	rs55617146 rs68343174, rs133754378 rs68343175, rs136574510
LRRCT	529..582	526 V 539 D/D	526 V 539 D/D	526 V 539 D/D	526 V	526 V	rs68343176 rs55617465, rs68268279 rs55617193 rs55617317, rs207882984 rs68268280, rs378853146
Trans membran	585..605	589 V/I 605 L/L	589 V/I 605 L/L	589 V/I 605 L/L	589 V/I 605 L/L	589 V/I 605 L/L	rs438448894 rs68268281, rs210580164 rs68343177, rs209572763 rs68343178
TIR	641..784	642 F/F 669 I/V 674 H/H 676 R/R 680 A/A 684 I/I 700 F/F 701 V/V	642 F/F 669 I/V 674 H/H 676 R/R 680 A/A 684 I/I 700 F/F 701 V/V	642 F/F 669 I/V 674 H/H 676 R/R 680 A/A 684 I/I 700 F/F 701 V/V	642 F/F 669 I/V 674 H/H 676 R/R 680 A/A 684 I/I 700 F/F 701 V/V	674 H/H	rs438448894 rs68268281, rs210580164 rs68343177, rs209572763 rs68343178 novel rs68343179 rs55617339, rs211454671 rs55617289, rs207586910 rs55617335 rs68268282
				E/E 710			

4. TARTIŞMA

Canlı hastalık etkenleri ve konak organizma arasındaki ilişkinin, uzun yıllar boyunca yalnız patojen mikroorganizmaların sahip oldukları adezyon, invazyon, replikasyon ve aktif hareket yetenekleri tarafından belirlendiği düşünülmüştür. Dolayısıyla, enfeksiyonun başlangıç aşamasında alınan etken miktarı ve patojenitesinin yüksek olması halinde akut ve ölümcül enfeksiyon gelişeceği, aksi durumda ise sessiz ve subklinik bir enfeksiyon ile sonuçlanacağı yönünde, hemen tüm araştırmacılar tarafından kabul gören klasik bir yaklaşım bulunmaktadır. Konağa ait doğal bağışıklığın ise nesilden nesile aktarılan ve patojene spesifik olmayan, yalnızca fiziksel bir bariyer görevi olduğu kabul edilmiştir (Tizard, 2009). Tüm bunlara rağmen, neden bazı tür ve ırk hayvanların bazı spesifik patojen etkenlere daha dirençli veya tam aksine duyarlı oldukları ise açıklanamamaktadır. Örneğin, rat, köpek ve kanatlı hayvanlar *B. anthracis* etkenlerine tür düzeyinde direnç gösterirken, enfeksiyona karşı direncin kanatlıların sahip olduğu yüksek vücut ısısı nedeniyle gelişmediği yönündeki teori (Turnbull, 1996) biyoinformatik analizlerle destekli moleküler çalışmalarla sorgulanmaya açık hale gelmiştir. Diğer taraftan, konak ve enfeksiyöz etkenler arasındaki denge, her iki taraf için yalnız tür değil, ırk, birey ve hatta cinsiyet düzeyinde bile farklılık gösterebilmektedir. Örneğin, 2000’li yıllarda Scrapie hastalığına dirençli koyun ırkları tanımlanmış ve enfeksiyöz Prion protein scrapie (PrP_{sc}) aminoasit dizisinde 136, 154, 171 nci sıralarda VRQ haplotipine sahip bireyler duyarlılık gösterirken, ARR haplotipi scrapie’ye dirençlilik ile ilişkilendirilmiştir (Groschup ve ark., 2007). Elbette, prion proteinler herhangi bir genetik materyal içermeyen ve konak genomu tarafından translasyonu yapılan tek hastalık etkeni olduğu için, hastalıklara direnç konusunda oldukça özgün bir örnektir. Yine, koyun ve keçilerde yüksek ölümlerle seyreden koyun keçi vebası (PPR), Morbillivirus’lar tarafından oluşturulan ve coğrafik bölgeler arasında filogenetik olarak farklı patojenitelere sahip hat yayılımı gösteren viral bir hastalıktır. Türkiye’nin de içerisinde olduğu Ortadoğu ve Arap yarımadasında etkenin 1 numaralı hattı (Lineage-1) yaygın olarak bulunur ve keçilerde yüksek ölüme yol açarken, koyunlarda klinik olarak dahi fark edilemeyen hafif ateşle seyreder.

Morbillivirusların patojenitesi ise sahip oldukları hemaglutinin proteinlerine göre farklılık göstermektedir. Bu virusun patojenitesindeki farklılıkların açıklanması için yeterli görünmekle birlikte, neden aynı Hat-1 PPR virus suşları ile enfekte olan keçiler daha duyarlı iken, koyunlarda enfeksiyon gelişmediği ise sadece klasik bağışıklık bilgileri ile açıklanamamaktadır (Kul ve ark., 2007). Son on yıl içerisinde, insan ve memeli hayvan genomlarının tanımlanması, moleküler tekniklerin ilerlemesi spesifik kromozom ve gen bölgelerinin, fonksiyonlar ile ilişkilendirilmesine imkan vermiş ve biyoinformatik analizlerle de insan ve hayvan genomundaki varyasyonların etkileri fonksiyonel çalışmalar ile değerlendirilmeye başlanmıştır. Yukarıda örnekleri verilen enfeksiyöz etkenlere karşı direnç mekanizmalarında, model tanıma reseptörleri tarafından patojenlere özgü moleküler modellerin tanınmasında ve aktif bağışıklığın başlatılması ile sürdürülmesinde görevli olan TLR gen bölgelerindeki polimorfizmin büyük rol oynayabileceği açıktır.

4.1.YNS'de Yükseltgenemeyen Bölgeler, Analiz Dışı Bırakılan Birey ve Filtrelenen Varyantlar

İncelenen TLR2, TLR4 ve TLR6 genlerinde toplamda 13 bireyde 5 farklı bölge (Çizelge 3.2) PZR'da yükseltgenemediği için bu bölgelerin YNS datası elde edilememiştir. Yükseltgenemeyen tüm bölgeler ilgili genlerin intronlarında bulunmaktadır. Bu bölgelerin yükseltgenememesi ileri ya da geri yönlü oligonükleotitlerin ilgili bölgelere bağlanamaması ve/veya yüksek GC içeriği (>%50) nedeniyle olabilmektedir (Pelt-Verkuil ve ark., 2008). Bu bölgeler incelendiğinde, GC içeriğinin en fazla %75, en düşük %43 olduğu görülmektedir. GC içeriği en yüksek olan bölge sadece 3 bireyde yükseltgenememiştir. Ayrıca en fazla yükseltgenemeyen (n=7) bölgenin GC içeriği %43'tür. Dolayısıyla yükseltgenmemenin nedeninin PZR'ın bağlanma aşamasında olduğu düşünülmektedir. Çünkü aynı oligonükleotitler bazı bireylerde bağlandığı ve yükseltgenmede sorun yaşanmadığı, ancak bu bölgelerde oligonükleotitlerin bağlandığı pozisyonlara yakın varyasyonlar olduğu görülmüştür. Bu yükseltgenme probleminin ilgili bölgelerdeki baz değişimlerine göre dejenere oligonükleotitler tasarlanarak tamamlanabileceği düşünülmektedir. Bunun yanında YNS datası olmayan bölgelerle ilgili olarak belirgin bir ırk özgüllüğü göze çarpmamaktadır.

Türkiye’de hayvan yetiştiriciliğinde yaşanan önemli problemlerden biri hayvanlar ile ilgili olarak verim, hastalık ve soy ağacı gibi kayıtlarının tutulmamasıdır (Yıldız, 2008). Tezde incelenen HOL ırkı bireylerinden (n=10) bir tanesinin analizler sonucunda yerli ırklarda bulunan varyantları taşıdığı belirlenmiştir. Bunun üzerine HOL ırkı biyolojik materyalinin temin edildiği çiftlikle görüşülmüş ve bu bireyin 3 nesil öncesinde YK ırkı bir birey ile melezlenmiş olabileceği öğrenilmiştir. HOL161 kodlu birey HOL ırkını temsil etmediğinden analiz dışında bırakılmış ve HOL ırkında 9 birey ile analizlere devam edilmiştir. Seabury ve ark., (2010), Fisher ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmalarda bazı ırkların sadece bir birey ile temsil edildiği görülmüştür. Dolayısıyla bu bireyin elenmesinin analiz sonuçlarına negatif etkilediği düşünülmemektedir.

Filtreleme sonucunda, GAK ırkında 9 adet, BOZ ırkında 8 adet, DAK ırkında 6 adet, HOL ırkında 3 adet ve YK ırkında 1 adet SNV’nin, HOL ırkından 2 tane ve YK ırkından bir tane InDel varyantın okuma derinliği değerinden dolayı elenmesine karar verilmiştir. Ancak elenen bazı varyantların genom veri tabanlarında bildirilmiş ve SNP ID’si olan varyantlar olması dikkat çekmiştir. Örneğin, filtre uyarısı olan ve 100 tane okuması olan bir SNV incelendiğinde Adenin nükleotiti içeren 10 (A, %10) ve Guanin nükleotiti içeren 90 (G, %90) okuması görülmüştür. Buna bağlı olarak %10A bazı ortaya çıkmış olabileceği için bu varyantlar G olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca incelenen yerli ırklarda görülen filtrelerin SNV-küme filtresi olduğu dikkat çekmiştir. Bu filtreleme, 10bp’lik bir alanda yan yana 3 SNV bulunması durumunda işaretleme yapılması koşuluyla oluşturulmuştur. IGV’de incelendiğinde ise doğru SNV çağrılarının olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle de yerli ırklar gibi genetik çeşitliliği yüksek olan canlılar incelenirken SNV küme filtresinin 3’ten yüksek bir değer kullanılmasının tercih edilmesinin ileriki çalışmalarda daha uygun olabileceği öngörülmektedir.

4.2.Transisyon/Transversiyon (Ti/Tv) Oranı

YNS’den elde edilen varyantların kalitesi iki şekilde ölçülebilmektedir. Bunlar transisyon (primidin-primidin ya da pürin-pürin dönüşümü) ve transversiyon (primidin-pürin ya da pürin-primidin değişimi) oranı (Transisyon/transversiyon, Ti/Tv) ve SNV dizilim karşılaştırmasıdır (Baes ve ark., 2014). Ti/Tv oranı,

nükleotitlerin bulunduğu pozisyondan, komşu nükleotitlerden ya da “cryptic” faktörlerden etkilenmektedir (Seplyarskiy ve ark., 2012). İnsan tüm genomunda Ti/Tv oranı 2,0-2,2 aralığında olduğu (Ebersberger ve ark., 2002; DePristo ve ark., 2011) ve metilasyon çalışmalarında ise bu oranın yükseldiği bildirilmiştir (Hodges ve ark., 2009). Oranın düşük olması elde edilen datanın rastgele sekans hatalarından ve yanlış pozitif okumaların genoma hizalanmasından kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir (Baes ve ark., 2014). Süt sığırlarında tüm genom YNS datasında varyant belirleme yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada Ti/Tv oranı en yüksek 2,13 en düşük 1,97 olarak belirlenmiştir (Baes ve ark., 2014). Doktora tez materyalinde incelenen gen bölgelerinde en yüksek Ti/Tv oranı GAK (2,48) ırkında belirlenmiştir. Bu ırkı DAK (2,46), BOZ (2,41), YK (2,35) ve HOL (2,26) ırkları takip etmektedir. TLR2, TLR4 ve TLR6 gen bölgeleri için belirlenmiş bir Ti/Tv oranı bulunmamaktadır ancak incelenen ırklarda belirlenen varyant sayısı ve Ti/Tv oranının orantılı olduğu görülmüştür. Elde edilen bu oran ileride yapılabilecek çalışmalar için bir karşılaştırma verisi oluşturmuştur.

4.3.TLR2, TLR4 ve TLR6 Belirlenen Varyasyonlarının Karşılaştırması

Gen bölgelerindeki varyasyonların belirlenmesine yönelik olarak yapılan çalışmaların başlıca amaçları, incelenen ırkların ne oranda çeşitlilik gösterdiği ve belirlenen varyantların fenotipik olarak etkilerinin olup olmamasıdır.

TLR2 gen bölgesinin hem tek başına hem de TLR1 ve TLR6 ile heterodimer özelliği göstererek tanıdığı ligandlar göz önüne alındığında (Çizelge 1.1.) bu bölgede belirlenecek varyantların hastalıklara direnç açısından oldukça önemli olduğu anlaşılmaktadır. TLR2 gen bölgesi için tez materyalinde en fazla varyant BOZ (n=10, 202) ırkında belirlenmiştir. Bu ırkı GAK (n=20, 170), DAK (n=20, 169), YK (n=20, 145) ve HOL (n=9, 60) ırkları takip etmektedir. Yeni varyasyonlar açısından incelendiğinde ise, bu bölgede en fazla yeni varyasyon DAK (30) ırkında belirlenmiş olup, bu ırkı BOZ (29), GAK (25), YK (23) ve HOL (9) ırkları takip etmektedir. Sadece ekzonlarda bulunan ve dolayısıyla fonksiyonel etkisi olması beklenen varyantlar incelendiğinde ise TLR2 ekzon bölgesinde GAK ve DAK ırklarında 28 (17ns, 11sn), BOZ ırkında 26 (15ns, 11sn), YK ırkında 23 (13ns, 10sn) ve HOL

ırkında 6 (4ns, 2sn) varyant belirlenmiştir. Bu değerler literatür verileri ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek oldukları görülmektedir. Seabury ve Womack (2008) Angus, Brahman, Charolais, Holstein, Limousin, Nelore, Piedmontese ve Romagnola sığırlarından birer birey kullanarak TLR2, TLR6 ve PGLYRP1 genleri ekzonları ve 3'UTR bölgelerinde bulunan varyasyonları incelemişler ve TLR2 geninde 41 tanesi yeni, 29 tanesi ekzonda ve 15 tanesi nonsinonim olmak üzere toplamda 43 tane varyant belirlemişlerdir. Mariotti ve ark. (2009) Avrupa'nın farklı bölgelerinden olmak üzere toplamda 16 sığır ırkında TLR2, TLR4 ve TLR6 gen bölgelerinin kısmen incelemişler ve TLR2 geninde kodlanmayan 3 tane SNV belirlemişlerdir. Mariotti ve ark. (2009) çalışmasıyla belirlenen SNV'lerden 3 tanesi daha önce Seabury ve Womack (2008) tarafından bildirilmiştir. Seabury ve ark. (2010) *Bos taurus* ve *Bos indicus* sığırlarından 37 ırkta doğal direnç ile ilgili olan 11 geni (TLR1-10 ve PGLYRP1) incelemişler ve TLR2 için, 13 tanesi ns olmak üzere 32 adet varyant belirlemişlerdir. Fisher ve ark. (2011) *Bos taurus*, *Bos indicus* sığırlarını kapsayan 31 sığır ırkı ve *Bos taurus-Bos indicus* hibritlerinde pirosekanslama yöntemi ile TLR1-10 genleri incelemişlerdir ve TLR2 (3.224bç) geninde 6ns olmak üzere toplamda 44 tane SNV belirlemişlerdir. Seabury ve Womack (2008), Mariotti ve ark. (2009), Seabury ve ark. (2010) ve Fisher ve ark (2011) tarafından yapılan çalışmalarda ırkları temsil eden örneklemin daha az sayıyla yapılmış olması, incelenen bölgelerin geni kısmen kapsamaması varyant sayısının düşük olmasının nedeni olabilir. Ancak bu çalışmalarda incelenen ırkların yapay seleksiyon baskısı altında olması, bununla beraber sunulan çalışmada yüksek düzeyde çeşitlilik gösteren yerli ırkların yapay seleksiyondan ziyade doğal seleksiyona uğramış olması da göz önüne alınmalıdır. Özellikle verim yönünden seleksiyon yapılmasının sağlık açısından olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir (Ingvarsen ve ark., 2003; Oltenacu ve Broom, 2010) ve bu nedenle incelenen yerli ırklarda belirlenen varyantların hastalıklara direnç açısından olumlu etkide bulunma potansiyellerinin olduğu düşünülmektedir.

TLR4 gen bölgesinin tanıdığı ligandlar incelendiğinde (Çizelge 1.1.) diğer gen bölgelerine oranla daha sınırlı olduğu sadece Gram (-) bakteriler üzerinden etkin olduğu görülmektedir. TLR4 gen bölgesinde, en fazla varyasyon GAK (88) ırkında belirlenmiş olup, bu ırkı DAK (85), HOL (80), BOZ (63) ve YK (21) ırkları takip

etmektedir. Bu bölge için en fazla yeni varyasyon GAK (5), BOZ (5) ve DAK (4) ırklarında belirlenmiştir. YK ve HOL ırklarında ise yeni belirlenen varyasyon sayısının aynı (2) olduğu görülmektedir. TLR4 ekzon bölgesinde HOL ırkında 15 (5ns, 10sn), DAK ırkında 14 (4ns, 10sn), GAK ırkında 12 (2ns, 10sn), BOZ ırkında 9 (2ns, 7sn) ve YK ırkında 2 (1ns, 1sn) varyant belirlenmiştir. Mariotti ve ark. (2009) 16 sığır ırkında kısmen incelenen TLR4 gen bölgesi için iki adet kodlanmayan ve bir adet sinonim (sn) olmak üzere 3 tane SNV belirlemişlerdir. White ve ark. (2003) TLR4 gen bölgesini inceledikleri sığırlarda, *Bos indicus* grubunda 5 tane nonsinonim, 21 tane sinonim ve 3 tane kodlanmayan bölgede olmak üzere toplamda 29, *Bos taurus* sığırlarında 1 tane nonsinonim, 1 tane sinonim ve 3 tane kodlanmayan bölgede olmak üzere toplamda 5 tane varyant belirlemişlerdir. Seabury ve ark. (2010) ise 37 ırkta TLR4 geni için 6 tanesi ns olmak üzere 22 adet varyant belirlemişlerdir. Fisher ve ark. (2011) TLR4 (3.470bç) geninde 3 tanesi ns olmak üzere toplamda 28 tane SNV belirlemişlerdir. Bu çalışmalardan elde edilen varyantlar göz önüne alındığında TLR4 gen bölgesi için de yüksek düzeyde çeşitlilik belirlendiği anlaşılmaktadır.

TLR6 geni patojen tanıma açısından etkinliğini TLR2 ile heterodimerleşerek göstermektedir ve bu heterodimer yapı ile ligandları tanıyabilmektedir (Çizelge 1.1.). TLR6 geninde en fazla varyasyon yine GAK (323) ırkında belirlenmiştir. Bu ırkı DAK (258), YK (232), BOZ (200) ve HOL (176) ırkları takip etmektedir. En fazla yeni varyasyon ise GAK (76) ırkında belirlenmiştir. Bu ırkı YK (23), DAK (19), BOZ (18) ve HOL (3) ırkları takip etmektedir. TLR6 ekzonunda ise GAK ırkında 28 (9ns, 19sn), DAK ırkında 26 (9ns, 17sn) YK ırkında 25 (9ns, 16sn) BOZ ırkında 24 (8ns, 16sn) ve HOL ırkında 8 (3ns, 8sn) tane varyant belirlenmiştir. Seabury ve Womack (2008) TLR6 geninde 19 tanesi yeni, ekzonda belirlenen 25 SNV'den 10 tanesi nonsinonim olmak üzere toplamda 28 tane SNV belirlemişlerdir. Mariotti ve ark. (2009) TLR6 geninde kodlanmayan bölgede bir adet SNV ve ekzon bölgesinde de bir adet nonsinonim (ns) (Asp855Asn) SNV olmak üzere 2 tane SNV belirlemişlerdir. Seabury ve ark. (2010) TLR6 geni için 7 tane ns olmak üzere 15 adet varyant belirlemişlerdir. Fisher ve ark. (2011) TLR6 (2.327bç) geninde yine 3ns nonsinonim olmak üzere toplamda 15 tane SNV belirlemişlerdir.

TLR2 geninde en fazla varyasyon belirlenen BOZ ırkı ve en düşük varyasyon belirlenen HOL ırkı çalışmada kullanılan diğer ırklardan farklı olarak *Bos taurus primigenus* alt grubundan köken almaktadır (Alpan ve Arpacık, 1996). Aynı alt gruptan köken almalarına rağmen HOL ırkı yapay seleksiyona maruz kalmış bir ırktır. BOZ ırkı ve diğer yerli ırklar ise doğal seleksiyona maruz kalmışlardır. Doğal seleksiyon ile hastalıklara ve olumsuz çevre koşullarına karşı duyarlı olan hayvanlar üreme şansı bulamadan popülasyondan elenmiştir (Haldane, 1992). Dolayısıyla TLR2 ve TLR6 gen bölgesi HOL ırkında belirlenen düşük varyasyon sayısı yapay seleksiyona bağlı varyasyon kaybının bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Jann ve ark. (2008) L227P (Lösin227Fenilalanin) H305P (Histidin305Prolin), H326Q (Histidin326Glutamin) amino asit değişimlerinin pozitif seleksiyon baskısı altında olduğunu bildirmişlerdir. Bunlardan 227 nolu amino asit yerli ırklarda Lösin, 326 nolu amino asit ise Glutamin olarak belirlenirken 305 nolu amino asit değişimine incelenen bireylerde rastlanmamıştır. Bunun yanında Jann ve ark. (2008) L227P, H326Q, N417S ve H665Q aa değişimlerinin *Bos indicus* sığırlarına özgün olduğunu ortaya koymuşlardır. Yerli ırklarda bunların yanısıra T405M varyasyonu da belirlenmiştir. Bu varyasyonun da Sahiwal (*Bos indicus*) sığırlarına özgün olduğu bildirilmiştir (Jann ve ark., 2008). Yerli sığır ırkları ile ilgili olarak yapılan çalışmalar bu ırkların *Bos taurus* ve *Bos indicus* melezi olduğunu göstermektedir (Loftus ve ark., 1999; Decker ve ark., 2014). Yerli ırklarda TLR2 gen bölgesinde belirlenen bu aa değişimleri ve Fisher ve ark. (2011) tarafından TLR2, TLR4 ve TLR6 gen bölgelerinde *Bos taurus* sığırlarında görülmeyen allellerin de incelenen yerli sığır ırklarında görülmesi bu görüşü desteklemektedir. Bunun yanında Werling ve ark. (2009) TLR2 gen bölgesinde ırklar arasında görülen varyasyonların farklı coğrafik bölgelere bağlı farklı mikrobiyal çevreden kaynaklanabileceğini önermişlerdir. TLR2 gen bölgesindeki varyasyon bu açıdan değerlendirildiğinde, yerli ırklarda görülen H326Q ve R563H aa değişimlerinin *Bos indicus* sığırları ile ortak çevresel şartlar altında yetiştirilen sığırlarda da görülebileceği bildirilmiştir (Jann ve ark., 2008). İncelenen ırkların *Bos indicus* kökenli sığır ırklarının yetiştirildiği coğrafyaya yakın olması ve bu nedenle benzer çevre şartlarına maruz kalınması *Bos indicus*'a özgü olduğu düşünülen amino asit değişimlerinin sayısını arttırmış olabilir.

Önceleri doğal direncin özgün olmayan (nonspesifik) bağışıklık sisteminin bir parçası olarak değerlendirildiği ancak son yıllarda yapılan etken ve ifade düzeyi çalışmaları ile belirli mikroorganizma gruplarına karşı özgün olduğu belirlenmiştir. Örneğin, *Mycobacterium avium paratuberculosis*'in (MAP) sebep olduğu John's hastalığı ile ilgili yapılan bir çalışmada TLR2 ve TLR4 ifadesinin arttığı bildirilmiştir (Wadhwa ve ark., 2013). Mucha ve ark. (2009) MAP enfeksiyonu yatkınlığı ile TLR2 ve TLR4 gen bölgelerindeki ns amino asit değişimlerini inceledikleri çalışmada TLR2'de Ile680Val ve Pro681His ile ilişkilendirmişlerdir. TLR4 gen bölgesi için yine MAP enfeksiyonu açısından Garza-Gonzalez ve ark. (2007) Asp299Gly ve Thr399Ile, Mucha ve ark. (2009) ise Gly298Arg ve Asp299Asn değişiminin sığırlarda yatkınlıkla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Sonuçları sunulan bu araştırmada incelenen bireylerde, MAP enfeksiyonuna yatkınlık ile ilişkili olarak bildirilen bu aa değişimlerine rastlanmamıştır. Ruiz-Larranaga ve ark. (2010) ise yine MAP duyarlılığı üzerine yaptıkları çalışmada, TLR2 gen bölgesinde 2 intronik ve 12 ekzonik varyant, TLR4 gen bölgesinde 6 intronik ve 3 ekzonik varyant incelemişlerdir. TLR2 gen bölgesinde hastalık yatkınlığı ile ilişkili allelik ya da genotipik bir ilişki belirleyemeseler de hasta hayvanlarda TLR2'de 152Q, 201S, 211V, 273L ve 575H değişimlerinden oluşan haplotipin enfekte hayvanlarda daha fazla görüldüğünü bildirmişlerdir. TLR2 için incelenen ekzonik varyantlardan R152Q, S201N, I211V değişimlerine DAK ve HOL ırklarında, R152Q ve I211V değişimi GAK ırkında belirlenmiştir ancak yatkınlık ile ilişkilendirilen haplotip bu ırklarda gözlenmemiştir. YK ve BOZ ırklarında bu varyantların hiç biri belirlenmemiştir. Ruiz-Larranaga ve ark. (2010) TLR4 gen bölgesinde 5'UTR'de rs29017188 (C/G) kodlu SNV'nin gen ifadesi düzeyindeki etkisinden dolayı duyarlılık ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir. İncelenen tüm ırklarda rs29017188 SNV'sine rastlanmıştır. Bu varyant için en yüksek minör allel frekansı GAK (0,97) ırkında belirlenmiştir ve bu ırkı DAK (0,95), YK (0,71), HOL (0,55) ve BOZ (0,5) ırkı takip etmektedir. Fisher ve ark. (2011) MAP enfeksiyonu ile TLR2 bölgesinde 3 SNV, TLR4 bölgesinde 1 SNV ve TLR6 bölgesinde 1 SNV'yi MAP enfeksiyonuna duyarlılık ile ilişkilendirmişlerdir. Bu varyantların TLR2 üzerindeki resesif karakterde, TLR4 ve TLR6 üzerinde olanların ise aditif etkili lokuslar olduğunu belirtmişlerdir. Tez dataları bu varyantlar açısından incelendiğinde, MAP ile ilişkili

bulunan tüm varyantlara HOL bireylerinde rastlanmıştır, yerli ırklarda ise rs68268245 kodlu varyant hariç farklı frekanslarda bulunduğu görülmüştür.

TLR2 gen bölgesinde en fazla varyantın belirlendiği BOZ, GAK ve DAK ırklarının da kan parazitlerine karşı dirençli olduğu bilinmektedir (TURKHAYGEN). Sığırlarda önemli kan parazitleri kene gibi vektörlerle taşınmakta ve bulaştırılmaktadır. Özellikle sıcak ülkelerde, hayvanlarda parazit mücadelesi ve tedavi için yapılan masraflar enfekte hayvanlardaki verim kayıpları olumsuz ekonomik etkiye yol açmaktadır (Kaiser, 2010). Loftus ve ark. (1999) Yakın Doğu'da yetiştirilen sığırların komşu birleştirme ağacına göre, BOZ ırk, Macaristan Bozu ve N'Dama sığırları ile aynı dalda yer aldığını bildirmişlerdir. N'Dama sığırlarının *Trypanosoma*'ya karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (Murray ve ark., 1981). TLR2 bölgesinin bu kan parazitine karşı immun yanıtı düzenleyici etkisi olduğu (Ropert ve Gazzinelli, 2004) göz önüne alındığında belirlenen varyantların kan paraziti direnci ile ilgisi olabileceği düşünülmektedir. Bunun yanında *Babesia* gibi apikompleksan parazitler dahil olmak üzere bir çok organizmanın yapısında bulunan HSP'ler (heat shock protein, HSP) (Robert, 2003), immun yanıtı TLR2 ve TLR4 aracılığı ile uyardığı bildirilmiştir (Asea ve ark., 2002). Düzlü ve ark. (2015) ülke çapında ekonomik kayıplara neden olan *Babesia* türlerinin Erzurum yöresinde melez sığırlarda belirlenmesi üzerine yaptıkları bir çalışmada sağlıklı görümlü sığırları incelemiş (n=300) ve 45 tanesinde etken belirlemişlerdir. Ayrıca Deniz ve ark. (2012) Diyarbakır yöresindeki sığırlarda *Theileria* türlerinin belirlenmesi üzerine yaptıkları bir çalışmada 100 adet sağlıklı sığır incelemişler ve bunun 24 tanesinde *Theileria* etkenini tespit etmişlerdir. Yerli sığır ırkları ve melezlerinin bu kan parazitlerini taşımalarına rağmen klinik olarak saptanabilir hastalık belirtisi göstermemeleri bu hayvanların dirençli olduğunun bir göstergesi olabileceğini düşündürmektedir.

TLR2 gen bölgesi için, omurgalı türler arası yapılan bir çalışmada bu gen bölgesinde fonksiyon kaybı hiç görülmediği ve bunun TLR2'nin kısıtlı bir seleksiyon altında olduğunu, buna karşın TLR2'nin heterodimer yaptığı TLR1 ve TLR6'nın türler arasında çok fazla çeşitlilik gösterdiği bildirilmiştir (Roach ve ark., 2005). Tez dataları incelendiğinde en fazla varyasyonun TLR6 bölgesinde görülmesi bu veriyi destekler niteliktedir. TLR2/TLR1 heterodimeri gram-negatif bakterilerin

triasillipopeptidlerine ve TLR2/TLR6 heterodimerinin diasillipopeptid ya da *Mycoplasma*'ya bağlandığı gösterilmiştir (Takeuchi ve ark., 2001; Jin ve Lee, 2007). Turner ve ark. (2014) gram-negatif ve gram-pozitif bakteriler sebepli endometrit olgularında endometrium epitel ve stroma hücrelerinin TLR2/TLR1 ve TLR2/TLR6 heterodimerleri ile yanıt oluşturdıklarını hücre kültürü çalışmalarında göstermişlerdir. Song ve ark. (2014) TLR6 gen bölgesindeki varyantların sığır tüberkülozuna (bTB) yatkınlığı için 4 SNV'yi incelemişlerdir. Amino asit değişimine sebep olmayan bu varyantlar için yerli ırklar incelendiğinde allel frekansları üzerinde belirgin bir farklılık olmadığı görülmüştür. Bunun yanında Bermingham ve ark. (2014) bTB direnç ile ilgili olarak hasta ve sağlıklı hayvanlarda SNV dizilim analizi ile tüm genom taraması yapmışlar ve Protein Tirozin Fosforaz Reseptör T (*protein tyrosine phosphatase receptor T*, PTPRT) ve Miyozin IIIB (*myosin IIIB*, MYO3B) genlerinin bTB direnci ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.

White ve ark. (2003) TLR4 gen bölgesini inceledikleri sığırlarda belirledikleri varyantlardan N151T, N238K, A347E ve T674I DAK ırkında, K381R ve T674I GAK ırkında, N151T, A347E ve T674I HOL ırkında belirlenirken YK ve BOZ ırklarında sadece N151T varyantı belirlenmiştir. Bu varyant TLR4 proteininin transmembran domaininde olduğu için patojen reseptör ilişkisinde etkisi olduğu düşünülmemektedir. Ingvarstsen ve ark. (2003) süt verimi ile ketozis, ovaryum kistleri, mastit ve ayak hastalıkları gibi hastalıklar arasında negatif genetik korelasyon olduğunu bildirmişlerdir (Ingvarstsen ve ark., 2003). Bir diğer çalışmada, sütte somatik hücre sayısı (Somatic cell score, SCS) ve TLR4 gen bölgesindeki üç SNV'nin (intron 1-rs8193046 A/G, ekzon 3- rs8193060 C/T ve 5'UTR- rs29017188 C/G) ilişkileri incelenmiştir (De Mesquita ve ark., 2012). En düşük SCS değeri intronda A allelini ve diğer bölgelerde C alleli bulunan hayvanlarda, yüksek SCS değeri ise ekzon 3'te T, diğer bölgelerde G allelini taşıyan hayvanlarda belirlenmiştir (De Mesquita ve ark., 2012). Tez materyali bu SNV'ler açısından incelendiğinde, intron varyantı için en yüksek A alleli frekansı BOZ (0,45) ırkında belirlenmiştir. Bunu HOL (0,44), YK (0,27) ve DAK (0,05) ile GAK (0,05) ırkları takip etmektedir. Ekzon C varyantı için en yüksek frekans BOZ (0,6) ırkında belirlenmiştir. Bunu YK (0,57) ve GAK (0,57), HOL (0,55) ve DAK (0,35) ırkları takip etmektedir. UTR varyantı için ise en yüksek C frekans en yüksek GAK (0,97) ırkında belirlenmiştir.

Diğer ırklarda ise DAK (0,95), YK (0,67), HOL (0,44) ve BOZ (0,5) olarak belirlenmiştir. HOL ırkı için elde edilen değerler Brezilyada yetiştirilen Holştayn sığırlarında elde edilen allel frekansları ile uyumluluk göstermektedir (sırasıyla, A alleli 0,54, C alleli 0,64 ve C alleli 0,55) (De Mesquita ve ark., 2012). Bu veriler doğrultusunda, incelenen ırklar arasında en düşük SCS değerinin BOZ ırkında görüleceği düşünülmektedir.

Sığırlarda mastit olgularında TLR4 gen ifadesinin değiştiği (Goldammer ve ark., 2004; Zheng ve ark., 2006) ve TLR4 gen bölgesi polimorfizmi ile mastit direnç/duyarlılığı arasında ilişki bulunduğu belirlenmiştir (Sharma ve ark., 2006; Wang ve ark., 2007). Bunun yanında süt üretimi ve mastit ile ilgili olarak yapılan bir başka çalışmada da TLR4 kantitatif karakter lokusları (KKL) arasında tanımlanmıştır (Ogorevc ve ark., 2009). Tez dataları incelendiğini bu literatür verileriyle uyumlu bir şekilde TLR4 gen bölgesi için en fazla varyasyon bulunan ilk üç ırk süt verim yönlü yetiştirilen ırklar olan sırasıyla GAK, DAK ve HOL ırklarında belirlenmiştir. Bu durum ileride yapılacak fonksiyon çalışmaları ile aydınlatılmalı ve ilgili varyantların mastitise karşı duyarlılık ya da direnç yönünde etkili olup olmadıkları ortaya konulmalıdır.

4.4.TLR2, TLR4 ve TLR6 Ekzon Haplotiplerinin Karşılaştırması

Fisher ve ark. (2011) TLR2 geninde belirledikleri 44 varyanta göre 38 haplotip, TLR4 geninde belirledikleri 28 varyanta göre 29 haplotip ve TLR6 geninde belirledikleri 15 varyanta göre 20 haplotip olduğunu bildirmişlerdir. Wang ve ark. (2014) TLR4 gen bölgesindeki 6 varyanta göre 21 haplotip belirlemişlerdir. White ve ark. (2003) *Bos taurus* ve *Bos indicus* sığırlarını temsil eden 39 sığırdaki, TLR4 bölgesinde 32 varyanta göre 20 tane haplotip belirlemişlerdir. Haplotip çeşitliliği açısından tez verileri incelendiğinde TLR2 bölgesinde 22 varyanta göre 36 tane, TLR4 gen bölgesinde 24 varyanta göre 25 haplotip ve TLR6 gen bölgesinde 46 varyanta göre 96 haplotip belirlenmiştir. İncelenen üç gen bölgesi göz önüne alındığında belirlenen varyant ve haplotip çeşitliliğinin güncel literatür verileri incelendiğinde en yüksek değerlere sahip olduğu saptanmıştır. Irk bazında değerlendirildiğinde ise HOL ırkının haplotip ve varyant değerleri literatür ile uyumlu iken yerli ırkların total haplotip ve varyant çeşitliliğine katkısının oldukça

yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum 96 haplotipten sadece 10 tanesinin HOL ırkından geldiği TLR6 gen bölgesi için özellikle dikkat çekicidir.

TLR2 ekzonu için, atasal haplotiplerin Haplotip 1 ve 2 olduğu belirlenmiş, HOL ırkının belirlenen haplotiplerden sadece 1, 2, 6 ve 10. haplotipleri taşıdığı, geriye kalan 32 haplotipin ise yerli ırklara özgü olduğu görülmüştür. TLR4 gen bölgesinin ekzonu için, 1, 7 ve 9. haplotiplerin atasal haplotip oldukları, belirlenen diğer haplotipler için ise ırka özgü bir dağılım olmadığı saptanmıştır. TLR6 gen bölgesinin ekzonu için, 11 ve 43. haplotiplerin atasal haplotipler olduğu, belirlenen diğer haplotipler için ise ırka özgü bir dağılım göstermediği belirlenmiştir. Ancak ırklara özgü olduğu düşünülen TLR2 haplotiplerinin doğrulanması için *Bos indicus* ve *Bos taurus* kökenli saf ırklardan elde edilecek haplotip verileri ile karşılaştırılma yapılmasının uygun olacağı düşünülmektedir. Bu konuda güncel literatür verilerinde belirlenen varyantların hangi haplotipleri oluşturduklarının yayınlanmamış olması da büyük bir eksiklik olarak görülmüş, tez datalarının karşılaştırılması yapılamamıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yirminci yüzyılın sonundan itibaren teknolojinin hızla ilerlemesi ve yaşam bilimlerine bütünleştirilmesi ile beraber, canlıların fenotipik karakterlerinin altında yatan genetik mekanizmaları belirlemeye yönelik kullanılan moleküler teknikler daha detaylı bilgi sağlayan araçlara dönüşmüştür. Yeni Nesil Sekanslama analizi bunlardan birisidir ve sunulan araştırmada bu analiz kullanılarak TLR2, TLR4 ve TLR6 genleri Yerli Kara, Güney Anadolu Kırmızısı, Doğu Anadolu Kırmızısı ve Boz yerli ırkları ile Holştayn kültür ırkında çeşitli biyoinformatik analizler yardımıyla incelenmiştir. Seçilen analiz yöntemlerinin; Ti/Tv oranı değerleri, haritalama kalite değerleri ve bireylerden elde edilen sekans verilerine göre metodolojik olarak uygun ve yeterli olduğu düşünülmektedir. Ancak, yerli ırklar gibi genetik çeşitliliği yüksek olan canlılar incelenirken göz önünde bulundurulması gereken 2 ölçüt belirlenmiştir. Bunlardan birisi, yükseltgenme problemi varlığında dejenere oligonükleotitler tasarlanmasına ihtiyaç duyulabileceği, bir diğeri ise filtreleme işleminde SNV küme filtresinin 3'ten yüksek bir değer tercih edilmesi gerekebileceğidir. İncelenen örnekler arasında sadece bir birey analiz dışı bırakılmıştır. O da hem *Bos indicus* hem de *Bos taurus* 'tan köken alan sığır ırklarına özgün paternler taşıdığı belirlenen bir Holştayn sığıridir. Böylece hatalı örnekleme oluşturacağı sapmanın önüne geçilmiş olup, ırkların karşılaştırılmasına yönelik çalışmalarda güvenilir kayıt bilgisinin ne kadar önemli olduğu bir kez daha anlaşılmıştır.

Doğal direncin anahtar moleküllerinden olan TLR'ler ile ilgili olarak yapılan çalışmalar bu bölgelerde bulunan varyasyonların patojen tanımada dolayısıyla hastalıklara karşı dirençlilik/duyarlılık üzerinde etkili olduklarını bildirmektedir (Werling ve ark., 2009). TLR gen ailesi içerisinde ise ekonomik kayıplar açısından önemli olan bakteri, mantar ve kan protozoonlarını tanıma ve immun sistemi harekete geçirmede öne çıkan 3 gen bulunmaktadır; TLR2, TLR4 ve TLR6. Bu genlerdeki varyasyonların ligandların tanıma potansiyelini arttırdığı bilinmektedir. İncelenen yerli ırklarda güncel literatür verilerine oranla her 3 gen bölgesi için de yüksek düzeyde varyant çeşitliliği ortaya konulmuştur. Araştırmadan elde edilen tüm gen bilgilerinin genom veri tabanlarına girişleri yapılarak literatüre katkı sağlanması

planlanmaktadır. Heterodimer olarak fonksiyon gösteren TLR'ler için amino asit değişimine sebep olan varyasyonların, ligand yelpazesini genişletme etkisinden dolayı önemli oldukları ve direnç/duyarlılık açısından aday bölgeler olabilecekleri düşünülmektedir. Özellikle TLR2 gen bölgesinde sadece yerli ırklarda görülen haplotipler ve TLR4 gen bölgesinde De Mesquita (2012) tarafından düşük SCS değeri ile ilişkili olabileceği iddia edilen ve yüksek frekansla Boz ırkında belirlenen varyantlar bunlardan başlıcalarıdır. Bu varyantları taşıyan bireylerin popülasyonlarda belirlenerek, ilgili TLR bölgesini hedef alan antijen spesifik fonksiyon testleri yapılması, hücre içi yolakların ve dolayısıyla fenotip üzerine etkilerinin incelenmesi önerilmektedir.

Sunulan araştırmada elde edilen varyantlar değerlendirildiğinde, Türkiye yerli sığır ırklarının *Bos indicus* kökenli sığırlarda bulunan varyantları da taşıdıkları belirlenmiştir. Bu durum için olası iki sebep bulunmaktadır, birincisi moleküler kanıtlarla (Loftus ve ark., 1999; Decker ve ark., 2014) da desteklenen Özcan ve Yalçın (1985) GAK ırkının fenotipine göre “*Belki de GAK ırkında zebu kanı vardır*” iddiası, ikincisi ise Jann ve ark. (2009) tarafından ortaya atılan *Bos indicus* kökenli sığır ırklarının yetiştirildiği coğrafyaya yakın olan sığırlarda da benzer varyantların sayısının bu ırklarda da artmış olabileceği iddiasıdır. Sunulan çalışmadan elde edilen sonuçlar her iki iddiayı da destekler niteliktedir.

İzleyen dönemde, bu çalışma ile ortaya konulan varyantların fonksiyonlarla ilişkilendirilmesine yönelik araştırmalara devam edilmesi ve elde edilen verilerin genom bankalarına kayıtlarının yapılması planlanmaktadır. Bu şekilde, tez çalışmasında ileri sürülen yerli sığır ırklarında TLR polimorfizminin tanımlanması ve kültür ırkı sığırlar arasında fark olup olmadığının anlaşılması yönündeki hipotez, sunulan çalışmada bulunan varyasyonların, hastalıklara direnç/duyarlılık etkilerinin araştırılmasına olanak veren, sürdürülebilir bir domino etkisi oluşturduğu düşünülmektedir. *To be continued!*

ÖZET

Türkiye’de Yetiştirilen Bazı Sığır Irklarında Yeni Nesil Sekans Analizi İle Toll Benzeri Reseptör (TLR) 2, 4 ve 6 Gen Bölgelerindeki Varyasyonların İncelenmesi

Sığırlarla ilgili olarak yapılan duyarlılık ve direnç çalışmaları doğal direncin örüntü tanımada anahtar reseptörü olan Toll Benzeri Reseptörler (Toll Like Receptors, TLR) üzerine yoğunlaşmıştır. Sığır genomunda TLR gen ailesinin 10 tane üyesi bulunmaktadır. TLR 2, 4, ve 6 farklı ligandları tanımakla görevli olan hücre yüzey reseptörleridir. Bu çalışmada hastalıklara dirençli olduğu bilinen Yerli Kara (YK, n=20), Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK, n=20), Güney Anadolu Kırmızısı (GAK, n=20) ve Boz (BOZ, n=10) olmak üzere 4 yerli ırk ve duyarlı olduğu bilinen Holştayn (HOL, n=10) olmak üzere bir kültür ırkı kullanılmıştır. TLR2, TLR4 ve TLR6 gen bölgelerinin incelenmesi PZR ve yeni nesil sekans analizi (YNS) ile yapılmıştır. Elde edilen YNS dataları biyoinformatik yöntemler kullanılarak incelenmiş ve duyarlı/dirençli hayvanlarda TLR2, TLR4 ve TLR6 gen bölgelerinde bulunan varyantlar belirlenmiştir. Gen bölgelerindeki toplam varyant açısından en fazla varyant GAK ırkında belirlenmiştir. Bu ırkı DAK, YK, BOZ ve HOL ırkları takip etmektedir. TLR2 gen bölgesinde en fazla varyant BOZ ırkında bulunurken TLR4 ve TLR6 genlerinde en fazla varyant GAK ırkında belirlenmiştir. Elde edilen veriler direnç ve duyarlılık ile ilişkilendirilmiş aday varyantlar yönünden karşılaştırılmıştır. Belirlenen bu varyantlara göre ekzonlar açısından haplotipler oluşturulmuş ve ırklar arası haplotip paylaşımları incelenmiştir. Türkiye yerli ırkları *Bos taurus* kökenli oldukları bilinmektedir ancak incelenen gen bölgelerinde *Bos indicus* sığırlarına özgü varyantlar belirlenmiştir. Bu varyantların fonksiyon açısından testlerinin yapılması ve elde edilen verilerin genom bankalarına kayıtlarının yapılması planlanmaktadır.

Anahtar kelimeler: Doğal direnç, yerli ırklar, yeni nesil sekans, toll benzeri reseptör (TLR), TLR2, TLR4, TLR6

SUMMARY

Determination of Gene Variations of Toll-like receptor (TLR) 2, 4 and 6 with Next Generation Sequencing in Some Cattle Breeds of Turkey

Disease resistance and susceptibility studies in cattle have focused on Toll Like Receptors (TLR), which are key proteins in pattern recognition of innate immunity. In cattle genome there are 10 members of TLR gene family. TLR2, TLR4 and TLR6 are expressed on cell surface and specialized in recognition of ligands. In this study native cattle breeds, which are known to be disease resistant Anatolian Black (AB, n=20), East Anatolian Ref (EAR, n=20), South Anatolian Red (SAR, n=20), Turkish Grey (TG, n=10) and one disease susceptible Holstein (HOL, n=10) cattle breeds were used. To investigate TLR2, TLR4 and TLR6 genes, PCR and next generation sequencing (NGS) analysis were performed. Data obtained from NGS were analyzed using bioinformatics software and variants were determined for these gene regions. The SAR breed has the most variations and followed by EAR, AB, TG and HOL. TG has the most variations for TLR2 gene whereas SAR has the most variations in TLR4 and TLR6 genes. Determined variants were compared with disease, and susceptibility associated variants. Also determined variants were used in construction of haplotypes for exonic regions and shared haplotypes were investigated within breeds. Turkish cattle breeds are known to be originated from *Bos taurus* however species specific variants have been determined for *Bos indicus*. Functional analysis of the variants and submission of the data set to genome bank are planned.

Key words; Innate immunity, native cattles, next generation sequencing, toll like receptors (TLR), TLR2, TLR4, TLR6

KAYNAKLAR

- ABREU, M. T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol*, **10**, 131-44.
- AKIRA, S., UEMATSU, S., TAKEUCHI, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, **124**, 783-801.
- ALBERTS, B., ALEXANDER J., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTERS P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, New York and London, Garland Science.
- ALEXOPOULOU, L., HOLT, A.C., MEDZHITOV, R., FLAVELL, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll like receptor 3. *Nature*, **413**, 732-738.
- ALPAN, O., ARPACIK, R. (1996). *Sığır Yetiştiriciliği*, Ankara, Şahin Matbaası.
- ANDRADE, W. A., SOUZA MDO, C., RAMOS-MARTINEZ, E., NAGPAL, K., DUTRA, M. S., MELO, M. B., BARTHOLOMEU, D. C., GHOSH, S., GOLENBOCK, D. T., GAZZINELLI, R. T. (2013). Combined action of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. *Cell Host Microbe*, **13**, 42-53.
- ASEA, A., REHLI, M., KABINGU, E., BOCH, J.A., BARE, O., AURON, P.E., STEVENSON, M.A., CALDERWOOD, S.K. (2002). Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem*, **277**, 15028–15034.
- BAES, C. F., DOLEZAL, M. A., KOLTES, J. E., BAPST, B., FRITZ-WATERS, E., JANSEN, S., FLURY, C., SIGNER-HASLER, H., STRICKER, C., FERNANDO, R., FRIES, R., MOLL, J., GARRICK, D. J., REECY, J. M., GREDLER, B. (2014). Evaluation of variant identification methods for whole genome sequencing data in dairy cattle. *BMC Genomics*, **15**, 948.
- BANDELDT, H., FORSTER, P., ROHL, A. (1999). Median joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.*, **16**.
- BARTON, G. M., MEDZHITOV, R. (2003). Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Science*, **300**, 1524-1525.
- BEHL, J. D., SHARMA, A., KATARIA, R. S., VERMA, N. K., KIMOTHI, S. P., BHATIA, A. K., SODHI, M., BEHL, R., JOSHI, B. K. (2014). Genetic polymorphisms in the bovine toll-like receptor 4 (TLR4) and monocyte chemo attractant protein-1(CCL2) genes: SNPs distribution analysis in *Bos indicus* Sahiwal cattle breed. *Animal Biotechnology*, **25**, 250-65.
- BERMINGHAM, M. L., BISHOP, S.C., WOOLLIAMS, J.A., PONG-WONG, R., ALLEN, A.R., MCBRIDE, S.H., RYDER, J.J., WRIGHT, D.M., SKUCE, R.A.,

- MCDOWELL, S.W., GLASS, E.J. (2014). Genome-wide association study identifies novel loci associated with resistance to bovine tuberculosis. *Heredity*, 112, 543–551;.
- BEUTLER, B., REHLI, M. (2002). Evolution of TIR, tolls and TLRs: functional inferences from computational biology. *Curr Top Microbiol Immunol* **270**, 1-21.
- BHIDE, M. R., MUCHA, R., MIKULA, I. J. R., KISOVA, L., SKRABANA, R., NOVAK, M., MIKULA, I. S. R. (2009). Novel mutations in TLR genes cause hyporesponsiveness to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *BMC Genet*, **10**.
- BISHOP, S. C., AXFORD, R.F.E., NICHOLAS, W.F. AND OWEN, J.B. (2010). *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals*, Cambridge, MA 02139 USA.
- CARVER, T., BOHME, U, OTTO, TD, ET AL. (2010). BamView: viewing mapped read alignment data in the context of the reference sequence. *Bioinformatics* **26**, 676–7.
- CINGOLANI, P., PATEL, V. M., COON, M., NGUYEN, T., LAND, S. J., RUDEN, D. M. , LU, X. (2012a). Using *Drosophila melanogaster* as a Model for Genotoxic Chemical Mutational Studies with a New Program, SnpSift. *Front Genet*, **3**, 35.
- CINGOLANI, P., PLATTS, A., WANG LE, L., COON, M., NGUYEN, T., WANG, L., LAND, S. J., LU, X. , RUDEN, D. M. (2012b). A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*, **6**, 80-92.
- CUNNINGHAM, F., AMODE, M. R., BARRELL, D., BEAL, K., BILLIS, K., BRENT, S., CARVALHO-SILVA, D., CLAPHAM, P., COATES, G., FITZGERALD, S., GIL, L., GIRON, C. G., GORDON, L., HOURLIER, T., HUNT, S. E., JANACEK, S. H., JOHNSON, N., JUETTEMANN, T., KAHARI, A. K., KEENAN, S., MARTIN, F. J., MAUREL, T., MCLAREN, W., MURPHY, D. N., NAG, R., OVERDUIN, B., PARKER, A., PATRICIO, M., PERRY, E., PIGNATELLI, M., RIAT, H. S., SHEPPARD, D., TAYLOR, K., THORMANN, A., VULLO, A., WILDER, S. P., ZADISSA, A., AKEN, B. L., BIRNEY, E., HARROW, J., KINSELLA, R., MUFFATO, M., RUFFIER, M., SEARLE, S. M., SPUDICH, G., TREVANION, S. J., YATES, A., ZERBINO, D. R. , FLICEK, P. (2015). Ensembl 2015. *Nucleic Acids Res*, **43**, D662-9.
- DANECEK, P., AUTON, A., ABECASIS, G., ALBERS, C. A., BANKS, E., DEPRISTO, M. A., HANDSAKER, R. E., LUNTER, G., MARTH, G. T., SHERRY, S. T., MCVEAN, G., DURBIN, R. , GENOMES PROJECT ANALYSIS, G. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, **27**, 2156-8.
- DE MESQUITA, A. Q., E REZENDE, C. S. M., DE MESQUITA, A. J., JARDIM, E. A. G. DA V., KIPNIS, A. P. J. (2012). Association of TLR4 polymorphisms with

subclinical mastitis in Brazilian holsteins. *Brazilian Journal of Microbiology*, **2**, 692-697.

- DECKER, J. E., MCKAY, S.D., ROLF, M.M., KIM J., MOLINA ALCALÁ A., SONSTEGARD T.S., HANOTTE O., GÖTHERSTRÖM A., SEABURY C.M., PRAHARANI L., BABAR M.E., CORREIA D.E., ALMEIDA REGITANO L., YILDIZ M.A., HEATON M.P., LIU W.S., LEI C.Z., REECY J.M., SAIF-UR-REHMAN M., SCHNABEL R.D., TAYLOR J.F. (2014). Worldwide Patterns of Ancestry, Divergence, and Admixture in Domesticated Cattle. *PloS Genetics*, **10**, e1004254.
- DELANEAU, O., HOWIE, B., COX, A., ZAGURY, J-F., MARCHINI J. (2013). Haplotype estimation using sequence reads. *American Journal of Human Genetics* **93** 787-696
- DENİZ, A., ÖNCEL, T., İÇEN, H., ŞİMŞEK, A. (2012). Diyarbakır Yöresinde Sığırlarda *Theileria annulata* ve *T. buffeli*'nin Multiplex PCR ile Saptanması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **18**, A111-A114.
- DEPRISTO, M., BANKS, E., POPLIN, R., GARIMELLA, K.V., MAGUIRE, J.R., HARTL C., PHILIPPAKIS A.A., DEL ANGEL G., RIVAS M.A., HANNA M., MCKENNA A., FENNELL T.J., KERNYTSKY A.M., SIVACHENKO A.Y., CIBULSKIS K., GABRIEL S.B., ALTSHULER D., DALY M.J. (2011) A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet*, **43**, 491-8.
- DIKER, K. S. (1998). *İmmunoloji*, Ankara, Medisan.
- DÜZLÜ, Ö., YILDIRIM, A., İNCİ, A., AVCIOĞLU, H., BALKAYA, İ. (2015). Sığırlarda *Babesia bovis* ve *Babesia bigemina*'nın Real-Time PCR ile araştırılması ve izolatların moleküler karakterizasyonu. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **62**, 27-35.
- EBERSBERGER, I., METZLER, D., SCHWARZ, C., AND PÄÄBO, S. (2002). Genomewide Comparison of DNA Sequences between Humans and Chimpanzees. *Am J Hum Genet.*, **70**, 1490–1497.
- ELGERT, K. D. (2009). *Immunology*, Wiley-Blackwell.
- FARHAT, K., RIEKENBERG, S., JUNG, G., WIESMULLER, K. H., JUNGI, T. W. , ULMER, A. J. (2010). Identification of full length bovine TLR1 and functional characterization of lipopeptide recognition by bovine TLR2/1 heterodimer. *Vet Res*, **41**.
- FISHER, C. A., BHATTARAI, E. K., OSTERSTOCK, J. B., DOWD, S. E., SEABURY, P. M., VIKRAM, M., WHITLOCK, R. H., SCHUKKEN, Y. H., SCHNABEL, R. D., TAYLOR, J. F., WOMACK, J. E. , SEABURY, C. M. (2011). Evolution of the bovine TLR gene family and member associations with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *PLoS One*, **6**, e27744.

- FIUME, M., WILLIAMS, V, BROOK, A, BRUDNO, M. (2010). Savant: genome browser for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **26**, 1938–44.
- GOLDAMMER, T., ZERBE, H., MOLENAAR, A., SCHUBERTH, H. J., BRUNNER, R. M., KATA, S. R., SEYFERT, H. M. (2004). Mastitis Increases Mammary mRNA Abundance of α -Defensin 5, Toll-Like-Receptor 2 (TLR2), and TLR4 but Not TLR9 in Cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*, **11**, 174-185.
- GROSCHUP, M. H., LACROUX, C., BUSCHMANN, A., LÜHKEN, G., MATHEY, J., EIDEN, M., LUGAN, S., HOFFMANN, C., ESPINOSA, J. C., BARON, T., TORRES, J. M., ERHARDT, G., ANDREOLETTI, O. (2007). Classic Scrapie in Sheep with the ARR/ARR Prion Genotype in Germany and France. *Emerging Infectious Diseases*, **13**, 1201-1207.
- THE SAM/BAM FORMAT SPECIFICATION WORKING GROUP, (2015). Sequence Alignment/Map Format Specification. Erişim: <https://github.com/samtools/hts-specs>. Erişim tarihi: 11 May 2015.]
- GUAN, Y., RANO, D.R., JIANG, S., MUTHA, S.K., LI, X., BAUDRY, J., TAPPING, R.I. (2010). Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling. *J Immunol*, **184**, 5094-5103.
- HAJJAR, A., O'MAHONY D.S., OZINSKY A., UNDERHILL D.M., ADEREM A., KLEBANOFF S.J., WILSON C.B. (2001). Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol*, **166**, 15-19.
- HALDANE, C. (1992). Disease and Evolution. *Current science*, 63.
- HODGES, E., SMITH, A.D., KENDALL, J., XUAN, Z., RAVI, K., ROOKS, M, ZHANG, M.Q, YE, K., BHATTACHARJEE, A., BRIZUELA, L., MCCOMBIE, W.R., WIGLER, M., HANNON, G.J, HICKS J.B. (2009). High definition profiling of mammalian DNA methylation by array capture and single molecule bisulfite sequencing. *Genome Res.*, **19**, 1593-605.
- HOPKINS, P. A., SRISKANDAN, S. (2005). Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin. Exp. Immunol.*, **140**, 395-407.
- INGVARTSEN, K. L., DEWHURST, R. J., FRIGGENS, N. C. (2003). On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livestock Production Science*, **83**, 277-308.
- JANEWAY, C. A., TRAVERS, P., WALPORT, M., SHLOMCHIK, M. (2006). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, Garland Science.
- JANN, O. C., WERLING, D., CHANG, J. S., HAIG, D., GLASS, E. J. (2008). Molecular evolution of bovine Toll-like receptor 2 suggests substitutions of functional relevance. *BMC Evol Biol*, **8**, 288.

- JENSEN, J., SU, G., MADSEN, P. (2012). Partitioning additive genetic variance into genomic and remaining polygenic components for complex traits in dairy cattle. *BMC Genetics*, **13**.
- JIN, M. S., KIM, S. E., HEO, J. Y., LEE, M. E., KIM, H. M., PAIK, S. G., LEE, H., LEE, J. (2007). Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*, **21**, 1071-1082.
- JONES, B. W., HELDWEIN, K.A., MEANS, T.K., SAUKKONEN, J.J., FENTON, M.J. (2001). Differential roles of TOLL-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. *Ann. Rheum. Dis.*, **60**, iii6-12.
- JUNGI, T. W., FARHAT, K., BURGNER, I.A., WERLING, D. (2011). Toll-like receptors in domestic animals. *Cell and Tissue Research*, **343**., 107-120.
- KAISER, P. (2010). *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals* (Chapter 2: The Immune system, p: 15-38), Editor: Bishop, S.C., Axford, R.F.E., Nicholas, F.W., Owen, J.B. Cambridge, MA 02139 USA.
- KAJAVA, A.V., VASSART, G., WODAK, S.J. (1995). Modelling of three dimensional structure of proteins with the typical leucine-rich repeats. *Structure*, **3**, 867-877.
- KAWAI, T., AKIRA, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, **11**, 373–384.
- KENT, W., SUGNET, C., FUREY, T., ROSKIN, K., PRINGLE, T., ZAHLER, A. , HAUSSLER, D. 2002. The human genome browser at UCSC. *Genome Res*, **12**, 996-1006.
- KOBE, B., KAJAVA, A.V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current Opinion in Structural Biology*, **11**, 725-732.
- KOKKINOPOULOS, I., JORDAN W.J., RITTER M.A. (2005). Toll-like receptor mRNA expression patterns in human dendritic cells and monocytes. *Mol Immunol*, **42**, 957-68.
- KÖK, S., SOYSAL, M.İ., GÜRCAN, E.K. (2012). An investigation on the carcass percentage of Anatolian Grey Breed in Edirne Province. *Journal of Agricultural Science and Technology* **A2**, 1107-1112.
- KUL, O., KABAKCI, N, ATMACA, HT, OZKUL, A. (2007). Natural peste des petits ruminants virus infection: novel pathologic findings resembling other morbillivirus infections. *Vet Pathol.*, **44**, 479-86.
- KURT-JONES, E. A., POPOVA L., KWINN L., HAYNES L.M., JONES L.P., TRIPP R.A., WALSH E.E., FREEMAN M.W., GOLENBOCK D.T., ANDERSON L.J. ET AL. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* **97**, 10162-10167.

- LARSEN, B., JENSEN, N.E., MADSEN, P., NIELSEN, S.M., KLASTRUP, O., MADSEN, P.S. (1985). Association of the M blood group system with bovine mastitis. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics*, **16**: 165–173.
- LEMIATRE, B., NICOLAS, E., MICHAUT, L., RECIHHART, J., M., HOFFMAN, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/TOLL/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, **86**, 973-983.
- LEVEQUE, G., FORGETTA, V., MORROLL, S., SMITH, A.L., BUMSTEAD, N., BARROW, P., LOREDO-OSTI, J.C., MORGAN, K., MALO, D. (2003). Allelic variation in TLR4 is linked to susceptibility to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in chickens. *Infect Immun*, **71**, 1116-1124.
- LI, H. (2011). A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*, **27**, 2987-93.
- LI, H., HANDSAKER, B., WYSOKER, A., FENNEL, T., RUAN, J., HOMER, N., MARTH, G., ABECASIS, G., DURBIN, R., GENOME PROJECT DATA PROCESSING, S. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, **25**, 2078-9.
- LIEN, E., Ingalls R.R. (2002). Toll-like receptors. *Crit. Care Med*, **30**, 1-11.
- LIZUNDIA, R., SAUTER, K-S., TAYLOR, G., WERLING, D. (2008). Host species-specific usage of the TLR4–LPS receptor complex. *Innate Immunity*, **14**, 223-231.
- LOFTUS, R. T., ERTUĞRUL, O., HARBA, A.H., EL-BARODY, M.A., MACHUGH, D. E., PARK, S.D., BRADLEY, D. G. (1999). A microsatellite survey of cattle from a centre of origin: the Near East. *Molecular Ecology*, **12**, 2015-22.
- MARIOTTI, M., WILLIAMS, J. L., DUNNER, S., VALENTINI, A., PARISSET, L. (2009). Polymorphisms within the Toll-Like Receptor (TLR)-2, -4, and -6 Genes in Cattle. *Diversity*, **1**, 7-18.
- MASON, I. L. (1996). A world dictionary of livestock breeds, types and varieties, Wallingford UK, CAB International.
- MATSUSHIMA, N., TANAKA, T., ENKHBAYAR, P., MIKAMI, T., TAGA, M., YAMADA, K., KUROKI, Y. (2007). Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics*, **8**, 124.
- MCGUIRE, K., JONES, M., WERLING, D., WILLIAMS, J. L., GLASS, E. J., JANN, O. (2006). Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine Toll-like receptors. *Anim Genet*, **37**, 47-50.
- MCKENNA, A., HANNA, M., BANKS, E., SIVACHENKO, A., CIBULSKIS, K., KERNYTSKY, A., GARIMELLA, K., ALTSHULER, D., GABRIEL, S., DALY, M., DEPRISTO, M. A. (2010). The Genome Analysis Toolkit: a

- MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*, **20**, 1297-303.
- MEDUGORAC, I., MEDUGORAC, A., RUSS, I., VEIT-KENSCH, C.E., TABERLET, P., LUNTZ, B., MIX, H.M., FORSTER, M. (2009). Genetic diversity of European cattle breeds highlights the conservation value of traditional unselected breeds with high effective population size. *Mol. Ecol.*, **18**, 3394-3410.
- MEDZHITOV, R., JANEWAY, C. A. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, **91**, 295-8.
- MENZIES, M. , INGHAM, A. (2006). Identification and expression of Toll-like receptors 1-10 in selected bovine and ovine tissues. *Vet Immunol Immunopathol*, **109**, 23-30.
- MIKAMI, T., MIYASHITA, H., TAKATSUKA, S., KUROKI, Y., MATSUSHIMA, N. (2012). Molecular evolution of vertebrate Toll-like receptors: evolutionary rate difference between their leucine-rich repeats and their TIR domains. *Gene*, 235–243.
- MILNE, I., BAYER, M., CARDLE, L., Shaw, P., Stephen, G., Wright, F., Marshall, D. (2010). Tablet--next generation sequence assembly visualization. *Bioinformatics* **26**, 401-402.
- MORR, M., TAKEUCHI, O., AKIRA, S., SIMON, M.M., MÜHLRADT, P.F. (2002). Differential recognition of structural details of bacterial lipopeptides by toll-like receptors. *Eur J Immunol*, **32**, 3337-3347.
- MUCHA, R., BHADE, M.R., CHAKURKAR, E.B., NOVAK, M., MIKULA, I Sr. (2009). Toll-like receptors TLR1, TLR2 and TLR4 gene mutations and natural resistance to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle. *Vet Immunol Immunopathol.*, **128**, 381-8.
- MURRAY, M., CLIFFORD, D.J., GETTINBY, G., SNOW, W.F., MCINTYRE, W.I. (1981). Susceptibility to African trypanosomiasis of N'Dama and Zebu cattle in an area of *Glossina morsitans submorsitans* challenge. *Vet Rec.*, **109**, 503-510.
- O'NEILL, L. A. , BOWIE, A. G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, **7**, 353-64.
- O'NEILL, L. A., FITZGERALD K. A., BOWIE A. G., (2003). The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. . *Trends Immunol* **24**, 286-90.
- OFFORD, V., COFFEY, T., WERLING, D. (2010). LRRfinder: A web application for the identification of leucine-rich repeats and an integrative Toll-like receptor database. *Developmental And Comparative Immunology*, **34**, 1035-41.
- OGOREVC, J., KUNEJ, T., RAZPET, A. , DOVC, P. (2009). Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Anim Genet*, **40**, 832-51.

- OLTENACU, P. A., AND BROOM, D.M. (2010). The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. *Animal Welfare*, **19**, 39-49.
- OPSAL, M. A., VAGE, D. I., HAYES, B., BERGET, I. , LIEN, S. (2006). Genomic organization and transcript profiling of the bovine toll-like receptor gene cluster TLR6-TLR1-TLR10. *Gene*, **384**, 45-50.
- ORMAN, M. N., ERTUĞRUL, O., ALPAN, O. (2005). Some Productive Characteristics of F1, B1 and F1xB1 Crossbreeds from Simmental x SAR Crossbreeding. *Turk J Vet Anim Sci*, **29**, 1129-1135.
- OSVALDOVA, A., WOODMAN, S., PATTERSON, N., OFFORD, V., MWANGI, D., GIBSON, A. J., MATIASOVIC, J. , WERLING, D. (2014). Replacement of two aminoacids in the bovine Toll-like receptor 5 TIR domain with their human counterparts partially restores functional response to flagellin. *Dev Comp Immunol*, **47**, 90-4.
- ÖZCAN H., YALÇIN C. (1985) Özel Zootekni (Ders Notları) İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Teksir Bürosu, İstanbul
- ÖZDEMİR, M., DOĞRU, U. (2009). Determination of Phylogenetic Relationships of Turkish Native Cattle Breeds with Other Cattle Breeds Using Mitochondrial DNA D-loop Sequence Polymorphism. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, **22**, 955-961.
- OZINSKY, A., UNDERHILL, D. M., FONTENOT, J. D., HAJJAR, A. M., SMITH, K. D., WILSON, C. B., SCHROEDER, L. , ADEREM, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13766-71.
- PANIGRAHI, M., SHARMA, A. , BHUSHAN, B. (2014). Molecular characterization and expression profile of partial TLR4 gene in association to mastitis in crossbred cattle. *Anim Biotechnol*, **25**, 188-99.
- PELT-VERKUIL, E., VAN BELKUM, A, HAYS, JP. (2008). Principles and Technical Aspects of PCR Amplification, Netherlands, Springer Science , Business Media.
- PICARD. Erişim: <http://broadinstitute.github.io/picard>. Erişim tarihi: 11 May 2015
- POLTORAK, A., HE, X, SMIRNOVA, I, LIU, M.Y., HUFFEL CV, DU X, BIRDWELL D, ALEJOS E, SILVA M, GALANOS C ET AL. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in the Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-2088.
- QURESHI, S. T., LARIVIERE, L., LEVEQUE, G., CLERMONT, S., MOORE, K.J., GROS, P., MALO, D. (1999). Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med*, **189**, 615-625.
- ROACH, J. C., GLUSMAN, G., ROWEN, L., KAUR, A., PURCELL, M. K., SMITH, K. D., HOOD, L. E. , ADEREM, A. (2005). The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9577-82.

- ROBERT, J. (2003). Evolution of heat shock protein and immunity. *Dev Comp Immunol*, **27**, 449-64.
- ROCK, F., HARDIMAN, G., TIMANS, J., KASTELEIN, R. AND BAZAN, J. (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 588-593.
- ROPERT, C., GAZZINELLI, R.T. (2004). Regulatory role of Toll-like receptor 2 during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Endotoxin Res*, **10**, 425-430.
- RUIZ-LARRAÑAGA, O., MANZANO, C., IRIONDO, M., GARRIDO, J.M., MOLINA, E., VAZQUEZ, P., JUSTE, R.A., ESTONBA, A. (2011). Genetic variation of toll-like receptor genes and infection by *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Holstein-Friesian cattle. *J Dairy Sci*, **94**, 3635-41.
- RUTHERFORD, K., PARKHILL, J., CROOK, J, ET AL. (2000). Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* **16**, 944–5.
- SEABURY, C. M., SEABURY, P.M., DECKER JE, SCHNABEL RD, TAYLOR JF, WOMACK JE. (2010). Diversity and evolution of 11 innate immune genes in *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* cattle. *P Natl A Sci.*, 151–156.
- SEABURY, C. M. , WOMACK, J. E. (2008). Analysis of sequence variability and protein domain architectures for bovine peptidoglycan recognition protein 1 and Toll-like receptors 2 and 6. *Genomics*, **92**, 235-45.
- SEPLYARSKIY, V. B., KHARCHENKO, P., KONDRASHOW, A.S., BAZYKIN, G.A. (2012). Heterogeneity of the Transition/Transversion Ratio in *Drosophila* and Hominidae Genomes. *Mol Biol Evo*, **29**, 1943-55.
- SHARMA, B. S., LEYVA, I., SCHENKEL, F. , KARROW, N. A. (2006). Association of Toll-Like Receptor 4 Polymorphisms with Somatic Cell Score and Lactation Persistency in Holstein Bulls. *Journal of Dairy Science*, **89**, 3626-3635.
- SHELDON, I. M. (2014). Genes and environmental factors that influence disease resistance to microbes in the female reproductive tract of dairy cattle. *Reprod Fertil Dev*, **27**, 72-81.
- SHINKAI, H., , TANAKA, M., MOROZUMI, T., EGUCHI-OGAWA, T., OKUMURA, N., MUNETA, Y., AWATA, T., UENISHI, H. (2006). Biased distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in porcine Toll-like receptor 1 (TLR1), TLR2, TLR4, TLR5, and TLR6 genes. *Immunogenetics* **58**, 324-330.
- SMITH, S., JANN, O.C., HAIG, D., RUSSELL, G.C., WERLING, D., GLASS, E.J., EMES, R.D. (2012). Adaptive evolution of Toll-like receptor 5 in domesticated mammals. *BMC Evol Biol*, **12**.
- SONG, Y., SUN, L., GUO, A., YANG, L. (2014). Toll-like receptor 6 gene polymorphisms increase the risk of bovine tuberculosis in Chinese Holstein cattle. *Acta Histochem*, **116**, 1159-62.

- SOYSAL, M. I., TUNA, Y.T., GURCA, E.K., OZKAN, E. (2004). Farms In Turkey: Sustainable Development In The Preservation Of Animal Genetic Resources In Turkey And In The World. *Trakia Journal of Sciences*, **2**, 47-53.
- STEIN, D., ROTH S., VOGELSANG E., NUSSLEIN-VOLHARD, C. (1991). The Polarity of the Dorsoventral Axis in the *Drosophila* Embryo Is Defined by an Extracellular Signal. *Cell*, **65**, 10.
- STEPHENS, M., AND DONNELLY, P. (2003). A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *American Journal of Human Genetics*, **73**, 1162-1169.
- SWAIN, D. K., KUSHWAH, M. S., KAUR, M., PATBANDHA, T. K., MOHANTY, A. K. , DANG, A. K. (2014). Formation of NET, phagocytic activity, surface architecture, apoptosis and expression of toll like receptors 2 and 4 (TLR2 and TLR4) in neutrophils of mastitic cows. *Vet Res Commun*, **38**, 209-19.
- TABERLET, P., VALENTINI, A., REZAEI, H. R., NADERI, S., POMPANON, F., NEGRINI, R. , AJMONE-MARSAN, P. (2008). Are cattle, sheep, and goats endangered species? *Mol Ecol*, **17**, 275-84.
- TABETA, K., GEORGEL, P., JANSSEN, E., DU, X., HOEBE, K., CROZAT, K., MUDD, S., SHAMEL, L., SOVATH, S., GOODE, J., ALEXOPOULOU, L., FLAVELL, R. A. , BEUTLER, B. (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 3516-21.
- TAKEDA, K. , AKIRA, S. (2004). TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*, **16**, 3-9.
- TAKEUCHI, O., AKIRA, S. (2001). Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *International Immunopharmacology*, **1**, 625–635.
- TAKEUCHI, O., HOSHINO, K., KAWAI, T., SANJO, H., TAKADA, H., OGAWA, T., TAKEDA, K. A. , S., A. (1999). Differential Roles of TLR2 and TLR4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components. *Immunity*, **11**, 443-451.
- TAKEUCHI, O., KAUFMANN, A., GROTE, K., KAWAI, T., HOSHINO, K., MORR, M., MUHLRADT, P. F. , AKIRA, S. (2000). Cutting Edge: Preferentially the R-Stereoisomer of the Mycoplasmal Lipopeptide Macrophage-Activating Lipopeptide-2 Activates Immune Cells Through a Toll-Like Receptor 2- and MyD88-Dependent Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*, **164**, 554-557.
- TAKEUCHI, O., KAWAI, T., MUHLRADT, P. F., MORR, M., RADOLF, J. D., ZYCHLINSKY, A., TAKEDA, K. , AKIRA, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol*, **13**, 933-40.

- TAUSZIG, S., JOUANGUY, E., HOFFMANN, J. A., AND IMLER JL (2000). Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10520-10525.
- THORVALDSDOTTIR, H., ROBINSON, J. T. , MESIROV, J. P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform*, **14**, 178-92.
- TIZARD, I. R. (2009). *Veterinary Immunology*, Saunders Elsevier, Missouri, USA
- TURKHAYGEN. Türkiye Yerli Evcil Hayvan Genetik Kaynaklarından Bazılarının In Vitro Korunması ve Ön Moleküler Tanımlanması-I. Erişim adresi: <http://www.turkhaygen.gov.tr/> Erişim tarihi: 07.07.2015 2015.
- TURNBULL, P. C. B. (1996). *Bacillus*, Galveston (TX), University of Texas Medical Branch at Galveston.
- TURNER, M. L., CRONIN, J. G., HEALEY, G. D., , SHELDON, I. M. (2014). Epithelial and Stromal Cells of Bovine Endometrium Have Roles in Innate Immunity and Initiate Inflammatory Responses to Bacterial Lipopeptides In Vitro via Toll-Like Receptors TLR2, TLR1, and TLR6. *Endocrinology*, **155**, 1453–1465.
- UNDERHILL, D. M., OZINSKY, A. (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Current Opinion in Immunology*, **14**, 103-110.
- VAN DER AUWERA, G., CARNEIRO, M.O., HARTL, C., POPLIN, R., DEL ANGEL, G., LEVY-MOONSHINE, A., JORDAN, T., SHAKIR, K., ROAZEN, D., THIBAUT, J., BANKS, E., GARIMELLA, K.V., ALTSHULER, D., GABRIEL, S., DEPRISTO, M.A. (2013). From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics*. , **11**.
- VAZQUEZ, P., RUIZ-LARRANAGA, O., GARRIDO, J. M., IRIONDO, M., MANZANO, C., AGIRRE, M., ESTONBA, A. , JUSTE, R. A. (2014). Genetic association analysis of paratuberculosis forms in holstein-friesian cattle. *Vet Med Int*, 321327.
- WADHWA, A., KUMAR, N., VELASCO-VILLA, A., EDA, S. (2013). Overview of Johne's disease immunology. *Veterinary World*, **6**, 901-904.
- WANG, X., XU, S., GAO, X., REN, H. , CHEN, J. (2007). Genetic polymorphism of TLR4 gene and correlation with mastitis in cattle. *Journal of Genetics and Genomics*, **34**, 406-12.
- WERLING, D., AND JUNGI, T.W. (2003). TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol*, **91**, 1-12.
- WERLING, D., JANN, O. C., OFFORD, V., GLASS, E. J. , COFFEY, T. J. (2009). Variation matters: TLR structure and species-specific pathogen recognition. *Trends Immunol*, **30**, 124-30.

- WHITE, S. N., TAYLOR, K.H., ABBEY, C.A., GILL, C.A., WOMACK, J.E. (2003). Haplotype variation in bovine Toll-like receptor 4 and computational prediction of a positively selected ligand-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **100**, 10364-9.
- WIENS, M., KORZHEV, M., PEROVIC-OTTSTADT, S., LUTHRINGER, B., BRANDT, D., KLEIN, S., MULLER, W.E. (2007). Toll-like receptors are part of the innate immune defense system of sponges (Demospongiae: Porifera). *Molecular Biology Evolution*, **24**, 792-804.
- WONG, E. B., MALLET, J. F., DUARTE, J., MATAR, C. , RITZ, B. W. (2014). Bovine colostrum enhances natural killer cell activity and immune response in a mouse model of influenza infection and mediates intestinal immunity through toll-like receptors 2 and 4. *Nutr Res*, **34**, 318-25.
- YILDIZ, A. Ş. (2008). Ankara ili damizlik siğir yetiştiricileri birliği'ne bağlı süt siğirciliği işletmelerinde bazı endemik hastalıkların işletme düzeyinde meydana getirdiği ekonomik kayıplar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Açık Arşiv Erişim: acikarsiv.ankara.edu.tr/browse/26726/tez.pdf Erişim Tarihi: 10.07.2015
- YILMAZ, O., AKIN O., METIN YENER, S., ERTUGRUL, M., WILSON, R. T. (2012). The domestic livestock resources of Turkey: cattle local breeds and types and their conservation status. *Animal Genetic Resources*, **50**, 65-73.
- ZHENG, J., WATSON, A.D. , KERR, D.E. (2006). Genome-wide expression analysis of lipopolysaccharide-induced mastitis in a mouse model. *Infection and Immunity*, **74**, 1907-15.
- ZHOU, H., GU, J., LAMONT, S.J., GU, X. (2007). Evolutionary analysis for functional divergence of the toll-like receptor gene family and altered functional constraints. *J Mol Evol* **65**, 119-123.
- ZIMIN, A., DELCHER, A.L, FLOREA, L., KELLEY, D.R., SCHATZ, M.C., PUIU, D., HANRAHAN, F., PERTEA, G., VAN, TASSELL, C., SONSTEGARD, T.S., MARÇAIS, G., ROBERTS, M., SUBRAMANIAN, P., YORKE, J.A., SALZBERG, S.L. (2009). A whole-genome assembly of the domestic cow, *bos taurus*. *Genome Biol*, **10**.
- ZIPFEL, C., ROBATZEK, S., NAVARRO, L., OAKELEY, E.J., JONES, J.D.G., FELIX, G., BOLLER, T. (2004). Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature*, **428**, 764–767.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı ve soyadı: Nüket BİLGEN

Doğum yeri ve tarihi: Seben, 18.04.1985

Uyruğu: TC

Medeni durumu: Bekâr

İletişim adresi ve telefonu: Ankara Üniversitesi

Veteriner Fakültesi Genetik AD

0 312 31703 15/ 4327

II- Eğitimi

2009-... Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı

Doktora Programı

2008-2009 Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Doktora Programı

2003- 2008 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi (Lisans)

2006-2007 Hannover Veteriner Üniversitesi (Lisans-Erasmus)

1999- 2003 Yalova Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi

1996- 1999 Yalova Rahmi Tokay İlk Öğretim Ortaokulu

1991- 1996 Seben Atatürk İlk Okulu

Yabancı dili: İngilizce (ÜDS:73,75) ve Almanca

III- Ünvanları

Veteriner Hekim 2008

IV- Mesleki Deneyimi

2011-.... Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik AD (Ar. Gör.)

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

2014-.... International Society of Animal Genetics (ISAG),

2014- ISAG Cat and Dog Genomics komite üyesi

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınlar

- 1- Çınar Kul Bengi, Bilgen Nüket, Akyüz Bilal, Ertuğrul Okan (2015) Molecular Phylogeny Of Anatolian And Cypriot Donkey Populations Based On Mitochondrial Dna And Y-Chromosomal Strs. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 63(2), (Yayın Kabul Edildi Basım Aşamasında)
- 2- Çınar Kul Bengi, Bilgen Nüket, Lenstra Johannes Arjen, Korkmaz Ağaoğlu Özgecan, Akyüz Bilal, Ertuğrul Okan (2015). Y-Chromosomal Variation Of Local Goat Breeds Of Turkey Close To The Domestication Centre. Journal Of Animal Breeding And Genetics, Doi: 10.1111/Jbg. 12154
- 3- Korkmaz Ağaoğlu Özgecan, Akyüz Bilal, Çınar Kul Bengi, Bilgen Nüket, Ertuğrul Okan (2015). Genetic Polymorphism Of Five Genes Associated With Meat Production Traits In Five Cattle Breeds In Turkey. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, Doi: 10.9775/Kvfd.2014.12722
- 4- Nüket Bilgen (2015), Adli Veteriner Hekimlikte DNA İncelemeleri, Uluslar Arası Adli Bilimler Kongresi Bayburt, Türkiye (Sözlü Sunum)
- 5- Çınar Kul Bengi, Bilgen Nüket, Korkmaz Ağaoğlu Özgecan, Akyüz Bilal, Ertuğrul Okan (2014). Trace Back Analysis Of Paternal Lineages In Local Goat Breeds Of Turkey By Using Ychromosomal Dna. International Society Of Animal Genetics (Isag) 34th Conference, 103 (Poster)
- 6- Çınar Kul Bengi, Bilgen Nüket, Korkmaz Ağaoğlu Özgecan, Özmen Özge, Hacan Özlem, Akyüz Bilal, Ertuğrul Okan (2014). Whole Mtdna Genome Sequence Analysis Of Different Haplotypes From The Turkish Native Goat Breeds. International Society Of Animal Genetics (Isag) 34th Conference, 144-145. (Poster)
- 7- Çınar Kul Bengi, Öcal Naci, Bilgen Nüket, Mustafa Yenal Akkurt, Cevat Temizkan, Akarsu Ayşe Nurten, Ertuğrul Okan (2014). Genome-Wide Analysis To Identify Genes Responsible For Ankyloglossia In Kangal Dogs. International Society Of Animal Genetics (Isag) 34th Conference, 183 (Poster)
- 8- Bilgen Nüket, Çınar Kul Bengi, Ertuğrul Okan (2011). Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) Availability In Animal Genetic Resources Protection. 8th Global Conference On The Conservation Of Animal Genetic Resources, 345-348. (Poster) Bilgen Nüket, Çınar Kul Bengi, Ertuğrul Okan (2011). Gene Transfer Detection On Preimplantation Stage Embryos Of Laboratory Animals. 3rd Iclas Symposium, 61 (Poster)
- 9- Bilgen Nüket, Çınar Kul Bengi, Korkmaz Ağaoğlu Özgecan, Ertuğrul Okan, Erzurumlu Feridun, Durmaz Murat (2014). Türkiye Arap Atlarında Polisakkarit

Depolama Hastalığı Tip I (Pssm-I), Öldürücü Açık Renk Hastalığı (Dccl) Ve Şiddetli Kombine İmmun Yetmezliğe (Scıd) Sebep Olan Mutasyonların Moleküler Tanı Yöntemleri İle Araştırılması. 5. Ulusal Zootečni Kongresi, 47-48. (Sözlü Sunum)

10- Bilgen Nüket, Ertuğrul Okan (2013) Sığırlarda Kopya Sayısı Değişimleri (KSD) ve KSD Belirlemede Kullanılan Yöntemler (Derleme) 10(2), 135-142

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Projeleri

1. Türkiye Arap Atlarında Polisakkarit Depolama Hastalığı (PSDH) ve Öldürücü Açık Renk Hastalığına (ÖARH) Sebep Olan Mutasyonların Moleküler Tanı Yöntemleri ile Araştırılması. (AÜBAP, 11B3338003) (Yardımcı araştırmacı)
2. Türkiye Yerli Keçi Irklarının Genetik İlişkilerinin Y-Kromozomal DNA ile Araştırılması, (TÜBİTAK, 111O799) (Bursiyer)
3. Kangal Köpeklerinde Ankyloglossia Malformasyonuna Yol Açan Genin Araştırılması (TÜBİTAK, 112O844) (Bursiyer)
4. Türkiye’de Yetiştirilen Bazı Sığır Irklarında Yeni Nesil Sekans Analizi İle Toll Benzeri Reseptör (TLR) 2 ve 6 Gen Bölgelerindeki Varyasyonların İncelenmesi 13B3338011 No’lu BAP projesi (Yardımcı araştırmacı)
5. Toll Benzeri Reseptör (TLR) 2 ve 6 Tüm Gen Bölgelerinin Long-Range PCR ile Yükseltgenmesi 14H0239004 No’lu BAP projesi (Yardımcı araştırmacı)
6. Ankara Keçilerinde Telogen ve Anagen Safhaları Arasında Kıl Folikülü Gelişimine Etkili Bazı Genlerin İfade Seviyelerinin Karşılaştırılması 15B0239003 No’lu BAP projesi (Yardımcı araştırmacı)

Verdiği konferans ya da seminerler

1. Tekli Nükleotit Polimorfizmi (SNP) ve Sığırlarda SNP Çalışmaları 2010/20011 Güz, Ankara
2. Sığır Türünde Kopya Sayısı Değişimleri (KSD); 2011/2012 Güz, Ankara

Diğer yayınlar

1. Çınar Kul Bengi, Bilgen Nüket (2010). Veteriner Hekimlikte Adli Olaylara Yaklaşım.. Veteriner Hekimler Derneği Bülteni(3-4), 18-20

Üniversite Dışı Deneyim

Doktora sırası bursiyer University of London, Royal Veterinary Genetics Doktora sırası araştırmacı olarak 3 aylık TÜBİTAK bursiyerliği, (Yurtdışı Üniversite)

VIII- Diğer Bilgiler (Katıldığı Kurs, Kongre, Toplantı vs...)**Kurslar**

1. Deneysel Araştırmalarda Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası. 21 Kasım-02 Aralık 2011. Kırıkkale Üniversitesi- Gata Ar-Ge Merkez Başkanlığı, Ankara, Türkiye.

Uluslararası sertifikalı eğitim kursu

1. 4th Course in Integration Of Cytogenetics, Microarrays And Massive Sequencing In Biomedical And Clinical Research (Hibrid Kursu). 25–28 Ekim 2011. Avrupa Genetik Vakfı'nın Düzenlediği Avrupa Genetik Tıp Okulu İstanbul Üniversitesi İşbirliği

IX- Ödüller

1. Poster Ödülü: MÜŞTAK K.H, BİLGİN N., DİKER S., UNER C., HASÇELİK G. (2013) Using of 16S rDNA partial sequence in diagnosis of Nocardia spp.2nd National Congress Of Clinical Microbiology, Titanic Congress Center Antalya Turkey

2. Travel Bursary award, International Society of Animal Genetics, ABD, 2014