

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE'DEKİ YERLİ TAVUK IRKLARI VE
TİCARİ TAVUK TIPLERİ ARASINDAKİ,
MHC GEN BÖLGESİNDEKİ,
GENETİK FARKLILIKLARIN BELİRLENMESİ

Ömer Faruk LENGER
Veteriner Hekim

MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Metin ERDOĞAN

Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 08.VF.01 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez No: 2011-003


AFYONKARAHİSAR-2011

KABUL ve ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından


Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

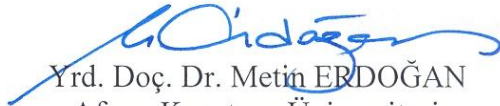
Tez Savunma Tarihi: 27.01.2011


Prof. Dr. Cafer TEPELİ
Selçuk Üniversitesi
Jüri Başkanı


Doç. Dr. Cevdet UĞUZ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye


Doç. Dr. Mine DOSAY AKBULUT
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye


Doç. Dr. Gülcan AVCI
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye


Yrd. Doç. Dr. Metin ERDOĞAN
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye

Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Ömer Faruk LENGER' in "Türkiye'deki yerli tavuk ırkları ve ticari tavuk tipleri arasındaki, MHC gen bölgesindeki, genetik farklılıkların belirlenmesi" başlıklı tezi 11/02/2011 günü saat 14.00' da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği' nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.


Doç. Dr. Esmâ KOZAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Dünya ekonomisi ve insan sağlığı açısından en önemli kriterlerin başında tarım ve hayvancılık endüstrilerinin geldiği bilinen bir gerçektir. Tarih boyunca insanoğlu hayvan sağlığının korunması, geliştirilmesi ve verimliliklerinin artırılması amacıyla genetik özellikleri yüksek canlıların üretilmesine yönelmiştir.

Hastalıklara karşı genetik dirençli hayvanların ıslahı ve seleksiyonu ile çiftlik hayvanlarının sağlık statüleri geliştirilmekte ve verim artışı sağlanmaktadır. Hastalıklara karşı genetik direncin artması kullanılan ilaç ihtiyacını azaltmakta, üretim maliyetlerini düşürmekte ve ilaçlara dirençli patojenlerin ortaya çıkmasını geciktirmektedir. Genetik direncin seviyesinde oluşan bir artış sürünün tamamının korunması anlamına gelmektedir. Kolay üremeleri ve çabuk yetiştirilmeleri açısından özellikle tavuklar, verim özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla seleksiyon, ıslah ve genetik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır.

Türkiye, sahip olduğu gen kaynakları yönünden dünyanın en zengin ülkelerinden birisidir. Ancak, yerli tavuk ırkları ile ilgili yapılan genetik çalışmalar az sayıdadır. Bu çalışmada, MHC gen bölgesindeki DNA polimorfizmi yardımı ile Türkiye yerli tavuk ırklarından olan Denizli ve Gerze tavuk ırklarının bir ölçüde genetik yapıları belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca, ipek yolu üzerinde yer alan ve Asya ile Avrupa arasında bir köprü konumunda bulunan Anadolu’ daki tavuk ırkları ile ticari tavuklar arasındaki genetik ilişkiler incelenmeye çalışılmıştır.

Tez konusunun belirlenmesinde, laboratuvar çalışmalarım ve her alanda göstermiş olduğu yardımlarından ve desteklerinden dolayı, doktora tez danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Metin ERDOĞAN’a teşekkürü bir borç bilirim. Doktora öğrenciliğim boyunca benden yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Cevdet UĞUZ ve Doç. Dr. Mine DOSAY AKBULUT hocalarıma teşekkürlerimi sunarım. Örneklerin toplanması aşamasındaki yardımlarından dolayı Denizli İl Tarım Müdürlüğü, Samsun Veteriner Araştırma Enstitüsü ve Gerze İlçe Tarım Müdürlüğü çalışanlarına, laboratuvar çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Merkezi Araştırma Laboratuvarı’ nda görevli Evrim BALCI ve Arş. Grv. Mert SUDAĞIDAN’a, her türlü desteklerini benden esirgemeyen arkadaşlarım Arş. Grv. Mustafa ESER’e, İskender ATAY’a ve Nadide SEKMAN’a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bugünlere gelmemde büyük emek sahibi olan annem Hacer LENGER başta olmak üzere, her türlü sıkıntı ve zorlukları benimle paylaşan ve her zaman bana destek olan aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 08.VF.01 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL ve ONAY	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER	viii
TABLolar	ix
RESİMLER	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Tavukların Kökeni ve Sınıflandırılması.....	1
1.2. Türkiye’deki Yerli Tavuk Irkları.....	2
1.2.1. Denizli Irkı.....	2
1.2.2. Gerze Irkı.....	3
1.2.3. Hacı Kadın Irkı.....	4
1.2.4. Sultan Irkı.....	5
1.3. Majör Doku Uyuşum Kompleksi Molekülleri ve Genleri.....	5
1.3.1. MHC Sınıf I Molekül ve Genleri.....	7
1.3.1.1. MHC Sınıf Ia Molekül ve Genleri.....	8
1.3.1.2. MHC Sınıf Ib Molekül ve Genleri.....	9
1.3.2. MHC Sınıf II Molekül ve Genleri.....	9
1.3.3. MHC Sınıf III Molekül ve Genleri.....	11
1.4. T Hücre Reseptör Kompleksi.....	11
1.5. Yardımcı CD4 ve CD8 Reseptörleri.....	12
1.6. TAP 1, TAP 2 ve Tapasin Proteinleri.....	13
1.7. MHC Genlerinin Kalıtımı.....	14
1.8. Polimorfizm.....	15
1.8.1. Biyokimyasal Polimorfizm.....	16
1.8.2. İmmunogenetik Polimorfizm.....	16
1.8.3. DNA Polimorfizm.....	17
1.8.3.1. Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP).....	17
1.9. Tavuklarda MHC Sistemi.....	18
1.9.1. Tavuk MHC Sistemi Molekül ve Genleri.....	19
1.9.2. Tavuklardaki TAP Genleri.....	21
1.9.3. Tavuklardaki Tapasin Geni.....	22
1.10. Tavuklardaki Hastalıklara Direnç veya Yatkinlık.....	23
1.11. İmmun Yanıtın Düzenlenmesinde MHC ve Hastalık İlişkisi.....	25
2. MATERYAL ve METOD	29
2.1. Materyal.....	29
2.1.1. Hayvan Materyali.....	29
2.1.2. Teknik Aletler.....	29
2.1.2.1. Mikropipet.....	29

2.1.2.2. Ultra Saf Su Cihazı.....	29
2.1.2.3. Güç Kaynağı.....	29
2.1.2.4. Yatay Elektroferez Sistemi.....	30
2.1.2.5. PCR Cihazı.....	30
2.1.2.6. Jel Görüntüleme Sistemi.....	30
2.1.2.7. NanoDrop-Spektrofotometre.....	31
2.1.2.8. DNA Dizileme Cihazı.....	31
2.2. Metod.....	31
2.2.1. Kanların Alınması, Hazırlanması ve İşlenmesi.....	31
2.2.2. Kandan DNA İzolasyonu.....	32
2.2.3. Jel Elektroferez.....	33
2.2.4. DNA'ların Çoğaltılması	34
2.2.4.1. TAP 1 Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması.....	34
2.2.4.2. TAP 2 Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması.....	35
2.2.4.3. Tapasin Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması.....	35
2.2.5. PCR ürünlerinin Temizlenmesi.....	36
2.2.6. DNA Dizileme Analizi.....	37
2.2.7. İstatistik Analiz.....	38
2.2.7.1. Genetik Uzaklıkların Hesaplanması.....	38
3. BULGULAR.....	41
3. 1. DNA İzolasyonu ve Optimizasyon.....	41
3. 2. TAP 1 Gen Bölgesi.....	41
3. 2. 1. DNA Dizileme Analizi.....	42
3. 2. 2. Genetik Uzaklık ve Kümeleme Analizi.....	44
3. 2. 3. Tajima Test İstatistikleri.....	45
3. 3. TAP 2 Gen Bölgesi.....	48
3. 3. 1. DNA Dizileme Analizi.....	48
3. 3. 2. Genetik Uzaklık ve Kümeleme Analizi.....	48
3. 3. 3. Tajima Test İstatistikleri.....	51
3. 4. TAP 1 ve TAP 2 Gen Bölgeleri.....	54
3. 5. Tapasin Gen Bölgesi.....	58
4. TARTIŞMA.....	59
5.SONUÇLAR.....	64
ÖZET.....	68
SUMMARY.....	70
6. KAYNAKLAR.....	72

KISALTMALAR

AKÜ	: Afyon Kocatepe Üniversitesi
BF	: MHC Sınıf I gen bölgesi
BG	: MHC Sınıf III gen bölgesi
BL	: MHC Sınıf II gen bölgesi
bp	: baz çifti
°C	: Santigrat Derece
dk	: dakika
HCl	: hidrojen klorür
HLA	: İnsan Lökosit Antijeni
M	: molar
mg	: miligram
MgCl ₂	: magnezyum klorür
MHC	: Major Histocompatibility Complex
ml	: mililitre
mM	: milimolar
M.Ö.	: Milattan Önce
NaCl	: sodyum klorür
ng	: nanogram
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pmol	: pikomol
sn	: saniye
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
TCR	: T Hücre Reseptörü
µl	: mikrolitre

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1.1. : Denizli Irkı Tavuk ve Horoz.....	3
Şekil 1.2. : Gerze Irkı Tavuk ve Horoz.....	4
Şekil 1.3. : İnsan Lökosit Antijen (HLA) Bölgesinin Gen Haritası.....	7
Şekil 1.4. : Sınıf I ve Sınıf II MHC Proteinleri.....	8
Şekil 1.5. : MHC Sınıf I, Sınıf II ve CD1' in moleküler yapıları.....	9
Şekil 1.6. : MHC Sınıf III molekül ve genleri.....	11
Şekil 1.7. : Yardımcı T Hücresi Reseptörünün Yapısı (A), Sitolitik T Hücresi Reseptörünün Yapısı (B).....	12
Şekil 1.8. : Tavuklarda MHC gen bölgesi.....	20
Şekil 1.9. : Tavuk MHC gen bölgesi TAP ve Tapasin genlerinin yerleşimi.....	22
Şekil 1.10. : Tavuklarda TAP 1 ve TAP 2 genlerinin organizasyonu.....	22
Şekil 1.11. : İşlenmiş antijenlerin MHC molekülleri ile birlikte lenfositlere sunulması.....	25
Şekil 3.1. : DNA örneklerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	41
Şekil 3.2. : TAP 1 Gen Bölgesine Ait Jel Elektroforez Görüntüsü.....	42
Şekil 3.3. : TAP 1'e ait DNA dizi analizi görüntüsü.....	42
Şekil 3.4. : Tavuk popülasyonları arasındaki TAP 1 gen bölgesine göre çizilen Conducting Interior-Branch Test filogenik ağacı.....	46
Şekil 3.5. : Tavuk popülasyonları arasındaki TAP 1 gen bölgesine göre çizilen Conducting Bootstrap Test filogenik ağacı.....	47
Şekil 3.6. : TAP 2 Gen Bölgesine Ait Jel Elektroforez Görüntüsü.....	48
Şekil 3.7. : Tavuk popülasyonları arasındaki TAP 2 gen bölgesine göre çizilen Conducting Interior-Branch Test filogenik ağacı.....	52
Şekil 3.8. : Tavuk popülasyonları arasındaki TAP 2 gen bölgesine göre çizilen Conducting Bootstrap Test filogenik ağacı.....	53
Şekil 3.9. : Tavuk popülasyonları arasındaki TAP 1 ve TAP 2 gen bölgelerine göre çizilen Conducting Interior-Branch Test filogenik ağacı.....	56
Şekil 3.10. : Tavuk popülasyonları arasındaki TAP 1 ve TAP 2 gen bölgelerine göre çizilen Conducting Bootstrap Test filogenik ağacı.....	57
Şekil 3.11. : Tapasin Gen Bölgesine Ait Jel Elektroforez Görüntüsü.....	58

TABLOLAR

	Sayfa
Tablo 3.1. : 85 tavuk örneğine ait TAP 1 bölgesi üzerinde bulunan 15 SNP pozisyonu.....	43
Tablo 3.2. : Popülasyon içi evrimsel farklılaşmanın tahmin edilmesi.....	44
Tablo 3.3. : Popülasyonlar arasındaki evrimsel farklılaşmanın tahmin edilmesi..	45
Tablo 3.4. : İncelenen tavuk ırklarındaki TAP 1 gen bölgesine göre hesaplanan Tajima Nötralite Test sonuçları.....	45
Tablo 3.5. : 87 tavuk örneğine ait TAP 2 bölgesi üzerinde bulunan 18 SNP pozisyonu.....	49
Tablo 3.6. : Popülasyon içi evrimsel farklılaşmanın tahmin edilmesi.....	50
Tablo 3.7.: Popülasyonlar arasındaki evrimsel farklılaşmanın tahmin edilmesi...	50
Tablo 3.8.: İncelenen tavuk ırklarındaki TAP 2 gen bölgesine göre hesaplanan Tajima Nötralite Test sonuçları.....	51
Tablo 3.9.: TAP 1 ve TAP 2 gen bölgeleri birlikte ele alınarak popülasyon içi evrimsel farklılaşmanın tahmin edilmesi.....	54
Tablo 3.10.: TAP 1 ve TAP 2 gen bölgelerine göre popülasyonlar arasındaki evrimsel farklılaşmanın tahmin edilmesi.....	55
Tablo 3.11.: İncelenen tavuk ırklarında TAP 1 ve TAP 2 gen bölgeleri birlikte ele alınarak hesaplanan Tajima Nötralite Test sonuçları.....	55

RESİMLER

	Sayfa
Resim 2.1. : PCR cihazı (Eppendorf, Mastercycler, ep gradient S).....	30
Resim 2.2. : DNA dizileme cihazı.....	31
Resim 2.3. : Kanat venasından (Vena cephalica antebrachii) kan alımı.....	32

1. GİRİŞ

1.1. Tavukların Kökeni ve Sınıflandırılması

Kanatlı hayvanların sürüngenlerden köken aldıkları varsayılmaktadır. Arkeolojik kazılarda, günümüzden yüz yada iki yüz milyon yıl önce yaşamış, her iki çenesinde dişler bulunan, bedenleri pullar ile kaplı, kuyruk ve kanatlarında telekler olan, karga ya da güvercin büyüklüğündeki kanatlı sürüngen hayvanlara (Archaeopterix) ait fosiller bulunmuştur. Bu hayvanların tüm kanatlıların atası olduğu görüşü yaygındır (Aksoy, 1999).

Tavukların evciltirme tarihi kesin olarak bilinmemekle beraber, koyunların evcilleştirilmesiyle aynı zamana rastladığı sanılmaktadır (Şenköylü, 2001). Arkeolojik bulgular, bugünkü evcil tavuğun ilk olarak Güneydoğu Asya' da evciltildiğini göstermektedir. Evcil tavukların M.Ö. 1400'lü yıllarda Çin ve Hindistan' da yetiştirildiği, M.Ö. 600'lü yıllarda Hindistan'dan Mısır'a ve daha sonra da Roma'ya götürüldüğü bildirilmektedir (Akçapınar ve Özbeyaz; 1999; Erensayın, 2000; Şenköylü, 2001). Güneydoğu Asya ormanlarında yaşayan *Gallus gallus* veya *Gallus bankiva* (kırmızı orman tavuğu), *Gallus lafayetti* (Seylan Orman Tavuğu), *Galus sonnerati* (gri orman tavuğu) ve *Gallus various*'un (siyah veya yeşil orman tavuğu) bugün bilinen tavuk ırklarının meydana gelmesinde katkısı olduğu veya kökenini oluşturduğu düşünülmektedir (Erensayın, 2000; Karabayır; 2007). Brahma, Cochin ve Langshan gibi Asya tavuk ırklarının atası olarak ise Asil (Asael) ya da Malaya (Malay) tavuğu gösterilmektedir (Aksoy, 1999).

Evcil tavuk, zoolojik sistemde, omurgalıların (vertebrata), kuşlar (aves) sınıfının, tavukgiller (gallinae) takımının, sülüngiller (phasinidae) familyasının, tavuk (gallus) cinsinin, evcil tavuk (*Gallus domesticus*) türünde yer almaktadır. Evcil tavuklar diğer gallus türlerinden, ağızlarında diş bulunmayışı ve başlarında ibik olması ile ayrılmaktadır (Aksoy, 1999; Erensayın, 2000).

Yabani tavuklar ile günümüzdeki evcil tavuklar arasında verim özellikleri bakımından büyük farklılıklar bulunmaktadır. Tavuk ırklarının ortaya çıkmasında başlangıçta tüylerin rengi, ibik şekilleri, horozların ötüşü ve dövüşkenlikleri gibi ekonomik olmayan özellikler ele alınmıştır. Sanayi devrimiyle birlikte hayvancılık işletmelerinde verimlilik; bakım, besleme, ürünlerin işlenmesi, hastalıklarla savaş ve pazarlama gibi alanlarda elde edilen yeni bilgiler uygulamaya konulmaktadır. Genetik ve hayvan ıslahı alanındaki ilerlemelere paralel olarak, lokal hayvan ırklarından kültür ırklarına, üstün verimli soy ve hatların elde edilmesine, bu soy ve hatlar arasında yapılan birleştirmeler ile de üstün verimli ve birörnek ticari hayvan tiplerinin yığmsal üretimine geçilmiştir (Aksoy, 1999).

Tavuk ırkları gelişim durumlarına (lokal yada yerli, geliştirilmiş ırklar yada geçit ırkları, kültür ırkı), ilk çıktıkları bölgeye (Asya, Akdeniz, Amerikan, İngiliz, lokal ve bantam), beden ağırlıklarına (hafif, orta ve ağır), verim özelliklerine (yumurtacı, kombine, etçi, lokal ve bantam), ticari üretim şekline (etçi, beyaz ve kahverengi yumurtacı), sağlık koruma, araştırma ve kontrol amacı ile üretilmiş oluşlarına göre altı farklı şekilde sınıflandırılmaktadır (Aksoy, 1999).

1.2. Türkiye’deki Yerli Tavuk Irkları

Türkiye’nin önemli yerli tavuk ırkları arasında Denizli, Gerze, Hacı Kadın ve Sultan ırkı yer almaktadır (Aksoy, 1999; Ertuğrul, 2006; Kaplan, 2009).

1.2.1. Denizli Irkı

Denizli ve yöresinden köken almaktadır. Ancak, günümüzde Anadolu’nun pek çok yerinde yetiştirilmektedir. Denizli ırkı tavuk ve horozların teleklerinin rengi ırk özelliklerini belirleme yönünden önem taşımaktadır. Horozlarda vücudu örten tüy ve telekler siyah; boyun, sırt ve kanatta renkli (demir kır, pamuk kır, al ve siyah) telekler bulunmaktadır (Kaplan, 2009; Soysal, 2010). Tavukların bazılarının boynunda görülebilen eser miktarda renk dışında tamamen siyahtır. Balta ve gül

ibikli varyeteleri bulunmaktadır. Gaga yapısı erkeklerde uzun, kalın ve üst gaga aşağı doğru eğimli, koyu gri renktedir. Dişilerde gaga yapısı ise erkeğe göre kalınlığı ve eğimi daha az, koyu gridir. Horoz ve tavukların burun delikleri küçük; kulaklar kısa tüylerle kaplı, kulak lopları belirgin, kırmızı renkte ya da kırmızı üzerine beyazlık olabilmektedir. İncik, ayak derisi ve pulları açık veya çok koyu gri, vücut derisi beyazdır. Bacaklar yüksek ve vücut iridir. Horozlar kuyruklarını dik tutmaktadır. Hem dişi hem de erkeklerin gözlerinin etrafında siyah bir halka bulunmaktadır (Şekil 1.1). Bu ırk, özellikle horozlarının güzel (davudi) sesi ve çok uzun ötüşü (yaklaşık 15-16 sn) ile ünlüdür (Aksoy, 1999; Kaya, 2008; Soysal, 2010).

Civciv çıkım ağırlığının 38.5 gram, ergin canlı ağırlığının dişilerde 1100, erkeklerde 2050 gram, yumurta kabuk renginin beyaz, yumurta ağırlığının 54 gram, yıllık ortalama yumurta veriminin 114 adet ve cinsel olgunluk yaşının 24-25 hafta olduğu bildirilmiştir (TAGEM, 2009; Soysal, 2010).



Şekil 1.1. Denizli İrki Tavuk ve Horoz (Anonim, 2011).

1.2.2. Gerze İrki

Sinop'un Gerze ilçesi ve çevresinden köken almaktadır. Vücut siyah tüylerle kaplıdır. Horozların parlak kuyruk tüyleri ışık altında yeşil-siyah bir görünüm

almaktadır. İbikleri çatallı ve boynuza benzemektedir. Gaga yapısı orta uzunlukta, güçlü ve gri tonlarındadır. Burun delikleri büyük ve gaga üzerine çıkıntılıdır. Kulaklar kısa tüylerle kaplı, kulakların altında her iki tarafta da belirgin beyaz kulak küpesi bulunmaktadır (Şekil 1.2.). İncik, ayak derisi ve pulları siyah, beden derisi beyaz renktedir (Aksoy, 1999; Soysal, 2010).

Civciv çıkım ağırlığının ortalama 37 gram, ergin canlı ağırlığının dişilerde 1100, erkeklerde 1850 gram, yumurta kabuk renginin beyaz, ortalama yumurta ağırlığının 49 gram, yıllık ortalama yumurta veriminin 88 adet ve cinsel olgunluk yaşının 24-25 hafta olduğu bildirilmiştir (TAGEM, 2009; Soysal, 2010).



Şekil 1.2. Gerze Irkı Tavuk ve Horoz

1.2.3. Hacı Kadın Irkı

Orta Anadolu'ya ait bir lokal ırk olduğu, değişik varyetelerinin bulunmadığı, siyah renkli, balta ibikli ve küçük bir vücudu yapısına sahip olduğu bildirilmektedir (Aksoy, 1999). Ancak, Gerze'nin bir varyetesi olabileceği ifade edilmektedir (Ertuğrul, 2006).

1.2.4. Sultan Irkı

İstanbul'dan köken alan bir ırktır. Süs amacıyla beslenen, cazip, çekici görünüşlerinden dolayı çok sevilen ve ender bulunan tavuk ırklarındandır. Beyaz ve karışık renkli olmak üzere 2 varyetesi bulunmaktadır (Aksoy, 1999).

İbik çok küçük ve V şeklinde, gaga kısa ve burun delikleri büyüktür. Başında kocaman bir tepelik olup yüzü de tüylerle kaplıdır. Sakal ve kulak lopları küçük ve yuvarlak olup, kulak lopları tüylerle örtülüdür. Vücut kare şeklinde olup bacaklar ayrı ve ayaklarında beş parmak bulunmaktadır. Ayak ve bacakları da tüylerle kaplı, deri beyaz, incik ve ayak derisi ile pulları arduaz mavisi, kulak lobları kırmızı, gözler kızıl doru renktedir (Aksoy, 1999).

Et ve yumurta veriminin düşük, ortalama canlı ağırlığın erkeklerde 2000 gr, dişilerde 1500 gr, yumurta kabuk renginin beyaz, yumurta ağırlığının 45 gr ve ortalama yıllık yumurta miktarının 70 adet olduğu bildirilmiştir (Ertuğrul, 2006).

1.3. Majör Doku Uyuşum Kompleksi Molekülleri ve Genleri

Bağışıklık sisteminin kendinden olanı veya olmayanı tanıması için gerekli olan doku antijenlerini kodlayan gen bölgesi, Majör Doku Uyuşum Kompleksi (Major Histocompatibility Complex, MHC) olarak adlandırılmaktadır. MHC, bütün omurgalılarda bulunan, bağışıklıkla ilgili ve bağışıklıkla ilgili olmayan fonksiyonları olan ve doku uyumunda rol oynayan, bir grup gen olarak tanımlanmaktadır (Trowsdale, 1995; Gruen, 1997; Gün; 2007; Worley, 2010; Bremdal, 2010). MHC gen bölgesinde, bağışıklıktan sorumlu çok sayıda genin yer aldığı gibi immun yanıtla ilgisi tanımlanmamış bazı genler de bulunduğu bildirilmektedir (Snell, 1981; Temiz, 2005; Gün; 2007).

MHC proteinleri, ilk olarak doku ve organ nakillerinde belirlenen temel antijenler olarak tanımlanmıştır. Aynı (allograft) veya farklı türler (xenograft)

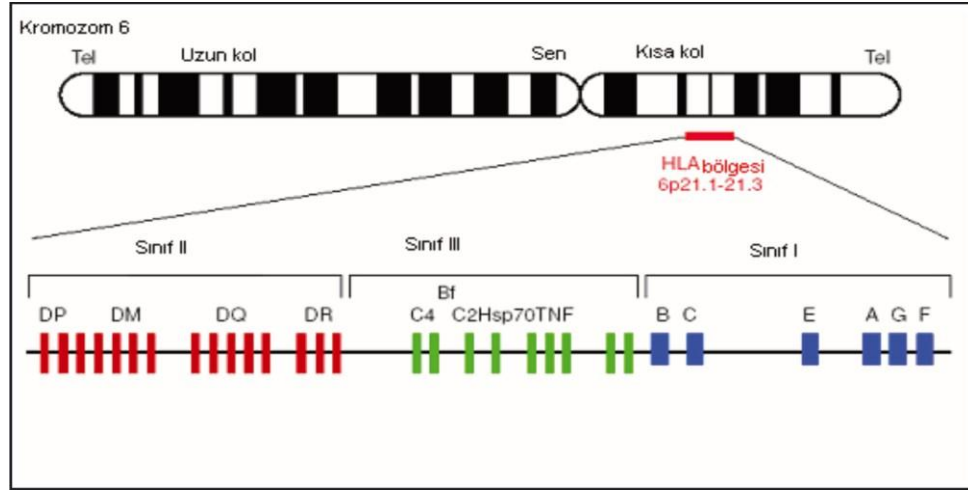
arasında yapılan organ veya doku yamaları reddedilebilmektedir (Alberts, 2008; Bremdal, 2010). Doku uyuşum antijenleri olarak da bilinen bu moleküller, immün yanıt sırasında immün sistem hücreleri arasındaki ilişkinin kurulmasında ve antijen sunulmasında önemli görevler üstlenmektedir (Salomonsen, 2005; Ahmed, 2007; Hee, 2010; Chaves, 2010a; Worley, 2010). MHC genleri tarafından kodlanan MHC proteinleri, doku uyuşum molekülü olarak adlandırılan hücre yüzey proteinlerinin en önemlilerini oluşturmaktadır. MHC, ilk olarak farelerdeki doku nakli esnasında belirlenmiş ve H-2 antijenleri olarak adlandırılmıştır. MHC, ikinci olarak tavuklarda belirlenmiştir (Lamont, 1989; Frangoulis, 1999; Alberts, 2008).

Her türde MHC gen bölgesi farklı kromozom üzerinde bulunabilmekte, MHC lokusundaki gen sayıları ve genlerin organizasyonu farklı olabilmektedir. MHC genlerince kodlanan moleküllere verilen adlar da, türlere göre farklılık göstermektedir. MHC molekülleri insanda HLA, sığırdada BoLA, koyunda OLA, keçide GLA, atta ELA, domuzda SLA, köpekte DLA, kedide FLA olarak adlandırılmaktadır. Ancak, fareler için H-2, rat için RT1 ve tavuklar için B terimleri kullanılmaktadır (Arda, 1994; Diker, 1998; Kelley, 2004; Bremdal, 2010).

MHC proteinlerinin üç önemli özelliğe sahip olduğu bildirilmektedir. İlk olarak, MHC proteinleri, T hücre aracılı transplantasyon tepkimelerinde en fazla öne çıkan antijenlerdir. İkinci olarak, T hücrelerinin büyük bir çoğunluğu yabancı MHC proteinlerini tanıyabilmektedir. Bunların % 0.001'den azı tipik viral antijene tepki verirken, % 0.1' den fazlası tek bir yabancı MHC antijenine yanıt oluşturabilmektedir (Alberts, 2008). Son olarak da, MHC proteinlerini kodlayan genlerden bazıları, omurgalılarda bilinen en fazla polimorfizmi göstermektedir (Alberts, 2008; Chaves, 2010a).

MHC gen bölgesi Sınıf I, II ve III olarak gruplandırılmakta ve benzer fonksiyona sahip bu gen bölgelerince sınıf I, II ve III MHC molekülleri kodlanmaktadır (Lamont, 1989; Kelley, 2004; Düzgün, 2006).

İnsanda MHC Sınıf I gen bölgesi HLA-A, HLA-B ve HLA-C olmak üzere üç major proteini; MHC Sınıf II gen bölgesi ise HLA-DR, HLA-DQ ve HLA-DP proteinlerini kodlamaktadır (Şekil 1.3) (Dalva, 2004; Kierszenbaum, 2006; Gün, 2007).



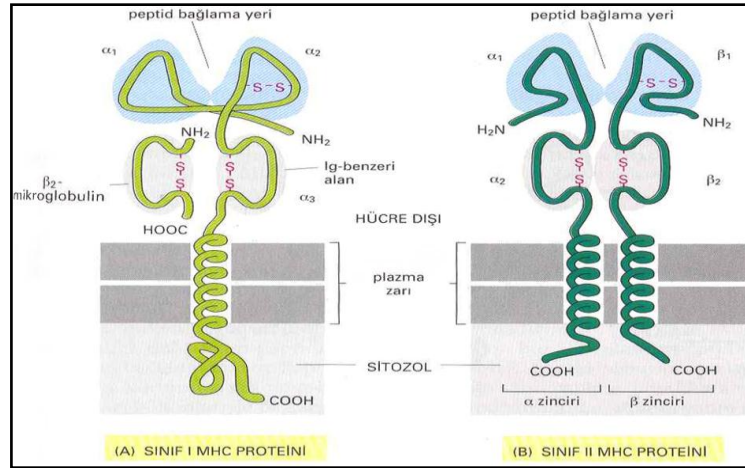
Şekil 1.3. İnsan Lökosit Antijen (HLA) Bölgesinin Gen Haritası (Dalva, 2004).

Moleküler biyolojideki hızlı gelişmeler, Restriksyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizimi (RFLP), Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), DNA Dizi Analizi ve diğer yöntemlerin geliştirilmesi, genin tanımlanmasına ve haritalanmasına yardımcı olmaktadır (Gün, 2007).

1.3.1. MHC Sınıf I Molekül ve Genleri

MHC sınıf I molekülü, vücuttaki bütün çekirdekli hücrelerde bulunmakta (Penny, 1999; Bremdal, 2010) ve endojen antijenlerin işlenmesi ve sunulmasından sorumlu olduğu bildirilmiştir. Sınıf I geni tarafından kodlanan 40-45 kDa' luk bir α zinciri ile 12 kDa' luk β_2 -mikroglobulin (β_{2-m}) proteinden oluşmaktadır (Şekil 1.4a ve Şekil 1.5). β_2 -mikroglobulin zarı kat etmediği ve MHC gen kümesinde yer almayan farklı bir gen tarafından kodlandığı bildirilmektedir (Lamont, 1989; Johnson, 2000). Sınıf I molekülleri, sitoplazmik ve transmembranöz bileşenlerden meydana geldiği belirtilmektedir (Choo, 1991; Ewald, 2004; Kaufman, 2008).

Alfa zincirinin zara en uzak olan iki N-uç alanı gen düzeyindeki polimorfizm nedeniyle değişken aminoasitler içermektedir. Antijen bağlanma bölgesi α -1 ve α -2 arasında yer almakta ve bu alan peptidi bağlayarak sitotoksik T hücrelerine sunmaktadır (Lamont,1989; Düzgün, 2006; Alberts, 2008; Villanueva, 2010; Chaves, 2010). Sınıf I molekülleri Ia ve Ib olmak üzere iki kategoride incelenmektedir.



Şekil 1.4. Sınıf I ve Sınıf II MHC Proteinleri (Alberts, 2008).

1.3.1.1. MHC Sınıf Ia Molekül ve Genleri

MHC sınıf Ia molekülleri vücuttaki tüm çekirdekli hücreler üzerinde yer almaktadır. Lenfosit ve makrofajlar üzerinde yoğun, iskelet kası ve düz kas gibi bazı dokularda çok az bulunduğu veya hiç bulunmadığı belirtilmektedir (Diker, 1998; Johnson, 2000).

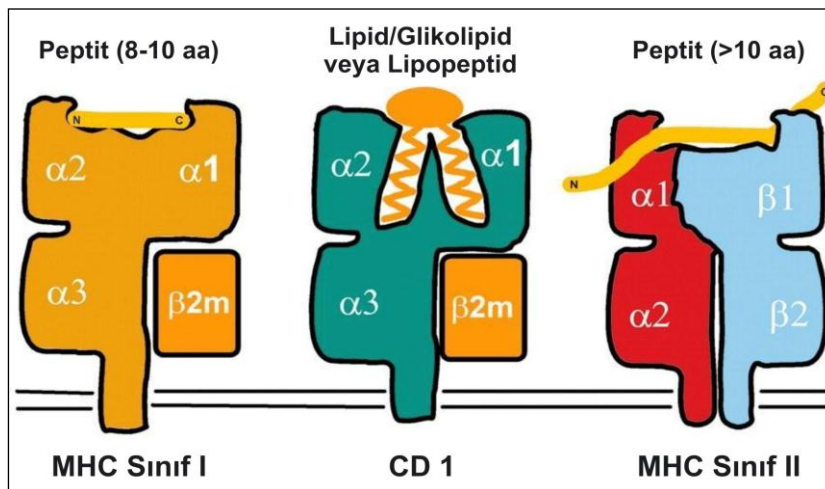
Doku transplantasyonlarındaki doku reddi olayları çoğunlukla sınıf Ia moleküllerine karşı oluşan immun yanıtın kaynaklandığı için, bunlara transplantasyon antijenleri de denmektedir. Tüm sınıf Ia moleküllerinin iki peptid zincirinden oluştuğu ve tüm memelilerin iki veya üç adet MHC Sınıf Ia gen lokusuna sahip ve çok polimorfik olduğu bildirilmiştir (Johnson ve ark., 2000).

1.3.1.2. MHC Sınıf Ib Molekül ve Genleri

MHC Sınıf Ib lokusundaki genler tarafından kodlanan ve polimorfik olmayan MHC sınıf I molekülleridirler. Sınıf Ib molekülleri, regülatör ve olgunlaşmamış lenfositler ile hematopoetik hücreler üzerinde bulunmaktadır. Bunların moleküler yapısı, sınıf Ia ve CD1 moleküllerine benzemektedir ve antijen bağlanma bölgesi içermektedir (Diker, 1998).

1.3.2. MHC Sınıf II Molekül ve Genleri

MHC sınıf II genleri, antijen sunan hücrelerin üzerinde bulunan MHC sınıf II moleküllerini kodlamakta, ekzojen antijenlerin işlenmesi ve sunulmasından sorumludurlar (Lamont, 1989; Penny, 1999; Bremdal, 2010). Sınıf I MHC proteinleri gibi, sınıf II MHC proteinleri de zara yakın, korunmuş iki Ig benzeri alanları ve zara uzak iki polimorfik N-uç alanlarıyla bir heterodimer yapısı göstermektedir. MHC kümesindeki genler tarafından kodlanan bu proteinlerdeki iki zincir (α ve β) zarı geçmektedir (Şekil 1.4b ve Şekil 1.5). İki polimorfik alan, bir peptidi bağlayarak yardımcı T hücrelerine sunmaktadır. Çoğunlukla B lenfositler, uyarılmış T lenfositler, makrofajlar, dendritik hücreler ve langerhans hücreleri üzerinde bulunmaktadır (Alberts, 2008; Bremdal, 2010; Singh, 2010b; Li, 2010).



Şekil 1.5. MHC Sınıf I, Sınıf II ve CD1' in moleküler yapıları (Porcelli, 2005).

Bölünen hücrelerde ve özel sitokinler ile uyarılmış hücrelerde sınıf II molekül yoğunluğu artmaktadır. Bir hücrenin üzerinde fazla sayıda sınıf II molekül bulunması, o hücrenin antijen sunma fonksiyonu olduğunu göstermektedir. Ekzojen antijenlerin işlenmesi ve sunulmasındaki rollerinden dolayı, sınıf II moleküllerine immunitéyle ilişkili antijenler (Ia antijenleri), genlerine immün yanıt genleri (Ir genleri) olarak da isimlendirilmektedir.

MHC sınıf II molekülleri α ve β polipeptid zincirlerinden oluşmakta ve sırasıyla 34 kDA ve 29 kDA ağırlığında olan transmembran glikoproteinleridir. Herbir zincir $\alpha 1$, $\alpha 2$ ve $\beta 1$, $\beta 2$ olarak iki domen içermektedir. Antijen bağlayan bölge $\alpha 1$ ve $\beta 1$ arasındaki alandan oluşmakta ve bu bölgedeki aminoasit dizileri polimorfizm göstermektedir (Lamont,1989; Johnson ve ark., 2000; Ahmed, 2007; Kaufman, 2008; Brendal, 2010).

MHC sınıf II moleküllerinin α ve β zincirleri ayrı genler tarafından kodlanmaktadır. Alfa zincirini kodlayan genler A harfi ile, beta zincirini kodlayan genler B harfi ile gösterilmektedir. İnsanlarda, Sınıf II bölgesinde yer alan DR, DQ ve DP bölgeleri sırasıyla DRA ve DRB, DQA ve DQB, DPA ve DPB olarak ayrılmaktadır. MHC sınıf II moleküllerinin de MHC sınıf I molekülleri gibi yüksek polimorfizme sahip olduğu bildirilmektedir (Diker, 1998; Gün, 2007; Brendal, 2010).

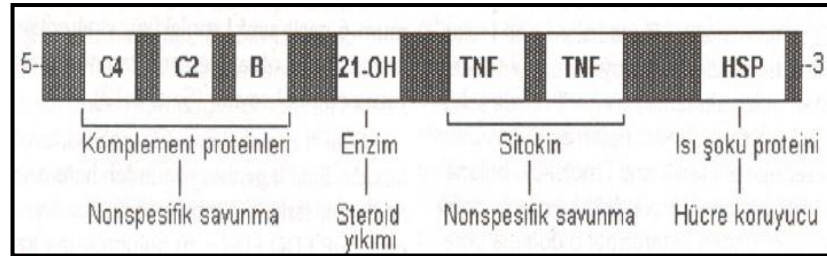
Antijen sunan sınıf I ve II molekülleri dışında, MHC bölgesindeki genler tarafından kodlanan ve antijen işlenmesi ile direk ilişkili olan en önemli moleküller arasında LMP ve TAP (transporters of antigenic peptides) proteinleri bulunmaktadır. LMP moleküllerinin fonksiyonu, endojen antijenleri küçük peptid parçalarına ayırmak, TAP proteinlerinin fonksiyonunun ise, hücre içinde işlenen endojen peptidleri bağlanacakları sınıf I moleküllerine taşımak olduğu bildirilmektedir (Diker, 1998).

1.3.3. MHC Sınıf III Molekül ve Genleri

MHC gen bölgesindeki sınıf I ve sınıf II genleri dışında kalan genlere sınıf III genleri denilmektedir. Memelilerde Sınıf I ve Sınıf II gen bölgeleri arasında bulunan (Şekil 1.3) ve oldukça korunmuş olan MHC Sınıf III gen bölgesinin antijen sunma ile ilgili görevleri bulunmamaktadır. Bu nedenle, immunolojik açıdan gerçek MHC molekülleri olarak kabul edilmediği ve polimorfik bir yapıya da sahip olmadıkları bildirilmektedir (Diker, 1998; Chaves, 2010a).

Memeli MHC sinden farklı olarak sınıf III genleri tavuklarda saptanamamıştır, ancak tavuklarda memelilerden farklı olarak B-G (sınıf IV) bölgesi bulunmaktadır (Lamont, 1989; Frangoulis, 1999; Xu, 2007).

Sınıf III bölgesi kompleman komponentlerini (C4a, C4b, C2 ve faktör B), (Kaufman, 2000) tümör nekroz faktörlerini (TNF-alfa, TNF-beta), 21-hidroksilaz koenzimini ve ısı şok proteinini (HSP70) kodlayan genleri (Şekil 1.6) içerdiği bildirilmektedir (Düzgün, 2006; Gün, 2007; Kaufman, 2008).



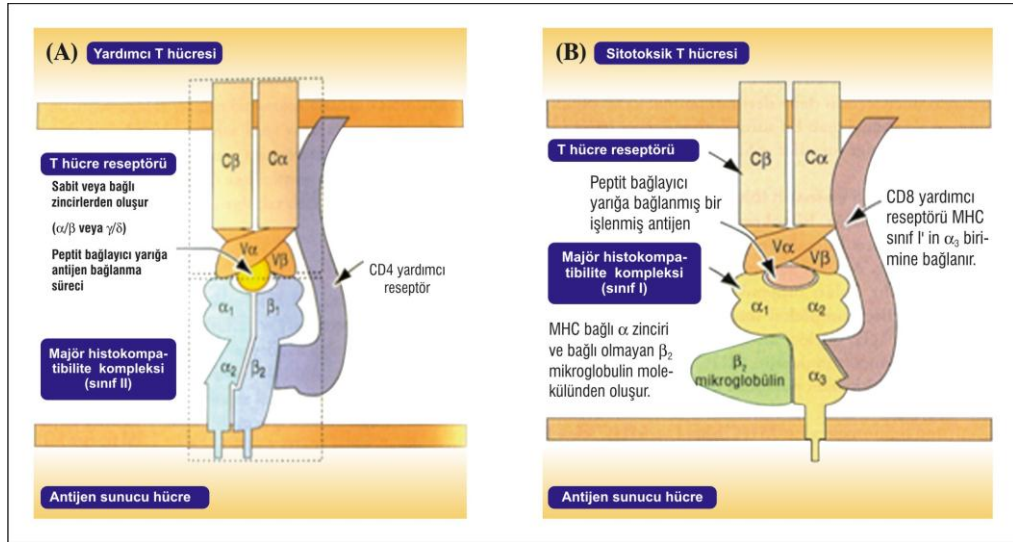
Şekil 1.6. MHC Sınıf III molekül ve genleri (Diker, 1998).

1.4. T Hücre Reseptör Kompleksi

T hücre alt gruplarının her birinde farklı antijen-peptid-MHC kompleksinin tanınmasını sağlayan hücre yüzey reseptörleri bulunmaktadır. MHC sınıf I ve sınıf II molekülleri tarafından sunulan, özgün antijenik peptidleri tanıyan reseptör T hücre reseptörü (TCR) olarak adlandırılmaktadır. TCR, antijen sunucu hücrelerin T

hücrelere bağlanmasını stabilize ederken, yardımcı-reseptör olarak adlandırılan yardımcı hücre yüzey molekülleri ile birlikte hareket ettiği ifade edilmektedir (Zekarias, 2002; Kierszenbaum, 2006; Bredmal, 2010).

TCR, disülfid bağlarıyla birbirine tutunan iki transmembran polipeptid zincirinden (α ve β) oluşmaktadır (Şekil 1.7). Sınırlı sayıdaki T hücrelerinde ise TCR gamma (γ) ve delta (δ) zincir bulunmaktadır. Her α ve β zinciri bir değişken (V_α ve V_β) ve bir sabit (C_α ve C_β) birim içermektedir (Zekarias, 2002; Kierszenbaum, 2006).



Şekil 1.7. Yardımcı T Hücre Receptörünün Yapısı (A), Sitolitik T Hücre Receptörünün Yapısı (B) (Kierszenbaum, 2006).

1.5. Yardımcı CD4 ve CD8 Receptörleri

Sitotoksik T hücreleri saldırılarını her zaman bir tehdit niteliğinde olan yabancı antijenleri üreten hücrelere (virus, bakteri vb.) odaklarken; yardımcı T hücreleri, vücudun bağışıklık savunmaları için gerekli olan ve hücre dışı sıvılardan yabancı antijenleri içlerine alan hücrelere odaklanmaktadır. Bu nedenle, T hücrelerinin bu iki tür hücreyi hiçbir zaman karıştırmamaları ve sitotoksik ile yardımcı olma işlevlerini yanlış yönlendirmemeleri gerekmektedir. Bu amaçla, antijen reseptörlerine ek olarak T hücrelerinin, peptid - MHC kompleksini tanıyan yardımcı reseptörleri

bulunmaktadır. Bu reseptörlerden CD4 ve CD8 sırasıyla MHC sınıf II ve MHC sınıf I molekülleri ile seçici olarak etkileşen T hücre yüzey proteinleridir. CD4, MHC sınıf II' nin β_2 alt birimine, CD8 ise MHC sınıf I' in α_3 alt birimine tutunmaktadır. CD4 yardımcı T hücrelerini, CD8 ise sitotoksik T hücrelerini uygun hedeflere yönlendirmektedir (Şekil 1.7) (Zekarias, 2002; Kierszenbaum, 2006; Shiina, 2006; Alberts, 2008; Singh, 2010b).

1.6. TAP 1, TAP 2 ve Tapasin Proteinleri

Antijen sunan sınıf I ve II molekülleri dışında, MHC genleri tarafından kodlanan TAP proteinleri, antijen işlenmesi ve peptid taşınması ile direk ilişkili olan en önemli moleküllerdendir. Polimorfik özellikte olan bu moleküller hücre içinde bulunmakta ve endojen antijenlerin işlenmesinden sorumlu oldukları bildirilmektedir (Diker, 1998; Sironi, 2008).

Endojen antijenler, sitoplazma içinde serbest olarak bulunmaktadır. İlk aşamada, ubiquitin proteinleri işlenecek olan endojen antijene bağlanmakta ve antijenin etrafını zincir gibi sarmakta ve işaretlemektedir. Enfekte olmuş konakçı hücre içinde ubiquitin ile işaretlenmiş antijenik proteinler proteozomlarda 8-10 amino asitlik küçük peptidlere ayrılarak sitozole verilmektedir. Sitozoldeki bu parçalanmış peptidler TAP 1 ve TAP 2 gibi taşıyıcı proteinlere bağlanmaktadır. Taşıyıcı proteinler peptid parçalarını endoplazmik retikulumun lumenine taşımakta ve lumen içersinde MHC sınıf I molekülleri ile TAP molekülleriyle taşınan peptitlerin birleşmesi gerçekleşmektedir (Diker, 1998; Sandberg, 2001; Antoniou, 2002; Kiper, 2002; Walker, 2005; Villanueva, 2010). Daha sonra bu peptidler MHC sınıf I' proteini ve β_{2-m} ile birlikte CD8(+) T lenfositlere sunulmak üzere hücre yüzeyine taşınmaktadır (Ewald, 2004; Villanueva, 2010; Münz, 2010). Bu nedenle, TAP moleküllerinin hem hücresel savunma mekanizmalarında yer alması hem de MHC grupları ile birlikteliği nedeniyle genetik açıdan önemli olduğu ifade edilmektedir (Kiper, 2002).

İnsanlarda yapılan çalışmalarda Graves hastalığı, romatoid artrit, diffüz panbronşiyolit, hepatit C virüs enfeksiyonu, jüvenil başlangıçlı psöriazis ve sarkoidoz gibi pek çok hastalık ile TAP gen polimorfizmi arasında ilişki saptanmıştır (Kiper, 2002).

TAP molekülü, TAP 1 ve TAP 2 proteinleri tarafından meydana gelen bir heterodimerik bir yapı göstermektedir. Taşıyıcı özelliğini her iki alt ünite varken göstermektedir. LMP ve TAP moleküllerinin her ikisinde de polimorfizm saptanmıştır. Polimorfik LMP molekülleri aynı antijeni farklı peptidlere parçalayabilirlerken, farklı TAP molekülleri de bu farklı peptidleri MHC moleküllerine taşıyabilmektedirler. Bu nedenle, LMP ve TAP polimorfizmi, hangi peptidlerin MHC sınıf I molekülüne bağlanacağını ve dolayısıyla hangi peptidlerin immun yanıtı uyuracağını belirlemektedir. Aynı antijene karşı farklı bireylerin oluşturduğu immun yanıtın gücünün farklı olması bundan kaynaklanmaktadır (Diker, 1998; Kaufman, 2008; Sironi, 2008).

Tapasin, TAP ve sınıf I molekülleri arasında moleküler bir köprü kurmakta (McCluskey, 2004) ve MHC sınıf I molekülleri üzerine peptitlerin yüklenmesinde rol oynamaktadır (Frangoulis, 1999; Shiina, 2006; Sironi, 2006a).

1.7. MHC Genlerinin Kalıtımı

Aynı kromozom üzerinde ve birbirine yakın lokuslarda bulunan, dolayısıyla bir birim halinde kalıtılan gen grupları haplotip olarak adlandırılmaktadır (Başaran, 2003). MHC haplotipleri de sınıf I, II ve III allellerinden oluşmakta ve eş-baskın (co-dominant) özellik göstermektedir (Temiz, 2005; Yiğitbaş, 2006). Bir bireyde bulunan iki haplotip, o bireyin MHC genotipini oluşturmaktadır. Haplotipler, Mendel kurallarına uygun bir kalıtım yolu izlemektedir. Basit Mendel kalıtımına göre iki kardeş 2 haplotipin birden benzer olma olasılığının % 25, bir haplotipin ortak olma olasılığının % 50, tamamen farklı haplotip olma olasılığının ise % 25 olabileceği

bildirilmektedir (Temiz, 2005; Elbaşı, 2008). Genetik rekombinasyonlarda ve crossing over gibi durumlarda yaklaşık % 2 oranında istina gözlenmektedir.

Allellerin, popülasyondaki beklenen frekansları temel alındığında, MHC haplotipleri üzerinde rastlanan allel kombinasyonlarının beklenen teorik değerden daha az sayıda bulunduğu görülmektedir. Bu durum, bazı allellerin birlikteliğinin rastgele olmadığını desteklemektedir. Bağlantı eşitsizliği (Linkage disequilibrium) olarak bilinen ve bazı haplotiplerin korunma çabası olarak açıklanmaktadır. Bu dengesizliğin önemi, transplant donörlerinin bulunmasında ortaya çıkmaktadır (Yiğitbaş, 2006; Elbaşı, 2008).

1.8. Polimorfizm

Polimorfizm çok şekillilik anlamına gelmektedir. Genetik polimorfizm ise en az iki gen tarafından meydana getirilen ve bir popülasyon içinde aynı zamanda farklı olarak ortaya çıkabilen özellikler olarak tarif edilebilir. Basit genetik polimorfizmin sebebi, genetik olayların oluşumundan sorumlu ve bir lokusta bulunan farklı allellerdir. Polimorfizmler Biyokimyasal Polimorfizm, İmmunogenetik Polimorfizm ve DNA Polimorfizmi olarak 3 şekilde gruplandırılır (Erdoğan, 2000). Polimorfizmler, organizmada patoloji yaratmayan mutasyonlar olarak da tanımlanabilir (Yiğitbaş, 2006); ancak polimorfizmlere mutasyonlardan daha sık rastlanmaktadır. Bu nedenle, toplumda %1'den daha yüksek sıklıkta bulunan genetik çeşitlilik ya da gen seçenekleri polimorfizm olarak tanımlanmaktadır (Ekmekçi, 2008). MHC lokusu, bilinen en polimorfik gen bölgelerindedir (Yiğitbaş, 2006; Lee, 2010).

MHC sınıf I ve sınıf II genleri yüksek derecede polimorfizm göstermekte ve amino asit dizileri bakımından bireyler arasında büyük farklılıklar bulunmaktadır (Adams ve Templeton,1998). Bu farklılıkların en önemli nedenleri ise nokta mutasyonları, gen konversiyonu ve karşılıklı rekombinasyondur (Ahmed, 2007).

Nokta mutasyonları, gen konversiyonu ve karşılıklı rekombinasyon MHC polimorfizmine katkıda bulunurken, bazı durumlarda insersiyonlar, delesyonlar ve gen duplikasyonlarının da önemli olduğu ifade edilmektedir (Ahmed, 2007; Horton, 2008; Hosomichi, 2008; Burri, 2010; Lee, 2010).

1.8.1. Biyokimyasal Polimorfizm

Elektroforezde protein bantları farklı hızlarda ilerleme göstermektedir. Elektroforetik her farklı form, proteini oluşturan bir veya birden fazla polipeptid zincirindeki aminoasit dizisinin farklılığı sonucu oluşmaktadır. Nişasta ve poliakrilamid jel elektroforezisi gibi biyokimyasal ayırıştırma metodlarının gelişmesi protein polimorfizmini kesin olarak ortaya çıkarmaktadır (Erdoğan, 2000).

Protein polimorfizmi, otozomal genler tarafından determine edilir ve kodominant basit kalıtım yolu izler. Böylece, homozigot yapıdaki bir birey iki aynı allel ve heterozigot bir birey ise iki farklı allel tarafından belirlenir. Monomerik kalıtım izleyen sistemlerde homozigot bireylerde tek bant, heterozigot bireylerde ise iki bant görülmektedir. Dimerik kalıtım yolu izleyen sistemlerde homozigot bireylerde iki bant, heterozigot bireylerde ise iki homozigot bandın arasında bir üçüncü bant daha şekillenmektedir (Özbeyaz, 1990; Erdoğan, 2000).

1.8.2. İmmunogenetik Polimorfizm

İmmunogenetik polimorfizm eritrosit ve lökosit (MHC) antijenleri ile komploment sistemlerini kapsamaktadır (Erdoğan, 2000).

Omurgalı genomlarındaki bazı lokuslar, ABO kan grupları gibi bazı antijenik özellikleri kodlamaktadır. ABO kan grupları polimorfik bir sistem oluşturmaktadırlar (Devrim, 2004). MHC antijenleri hastalıklara direnç ve doku reddinde rol oynayan bir grup genidir. Bu genler immün savunma sisteminde görevli olan glikoproteinleri

(hücre zarı antijenleri ve bazı serum proteinleri) kodlamaktadır (Ahmed, 2007). Tavuklarda bu sistem B kompleks olarak isimlendirilmektedir. B kompleksi içerisinde BF (Sınıf I), BL (Sınıf II) ve BG (Sınıf IV) lokusları bulunmaktadır (Briles, 1950; Lamont, 1989; Zekarias, 2002; Xu, 2007).

1.8.3. DNA Polimorfizm

Polimorfizm çalışmaları, rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesi ve PZR (polimeraz zincir reaksiyonu)'ın keşfi sonucu moleküler teknikler ile daha hızlı ve daha kesin sonuçlar alınmaktadır. Son yıllarda, çeşitli moleküler teknikler (AFLP, RAPD, RFLP, Mikrosatelitler) geliştirilmiştir (Kiraz, 2010).

1.8.3.1. Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorfizm - SNP):

Tek nükleotid polimorfizmi (SNP), genomik DNA'nın bir popülasyonun normal bireyleri arasında farklılık gösterdiği tek baz-çifti değişiklikleridir. Gen polimorfizmleri popülasyonda yaygın olarak görülmekte, etnik ve coğrafi farklılıklar göstermektedirler. Bir çok durumda, hücre metabolizması için önemli olan yollarda (DNA tamiri, hücre döngüsü kontrolü, sinyal iletimi vb.) rol alan genler kritik pozisyonlarda yer almaktadır. Bazı durumda genin kodladığı proteinin fonksiyonu ya da enzim aktivitesi bu değişikliklerden önemli ölçüde etkilenebilir. Hücre metabolizması için kritik önem taşıyan proteinlerin fonksiyonun bozulması çeşitli hastalıklara yol açmakta veya bazı hastalıklar için riski artırmaktadır. Tek baz değişimleri ile ilişkili olarak ortaya çıkan hastalıklara örnek olarak trombofili verilebilir (Deligezer, 2004). İnsan genomunda en çok bulunan genetik çeşitlilik tipi, tek nükleotid polimorfizmleridir (Ekmekçi, 2008).

Bireyler arasında DNA daki tek nükleotid değişiklikleri olarak adlandırılan SNP'ler transisyon, transversiyon olayları sonucu ortaya çıkabildiği gibi çeşitli insersiyon ve delesyonlar sonucu da oluşabilir (Emir, 2006; Anonim, 2010).

1.9. Tavuklarda MHC Sistemi

Tavuklarda (*Gallus domesticus*) kan gruplarıyla ilgili yapılan çalışmalar, B kan grubu allellerinin bazı özellikleri anlaşıldıktan sonra önem kazanmıştır (Aksoy ve ark. 1998). Landsteiner ve Miller (1924) değişik tavuk eritrositlerinin farklı antijenik özelliklere sahip olduklarını belirlemişlerdir. Tavuklarda MHC sistemi, başlangıçta bir eritrosit antijeni olarak keşfedildiğinden, B kompleks olarak da isimlendirilmektedir (Briles, 1950; Lamont, 1989; Li, 1997; Yan, 2005). MHC sistemi, tavuklarda B kan grubu allelleri ile belirlenebilmektedir. Tavuklarda B kan grubu allellerinin, ana grup doku uyuşması veya MHC genlerini işaret etme gibi önemli bir özelliği bulunmaktadır (Aksoy ve ark. 1998). Schierman ve Nordskog (1961), tavuklardaki B sisteminin doku uyuşumunu kontrol eden genlerle bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir (Shierman,1961; Shafi, 2002; Shiina, 2006).

B sistemi ile ilgili moleküler çalışmalar 1988 yılında başlamış (Auffray ve ark., 1988) ve tavuk, MHC' nin belirlendiği ikinci hayvan türüdür (Lamont,1989; Frangoulis, 1999). Tavuk MHC gen bölgesindeki sınıf Ia ve sınıf II β genlerinin yerleri ilk kez Guillemot ve ark., (1988) tarafından yapılan çalışmada gösterilmiştir.

Tavuklardaki B kompleksi, T lenfositlere antijen sunan heterodimerik transmembran glikoproteinlerinden oluşmaktadır (Zekerias, 2002). Tavuklar, yaklaşık 92 kb uzunluğunda küçük bir MHC gen paketine sahiptir (Zekerias, 2002; Burri, 2010). Tavuk MHC genleri 16. kromozom üzerinde lokalize olmuş ve üç sınıf içermektedir (Parmentier, 2004; Walker, 2005; Xu, 2007; Delany, 2009). Sınıf I, II ve IV genleri sırasıyla B-F, B-L ve B-G diye isimlendirilmektedir. Sınıf I (B-F) antijenleri, hemen hemen tüm hücrelerin üzerinde bulunmaktadır. Sınıf II (B-L) antijenleri, monositler, makrofajlar, B hücreleri ve T hücrelerinin bir kısmında yer almaktadır (Lamont, 1989; Livant ve ark., 2001; Emara, 2002; Zekarias, 2002; Zhou ve Lamont, 2003; Shiina, 2006; Delany, 2009; Li, 2010). Sınıf I molekülleri 40 ve 11 kDa ağırlığında, sınıf II molekülleri 27 ve 30 kDa ağırlığında zincirlere sahip heterodimer yapıdadır (Diker, 1998).

1.9.1. Tavuk MHC Sistemi Molekül ve Genleri

Sınıf I ve sınıf II moleküllerini kodlayan tavuk MHC genleri fonksiyon ve yapı bakımından memelilerin MHC genlerine çok benzediği halde, tavuk organizasyonu tamamen farklılık göstermektedir. Tavuk MHC genleri, memelilerdeki karşılıklarıyla karşılaştırıldığında daha küçük olduğu belirlenmiştir (Frangoulis, 1999; Kaufman, 2008).

Tavuklarda sınıf I ve sınıf II genleri gibi MHC' nin genetik olarak bağımsız bir başka gen kümesi de bildirilmiştir (Briles, 1993). Bu polimorfik gen kümesi, Rfp-Y (restriction fragment polymorphism-Y) olarak isimlendirilmektedir.

MHC genleri, B ve Rfp-Y kompleksleri olarak iki bağımsız kümede toplanmaktadır (Shiina, 2006; Delany, 2009; Hee, 2010; Chaves, 2010b). B ve Y genetik olarak bağlanmalarına rağmen B ve Y bölgelerinin her ikisi aynı kromozomun iki farklı bölgesinde bulunmaktadır (Lee, 2010). Rfp-Y sisteminin sınıf I ve II genleri hakkında az sayıda bilgi bulunmaktadır (Briles, 1993; Emara, 2002; Miller, 2004; Shiina, 2006). Rfp-Y bölgesinin MDV (Marek hastalık virüsü) ve RSV (Rous Sarkoma tümör virüsü)' ye dirençle ilişkili olduğu bildirilmekle beraber detaylı bilgi bulunmamaktadır (Shiina, 2006).

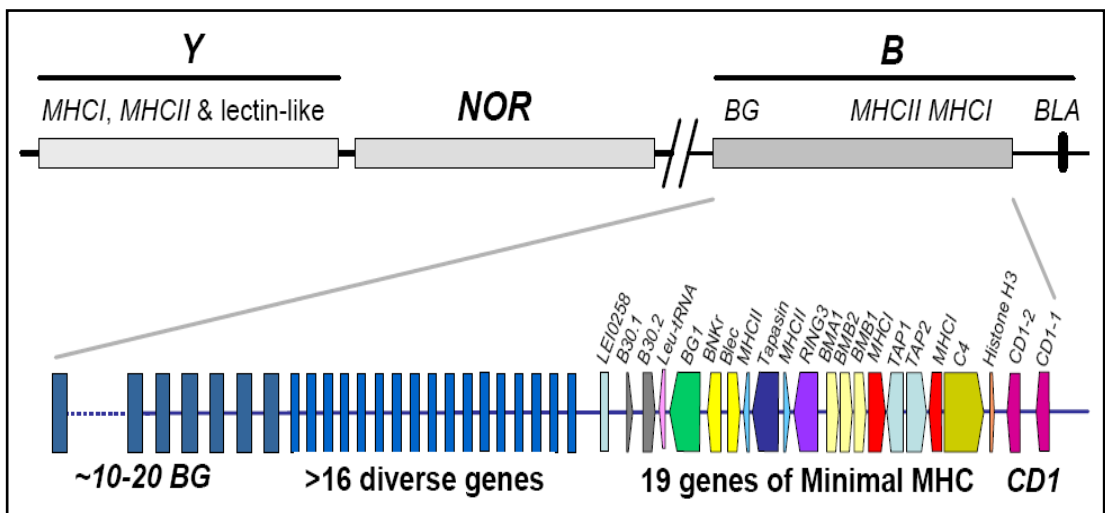
B ve Rfp-Y kompleksleri polimorfik yapıdadır ve her ikisi de Sınıf I (B-F veya Y-F) ve Sınıf II (B-L yada Y-L) lokuslarını içermektedir. İki kümedeki genler arasında bazı yapısal farklılıklar bulunmaktadır. B kompleksi, memeli Sınıf I ve Sınıf II bölgelerine homolog olan B-F ve B-L bölgelerini ve ayrıca tavuklara özel Sınıf IV gen bölgesini içermektedir (Emara, 2002; Zekarias, 2002; O'Neill, 2009).

Bıldırcın ve tavuk MHC sınıf 1 ve sınıf 2 genlerinin filogenik analiz sonuçlarına göre, bu genlerin dizilimlerinin oldukça yakın oldukları bildirilmektedir (Shiina, 2004). Buna karşın tavuk sınıf 1 ve sınıf 2 proteinleri, bıldırcınlardaki karşılığı olan proteinlere göre daha azdır. Bu antijen sunum repertuarının bıldırcında

daha geniş ve çevresel patojenlere daha iyi adapte olabildiklerini göstermektedir (Shiina, 2004). Tavuk ve bıldırcın arasındaki bu farklılığın, bıldırcının göçebe davranışının sonucu olarak daha fazla patojene maruz kalmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Tavuk, göç yapmadığı için patojene maruz kalma çeşitliliği de azalır (Chaves, 2010a).

Tavuk ve insan sınıf II genleri arasında, %55-65 oranında yüksek bir homoloji bulunduğu; sınıf I genleri arasında ise %35 oranında düşük bir homolojinin olduğu bildirilmektedir (Lamont, 1989).

Memeli MHC sinden farklı olarak sınıf III genleri henüz tavuklarda saptanamamıştır, ancak tavuklarda farklı olarak B-G (Sınıf IV) bölgesi bulunmaktadır (Lamont, 1989; Frangoulis, 1999; Xu, 2007). B-G genlerinin çoğu B-G bölgesinde, bir kısmı B-F/B-L bölgesinde bulunmaktadır ve çok polimorfiktir. B-G antijeni 46000 dalton ağırlığındadır ve sadece eritrositler üzerinde bulunmaktadır (Li, 1997). Memeli hayvanlarda bu antijene eşdeğer bir molekül belirlenememiştir (Arda, 1994; Livant ve ark., 2001; Fulton, 2006). Tavuklarda, B kompleksi içinde yer alan genlerin organizasyonu da memelilerden oldukça farklılık göstermektedir. B-F ve B-L genleri farklı bölgelerde kümelenmedikleri, B-F/B-L bölgesinde karışık olarak bulunduğu bildirilmiştir (Diker, 1998).



Şekil 1.8. Tavuklarda MHC gen bölgesi (Miller, 2005).

Tavuklarda B kompleksi içerisinde MHC I (BF1 ve BF2), MHC II (BLB1 ve BLB2) ve MHC IV (BG) lokusları bulunmaktadır.

MHC I lokusu, BMB1 ve TAP 1 lokusları arasında yer alan bölge BF1 (BF-I, B-F minor ve BF α 2); TAP 2 ve C4 lokusları arasında yer alan bölge ise BF2 (B-FIV, B-F major ve BF α 1) olarak isimlendirilmektedir. Blec ve Tapasin lokusları arasında yer alan MHC II lokusu BLB1, Tapasin ve RING3 lokusları arasında yer alan MHC II lokusu ise BLB2 olarak adlandırılmaktadır (Şekil 1.8) (Miller, 2004).

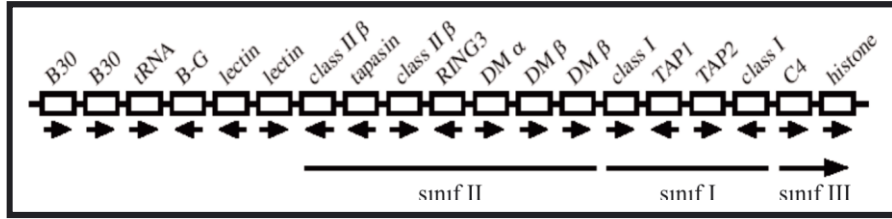
BF\BL bölgesi, MHC içerisinde bulunan 12 lokus içermektedir. Bunlar B30.2.-1 (B30.1, B-BTN1), B30.2-2 (B30.2, B-BTN2), Leu-tRNA, Tapasin (B-TAPBPL), RING3, DMA (Bma), DMB1 (Bmb1), DMB2 (Bmb2), TAP 1 (Tap1), TAP 2 (Tap2), C4 (complement 4) ve CENP-A (histone H3, B-H3) olarak isimlendirilmektedir (Kaufman, 1999; Regnier, 2003; Regnier, 2005; Ruby, 2005).

Memeli MHC siyle karşılaştırıldığında tavukların BF\BL gen bölgesinde LMP (Large Multifunctional Protease) 2 ve 7 (PSMB8 ve PSMB9) genleri bulunmamaktadır. Ayrıca, memelilerde MHC gen bölgesi dışında haritalanan Blec1 (B-lec) ve Blec2 (B-NKr) lokusları tavukların MHC gen bölgesi içerisinde yer almaktadır. İnsanlarda ve diğer memelilerde CD1 ve MHC lokusu farklı kromozomlar üzerinde bulunmaktadır (Shiina, 2006).

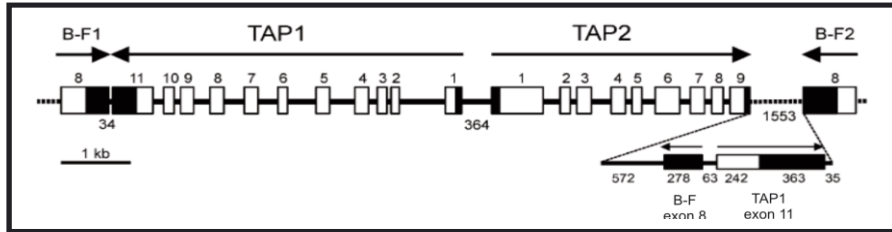
1.9.2 Tavuklardaki TAP Genleri

Tavuklarda TAP genleri, MHC Sınıf I bölgesinde, iki sınıf 1 genlerinin arasında yanyana bulunmaktadır (Şekil 1.9) ve TAP 1 ile TAP 2 iki alt üniteye sahiptir (Sironi, 2008). İnsan ve farelerde ise sınıf 1 genlerinden çok uzakta yer almakta ve önemli derecelerde rekombinasyonla ayrılmaktadırlar (Kaufman, 2008). memelilerle karşılaştırıldığında tavuk TAP 1, TAP 2 ve Tapasin genleri oldukça polimorfik özellik göstermektedir (Kaufman, 2000; Walker, 2005; Kaufman, 2008). İki genin toplam uzunluğu insanlardaki karşılığı olan genlerden daha kısadır ve bu farklılık intron uzunluğundan kaynaklanmaktadır (Sironi, 2008).

Tavuk TAP 1 geni, insanlardaki karşılığı gibi 11 ekzondan oluştuğu, fakat tavuklarda birinci ekzonun insanlardakinden daha kısa olduğu bildirilmiştir. Tavuk TAP 2 geninin ise insanlardaki birinci ve yedinci intronların bulunmaması nedeniyle birleşmiş 9 ekzondan oluştuğu belirtilmektedir (Şekil 1.10) (Walker, 2005; Shiina, 2006; Sironi, 2008).



Şekil 1.9. Tavuk MHC gen bölgesindeki TAP ve Tapasin genlerinin yerleşimi (Kaufman, 2000).



Şekil 1.10. Tavuklarda TAP 1 ve TAP 2 genlerinin organizasyonu (Walker, 2005).

1.9.3. Tavuklardaki Tapasin Geni

Tapasin, endoplazmik retikulumda lokalizedir ve Ig süperailisinin 48 kDa' luk bir transmembran protein üyesidir. TAP ile MHC sınıf I moleküllerinin montajına yardımcı olmak Tapasinin molekülünün fonksiyonları arasında yer almaktadır (McCluskey, 2004). Tapasin molekülü MHC sınıf 1 ve TAP molekülleri arasında bir köprü konumundadır (Sadasivan, 1996; Androlewicz, 1999; Schoenhals, 1999; Tan, 2002) ve yıkımlanması durumunda sınıf 1 ve TAP birleşimi ayrılmaktadır. MHC sınıf I molekülleri üzerine peptitlerin yüklenmesinde de rol oynamaktadır (Frangoulis, 1999; Shiina, 2006; Sironi, 2006a).

Tavuklarda ekzon 5 ile ekzon 6 arasındaki 448 bp uzunluğunda olan Tapasin bölgesinin uzunluğu Hindi'de 554 bp, Sülün'de ise 564 bp uzunluğundadır ve aynı primer çifti ile farklı türlerden amplifike edilebilir. Tavukta, hindi ve sülünde ekzon 5 ve 6 tarafından kodlanan bölgeler arasında homoloji olduğu ve uzunluk farklılığının tamamen 2 nükleotit kümenin insersiyonuna bağlı olduğu bildirilmektedir (tavuk 264 ve 317. bazlarından sonra insersiyonlar vardır) (Sironi, 2006a). Ayrıca, ilk küme içinde, sülünlerin 2 extra nükleotid daha sunduğu, 251 ve 260. tavuk nükleotitleri arasında lokalize 8 bazın hindi de mevcut olmadığı, sülün ve tavuk da ise var olduğu bildirilmiştir (Sironi, 2006a).

Tavuk Tapasin geni insanlardaki karşılığı olan gen gibi 8 ekzondan oluşmaktadır. Ancak, insanlardaki benzerinden iki intron daha küçük olduğu için daha kısa bir gen dizilimi göstermektedir. Tavuk Tapasin geni MHC gen bölgesinde sınıf II genlerinin arasında lokalize ve çok polimorfik olduğu bildirilmiştir (Frangoulis, 1999; Kaufman, 2000; Shiina, 2006; Sironi, 2006a).

1.10. Tavuklardaki Hastalıklara Direnç veya Yatkinlık

Yapılan çalışmalarda tavuk MHC' sinin bazı enfeksiyöz patojenlere karşı direnci belirlediği bulunmuştur (Miller ve ark, 2004; Shiina, 2006; Kaufman, 2008; Schou, 2010; Singh, 2010b; Worley, 2010). Tavuklarda B kan grubu allelleri bakımından seçilen bazı tavuk soy ve hatları arasında hastalıklara direnç bakımından farklılıkların olduğu ilk kez Hansen ve ark. (1967) tarafından bildirilmiştir (Hansen, 1967; Aksoy, 1998; Shafi; 2002). Bazı hastalıklara karşı dirençli ya da dirençsiz olan aile, soy ya da hatlar bulunmaktadır. Houghton Rhode Island Red ırkının marek hastalığına karşı hassas iken, lenfoid lökosis hastalığına karşı ise dirençli olduğu, Houghton Light Sussex ırkının da eimeria türlerine karşı dirençsiz olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, Cornel K hattı tavukların Avian Löykozis hastalığına (Aksoy, 1999), Leghorn ırkı yumurtacı tavukların ise Salmonella gallinarum enfeksiyonlarına dirençli oldukları bildirilmiştir (Arda,1994).

Tavuk MHC genlerinin viral, bakteriyel, paraziter ve otoimmün hastalıklara direnç ve yatkınlıkla ilişkili bir gen kompleksi olduğu bildirilmektedir (Lamont, 1989; Li, 1997; Frangoulis, 1999; Detilleux, 2001; Ahmed, 2007; Hosomichi, 2008; Li, 2010; Schou, 2010). Rous Sarkoma tümör virüsü (RSV), Avian löykozis virüs, infeksiyöz bursal hastalık virüsü (IBDV), *Pasteurella multocida*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, kanatlı kolerası, koksidiyoz gibi çok sayıda patojenlerin neden olduğu hastalıklara; tiroiditis ve vitiligo gibi otoimmün hastalıklara karşı hastalık direnci veya hassasiyet gelişmesi ile MHC arasında güçlü bir ilişki olduğu bulunmuştur (Wigley, 2004; Fulton, 2006; Shiina, 2006; Worley, 2010; Schou, 2010).

MHC genlerinin Marek hastalığına (MDV) direnç veya hassasiyetle ilişkili olduğu bildirilmektedir (Lamont, 1989; Macklin, 2002; Emara, 2002; Miller, 2005; Hosomichi, 2008; O'Neill, 2009; Worley, 2010). Dalgaard ve ark. (2003) tarafından yapılan çalışmada, B kan grubunu dikkate almadan Marek hastalığına dirençli fertler seçilmiş ve sonuçta sürüde B₂₁ haplotipine sahip fertlerin hızla arttığı belirlenmiştir. Tavuklarda, Marek hastalığına direnç ile B₂, B₆, B₁₃, B₁₄ ve B₂₁ haplotipleri arasında; duyarlılık ile B₁₂, B₁₅ ve B₁₉ haplotipleri arasında bir ilişki olduğu saptanmıştır (Shiina, 2006). Özellikle, B₁₉ haplotipi Marek' e duyarlılığa, B₂₁ haplotipinin ise yüksek dirence neden olduğu bulunmuştur.

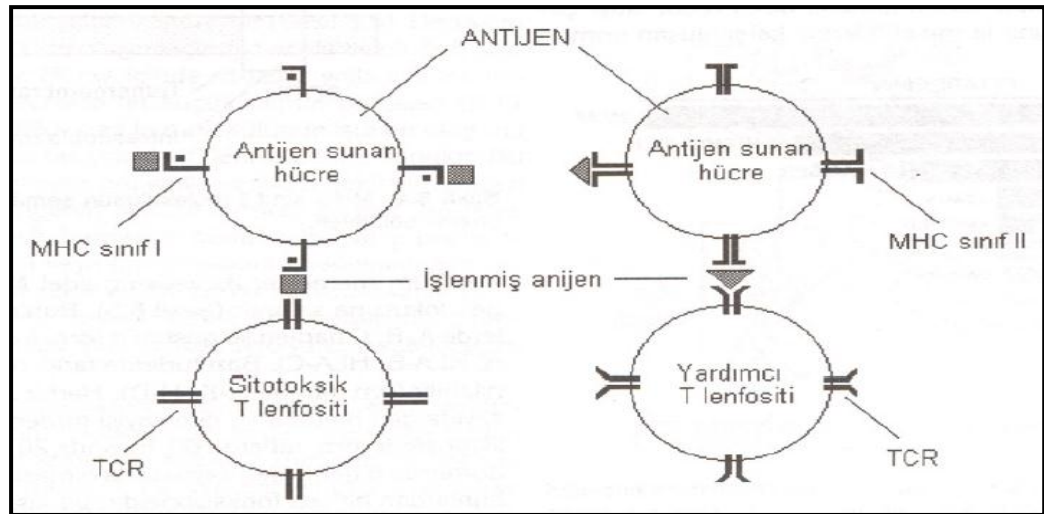
Collins ve ark. (1977), B₂B₂ ve B₂B₅ genotipindeki tavuklarda sarkomaların hızlı şekilde gerilediğini, B₅B₅ genotipindeki tavuklarda ise sarkomaların ilerleyip, metastaz yaptığı ve tavukların ölümüne neden olduğunu bildirmişlerdir. RSV ile yapılan çalışmalarda piliçlerin kanat derileri içine enjekte edilen standart RSV sonrası tümör oluşumlarını ölçülmüştür. Bu tavukların B₂₃B₂₆ genotipinde olanlarında çok iri tümörler, B₂₄B₂₄ genotipindeki tavuklarda ise çok az reaksiyon gözlenmiştir (Collins ve ark., 1977; Brown ve ark., 1982; Bacon ve ark., 2000).

Lamont ve ark. (1987), tavuk kolerası etkeni *Pasteurella multocida* X73 suşunu düşük dozlarda tavuklara enjekte etmişler ve B₁B₁ genotipteki hayvanlarda ölüm oranının çok düşük olduğunu belirlenmişlerdir. Bir başka çalışmada, B₁B₁

genotipindeki tavukların *Salmonella pullorum* ve insan serum albuminine karşı zayıf immün yanıt şekillendiği bildirilmiştir. Ayrıca, B lokusu tavuklarda otoimmün tiroiditis gelişimini etkilemektedir. Koksidiyoz hastalığında, B₅B₅ genotipindeki tavukların B₂B₂ genotipindekilere göre daha iyi antikor yanıt ve daha az lezyon şekillenmiştir (Arda, 1994; Diker, 1998).

1.11. İmmün Yanıtın Düzenlenmesinde MHC ve Hastalık İlişkisi

Mikroorganizmalara veya diğer protein antijenlere karşı immün yanıtın uyarılması için öncelikle, bunların antijen sunan hücreler tarafından kısa peptid parçalarına (antijenik determinant) ayrılması gerekmektedir. Bu olaya antijen işlenmesi denilmektedir.



Şekil 1.11. İşlenmiş antijenlerin MHC molekülleri ile birlikte lenfositlere sunulması (Diker, 1998).

Etkili bir immün yanıt için antijenlerin hücre içinde işlenmesi yeterli değildir. Bu işlenmiş antijenlerin, uygun antijen sunan moleküller ile bağlanması ve bu şekilde lenfositlere sunulması gerekmektedir (Şekil 1.11). Antijen sunan bu moleküller doku uyuşum molekülleri veya doku uyuşum antijenleri olarak adlandırılmaktadır (Diker, 1998; Sandberg, 2001; Münz, 2010).

MHC genleri, antijenin nasıl işleneceğini dolayısıyla antijenin MHC moleküllerine uyup uymayacağını belirlemekte, antijen işleme ve sunma olaylarını kontrol etmektedir. Bu nedenle MHC, infeksiyöz veya immunité ile ilişkili hastalıklara direnci veya duyarlılığı belirleyen en önemli genetik faktörlerden birisidir (Diker, 1998; O' Neill, 2009; Hee, 2010; Schou, 2010; Villanueva, 2010).

Bir antijen MHC moleküllerinin oluklarına bağlanabilirse immun yanıt şekillenmekte; eğer antijen en az bir MHC molekülüne bağlanamazsa immun yanıt oluşmamaktadır. Bu nedenle, bir antijene karşı immun yanıt oluşup oluşmayacağını bireyin sahip olduğu MHC genleri belirlemektedir. MHC moleküllerinin immun sistem hücreleri üzerindeki miktarı da immun yanıtın gücünü belirlemektedir. Bir antijeni sunabilecek MHC molekülleri bulunsa bile, eğer bunların antijen sunan hücreler üzerindeki sayısı az ise yeterli bir immun yanıt oluşmamaktadır (Diker, 1998).

MHC molekülleri, hastalığa yatkınlığı gösteren bir özellik olup, genellikle hastalığın ortaya çıkmasına çok sayıda faktörün beraber bulunması neden olmaktadır. Sunulacak peptidleri ve dolayısıyla oluşacak immun yanıtın özelliklerini, MHC molekülleri kadar, antijenlerin işlenmesi sırasında oluşan peptidlerin yapısı da belirlemektedir. Bu nedenle, sınıf II MHC genleri arasında yer alan ancak yapısal olarak onlara benzerlik göstermeyen ve antijen işlenmesinde rol alan LMP ve TAP genlerindeki polimorfizmin de hastalıklar ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Çevirgen, 2005).

MHC' nin çeşitli hastalıklarla ilişkisi bazen antijen sunumundaki farklılıklar ile bazen de moleküler benzerlik veya taklit (mimicking) mekanizmaları ile izah edilmeye çalışılmıştır. Hastalıklarla ilişkili genler MHC ile birlikte taşınabilmekte, hastalık ajanı ile MHC antijeni immünolojik olarak benzezebilmekte veya hastalık ajanları MHC molekülünü taklit edebilmektedir. MHC molekülüne bağlanan peptid ile MHC molekülünün yeni bir antijenik peptid oluşturarak immun sistemi uyarması sonucu hastalık şekillenebilmektedir (Çevirgen, 2005).

Otoimmün hastalıkların çoğunun MHC ile ilişkisi bulunduğu bildirilmektedir (Çevirgen, 2005). Bu hastalıkların otoimmün kökenli (Miller, 2004; Çevirgen, 2005) olabildiği gibi viral, alerjik, nörolojik ve endokrin vb. kökenli olabileceğide belirtilmektedir. Hastalıkların pek çoğunda MHC dışında çok sayıda gen ve çevresel etkenlerde rol oynamaktadır. Bu nedenle, hastalıklar ile MHC' nin arasındaki ilişkisini belirlemek zordur. Ancak, bazı MHC gruplarıyla hastalıklar arasındaki kuvvetli ilişkiler olduğu bildirilmiştir (Sabuncuoğlu, 2006). Buna, insanlarda görülen ankilozan spondilit ile HLA B27 arasında bir ilişki bulunmaktadır (Başaran, 2003; Çevirgen, 2005). İnsanlardaki R-R tip multiple skleroz' da DQ antijenlerinin hastalığa yatkınlık ve dirençle ilgili olduğu düşünülmektedir (Kuş ve ark, 2004). Ayrıca, romatoid artirit, insüline bağımlı diyabet hastalığı (IDDM), Behçet hastalığı v.b. hastalıklarında MHC ile ilişkili oldukları bildirilmiştir (Çevirgen, 2005).

Tavuklarda B₂₁ antijeni taşıyan tavukların marek hastalığına, B₂ antijeni taşıyanların lenfoid leukozis hastalığına dirençli, B₁ antijeni yönünden homozigot olan tavukların ise marek hastalığına ve bakteriyel enfeksiyonlara daha duyarlı oldukları bildirilmiştir (Arda, 1994).

Bir hastalık ile MHC antijeni arasında ilişki Rölatif Risk ile tespit edilmektedir. Rölatif risk, hastalıkla ilişkili MHC antijenine sahip bir bireyde, bu antijene sahip olmayan bir bireye oranla bu hastalığın görülme ihtimalini ifade etmekte ve aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır.

$$\text{Rölatif Risk} = p^+ \times c^- / p^- \times c^+$$

Burada;

c^- = Belirli MHC antijeninden yoksun kontrollerin sayısı

c^+ = Belirli MHC antijenine sahip kontrollerin sayısı

p^+ = Belirli MHC antijenine sahip hastaların sayısı

p^- = Belirli MHC antijeninden yoksun hastaların sayısıdır

Hesaplanan rakamla antijeninin hasta popülasyonundaki sıklığı arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır. Rölatif risk arttıkça hasta popülasyonunda antijen daha fazla görülmektedir (Temiz, 2005; Yeşilli, 1993).

Bu araştırma Denizli ve Gerze yerli tavuk ırklarındaki MHC bölgesinde bulunan TAP 1, TAP 2 ve Tapasin gen bölgelerindeki polimorfizmleri belirlemek, yerli tavuk ırkları ve bu ırklar ile ticari tavuk tipleri arasındaki MHC gen bölgesindeki farklılıkların ortaya koymak amacıyla yapılmıştır. Ayrıca, yerli tavuk ırklarının MHC gen bölgesinde yapılacak diğer genetik çalışmalara da alt yapı oluşturması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Hayvan Materyali

Bu araştırmada, 30 adet Denizli ırkı, 30 adet Gerze ırkı, 10 adet Lohmann-LSL beyaz yumurtacı, 10 adet Brown nick kahverengi yumurtacı ve 10 adet broiler olmak üzere toplam 90 tavuk kullanılmıştır.

2.1.2. Teknik Aletler

Araştırmanın laboratuvar uygulamaları sırasında kullanılan laboratuvar malzemeleri şunlardır:

2.1.2.1. Mikropipet

Tüm sulandırmalar ve aplikasyonlar için 0,5 - 10, 10 - 100 ve 100 - 1000 μ l' lere ayarlanabilen THERMO-Finnpipette mikro pipetleri kullanılmıştır.

2.1.2.2. Ultra Saf Su Cihazı

Primerlerin, DNA'ların ve PCR reaksiyonları için gerekli olan ultra saf su Milli-Q Synthesis (MILLIPORE) cihazından şağlanmıştır.

2.1.2.3. Güç Kaynağı

Elektroforez alışmasında Thermo (4000 P, Power Supply) programlanabilir güç kaynağı kullanılmıştır.

2.1.2.4. Yatay Elektrophorez Sistemi

Elde edilen DNA' ların elektrophorezde yurütölmeleri için EC 320 ve EC 330 (Thermo) elektrophorez jel sistemleri kullanılmıştır.

2.1.2.5. PCR Cihazı

Uygun primerler kullanılarak, istenen DNA bölgelerinin çoğaltılması Eppendorf (Mastercycler, ep gradient S) PCR cihazı ile gerçekleştirilmiştir.



Resim 2.1. PCR cihazı (Eppendorf, Mastercycler, ep gradient S).

2.1.2.6. Jel Görüntüleme Sistemi

DNA izolasyonu ve PCR sonucu elde edilen DNA' ların elektrophorez sonrası görüntülenmesi amacıyla VILBER LOURMAT Biovision (VILBER LOURMAT, Marne-la-Vall'ee Cedex, France) jel görüntüleme sistemi kullanılmıştır.

2.1.2.7. NanoDrop-Spektrofotometre

DNA'ların miktarını ve saflığını belirlemede NanoDrop 8000 spektrofotometre cihazı (Thermo Scientific) kullanılmış ve 1.8 ile 2 ng/ μ l arası değerler PCR ürünleri için uygun miktarlar kabul edilmiştir.

2.1.2.8. DNA Dizileme Cihazı

PCR ile çoğaltılan DNA' lara ait baz dizilimlerini belirlemek için 3130x Genetic Analyzer (Applied Biosystems) cihazından yararlanılmıştır.



Resim 2.2. DNA dizileme cihazı (3130x Genetic Analyzer).

2.2. Metod

2.2.1. Kanların Alınması, Hazırlanması ve İşlenmesi

Her tavuğun kanat venasından (Vena cephalica antebrachii), içerisinde antikoagulant (EDTA) bulunan, iki adet 5 ml'lik tüplere kan örnekleri alınmış ve tüplerin üzerine tavuğun ırkı, cinsiyeti ve numarası yazılmıştır. Kan örnekleri laboratuara

getirildikten sonra DNA izolasyonu yapılncaya kadar - 20 °C' de derin dondurucuda saklanmıştır.



Resim 2.3. Kanat venasından (Vena cephalica antebrachii) kan alımı.

2.2.2. Kandan DNA İzolasyonu

Kandan DNA izolasyonu fenol - kloroform yöntemi ile Sambrook ve Russel (2001)' e göre elde edilmiştir. Bu yöntemle göre ihtiyaç duyulan stok solüsyonun yapısı ve yöntem aşağıdaki gibidir.

TNE Solüsyonu

Tris-HCl, pH 8	1,5 ml
1 M NaCl	3 ml
0,5 M EDTA, pH 8	300 µl
Ultra distile su	25,2 ml

1,5 ml'lik mikro santrifüj tüplere sırasıyla her tavuğa ait 100 µl kan örneği, 300 µl TNE solüsyonu, 30 µl Tris-HCl (pH 8), 5 µl proteinaz K (10 mg/ml) ve 10 µl % 20'lik SDS solüsyonu eklenmiş ve daha sonra tüpler 50-55 °C' de bir gece karıştırılarak bekletilmiştir.

Ertesi gün tüplere 445 µl fenol (pH 8) eklenmiş ve 10 dakika hafifçe karıştırılmıştır. Daha sonra 3000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilmiş ve üstteki sıvı kısım (süpernatant) başka bir mikro santrifüj tüpüne dikkatlice aktarılmıştır.

Her tüpün üzerine 445 µl fenol / kloroform (1:1) eklenmiş, 10 dakika hafifçe karıştırılmış ve 3000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatantlar yeni mikro santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Daha sonra her tüpe 445 µl kloroform / izoamilalkol (24:1) eklenmiş, 10 dakika karıştırılmış ve 3000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar başka mikro santrifüj tüplerine aktarılmış ve üzerlerine - 20 °C de bekletilmiş 890 µl % 100 etanol eklenmiştir. Tüm örnekler 10.000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek DNA peletleri elde edilmiştir.

DNA peletlerini yıkamak için tüplerin içerisindeki etanol tüplerin kenarlarından dökülmüş, peletlerin üzerine - 20 °C de bekletilmiş 890 µl %70' lik etanol eklenmiş ve 10.000 rpm' de 10 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. Daha sonra tüplerin içerisindeki etanoller tüplerin kenarlarından dökülmüş ve oda sıcaklığında etanollerin uçması için bekletilmiştir. Peletleri çözdürmek amacıyla üzerlerine 100 µl ultra saf su eklenerek 1 gece 4 °C' de bekletilmiştir. Ertesi gün % 0.6 lık agarose jelde DNA ların hepsi kontrol edilmiştir.

2.2.3. Jel Elektroforez

Agaroz jeli (% 0,6' lık) hazırlamak için 100 ml 1xTBE ve 0,6 g agaroz karıştırılmış, mikrodalga fırında eritilmiş ve tarak bulunan elektroforez jel tepsisine dökülmüştür. Jelin katılaşması için 30 dakika oda sıcaklığında, 30 dakika da 4 °C' de bekletilmiştir. Daha sonra jeldeki tarak uzaklaştırılmış ve elektroforez tankı 1XTBE solüsyonu ile doldurulmuştur.

Her kuyucuğa 2 µl 6x loading dye ve 10 µl DNA örneğinden oluşan karışım eklenmiş ve 120 volt da 30 dakika yürütülmüştür. DNA' ları görüntülemek için jeller

% 2'lik ethidium bromid içersinde 30 dakika bekletilmiş ve jel görüntüleme sistemi ile kontrol edilmiştir. Işımanın olduğu bantlar pozitif, ışımının görülmediği bantlar ise negatif olarak değerlendirilmiştir. DNA örnekleri, PCR ve DNA dizileme analizi yapılmıncaya kadar -35 °C' de saklanmıştır.

2.2.4. DNA'ların Çoğaltılması

En uygun MgCl₂ ve yapışma sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla TAP 1, TAP 2 ve Tapasin bölgelerinin ayrı ayrı optimizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, MgCl₂ konsantrasyonu 1 mM, 1,5 mM ve 3 mM olacak şekilde üç farklı PCR protokolü hazırlanmıştır. Gradientli PCR cihazı yapışma sıcaklığı 55 ile 70 °C' ler arasında olacak şekilde ayarlanmış ve her protokol için 6 örnek hazırlanmıştır.

Elde edilen PCR ürünleri (% 0,6' lık) agarose jelde yürütülmüş, ethidium bromide ile boyanmış ve oluşan ışımalar değerlendirilerek uygun MgCl₂ ve yapışma sıcaklıkları belirlenmiştir. Optimizasyonlar sonrası MgCl₂ konsantrasyonu TAP 1 gen bölgesi için 1,5 mM, TAP 2 ve Tapasin gen bölgeleri için ise 3 mM bulunmuştur. Yapışma ısıları ise Tapasin gen bölgesi için 63 °C, TAP 1 ve TAP 2 gen bölgeleri için 65 °C olarak belirlenmiştir.

2.2.4.1. TAP 1 Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

TAP 1 gen bölgesi için ileri 5'-CGAAGAGCCCACAGCCTT-3', geri 5'-ACCGTCAGCACTGGGGACC-3' primeri seçilmiştir (Sironi, 2008). Bu primerler TAP 1 geninin ekzon 6 ile ekzon 7 (Genbank: AL023516.3) arasındaki 431 bp uzunluğundaki bir bölgeyi çoğaltmak için kullanılmıştır. DNA'ların çoğaltılması için 10x Buffer solüsyonundan 5 µl, 25 mM' lık MgCl₂ solüsyonundan 3 µl, 25 M'lık dNTP' den 0.20 µl, 10 pmol' lük forward ve reverse primer karışımından 1.5 µl, Taq polimeraz 0.5 µl ve 34,8 µl ultra distile su, örnek sayısı kadar hazırlanarak bir mikro santrifüj tüpü içerisinde karıştırılmıştır. Daha sonra 0,2 ml'lik pcr tüplerine 45 µl hazırlanan karışım ve 5 µl DNA örneği eklenmiştir.

PCR cihazı önce denatürasyon için 95 °C' de 10 dakika, daha sonra 95 °C' de 30 sn, primerlerin bağlanması için (hibridizasyon-annealing) 65 °C' de 1 dakika, polimerizasyon (extension) 72 °C' de 1 dakika olacak şekilde 35 döngü; son olarak da 72 °C' de 10 dakika ve 4 °C' de bekletilecek şekilde programlanmıştır.

2.2.4.2. TAP 2 Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

TAP 2 gen bölgesi için ileri 5'-AGGGCCATTTTTCTCCTCAT-3' ve geri 5'-TGCATTGCTCAGAAGGTCAC-3' primeri seçilmiş (Sironi, 2008). Bu primerler TAP 2 geninin ekzon 4 ile ekzon 6 (Genbank: AL023516.3) arasındaki 399 bp uzunluğundaki bir bölgeyi çoğaltmak için kullanılmıştır. DNA'ların çoğaltılması için 5 µl buffer solüsyonu, 6 µl MgCl₂ (25 mM), 0.20 µl dNTP (25 M) karışımı, 1.5 µl 10 pmol' lük forvard ve reverse primer karışımı, 0.5 µl Taq polimeraz ve 31,8 µl deiyonize su, örnek sayısı kadar hazırlanarak bir mikro santrifüj tüpü içerisinde karıştırılmıştır. Daha sonra 0,2 ml'lik pcr tüplerine 45 µl hazırlanan karışım ve 5 µl DNA örneği eklenmiştir.

PCR cihazı önce 95 °C' de 10 dk, sonra 95 °C' de 30 sn, 65 °C' de 1 dk ve 72 °C' de 1 dk olacak şekilde 40 döngü, 72 °C' de 10 dk ve 4 °C' de bekletilecek şekilde programlanmıştır.

2.2.4.3. Tapasin Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

Tapasin gen bölgesi için ileri 5'-GGGACACAGTGATGGACAGC-3' ve geri 5'-GTAGAGCCAACGGATGAGGC-3' primeri seçilmiş (Sironi, 2006a). Bu primerler Tapasin geninin ekzon 5 ile ekzon 6 (Genbank: AL023516-AJ004999) arasındaki 448 bp uzunluğundaki bir bölgeyi çoğaltmak için kullanılmıştır. DNA'ların PCR ile çoğaltılması için 5 µl buffer solüsyonu, 6 µl MgCl₂ (25 mM), 0.20 µl dNTP (25 M) karışımı, 1.5 µl 10 pmol' lük forvard ve reverse primer karışımı, 0.5 µl Taq polimeraz ve 31,8 µl deiyonize su, örnek sayısı kadar hazırlanarak bir mikro santrifüj

tüpü içerisinde karıştırılmıştır. Daha sonra 0,2 ml'lik pcr tüplerine 45 µl hazırlanan karışım ve 5 µl DNA örneği eklenmiştir.

PCR cihazı önce 95 °C' de 10 dk, sonra 95 °C' de 30 sn, 63 °C' de 1 dk ve 72 °C' de 1dk olacak şekilde 35 döngü, daha sonra 72 °C'de 10' dk' ve 4 °C' de bekletilecek şekilde programlanmıştır.

2.2.5. PCR ürünlerinin Temizlenmesi

PCR ürünleri agarose jelde koşturulmuş ve %2 ethidium bromide ile boyanmıştır. Daha sonra jelde yürütülen PCR ürünleri jelden kesilerek Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas) ile temizlenmiştir. Tüm uygulamalar oda sıcaklığında ve santrifüjlerin hepsi 12000 g den fazla bir değerde yapılmıştır.

Temiz bir bisturi veya jilet yardımıyla DNA parçalarını içeren jel parçaları, jel miktarını minimize etmek için, DNA ya mümkün olduğunca yakın yerden kesilmiştir. Jel parçaları, önceden darası alınmış, 1,5 ml mikro santrifüj tüplerine yerleştirilmiş ve tartılarak jelin ağırlığı kaydedilmiştir. Daha sonra jelin üzerine 4,5:1 oranında binding buffer ve 0,5 kat TBE conversion buffer eklenmiş ve jel karışımı 5 dakika 55 °C' de, jel parçaları tamamen çözününceye kadar bekletilmiştir. Erime sürecini kolaylaştırmak için birkaç dakikada bir tüpler alt-üst edilmiştir.

Solüsyonun rengi kontrol edilmiş ve sarı bir rengin oluşması DNA bağlanma pH' sının uygun olduğunu göstermektedir. Eğer solüsyonun rengi turucu veya menekşe rengi ise 10 µl 3M sodyum asetat (pH 5.2) eklenerek karıştırılmış ve karışımın renginin sarı olması sağlanmıştır.

DNA / binding buffer karışımına 2 µl silica powder suspansiyonu eklenmiş ve karıştırılmıştır. Silicaların DNA lara bağlanması için 55 °C' de 10 dakika karıştırılarak bekletilmiştir. Daha sonra karışım 10 saniye 14000 rpm' de santrifüj edilmiş ve üstteki sıvı dikkatli bir şekilde uzaklaştırılarak atılmıştır. Üzerine 4 °C' de

bekletilmiş 500 µl yıkama solüsyonu eklenerek peletler 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış ve bu işlem üç kez tekrarlanmıştır.

Son yıkamadan sonra peletlerin üzerine 30 µl steril ultra saf su eklenmiş ve tüp 55 °C' de 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra tüp santrifüj edilerek süpernatantlar yeni bir tüpe aktarılmıştır. Silika tozu kalıntılarını uzaklaştırmak için tüp tekrar 30 saniye santrifüj edilerek süpernatantlar yeni bir tüpe aktarılmış ve dizileme analizine kadar örnekler -20 °C' de saklanmıştır.

2.2.6. DNA Dizileme Analizi

Sephadex kolon yardımıyla temizlenen PCR ürünleri BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem) kullanılarak PCR (Cycle Sequence) yapılmıştır. Bunun için, 2 µl DNA, 1 µl primer (3,2 pmol/ ml), 1 µl BigDye Terminator V1.1, V3.1 5xSequencing Buffer, 2 µl BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing RR-100, 4 µl ultra saf su bir mikro santrifüj tüpünde karıştırılmıştır.

Daha sonra karışım PCR cihazına yerleştirilmiş ve cihaz 96 °C de 1 dakika da 1 döngü, 96 °C de 10 saniye, 50 °C de 5 saniye, 60 °C de 4 dakika da 30 döngü ve 4 °C de bekletilecek şekilde programlanmıştır.

DNA dizileme öncesi 10 µl PCR ürünlerini saflaştırmak için Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich) kolonlar kullanılmıştır. Bu amaçla, 1gr Sephadex G-50 ile 15 ml ultra saf su 5 dakika kuvvetlice çalkalanmış ve boş spin kolonlara 650 µl eklenmiştir. Yarım saat beklendikten sonra 4800 rpm' de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar uzaklaştırıldıktan sonra 10 µl pcr ürünleri Sephadex kolonun ortasına konulmuş ve 5400 rpm' de 2 dakika santrifüj edilmiştir.

Kolondan geçen PCR ürünlerinden 10 µl 96' lık pleytlerin dip kısmına aktarılmıştır. Pleytlerde aynı hizada olmayan örnekler Hi-Di TM formamide

(Applied Biosystems) ile tamamlanmıştır. Daha sonra pleyt dizileme cihazına (3130x Genetic Analyzer, Applied Biosystems) yerleştirilmiştir.

Polimer olarak 7 ml 3130 pop-7 TM Performance optimized Polymer'dan, anot ve katot kutupları için 25 ml EDTA'lı Genetic Analyzer 10x Running Buffer kullanılmıştır.

DNA dizileme analizleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

2.2.7. İstatistik Analiz

2.2.7.1. Genetik Uzaklıkların Hesaplanması

TAP 1 ve TAP 2 gen bölgelerine ait dizileme sonuçları Blast programında karşılaştırılmış ve Gallus gallus'a ait TAP 1 ve TAP 2 gen bölgeleriyle uyumlu bulunmuştur. Elde edilen tüm dizileme sonuçları Bio Edit programı kullanılarak düzeltilmiştir.

Tavuk popülasyonları arasındaki genetik uzaklıkların tahmininde Tamura-Nei (1993)'nin Maximum Composite Likelihood yöntemi kullanılmıştır. Bu model kullanılarak yapılan kümeleme analizinde, dendogramlar için Nei ve Kumar (2000) tarafından verilen Neighbor-Joining Tree metodu uygulanmıştır. Bu amaçla Mega 4 bilgisayar paket programından (Tamura, 2004, 2007) yararlanılmıştır.

Genetik uzaklık değerleri TAP 1 ve TAP 2 bölgeleri için ayrı ayrı hesaplanmış, daha sonra bu iki bölge birleştirilerek (TAP 1 + TAP 2) genetik uzaklık değerleri tekrar hesaplanmıştır (Nei & Kumar 2000; Tamura, 2004; 2007).

Genetik uzaklık değerlerine ilişkin Phylogeny sonuçları Neighbor-Joining Tree (İnterior-Branch Test ve Bootstrap Test) yöntemi kullanılarak TAP 1, TAP 2 ve TAP 1 + TAP 2 için elde edilmiştir.

Tavuk popülasyonları arasındaki nükleotid farklılıkları (π) ve popülasyon mutasyon oranını (θ) ve Tajima D yi hesaplamak için “Tajima's Neutrality Test” uygulanmıştır (Tajima, 1989; 1993; Nei & Kumar, 2000). Bu amaçla Mega 4 bilgisayar paket programından (Tamura, 2007) yararlanılmıştır.

Popülasyonların geçmişte seçilime uğrayıp uğramadığını belirlemek için nötralite testleri kullanılmaktadır (Koban ve ark., 2008). DNA polimorfizmden doğal seleksiyonu belirlemek için çoğunlukla Tajima D testinden yararlanılmaktadır (Innan, 2000; McVean, 2002; Winter, 2005). Bir DNA dizisinin doğal olup olmadığını bilmek için yapılmaktadır (Winter, 2005). Nükleotid datalar için Tajima Testi en popüler testlerden biridir (Nielsen, 2001).

Tajima Nötrality Test’ inde her bir örnek için nükleotid farklılıklar (π) ile toplam polimorfik bölge sayıları (S) karşılaştırılmaktadır (Tajima, 1989). Nükleotid farklılıklar iki dizi arasındaki her örnek için nükleotid farklılıkların ortalama sayısı olarak tanımlanmıştır (Tajima, 1989).

Tajima D değeri, yeni mutasyonlar yüksek miktarda görüldüğünde, seçici süpürme (selective sweep) yada popülasyon genişlemesi (population expansion) durumlarında negatif; yeni mutasyonlar çok az miktarda görüldüğünde, dengeli seçim (balancing selection) ve popülasyon azalması (population decline) durumlarında ise pozitif değer almaktadır (Innan, 2000; McVean, 2002; Koban ve ark., 2008).

Tajima Nötrality Test’ i kullanarak, her bir örneğe ait TAP 1, TAP 2 bölgelerine ait nükleotid dizileri için toplam polimorfik bölge sayısı (S), farklılık gösteren sitelerin oranı (p_s), nükleotid farklılıklar (π) ve popülasyon mutasyon

oranını (θ) ve Tajima D hesaplanmıştır (Wang, 2010). Daha sonra TAP 1 ve TAP 2 bölgelerini birleştirerek aynı hesaplamalar tekrar edilmiştir.

n = Toplam örnek sayısı

m = Toplam baz uzunluğu

S = Toplam polimorfik bölge sayısı

θ = Popülasyondaki mutasyon oranını

π = nükleotid farklılıklar.

$$\theta = p_s/a_1,$$

$p_s = S/m$, farklılık gösteren sitelerin oranı

$$a_1 = \sum_{i=1}^{n-1} 1/i$$

$$\pi = \frac{\text{toplam farklılık} / \text{karşılaştırılan örnek çifti}}{\text{dizinin uzunluğu}}$$

Karşılaştırılan örnek çifti = $n.(n-1) / 2$

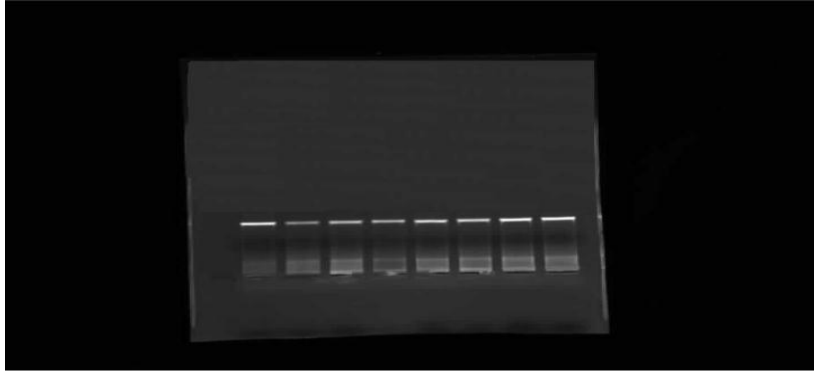
D = Tajima test istatistiği

$$D = \frac{\pi - S/a_1}{\sqrt{\text{Var}(\pi - S/a_1)}}$$

3. BULGULAR

3. 1. DNA İzolasyonu ve Optimizasyon

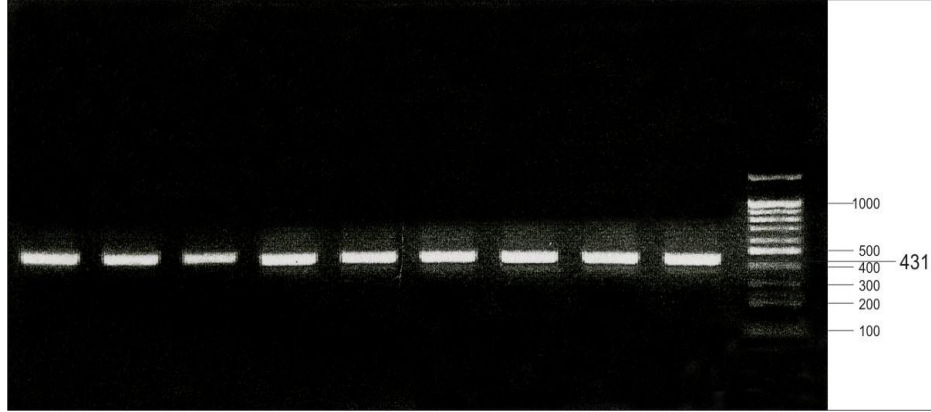
Fenol-kloroform yöntemiyle elde edilmiş, DNA örnekleri %0,6 'lık agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve jel görüntüleme sistemiyle görüntülenmiştir (Şekil 3.1.). Daha sonra her örnek 50 ng olacak şekilde sulandırılmış ve her gen bölgesi için gradiyentli PCR cihazında optimizasyonları yapılmıştır. Optimizasyonlar sonunda TAP 1 gen bölgesi için $MgCl_2$ konsantrasyonu 1,5 mM, TAP 2 ve Tapasin gen bölgeleri için ise 3 mM bulunmuştur. TAP 1 ve TAP 2 gen bölgeleri için yapışma ısısı 65 °C, Tapasin gen bölgesi için 63 °C olarak belirlenmiştir.



Şekil 3. 1. DNA örneklerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.

3. 2. TAP 1 Gen Bölgesi

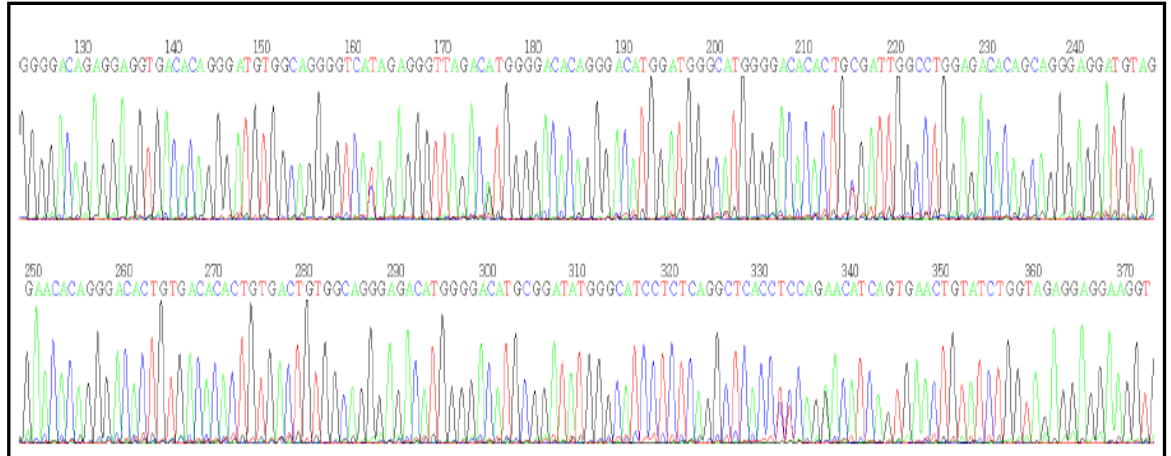
TAP 1 geninin, ekzon 6 ile ekzon 7 (Genbank: AL023516.3) arasındaki bölge çoğaltılmış ve 431 bp uzunluğunda bir bant elde edilmiştir (Şekil 3. 2.).



Şekil 3. 2. TAP 1 Gen Bölgesine Ait Jel Elektroferez Görüntüsü

3. 2. 1. DNA Dizileme Analizi

Tavukların TAP 1 gen bölgelerine ait DNA dizileme analizi sonuçları Blast programında karşılaştırılmış ve Bio Edit Programı kullanılarak tüm dizilimler hizalanmıştır. Analizler sonucu Denizli’de 15, Gerze’de 7, kahverengi yumurtacıda 8, beyaz yumurtacıda 8 ve broilerde 10 polimorfik bölge tespit edilmiştir (Tablo 3.1.).



Şekil 3. 3. TAP 1’e ait DNA dizi analizi görüntüsü

Tablo 3. 1. 85 tavuk örneğine ait TAP 1 bölgesi üzerinde bulunan 15 SNP pozisyonu

Pozisyon														Kahve Y.	Broiler	Beyaz Y.	Gerze	Denizli	Toplam		
6	8	9	1	1	1	1	1	1	2	2	2	3	3							3	
8	9	6	1	1	1	3	4	9	1	5	7	6	6	7							
			1	3	6	6	6	7	0	0	4	7	8	2							
G	C	C	A	A	G	G	T	C	G	C	A	C	C	G	1						1
.	T	.	.			1				1
.	C			2				2
.	C	T	.	1		1	1			3
.	C	T	.	.			1				1
.	C	T	.	.	.	T	.	.		1					1
.	.	.	G	G	.	T	.		3					3
.	.	.	G	.	.	.	C	T	.		1					1
.	.	.	G	.	.	.	C	.	.	.	G	T	.	.			1		1		2
.	.	.	G	.	.	.	C	.	.	.	G	T	.	A	1						1
.	.	.	G	.	.	.	C	.	.	T	G	T	.	A	1						1
.	.	.	G	.	.	.	C	T	.	.	G	T	.	.			1				1
.	.	.	G	.	T	T	.			1				1
.	.	T	G	.	.	.	C	.	.	.	G	T	.	.				1			1
.	.	T	G	.	.	A	C	.	.	.	G	T	.	.				1			1
.	T	T	C	T	.						1	1
.	T	T	G	.	.	.	C	.	.	.	G	T	.	.		1		1			2
.	T	T	G	.	.	A	C	.	.	.	G	T	.	.			1			1	2
.	T	T	G	.	.	A	C	.	.	.	G	T	.	A						1	1
.	T	T	G	.	T	.	C	.	.	T	G	T	.	A						1	1
R	G	.	T	A	1						1
R	C	T	A	1						1
R	.	.	G	.	.	.	C	T	.	A	1						1
R	T	T	G	.	.	.	C	T	.	.	G	T	.	.						2	2
R	T	T	G	.	.	A	C	.	.	.	G	T	.	.						1	1
R	T	T	G	.	.	A	C	.	A	.	G	T	.	.						1	1
R	T	T	G	.	.	A	C	T	.	.	G	T	.	.						3	3
A	T	.			1		1		2
A	C	T	.				3			3
A	C	T	.	.	1			2			3
A	.	.	G	G	.	.	.				3			3
A	.	.	G	G	.	T	.				6			6
A	.	.	G	G	T	.	.				9			9
A	.	.	G	G	T	T	.				1			1
A	.	.	G	T	.	.	G	.	T	.			1				1
A	.	.	G	.	.	.	C	T	.	.	1						1
A	.	.	G	.	.	.	C	.	.	.	G	T	.	.	1						1
A	.	.	G	.	.	.	C	T	.	.	G	T	.	.				2			2
A	.	.	G	.	T	.	C	T	.	T	G	T	.	A						1	1
A	.	.	G	G	.	.	C	T	A	.	G	T	.	.						7	7
A	.	.	G	G	.	.	C	T	A	.	G	T	.	A						1	1
A	.	T	G	.	.	.	C	.	.	.	G	T	.	.						1	1
A	T	T	G	.	.	.	C	.	.	.	G	T	.	.						1	1
A	T	T	G	.	.	.	C	T	.	.	G	T	.	.						1	1
A	T	T	G	G	.	.	C	T	.	.	G	T	.	.						2	2
A	T	T	G	G	.	.	C	T	A	.	G	T	.	.						1	1

R= A veya G

3. 2. 2. Genetik Uzaklık ve Kümeleme Analizi

TAP 1 bölgesi ele alınarak hesaplanan popülasyonların kendi içlerindeki genetik uzaklık değerleri Tablo 3.2’ de verilmiştir ve genetik uzaklık değerleri 0,0056 ile 0,0087 arasında değişmektedir. En düşük genetik uzaklık değeri 0,0056 ile Gerze ırkında, en yüksek ise 0,0087 ile Denizli ırkında bulunmuştur. İncelenen tüm popülasyonlar içindeki ortalama evrimsel farklılaşma katsayısı 0,0075 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, Gerze ırkının diğer ırklara oranla daha homojen yapıda olduğunu, dar bir bölgede yetiştirilmiş ve yakın akraba olabileceklerini düşündürmektedir. Genetik uzaklık değerinin Denizli ırkı içerisinde 0,0087 olarak tahmin edilmesi, bu ırkın diğerlerine oranla daha heterojen yapıda olduğunu ve popülasyon içerisinde yakın akraba olma olasılığının düşük olduğunu akla getirmektedir.

Tablo 3. 2. Popülasyon içi evrimsel farklılaşmanın tahmin edilmesi.

Popülasyon	n	D ± S.E.
Kahverengi Y.	10	0,0075 ± 0,0028
Broiler	10	0,0081 ± 0,0028
Beyaz Y.	10	0,0076 ± 0,0028
Gerze	28	0,0056 ± 0,0023
Denizli	27	0,0087 ± 0,0028
Populasyonlar içindeki ortalama farklılaşma	85	0,0075 ± 0,0022

TAP 1 gen bölgesi için popülasyonlar arasındaki genetik uzaklık değerleri Tablo 3.3’ de verilmiştir. Genetik uzaklık değerleri en düşük Gerze ve broilerler arasında ($0,0069 \pm 0,0025$), en yüksek ise Denizli ile broilerler arasında ($0,0137 \pm 0,0039$) tahmin edilmiştir. Bu sonuçlar, broilerlerin Gerze ırkına daha yakın, Denizli ırkına ise çok uzak olduklarını göstermektedir. Gerze’ nin genetik bakımdan en uzak olduğu grup Denizli olarak ($0,0127 \pm 0,0038$) tahmin edilirken, Denizli’ nin genetik bakımdan en yakın olduğu popülasyon beyaz yumurtacılar ($0,0112 \pm 0,0034$) olarak hesaplanmıştır.

Popülasyonlar arası ortalama uzaklık değeri $0,0099 \pm 0,0027$ olarak bulunmuştur (Tablo 3.3.).

Tablo 3. 3. Popülasyonlar arasındaki farklılaşmanın tahmin edilmesi.

Popülasyon	Kahverengi Y.	Broiler	Beyaz Y.	Gerze	Denizli
Kahverengi Y.		0,0031	0,0027	0,0029	0,0039
Broiler	0,0092		0,0032	0,0025	0,0039
Beyaz Y.	0,0082	0,0097		0,0029	0,0034
Gerze	0,0078	0,0069	0,0082		0,0038
Denizli	0,0135	0,0137	0,0112	0,0127	
Popülasyonlar arası Ortalama Farklılaşma				0,0099 \pm 0,0027	

Tüm popülasyonlar üzerinden hesaplanan evrimsel farklılaşma kat sayısı $0,2422 \pm 0,0562$ olarak tahmin edilmiştir .

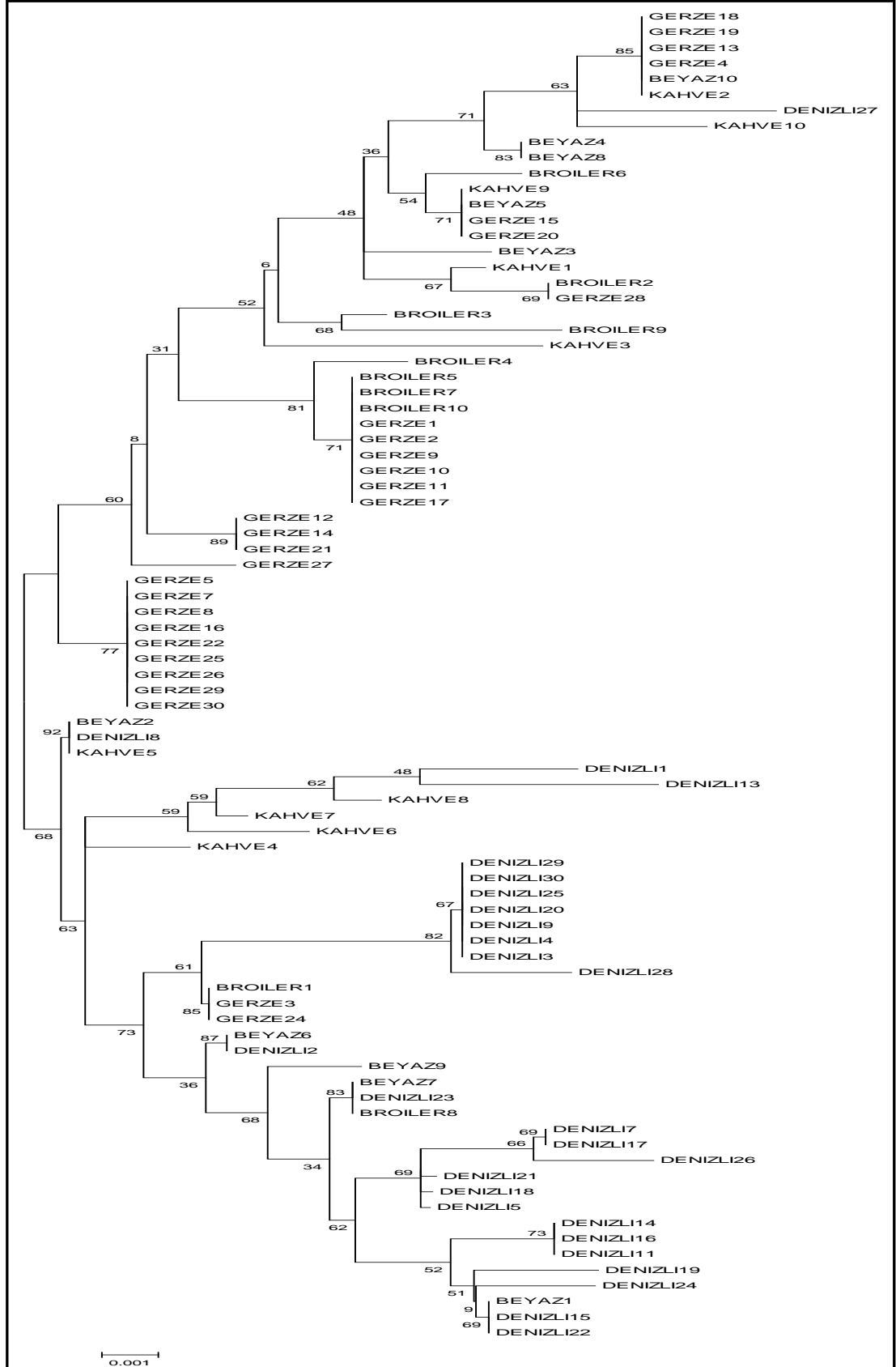
Genetik uzaklık değerleri yardımıyla Neighbor-Joining ağaç yöntemi kullanılarak çizilen Interior-Branch Test (Saitou & Nei, 1987; Rzhetsky & Nei, 1992; Dopazo, 1994; Tamura, 2004; 2007) ve Bootstrap Test (Felsenstein, 1985; Saitou & Nei, 1987; Tamura, 2004; 2007) sonuçları sırasıyla Şekil 3.4 ve Şekil 3.5’ de verilmiştir. Bu filogenik ağaçlarda iki büyük küme görülmektedir ve çoğunlukla bu büyük kümelerden birini Gerze ırkı ve broilerler, diğer büyük kümeyi ise Denizli ırkı ve yumurtacı tavuklar oluşturmaktadır.

3. 2. 3. Tajima Test İstatistikleri

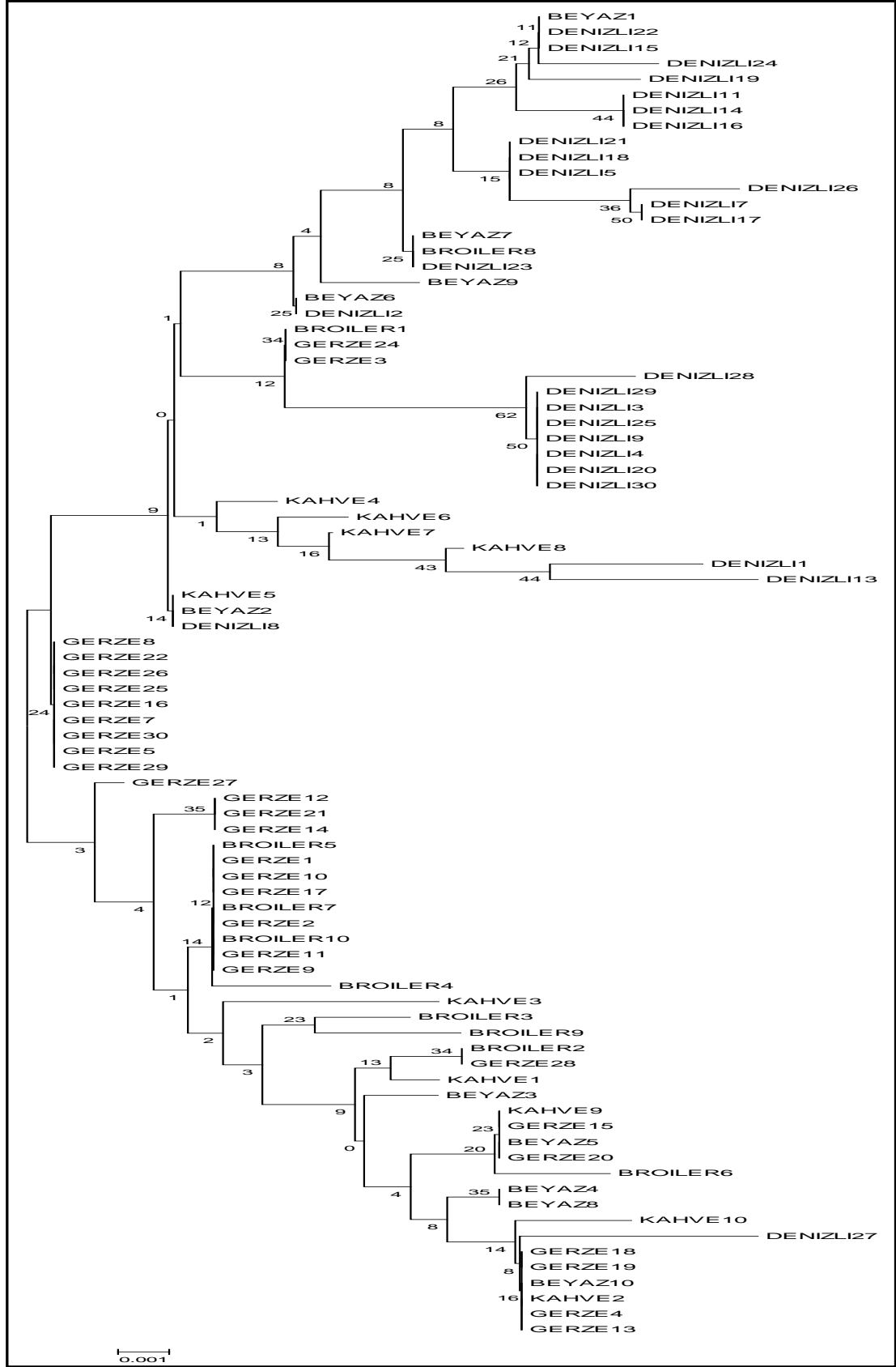
İncelenen 85 adet tavuk üzerinden TAP 1 gen bölgesine göre hesaplanan Tajima Test İstatistikleri Tablo 3. 4’ de verilmiştir.

Tablo 3. 4. İncelenen tavuk ırklarındaki TAP 1 gen bölgesine göre hesaplanan Tajima Nötrali Test sonuçları (Tajima, 1989; Nei & Kumar, 2000; Tamura, 2007).

n	S	p_s	Θ	π	D
85	14	0,0326	0,0065	0,0097	1,3913



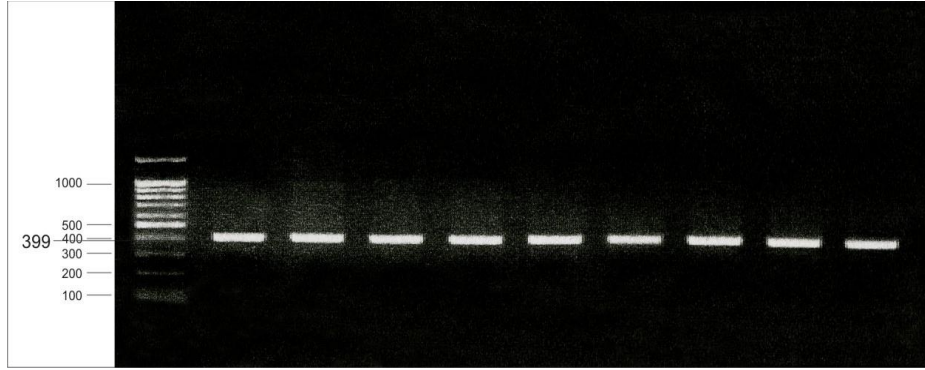
Şekil 3. 4. Tavuk popülasyonları arasındaki TAP 1 gen bölgesine göre çizilen Conducting Interior-Branch Test filogenik ağacı.



Şekil 3. 5. Tavuk popülasyonları arasındaki TAP 1 gen bölgesine göre çizilen Conducting Bootstrap Test filogenik ağacı.

3. 3. TAP 2 Gen Bölgesi

TAP 2 geninin, ekzon 4 ile ekzon 6 (Genbank, AL023516.3) arasındaki bölge çoğaltılmış ve 399 bp uzunluğunda bir bant elde edilmiştir (Şekil 3. 6.).



Şekil 3. 6. TAP 2 Gen Bölgesine Ait Jel Elektrofrez Görüntüsü

3. 3. 1. DNA Dizileme Analizi

Araştırma materyalini oluşturan tavukların TAP 2 gen bölgelerine ait DNA dizileme analizi sonuçları Bio Edit Programı yardımıyla tüm dizilimler hizalanmıştır. Analizler sonunda Denizli’de 16, Gerze’de 14, kahverengi yumurtacıda 5, beyaz yumurtacıda 9 ve broilerde 13 polimorfik bölge tespit edilmiştir (Tablo 3. 5.).

3. 3. 2. Genetik Uzaklık ve Kümeleme Analizi

TAP 2 bölgesi ele alınarak hesaplanan popülasyonların kendi içlerindeki genetik uzaklık değerleri Tablo 3.6’ de verilmiştir En düşük genetik uzaklık değeri 0,0048 ile kahverengi yumurtacılar, en yüksek ise 0,0175 ile Denizle ırkında bulunmuştur. İncelenen tüm popülasyonlar içindeki ortalama evrimsel farklılaşma katsayısı 0,0125 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, kahverengi yumurtacıların TAP 2 gen bölgesi bakımından diğer ırklara oranla daha homojen yapıda olduğunu ve yakın akraba olabileceklerini göstermektedir. Denizli ırkın ise diğerlerine oranla daha heterojen yapıda olduğunu ve popülasyon içerisindeki örneklerin yakın akraba olma olasılığının düşük olduğunu göstermektedir.

Tablo 3. 5. 87 tavuk örneğine ait TAP 2 bölgesi üzerinde bulunan 18 SNP pozisyonu

Pozisyon																		Kalve Y.	Broiler	Beyaz Y.	Gerze	Denizli	Toplam
7	8	9	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3						
0	9	8	1	3	3	4	5	8	8	0	1	4	6	6	7	0	3						
			7	1	4	3	7	0	8	6	2	8	1	7	1	0	6						
G	C	A	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	C	C	G	T	C	1					1
.	G						1
.	A	.	.	A	.	G					1	1
.	A						1
.	A	.	.	.	A						4
.	A	.	.	.	A						1
.	A	.	.	.	A	.	G						1
.	A	.	.	.	A	.	G	.	.	.	G						1
.	A	.	.	.	A	.	G						1
.	A	.	.	.	A	A	.	G	.	T	C	.						1
.	A	.	.	A	C	.	A	.	G	.	.	.	G						1
.	A	.	A						1
.	A	.	.	.	C	A	.	.	G						1
.	A	.	.	A	C	.	A	.	G	.	.	.	G						5
.	A	.	.	A	C	A	A	.	G	.	.	.	G						3
.	A	A	A	.	G						1
.	A	A	.	.	.	A	A	.	G	.	T	.	.						1
.	A	A	.	A	G						1
.	A	A	.	A	.	A	A	.	G						1
.	.	.	A	.	.	A	.	.	.	A	A	.	G	.	.	C	.						1
.	.	.	A	A	.	A	G	T	T	C	.						1
.	.	.	A	A	.	A	.	.	.	A	A	.	G	.	T	C	.						1
.	.	G	.	.	.	A	A	A	.	G	.	.	C	.					1
.	.	G	.	.	.	A	A	.	G	.	.	G						1
.	.	G	.	.	.	A	A	.	G	.	.	C	.					1
.	T	A	G						1
.	T	A	.	.	.	A	.	.	G	T	T	.	.						2
.	T	A	.	.	.	A	A	.	G	.	T	C	.						1
.	T	.	.	.	A	.	.	A	G						1
.	T	.	.	.	A	A	.	A	.	A	.	.	G						1
.	T	.	.	.	A	A	.	A	G						1
.	T	.	.	.	A	A	G						3
.	T	.	A	A	.	A	G	.	T	C	.						1
.	T	G	A	G						2
.	T	G	A	G	.	.	C	.						1
.	T	G	.	.	.	A	G						1
.	T	G	.	.	.	A	G	T	.	.	G						1
.	T	G	.	.	.	A	A	.	G	.	T	C	.						1
.	T	G	.	A	.	A	G						1
.	T	G	.	A	.	A	.	.	.	A	.	.	G						5
.	T	G	A	A	.	A	G	T	T	.	.						1
.	T	G	A	A	.	A	G	T	T	C	.						5
.	T	G	A	A	.	A	.	.	.	A	.	.	G	.	T	.	.						1
.	T	G	A	A	.	A	.	.	.	A	.	.	G	T	T	C	.						3
C	A	.	.	.	A	.	G	.	.	C	.						4
C	T	G	A	A	.	A	A	.	.	.	A	.	G	.	T	C	.						1

Tablo 3. 6. Popülasyon içi evrimsel farklılaşmanın tahmin edilmesi.

Popülasyon	n	D ± S.E.
Kahverengi Y.	10	0,0048 ± 0,0023
Broiler	10	0,0139 ± 0,0041
Beyaz Y.	10	0,0113 ± 0,0043
Gerze	28	0,0149 ± 0,0045
Denizli	29	0,0175 ± 0,0049
Popülasyonlar içindeki ortalama farklılaşma	87	0,0125 ± 0,0031

TAP 2 gen bölgesi için popülasyonlar arasındaki genetik uzaklık değerleri Tablo 3. 7’ de verilmiştir. Genetik uzaklık değerleri en düşük kahverengi yumurtacı ve broiler popülasyonları arasında ($0,0132 \pm 0,0039$), en yüksek ise Denizli ile beyaz yumurtacı popülasyonları arasında ($0,0248 \pm 0,0062$) tahmin edilmiştir. Gerze’ nin genetik bakımdan en yakın popülasyon broiler ($0,0160 \pm 0,0046$), en uzak popülasyon ise Denizli ($0,0220 \pm 0,0056$) olarak tahmin edilmiştir. Gerze ırkı için bu sonuçlar TAP 1 ile benzerlik göstermektedir. Denizli ırkının genetik bakımdan en yakın olduğu popülasyonlar broiler ($0,0203 \pm 0,0051$) ve kahverengi yumurtacı populusyon ($0,0204 \pm 0,0055$) olarak hesaplanmıştır. Popülasyonlar arası ortalama uzaklık değeri $0,0188 \pm 0,0046$ bulunmuştur (Tablo 3.7.). Tüm popülasyonlar üzerinden hesaplanan evrimsel farklılaşma kat sayısı $0,3361 \pm 0,0343$ olarak tahmin edilmiştir .

Tablo 3. 7. Popülasyonlar arasındaki evrimsel farklılaşmanın tahmin edilmesi. (Dik üçgen evrimsel farklılaşma, ters dik üçgen standart hata)

Popülasyon	Kahverengi Y.	Broiler	Beyaz Y.	Gerze	Denizli
Kahverengi Y.		0,0039	0,0049	0,0052	0,0055
Broiler	0,0132		0,0050	0,0046	0,0051
Beyaz Y.	0,0146	0,0182		0,0053	0,0062
Gerze	0,0176	0,0160	0,0190		0,0056
Denizli	0,0204	0,0203	0,0248	0,0220	
Popülasyonlar arası Ortalama Farklılaşma				0,0188 ± 0,0046	

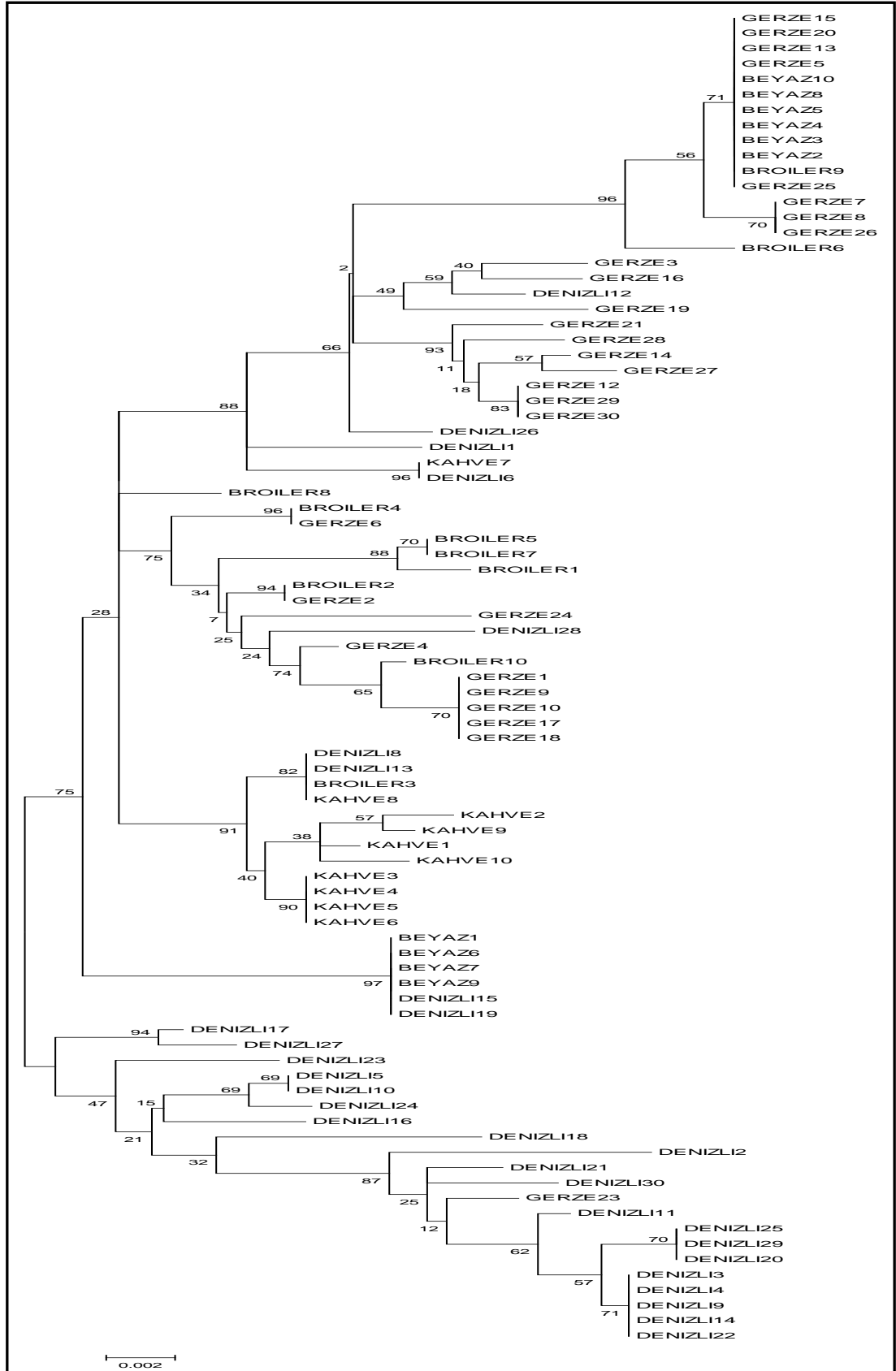
Genetik uzaklık değerleri yardımıyla Neighbor-Joining ağaç yöntemi kullanılarak çizilen Interior-Branch Test (Saitou & Nei, 1987; Rzhetsky & Nei, 1992; Dopazo, 1994; Tamura, 2004; 2007) ve Bootstrap Test (Felsenstein, 1985; Saitou & Nei, 1987; Tamura, 2004; 2007) sonuçları sırasıyla Şekil 3.7 ve Şekil 3.8’ de verilmiştir. Bu filogenik ağaçlarda iki büyük küme görölmektedir ve çoğunlukla bu büyük kümelerden birini Gerze ırkı ve broilerler, diğer büyük kümeyi ise Denizli ırkı ve yumurtacı tavuklar oluşturmuştur. Ancak, Denizli ırkından 5 örnek birinci kümede yer aldığı görölmektedir.

3. 3. 3. Tajima Test İstatistikleri

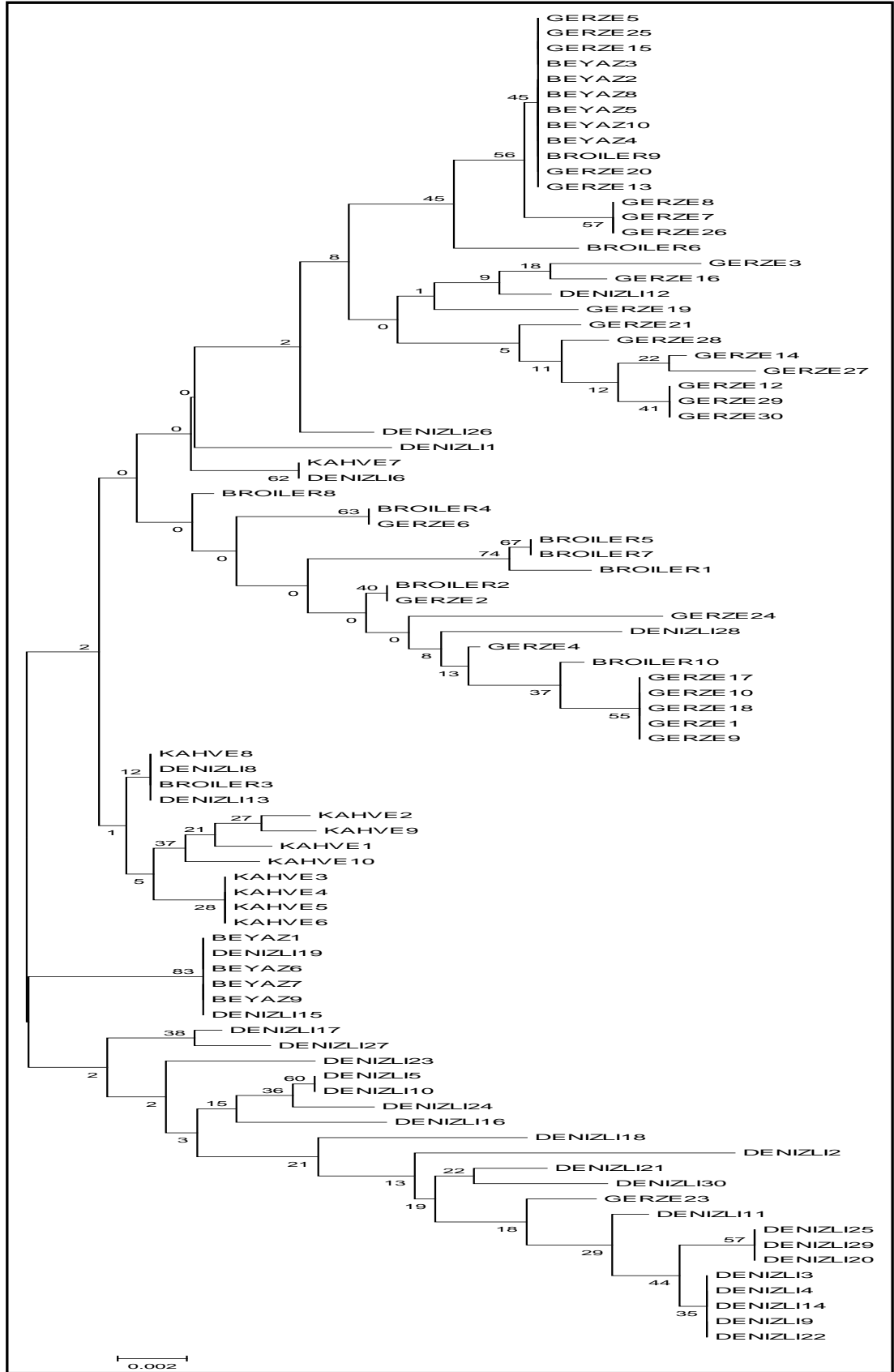
İncelenen 87 adet tavuk üzerinden TAP 2 gen bölgesine göre hesaplanan Tajima test istatistikleri Tablo 3. 8’ de verilmiştir.

Tablo 3. 8. İncelenen tavuk ırklarındaki TAP 2 gen bölgesine göre hesaplanan Tajima Nötrali Test sonuçları (Tajima, 1989; Nei & Kumar, 2000; Tamura, 2007).

n	S	p_s	Θ	π	D
87	18	0,0533	0,0106	0,0183	2,1317



Şekil 3. 7. Tavuk popülasyonları arasındaki TAP 2 gen bölgesine göre çizilen Conducting Interior-Branch Test filogenik ağacı.



Şekil 3. 8. Tavuk popülasyonları arasındaki TAP 2 gen bölgesine göre çizilen Conducting Bootstrap Test filogenik ağacı.

3. 4. TAP 1 ve TAP 2 Gen Bölgeleri

Popülasyonların kendi içlerindeki en düşük genetik uzaklık değeri 0,0063 ile kahverengi yumurtacılarda, en yüksek ise 0,0123 ile Denizle ırkında hesaplanmıştır (Tablo 3. 9.). İncelenen tüm popülasyonlar içindeki ortalama evrimsel farklılaşma katsayısı 0,0096 olarak tahmin edilmiştir. Bu sonuçlar, kahverengi yumurtacıların diğer ırklara oranla daha homojen yapıda olduğunu ve yakın akraba olabileceklerini, Denizli ırkın ise daha heterojen yapıda olduğunu göstermektedir.

Tablo 3. 9. TAP 1 ve TAP 2 gen bölgeleri birlikte ele alınarak popülasyon içi evrimsel farklılaşmanın tahmin edilmesi.

Popülasyon	n	D ± S.E.
Kahverengi Y.	10	0,0063 ± 0,0018
Broiler	10	0,0106 ± 0,0022
Beyaz Y.	10	0,0092 ± 0,0023
Gerze	26	0,0095 ± 0,0023
Denizli	26	0,0123 ± 0,0025
Popülasyonlar içindeki ortalama farklılaşma	82	0,0096 ± 0,0017

TAP 1 + TAP 2 gen bölgesi bakımından popülasyonlar arası genetik uzaklık değerleri en düşük Gerze ve broiler popülasyonları arasında ($0,0108 \pm 0,0023$), en yüksek ise Denizli ile beyaz yumurtacı popülasyonları arasında ($0,0175 \pm 0,0033$) tahmin edilmiştir (Tablo 3. 10.). Gerze' nin genetik bakımdan en yakın popülasyon broiler ($0,0108 \pm 0,0023$), en uzak popülasyon ise Denizli ($0,0171 \pm 0,0032$) olarak tahmin edilmiştir. Denizli ırkının genetik bakımdan en yakın olduğu popülasyonlar broiler ($0,0167 \pm 0,0030$) ve kahverengi yumurtacı popülasyon ($0,0167 \pm 0,0031$) olarak hesaplanmıştır. Popülasyonlar arası ortalama uzaklık değeri $0,0138 \pm 0,0025$ bulunmuştur (Tablo 3. 10.). Tüm popülasyonlar üzerinden hesaplanan evrimsel farklılaşma kat sayısı $0,3055 \pm 0,0309$ olarak tahmin edilmiştir .

Tablo 3. 10. TAP 1 ve TAP 2 gen bölgelerine göre popülasyonlar arasındaki evrimsel farklılaşmanın tahmin edilmesi (Dik üçgen evrimsel farklılaşma, ters dik üçgen standart hata).

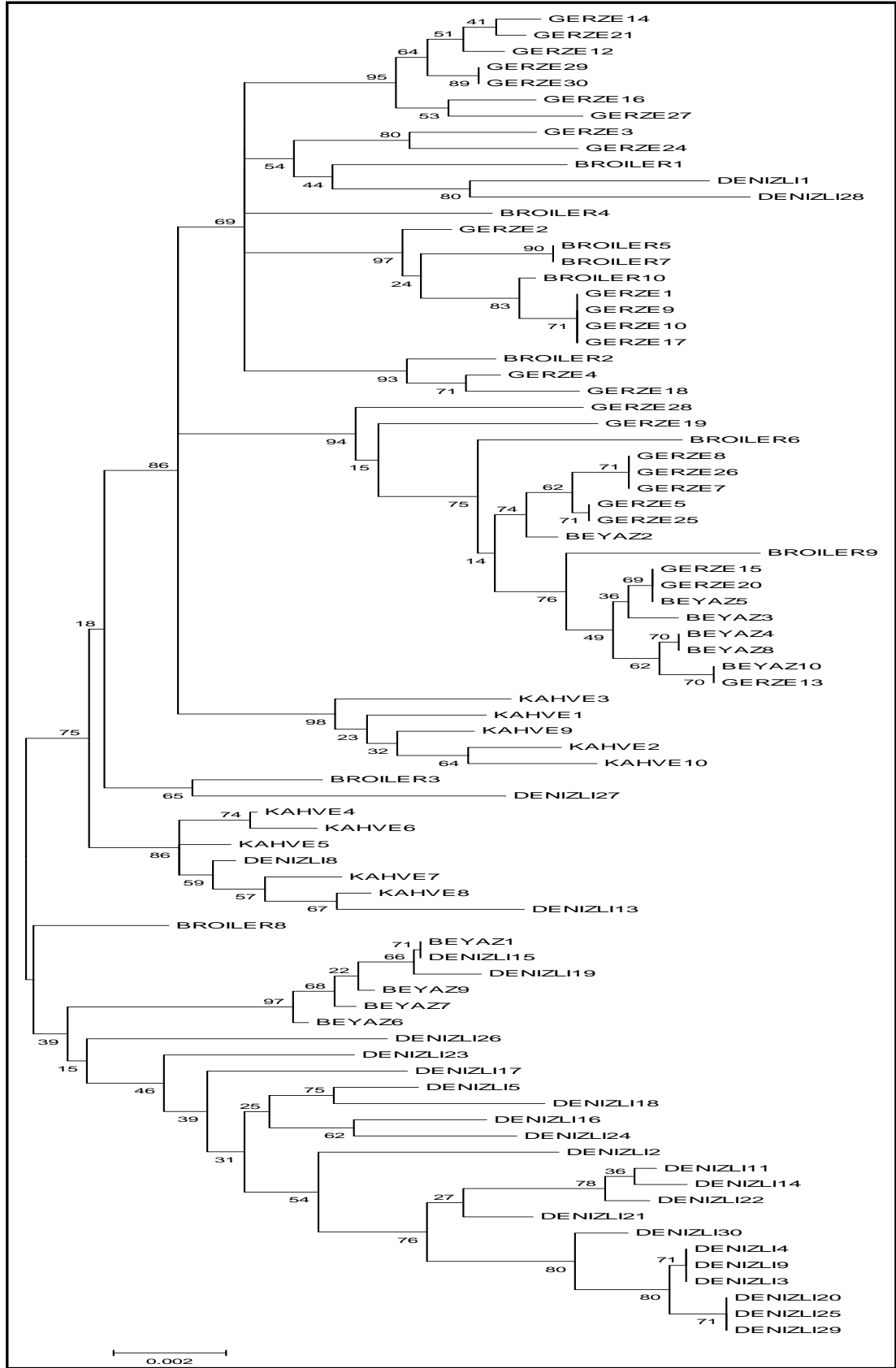
Popülasyon	Kahverengi Y.	Broiler	Beyaz Y.	Gerze	Denizli
Kahverengi Y.		0,0023	0,0024	0,0026	0,0031
Broiler	0,0109		0,0027	0,0023	0,0030
Beyaz Y.	0,0109	0,0133		0,0026	0,0033
Gerze	0,0120	0,0108	0,0125		0,0032
Denizli	0,0167	0,0167	0,0175	0,0171	
Popülasyonlar arası Ortalama Farklılaşma				0,0138 ± 0,0025	

Genetik uzaklık değerleri yardımıyla Neighbor-Joining ağaç yöntemi kullanılarak çizilen Interior-Branch Test (Saitou & Nei, 1987; Rzhetsky & Nei, 1992; Dopazo, 1994; Tamura, 2004; 2007) ve Bootstrap Test (Felsenstein, 1985; Saitou & Nei, 1987; Tamura, 2004; 2007) sonuçları sırasıyla Şekil 3. 9 ve Şekil 3. 10' da verilmiştir. Bu filogenik ağaçlarda iki büyük küme görülmektedir ve çoğunlukla bu büyük kümelerden birini Gerze, broiler ve kahverengi yumurtacılar oluşturmaktadır. Bu küme iki kümeye ayrılmakta ve bu kümelerden birinde Gerze ve broilerler, diğerinde ise kahverengi yumurtacılar bulunmaktadır. Diğer büyük kümeyi ise Denizli ırkı ve beyaz yumurtacı tavuklar oluşturmuştur.

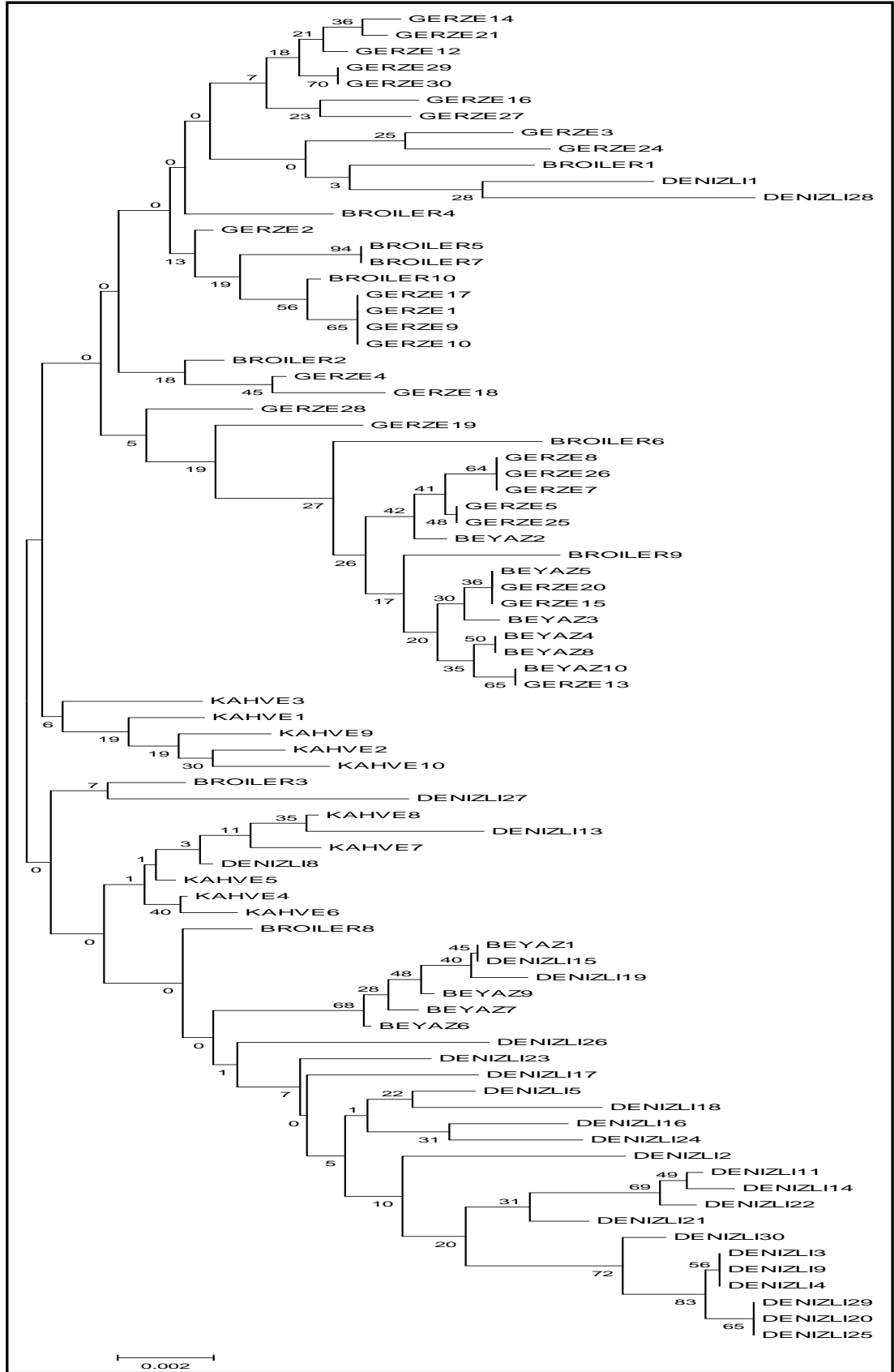
İncelenen 82 adet tavuk üzerinden TAP 1 ve TAP 2 gen bölgeleri birlikte ele alınarak hesaplanan Tajima test istatistikleri Tablo 3. 11' de verilmiştir.

Tablo 3. 11. İncelenen tavuk ırklarında TAP 1 ve TAP 2 gen bölgeleri birlikte ele alınarak hesaplanan Tajima Nötralite Test sonuçları (Tajima, 1989; Nei & Kumar, 2000; Tamura, 2007).

n	S	p _s	Θ	π	D
82	32	0,0417	0,0084	0,0136	1,9558



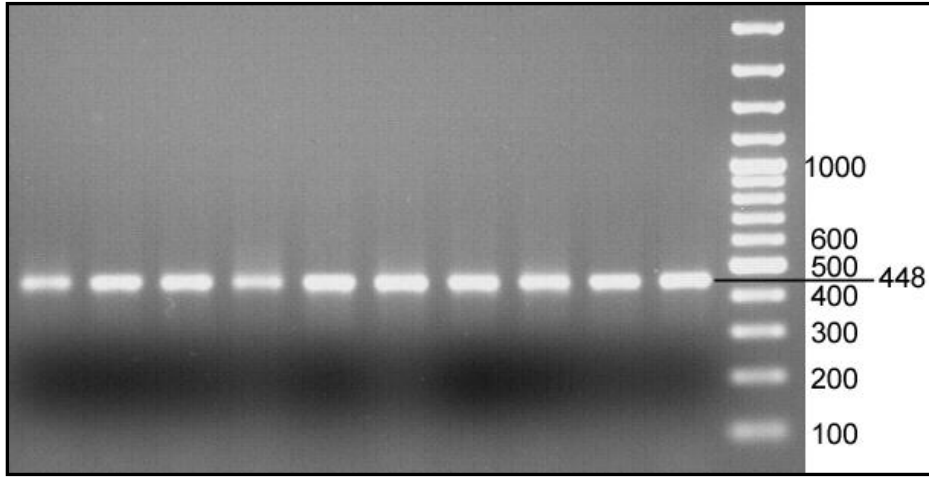
Şekil 3. 9. Tavuk popülasyonları arasındaki TAP 1 ve TAP 2 gen bölgelerine göre çizilen Conducting Interior-Branch Test filogenik ağacı.



Şekil 3. 10. Tavuk popülasyonları arasındaki TAP 1 ve TAP 2 gen bölgelerine göre çizilen Conducting Bootstrap Test filogenik ağacı.

3. 5. Tapasin Gen Bölgesi

Bu primerler Tapasin geninin ekzon 5 ile ekzon 6 (Genbank, AL023516 - AJ004999) arasındaki 448 bp uzunluğundaki bir bölgeyi çoğaltmak için kullanılmıştır (Şekil 3. 11.). PCR sonrası yapılan DNA dizileme analizi sonunda Tapasin gen bölgesine ait piklerde çakışmalar gözlenmiştir. Bu nedenle, tekrar kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılmış, PCR’ da çoğaltılmış ve DNA dizileme analizleri yapılmıştır. Ancak, tekrarlanan analizlerde de sağlıklı sonuçlar alınamaması nedeniyle bu gen bölgesine ait istatistik analizlere çalışmada yer verilmemiştir.



Şekil 3. 11. Tapasin Gen Bölgesine Ait Jel Elektroforez Görüntüsü

4. TARTIŞMA

MHC bölgesindeki polimorfizm ile omurgalılarıdaki immun tepki arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Sironi, 2006a). Tavuk MHC' sinin oldukça basit (Burri, 2010), memeli homologlarına göre daha küçük ve düşük rekombinasyon sıklığı ile karakterizedir (Kaufman ve ark., 1999a, 1999b). MHC sistemi ile yapılan çalışmalarda farklı gen bölgeleri kullanılmıştır. Bu araştırmada, TAP 1 gen bölgesi için 6. ekzondan 7.ekzona, TAP 2 gen bölgesi için 4. ekzondan 6.ekzona ve Tapasin gen bölgesi için ise 5. ekzondan 6.ekzona kadar olan bölge incelenmiştir. İncelenen tüm ırklarda TAP 1 431 bp, TAP 2 399 bp ve Tapasin 448 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiştir. TAP 1, TAP 2 ve Tapasin gen bölgeleri için elde edilen baz uzunlukları yapılan çalışmalarla (Sironi, 2006a; 2006b; 2008) uyumluluk göstermektedir. Ancak, Tapasin gen bölgesinin dizileme analizlerinde baz dizilimlerinde kesin sonuçlar elde edilememiştir. Bu ya elde edilen DNA'lardaki bir kontaminasyondan veya heterozigot bireylerde DNA dizilimlerinin okunamamasından kaynaklanmaktadır. Kontaminasyon olabileceği düşünülerek tekrar DNA izolasyonu ve dizileme analizleri yaptırılmıştır. Fakat problem çözülememiş ve bu nedenle Tapasin gen bölgesi ile tartışma yapılamamıştır.

Tavuklarda 431 bp uzunluğunda olan TAP 1 bölgesi, hindi ve bildircin' da daha kısa olduğu ve hindide 206 bp uzunluğunda olduğu bildirilmiştir (Sironi; 2008). Bu uzunluk farklılığının nedeni tavuk TAP 1 gen bölgesindeki 225 baz çiftinden kaynaklandığı ve bunun Hindide 111 ve 112. nükleotitlere karşılık gelen bölgede olduğu ifade edilmiştir (Sironi, 2006b).

Tavuklarda 399 bp uzunluğunda olan TAP 2 bölgesi, sülünde 399, hindide 404 ve beç tavuğunda (Guinea fowl) 437 bp uzunluğundadır (Sironi, 2006b; 2008). Tavuk ve Hindi TAP 2 gen bölgesi uzunluk farklılığının nedeni (399 bp ve 404 bp), Hindide 5 Ekstra nükleotit bulunması (Hindi'de 344-348. nükleotit) ve bölgenin tavuktaki 343 ve 344 nükleotitlere karşı gelen bölgede lokalize olduğu ifade edilmiştir (Sironi, 2006b).

İnsanların TAP 2 de bulunan 11 ekzon ile karşılaştırıldığında, tavuk TAP 2' sinin yalnızca 9 ekzona sahip olduğu, bu farklılığın ekzonların birleşmesiyle sonuçlanan 2 intronun delesyonundan kaynaklandığı bildirilmektedir. TAP 2 için bu ekzon yapısının, aynı zamanda diğer bıldırcın ve ördek gibi kuş türlerinde de bulunduğu tahmin edilmektedir (Walker, 2005).

Yapılan çalışmalar tavukların TAP 1 ve TAP 2 gen bölgelerinde yüksek polimorfizm bulunduğunu göstermektedir (Walker, 2005; Sironi, 2006b; Sironi, 2008). Bu araştırmada TAP 1 ve TAP 2 gen bölgelerindeki ortalama nükleotid çeşitliliği karşılaştırıldığında yumurtacı tavukların broilerlere oranla daha düşük nükleotid polimorfizm gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar Sironi ve ark. (2006a) yapmış oldukları çalışma ile benzerlik göstermektedir. Yumurtacıların broilerlere göre da daha düşük polimorfizm göstermesi yumurtacı tavuklar arasındaki kan yakınlığının daha fazla olduğunu veya bu gen bölgesi bakımından sıkı bir seleksiyon uygulandığını akıla getirmektedir.

İncelenen tavuk ırklarında TAP 1 gen bölgesindeki polimorfik bölgelerin 68, 89, 96, 111, 113, 116, 136, 146, 197, 210, 250, 274, 367, 368, 372. nükleotidlerde (Tablo 3. 1.), TAP 2 gen bölgesindeki polimorfik bölgelerin ise 70, 89, 98, 117, 131, 134, 143, 157, 180, 188, 206, 212, 248, 261, 267, 271, 300, 336. nükleotidlerde (Tablo 3. 5.) olduğu bulunmuştur. TAP 1 gen bölgesinde Denizli'de 15, Gerze'de 7, kahverengi yumurtacılar da 8, beyaz yumurtacılar da 8 ve broilerlerde 10; TAP 2 bölgesinde ise Denizli'de 16, Gerze'de 14, kahverengi yumurtacılar da 5, beyaz yumurtacılar da 9 ve broilerlerde 13 polimorfik bölge belirlenmiştir. Bu değerler Sironi ve ark. (2006b) tarafından bildirilen değerden düşük bulunmuştur. Bu farklılık Sironi ve ark. (2006b) bazı baz çiftlerini kesin olarak belirleyememelerinden ve bunları polimorfik olarak kabul etmelerinden kaynaklanmaktadır.

Hosomichi ve ark. (2008) yapmış oldukları bir çalışmada TAP 1 ve TAP 2 bölgelerine ait tek nükleotid polimorfizm yüzdelerini sırasıyla 4,39 ve 4,42 olarak bildirilmiştir. Bu araştırmada ise TAP 1 ve TAP 2 bölgelerine ait tek nükleotid polimorfizm yüzdeleri sırasıyla 3,48 ve 4,51 olarak bulunmuştur. Bu farklılık

Hosomichi ve ark. (2008) çalışmalarında seçilen bölgenin TAP 1 (4848 bp) ve TAP 2 (3121 bp) gen bölgeleri için daha uzun bir baz dizilimine sahip olmasından kaynaklanmaktadır.

Singh (2010) ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada MHC Sınıf I bölgesi ele alınarak tavuk, Guinea fowl (beç tavuğu), bildircin, ördek ve kaz türleri arasındaki genetik uzaklıklar hesaplanmış ve çalışma sonucunda tavukların popülasyon içi uzaklığının 0,092 olduğunu; tavuk ile beç tavuğu, bildircin, ördek ve kaz arasındaki genetik uzaklığın sırasıyla 0,325, 0,307, 0,534 ve 0,509 olduğu bildirilmiştir (Singh; 2010a).

Bu araştırmada incelenen tüm gruplar arasında, popülasyon içi genetik uzaklık değeri en yüksek TAP 1 bölgesi için 0,0087, TAP 2 bölgesi için 0,0175, TAP 1 ve TAP 2 bölgelerinin birleşimi ele alınarak TAP 1 + TAP 2 bölgesi için 0,0123 ile Denizli ırkında bulunmuştur. Popülasyon içi en düşük genetik uzaklık değeri TAP 1 bölgesi için 0,0056 ile Gerze ırkında, TAP 2 ve TAP 1 + TAP 2 gen bölgeleri için 0,0048 ve 0,0063 ile kahverengi yumurtacılarda bulunmuştur. Bu sonuçlar Kaya ve Yıldız'ın (2008) bildirdiği sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Kaya ve Yıldız (2008) yaptıkları çalışmada, Denizli türündeki genetik farklılığın Gerze türündeki genetik farklılıktan daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmada Denizli ve Gerze ırklarının kendi alt popülasyonları arasındaki genetik mesafeler küçükken, Denizli ve Gerze ırkları arasındaki genetik mesafenin, kendi alt popülasyonları arasındaki uzaklıktan daha fazla olduğu bildirilmiştir (Kaya ve Yıldız; 2008).

Bu sonuçlar, TAP 1 gen bölgesi bakımından Gerze ırkının, TAP 2, TAP 1 + TAP 2 gen bölgeleri bakımından kahverengi yumurtacıların diğer ırklara oranla daha homojen yapıda olduğunu, dar bir bölgede yetiştirilmiş ve yakın akraba olabileceklerini, TAP 1, TAP 2, TAP 1 + TAP 2 gen bölgeleri bakımından Denizli ırkının ise diğerlerine oranla daha heterojen yapıda olduğunu ve popülasyon

içerisindeki örneklerin yakın akraba olma olasılığının düşük olduğunu düşündürmektedir.

TAP 1 gen bölgesi bakımından popülasyonlar arası genetik uzaklık değerleri (Tablo 3.3.) en düşük Gerze ve broiler arasında ($0,0069 \pm 0,0025$), en yüksek ise Denizli ile broiler arasında ($0,0137 \pm 0,0039$) tahmin edilmiştir. Bu sonuçlar, broilerlerin Gerze ırkına daha yakın, Denizli ırkına ise çok uzak olduklarını göstermektedir. Gerze' nin genetik bakımdan en uzak olduğu grup Denizli olarak ($0,0127 \pm 0,0038$) tahmin edilirken, Denizli' nin genetik bakımdan en yakın olduğu popülasyon beyaz yumurtacılar ($0,0112 \pm 0,0034$) olarak hesaplanmıştır. Popülasyonlar arası ortalama uzaklık değeri $0,0099 \pm 0,0027$ olarak bulunmuştur.

TAP 2 gen bölgesi bakımından popülasyonlar arası genetik uzaklık değerleri (Tablo 3.7.) en düşük kahverengi yumurtacı ve broiler popülasyonları arasında ($0,0132 \pm 0,0039$), en yüksek ise Denizli ile beyaz yumurtacı popülasyonları arasında ($0,0248 \pm 0,0062$) tahmin edilmiştir. Gerze' nin genetik bakımdan en yakın popülasyon broiler ($0,0160 \pm 0,0046$), en uzak popülasyon ise Denizli ($0,0220 \pm 0,0056$) olarak tahmin edilmiştir. Gerze ırkı için bu sonuçlar TAP 1 ile benzerlik göstermektedir. Denizli ırkının genetik bakımdan en yakın olduğu popülasyonlar broiler ($0,0203 \pm 0,0051$) ve kahverengi yumurtacı popülasyon ($0,0204 \pm 0,0055$) olarak hesaplanmıştır. Popülasyonlar arası ortalama uzaklık değeri $0,0188 \pm 0,0046$ bulunmuştur.

TAP 1 + TAP 2 gen bölgesi bakımından popülasyonlar arası genetik uzaklık değerleri (Tablo 3.10.) en düşük Gerze ve broiler popülasyonları arasında ($0,0108 \pm 0,0023$), en yüksek ise Denizli ile beyaz yumurtacı popülasyonları arasında ($0,0175 \pm 0,0033$) tahmin edilmiştir. Gerze' nin genetik bakımdan en yakın popülasyon broiler ($0,0108 \pm 0,0023$), en uzak popülasyon ise Denizli ($0,0171 \pm 0,0032$) olarak tahmin edilmiştir. Denizli ırkının genetik bakımdan en yakın olduğu popülasyonlar broiler ($0,0167 \pm 0,0030$) ve kahverengi yumurtacı popülasyon ($0,0167 \pm 0,0031$) olarak

hesaplanmıştır. Popülasyonlar arası ortalama uzaklık değeri $0,0138 \pm 0,0025$ bulunmuştur

Genetik uzaklık değerlerine ilişkin Phylogeny sonuçları Neighbor-Joining Tree yöntemi kullanılarak Interior-Branch Test ve Bootstrap Test sonuçlarında da Denizli ve Gerze ırklarının birbirlerinden çok farklı lokalize oldukları görülmektedir. Bu filogenik ağaçlarda iki büyük küme görülmektedir ve bu büyük kümelerden birini Gerze ırkı ve broilerler, diğer büyük kümeyi ise Denizli ırkı ve yumurtacı tavuklar oluşturmaktadır.

Gerze ve Denizli ırklarının genetik uzaklık değerleri ve filogenik ağaç sonuçlarına göre Gerze ırkı ile Denizli ırkı tavukların farklı ırklar olabileceği, bunlar arasındaki karışmanın çok az olabileceğini akla getirmektedir. Gerze ırkının broilerlere daha yakın olması, etçi tavuk ırklarının daha çok Asya kökenli olması nedeniyle Gerze ırkının Asya tavuk ırklarıyla akraba olabileceğini; Denizli ırkının yumurtacı tavuklara daha yakın bulunması, yumurtacıların daha çok Akdeniz kökenli olması nedeniyle Denizli ırkının Akdeniz tavuk ırklarıyla akraba olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuçta, burada sunulan sonuçlar, tavuk TAP genleri ve bu genlerin polimorfizm seviyeleri hakkında yapısal bilgileri sağlamaktadır (Sironi, 2008).

5. SONUÇLAR

Denizli, Gerze, Lohmann-LSL beyaz yumurtacı, Brown nick kahverengi yumurtacı ve broilerlerde TAP 1 ve TAP 2 genlerindeki nükleotid farklılıkların belirlenmesi, popülasyon içi ve popülasyonlar arası uzaklık değerlerinin hesaplanması, Tajima test istatistikleri ve filogenik ağaç metoduyla ırkların sınıflandırılması amacıyla yapılan bu araştırmadan elde edilen bulgulara dayanarak aşağıda belirtilen sonuçlara varılmıştır.

İncelenen tüm ırklarda TAP 1 431 bp, TAP 2 399 bp ve Tapasin 448 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiştir. Ancak, Tapasin gen bölgesinin dizileme analizlerinde baz dizilimlerinde kesin sonuçlar elde edilememiştir. Bu ya elde edilen DNA'lardaki bir kontaminasyondan veya heterozigot bireylerde DNA dizilimlerinin okunamamasından kaynaklanmaktadır.

Yapılan araştırmada tavukların TAP 1 ve TAP 2 gen bölgelerinin yüksek polimorfizm gösterdiği belirlenmiştir. Bu araştırmada TAP 1 ve TAP 2 gen bölgelerindeki ortalama nükleotid çeşitliliği karşılaştırıldığında yumurtacı tavukların broilerlere oranla daha düşük nükleotid polimorfizm gösterdiği belirlenmiştir.

İncelenen tavuk ırklarında TAP 1 gen bölgesindeki polimorfik bölgelerin 68, 89, 96, 111, 113, 116, 136, 146, 197, 210, 250, 274, 367, 368, 372. nükleotidlerde, TAP 2 gen bölgesindeki polimorfik bölgelerin ise 70, 89, 98, 117, 131, 134, 143, 157, 180, 188, 206, 212, 248, 261, 267, 271, 300, 336. nükleotidlerde olduğu bulunmuştur. TAP 1 gen bölgesinde Denizli'de 15, Gerze'de 7, kahverengi yumurtacılar da 8, beyaz yumurtacılar da 8 ve broilerlerde 10; TAP 2 bölgesinde ise Denizli'de 16, Gerze'de 14, kahverengi yumurtacılar da 5, beyaz yumurtacılar da 9 ve broilerlerde 13 polimorfik bölge belirlenmiştir.

Araştırmada TAP 1 ve TAP 2 bölgelerine ait tek nükleotid polimorfizm yüzdeleri sırasıyla 3,48 ve 4,51 olarak bulunmuştur.

Bu araştırmada incelenen tüm gruplar arasında, popülasyon içi genetik uzaklık değeri en yüksek TAP 1 bölgesi için 0,0087, TAP 2 bölgesi için 0,0175, TAP 1 ve TAP 2 bölgelerinin birleşimi ele alınarak TAP 1 + TAP 2 bölgesi için 0,0123 ile Denizli ırkında bulunmuştur. Popülasyon içi en düşük genetik uzaklık değeri TAP 1 bölgesi için 0,0056 ile Gerze ırkında, TAP 2 ve TAP 1 + TAP 2 gen bölgeleri için 0,0048 ve 0,0063 ile kahverengi yumurtacılar da bulunmuştur.

Bu sonuçlar, TAP 1 Gen bölgesi bakımından Gerze ırkının, TAP 2, TAP 1 + TAP 2 gen bölgeleri bakımından kahverengi yumurtacıların diğer ırklara oranla daha homojen yapıda olduğunu, dar bir bölgede yetiştirilmiş ve yakın akraba olabileceklerini, TAP 1, TAP 2, TAP 1 + TAP 2 gen bölgeleri bakımından Denizli ırkının ise diğerlerine oranla daha heterojen yapıda olduğunu ve popülasyon içerisindeki örneklerin yakın akraba olma olasılığının düşük olduğunu düşündürmektedir.

İncelenen tüm popülasyonlar içindeki ortalama evrimsel farklılaşma katsayısı TAP 1, TAP 2 ve TAP 1 + TAP 2 bölgeleri için sırasıyla 0,0075, 0,0125, 0,0096 olarak hesaplanmıştır.

TAP 1 gen bölgesi bakımından popülasyonlar arası genetik uzaklık değerleri en düşük Gerze ve broiler arasında ($0,0069 \pm 0,0025$), en yüksek ise Denizli ile broiler arasında ($0,0137 \pm 0,0039$) tahmin edilmiştir. Bu sonuçlar, broilerlerin Gerze ırkına daha yakın, Denizli ırkına ise çok uzak olduklarını göstermektedir. Gerze' nin genetik bakımdan en uzak olduğu grup Denizli olarak ($0,0127 \pm 0,0038$) tahmin edilirken, Denizli' nin genetik bakımdan en yakın olduğu popülasyon beyaz yumurtacılar ($0,0112 \pm 0,0034$) olarak hesaplanmıştır. Popülasyonlar arası ortalama uzaklık değeri $0,0099 \pm 0,0027$ olarak bulunmuştur.

TAP 2 gen bölgesi bakımından popülasyonlar arası genetik uzaklık değerleri en düşük kahverengi yumurtacı ve broiler popülasyonları arasında ($0,0132 \pm 0,0039$), en yüksek ise Denizli ile beyaz yumurtacı popülasyonları arasında ($0,0248 \pm 0,0062$) tahmin edilmiştir. Gerze' nin genetik bakımdan en yakın popülasyon broiler ($0,0160$)

$\pm 0,0046$), en uzak popülasyon ise Denizli ($0,0220 \pm 0,0056$) olarak tahmin edilmiştir. Gerze ırkı için bu sonuçlar TAP 1 ile benzerlik göstermektedir. Denizli ırkının genetik bakımdan en yakın olduğu popülasyonlar broiler ($0,0203 \pm 0,0051$) ve kahverengi yumurtacı popülasyon ($0,0204 \pm 0,0055$) olarak hesaplanmıştır. Popülasyonlar arası ortalama uzaklık değeri $0,0188 \pm 0,0046$ bulunmuştur.

TAP 1 + TAP 2 gen bölgesi bakımından popülasyonlar arası genetik uzaklık değerleri en düşük Gerze ve broiler popülasyonları arasında ($0,0108 \pm 0,0023$), en yüksek ise Denizli ile beyaz yumurtacı popülasyonları arasında ($0,0175 \pm 0,0033$) tahmin edilmiştir. Gerze' nin genetik bakımdan en yakın popülasyon broiler ($0,0108 \pm 0,0023$), en uzak popülasyon ise Denizli ($0,0171 \pm 0,0032$) olarak tahmin edilmiştir. Denizli ırkının genetik bakımdan en yakın olduğu popülasyonlar broiler ($0,0167 \pm 0,0030$) ve kahverengi yumurtacı popülasyon ($0,0167 \pm 0,0031$) olarak hesaplanmıştır. Popülasyonlar arası ortalama uzaklık değeri $0,0138 \pm 0,0025$ bulunmuştur

Neighbor-Joining ağaç yöntemi kullanılarak çizilen Interior-Branch Test ve Bootstrap Test filogenik ağaçlara göre, iki büyük küme görülmektedir ve bu büyük kümelerden birini Gerze ırkı ve broilerler, diğer büyük kümeyi ise Denizli ırkı ve yumurtacı tavuklar oluşturmaktadır.

Tajima Nötrali Test sonuçlarına göre TAP 1, TAP 2, TAP 1 + TAP 2 gen bölgelerine ait değerler sırasıyla, π değeri için 0,0097, 0,0183, 0,0136; θ değeri için 0,0065, 0,0106, 0,0084; D değeri için 1,3913, 2,1317, 1,9558 bulunmuştur.

Gerze ve Denizli ırklarının genetik uzaklık değerleri ve filogenik ağaç sonuçlarına göre Gerze ırkı ile Denizli ırkı tavukların farklı ırklar olabileceği, bunlar arasındaki karışmanın çok az olabileceğini akla getirmektedir. Gerze ırkının broilerlere daha yakın olması, etçi tavuk ırklarının daha çok Asya kökenli olması nedeniyle Gerze ırkının Asya tavuk ırklarıyla akraba olabileceğini; Denizli ırkının yumurtacı tavuklara daha yakın bulunması, yumurtacıların daha çok Akdeniz kökenli

olması nedeniyle Denizli ırkının Akdeniz tavuk ırklarıyla akraba olabileceğini düşündürmektedir.

Denizli ve Gerze yerli tavuk ırklarında daha önce bu tip bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışma Denizli ve Gerze yerli tavuk ırklarındaki MHC bölgesindeki TAP 1, TAP 2 ve Tapasin gen bölgelerindeki polimorfizmleri belirlemek, yerli tavuk ırkları ve bu ırklar ile ticari tavuk tipleri arasındaki MHC gen bölgesindeki polimorfizmin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Ayrıca, yerli tavuk ırklarının MHC gen bölgesinde yapılacak diğer genetik çalışmalara alt yapı oluşturacaktır. Ayrıca bu çalışmanın yerli tavuk ırklarındaki, MHC gen bölgesinde belirlenen bu farklılıklar ile hastalıklara direnç/yatkınlık arasındaki ilişkileri açıklamaya yönelik ileriki çalışmalara zemin oluşturacağı düşünülmektedir.

Hastalıklara direnç ile ilişkisi olduğu belirlenecek genlerin damızlık ticari tavuk sürülerine aktararak hastalıklara dirençli yeni hatlar oluşturulmasına olanak sağlayacağı, yerli tavuk ırklarımıza ait bir veri bankasının oluşturulmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu çalışmanın tavuklarda hastalıklara direnç ve MHC gen bölgesinde yapılacak diğer genetik çalışmalara alt yapı oluşturacağı gibi diğer evcil hayvan türlerinde yapılacak hastalıklara genetik direnç ile ilgili çalışmalara da alt yapı oluşturacaktır.

ÖZET

Bu çalışmada 30 Denizli, 30 Gerze, 10 Lohmann-LSL beyaz yumurtacı, 10 Brown nick kahverengi yumurtacı ve 10 broiler tavuğuna ait, TAP 1 gen bölgesi için 6. ekzondan 7.ekzona, TAP 2 gen bölgesi için 4. ekzondan 6. ekzona ve Tapasin gen bölgesi için ise 5. ekzondan 6. ekzona kadar olan bölge incelenmiştir. İncelenen tüm ırklarda TAP 1 431 bp, TAP 2 399 bp ve Tapasin' in 448 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiştir. Ancak, Tapasin gen bölgesinin dizileme analizlerinde baz dizilimlerinde kesin sonuçlar elde edilememiştir. TAP 1 gen bölgesinde Denizli'de 15, Gerze'de 7, kahverengi yumurtacılarda 8, beyaz yumurtacılarda 8 ve broilerlerde 10; TAP 2 gen bölgesinde ise Denizli'de 16, Gerze'de 14, kahverengi yumurtacılarda 5, beyaz yumurtacılarda 9 ve broilerlerde 13 polimorfik bölge belirlenmiştir.

İncelenen tüm gruplar arasında, popülasyon içi genetik uzaklık değeri en yüksek TAP 1 bölgesi için 0,0087, TAP 2 bölgesi için 0,0175, TAP 1 + TAP 2 bölgesi için 0,0123 ile Denizli ırkında bulunmuştur. Popülasyon içi en düşük genetik uzaklık değeri TAP 1 bölgesi için 0,0056 ile Gerze ırkında, TAP 2 ve TAP 1 + TAP 2 gen bölgeleri için sırasıyla 0,0048 ve 0,0063 ile kahverengi yumurtacılarda bulunmuştur. Bu sonuçlar, TAP 1 Gen bölgesi bakımından Gerze ırkının, TAP 2, TAP 1 + TAP 2 gen bölgeleri bakımından kahverengi yumurtacıların diğer ırklara oranla daha homojen yapıda olduğunu, dar bir bölgede yetiştirilmiş ve yakın akraba olabileceklerini, TAP 1, TAP 2, TAP 1 + TAP 2 gen bölgeleri bakımından Denizli ırkının ise diğerlerine oranla daha heterojen yapıda olduğunu ve popülasyon içerisindeki örneklerin yakın akraba olma olasılığının düşük olabileceğini düşündürmektedir.

TAP 1 gen bölgesi bakımından popülasyonlar arası genetik uzaklık değerleri en düşük Gerze ve broiler arasında ($0,0069 \pm 0,0025$), en yüksek ise Denizli ile broiler arasında ($0,0137 \pm 0,0039$) tahmin edilmiştir. TAP 2 gen bölgesi bakımından popülasyonlar arası genetik uzaklık değerleri en düşük kahverengi yumurtacı ve broiler popülasyonları arasında ($0,0132 \pm 0,0039$), en yüksek ise Denizli ile beyaz yumurtacı popülasyonları arasında ($0,0248 \pm 0,0062$) tahmin edilmiştir. TAP 1 +

TAP 2 gen bölgesi bakımından popülasyonlar arası genetik uzaklık değerleri en düşük Gerze ve broiler popülasyonları arasında ($0,0108 \pm 0,0023$), en yüksek ise Denizli ile beyaz yumurtacı popülasyonları arasında ($0,0175 \pm 0,0033$) tahmin edilmiştir.

Neighbor-Joining ağaç yöntemi kullanılarak çizilen Interior-Branch Test ve Bootstrap Test filogenik ağaçlara göre, iki büyük küme görülmektedir ve bu büyük kümelerden birini Gerze ırkı ve broilerler, diğer büyük kümeyi ise Denizli ırkı ve yumurtacı tavuklar oluşturmaktadır. Tajima Nötrali Test sonuçlarına göre TAP 1, TAP 2, TAP 1 + TAP 2 gen bölgelerine ait değerler sırasıyla, π değeri için 0,0097, 0,0183, 0,0136; θ değeri için 0,0065, 0,0106, 0,0084; D değeri için 1,3913, 2,1317, 1,9558 bulunmuştur.

Gerze ve Denizli ırklarının genetik uzaklık değerleri ve filogenik ağaç sonuçları bu iki ırkın birbirinden farklı ırklar olabileceği ve farklı bölgelerden köken alma ihtimalini akla getirmektedir.

Bu çalışma Denizli ve Gerze yerli tavuk ırklarındaki MHC bölgesindeki TAP 1, TAP 2 ve Tapasin gen bölgelerindeki polimorfizmleri belirlemek, yerli tavuk ırkları ve bu ırklar ile ticari tavuk tipleri arasındaki MHC gen bölgesindeki farklılıkları ortaya koymak amacıyla yapılmıştır. Ayrıca, yerli tavuk ırklarının MHC gen bölgesinde yapılacak diğer genetik çalışmalara alt yapı oluşturacaktır. Sonuçlar, tavuk TAP genleri ve bu genlerin polimorfizm seviyeleri hakkında yapısal bilgileri sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: MHC, Polimorfizm, TAP, Tapasin, Tavuk, Denizli ırkı, Gerze ırkı.

SUMMARY

In this study, the region which belongs to 30 Denizli, 30 Gerze, 10 Lohmann–LSL white egg layer, 10 Brown nick layer and 10 Broiler chicken, was investigated for TAP 1 gene region from exon 6 till exon 7, for TAP 2 gene region from exon 4 till exon 6 and for Tapasin gene region from exon 5 till exon 6. In all strains that were examined, TAP 1, TAP 2 and Tapasin lengths were determined respectively 431 bp, 399 bp and 448 bp. However, In the sequence analyses of Tapasin gene region, in base sequences, the exact result could not be obtained. In TAP 1 gene region, polymorphic regions were identified as below numbers; In Denizli 15, Gerze 7, Brown egg layer 8, white egg layer 8 and broilers 10 and in TAP 2 gene region in Denizli 16, Gerze 14, Brown Egg Layer 5, White Egg Layer 9 and Broilers 13.

In all groups that were investigated, in population the highest value of genetic distance was recorded in Denizli race, as stated respectively for TAP 1 region 0,0087, for TAP 2 region 0,0175, for TAP 1 + TAP 2 region 0,0123. Intra population the lowest value of genetic distance for TAP 1 region was in Gerze race as with 0,0056, and for TAP 2 and TAP 1 + TAP 2 regions was found in Brown egg layer respectively 0,0048 and 0,0063. These results shows that for TAP 1 gen region Gerze race, and for TAP 2, TAP 1 + TAP 2 gen regions, Brown egg layers have more homogeneous structure than other races and this suggest that they were brought up in a narrow region and they can be related closely, in TAP 1, TAP 2, TAP 1 + TAP 2 gen regions Denizli race have more heterogenic structure than other races and this suggest that near relation probability for these samples in intrapopulation is very low.

In TAP 1 gene region, genetic distance values between populations were $(0,0069 \pm 0,0025)$ the lowest between Gerze and broiler, however the highest was $(0,0137 \pm 0,0039)$ estimated between Denizli and broiler. In TAP 2 gene rejion,the lowest values of genetic distance was estimated between Brown egg layer and broiler population $(0,0132 \pm 0,0039)$, the highest value of genetic distance was estimated between Denizli and White Egg Layer population $(0,0248 \pm 0,0062)$. In TAP 1 + TAP 2 gen region, the lowest values of genetic distance between populations

estimated between Gerze and Broiler ($0,0108 \pm 0,0023$), and the highest value estimated between Denizli and White Egg Layer populations ($0,0175 \pm 0,0033$).

According to the Interior-Branch Test and Bootstrap Test phylogenetic trees that were crossed by using Neighbor- Joining tree method, two big cluster were visible, Gerze race and broilers are one of these big cluster, and the other big cluster is constituted with Denizli race and egg layer chickens. According to the Tajima Neutrality Test results, values which are belong to the TAP 1, TAP 2, TAP 1 + TAP 2 gen regions are found respectively, for π value 0,0097, 0,0183, 0,0136; for θ value 0,0065, 0,0106, 0,0084; for D value 1,3913, 2,1317, 1,9558.

The values of genetic distance for Gerze and Denizli races and their phylogenetic tree results suggest that these two races are probably different races and results connote the possibility of having their origins from different regions .

The present study is aimed to identify polymorphism in TAP 1, TAP 2, Tapasin gene regions of MHC region in Denizli and Gerze indigenous chicken races, and also aimed to demonstrate the differences of MHC gene region between indigenous chicken races and commercial chicken species. Moreover, this study can be an initial guide for the future genetic studies and investigations that will be in Mhc gene region of indigenous chicken races. Results provide structural informations about chicken TAP genes and their polymorphism levels

Key Words: MHC, Polymorphism, TAP, Tapasin, Chicken, Denizli race, Gerze race .

KAYNAKLAR

- ADAMS, L.G., TEMPLETON, J.W. (1998). Genetic Resistance To Bacterial Diseases Of Animals. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 17 (1): 200-219.
- AHMED, K.A., SAXENA, V. K., SAXENA, M., ARA, A., PRAMOD, A.B., RAJARAM, M.L., DORMAN, K.S., MAJUMDAR, S., RASOOL, T.J. (2007). Molecular Cloning and Sequencing of MHC Class II Beta 1 Domain of Turkey Reveals High Sequence Identity With Chicken. Blackwell Publishing Ltd, International Journal of Immunogenetics 34, 97–105.
- AKÇAPINAR, H., ÖZBEYAZ, C. (1999) Hayvan Yetiştiriciliği Temel Bilgileri. Ankara. Sy: 14. ISBN: 975-96978-0-7.
- AKSOY, T. (1999). Tavuk Yetiştiriciliği. Ankara. Sy: 13-41. ISBN: 975-95417-0-X.
- AKSOY, T., ERTUĞRUL, O., ATASOY, F., GÜRLER, M., ERDOĞAN, M. (1998). Denizli Tavuklarının B Kan Grubu Allelleri Üzerinde Bir Araştırma. Tübitak Proje No : VHAG 1173.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. (2008). Hücrenin Moleküler Biyolojisi. Dördüncü Baskıdan Çeviri. Garland Science. Taylor & Francis Group. Sy:1392-1410.
- ANDROLEWICZ, M.J. (1999). The Role of Tapasin in MHC Class I Antigen Assembly. Immunologic Research 20:79-88.
- ANONİM (2010). SNP. Erişim tarihi: 09.12.2010. Erişim: [http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_snp.pdf].
- ANONİM (2011). Erişim tarihi: 15.01.2011. Erişim: [http://www.pamukkale.gov.tr/tr/content.asp?id=560].
- ANTONIOU, A.N., FORD, S., PILLEY, E.S., BLAKE, N., POWIS, S.J. (2002) Interactions Formed By Individually Expressed TAP1 and TAP2 Polypeptide Subunits. Blackwell Science Ltd, Immunology, 106, 182-189.
- ARDA, M., MİNBAY, A., AYDIN, N., AKAY, Ö., İZGÜR, M., DİKER, K.S. (1994). İmmunoloji. Medisan yayınevi. Ankara. Sy: 9-10; 193-200; 209-216.
- BACON, L.D., HUNT, H.D., CHENG, H.H. (2000). A Review of the Development of Chicken Lines to Resolve Genes Determining Resistance to Diseases. Poultry Science 79: 1082-1093.
- BAŞARAN, N. (2003). Tıbbi Genetik. Nobel 8 Güneş Tıp Kitabevi. Sekizinci Baskı.Bursa. Sy: 349-352.

- BREMDAL, K.B. (2010). Evolution Of MHC Genes And MHC Gene Expression. Uppsala University. ISSN: 1651-6214. ISBN: 978-91-554-7792-9.
- BRILES, W. E., McGIBBON, W. H., IRWIN, M. R. (1950). On Multiple Alleles Effecting Cellular Antigens in The Chicken. *Genetics*. 35: 633-652.
- BRILES, W.E., GOTO, R.M., AUFRAY, C., MILLER, M.M. (1993). A polymorphic system related to but genetically independent of the chicken major histocompatibility complex. *Immunogenetics* 37:408–414.
- BROWN, D.W., COLLINES, W.M., WARD, P.H. (1982). Complementation of Major Histocompatibility Haplotypes in Regression of Rous Sarcoma Virus-Induced Tumors in Noninbred Chickens. *Poultry Sci.* 61: 409-413. Atfen: AKSOY, T., ERTUĞRUL, O., ATASOY, F., GÜRLER, M., ERDOĞAN, M. (1998). Denizli Tavuklarının B Kan Grubu Allelleri Üzerinde Bir Araştırma. Tübitak Proje No : VHAG 1173.
- BURRI, R., SALAMIN, N., STUDER, R.A., ROULIN, A., FUMAGALLI, L. (2010). Adaptive Divergence of Ancient Gene Duplicates in the Avian MHC Class II β . *Molecular Biology and Evolution*, 27(10): 2360–2374.
- CHAVES, L.D. (2010a). The Major Histocompatibility Complex of the Turkey. A Dissertation Submitted To The Faculty of the Graduate School of the University of Minnesota.
- CHAVES, L.D., FAILE, G.M., KRUEH, S.B., HENDRICKSON, J.A., REED, K.M. (2010b). Haplotype Variation, Recombination, and Gene Conversion Within the Turkey MHC-B Locus. *Immunogenetics*. 62:465–477.
- CHOO, S.Y. (1991). Immunogenetics of the HLA System. *Yonsei Medical Journal*. Vol. 32,1-8.
- COLLINS, W.M., BRILES, W.E., ZSIGRAY, R.M., DUNLOP, W.R., CORBETT, A.C., CLARK, K.K., MARKS, J.L., MCGRAIL, T.P. (1977). The B Locus (MHC) in the Chicken: Association with the Fate of RSV-Induced Tumors. *Immunogenetics* 5: 333–343.
- ÇEVİRGEN, T. (2005). Multipl Myelomlu Hastalarda HLA Sınıf-I ve HLA Sınıf-II Alel Sıklığının Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İmmünoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi.
- DALGAARD, T.S., HOJSGAARD, S., SKJODT, K., JUUL-MADSEN, H.R. (2003). Differences in Chicken Major Histocompatibility Complex(MHC) Class Ia Gene Expression Between Marek's Disease -Resistant and- Susceptible MHC Haplotypes. *Scandinavian Journal of Immunology* 57: 135-143.

- DALVA, K. (2004). Her Yerde Karşımda; Nedir Bu HLA Tiplendirimi?. XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi. Antalya IV. Hematoloji İlk Basamak Kursu Kitabı. Sy: 42-52.
- DELANY, M.E., ROBINSON, C.M., GOTO, R.M., MILLER, M.M. (2009). Architecture and Organization of Chicken Microchromosome 16: Order of the NOR, MHC-Y, and MHC-B Subregions. *The Journal of Heredity* 100(5): 507–514.
- DEVİRİM, A.K., KAYA, N. (2004). Genetik Polimorfizm ve Mikrosatellitler. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.* 10(2): 215-220.
- DOPAZO, J. (1994) Estimating Errors and Confidence Intervals for Branch Lengths in Phylogenetic Trees By A Bootstrap Approach. *Journal of Molecular Evolution* 38:300-304.
- DETILLEUX, J. (2001). Genetic Improvement of Resistance to Infectious Diseases in Livestock. *The American Dairy Science Association*, 84: 39-46.
- DİKER, K.S. (1998). İmmunoloji. Medisan yayınevi. Ankara. Sy: 73-85; 105-112.
- DELİGEZER, U., AKIŞIK, E.E., DALAY, N. (2004). Gen Polimorfizm Analizinde LightCycler Floresan PCR Tekniğinin Kullanılması. *Türk Onkoloji Dergisi*, Cilt:19, Sayı: 4, sy: 134-139.
- DÜZGÜN, N. (2006). Transplantasyon İmmünolojisi. Erişim tarihi: 7.11.2006 Erişim : [http://www.medicine.ankara.edu.tr/dahili_tip/nefroloji//files/Tximmunoloji.doc].
- ELBAŞI, M.O. (2008). Majör Histokompatibilite Kompleksinin Fetusun Yaşamındaki Rolü. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İmmünoloji Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- EKMEKÇİ, A., KONAÇ, E., ÖNEN, H.İ. (2008) Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık. *Marmara Medical Journal* 21(3); 282-295.
- EMARA, M. G., KIM, H., ZHU, J., LAPIERRE, R. R., LAKSHMANAN, N., LILLEHOJ, H. S. (2002). Genetic Diversity at the Major Histocompatibility Complex (*B*) and Microsatellite Loci in Three Commercial Broiler Pure Lines. *Poultry Science* 81: 1609–1617.
- EMİR, F., ÖZDEN, A. (2006). Genetik Polimorfizm ve Polimorfizm Çalışmaları. *Güncel Gastroenteroloji* 10/1 sy:24-28.
- ERDOĞAN, M. (2000). Bazı Köpek Irklarında Kan Protein Polimorfizmi ve Irklar Arası Genetik Mesafelerin Tahmin Edilmesi. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı, Doktora Tezi.

- ERENSAYIN, C. (2000). Bilimsel, Teknik, Pratik Tavukçuluk. 2. Baskı. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara. Cilt: 1, Sy: 35-40. ISBN: 975-591-162-6.
- EWALD, S.J., LIVANT, E.J. (2004). Distinctive Polymorphism of Chicken B-FI (Major Histocompatibility Complex Class I) Molecules. *Poultry Science* 83: 600–605.
- ERTUĞRUL, O. (2006). Anadolunun Özgün Hayvanları. Sultan Tavuğu. Veteriner Hekimler Derneği Dergisi. Cilt: 77, Sayı: 2, Sy: 73-76.
- FELSENSTEIN, J. (1985) Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using The Bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- FRANGOULIS, B., PARK, I., GUILLEMOT, F., SEVERAC, V., AUFRAY, C., ZOOROB, R. (1999). Identification of the Tapasin Gene in the Chicken Major Histocompatibility Complex. *Immunogenetics*. 49: 328-337.
- FULTON, J.E., JUUL-MADSEN, H.R., ASHWELL, C.M., MCCARRON, A.M., ARTHUR, J.A., O'SULLIVAN, N.P., TAYLOR JR, R.L. (2006). Molecular Genotype Identification Of The Gallus Gallus Major Histocompatibility Complex. *Immunogenetics* 58: 407–421.
- GRUEN, J.R., WEISSMAN, S.M. (1997). Evolving Views of the Major Histocompatibility Complex. *Blood*. 90: 4252-4265.
- GUILLEMOT, F., BILLAULT, A., POURQUIE, O., BEHAR, G., CHAUSSE, A.M., ZOOROB, R., KREIBICH, G., AUFRAY, C. (1988). A Molecular Map of the Chicken Major Histocompatibility Complex: the Class II β Genes are Closely Linked to the Class I Genes and the Nucleolar Organizer. *The EMBO Journal*. 7: 2775–2785.
- GÜN, F.D. (2007). Meme Kanseri Patogenezinde MHC Sınıf-2 Moleküllerinin Rolü. Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi.
- HANSEN, M.P., ZANT, J.N., LAW, G.R.J. (1967). Differences in Susceptibility to Marek's Disease in Chickens Carrying Two Different B Blood Group Alleles. *Poultry Sci.* 46: 1268. Atfen: AKSOY, T., ERTUĞRUL, O., ATASOY, F., GÜRLER, M., ERDOĞAN, M. (1998). Denizli Tavuklarının B Kan Grubu Allelleri Üzerinde Bir Araştırma. Tübitak Proje No : VHAG 1173.
- HEE, C.S., GAO, S., LOLL, B., MILLER, M.M., UCHANSKA-ZIEGLER, B., DAUMKE, O., ZIEGLER, A. (2010). Structure of a Classical MHC Class I Molecule that Binds “Non-Classical” Ligands. *PLoS Biology*, Vol: 8, Issue: 12, 1-12.
- HORTON, R., GIBSON, R., COGGILL, P., MIRETTI, M., ALLCOCK, R.J., ALMEIDA, J., FORBES, S., GILBERT, J.G.R., HALLS, K., HARROW, J.L.,

- HART, E., HOWE, K., JACKSON, D.K., PALMER, S., ROBERTS, A.N., SIMS, S., STEWART, C.A., TRATHERNE, J.A., TREVANION, S., WILMING, L., ROGERS, J., JONG, P.J., ELLIOTT, J.F., SAWCER, S., TODD, J.A., TROWSDALE, J., BECK, S. (2008). Variation Analysis and Gene Annotation of Eight MHC Haplotypes: The MHC Haplotype Project. *Immunogenetics* 60:1–18.
- HOSOMICHI, K., MILLER, M.M., GOTO, R.M., WANG, Y., SUZUKI, S., KULSKI, J.K., NISHIBORI, M., INOKO, H., HANZAWA, K., SHIINA, T. (2008). Contribution of Mutation, Recombination, and Gene Conversion to Chicken *Mhc-B* Haplotype Diversity. *The Journal of Immunology* 181;3393-3399.
- JOHNSON, A.G., ZIEGLER, R.J., LUKASEWYCZ, O.A., HAWLEY, L.B. (2000). *Mikrobiyoloji ve İmmunoloji*. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul. Sy:277-278.
- KAPLAN, G., AKSOY, F.T. (2009). Denizli Irkı Bir Tavuk Sürüsünde Telek Rengi Özellikleri ve Canlı Ağırlığın İncelenmesi. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 56, 297-303.
- KARABAYIR, A. (2007). *Tavukçuluk*. İstanbul. Sy: 14-15. ISBN: 978-9944-425-25-4.
- KAUFMAN, J. (1999a). Co-Evolving Genes in MHC Haplotypes: The “Rule” for Nonmammalian Vertebrates? *Immunogenetics*. 50: 228–236.
- KAUFMAN, J., MILNE, S., GOBEL, T.W., WALKER, B.A., JACOB, J.P., AUFRAY, C., ZOOROB, R., BECK, S. (1999b). The Chicken B Locus is a Minimal Essential Major Histocompatibility Complex. *Nature* 401; 923–925.
- KAUFMAN, J. (2000). *The Simple Chicken Major Histocompatibility Complex: Life and Death in the Face of Pathogens and Vaccines*. The Royal Society. 355, 1077-1084.
- KAUFMAN, J. (2008) *The Avian MHC*. *Avian Immunology*, Editörler, DAVISON, T.F., KASPERS, B., SCHAT, K.A. Elsevier, Ltd. 161-184. ISBN: 978-0-12-370634-8.
- KAYA, M., YILDIZ, M.A. (2008). Genetic Diversity Among Turkish Native Chickens, Denizli and Gerze, Estimated by Microsatellite Markers. *Biochem Genet.* 46: 480-491.
- KELLEY, J., WALTER, L., TROWSDALE, J. (2004). Comparative Genomics Of Major Histocompatibility Complexes. *Immunogenetics*. Vol:56: 683-695.
- KIERSZENBAUM, A.L. (2006). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. Palme Yayıncılık. Ankara. ISBN:9944-341-02-9. Sy: 267-281.

- KİPER, N., GÖÇMEN, A., ÖZÇELİK, U., YALÇIN, E. (2002). Çocukluk Çağı Kist Hidatik Hastalığına Karşı Genetik Yatkınlıkta TAP-1 ve TAP-2 Gen Polimorfizminin Rolünün Belirlenmesi. Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu. Proje No: SBAG-2279.
- KİRAZ, S., EKİNCİ, M.S., ÖZKÖSE, E., AKYOL, İ. (2010). Genetik Polimorfizmin Belirlenmesinde Kullanılan Moleküler Teknikler. Erişim: <http://zootekni2007.yyu.edu.tr/pdfler/GEN9.pdf>.
- KUŞ, N.S., ZORLU, Y., ÇOKER, I., ŞENER, U., ALTINEL, Ö. (2004). R-R Tip Multipl Distribution of HLA DQ Antigens in R-R Type Multiple Sclerosis Patients. (Skleroz Hastalarında HLA DQ Antijenlerinin Dağılımı). SSK Tepecik Hast. Derg. 14(2):95-100.
- LAMONT, S.J. (1989). The Chicken Major Histocompatibility Complex in Disease Resistance and Poultry Breeding. Journal of Dairy Science. Vol:72, 1328-1333.
- LI, L., JOHNSON, L.W., EWALD, S.J. (1997). Molecular Characterization of Major Histocompatibility Complex (B) Haplotypes in Broiler Chickens. Animal Genetics 28: 258-267.
- LI, X.X., HAN, L.X., HAN, J.L. (2010). No Specific Primer Can Independently Amplify the Complete Exon 2 of Chicken BLB1 or BLB2 Genes. International Journal of Poultry Science 9 (2): 192-197.
- LIVANT, E.J., ZHENG, D., JOHNSON, L.W., SHI, W., EWALD, S.J. (2001). Three New MHC Haplotypes in Broiler Breeder Chickens. Animal Genetics, 32: 123-131.
- MACKLIN, K.S., EWALD, S.J., NORTON, R.A. (2002). Major Histocompatibility Complex Effect on Cellulitis Among Different Chicken Lines. Avian Pathology 31, 371– 376. ISSN 0307-9457, 1465-3338.
- MCCLUSKEY, J., ROSSJOHN, J., PURCELL, A.W. (2004). TAP Genes and Immunity. Current Opinion in Immunology 16:651–659.
- MILLER, M.M., BACON, L.D., HALA, K., HUNT, H.D., EWALD, S.J., KAUFMAN, J., ZOOROB, R., BRILES, W.E. (2004). 2004 Nomenclature for the Chicken Major Histocompatibility (B and Y) Complex. Immunogenetics. 56: 261–279.
- MILLER, M.M. (2005). Mapping MHC Genes Linked with Resistance to Tumors Induced by Marek's Disease Virus Infections. International Workshop on Animal Genome November 9, 2005.
- MUNZ, C. (2010). Antigen Processing for MHC Presentation by Autophagy. Biology Reports 2:61; 1-4.

- NEI, M. & KUMAR, S. (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- O'NEILL, A.M., LIVANT, E.J., EWALD, S.J. (2009). The Chicken BF1 (Classical MHC Class I) Gene Shows Evidence of Selection for Diversity in Expression and in Promoter and Signal Peptide Regions. *Springer, Immunogenetics* 61:289–302.
- ÖZBEYAZ, C. (1990). Türkiye Esmer ve Holştayn Sığır Irklarında Protein Polimorfizmi ve Ebeveyn Kontrolündeki Önemi. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. Atfen: ERDOĞAN, M. (2000). Bazı Köpek Irklarında Kan Protein Polimorfizmi ve Irklar Arası Genetik Mesafelerin Tahmin Edilmesi. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı, Doktora Tezi.
- PARMENTIER, H.K., BAELMANS, R., SAVELKOUL H.F.J., DORNY, P., DEMEY, F., BERKVENS, D. (2004). Serum haemolytic complement activities in 11 different MHC (B) typed chicken lines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 100: 25-32.
- PENNY, L.A., ARMSTRONG, D., BRAMLEY, T.A., WEBB, R., COLLINS, R.A., WATSON, E.D. (1999). Immune Cells and Cytokine Production in the Bovine Corpus Luteum Throughout the Oestrous Cycle and after Induced Luteolysis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 115; 87-96.
- PORCELLI, S.A. (2005). Bird Genes Give New Insights into the Origins of Lipid Antigen Presentation. *PNAS*. Vol:102. No:24. 8399-8400.
- REGNIER, V., NOVELLI, J., FUKAGAWA, T., VAGNARELLI, P., BROWN, W. (2003). Characterization of Chicken CENP-A and Comparative Sequence Analysis of Vertebrate Centromere-Specific Histone H3-like proteins. *Gene* 316, 39–46.
- REGNIER, V., VAGNARELLI, P., FUKAGAWA, T., ZERJAL, T., BURNS, E., TROUCHE, D., EARNSHAW, W., BROWN, W. (2005). CENP-A is Required for Accurate Chromosome Segregation and Sustained Kinetochore Association of BubR1. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 3967–3981.
- RUBY, T., BED'HOM, B., WITZELL, H., MORIN, V., OUDIN, A., ZOOROB, R. (2005). Characterisation of a Cluster of TRIM-B30.2 Genes in the Chicken MHC B Locus. *Immunogenetics*. 57; 116–128.
- RZHETSKY, A. & NEI, M. (1992) A Simple Method for Estimating and Testing Minimum Evolution Trees. *Molecular Biology and Evolution* 9:945-967.
- SABUNCUOĞLU, Y. (2006). Vitiligolu Olgularda MHC Gen Polimorfizmleri. Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.

- SADASIVAN, B., LEHNER, P.J., ORTMANN, B., SPIES, T., CRESSWELL, P. (1996). Roles for Calreticulin and a Novel Glycoprotein, Tapasin, in the Interaction of MHC Class I Molecules with TAP. *Immunity*, Vol. 5, 103–114.
- SAITOU, N. & NEI, M. (1987) The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- SALOMONSEN, J., SØRENSEN, M.R., MARSTON, D.A., ROGERS, S.L., COLLEN, T., HATEREN, A.V., SMITH, A.L., BEAL, R.K., SKJØDT, K., KAUFMAN, J., (2005). Two CD1 Genes Map to the Chicken MHC, Indicating that CD1 Genes are Ancient and Likely to have been Present in the Primordial MHC. *PNAS*, vol. 102, no. 24, 8668-8673.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D. (2001). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANDBERG, J.K., GLAS, R. (2001). Antigen Processing. *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group, 1-6.
- SCHIERMAN, L.W., NORDSKOG, A.W. (1961). Relationship of Blood Type to Histocompatibility in Chickens. *Science* 134:1008-1009. Atten: SHIINA, T., HOSOMICHI, K., HANZAWA, K. (2006). Comparative Genomics of the Poultry Major Histocompatibility Complex. *Animal Science Journal* 77: 151-162.
- SCHOENHALS, G.J., KRISHNA, R.M., GRANDEA, A.G., SPIES, T., PETERSON, P.A., YANG, Y., FRÜH, K. (1999). Retention of Empty MHC Class I Molecules by Tapasin is Essential to Reconstitute Antigen Presentation in Invertebrate Cells. *The EMBO Journal* Vol.18 No.3, 743–753.
- SCHOU, T.W., LABOURIAU, R., PERMIN A., CHRISTENSEN J.P., SØRENSEN, P., CU, H.P., NGUYEN, V.K., JUUL-MADSEN, H.R. (2010). MHC Haplotype and Susceptibility to Experimental Infections (*Salmonella* Enteritidis, *Pasteurella Multocida* or *Ascaridia Galli*) in a Commercial and an Indigenous Chicken Breed. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 135, 52–63.
- SHAFI, S.S., JOSHI, C.G. (2002). Molecular characterization of B-Lb II family (class II MHC) alleles in three strains of poultry and its association with immune response. Department of Animal Genetics and Breeding College of Veterinary Science and Animal Husbandry, Gujarat Agricultural University, Anand Campus, Anand. Erişim: [http://openmed.nic.in/2249/01/Dr._Shanaz_Shafi_M.V.Sc._Thesis.pdf]. Erişim tarihi: 09.11.2007.
- SHIINA, T., SHIMIZU, S., HOSOMICHI, K., KOHARA, S., WATANABE, S., HANZAWA, K., BECK, S., KULSKI, J.K., INOKO, H. (2004). Comparative

- Genomic Analysis of Two Avian (Quail and Chicken) MHC Regions. *The Journal of Immunology*, 172: 6751–6763.
- SHIINA, T., HOSOMICHI, K., HANZAWA, K. (2006). Comparative Genomics of the Poultry Major Histocompatibility Complex. *Animal Science Journal* 77: 151-162.
- SINGH, S.K., MEHRA, S., SHUKLA, S.K., KUMAR, V., TIWARI, A., MEHRA, M., GOYAL, G., MATHEW, J., SHARMA, D. (2010a). Nucleotide Sequence Variation in MHC Class I Region in Guinea Fowl. *International Journal of Poultry Science* 9 (3): 236-239. ISSN:1682-8356.
- SINGH, S.K., MEHRA, S., KUMAR, V., SHUKLA, S.K., TIWARI, A., MEHRA, M., GOYAL, G., MATHEW, J., SHARMA, D. (2010b). Sequence Variability in the BLB2 Region Among Guinea Fowl and Other Poultry Species. *International Journal of Genetics and Molecular Biology* Vol. 2 (3), pp. 048-051.
- SIRONI, L., LAZZARI, B., RAMELLI, P., GORNI, C., MARIANI, P. (2006 a). Single Nucleotide Polymorphism Discovery in the Avian Tapasin Gene. *Poultry Science* 85: 606-612.
- SIRONI, L., LAZZARI, B., STELLA, A., RAMELLI, P., MARIANI, P. (2006 b). Avian TAP1 and TAP2 genes: polymorphisms and haplotypes. EPC 2006, XII European Poultry Conference, Verona, Italy, 10-14 September 2006.
- SIRONI, L., LAZZARI, B., RAMELLI, P., STELLA, A., MARIANI, P. (2008). Avian TAP Genes: Detection of Nucleotide Polymorphisms and Comparative Analysis Across Species. *Genetics and Molecular Research* 7 (4): 1267-1281.
- SNELL, G.D. (1981). *Studies in Histocompatibility*. Science. 213: 172-178.
- SOYSAL, M.İ. (2010). Türkiye Yerli Evcil Hayvan Genetik Kaynakları. *Tekirdağ*. Sy: 225-228; 352-354.
- ŞENKÖYLÜ, N. (2001). *Modern Tavuk Üretimi*. 3. Baskı. Anadolu Matbaası. Sy:1-5. ISBN: 975-93691-2-5.
- TAGEM (2009). Türkiye Evcil Hayvan Genetik Kaynakları. Ankara. Sy: 84-85.
- TAJIMA, F. (1989) Statistical Methods to Test for Nucleotide Mutation Hypothesis By DNA Polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
- TAJIMA, F. (1993) Simple Methods for Testing Molecular Clock Hypothesis. *Genetics* 135:599-607.

- TAMURA, K., NEI, M. & KUMAR, S. (2004) Prospects for Inferring Very Large Phylogenies By Using The Neighbor-Joining Method. PNAS 101:11030-11035.
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. & KUMAR, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. Molecular Biology and Evolution 10.1093/molbev/msm092.
- TAN, P., KROPSHOFER, H., MANDELBOIM, O., BULBUC, N., HAMMERLING, G.J., MOMBURG1, F. (2002). Recruitment of MHC Class I Molecules by Tapasin into the Transporter Associated with Antigen Processing-Associated Complex Is Essential for Optimal Peptide Loading. The Journal of Immunology. 168: 1950–1960.
- TEMİZ, N. (2005). Akdeniz Bölgesinde HLA (Human Leucocyte Antigens) Tipleri ve Sıklığının Saptanması. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- TROWSDALE, J. (1995). “ Both man & bird & beast” : Comparative Organization of MHC Genes. Immunogenetics. 41: 1-17.
- VILLANUEVA, A.B., BLICKWEDEHL, J., McEVOY, S., GOLDING, M., GOLLNICK, S.O., BANGIA, N. (2010). What is the Role of Alternate Splicing in Antigen Presentation by Major Histocompatibility Complex Class I Molecules? Humana Press, Immunol Res 46: 32–44.
- WALKER, B.A., HATEREN, A., MILNE, S., BECK, S., KAUFMAN, J. (2005). Chicken TAP Genes Differ From Their Human Orthologues in Locus Organisation, Size, Sequence Features and Polymorphism. Immunogenetics 57: 232-247.
- WIGLEY, P. (2004). Genetic resistance to Salmonella infection in domestic animals. Research in Veterinary Science 76: 165–169.
- WORLEY, K., COLLET, J., SPURGIN, L.G., CORNWALLIS, C., PIZZARI, T., RICHARDSON, D.S. (2010). MHC Heterozygosity and Survival in Red Junglefowl. Molecular Ecology 19, 3064–3075.
- XU, R., LI, K., CHEN, G., XU, H., QIANG, B., LI, C., LIU, B. (2007). Characterization of Genetic Polymorphism of Novel MHC B-LB II Alleles in Chinese Indigenous Chickens. Journal of Genetics and Genomics, Vol.34 No.2: 109-118.
- YAN, R.Q., LI, X.S., YANG, T.Y., XIA, C. (2005). Characterization of BF2 and β 2m in Three Chinese Chicken Lines. Veterinary Immunology and Immunopathology. 108: 417-425.

- YEŞİLLİ, O. (1993). Pemfigus vulgarisde Human Lökosit Antijenleri. Ç.Ü. Uzmanlık Tezi. Adana. 40: 12-21s. Atfen: TEMİZ, N. (2005). Akdeniz Bölgesinde HLA (Human Leucocyte Antigens) Tipleri ve Sıklığının Saptanması. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- YİĞİTBAŞ, E. (2006). Türk Popülasyonunda Yüksek Rezolusyon MHC Class-I Related Chain A (MICA) Genotiplenmesi, HLA-B – MICA Haplotiplerinin İncelenmesi ve Yeni MICA Alellerinin Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı, Doktora Tezi.
- ZEKARIAS, B., TER HUURNE, A.A.H.M., LANDMAN, W.J.M., REBEL, J.M.J., POL, J.M.A., GRUYS, E. (2002). Immunological Basis of Differences in Disease Resistance in the Chicken. INRA, EDP Sciences, Vet. Res. 33: 109–125.
- ZHOU, H., LAMONT, S.J. (2003). Chicken MHC class I and II gene effects on antibody response kinetics in adult chickens. Immunogenetics. Vol:55: 133-140.