

Sıcak stresi ve termotolerans: Sığırlarda moleküler alışmalar

Özge şebnem ıldır¹ , Özge Özmen² 

^{1,2} Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi, Genetik Anabilim Dalı, Altındağ, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 21.08.2019, **Kabul tarihi** / Accepted: 28.11.2019

Özet: Küresel iklim değişikliği riski insan nüfusu, evre kirliliği ve atmosferdeki sera gazları oranlarında görölen artış nedeniyle gün geçtikçe artmaktadır. Yüzey sıcaklığında 2100'lerin sonunda yaklaşık 1,8 ile 4,8°C aralığında artış beklenmektedir. İliman iklimlerde yaşamakta olan sığırlar gelecekte artan sıcaklıklarla ve dolayısıyla da sıcak stresi ile karşı karşıya kalacaklardır. Sıcak etkisi ile ortaya çıkan stres yanıtları aynı zamanda verim kaybıyla sonuçlanmaktadır. Yüksek sıcaklık ve nem seviyeleri verim özelliklerini olumsuz yönde etkilemektedir. Tüm bu gerekçeler sıcak stresi ve termotolerans ile ilişkili moleküler çalışmaların gerekliliğini gözler önüne sermektedir. Bilim insanları genom boyu ilişkilendirme alışması (GWAS), gen ifadesi, polimorfizm ve mikroRNA çalışmaları gibi birçok farklı yaklaşım ile sıcak stresini ve termotoleransın moleküler mekanizmalarını araştırmışlardır. Bu derlemede sıcak stresi ve zararlı etkileri tanımlanmış, sığırlar üzerinde yapılmış moleküler çalışmalar ise tek bir yayın altında toplanmaya çalışılmıştır.

Anahtar kelimeler: Sıcak stresi, GWAS, polimorfizm, gen ifadesi, miRNA

Heat stress and thermotolerance: Molecular studies in cattle

Abstract: The risk of global climate change has been increasing from day to day due to, the increase in the human population, environmental pollution, and greenhouse gases in the atmosphere. It is estimated that the surface temperature will increase by approximately 1.8 to 4.8 °C at the end of the 2100s. Cattle breeds, which are living in temperate climates will face off increasing temperatures and heat stress in the future. The stress response resulting from the high-temperature effect also results in loss of yield in cattle. Additionally, high temperature and humidity levels cause negative effects on productivity. All these reasons, reveal the necessity of molecular studies related to heat stress and thermotolerance. Scientists have been investigating the molecular mechanisms of heat stress and thermotolerance with many different approaches such as genome-wide association study (GWAS), gene expression, polymorphism, and microRNA studies. In this review, heat stress and its harmful effects are described and molecular studies, which are applied to cattle have been explained.

Key words: Heat stress, GWAS, polymorphism, gene expression, miRNA

Giriş

İnsan popölasyonundaki artış, atıklar ve atmosferdeki CO₂, CH₄, N₂O gibi sera gazlarının oranlarındaki yükseliş küresel iklim değişikliği için risk teşkil etmektedir [37, 64]. Yüzey sıcaklığının 2100'lerin sonunda 1,8-4,8°C aralığında artması beklenmektedir [58, 64]. 2018 yılında yayınlanan IPCC (Intergovernmental panel on climate change/Hükümetlerarası iklim değişikliği paneli) özel raporuna göre, ısı artışının devam etmesi halinde, 2030 ve 2052 yılları arasında küresel ısınmadaki artışın 1,5°C'ye ulaşacağı beklenmektedir [33].

Küresel ısınma nedeniyle birçok bölgede aşırı sıcaklık artışının frekansı ve yoğunluğunda; yağış sıklığı ve miktarında ya da kuraklık olaylarının görölme sıklığında artış beklenmektedir [17, 33, 37, 51, 52, 64]. Karada artan sıcakların GMST (Global Mean Surface Temperature/anlamli küresel yüzey sıcaklı-

ęı) değerlerinden daha yüksek düzeyde olacağı ve iliman iklim kuşağındaki aşırı sıcak günlerde küresel ısınmadaki artışın 1,5°C olması durumunda, 3°C'lik artış görölmesi öngörölmektedir [33]. Geimleri tarım ve kıyı alanlarındaki kaynaklara bağlı olan popölasyonlar ve bazı bölgelerdeki yerli halklar küresel ısınmanın doğrudan etkilerinin yanı sıra, dolaylı etkilerine de yüksek oranda maruz kalacaklardır [32, 33]. Buzul ekosistemleri, kurak bölgeler, küçük adalardaki gelişmekte olan ölkeler ve az gelişmiş ölkeler en çok risk altında olan bölgelerdir [17, 32, 33]. Sahra altı Afrika, Güneydoğu Asya, Orta Amerika ve Güney Amerika'da mısıır, pirinç, buğday ve diğer tahılların veriminde ve pirinç ve buğdayın CO₂'e bağlı beslenme kalitesinde düşüş görölmesi beklenmektedir [33, 55]. Yem kalitesi ve miktarındaki düşüşler, hastalıkların yayılması ve kullanılabilir su kaynaklarında öngörölen kayıplar artan sıcaklığın hayvancılıktaki dolaylı etkileri olarak sayılabilmektedir [2, 33, 51, 63].

Yazışma adresi / Correspondence: Özge şebnem ıldır, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi, Genetik AD. Ankara
E-posta: oscildir@ankara.edu.tr

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0001-7070-4212 • ²0000-0002-8577-7323

Sıcak stresi, dünya genelinde hayvanlarda verim kaybına neden olan en önemli sorunlardan biridir. Her ne kadar hayvanlar zorlu iklim koşullarına adapte olabilseler de; hayatta kalmalarını sağlayan fizyolojik stres yanıtları verim kaybıyla sonuçlanmaktadır. Yüksek sıcaklık ve nem oranları büyüme oranı; süt verimi; süt yağ, protein ve laktoz oranları; yemden yararlanma oranı; canlı ağırlık artışı ve fertilitede düşüşe neden olmaktadır [11, 50].

Küresel ısınmanın Türkiye için olası etkileri düşünüldüğünde yağışlarda azalma, sıcaklıklarda artma, seller ve kuraklık olayları gibi alışılmışın dışında doğa olaylarında artış gözlenmesi beklenmektedir [37]. Küçük ve orta ölçekli işletmeler ile meraya dayalı hayvancılık ile geçimlerini sağlayan gelişmekte olan ülkeler için çevresel stres faktörlerine daha dirençli veya adaptasyon yeteneği güçlü genotiplerin geliştirilmesi oldukça önemlidir [37, 58].

Bu derlemede sıcak stresi ve zararlı etkileri tanımlanmış, sığırlar üzerinde yapılmış moleküler çalışmalar tek bir yayın altında toplanmaya çalışılmıştır.

Sıcak Stresi, Hipertermi ve Fizyolojik Yanıtlar

M.C Appleby ve B.O. Hughes refahı "Hayvanların fizyolojik, çevresel, besinsel, davranışsal ve sosyal ihtiyaçlarının karşılandığı iyi olma hali" olarak tanımlamışlardır. Hayvanlar refah sınırları dışına çıktığında ise stres yanıtları görülmeye başlamaktadır [29]. Ilıman iklimlerde yaşayan sığırlar gelecekte artan sıcaklıklar nedeniyle sıcak stresi ile karşı karşıya kalacaklardır. Şekil 1 çiftlik hayvanlarının sıcak stresine adaptasyon mekanizmalarını göstermektedir [4].

Vücut sıcaklığındaki her 1 °C'lik artış metabolizma hızında %10 artışa neden olmaktadır. Bu nedenle öncelikle homeostazis bozulur, fizyolojiyi dengelemek amacıyla sıcak stresi semptomları görülmeye başlar, ardından hipertermi gerçekleşir. Sıcak stresinden hipertermiye doğru gidildikçe sırasıyla deride vazodilatasyon, dehidrasyon, hipovolemi, hipotansiyon ve serebral iskemi semptomları görülür. Hipertermide artan metabolizma ve dokularda oksijen kullanımındaki artış nedeniyle hücrelerde hipoksi meydana gelir ve bunun sonucunda organ yetmezlikleri görülmeye başlar. Hiperterminin son aşamasında ise enzimler denatüre olur ve hipertermi ölümle sonuçlanır [16, 59].

Yüksek sıcaklık ve nem oranları hücresel ve sistemik yanıtları da beraberinde getirmektedir. Akut stres anında sempatik sinir sistemi uyarımının bir

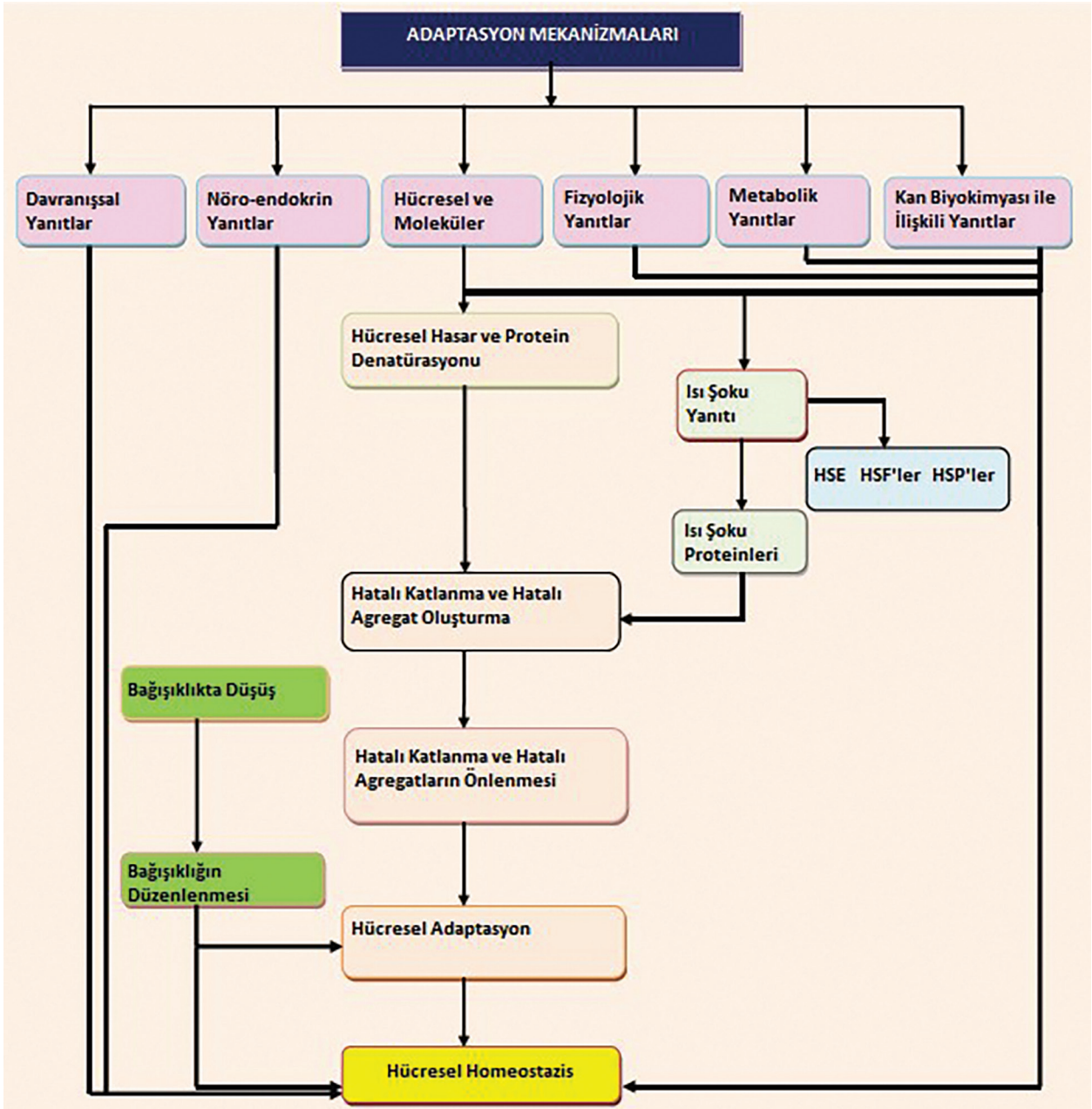
sonucu olarak kalp atımında ve kandaki epinefrin seviyesinde kısa süreli bir artış meydana gelir. Kısa vadede glukokortikoid seviyelerinde artış görülür; sıcak stresinin uzun süre devam etmesi halinde ise glukokortikoid seviyeleri tekrar düşmeye başlar [16, 29]. Kronik stres durumunda ise CRF (kortikotropin salgılatıcı faktör) ACTH (adrenokortikotropik hormon) sentezini uyarır; ACTH salınımını ise kortikosteroidlerin salınımına neden olur [29]. Hipertermi nedeniyle tiroid fonksiyonları baskılanır ve metabolik ısı üretimi azaltılmaya çalışılır [16].

Sıcak stresi söz konusu olduğunda prolaktin seviyesi ve plazma insülin konsantrasyonlarında artış görülmektedir. Strese karşı ortaya çıkan fizyolojik yanıtlar nedeniyle solunum hızı, rektal sıcaklık, plazma kortizol, tiroksin ve triiodotreonin seviyeleri çevresel stresin tespitinde ideal belirteçler olarak önerilmektedir [64].

Termal çevrede homeostazis termoregülasyon ile sağlanmaktadır. Isı değişimi ısı üretimine, evaporatif ve evaporatif olmayan ısı kaybına bağlıdır. Evaporatif olmayan ısı kaybı epidermal damarlaşmadaki değişikliklerle; evaporatif ısı kaybı ise polipne ve terleme ile sağlanmaktadır [59]. Epidermis yüzeyi; ter bezlerinin yoğunluğu ve fonksiyonları; kıl yoğunluğu, inceliği, uzunluğu ve rengi; don rengi; epidermal damarlaşmanın regülasyonu gibi faktörler evaporatif ısı kaybını etkileyen en önemli faktörlerdir [16].

Sıcak Stresinin Verim Özellikleri Üzerindeki Etkileri

Sıcak stresinin sığırlar üzerinde birçok olumsuz etkisi bulunmaktadır. Şekil 2 artan çevresel sıcaklığın sığırlar üstündeki yaygın potansiyel etkilerini göstermektedir [56]. Yüksek sıcaklıklar yem alımı ve ruminasyonu baskılamakta; hızlı soluk alıp verme nedeniyle solunum alkalozu meydana gelmektedir. Oksidatif hasarda artış görülmekte; bağışıklık sistemi olumsuz etkilenmektedir. Üreme performansı ve embriyo gelişiminin de artan çevresel sıcaklıklardan olumsuz etkilendiği bildirilmektedir [19]. Sıcak stresindeki ineklerde çiftleşme ve doğum oranları ile süt veriminde düşüş tespit edilmiştir [74]. Yem alımı, büyüme oranı, döl verimi azalmakta; kızgınlık dönemi sıcak stresine duyarlı ineklerde daha zor tespit edilmektedir. Oosit kalitesi, sperm kalitesi ve embriyo gelişimi artan sıcaklıklardan olumsuz etkilenmekte; bu da fertilitede düşüş ile sonuçlanmaktadır [14, 19, 34].



Şekil 1. Isı şoku proteinlerinin üretiminde ortaya çıkan hücresel ve moleküler mekanizmalar [3].

Sıcak stresi ineklerde süt verimi, laktasyon periyodu, meme sağlığı, somatik hücre skoru ve süt kompozisyonunu etkilemektedir. Hammami ve ark. [26] Holştayn sığır ırkında sıcak stresiyle ilişkili olarak, süt verimi; süt yağ ve protein oranları ile yağ asitlerinin çoğunda düşüş gözlemlenmiştir. Somatik hücre skoru, C18:0, C18:1 *cis*-9, doymamış yağ asitleri, tekli doymamış yağ asitleri, çoklu doymamış yağ asitleri ve uzun zincirli yağ asitlerinin seviyelerinde ise artış olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda süt kompozisyonundaki değişimlerin sıcak stresi

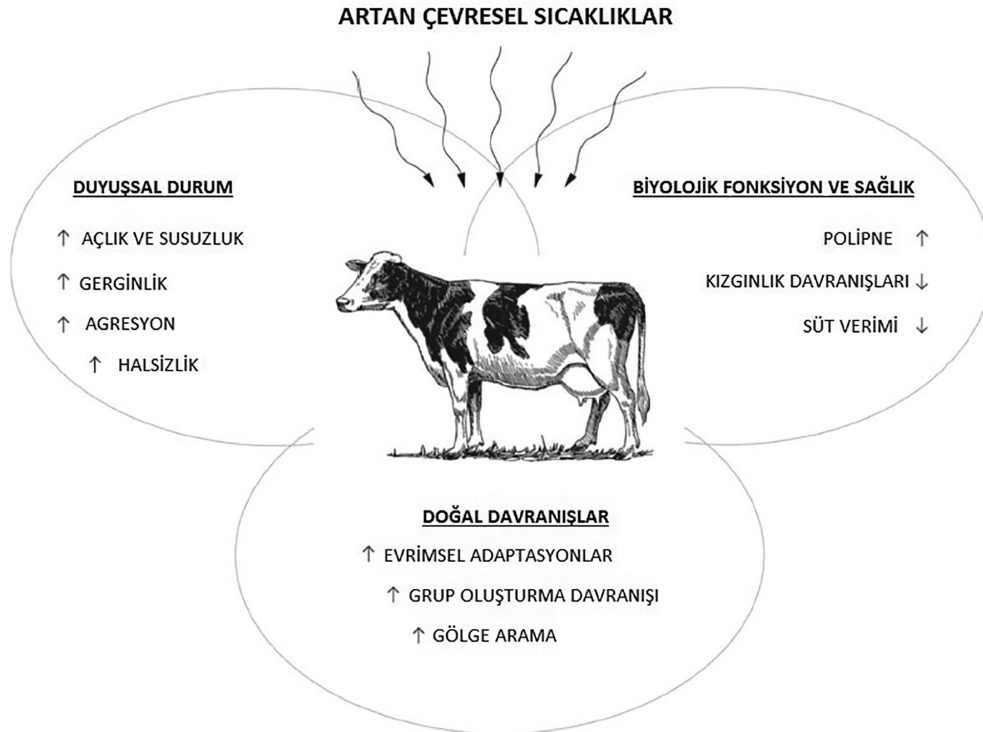
için belirteç olarak kullanılabilmesi önerilmiştir [26]. Das ve ark. [19]'nın yayınları süt sentezi, süt yağı, yağsız kuru madde miktarı ve protein oranlarındaki değişimler bakımından Hammami ve ark. [26]'nın yayınlarını destekler niteliktedir [19, 26]. Süt verimi arttıkça sıcak stresiyle duyarlılığın arttığı belirtilmiş, daha yüksek verim alınabilmesi için barınak, beslenme, elektrolit dengesi gibi çevresel koşulların uygun hale getirilmesi ve termotolerans ile ilişkilendirilmiş genler aracılığıyla belirteç yardımcı seleksiyona gidilmesi önerilmektedir [19]. Pragna ve ark. [57] aynı

verileri desteklemekle birlikte sütteki laktoz oranında düşüş ve mastitise yatkınlık görüldüğünü bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra dünya genelinde süt verimi kayıplarının nedenlerinin net bir şekilde tanımlanabilmesi amacıyla daha geniş kapsamlı çalışmalar yapılması gerektiğini vurgulamışlardır [57]. Thorat ve ark. [71] ise Deoni sığırlarında yaptıkları çalışmada sıcak stresi ile laktasyon periyodu arasında negatif korelasyon görüldüğünü ifade etmişlerdir. Sıcaklık-nem indeksi çalışma süresince stres yaratmayacak düzeylerde ölçülmüş olsa da, sıcaklık-nem indeksi düştükçe aylık laktasyon süt veriminin arttığı belirtilmiş ve süt veriminde düşüşün önüne geçilebilmesi için genomik seleksiyon ve çiftlik yönetiminin önemi üzerinde durulmuştur [71].

Uslucan [73] süt verimi ve fertilitiyi etkileyen çevresel faktörler üzerine çalışmıştır. Çalışma sonuçları sığırlarda sıcak ve soğuk mevsimlerde birçok davranış değişikliği olduğunu göstermiştir. Süt verimi; yem alımı; ayakta durma, dinlenme, hareket etme ve kızgınlık davranışları mevsimler arasında farklılık göstermiştir [73]. Polsky ve von Keyserlingk [56] ineklerde ayakta durma süresi ile topallık ve ağrı arasında ilişki olduğunu belirtmişlerdir. Sıcak stresi dolaylı olarak ayak hastalıklarına predispozisyona da neden olabilmektedir [56].

Trifković ve ark. [72] farklı mevsimlerin Holştayn ırkında kolostrum ve buzağların doğum sonrası adaptasyon kapasitelerine etkileri üstüne çalışmışlardır. Çalışma sonuçları sıcak mevsimlerde kolostrumun hem kompozisyon hem de kalitesinin olumsuz etkilendiğini; sıcak mevsimlerde doğan buzağların ise fizyolojik, metabolik ve endokrin performanslarının muhtemelen sıcak stresi nedeniyle baskılandığını göstermiştir [72]. Buna karşın, Ahmed ve ark. [3] fetal hayatta sıcak stresine maruz kalan buzağların hayatlarının ilerleyen dönemlerinde daha yüksek termotoleransları olduğunu iddia etmektedir.

Sığırları ve verim özelliklerini sıcak stresinin etkilerinden korumak için çevresel faktörlerin hayvanlar için en uygun koşullara getirilmesi oldukça önemlidir. Barınakların fiziksel koşulları geliştirilmeli, çevresel koşullara en uygun ırklar yetiştirilmeli ve ırklar sert iklim koşullarına dayanıklı hale getirilmelidir. Hayvan açısından çevre şartlarına uygun genotiplerin geliştirilmesi en önemli faktörlerden birisidir. Sıcak stresiyle başa çıkabilmek için Renaudeau ve ark. [58] üç temel strateji önermektedir. Yem alımı artırılmalı veya metabolik ısı üretimi azaltılmalı; ısı kaybı kapasiteleri geliştirilmeli; termotoleransı yüksek genotipler elde edilebilmesi amacıyla genetik seleksiyona gidilmelidir [58].



Şekil 2. Çevresel sıcak stresin ani etkileri ve hayvan refahının üç temel bileşeni arasındaki ilişki: (1) hayvanın biyolojik fonksiyonları ve sağlığı, (2) hayvanın duyuşsal durum ve deneyimleri, (3) hayvanın mevcut ısı yönetim stratejileri altındaki doğal davranışları [47].

Sıcak Stresi ve Termoregülasyon için Yapılmış Genom Boyu İlişkilendirme Çalışmaları

Hastalık ve çeşitli karakterlere ilişkin varyasyonlar genom boyu ilişkilendirme (GWAS) çalışmaları ile tanımlanabilmektedir. Belirli bir karaktere sahip binlerce genom genellikle mikrodizin analizine tabi tutulur, elde edilen veriler ilgilenilen karaktere sahip olmayan bireylerin genomları ile kıyaslanarak karakterin oluşumuna etki eden aday genler ve varyantlar tanımlanmaya çalışılır [12]. Bu bölümde sunulan çalışmalarda mikrodizin analizi kullanılmıştır.

Sığırlarda ilk genom boyu ilişkilendirme çalışması Hayes ve ark. [27] tarafından Holştayn ve Jersey ırklarında yapılmıştır. *FGF4* geninin meme epitel hücrelerinin apoptozisinde regülatör görevi gördüğü, insan testisinde eşey hücrelerini artıran sıcaklıklardan koruduğu ifade edilmiş bu nedenle de sıcak stresi ile ilişkilendirilen SNP'lerden (tekli nükleotit polimorfizmi) birinin pozisyonu gereği *FGF4* geninde bulunduğu ve *FGF4* geninin termotoleransa ilişkin önemli bir aday gen olduğu ileri sürülmüştür. [27]. Howard ve ark. [30] Angus, Simental ve Piedmont ırkı sığırlar ve bunların melezleri ile yaptıkları çalışmada kış mevsimi için, *CCNH*, *TNRC6A*, *FGD3*, *G2E3*, *RASA1*, *CSTB*, *DAPK1*, *CACNG3*, *CLCN4*, *PRKCB*, *TRPC5*, *COX4I1* ve *COX7C* genlerinin; yaz mevsimi için ise; *STAC*, *WRNIP1*, *MLH1*, *RIPK1*, *SMC6*, *GEN1*, *SERPINB9*, *KCNS3*, *SLC22A23* ve *TRPC4* genlerinin bulunduğu bölgeleri termoregülasyon ve sıcak stresi ile ilişkili bulmuşlardır. Yapılan fonksiyonel anotasyonlar ve yolak analizleri sonucunda bu bölgelerdeki genlerin hücrel stres, sıcak stresi ve apoptozis yolları ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir [30]. Dikmen ve ark. [22] Holştayn ırkında yaptıkları çalışmada *GOT1*, *KBTBD2*, *RFWD12*, *LSM5*, *SCARNA3*, *SNORA19* ve *U1* genlerinin bulunduğu bölgelerin sıcak stresi altındaki süt ineklerinde kantitatif özellik lokusları olduklarını ve bu bölgelerdeki SNP'lerin termotolerans açısından genetik seleksiyonda kullanılabileceğini ve sıcak stresine verilen yanıtın moleküler mekanizmasının aydınlatılmasında etkili olabileceğini ifade etmişlerdir [22]. Dikmen ve ark. [23]'nün Holştayn ırkındaki bir diğer çalışmalarında *ATP1A1*, *HSP70A*, *PGR*, *CAST*, *SERPINE2* ve *ARL6IP1* genlerinin termoregülasyonla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu genlerdeki mutasyonların sıcak stresinde verilen fizyolojik yanıtlara etkilerinin araştırılması için yeni çalışmaların yapılması gerektiği belirtilmiştir. Hayes ve ark. [27]'nün *FGF4* geni ile ilişkilendirdikleri SNP'in apokrin ter bezlerindeki miyoepitelyal hücre hatları arasındaki bağlantıları sağlamakla görevli *SHANK2* geninde olduğu ifade edilmiştir [23].

Sıcak iklimlere toleransı yüksek olduğu bilinen Doğu Afrika Kısa Boynuzlu Zebularında (Afrika gerçek sığıru ve Asya zebu melezi) yapılan araştırma sonuçları diğer sığır ırkları ile yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında Afrika Kısa Boynuzlu Zebularının *HSPB9*, *DNAJC7*, *DNAJC8*, *DNAJC14*, *DNAJC18*, *PPP1R10*, *PPP1R8*, *KRT* ve *PMEL* genleri yönünden pozitif seleksiyona uğramış oldukları belirlenmiştir. Bu genlerin çoğunun sığağa karşı hücrelerin korunmasını sağlayan ısı şoku proteinleri (HSP) ailesinde yer aldıkları, bir kısmının ise yine sığağa karşı duyarlılık ve direnci doğrudan etkileyen faktörlerden don rengi ve kıl yapısıyla ilişkili oldukları bildirilmiştir [6].

Son olarak, Macciotta ve ark. (2017)'nin İtalyan Holştaynları ile yaptıkları çalışmada süt verimi; süt yağ ve protein oranlarındaki değişiklikler stres yanıtından etkilenen faktörler olarak kabul edilerek temel bileşenler analizi yapılmıştır. *BTRC*, *FGF8*, *MGEA5*, *KCNIP2* ve *HPS6* genlerinin bulunduğu bölge ile *CCSER1* geninin bulunduğu bölge süt verimi ile ilişkili bulunmuştur. *DGAT1*, *HSF1*, *ARHGAP39* ve *RPL8* genleri ile; *MAPK15* ve *ZNF34* genlerinin bulunduğu bölgeler süt yağı oranı ile ilişkilendirilmiştir. Son olarak süt protein oranı ile ilişkili bölgenin *MCAT*, *SAMM50* ve *TSPO* genlerinin bulunduğu bölge olduğu ifade edilmiştir. Artan sıcaklık-nem indeksi verileri ve analiz edilen özelliklerdeki değişimler göz önünde bulundurulduğunda, bu özelliklerin yetiştiricilikte termotolerans ölçütü olarak kullanılabileceği belirtilmiştir [46].

Polimorfizm Çalışmaları

Birçok karakterin ve gen ailesinin sıcak stresi ve termotolerans ile ilişkili olabileceğine ikinci bölümde değinilmişti. Dördüncü bölümde görülen GWAS çalışmalarının sonucunda ise aday genler ve termotolerans etkilediği düşünülen aday SNP'ler belirlenmişti. Sonraki aşamada yapılan çalışmaların büyük bir kısmını sıcak stresi ile ilişkili olduğu düşünülen karakterlere ilişkin aday genlerde yapılmış olan polimorfizm çalışmaları oluşturmaktadır. Bu karakterlerden bazıları ve yapılan polimorfizm çalışmaları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

1. "*SLICK hair*" fenotipi: Kısa ve ince kıl yapısıyla karakterize otozomal dominant kalıtım gösteren bir fenotiptir. Bu fenotipe sahip bireylerin yüksek sıcaklıklarda diğer bireylere göre daha dayanıklı oldukları belirtilmektedir [53]. *PRLR* geninde tespit edilen 20 baz çiftlik bir delesyon ve iki farklı anlamsız mutasyon bu fenotipe neden olmaktadır [54].

2. *ATPaz genleri*: Sıcak stresi oksidatif strese neden olarak plazma K^+ ve Na^+ seviyelerinde deği-

şimlere neden olmaktadır. ATPaz proteininin sentezinde görevli genler Na⁺ iyonlarının hücre zarından transportu ile ilişkilidir. Liu ve ark. [44] Holştaynlarda *ATP1A1* geninde 14'üncü ekzonda polimorfizm saptamış; bazı genotiplere sahip bireylerin sıcak stresine diğer bireylerden daha dirençli olduklarını belirtmişlerdir [44]. Aynı araştırmacılar 2011 yılında aynı gende yeni bir SNP bulmuş; tespit ettikleri genotiplerden birinin diğer genotiplere göre sıcak stresi karşısında daha dirençli olduklarını önermişlerdir [45]. Kashyap ve ark. [35] Tharparkar ve Vrindavani ırklarında *ATP1A1* geninde yaptıkları çalışmada 17'nci ekzonda bir varyant tespit etmişlerdir. Bu varyantın bulunduğu genotipteki bireylerin diğer genotipteki bireylere göre solunum hızı ve rektal sıcaklık açısından daha avantajlı durumda olduklarını belirtmişlerdir [35].

Wang ve ark. [77] Çin Holştaynlarda *ATP1B2* geninde polimorfizm çalışması yapmışlar; 2'nci ve 4'üncü intronlarda sırasıyla iki adet tekli nükleotit varyantı bulmuşlardır. Araştırmacılar 4'üncü intronda buldukları varyantı termotolerans ile ilişkilendirmişlerdir [77].

3. **PPAR α geni:** PPAR α adaptif termogenez, metabolizma ve hücre farklılaşması gibi biyolojik yanıtlarda görev alan bir transkripsiyon faktörüdür. Fang ve ark. [24] Çin Holştaynlarda *PPAR α* geninde polimorfizm taramışlardır. Çalışmada sekiz farklı haplotip tespit edilmiş; bu haplotiplerden birine sahip bireylerin sıcak stresine karşı diğer haplotiplere sahip bireylerden daha dirençli oldukları önerilmiştir [24].

4. **HSP'ler ve HSP ilişkili proteinler:** Isı şoku proteinleri hücreleri toksik etkilerden ve sıcak stresine bağlı meydana gelen termal hasarlardan korumaktadırlar. Bu proteinler moleküler ağırlıklarına göre adlandırılmışlardır. HSP27 ailesi mikrofilamentlerin stabilizasyonu ve apoptozisin önlenmesinde görev almaktadır. HSP60 ailesi proteinlerin yeniden katlanmasından sorumludur; denatüre edilmiş proteinlerin agregat oluşturmasını önler ve apoptozis öncesinde görev alır. HSP70 ailesi moleküler şaperonlarda ve apoptozisin önlenmesinde görevlidir. HSP90 ailesi steroid hormon reseptörlerinin regülasyonunda, protein katlanmasında, hücre sinyalinde ve tümör baskılanmasında görevlidir. HSP110/104 ailesi protein katlanmasında görev yapar. Sıcak stresine karşı en duyarlı HSP'lerin HSP70 protein ailesi olduğu bildirilmiştir [13, 68].

1990 yılında sıcak stresi altındaki sığır lökositlerinde HSP'lerde artış görüldüğü; 1997 yılında ise sıcak stresinde HSP'lerde artış görülürken diğer proteinlerin ifadesinde düşüş olduğu gösterilmiştir

[15]. Favatier ve ark. [25] HSP70 ailesindeki genlerin oksidatif hasar, iskemi, yangı, UV radyasyonu ve yaşlanmaya karşı koruyucu olduklarını belirtmiş; balık ve böceklerde termotolerans ile HSP70 ifadelerinin arasında pozitif korelasyon görüldüğünü bildirmiştir [25].

HSP70 proteinlerinden sorumlu *HSPA8*, *HSPA6*, *HSPA1A*, *HSPA1L*, *HSPA2* genleri [4] ile ilişkili olarak yapılmış çalışmalar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

Adamowicz ve ark. [1] *HSP70-1* geninin 3' UTR (Translasyonu yapılmayan bölge) bölgesinde yeni bir SNP tanımlamışlardır. Cai ve ark. [10] aynı yıl sıcak stresine maruz kalan süt ineklerinin lenfositlerinde *HSP70* polimorfizminin *HSF1*, *Bcl2* ve *Bax-a* gen ifadeleri ile arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Sonuçlar bu bölgedeki polimorfizmlerin *HSP70*, *HSF1*, *Bcl2* ve *Bax-a* mRNA'larının ifadelerinde değişikliklere neden olduğunu göstermiştir [10]. Rosenkrans ve ark. (2010) *HSP70* geninin promotor bölgesinde polimorfizm çalışması yapmış ve tespit edilen polimorfizmlerin Brahman ırkında doğum ile ilişkisini araştırmışlardır. Tespit edilen 11 mutasyondan 3'ünün doğum ile ilişkili olduğu önerilmiştir [60]. Li ve ark. [43] *HSP70A1A* polimorfizmlerini ve Çin Holştaynlarda bu genin doku spesifik ifadelerini incelemişlerdir. Üç genotip termotolerans ile ilişkili bulunmuştur. Gen ifadelerine bakıldığında ise en yüksek ifade görülen dokudan en düşük ifade görülen dokuya doğru organlar kalp, karaciğer, böbrek, kas ve dalak olarak sıralanmıştır [43]. Maróti-Agóts ve ark. [48] sıcak stresine adapte olduğu bilinen yerli bir ırk olan Hungarian Grey ile soğuk iklimde adapte olduğu bilinen Norwegian Red ve Finnish Ayrshire melezlerini karşılaştırmışlardır. Hungarian Grey ırkı bireylerin hiçbirinde *HSP70.2* geni promotor bölgesinde tanımlanmış AP2 mutanı homozigot olarak bulunmamasına rağmen, melez bireylerde mutant ve yabanıl tip alleller eşit oranda bulunmuştur [48]. Basiricò ve ark. [7] Holştaynlarda *HSP70.1* geni polimorfizmi ve hücresel termotolerans arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Polimorfizmler tespit edildikten sonra seçilen genotiplerdeki bireylere ait örnekler ile hücre kültüründe çalışılmıştır. Sıcağa maruz bırakılan hücrelerin hayatta kalma kapasiteleri, gen ve protein ifadeleri incelenmiş; iki genotipin diğer genotiplere göre sıcak stresine daha dayanıklı olduğu tespit edilmiştir [7]. Deb ve ark. [20] Frieswal (Holştayn ve Sahival ırkı melezi) ırkı sığırlarda *HSP70.1* geni AP2 kutusunda polimorfizm taramışlardır. Sonuçlar AP2 kutusuna ait genotipleri heterozigot olarak taşıyan bireylerin mutant ve yabanıl tip genotip taşıyan bireylere göre daha yüksek süt verimi, laktasyon piki, protein ve yağ oranlarına sahip olduklarını göster-

miştir [20]. Xiong ve ark. [78] Çin Holştaynlarında *HSP70A1A* genindeki haplotiplerin termotolerans ile ilişkilerini incelemişlerdir. Sekiz yeni mutasyonun tespit edildiği çalışmada üç farklı haplotip tanımlanmıştır. Farklı haplotiplerde genin ifadesinde değişiklikler olduğu gözlemlenmiştir [78]. Kerekoppa ve ark. [36] Holştayn melezleri ve Deoni ırklarında *HSPA1A* geninin karakterizasyonu için çalışmışlardır. Çalışma sonucunda 10 farklı polimorfizm tespit edilmiştir. g.312-C>G ve g. 1098-A>G polimorfizmleri her iki ırkta ortak olarak bulunmuş; g.456-G>A, g.972-A>G, g.1788-G>A, g.1766-C>T ve g.2033-G>C polimorfizmleri yalnızca Deoni ırkında tespit edilmiş; g.480-A>G, g.574_575insC, ve g.624_625insC polimorfizmleri ise yalnızca Holştayn melezlerinde tespit edilmiştir. Tespit edilen 10 nükleotid polimorfizminden üçü amino asit değişikliğine; insersiyonlar ise amino asit değişikliği ile birlikte çerçeve kayması mutasyonuna neden olmaktadır [36]. Bhat ve ark. [9] Tharparkar ırkı sığırlarda *HSP70* polimorfizminin termotolerans üstündeki etkilerini araştırmışlardır. Aspartattan tirozine amino asit dönüşümüne neden olan g.149-G>T mutasyonunu homozigot olarak barındıran bireylerin sıcak stresine toleransının daha yüksek olduğu bildirilmiştir [9]. Bharati ve ark. [8] kronik sıcak stresi altındaki Tharparkar ırkı sığırlarda *HSP70* geni ifadesini incelemişlerdir. Sonuçlar *HSP70* mRNA ifadesinin sıcaklık-zaman durumuna göre farklılık gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Sıcağa maruziyetten on gün sonra ifadenin daha yüksek olduğu belirtilmiştir [8]. Maibam ve ark. [47] Tharparkar ve Karan Fries (Tharparkar ve Holştayn melezi) ırklarında *HSP70* geni ifadesine bakmışlardır. Deri biyopsileri ile yapılan çalışmada yaz ve kış mevsimlerinde gen ifadesinin diğer mevsimlere göre daha yüksek olduğu; Tharparkar ırkının Karan Fries ırkına göre sıcak stresine daha dayanıklı olduğu görülmüştür [47]. Suqueli Garcia ve ark. [70] *HSP70* genleri ile ilişkili yapılmış çalışmalarda çeşitli tutarsızlıklar olduğunu farketmişlerdir. Çalışmanın sonuçları sığır referans genomu UMD 3.1.1.'de muhtemel bir delesyonun varlığını göstermiştir. Daha önce çalışılan diziler üstünde yapılan *in silico* analizler referans genomda 11,1 kilobazlık bir delesyon olduğunu göstermiştir. *HSP70.1* ve *HSP70.2* genlerinde yalnızca bir amino asidin farklı olduğuna vurgu yapılan çalışmada, iki genin promotor bölgelerinin ise türler arasında korunmuş farklılıklar içerdiğine dikkat çekilmiştir. Daha önce çalışılan diziler farklı bir referans dizi ile hizalanmış (genbank erişim numarası: FQ482128.2) bazı çalışmalarda yanlış *HSP70* geni ile çalışıldığı; bazı çalışmalarda ise hangi gen ile çalışıldığının belirsiz olduğu ortaya çıkmıştır [70].

Verma ve ark. [75] *HSPB8* geninde iki adet SNP tespit etmiş; her iki SNP'in termotoleransla anlamlı derecede ilişkili olduklarını bildirmişlerdir.

Kumar ve ark. [39] Karan Fries ırkında *HSPB6* geninde dizi analizi ile beş yeni varyant tespit etmiştir. Bu varyantların intergenik bölge, 3' UTR bölgesi ve intronik bölgede oldukları ifade edilmiştir. Protein dizisini değiştiren herhangi bir amino asit değişikliği olmamasına karşın bu bölgelerde gözlenen nükleotid değişimlerinin gen ifadesini değiştirebileceği ifade edilmiştir. Sıcak stresi yanıtı ve deney tasarımı arasında herhangi bir ilişki tespit edilemediği bildirilmiştir [39].

HSP90 proteinlerinin sentezinden sorumlu genler ile yapılan çalışmalar aşağıdaki gibi özetlenmeye çalışılmıştır:

Shergojry [68] Deoni sığır ırkında *HSP90AA1* geninin moleküler karakterizasyonu üstünde çalışmıştır. Genetik varyantlar ve reproduktif performans arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmada, genetik varyantlardan birinin ilk buzağılama yaşı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [68]. Kumar ve ark. [38] *HSP90AA1* geninin 3'üncü ekzonunda bulunan bir SNP'in Karan Fries ırkında termotolerans ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Badri ve ark. [5] Çin Holştaynlarında *HSP90AA1* geninde beş adet polimorfizm saptamış; bu polimorfizmlerden birinin (g.-87-G>C) promotor bölgede; üçünün (g.605-A>G; g.1662-T>G; g.2819-G>A) protein kodlayan bölgede; sonuncusunun ise (g.4172-A>G) 3'UTR bölgesinde olduğunu belirlemişlerdir. g.2819-G>A yabancıl tip allelinin stres döneminde sütte daha çok somatik hücre sayısına neden olduğu bildirilmiştir. g.-87-G>C mutant allelinin ifadesinin sıcak ve nemin toplamalı etkisine maruz kalındığında yabancıl tipe göre daha fazla olduğu fakat tek zincir konformasyonu ve süt üretimi açısından normal sıcaklık ve stres dönemi arasında herhangi bir farklılık gözlenmediği belirtilmiştir. g.4172-A>G mutant allelinin ifadesinde dme-miR-2279'a bağlı olarak düşüş olabileceği belirtilmiştir [5].

Charoensook ve ark. [13]'nün Holştayn ve yerli Thai sığır ırkları ile yaptıkları çalışmada *HSP90AB1* geninde 9 adet SNP tespit edilmiş fakat bu SNP'lerin sıcak stresi nedeniyle meydana gelen fizyolojik yanıtlarda anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı ifade edilmiştir. Sailo ve ark. [62]'nün Jersey melezlerinde yaptıkları çalışmada *HSP90AB1* genindeki genetik varyantlardan yalnızca birinin düşük rektal sıcaklık ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Sajjanar ve ark. [61]'nün Hindistan'da süt verimi için yetiştirilen sığırlar ile yaptıkları çalışmada *HSP90AB1* geninde tespit ettikleri genotiplerden birine sahip bireylerin sıcak

stresine karşı fizyolojik yanıtlarının ve süt veriminin diğer bireylere göre daha iyi olduğu bildirilmiştir.

HSP ilişkili diğer proteinlerle yapılmış çalışmalar aşağıdaki gibidir:

Li ve ark. [42] Çin Holştaynlarında yaptıkları çalışmada *HSF1* geninde iki yeni SNP tanımlamışlar ve her iki SNP'in de termotolerans ile anlamlı derecede ilişkili olduklarını ifade etmişlerdir.

Çin Holştaynlarında *HSBP1* geninde yedi haplotip tespit edilmiş ve bu haplotiplerden birine sahip bireylerin, diğer bireylere göre sıcak stresi daha dayanıklı oldukları ifade edilmiştir [76].

Sıcak stresi verilen fizyolojik yanıtlar ve termotolerans birçok genin aktivitesinden etkilenmektedir. Farklı bireylerin yalnızca tek bir gende tespit edilen polimorfizmlere göre, gerek HSP genleri gerekse protein onarımı ile ilişkili yollarda görevli diğer genlere bakılmaksızın sıcak stresi duyarlı veya dirençli olarak nitelendirilmesi çalışmaların ne derece güvenilir olduğu konusunda şüphe uyandırmaktadır. Çalışmalarda kullanılan yöntemlerden SSCP (Tek iplikçik konformasyon polimorfizmi/ Single Strand Conformational Polymorphism) gibi eski ve düşük çözünürlüklü bir metodun yerini DNA dizi analizine bırakması; elde edilen polimorfizmlerin genin yapısı, fonksiyonu ve ifadesini ne şekilde etkileyebileceğine dair verilerin biyoinformatik analizlerle ortaya konulması; doğrulama amacıyla klonal hücre hatlarında ilgili mutasyonların indüklenerek sıcak stresi maruz bırakılması sonucu stres yanıtının ve hücrenin yaşamsal fonksiyonlarının ne şekilde etkilediğinin tespit edilebileceği daha sistemli deney tasarımları çalışmaların güvenilirliğini artıracaktır. Polimorfizm çalışmalarında "*Slick hair*" fenotipinden tek bir gen sorumlu olduğu için [54], *PRLR* genindeki mutasyonların bu fenotipi etkilediği bilgisi diğer çalışmalarla kıyaslandığında oldukça güvenilir bir bilgidir. İkinci bölümde de değinildiği üzere kıl yoğunluğu, inceliği ve uzunluğu gibi karakterler evaporatif ısı kaybını etkilediğinden *PRLR* geni mutasyonları termoregülasyonda önemli faktörlerden biridir [14, 53, 54].

Gen İfadesi Çalışmaları

Sıcak stresi ile ilişkili yapılmış birçok gen ifadesi çalışması bulunmaktadır. Horowitz [28], HSP70 benzeri protein ifadeleri yüksek olan türlerin yüksek sıcaklıklara daha dayanıklı olduklarını belirtmiştir.

Collier ve ark. [15] sığır meme epiteli kollajen jel kültürü sisteminde çalışmışlardır. Çalışmada aklimasyon, adaptasyon ve termotolerans ile ilişkili genleri araştırmak amaçlanmıştır. *PIN*, *COLL* ve *UTRO* genleri

artan sıcak stresiyle negatif korelasyon gösterirken; *RAS*, *Lig*, *PFK-P*, *p38*, *CLK1*, *BAG3*, *HSP40*, *PLTP*, *TRAF*, *SIPP*, *HSP70A*, *HSP70B* genlerinin ifadeleri sıcak stresi ile birlikte artış göstermiştir. İfadelerinde artış görülen genlerin stres yanıtı ve protein onarımında görevli oldukları; ifadelerinde düşüş görülen genlerin ise biyosentez, metabolizma ve morfogenez ile ilişkili oldukları vurgulanmıştır. Gen ifadelerindeki değişimlerden anlaşıldığı üzere sıcak stresinin zararlı etkilerine maruz kalan hücrelerde stres yanıtı ve protein onarımı ile ilişkili mekanizmalar devreye girmekte; diğer faaliyetler ise baskılanmaktadır [15].

Collier ve ark. [16] sistemik sıcak stresi yanıtı ve moleküler mekanizmalarını derledikleri yayınlarında sıcak stresi yanıtında gen ifadesi değişimlerinin aşamalarını açıklamışlardır. Sıcak stresi maruziyette ilk önce *HSF1* (ısı şoku faktörü 1) aktive olmaktadır. Bunu HSP ifadelerinin artışı ve diğer protein ifadelerinin düşüşü izlemektedir. Glukoz ve amino asit oksidasyonunda artış; yağ asidi metabolizmasında düşüş gözlenir ve endokrin sistem stres yanıtı için aktive edilir. HSP'lerin hücre dışı kompartmana çıkışı ile bağışıklık sistemi uyarılır [16].

Artan HSP ifadeleri hücreleri ısı şoku, hipertermi, dolaşım şoku ve serebral iskemiyeye karşı korumaktadır. Sıcak stresi maruz kalınan süre uzadığında endokrin sistem de hücresel stres yanıtını etkilemektedir. Melatonin, prolaktin, prostaglandin- α ve glukokortikoidler HSP ifadesini artırırken, leptinin HSP ifadesini baskıladığı bildirilmiştir [16].

Mehla ve ark. [49] Sahiwal ırkı (Zebu) sığırlarda yaptıkları mikrodizin çalışmasında sıcağa maruziyet sonrası 140 transkriptin ifadesinde artış; 77 transkriptin ise ifadesinde düşüş saptamışlardır. *HSF1* ifadesi ve HSP'lerin sentezlenmesinde artış görülürken, diğer proteinlerin ifadelerinde düşüş görülmüş; HSP'lerin hücre dışına salınımının ardından bağışıklık sisteminin aktive edildiği belirtilmiştir [49].

Li ve ark. [40] sığır meme epiteli hücre kültüründe sıcağa maruziyetin etkilerini inceleyen bir çalışma yapmışlardır. Mikrodizin analizinde ısıya maruz kalan grupta kontrol grubuna göre 123 genin ifadesinde artış, 419 genin ifadesinde ise düşüş gözlemlenmiştir. Hücre iskeleti ve TGF- β sinyal yolağı ile ilişkili *FGF7*, *CHRM3*, *ROCK2*, *PIK3CA*, *PPP1R12A* ve *BMPR1A* genlerinde ifade düşüşü; HSP ailesindeki *HSPB8*, *HSPA1A*, *HSPA5* ve *HSP90AB1* genlerinde ise ifade artışı tespit edilmiştir [40]. HSP gen ailesindeki genlerde görülen ifade artışı ve diğer yollarda görevli genlerde görülen ifade düşüşleri Collier ve ark. [13, 16]'nın yayınlarını destekler nitelikte görülmektedir.

Deb ve ark. [21] *ATP1B1*, *ATP1B2* ve *ATP1B3* izoformları ile sıcak stresine ilişkisini araştırdıkları çalışma sonucunda *ATP1B1*, *ATP1B2* transkriptlerinin sıcak stresinde anlamlı derecede artış gösterdiği belirlenmiş; her üç izoformun *HSP70* geni ile arasında pozitif korelasyon görüldüğü bildirilmiştir.

Li ve ark. [41] granüloza hücrelerinde sıcak stresinin progesteron, 17β -östradiol ve apoptozise etkilerini araştırmak için bir çalışma tasarlamışlardır. Isıya maruz bırakılan hücreler ve kontrol grubu karşılaştırıldığında ısıya maruz bırakılan grupta 175 genin ifadesinde artış; 1036 genin ifadesinde ise düşüş gözlenmiştir. *HSP90B1*, *CASP3*, *BAX*, *BCL-2* genlerinde anlamlı derecede ifade artışı; *SF1*, *STAR*, *CYP11A1* ve *CYP19A1* genlerinde ise anlamlı derecede ifade düşüşü gözlenmiştir. Isıya maruz bırakılan grupta *CASP3*'ün artan ifadesi ve *BAX/BCL-2* mRNA oranının artışı ve buna bağlı olarak apoptoziste anlamlı derecede artış tespit edilmiştir. Yine bu grupta sığağa maruziyette koruyucu rolleri olduğu bilinen HSP ilişkili *HSP32*, *HSP60*, *HSP70*, *HSP90* ve *HSP105* genlerinin ifadelerinde anlamlı artış göze çarpmaktadır [41].

Srikanth ve ark. [69] RNA dizileme analizi ile sıcak stresine maruz kalan Holştayn buzağılarında anlamlı derecede farklı ifade edilen genleri tanımlamaya çalışmışlardır. Analiz sonuçları 376 genin farklı ifade edildiğini göstermiştir. Sığağa maruziyetin birinci, ikinci ve üçüncü günlerinde sırasıyla 343, 261 ve 256 genin ifadesinde artış; 159, 133 ve 120 genin ifadesinde düşüş görülmüştür. İfade artışı ve düşüşü görülen genler moleküler fonksiyonları açısından sınıflandırıldığında genlerin ısı şoku faktörleri ve şapetonlar; bağışıklık sisteminde görevli genler ve MAPK yolağında görev yapan genler olarak gruplandıkları görülmüştür. HSP ilişkili genlerden *HSPA1A*, *HSPA8*, *HSPH1*, *HSP90AB1*, *HSP90AA1*, *DNAJA1*, *DNAJB1*, *HSPB1*, *STIP1* genlerinin ifadelerinde artış; *ATPA7A* ifadesinde ise düşüş görüldüğü bildirilmiştir. İfade artışının en fazla gözlemlendiği genler *TSK*, *IRF4*, *PGA5*, *HSPA1A*, *BOLA-DQA5*, *STT3A*, *PSIP1*, *PPP1R1B*, *HSPH1*, *TNFRSF13C* genleri; ifade düşüşünün ise en fazla görüldüğü genler *PSTK*, *SDCCAG8*, *C11orf54*, *ACTR5*, *FBXW8*, *FAM46A*, *VCAN*, *MCTP1*, *EHD4* ve *NRP2* olarak bildirilmiştir [69].

MikroRNA Çalışmaları

MikroRNA'lar (miRNA) 18-25 nükleotit uzunluğunda, tek zincirli, küçük RNA molekülleridir. DNA'dan transkribe olan fakat proteine translasyonu gerçekleştirilmeyen bu moleküller gen ifadelerinin transkripsiyon sonrası regülasyonunda kritik rol oynamaktadır. Protein kodlayan genlerin mRNA'larının ge-

nellikle 3' UTR bölgesine komplementerite esasına göre bağlanan miRNA'lar, hedefledikleri mRNA'ların degradasyonuna neden olabilmekte veya proteine translasyonlarını baskılayabilmekte; bu sayede hedefledikleri genlerin ifadelerini değiştirebilmektedirler. Bir miRNA birden fazla protein kodlayan geni hedefleyebilmekte, bir gen ise birden fazla miRNA tarafından hedeflenebilmektedir [67].

Sengar ve ark. [65] sıcak stresine maruz kalan Frieswal ırkı sığırlarda yaz mevsiminde 65 miRNA'nın farklı şekilde ifade edildiği belirlemişlerdir. Sıcak stresi sırasında bta-miR-103-2, bta-miR-2898, bta-miR-2478 ve bta-miR-181b-2'in ifadelerinde anlamlı derecede artış; bta-miR-2311 ve bta-miR-6536-2'nin ifadelerinde ise anlamlı derecede düşüş görüldüğü belirtilmiştir. Bu miRNA'ların birçoğunun HSP ilişkili proteinleri hedefledikleri tespit edilmiştir [65]. Aynı araştırmacılar 2018 yılında Sahiwal ırkında yaz mevsiminde kış mevsimine kıyasla bta-miR-1248, bta-miR-2332, bta-miR-2478 ve bta-miR-1839'un ifadelerinde anlamlı artış; bta-miR-16a, bta-let-7b, bta-miR-142 ve bta-miR-425 ifadelerinde ise anlamlı düşüş tespit etmişlerdir [66]. Hu ve ark. [31] normal koşullarda ve sıcak stresindeki besi sığırlarında ifade edilen miRNA profillerini incelemişlerdir. miR-1246'nın sıcak stresi altındaki sığırlarda anlamlı derecede ifade artışı gösterdiği tespit edilmiştir. Bu miRNA'nın akciğer hücrelerinde sıcaklıkla indüklenen apoptozisi baskılayan *PCBP2* ve *CREBL2* mRNA'larının 3'-UTR bölgesine bağlandığı deneysel olarak gösterilmiştir [31]. miR-1246 ifadesinin artışı *PCBP2* ve *CREBL2* ifadelerini baskılayarak akciğer hücrelerinde sıcaklık ile indüklenen apoptozise neden olmaktadır.

Tartışma ve Sonuç

Sığırlarda sıcak stresi ve termotoleransın moleküler mekanizmalarının aydınlatılması için birçok çalışma yapılmıştır. Sıcak stresine verilen fizyolojik yanıt ve termotolerans birçok gen, transkripsiyon faktörü ve miRNA'lar gibi epigenetik faktörlerden etkilenmesine karşın; çalışmaların birçoğunda tek bir gene odaklanılmıştır. Bu nedenle araştırmalarda deney tasarımı doğru sonuçlara ulaşmak için oldukça önemlidir.

Sıcak stresi ve termoregülasyon konusunda tanımlanmış birçok belirteç olduğu görülmektedir. Yapılmış çalışmalarda sıcak stresine duyarlılık ve direnç konularında farklı belirteçlerin kullanılması söz konusudur. Bu nedenle, araştırmalarda elde edilen sonuçların diğer çalışmalarla karşılaştırılması zorlaşmaktadır. Örneğin; araştırmacılar bir çalışmada rek-

tal sıcaklık ve solunum sayısını stres belirteci olarak kullanırken; bir diğer çalışmada ise eritrositlerdeki potasyum konsantrasyonu stres belirteci olarak ele alınmıştır. Bu durum iki çalışmadan elde edilen bulguların karşılaştırılmasını, seçilen stres belirteçlerinin farklı olması nedeniyle zorlaştırmaktadır.

Stres yanıtını etkileyen birçok faktör göz önüne alındığında tekli nükleotit varyasyonları üstüne yapılmış çalışmalarda canlı organizmalar yerine, hücre kültürü çalışmalarının kullanımının daha etkili ve kesin sonuçlar vermesi olasıdır. CRISPR/Cas9 gibi yeni genom düzenleme teknolojileri ile istenen mutasyonlar indüklenebilmektedir [18]. Aday genlerdeki polimorfizmlerin termotoleransa etkisi araştırılırken, hücre kültüründe istenen mutasyonlar indüklenerek sıcak stresine duyarlılık veya direnç yönünden incelenebilmesi bu sayede artık mümkündür. Hücre kültürü çalışmalarında elde edilen ön sonuçlar ise daha sonra canlı organizmalarda test edilerek *in vivo* etkileri gözlemlenebilir.

HSF1 gibi bazı transkripsiyon faktörlerinin sıcak stresi yanıtını etkileyebildikleri bilinmektedir [16; 42]. Örneğin; *HSF1* transkripsiyon faktörü *HSP70* geninin promotor bölgesine bağlanarak stres yanıtının başlamasını sağlamaktadır. Eğer HSE'de (ısı şoku elementi; *HSP70* geninin promotor bölgesinde bulunur ve *HSF1* transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgesidir) olası bir metilasyon söz konusu olursa; *HSF1* ve *HSP70*'in bağlanmaları sekteye uğrayabilir ve bu nedenle *HSP70* mRNA'sı sentezlenemez [42]. Tek bir gen ile yapılan çalışmalara bakıldığında, hiçbir çalışmada çalışılan genlerin promotor bölgelerinde DNA metilasyonunun araştırılmadığı görülmektedir. Yalnızca promotor bölge metilasyonu değil, aynı zamanda gen üstündeki diğer regülatör elementlerin bulunduğu bölgelerdeki CpG adacıklarında yapılacak metilasyon analizleri de gen ifadelerindeki değişimlerin nedenlerinin aydınlatılmasını sağlayacaktır.

miRNA'ların da UTR bölgelerine bağlanarak gen ifadesini transkripsiyon sonrası aşamada düzenleyebildikleri bilinmektedir. miRNA bağlanma bölgelerindeki olası nükleotit değişimleri transkripsiyon sonrası aşamada gen ifadelerini etkileyebilecektir. Sıcak stresi ve termotolerans konularında miRNA'lar ile yapılmış çalışmaların sayısı oldukça azdır [31, 65, 66]. miRNA çalışmaları ile hedef genlerdeki tekli nükleotit polimorfizmi çalışmalarının birleştirildiği bir deney tasarımı bu konuda yapılacak çalışmaların doğruluğu ve güvenilirliğini artıracaktır.

HSP70 genleri ile ilişkili yapılmış çalışmalarda sığır referans genomundaki (UMD 3.1.1.) delesyon

nedeniyle karışıklık olduğu Suqueli Garcia ve ark. [70] tarafından gösterilmiştir. Gelecekte bu genler ile ilişkili yapılacak çalışmaların Suqueli Garcia ve ark. [70]'nın yayınlarına göre doğrulanarak gerçekleştirilmesi daha doğru sonuçlar alınmasını sağlayacaktır.

Dünya genelinde verim kaybına neden olan en önemli sorunlardan biri sıcak stresidir. Küresel iklim değişikliği nedeniyle yüzey sıcaklığında öngörülen sıcaklık artışları ılıman iklim kuşağındaki ülkelerde de sıcak stresi riskinde artışa neden olacaktır. Bu nedenle sıcak stresine verilen yanıtlar ve termotoleransın moleküler mekanizmasının aydınlatılması amacıyla yapılan çalışmalar gittikçe önem kazanmaktadır. Sıcak stresine verilen yanıtla ilişkin mekanizmalar aydınlatıldığında; akla gelecek ilk soru küresel iklim değişikliği karşısında hangi stratejinin izlenmesi gerektiği olacaktır. Çevreye adaptasyon mekanizmaları geçmişten günümüze uzanan ve devam eden bir süreçtir. Yerli ırklar ve nesillerdir belirli bir bölgede yetiştirilen ticari ırkların çevresel etkilere adaptasyonu diğer ırklara göre daha fazladır. Irkların nesillerdir yetiştikleri çevresel koşullara adaptasyonlarının genetik seleksiyonla geliştirilmesi, tüm ırkların sert çevre koşullarına dayanıklılıklarının benzer şekilde artırılmasına kıyasla daha etkili bir yöntem olacaktır.

Kısaltmalar

3' UTR	: 3' ucundaki translasyonu yapılmayan bölge (3' Untranslated region)
ACTH	: Adrenokortikotropik hormon (Adrenocorticotrophic hormone)
CpG adacıkları	: Gen üstünde gen ifadesinin regülasyonu ile ilişkili ardişık CG (sitozin-guanin) nükleotitlerinin bulunduğu bölgeler
CRF	: Kortikotropin salgılatıcı faktör (Corticotropin releasing factor)
GMST	: Anlamli küresel yüzey sıcaklığı (Global Mean Surface Temperature)
GWAS	: Genom boyu ilişkilendirme çalışması (Genome-wide association study)
HSE	: Isı şoku elementi, <i>HSP70</i> geninin promotor bölgesinde <i>HSF1</i> transkripsiyon faktörünün bağlandığı DNA dizisi (Heat shock element)
HSP	: Isı şoku proteinleri (Heat shock proteins)
IPCC	: Hükümetlerarası iklim değişikliği paneli (Intergovernmental panel on climate change)
miRNA	: MikroRNA
SNP	: Tekli nükleotit polimorfizmi (Single nucleotide polymorphism)
SSCP	: Tek iplikçik konformasyon polimorfizmi (Single strand conformational polymorphism)

Kaynaklar

- Adamowicz T, Pers E, Lechniak D (2005): A New SNP in the 3'-UTR of the hsp 70-1 Gene in *Bos taurus* and *Bos indicus*. *Biochemical Genetics* 43 (11-12): 623-627.
- Aggarwal P, Vyas S, Thornton P, Campbell BM (2019): How much does climate change add to the challenge of feeding the planet this century? *Environ Res Lett* 14: 043001.
- Ahmed BMS, Younas U, Asar TO, Dikmen S, Hansen PJ, Dahl GE (2017): Cows exposed to heat stress during fetal life exhibit improved thermal tolerance. *Journal of Animal Science* 95: 3497-3503.
- Archana PR, Aleena J, Pragna P, Vidya MK, Abdul Niyas PA, Bagath M, Krishnan G, Manimaran A, Beena V, Kurien EK, Sejian V, Bhatta R (2017): Role of Heat Shock Proteins in Livestock Adaptation to Heat Stress. *J Dairy Vet Anim Res* 5(1): 00127. DOI: 10.15406/jdvar.2017.05.00127
- Badri TM, Chen KL, Alsiddik MA, Li L, Cai Y, Wang GL (2018): Genetic polymorphism in Hsp90AA1 gene is associated with the thermotolerance in Chinese Holstein cows. *Cell Stress and Chaperones* 23: 639-651.
- Bahbahani H, Clifford H, Wragg D, Mbole-Kariuki MN, Van Tassel C, Sonstegard T, Woolhouse M, Hanotte O (2015): Signatures of positive selection in East African Shorthorn Zebu: A genome-wide single nucleotide polymorphism analysis. *Scientific Reports* 5: 11729.
- Basiricò L, Morera P, Primi V, Lacetera N, Nardone A, Bernabucci U (2011): Cellular thermotolerance is associated with heat shock protein 70.1 genetic polymorphisms in Holstein lactating cows. *Cell Stress and Chaperones* 16: 441- 448.
- Bharati J, Dangi SS, Chouhan VS, Mishra SR, Bharti MK, Verma V, Shankar O, Yadav VP, Das K, Paul A, Bag S, Maurya VP, Singh G, Kumar P, Sarkar M (2017): Expression dynamics of HSP70 during chronic heat stress in Tharparkar cattle. *International Journal of Biometeorology* 61 (6): 1017-1027.
- Bhat S, Kumar P, Kashyap N, Deshmukh B, Dige MS, Bhushan B, Chauhan A, Kumar A, Singh G (2016): Effect of heat shock protein 70 polymorphism on thermotolerance in Tharparkar cattle. *Veterinary World* 9 (2): 113-117.
- Cai Y, Liu Q, Xing G, Zhou L, Yang Y, Zhang L, Li J, Wang G (2005): Polymorphism of the Promoter Region of Hsp70 Gene and Its Relationship with the Expression of HSP70mRNA, HSF1mRNA, Bcl-2mRNA and Bax-AMRNA in Lymphocytes in Peripheral Blood of Heat Shocked Dairy Cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 18 (5): 734-740.
- Casasús I, Rogošić J, Rosati A, Štoković I, Gabiña D (2012): Animal farming and environmental interactions in the Mediterranean region, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, pp. 77; 232.
- Chang M, He L, Cai L (2018): An Overview of Genome-Wide Association Studies. In: Huang T (eds) *Computational Systems Biology. Methods in Molecular Biology*, vol 1754. Humana Press, New York, USA.
- Charoensook R, Gatphayak K, Sharifi AR, Chaisongkram C, Brenig B, Knorr C (2012): Polymorphisms in the bovine HSP90AB1 gene are associated with heat tolerance in Thai indigenous cattle. *Tropical Animal Health and Production* 44: 921-928.
- Cheng Y, Liu S, Zhang Y, Su D, Wang G, Lv C, Zhang Y, Yu H, Hao L, Zhang J (2016): The effect of heat stress on bull sperm quality and related HSPs expression. *Animal Biology* 66: 321-333.
- Collier RJ, Stiening CM, Pollard BC, VanBaale MJ, Baumgard LH, Gentry PC, Coussens PM (2006): Use of gene expression microarrays for evaluating environmental stress tolerance at the cellular level in cattle. *Journal of Animal Science* 84 (E Suppl.): E1-E13.
- Collier RJ, Collier JL, Rhoads RP, Baumgard LH (2008): Invited review: Genes involved in the bovine heat stress response. *Journal of Dairy Science* 91: 445-454.
- Conway D, Nicholls RJ, Brown S, Tebboth MGL, Adger WN, Ahmad B, Biemans H, Crick F, Lutz AF, De Campos RS, Said M, Singh C, Zaroug MAH, Ludi E, New M, Wester P (2019): The need for bottom-up assessments of climate risks and adaptation in climate-sensitive regions. *Nat. Clim. Chang.* 9: 503-511. doi:10.1038/s41558-019-0502-0.
- Çıldır ÖŞ, Özmen Ö (2018): Çiftlik Hayvanlarında CRISPR/Cas9 Uygulamaları. *Selcuk J Agr Food Sci* 32 (3): 559-566. doi: 10.15316/SJAFS.2018.137.
- Das R, Sailo L, Verma N, Bharti P, Saikia J, Intiwati, Kumar R (2016): Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. *Veterinary World*, 9 (3): 260-268.
- Deb R, Sajjanar B, Singh U, Kumar S, Brahmane MP, Singh R, Sengar G, Sharma A (2013): Promoter variants at AP2 box region of Hsp70.1 affect thermal stress response and milk production traits in Frieswal cross bred cattle. *Gene* 532: 230-235.
- Deb R, Sajjanar B, Singh U, Alex R, Raja TV, Alyethodi RR, Kumar S, Sengar G, Sharma S, Singh R, Prakash B (2015): Understanding the mechanisms of ATPase beta family genes for cellular thermotolerance in crossbred bulls. *International Journal of Biometeorology* 59 (12): 1783-1789.
- Dikmen S, Cole JB, Null DJ, Hansen PJ (2013): Genome-wide association mapping for identification of quantitative trait loci for rectal temperature during heat stress in Holstein cattle. *PLoS ONE* 8 (7): e69202.
- Dikmen S, Wang X-z, Ortega MS, Cole JB, Null DJ, Hansen PJ (2015): Single nucleotide polymorphisms associated with thermoregulation in lactating dairy cows exposed to heat stress. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 132: 409-419.
- Fang W, He J, Huang J, Ju Z, Wang C, Qi C, Li J, Li R, Zhong J, Li Q (2014): Study on genetic variations of PPARα gene and its effects on thermal tolerance in Chinese Holstein. *Molecular Biology Reports* 41: 1273-1278.
- Favatier F, Bornman L, Hightower LE, Günther E, Polla BS (1997): Variation in hsp gene expression and Hsp polymorphism: do they contribute to differential disease susceptibility and stress tolerance? *Cell Stress & Chaperones* 2 (3): 141-155.
- Hammami H, Vandenplas J, Vanrobays ML, Rekik B, Bastin C, Gengler N (2015): Genetic analysis of heat stress effects on yield traits, udder health, and fatty acids of Walloon Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 98: 4956-4968.
- Hayes BJ, Bowman PJ, Chamberlain AJ, Savin K, van Tassel CP, Sonstegard TS, Goddard ME (2009): A validated genome wide association study to breed cattle adapted to an environment altered by climate change. *PLoS ONE* 4 (8): e6676.
- Horowitz M (2001): Heat acclimation: phenotypic plasticity and cues to the underlying molecular mechanisms. *Journal of Thermal Biology* 26: 357-363.
- Haupt KA (2008): Dukes Veteriner Fizyoloji. p: 925-935. In: Davranış Fizyolojisi, Edit.: Reece WO, Yıldız S, Onikinci Baskı, Medipres Matbaacılık Ltd. Şti, ISBN: 978-975-6676-36-3, Malatya, Türkiye.
- Howard JT, Kachman SD, Snelling WM, Pollak EJ, Ciobanu DC, Kuehn LA, Spangler ML (2013): Beef cattle body temperature during climatic stress: a genome-wide association study. *International Journal of Biometeorology* 58 (7): 1665-1672.

31. Hu Y, Cai MC, Wang L, Zhang TH, Luo ZG, Zhang GW, Zuo FY (2018): MiR-1246 is upregulated and regulates lung cell apoptosis during heat stress in feedlot cattle. *Cell Stress and Chaperones* 23: 1219. <https://doi.org/10.1007/s12192-018-0927-9>.
32. Islam MM, Barman A, Kundu GK, Kabir MA, Paul B (2019): Vulnerability of inland and coastal aquaculture to climate change: Evidence from a developing country. *Aquaculture and Fisheries* 4: 183-189.
33. IPCC (2018): Summary for Policymakers. In: Global warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty [V. Masson-Delmotte, P. Zhai, H. O. Pörtner, D. Roberts, J. Skea, P. R. Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. Péan, R. Pidcock, S. Connors, J. B. R. Matthews, Y. Chen, X. Zhou, M. I. Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor, T. Waterfield (eds.)]. World Meteorological Organization, Geneva, Switzerland, 32 pp.
34. Kadokawa H, Sakatani M, Hansen PJ (2012): Perspectives on improvement of reproduction in cattle during heat stress in a future Japan. *Animal Science Journal* 83 (6): 439-45.
35. Kashyap N, Kumar P, Deshmukh B, Bhat S, Kumar A, Chauhan A, Bhushan B, Singh G, Sharma D (2015): Association of ATP1A1 gene polymorphism with thermo tolerance in Tharparkar and Vrindavani cattle. *Veterinary World* 8 (7): 892-897.
36. Kerekoppa RP, Rao A, Basavaraju M, Geetha GR, Krishnamurthy L, Rao TVLN, Das DN, Mukund K (2015): Molecular characterization of the HSPA1A gene by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis in Holstein-Friesian crossbred and Deoni cattle raised in India. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 39: 128-133.
37. Koyuncu M (2017): Küresel iklim değişikliği ve hayvancılık. *Selçuk Journal of Agriculture and Food Sciences* 31 (2): 98-106.
38. Kumar R, Gupta ID, Verma A, Singh SV, Verma N, Vineeth MR, Magotra A, Das R (2016): Novel SNP identification in exon 3 of HSP90AA1 gene and their association with heat tolerance traits in Karan Fries (Bos taurus × Bos indicus) cows under tropical climatic condition. *Tropical Animal Health and Production* 48 (4): 735-740.
39. Kumar R, Gupta ID, Verma A, Kumari R, Verma N (2017): Molecular characterisation and SNP identification in HSPB6 gene in Karan Fries (Bos Taurus x Bos indicus) cattle. *Tropical Animal Health and Production* 49: 1059-1063.
40. Li L, Sun Y, Wu J, Li X, Luo M, Wang G (2015): The global effect of heat on gene expression in cultured bovine mammary epithelial cells. *Cell Stress and Chaperones* 20: 381-389.
41. Li L, Wu J, Luo M, Sun Y, Wang G (2016): The effect of heat stress on gene expression, synthesis of steroids, and apoptosis in bovine granulosa cells. *Cell Stress and Chaperones* 21: 467-475.
42. Li Q, Ju Z, Huang J, Li J, Hou M, Wang C, Zhong J (2011a): Two Novel SNPs in HSF1 Gene Are Associated with Thermal Tolerance Traits in Chinese Holstein Cattle. *DNA and Cell Biology* 30 (4): 247-254.
43. Li Q, Han J, Du F, Ju Z, Huang J, Wang J, Li R, Wang C, Zhong J (2011b): Novel SNPs in HSP70A1A gene and the association of polymorphisms with thermo tolerance traits and tissue specific expression in Chinese Holstein cattle. *Molecular Biology Reports* 38: 2657-2663.
44. Liu YX, Zhou X, Li DQ, Cui QW, Wang GL (2010): Association of ATP1A1 gene polymorphism with heat tolerance traits in dairy cattle. *Genetics and Molecular Research* 9 (2): 891-896.
45. Liu YX, Li D, Li H, Zhou X, Wang G (2011): A novel SNP of the ATP1A1 gene is associated with heat tolerance traits in dairy cows. *Molecular Biology Reports* 38: 83-88.
46. Macciotta NPP, Biffani S, Bernabucci U, Lacetera N, Vitali A, Ajmone-Marsan P, Nardone A (2017): Derivation and genome-wide association study of a principal component-based measure of heat tolerance in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 100: 1-15.
47. Maibam U, Hooda OK, Sharma PS, Mohanty AK, Singh SV, Upadhyay RC (2017): Expression of HSP70 genes in skin of zebu (Tharparkar) and crossbred (Karan Fries) cattle during different seasons under tropical climatic conditions. *Journal of Thermal Biology* 63: 58-64.
48. Maróti-Agóts Á, Bodó I, Jávorka L, Gyurmán A, Solymosi N, Zenke P, Skogseth M, Zöldág L (2011): Possible genetic sign of heat stress adaptation in Hungarian Grey Bos taurus bred. *Acta Biologica Hungarica* 62 (1): 65-72.
49. Mehla K, Magotra A, Choudhary J, Singh AK, Mohanty AK, Upadhyay RC, Srinivasan S, Gupta P, Choudhary N, Antony B, Khan F (2014): Genome-wide analysis of the heat stress response in Zebu (Sahival) cattle. *Gene* 533: 500-507.
50. Misztal I (2017): Breeding and Genetics Symposium: Resilience and lessons from studies in genetics of heat stress. *Journal of Animal Science* 95 (4): 1780-1787.
51. Mora C, Spirandelli D, Franklin EC, Lynham J, Kantar MB, Miles W, Smith CZ, Freil K, Moy J, Louis LV, Barba EW, Bettinger K, Frazier AG, Colburn IX JF, Hanasaki N, Hawkins E, Hirabayashi Y, Knorr, Little CM, Emanuel K, Sheffield J, Patz JA, Hunter CL (2018): Broad threat to humanity from cumulative climate hazards intensified by greenhouse gas emissions. *Nature Clim Change* 8: 1062-1071. doi:10.1038/s41558-018-0315-6.
52. Naumann G, Alfieri L, Wyser K, Mentaschi L, Betts RA, Carrao H, Spinoni J, Vogt J, Feyen L (2018): Global changes in drought conditions under different levels of warming. *Geophysical Research Letters*, 45. <https://doi.org/10.1002/2017GL076521>.
53. Olson TA, Lucena C, Chase CC Jr, Hammond AC (2003): Evidence of a major gene influencing hair length and heat tolerance in Bos taurus cattle. *Journal of Animal Science* 81 (1): 80-90.
54. OMIA-Online Mendelian Inheritance In Animals (2019): OMIA 001372-9913 : Slick hair in Bos taurus. [Erişim: <https://omia.org/OMIA001372/9913/>], [Erişim tarihi: 20.08.2019].
55. Parry ML, Rosenzweig C, Iglesias A, Livermore M, Fischer G (2004): Effects of climate change on global food production under SRES emissions and socio-economic scenarios. *Global Environmental Change* 14 (1): 53-67.
56. Polsky L, von Keyserlingk MAG (2017): Invited review: Effects of heat stress on dairy cattle welfare. *Journal of Dairy Science* 100: 8645-8657.
57. Pragna P, Archana PR, Aleena J, Sejian V, Krishnan G, Bagath M, Manimaran A, Beena V, Kurien EK, Varma G, Bhatta R (2016): Heat stress and dairy cow: Impact on both milk yield and composition. *International Journal of Dairy Science* 12 (1): 1-11.
58. Renaudeau D, Collin A, Yahav S, de Baulieu V, Gourdière JL, Collier RJ (2012): Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock. *Animal* 6 (5): 707-728.
59. Robertshaw D (2008): Dukes Veteriner Fizyoloji. p: 935-945. In: Termoregülasyon ve Termal Çevre, Edit.: Reece WO, Yıldız S, Onikinci Baskı, Medipres Matbaacılık Ltd. Şti, ISBN: 978-975-6676-36-3, Malatya, Türkiye.
60. Rosenkrans JrC, Banks A, Reiter S, Looper M (2010): Calving traits of crossbred Brahman cows are associated with Heat Shock Protein 70 genetic polymorphisms. *Animal Reproduction Science* 119: 178-182.

61. Sajjanar B, Deb R, Singh U, Kumar S, Brahmane M, Nirmale A, Bal SK, Minhas PS (2015): Identification of SNP in HSP90AB1 and its Association with the Relative Thermotolerance and Milk Production Traits in Indian Dairy Cattle. *Animal Biotechnology* 26 (1): 45-50.
62. Sailo L, Gupta ID, Verma A, Singh A, Chaudhari MV, Das R, Upadhyay RC, Goswami J(2015): Single Nucleotide Polymorphisms in HSP90AB1 Gene and its association with thermotolerance in Jersey crossbred cows. *Animal Science Reporter* 9 (2): 43-49.
63. Sejian V, Naqvi SMK, Ezeji T, Lakritz J, Lal R (2012): *Environmental Stress and Amelioration in Livestock Production*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, ISBN: 978-3-642-29205-7, p: 413-468.
64. Sejian V, Bhatta R, Gaughan J, Malik PK, Naqvi, SMK, Lal R (2017): *Sheep Production Adapting to Climate Change*. Springer Nature Singapore Pte Ltd, Singapore, p: 3; 118.
65. Sengar GS, Deb R, Singh U, Raja TV, Kant R, Sajjanar B, Alex R, Alyethodi RR, Kumar A, Kumar S, Singh R, Jakhesara SJ, Joshi CG (2018a): Differential expression of microRNAs associated with thermal stress in Frieswal (Bos taurus x Bos indicus) crossbred dairy cattle. *Cell Stress Chaperones* 23 (1): 155-170.
66. Sengar GS, Deb R, Singh U, Junghare V, Hazra S, Raja TV, Alex R, Kumar A, Alyethodi RR, Kant R, Jakshara S, Joshi CG (2018b): Identification of differentially expressed microRNAs in Sahiwal (Bos indicus) breed of cattle during thermal stress. *Cell Stress and Chaperones* <https://doi.org/10.1007/s12192-018-0911-4>. doi: 10.1007/s12192-018-0911-4.
67. Shao-Yao Y, Donald CC, Shi-Lung L (2018): *MicroRNA Protocols*. p:1-26. In: *The MicroRNA*, Edit.: Shao-Yao Y, Third Edition, Humana Press, ISBN: 978-1-4939-7601-0, New York, USA.
68. Shergojry SA (2011): *Molecular Genetic Characterization of HSP90 gene in Deoni (Bos indicus) cattle*. Master Thesis, National Dairy Research Institute, Karnal (Deemed University), Bangalore, India.
69. Srikanth K, Lee E, Kwan A, Lim Y, Lee J, Jang G, Chung H (2017): Transcriptome analysis and identification of significantly differentially expressed genes in Holstein calves subjected to severe thermal stress. *International Journal of Biometeorology* 61 (11): 1993-2008.
70. Suqueli Garcia MF, Castellote MA, Feingold SE, Corva PM (2017): Characterization of a deletion in the Hsp70 cluster in the bovine reference genome. *Animal Genetics* 48 (4): 377-385.
71. Thorat BN, Thombre BM, Narwade SG (2016): Studies on effect of climatic parameters on monthly lactation milk yields in Deoni cattle of Maharashtra, India. *Indian Journal of Animal Research* 50 (1): 31-34.
72. Trifković J, Jovanović L, Đurić M, Stevanović-Đorđević S, Milanović S, Lazarević M, Sladojević Z, Kirovski D (2018): Influence of different seasons during late gestation on Holstein cows' colostrum and postnatal adaptive capability of their calves. *International Journal of Biometeorology* 62 (6): 1097-1108.
73. Uslucan B (2017): Siyah alaca sığırlarda süt ve döl verim özellikleri ile bazı davranış parametreleri üzerine etkili çevre faktörlerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
74. Üçeş H (2005): Sıcaklık stresinin döl verim kriterleri üzerine etkisi ve süt verimi ile ilişkileri açısından sürü kayıtlarının değerlendirilmesi üzerine bir çalışma. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
75. Verma N, Gupta I D, Verma A, Kumar R, Das R, Vineeth MR (2016): Novel SNPs in HSPB8 gene and their association with heat tolerance traits in Sahiwal indigenous cattle. *Tropical Animal Health and Production* 48 (1): 175-180.
76. Wang Y, Huang J, Xia P, He J, Wang C, Ju Z, Li J, Li R, Zhong J, Li Q (2013): Genetic variations of HSBP1 gene and its effect on thermal performance traits in Chinese Holstein cattle. *Molecular Biology Reports* 40: 3877-3882.
77. Wang Z, Wang G, Huang J, Li Q, Wang C, Zhong J (2011): Novel SNPs in the ATP1B2 gene and their associations with milk yield, milk composition and heat-resistance traits in Chinese Holstein cows. *Molecular Biology Reports* 38: 1749-1755.
78. Xiong Q, Chai J, Xiong H, Li W, Huang T, Liu Y, Suo X, Zhang N, Li X, Jiang S, Chen M (2013): Association analysis of HSP70A1A haplotypes with heat tolerance in Chinese Holstein cattle. *Cell Stress and Chaperones* 18 (6): 711-718.