T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

DENİZLİ VE GERZE TAVUK IRKLARINDA *TLR3, TLR4, TLR5* VE *TLR15* RESEPTÖRLERİNİN *İN VİVO* VE *İN VİTRO* ŞARTLARDA GENETİK POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI

Leyla BENER

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

OCAK 2025

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

DENİZLİ VE GERZE TAVUK IRKLARINDA *TLR3, TLR4, TLR5* VE *TLR15* RESEPTÖRLERİNİN *İN VİVO* VE *İN VİTRO* ŞARTLARDA GENETİK POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI

Leyla BENER

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

OCAK 2025

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Denizli ve Gerze Tavuk Irklarında *TLR3, TLR4, TLR5* ve *TLR15* Reseptörlerinin *in vivo* ve *in vitro* Şartlarda Genetik Polimorfizminin Araştırılması

Leyla BENER

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FDK-2023-6095 nolu proje ile desteklenmiştir.

OCAK 2025

Evrak Tarih ve Sayısı: 08.01.2025-643

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Denizli ve Gerze Tavuk Irklarında TLR3, TLR4, TLR5 ve TLR15 Reseptörlerinin in vivo ve in vitro Şartlarda Genetik Polimorfizminin Araştırılması

Leyla BENER

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZi

Bu tez 03/01/2025 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Demir ÖZDEMİR (Danışman)
Doç. Dr.Taki KARSLI
Prof. Dr. Kemal KARABAĞ
Prof. Dr. Türker SAVAŞ
Prof. Dr.Yasemin ÖNER

Bu belge, güvenli elektronik İmza ile imzalanmıştır.
Evrak sorgulaması https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=5543&eD=BSR2PA1PE3&eS=643 adresinden yapılabilir. (PIN:87252)

ÖZET

DENİZLİ VE GERZE TAVUK IRKLARINDA *TLR3, TLR4, TLR5* VE *TLR15* RESEPTÖRLERİNİN *İN VİVO* VE *İN VİTRO* ŞARTLARDA GENETİK POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI

Leyla BENER

Doktora Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Demir ÖZDEMİR

Ocak 2025; 173 sayfa

Tavukların bağışıklık sistemini etkileyen mikroorganizmalar bakteri, virüs, mantar ve parazit kaynaklı olabilmektedir. Bağışıklık sistemi, doğuştan gelen ve sonradan kazanılan bağışıklık sistemi olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Sonradan kazanılan bağışıklık sistemi istilacı patojenlere karşı ilkel bir koruma sağlarken, doğuştan gelen bağışıklık sistemi, patojen tanıma reseptörleri aracılığıyla mikrobiyal ajanların varlığını algılar ve savunma mekanizmalarını aktive eder. Bu reseptörlerden Toll-benzeri reseptörler, bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde, enfeksiyonlara karşı savunmada ve bağışıklık homeostazının korunmasında kritik bir role sahiptir. Doğuştan gelen bağışıklık sistemine ait bu reseptörler hakkında bilgi, bağışıklık sisteminin işlevi ve hastalıklara direnç konularında temel veriler sunmaktadır. Bu bağlamda, Denizli ve Gerze yerli tavuk ırklarının bağışıklık potansiyelini belirlemek, bu ırkları koruma stratejilerine destek sağlamak ve gelecekte yapılacak çalışmalara temel oluşturmak amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada, hastalıklarla ilişkilendirilen *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* reseptörlerinin polimorfizmleri ve erirosit hücrelerinde farklı süre ve konsantrasyonlarda sentetik sınıf B CpG ODN 2007 ve poli I:C ligand mumamelelerinin hücre kültürü sonsası gen ekspresyon düzeyleri incelenmiştir.

Çalışmanın polimorfizm analizi için her iki ırktan 6'şar bireyden alınan kan örneklerinde *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* reseptör genleri yeni nesil dizileme (NGS) yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sonucunda, *ChTLR3* geninde 17 SNP, 7 haplotip ve haplotip nükleotit çeşitliliği 0,87, *ChTLR4* geninde 26 SNP, 3 haplotip ve nükleotit çeşitliliği 0,61, *ChTLR5* geninde 39 SNP 7 haplotip ve nükleotit çeşitliliği 0,88 ve *ChTLR15* geninde ise 24 SNP, 4 haplotip ve nükleotit çeşitliliği 0,67 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Denizli ve Gerze tavuk ırklarına ait veriler protein düzeyinde *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* reseptörlerinin amino asit sekans analizi sonucunda, sırasıyla 9, 9, 10 ve 11 polimorfik bölgeye sahip olduğu saptanmıştır.

Çalışmanın hücre kültürü basamağında, her iki ırktan 4 bireyden alınan kan örneklerinden eritrositler histopaque kullanılarak ayrınlanmış ve sentetik sınıf B CpG

ODN ve poli I:C ligandlarıyla farklı süre ve konsantrasyonlarda 41 ˚C'de inkübe edilmiş ve ardından endojen referans gen *GAPDH* ve dört reseptörün gen ekspresyon düzeyleri RT-qPCR yöntemiyle analiz edilmiştir. Sonuçlar, virüs kaynaklı hastalık direnci ile ilişkilendirilen *ChTLR3* ve bakteriyel hastalık direnci ile ilişkilendirilen *ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* reseptör genlerinin ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak önemli derecede arttığı saptanmıştır ($P<0.05$ ve $P<0.001$). Bu çalışma, Denizli ve Gerze yerli tavuk ırklarında bağışıklıkla ilişkili genlerin polimorfizm ve gen ekspresyon seviyelerini araştıran ilk çalışma olma özelliği taşımakta ve elde edilen bulgular, bu ırklarda gelecekte yapılacak moleküler ıslah çalışmaları için temel bilgiler sunmaktadır.

ANAHTAR KELİMELER: Eritrosit, Hücre Kültürü, İmmun Yanıt, mRNA İfadesi Polimorfizm, Toll-Benzeri Reseptörleri

JÜRİ: Doç. Dr. Demir ÖZDEMİR

Doç. Dr. Taki KARSLI

Prof. Dr. Kemal KARABAĞ

Prof. Dr. Türker SAVAŞ

Prof. Dr. Yasemin ÖNER

ABSTRACT

INVESTIGATION OF GENETIC POLYMORPHISM OF *TLR3, TLR4, TLR5* AND *TLR15* RECEPTORS IN DENİZLİ AND GERZE CHICKEN BREEDS *IN VIVO* AND *IN VITRO* CONDITIONS

Leyla BENER

PhD Thesis, Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Demir OZDEMIR

January 2025; 173 pages

Microorganisms affecting the immune system in chickens can originate from bacteria, viruses, fungi, and parasites. The avian immune system is divided into two categories: innate immunity and acquired immunity. While acquired immunity provides a basic level of protection against invading pathogens, innate immunity detects the presence of microbial agents through pattern recognition receptors and activates defense mechanisms. Among these receptors, Toll-like receptors play a critical role in regulating immune responses, defending against infections, and maintaining immune homeostasis. Information about these receptors, which are part of the innate immune system, provides fundamental insights into the function of the immune system and disease resistance. In this context, this study was conducted to determine the immune potential of denizli and gerze chicken breeds, to support protection strategies and establish a foundation for future research. The study investigated the polymorphisms of *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* and *ChTLR15* receptors associated with diseases and gene expression levels of synthetic class B CpG ODN 2007 and poly I:C ligand samples after cell culture at different times and concentrations in erythrocyte cells.

In the polymorphism analysis of the study, blood samples collected from six individuals from both breeds were used for *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* and *ChTLR15* receptor genes by next generation sequencing. The analyses were conducted through Next-Generation Sequencing, the single nucleotide polymorphisms, number of haplotypes, and haplotype diversity, of these genes were determined. For the *ChTLR3* gene, 17 SNPs and 7 haplotypes and 0.87 haplotype diversity were identified; for *ChTLR4*, 26 SNPs and 3 haplotypes and 0.61 haplotype diversity; for *ChTLR5*, 39 SNPs and 7 haplotypes and 0.88 haplotype diversity; and for *ChTLR15*, 24 SNPs and 4 haplotypes and 0.67 haplotype diversity were detected. In addition, the sequence data of Denizli and Gerze chicken breeds indicate that *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* and *ChTLR15* receptors 9, 9, 10 and 11 polymorphic regions at protein level, respectively.

In the cell culture phase, blood samples from four individuals of each breed and erythrocytes were separated from blood samples using histopaque and incubated were incubated with synthetic class B CpG ODN and poly I:C ligands at different

durations and concentrations. Incubations were conduct at 41 ˚C, and then the gene expression levels of the endogenous reference gene *GAPDH* and four receptors were analyzed by RT-qPCR method. The results showed that the expression levels of *ChTLR3*, which is associated with viral disease resistance, and *ChTLR4, ChTLR5* and *ChTLR15* receptor genes, which are associated with bacterial disease resistance, were statistically significantly increased ($P<0.05$ and $P<0.001$). This study represents the first investigation into the polymorphisms and gene expression levels of immune-related genes in the local Denizli and Gerze chicken breeds. The findings provide a foundational resource for future molecular breeding studies in these breeds.

KEYWORDS: Erythrocyte, Cell Culture, Immune Response, mRNA Expression Polymorphism, Toll-Like Receptors

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Demir OZDEMIR

Assoc. Prof. Dr. Taki KARSLI

Prof. Dr. Kemal KARABAG

Prof. Dr. Turker SAVAS

Prof. Dr. Yasemin ONER

ÖNSÖZ

Son yıllarda gerek ticari tavuk üretiminin artışı gerek uluslararası boyutta etkili olan kanatlı hastalıkları nedeniyle yerel tavuk ırkları da ciddi bir şekilde yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmışlardır. Ülkemizde de yerli Gerze tavuk ırkımız etkilenmiş, Denizli ise koruma altına alınmış ve bu ırklarımızı hastalık direnci, et lezzeti ve sürdürülebilir yetiştiriciliğinin sağlanması ile ticari üretime dahil edilmesi oldukça önem teşkil etmektedir. Gelişmiş birçok ülkelerde bir yandan birçok yerli tavuk ırkının ıslahı ve koruma stratejileri geliştirirken, diğer yandan da bu ırklardan elde edilen ürünlerin dünyaya tanıtılması ve ulaştırılması da başarılı bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Zengin biyoçeşitliliğiyle önemli hayvan genetik kaynaklarına sahip olan Türkiye'nin yok olma tehlikesi ile karşı karşıya olan coğrafik değerlerimizin sadece ekonomik değil aynı zamanda sosyo-kültürel olarak da ülkemize bir değer kazandırılmasını bir borç bilirim. Bu hedef doğrultusunda bu çalışmada elde edilen sonuçların, yakın gelecekte yerel tavuk ırklarımız ile ilgili büyük bir farkındalık yaratarak gelecekte yapılacak somut ve önemli adımların bir başlangıcı olmasını temenni ederim.

Öncelikle doktora eğitimim süreci boyunca en kritik döneminde akademik ve bilimsel desteğini benden esirgemeyen, ayrıca çalıştığım bu tez konusu üzerinde laboratuvar çalışmalarım ve analizlerin yapılma süreci boyunca sağladığı imkân ve katkılarıyla tez çalışmasını zenginleştiren saygı değer danışman hocam Doç. Dr. Demir ÖZDEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Doktora tezi ve diğer bütün çalışmalarda bilgisini, sabrını, hoşgörü, desteğini ve anlayışını hiçbir zaman esirgemediği için kendisine minnettarım. Akademi yolumun bu en kıymetli dönemini sizin önderliğinizde tamamlamış olmamın gurur ve mutluluğunu her daim hissedeceğim.

Bu doktora tez çalışmasının maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimimin YÖK 100/2000 projesi Hayvan Besleme alanında gerçekleştirilmesi amacıyla bursiyer statüsünde desteklenmeme imkân sağlayan Yüksek Öğretim Kurumu'na teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimimi tamamlama sürecinde 220O069 nolu TÜBİTAK "Ispenç Tavuk Irkı Popülasyonlarının Mitogenom Dizi Analizine dayalı Genetik Karakterizasyonu (2021-2022)" başlıklı projede bursiyer olarak destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Şubat 06. 2023'te yaşamış olduğumuz deprem felaketinden dolayı doktora eğitimimin devam etmesi sürecine destek olan TÜBİTAK BİÇABA-Birlikte Çalışıp Birlikte Başaracağız Burs Programı kapsamında 122R004 nolu "Biyoteknoloji Destekli Yerli Hibrit Süs Ayçiçeği Hatlarının Geliştirilmesi projesi (2023-2025)" başlıklı proje ile destekleyen TÜBİTAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım ve ayrıca bu proje kapsamında bursiyer statüsünde destek sağlayan Prof. Dr. Songül Sever MUTLU hocama teşekkürlerimi sunarım.

Tez konusunun belirlenmesi ve devamında yürütülen tüm tez izleme sürecinde değerli katkılarını benden esirgemeyen ve değerli bilgilerle beni yüreklendiren çok değerli Tez İzleme Komitesi Üyeleri; Sayın Prof. Dr. Kemal KARABAĞ'a ve Sayın Doç. Dr. Taki KARSLI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca tez çalışmasının değerlendirilmesi aşamasında sağladıkları katkılarla çalışmayı zenginleştiren Tez Savunma Sınav Jüri Üyesi hocalarım; Sayın Prof. Dr. Türker SAVAŞ'a ve Sayın Prof. Yasemin ÖNER'e çok teşekkür ederim.

Bu çalışmanın materyalini sağlayan Denizli tavuğu yetiştiricileri başta Denizli ili "Türkiye Süs Tavukları ve Bahçe Hayvanları Federasyonu" başkanı Sayın Hasan SAĞLAM, Ramazan SAĞLAM ve Mustafa SERTÜRK, ayrıca Gerze tavuğu materyalini sağlayan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Zootekni bölümü Sayın Doç. Dr. Umut Sami YAMAK hocama ve örnek toplama sürecinde desteklerinden ötürü Sayın Prof. Dr. Levent MERCAN hocama çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimim ve tez sürecimde her daim bana destek olan ve bıkmadan, usanmadan her soruma sabırla cevap veren ve bana verdiği destek, sevgi, hoşgörü, anlayış, saygı ve en önemlisi kıymetli yol arkadaşlığı yapan ekip arkadaşım Dr. Emine TOPARSLAN AKÇAY'a çok teşekkür ederim. Katkıların, desteğin ve en önemlisi yol arkadaşlığın için minnettarım.

Doktora eğitimimin son döneminde destek veren ekip arkadaşım doktora öğrencisi Gülsüm MANAV'a kıymetli yoldaşlığı için teşekkür ederim.

Lisans eğitimime başladığım günden bu yana maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, eğitim hayatıma devam etme fırsatını sunan manevi ailem Pervin-Sedat BULUT ailesine sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Antalya'da başladığım doktora eğitimime manevi olarak destek veren Berrin-Ömer ERSELCAN ve Elif-Abbas YILMAZ ailelerine sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Eğitim hayatıma başladığım günden bu yana maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, bana her daim azim, umut ve cesaret veren canım annem-babam, Gaffure-Abuzer BENER'e, ablam-kardeşim, Barış, Gülüzar, Ziya, Sultan, Şeyho ve Enver'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT iii
ÖNSÖZ v
AKADEMİK BEYAN x
SİMGELER VE KISALTMALAR xi
ŞEKİLLER DİZİNİ xviii
ÇİZELGELER DİZİNİ xxiii
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK TARAMASI 1
2.1. Yerli tavuk ırkları 1
2.2. Denizli tavuk ırkı 1
2.3. Gerze tavuk ırkı 2
2.3. Kanatlı immün sistemi ve hastalıklar 3
2.3.1. Tavuk toll benzeri reseptörü 1 (*ChTLR1*) 7
2.3.2. Tavuk toll benzeri reseptörü 2 (*ChTLR2*) 8
2.3.3. Tavuk toll benzeri reseptörü 3 (*ChTLR3*) 8
2.3.4. Tavuk toll benzeri reseptörü 4 (*ChTLR4*) 9
2.3.5. Tavuk toll benzeri reseptörü 5 (*ChTLR5*) 10
2.3.6. Tavuk toll benzeri reseptörü 7 (*ChTLR7*) 11
2.3.7. Tavuk toll benzeri reseptörü 15 (*ChTLR15*) 11
2.3.8. Tavuk toll benzeri reseptörü 21 (*ChTLR21*) 12
2.3.9. Toll benzeri reseptörlerin sinyal iletim mekanizması 13
2.4. Toll benzeri reseptörlerin hücresel yanıt sistemi bileşenleri 13
2.4.1. Transkripsiyon faktörü (NF-KB) 13
2.4.2. MyD88'e bağımlı ve bağımsız sinyal iletimi 14
2.4.3. Tümör nekroz faktör reseptörü ile ilişkili faktör 6 (TRAF6) 15
2.4.4. Moleküler çalışmalarda kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu, sekans ve analiz teknikleri 16
2.4.5. Kantitatif gerçek zamanlı RT-qPCR 19
2.5. Damlacık dijital polimeraz zincir reaksiyonu (ddPCR) 24
2.6. *İn vitro* hücre kültürü 25

2.6.1. Eritrosit 25
3. MATERYAL VE METOT 27
3.1. Materyal 27
3.1.1. Araç ve gereç 27
3.1.2. Tamponların ve solüsyonların hazırlanması 29
3.1.2.4. Primerlerin hazırlanması 29
3.2. Yöntem 30
3.2.1. Toll-benzeri reseptörlerin polimorfizmi 30
3.2.1.1. Kan örneklerinin toplanması 30
3.2.1.2. DNA ekstraksiyonu 30
3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) 31
3.2.3. Primerlerin tasarlanması ve kullanıma hazırlanması 32
3.2.4. Hücre kültürünün hazırlanması 33
3.2.4.1. Tavuk kan hücresi eritrositlerin canlılık testi 33
3.2.4.2. Hücre kültüründe kullanılacak stok solüsyonların hazırlanması 35
3.2.4.2.1. İnaktive fetal calf serumun (FCS) hazırlanması 35
3.2.4.2.2. Stok fosfat tamponlu tuz çözeltisinin hazırlanması 35
3.2.4.2.3. *İn vitro* eritrosit yıkama medyumunun hazırlanması 35
3.2.4.2.4. Hücre kültüründe kullanılacak ligandların hazırlanması 35
3.2.4.2.5. İnkübatörün hazırlanması 35
3.2.5. Hayvan materyali ve eritrosit hücrelerinin kültüre hazırlanması 35
3.2.6. RNA izolasyonu 37
3.2.7. Gen ekspresyonu için örneklerin cDNA sentezi 38
3.2.8. RT-qPCR analizi için kullanılacak primerlerin tasarlanması ve analize hazırlanması 39
3.2.9. Tavuk Toll benzeri reseptörlerin polimorfizmleri 41
3.2.10. Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) 43
3.2.11. Gerçek zamanlı-kantitatif polimeraz zincir raksiyonu (RT-qPCR) analizi 44
3.2.11.1. Primerler için standart eğri oluşturulması 44
3.2.11.2. RT-qPCR analizi ile genlerin ifadelerinin belirlenmesi 46
3.2.12. İstatistiki analizler 48

4. BULGULAR VE TARTIŞMA 51
4.1. DNA/RNA örneklerinin kalite ve kantite sonuçları 51
4.2. PCR analizi ile primerlerin kontrol edilmesi 52
4.3. Denizli ve Gerze ırklarının tavuk *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* ‘in polimorfizmi 53
4.3. Denizli ve Gerze tavuk kan örneklerinin hücre kültürü sonrası RT-qPCR analizi 82
4.3.1. Standart eğri 83
4.4. RT-qPCR analizi ile genlerin ifade seviyelerinin belirlenmesi 83
4.4.1. Tavuklarda immün sistemde görev alan genlerin polimorfizminin incelenmesi 91
4.4.2. Tavuklarda farklı konsantrasyonda hazırlanan poli I:C uygulama sonrası TLR genlerin ifade seviyelerinin incelenmesi 98
4.4.3. Tavuklarda farklı konsantrasyonlarda hazırlanan sentetik B sınıfı CpG ODN 2007 uygulama sonrası *TLR* genlerinin ifade seviyelerinin incelenmesi 99
5. SONUÇLAR 102
6. KAYNAKLAR 105
7. EKLER 131
ÖZGEÇMİŞ

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum "DENİZLİ VE GERZE TAVUK IRKLARINDA *TLR3, TLR4, TLR5* VE *TLR15* RESEPTÖRLERİNİN *İN VİVO* VE *İN VİTRO* ŞARTLARDA GENETİK POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI" adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

03/01/2025

LEYLA BENER

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

% : Yüzde

aa : Amino asit

Bç : Baz çifti

CO_2 : Karbondioksit

C_q : Kantitatif döngü eşik değeri

ddH_2O : Çift distile su

E : Eğim

G : Göreceli santrifüj kuvveti

M : Molar

Mg : Miligram

ml : Mililitre

mM : Milimolar

ng : Nanogram

^oC : Santigrat derece

R^2 : Belirtme katsayısı

Δ : Delta

µg : Mikrogram

µl : Mikrolitre

µM : Mikromolar

Kısaltmalar

A : Adenin

AIV : Kuş gribi virüsü

ALS : Alsever Solüsyon

B : Bursa Fabrisius kökenli hücre

C : Sitozin

cDNA : Tamamlayıcı DNA

ChTLR : Tavuk Toll Benzeri Reseptörleri

ChTLR1 : Tavuk Toll Benzeri Reseptörü1

ChTLR2 : Tavuk Toll Benzeri Reseptörü2

ChTLR3 : Tavuk Toll Benzeri Reseptörü3

ChTLR4 : Tavuk Toll Benzeri Reseptörü4

ChTLR5 : Tavuk Toll Benzeri Reseptörü5

ChTLR7 : Tavuk Toll Benzeri Reseptörü7

ChTLR15 : Tavuk Toll Benzeri Reseptörü15

ChTLR21 : Tavuk Toll Benzeri Reseptörü21

CPD : Sitrat-fosfat-dekstroz

CpG : Sitozin-fosfat-Guanin dinükleotidi

CpG-ODN : sitozine-fosfat-guanin oligodeoksinükleotid motifleri

CT-LRR : C- Terminal Lösince Zengin Tekrarlar

Cys : Sistein

DC : Dendritik Hücre

dDNTP : diDeoksiribonükleozit Trifosfat

ddPCR : droplet digital PCR

DEPC : Dietilpirokarbonat

DNA : Deoksiribonükleik asit

DNaz : Deoksiribonükleaz

DNTP : Deoksiribonükleozit Trifosfat

dsDNA : Çift zincirli DNA

E. Coli : *Escherichia coli*

EtBr : Etidyum Bromür

EtOH : Etil Akol

FAO : Dünya Tarım Örgütü

FCS : Fetal Calf Serum

FDC : Foliküler Dentritik Hücreleri

G : Guanin

GAPDH : Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz

H : Horoz

H5N1 : Kuş Gribi Suşu

HD11 : Tavuk makrofaj hücre hattı

HGP : İnsan Genom Projesi

IBDV : İnfeksiyöz bursal hastalık virüsü

IFN : İnterferon

IL : İnterlökin

IL-1 : İnterlökin 1

IRAK : İnterlökin-1 Reseptörü ile İlişkili Kinaz

İNOS : İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

LHMAE : Lalahan Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü

LNA : Kilitli Nükleik Asit Probu

LPS : Lipopolisakkarit

LRR : Lösince zengin tekraralar

MAPPK : Mitojenle aktifleştirilen protein kinaz

MD : Miyelin Farklılaşma

MD2 : Miyeloid farklılaşma proteini 2

MGB : Minör Oyuk Bağlama Probu

miRNA : Mikro RNA

mRNA : Mesajcı ribonükleik asit

mtDNA : Mitokonriyal DNA

MYD88 : miyeloid farklılaşma birincil yanıt geni 88

NCBI : Uluslararası veri bankası

ND : Newcastle hastalığı

nDNA : Nükleer DNA

NF-KB : Transkripsiyon faktörünü

NGS : Yeni Nesil Sekanslama

NKC : Doğal Öldürücü Hücreleri (Naturel killer cells)

NLRP3 : Lösince Zengin Tekrarlar İçeren Reseptör

NT-LRR : N-Terminal Lösince Zengin Tekrarlar

OECD : Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü

PAMP : Patojenle ilişkili moleküler modeller

PBMC : Periferal Mononükleer Kan Hücreleri

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PEDV : Domuz salgını ishal virüsü

PGN : Peptidoglikan

Poli(I:C) : Polisiyonik polisitidilik asit

PRR : Model tanıma reseptörleri

qPCR : Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RIP1 : Reseptörle etkileşime giren protein kinaz 1

RNA : Ribonükleik Asit

RNaz : Ribonükleaz

Rpm : Dakikadaki devir sayısı

RT-PCR : Ters Traskripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RT-qPCR : Gerçek Zamanlı-Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

S.E : *Salmonella Enteridis*

Sars-cov : Şidetli Akut Solunum Yolu Sendromu Virüsü

SNP : Tek Nükleotit Polimorfizmi

T : Timin

T : Tavuk

TAE : Tris Asetat EDTA

TAE : Tris Asetat EDTA

TAGEM : Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü

TAK1 : Dönüştürücü büyüme faktörü

TANK : Transkripsiyon Bağlayıcı Kinaz

Taq : Thermus Aquaticus

Tc : Sitotoksik T hücreleri

Th : Yardımcı T hücreleri

TIR : Toll/interleukin-1 receptor

Tm : Erime sıcaklığı

TNF-α : Tümör nekroz faktörü-a

TOB : Tarım Orman Bakanlığı

TRAF6 : Tümör nekroz faktör reseptörü ile ilişkili faktör 6

TRAM : TRİF ile İlişkili Adaptör Molekülü

TRAP : TIR Domainini İçeren Adaptör Protein

TSHF : Türkiye Süs Tavukları ve Bahçe Hayvanları Federasyonu

UCE : Ultra Korunmuş Lokuslar

vb : ve benzeri

vd : ve diğerleri

Tezde kullanılan ondalık sayılar “." ayracı ile belirtilmiştir.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Denizli tavuğu ve horozunun 15 haftalık renk varyetelerinden kırmızı 2

Şekil 2. 2. Gerze tavuğu ve horozu (Toparslan 2023'ten uyarlanmıştır.)..... 3

Şekil 2. 3. A) Toll-benzeri reseptörlerin hücresel konumu ve hücrede sinyal iletiminin şematik gösterimi. B) Bir Toll-benzeri reseptörünün yapısının şematik gösterimi (Gupta vd. 2014 ve Keestra, 2008' den uyarlanmıştır)..... 13

Şekil 2. 4. Tavuk toll benzeri reseptörlerinin hücredeki yerleri ve sinyal iletim şeması (Keestra vd. 2013'ten uyarlanmıştır) 15

Şekil 2. 5. Shotgun sekanslama şeması ve Pyrosekanslama tekniğinin gösterimi (Motahari vd. 2013'ten uyarlanmıştır)..... 17

Şekil 2. 6. Sanger dizileme metodu (Waters ve Lemaire, 2016'dan uyarlanmıştır) .. 18

Şekil 2. 7. Şematize edilmiş yeni nesil sekanslama (Aryal 2022 uyarlanmıştır)..... 19

Şekil 2. 8. Gen ifadesinin belirlenmesinde kullanılan üç farklı PCR analizinin reaksiyon basamakları; (A); RT-PCR, (B); qPCR, (C); RT-qPCR (Adams 2020' den uyarlanmıştır) 20

Şekil 2. 9. RT-qPCR analizi sonucu elde edilen erime eğrisi grafiği ve olası fragmentler (Toparslan 2023'ten uyarlanmıştır)..... 21

Şekil 2. 10. RT-qPCR analizi sonucunda elde edilen ΔCt grafiğinde tespit edilebilecek olası pikler..... 22

Şekil 2. 11. RT-qPCR analizinde gerçek zamanlı tespit sonrası oluşan başlama, üstel ve plato fazları 23

Şekil 3.2. 1. Polimorfizm için A) tavuk kanat altı toplar damarından kan alımı, B) kan örneklerinin serin ortamda laboratuvara taşınması C) Kan örneklerinden DNA izolasyonu D) DNA örneklerinin Biodropta konsantrasyon ve yoğunluğunun ölçümü..... 31

Şekil 3.2. 2. Polimorfizm için kullanılan polimeraz enzimi, PCR cihazı, jel elektroforez ve görüntüleme sistemi 31

Şekil 3.2. 3. *ChTLR4* için SnapGene programında birinci fragment geri ile ikinci fragment ileri primer dizi görüntüsü 33

Şekil 3.2. 4. Hücre canlılık testi için tavuktan kan alımı ve ALS solüsyonlarının eklenmesi..... 34

Şekil 3.2. 5. Eritrosit canlılık testinde 6. saat sonrası sürüntü oluşturma ve mikroskop altında canlı hücrelerin görüntüsü..... 35

Şekil 3.2. 6. Hücre kültüründe kullanılan kanın toplanması, eritrositlerin histopaque ile ayrımlanması 36

Şekil 3.2. 7. Hücrelerin T75 petrisinde inkübasyona bırakılması 36

Şekil 3.2. 8. Hücre kültürüne alınan eritrositlerin plate şablonu (A-B) ve inkübasyon sonrası eritrositlerin C) 1. saat sonrası ve D) 3. saat sonrası mikroskop altında görüntülenmesi (kırmızı halka içerisinde belirtilen hücreler ölü hücrelerdir) 37

Şekil 3.2. 9. Hücre kültürüne alınan örneklerin şablon üzerinde gösterimi 37

Şekil 3.2. 10. A) Hücre kültürü sonrası medyumu uzaklaştırılan eritrositler B) RNA izolasyonunda kullanılan ticari kit C) RNA izolasyonu için hazırlanan tüpler 38

Şekil 3.2. 11. RNA örneklerinin cDNA sentezinde kullanılan ticari kit 39

Şekil 3.2. 12. RT-qPCR analizinde kullanılan primerlerin tasarımı; A) GenBank veri tabanındaki *ChTLR3* geninin referans mRNA dizisi baz alınarak tasarlana 153 bç primer B) *ChTLR3* geninin ekzon dizilerinin GenBank veri tabanındaki bilgileri 41

Şekil 3.2. 13. Tabanındaki *ChTLR4* geninin referans mRNA dizisi baz alınarak tasarlanan 162 bç primerin Amplify4 Programına ait görsel 41

Şekil 3.2. 14. Standart eğri analizi için 1:10 oranında hazırlanan 5 farklı cDNA dilüsyonu. Tüplerin alt kısmında belirtilen konsantrasyonlar, dilüe edilmiş cDNA miktarlarını ifade etmektedir. Standart eğri analizinde her dilüsyondan 5 µl cDNA kullanılmıştır. Tüplerin üzerindeki konsantrasyonlar ise RT-qPCR analizinde kullanılan son cDNA yoğunluk miktarlarını göstermektedir. 45

Şekil 3.2. 15. Standart eğri analizi için kullanılan RT-qPCR cihazı, örneklerin plate şablonu ve SYBR Green tabanlı master mix 46

Şekil 3.2. 16. *GAPDH*, primeri için cDNA dilüsyon pik görüntüsü 46

Şekil 4. 1. Gerze ve Denizli tavuk ırklarına ait DNA örneklerinin *ChTLR3* primerinin üç fragmentine ait jel görüntüsü ……...53

Şekil 4. 2. *ChTLR3* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarına ait sekans dizisinin referans gen ile Mega11'de hizalanması 54

Şekil 4. 3. *ChTLR3* reseptörünün popülasyon içi popülasyonlar arası haplotip dağılımı. (*Gallus gallus* (GG), (Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ)). 55

Şekil 4. 4. *ChTLR3* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarında popülasyon arası haplotip nükleotit pozisyonu 55

Şekil 4. 5. *ChTLR3* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarına ait dendogram 56

Şekil 4. 6. *ChTLR3* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarına ait haplotip ağı 56

Şekil 4. 7. *ChTLR3* reseptörü polimorfizminin Denizli ve Gerze tavuklarına popülasyonlarında oluşturulan ısı haritası 57

Şekil 4. 8. *ChTLR3* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarının diğer popülasyonların haplotip nükleotit pozisyonu 57

Şekil 4. 9. *ChTLR3* reseptörünün Denizli ve Gerze tavukları ve diğer ırklara ait dendogram 58

Şekil 4. 10. *ChTLR3* reseptörünün Denizli ve Gerze tavukları ve diğer ırklara ait haplotip ağı 59

Şekil 4. 11. *ChTLR3* reseptörü polimorfizminin Denizli ve Gerze tavukları ve diğer popülasyonlara ait ısı haritası 60

Şekil 4. 12. *ChTLR3* reseptörünün protein sekans dizisinin Denizli ve Gerze tavuklarının diğer popülasyonlar ile hizalanması ile elde edilen görüntü 60

Şekil 4. 13. *ChTLR4* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarında popülasyon içi haplotip nükleotit pozisyonu 61

Şekil 4. 14. *ChTLR4* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarına ait sekans dizisinin referans gen ile Mega11'de hizalanması ve bu popülasyonlara ait dendogram (*Gallus gallus* (GG), (Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ)) 62

Şekil 4. 15. *ChTLR4* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarına ait haplotip ağı (Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ)) 62

Şekil 4. 16. *ChTLR4* reseptörü polimorfizminin Denizli ve Gerze tavuklarına ait ısı haritası 63

Şekil 4. 17. *ChTLR4* reseptörünün Denizli, Gerze ve diğer tavuklar ile popülasyon 64

Şekil 4. 18. *ChTLR4* reseptörünün Denizli, Gerze ve diğer tavuk popülasyonlarına ait dendogram 65

Şekil 4. 19. *ChTLR4* reseptörü polimorfizminin Denizli, Gerze ve diğer tavuk ırklarına ait ısı haritası 67

Şekil 4. 20. *ChTLR4* reseptörünün popülasyon içi ve popülasyonlar arası haplotip dağılımı 67

Şekil 4. 21. *ChTLR4* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarının protein sekans dizisinin amino asit dağılımından bir kesit 68

Şekil 4. 22. *ChTLR5* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarında popülasyon arası haplotip nükleotit pozisyonu 69

Şekil 4. 23. *ChTLR5* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarına ait sekans dizisinin referans gen ile Mega11'de hizalanması ve bu popülasyonlara ait dendogram (*Gallus gallus* (GG), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ)) 69

Şekil 4. 24. *ChTLR5* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarına ait haplotip ağı (*Gallus gallus* (GG), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ)) 70

Şekil 4. 25. *ChTLR5* reseptörü polimorfizminin Denizli ve Gerze tavuklarına ait ısı haritası 70

Şekil 4. 26. *ChTLR5* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarında popülasyon içi popülasyonlar arası haplotip nükleotit pozisyonu 71

Şekil 4. 27. *ChTLR5* reseptörünün popülasyon içi ve popülasyonlar arası haplotip dağılımı 71

Şekil 4. 28. *ChTLR5* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarında ve diğer popülasyonlara ait filogenetik dendogram 72

Şekil 4. 29. *ChTLR5* reseptörünün Denizli ve Gerze tavukları ve diğer ırklar ile kıyaslanmasından oluşturulan haplotip ağı 73

Şekil 4. 30. *ChTLR5* reseptörü polimorfizminin Denizli ve Gerze tavukları diğer popülasyonlarına ait ısı haritası 74

Şekil 4. 31. *ChTLR5* reseptörünün Denizli ve Gerze tavukları diğer popülasyonlara ait protein sekans dizisinin amino asit polimorfizmi 74

Şekil 4. 32. *ChTLR15* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarında popülasyon içi haplotip nükleotit pozisyonu 75

Şekil 4. 33. *ChTLR15* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarına ait sekans dizisinin referans gen ile Mega11'de hizalanması ve bu popülasyonlara ait dendogram (*Gallus gallus* (GG), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ)) 76

Şekil 4. 34. *ChTLR15* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarına ait haplotip ağı (*Gallus gallus* (GG), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ)) 76

Şekil 4. 35. *ChTLR15* reseptörü polimorfizminin Denizli ve Gerze tavuklarına ait ısı haritası 77

Şekil 4. 36. *ChTLR5* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarında popülasyon içi popülasyonlar arası haplotip nükleotit pozisyonu 78

Şekil 4.37. *ChTLR15* reseptörünün popülasyonlar arası alınan dendogram 78

Şekil 4. 38. *ChTLR15* reseptörünün Denizli ve Gerze tavukları ve diğer ırklar ile kıyaslanmasından oluşturulan haplotip ağı 79

Şekil 4. 39. *ChTLR15* reseptörü polimorfizminin Denizli ve Gerze tavukları ve diğer popülasyonlara ait ısı haritası..... 80

Şekil 4. 40. *ChTLR15* reseptörünün popülasyon içi ve popülasyonlar arası haplotip dağılımı 80

Şekil 4. 41. *ChTLR15* reseptörünün Denizli ve Gerze tavukları ile referans gen ve diğer tavuk ırkları ile Mega11'de kıyaslanması ile elde edilen resim 81

Şekil 4. 42. *ChTLR15* reseptörünün Denizli ve Gerze tavukları diğer popülasyonlara ait protein sekans dizisinin amino asit polimorfizminden bir kesit .. 82

Şekil 4. 43. Tavuk toll benzeri reseptör *ChTLR15*'in yapısı. Koyu mavi dikdörtgen transmembran protein alanını temsil eder ve yeşil bantlar patojenle ilişkili moleküler desen tanımada yer alan lösince zengin tekrarları (LRR) gösterir. Açık mavi daire C terminal LRR'yi (CTLRR) ve TIR (toll–IL-1) reseptörünü temsil eder. Analiz (SMART service;http://smart.embl-heidelberg.de) sağlanmıştır. 82

Şekil 4. 44. Gerze ve Denizli tavuk ırklarının 4 adet gen için 1. Saat ve 3. Saat elde edilen göreceli kantitatif mRNA seviyeleri (*: P<0.05, **: p<0.001). Görsel sırasıyla Denizli 1. Saat ve 3. Saat ve Gerze 1. Saat ve 3. Saat olarak verilmiştir (D: Denizli, G: Gerze, Kont. Kontrol grubu) 86

Şekil 4. 45. Gerze ve Denizli tavuk ırklarının 4 adet gen için 1. Saat ve 3. Saat elde edilen göreceli kantitatif mRNA seviyeleri (*: P<0.05, **: p<0.001). Görsel sırasıyla Denizli 1. Saat ve 3. Saat ve Gerze 1. Saat ve 3. Saat olarak verilmiştir (D: Denizli, G: Gerze, Kont. Kontrol grubu) 86

Şekil 4. 46. Gerze ve Denizli tavuk ırklarının 4 adet gen için 1. Saat ve 3. Saat elde edilen göreceli kantitatif mRNA seviyeleri (*: P<0.05, **: p<0.001). Görsel sırasıyla Denizli 1. Saat ve 3. Saat ve Gerze 1. Saat ve 3. Saat olarak verilmiştir (D: Denizli, G: Gerze, Kont. Kontrol grubu) 87

Şekil 4. 47. Gerze ve Denizli tavuk ırklarının 4 adet gen için 1. Saat ve 3. Saat elde edilen göreceli kantitatif mRNA seviyeleri (*: P<0.05, **: p<0.001). Görsel sırasıyla Denizli 1. Saat ve 3. Saat ve Gerze 1. Saat ve 3. Saat olarak verilmiştir (D: Denizli, G: Gerze, Kont. Kontrol grubu) 88

Şekil 4. 48. Gerze ve Denizli tavuk ırklarının 4 adet gen için 1. Saat ve 3. Saat elde edilen göreceli kantitatif mRNA seviyeleri (P<0.05, p<0.001) (D, Denizli ve G, Gerze, Kont. Kontrol grubu) 88

Şekil 4. 49. Denizli tavuk ırkının 4 adet gen için cinsiyete bağlı elde edilen göreceli kantitatif mRNA seviyeleri (P<0.05, p<0.001) ((D) Denizli, (G) Gerze, (T) tavuk ve (H) horoz) 89

Şekil 4. 50. Gerze tavuk ırkının 4 adet gen için cinsiyete bağlı elde edilen göreceli kantitatif mRNA seviyeleri (P<0.05, p<0.001) ((D) Denizli, (G) Gerze, (T) tavuk ve (H) horoz, Kont. Kontrol grubu) 91

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Deney gruplarına ait örneklem zamanları, ırklar ve birey sayıları 27

Çizelge 3. 2. Araştırmada kullanılan ekipmanlar ve kullanım amaçları 28

Çizelge 3. 3. DNA örneklerinin PCR bileşenleri ve miktarı..... 32

Çizelge 3. 4. PCR reaktifleri, sıcaklık, süre ve döngü sayısı 32

Çizelge 3. 5. Polimorfizm analizi için fragmentlerin dizisi, amplikon uzunlukları ve bağlanma sıcaklıkları..... 33

Çizelge 3. 6. cDNA kitinin bileşenleri ve miktarları 39

Çizelge 3. 7. qPCR analizinde kullanılan primerlerin dizisi, amplikon uzunlukları ve bağlanma sıcaklıkları..... 40

Çizelge 3. 8. RT-qPCR termal döngü, süre ve sayısı..... 43

Çizelge 3. 9. RT-qPCR'da kullanılan bileşenler 43

Çizelge 4. 1. Denizli ve Gerze tavuk ırklarına ait polimorfizm çalışılan örneklerin DNA saflık ve yoğunlukları …….…….....51

Çizelge 4. 2. Denizli ve Gerze tavuk ırklarına ait hücre kültürü çalışılan birinci bireyin birinci saat sonrası örneklerin RNA saflık ve yoğunlukları 52

Çizelge 4. 3. Denizli ve Gerze tavuk ırklarının hücre kültürü birinci bireyin üçüncü saat sonrası örneklerin RNA saflık ve yoğunlukları 52

Çizelge 4. 4. Gerze ve Denizli tavuk ırklarına ait farklı süre ve ligand uygulaması yapılan örneklem döneminden elde edilen C_q değerleri ile ΔC_q değerleri..... 83

Çizelge 4. 5. Gerze ve Denizli tavuk ırklarının cinsiyete ait (horoz ve tavuk) örneklerin C_q değerleri ile ΔC_q değerleri 83

1. GİRİŞ

İnsan beslenmesinde oldukça önemli, ucuz bir protein kaynağı olan tavuk eti, erişilmesi kolay temel bir gıda maddesi olarak yerini korumaktadır. Dünyada kümes hayvanlarının etinin uygun fiyatlı olması, hayvanların sağlığı, refahı, beslenmesi ve barınması gibi temel unsurlar kanatlı eti piyasasını daha sürdürülebilir hale getirmektedir (Mariadassou vd. 2021; Neeteson vd. 2023). Ayrıca kanatlı eti tüketiminin, 2032 yılında toplam et tüketiminin %41'ini oluşturması beklenmektedir (OECD 2022). Kanatlı yetiştiriciliği, 1940'ların sonlarında hız kazanmış ve yoğun bir şekilde entansif hibrit üretimi yapılmaya başlanmıştır (Escobedo vd. 2020). Hibrit tavuk üretimi, hızlı büyüme, yüksek yumurta ve et verimi özellikleri nedeniyle kapalı alanlarda yetiştiricilik maliyetlerini düşürme açısından tercih edilmiştir (Zanetti vd. 2010; Pellatiero vd. 2020). Ancak, kapalı alanlarda yetiştirilen kanatlıların, bulaşıcı hastalıkların sürü içinde hızla yayılması ve çeşitli stres koşulları gibi etkenlerle daha hassas hale geldiği bilinmektedir (Swayne 2013).

Dünyada bilinen yaklaşık 50.000 memeli ve kuş türünden yalnızca 40 kadarı evcilleştirilmiş olup, bu türler arasından 7.616'sı çiftlik hayvanlarından oluşmaktadır. Bu türlerden %9'unun nesli tükenmiş, %21'i yok olma riski taşımakta ve %36'sı hakkında ise yeterli bilgi bulunmamaktadır (FAO 2007). Türlerin yok olma süreci dikkate alındığında, bu durumun gelecekte dünya genelinde hayvan genetik kaynaklarını olumsuz yönde etkileyeceği öngörülmektedir. Bu kaygılar doğrultusunda, koruma için çeşitli önlemler alınması amacıyla hem küresel hem de ulusal düzeyde adımlar atılmıştır. Bu durum, 2007 yılında kabul edilen İnterlaken Deklarasyonu ile bir ivme kazanmış ve "Hayvan Genetik Kaynakları Küresel Eylem Planı" hayata geçirilmiştir. İnterlaken Deklarasyonu ile ülkeler, sahip oldukları hayvan genetik kaynaklarını korumak amacıyla; envanter oluşturma, karakterizasyon, politika geliştirme, altyapı ve kapasite geliştirme, ilgili risklerin izlenmesi, koruma, ıslah, sürdürülebilir kullanım ve geliştirme gibi stratejik konuları kabul etmişlerdir (FAO 2007; TAGEM 2009). Bu kapsamda, genetik kaynakların önemine dikkat çekmek amacıyla Birleşmiş Milletler Biyoçeşitlilik Sözleşmesi'nde "bugün veya gelecek için değer taşıyan genetik materyal" olarak tanımlanan genetik kaynaklar üzerine yapılan araştırmalar hız kazanmıştır (Jiang ve Groen 2000; Çanta ve İsmail 2004; Özdemir 2010; Chang vd. 2012; Jia vd. 2018; Soysal vd. 2020; Manyelo vd. 2020).

Kanatlı hayvan endüstrisi, küresel gıda arzındaki taleplerin değişiklik göstermesine rağmen yetiştirme koşulları ve ekonomik modeller açısından birtakım sorunları beraberinde getirmektedir. Ayrıca bu endüstride uygulanan iş modellerinin artan girdi maliyetleri, çözülmesi gereken önemli sorunlar arasında yer almaktadır. Kanatlı endüstrisini etkileyen başlıca olumsuz faktörler arasında yem kalitesindeki dalgalanmalar, tedarik zinciri sorunları, tüketici taleplerindeki değişiklikler ve hastalıklar yer almaktadır (Ramos ve Girish 2018). Bunun yanı sıra, hibritlerin hızlı gelişimi nedeniyle antibiyotik, hormon ve büyütme faktörleri gibi ürünlerin kullanımına dair algılar güven kaybı yaratarak endüstri üzerinde negatif etkilere neden olur (Devatkal vd. 2019). Kanatlı hastalıklarının ortaya çıkmasında ise coğrafi koşullar, yerleşim planlaması,

yönetim uygulamaları ve aşılama eksiklikleri gibi unsurlar etkili olmaktadır (Tadesse vd. 2005).

Tavuklarda görülen hastalıklar, yalnızca ölüm oranlarında veilaç masraflarında artışa, üretim ve pazar kaybına neden olmakla kalmayıp aynı zamanda zoonoz hastalıklar yoluyla halk sağlığı için ciddi riskler oluşturmaktadır (Wubet vd. 2019). Son yıllarda kanatlı sektörünü tehdit eden hastalıklar, yetiştiriciler için büyük ekonomik kayıplara yol açmış ve yerel gen kaynaklarını olumsuz etkilemiştir (Al Mamun vd. 2019). Bu durum tüketicilerde endişe yaratmış ve hayvan refahına verilen önemin artmasına neden olmuştur. Bu bağlamda, tüketici taleplerinin yerel ırklara yönelmesi artmıştır.

Yerli tavuk ırkları, kendine has özellikleriyle dikkat çekmektedir. Süs ve hobi amaçlı kullanımı, et kalitesi ve lezzeti ile zorlu iklim koşullarına dayanıklılık gibi özellikler, yerel tavuk ırklarını hem tüketicilerin hem de araştırmacıların ilgisini çeken bir konu haline getirmiştir (Mercan ve Okumuş 2004; Spalona vd. 2007; Özdemir 2010; Özdemir vd. 2013; Zhao vd. 2016; Özdemir ve Cassandro 2018; San vd. 2021; Zhang vd. 2018). Uzun yıllar boyunca yerel halk tarafından, bulundukları coğrafyaya uyum sağlama ve kültürel gereksinimlere cevap verme gibi özellikleri nedeniyle yetiştirilen yerli tavuk ırkları, entansif üretimde düşük verimlilikleri sebebiyle tercih edilmemiş ve bu nedenle sayılarında ciddi azalmalar yaşanmıştır (Spalona vd. 2007).

Yerli ırklar yetiştirildikleri coğrafyada çeşitli faktörlerin etkisiyle uzun yıllarda kazandıkları bazı avantajları, genetik iyileştirme, korunma ve üstün özelliklerinden yararlanma açısından yerel genetik kaynaklarının sunduğu avantajları ticari kanatlı üretiminde kullanma potansiyeline sahiptir. Ancak ticari üretimde seleksiyon yoluyla elde edilen yüksek verimli ırklar (saf hatlar) tercih edilmekte, yerli ırklar düşük verimleri nedeniyle ticari üretimde kullanılmamaktadır. Ayrıca, hastalıklar nedeniyle kanatlı popülasyonlarının itlaf edilmesi, yerel ırkların sayısında küresel ölçekte ciddi azalmalar yaratmıştır (Mtileni vd. 2012). Örneğin, dünya genelinde etkili olan kuş gribi (*Avian İnfluenza*) (Lupiani ve Reddy 2009), Türkiye'de de etkili olmuş ve "8/8/2006 tarihinde 26253 sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan Kuş Gribi ve İnsana Tesir Eden Salgına Karşı Hazırlık ve Mücadele Projesi (AIHP)" ikraz anlaşması kapsamında, kuş gribine karşı alınan önlemler çerçevesinde yapılan imha işlemleri sonucunda yerel genetik kaynaklarımızda önemli kayıplar yaşanmıştır (Öncul vd. 2006; Öner vd. 2006).

Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde ticari tavuk üretimini tehdit eden pek çok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler arasında yüksek ekonomik kayıplara yol açan kanatlı hastalıkları önemli bir yere sahiptir (Özdemir 2010; Bayraktar vd. 2019). Bu durum, sadece hibrit tavukları etkilemekle kalmayıp aynı zamanda Türkiye'de kırsal bölgelerde yerli tavuk yetiştiriciliğini sınırlamakta ve halkın geçim kaynaklarını olumsuz etkilemektedir. Bu durum ülkemizin önemli gen kaynakları arasında yer alan yerli tavuk ırklarının popülasyonlarında ciddi azalmalara neden olmakta ve bu ırklar yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmaktadır (Taşkesen 2010; Özdemir vd. 2013; Özdemir 2019).

Kanatlı hastalıkları viral, bakteriyel, mantar ve dış parazit kaynaklı olabilmektedir. Bu hastalıkların kontrol altına alınması ve önlenmesi ilk olarak aşıların

benimsenmesi ve biyogüvenlik önlemlerinin alınması gibi kümes yönetimi uygulamalarına bağlıdır. Yerli tavuk yetiştiriciliğinin yapıldığı ve "arka bahçe üretim" olarak adlandırılan üretim sistemlerinde hastalıkların kontrolü daha zor olmaktadır. Araştırmalar, bulaşıcı hastalıklara karşı dirençteki değişkenliğin açıklanmasında çiftlik hayvanlarının ve kuşların genetik çeşitliliğinin rolünün önem arz ettiğini ve saf olmayan popülasyonların saf olan popülasyonlara kıyasla hastalığa daha az duyarlı olduğunu bildirmişlerdir (Musako ve Abolnik 2012; Nawab vd. 2019; Sumantri vd. 2020; Simbizi vd. 2021). Yüksek genetik çeşitliliğe sahip olan tavuk ırk ya da ekotipleri patojenlere ve zorlu çevre koşullarına karşı daha iyi adaptasyon yeteneği göstermektedirler. Bu durum ülkelerin sahip oldukları yerli tavuk ırklarında hastalıklara karşı direncin altında yatan genetik potansiyelin daha iyi tanımlanmasını ve geliştirilmesini zorunlu hale getirmektedir.

Hayvan gen kaynaklarındaki genetik çeşitlilik, ülkeler için önemli bir zenginlik oluşturur. Uzun yıllar boyunca yaşadıkları bölgeye başarılı bir şekilde uyum sağlamış, hastalıklara direnç ve zorlu çevre koşullarına karşı yüksek yaşam gücü gibi üstün özellikler sergileyen yerli ırklar, verim özellikleri bakımından ekonomik açıdan daha az verimli oldukları için sürdürülebilirlikleri giderek zorlaşmaktadır. Hayvan gen kaynakları üzerine yapılan seleksiyon çalışmaları, kültür ırklarının gelişmesine yol açarken yerli ırklarda genetik çeşitliliğinin önemli ölçüde azalmasına neden olmuş ve pek çok ırkın yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmasına yol açmıştır (Aksoy 2001; Besbes vd. 2007; Jiang ve Groen 2000; Kaya 2008; Şekeroğlu ve Nihat 1997).

Türkiye, jeopolitik ve coğrafi konumu itibariyle tarihsel süreçte göç yolları üzerinde ticaretin, ulaşımın ve önemli genetik kaynak durumuna olan evcil hayvanların taşınmasında etkin bir rol oynamıştır (Özdemir 2019). Ancak, bu önemine rağmen Türkiye'de bugüne kadar resmi olarak tescil edilen tavuk ırkları yalnızca Denizli ve Gerze'dir. Her iki tavuk ırkı da farklı iklim ve çevre koşullarına başarılı bir şekilde uyum sağlamış ve uzun yıllardır yerel halk tarafından ilgiyle yetiştirilmektedir. Sinop ili Gerze ilçesinde lokal olarak yetiştirilen Gerze tavuk ırkının neslinin kritik seviyeye düştüğü, yapılan anket çalışmalarıyla bildirilmiştir (Özdemir 2019). Bu durum, yerli ırkımızın herhangi bir salgın veya afette yok olma riskiyle karşı karşıya olduğunu göstermektedir. Her iki yerli tavuk ırkı, Lalahan Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü (TOB LHMAE) bünyesinde 2009 yılında koruma altına alınmıştır (TAGEM 2009). Ayrıca, Gerze tavuk ırkı, Tarım ve Orman Bakanlığı'na bağlı Gerze İlçe Müdürlüğü'ne ait Gerze Tavuğu Üretme Çiftliği'nde de yetiştirilmektedir (Kaya ve Yıldız 2014; İlhan ve Muhammet 2022; Toparslan 2023). Denizli tavuk ırkı ise 2001 yılından itibaren, Denizli Tarım İl Müdürlüğü bünyesinde ve ülke genelinde damızlık hayvan talebini karşılamak amacıyla saf sürülerle üretimi yapılmaktadır (Aksoy 2001).

Son yıllarda biyoteknoloji ve moleküler genetik alanındaki çalışmalar hayvanlarda genomik, filogenetik, filocoğrafya, maternal ve paternal tanımlama gibi pek çok alanda ilerleme sağlamıştır (Mercan ve Okumuş 2004; Özdemir 2010; El-Sabrout vd. 2015; Jia vd. 2018; Özdemir ve Cassandro 2018; Toparslan 2023). Özellikle son yıllarda moleküler çalışmalardan yeni nesil dizileme (NGS) teknolojilerindeki gelişim, kanatlı evrimi ve kanatlıların fonksiyonel genom yapılarının incelenmesi için harika bir veri kaynağı sunmaktadır (Kraus ve Wink 2015). Moleküler tekniklerin gelişmesi ile birlikte

sadece SNP (Tek nükleotit polimorfizmi (single nucleotide polymorfzm)) bölgesi değil aynı zamanda tüm genom dizilemesi de mümkün olmuştur (Johansson ve Nelson 2015; Fan vd. 2023; Gu vd. 2024). Bu gelişmeler, birde son yıllarda DNA sekanslama teknolojisi genom araştırmalarına transkriptom (Xiao vd. 2021), gen (Cendron vd. 2021; Toparslan 2023), gen ifadesi (Li vd. 2010; Swaggerty vd. 2014), epigenom (farklılaşma ve gelişimle ilgili, sitozinin metilasyonu gibi DNA modifikasyonları) (Beacon ve Davie 2021; Gryzińska vd. 2013), filo-genetik (Yang vd. 2014; Yang vd. 2022) ve filo-coğrafik (Ajibike vd. 2017; Godinez vd. 2022) verilerinin çeşitli biyoinformatik araçlarla analizlerinin yapılmasına olanak sağlamıştır (Jarvis vd. 2014; Kraus ve Wink 2015; Suhardi vd. 2022).

Bugüne kadar Denizli ve Gerze üzerine, tavuk Toll-Benzeri Reseptörleri (*ChTLR*) ve gen ekspresyonu üzerine herhangi bir moleküler çalışma yapılmamıştır. Bu bağlamda gerçekleştirilen, bu doktora tez çalışması, Denizli ve Gerze tavuk ırklarına ait *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* reseptörleri üzerindeki polimorfizmlerini belirlemeyi ve bu ırklara ait kan hücrelerinin, özellikle eritrositlerin, hücre kültüründe farklı oranlarda hastalık ligandları ile muamelesinin etkilerini araştırmayı amaçlamaktadır. Ayrıca, farklı sürelerle yapılan hücre kültürü sonrası *GAPDH* (gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz), *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* reseptörlerinin gen ifadesi (mRNA) düzeyleri incelenmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Yerli tavuk ırkları

Yerli tavuk ırkları, dünya genelinde olduğu gibi Türkiye'de de farklı çevre koşullarına başarıyla adapte olmuş ve nesiller boyu yetiştiriciler tarafından farklı amaçlar doğrultusunda üretilen ırklardır. Bu ırklar, sosyo-ekonomik, kültürel, hobi, süs ve organik üretim gibi farklı amaçlarla yetiştirilmektedir (Egahi vd. 2010; Moges vd. 2010; Özdemir 2019; Manyelo vd. 2020). Türkiye'de de farklı coğrafi bölgelere uyum sağlayan ve önemli gen kaynakları arasında yer alan Denizli ve Gerze tavuk ırkları, sahip oldukları benzersiz özellikler (tüy rengi, etin lezzeti, uzun ötüş gibi) nedeniyle, yetiştiriciler tarafından ekonomik, besin, hobi ve eğlence gibi amaçlarla yetiştirilmektedir (Özdemir 2019).

Yerli tavuk ırklarının sahip olduğu bazı üstün özelliklerinin ekonomik olarak ticari üretimde kullanımının sağlanmasına yönelik çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu ırkların olası sahip olduğu yüksek adaptasyon, hastalık direnci ve yaşama gücü gibi özelliklerinden yararlanmak için ırkların biyolojik, morfolojik ve genetik olarak iyi tanımlanması gerekmektedir. Denizli ve Gerze tavuk ırkları üzerine bugüne kadar az sayıda çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalar Denizli ve Gerze tavuklarının yumurta kalitesi ve verim özelliklerinin araştırılması, bazı moleküler markerler kullanılarak genetik çeşitliliğinin araştırılması, Denizli ve Gerze horoz ve tavuklarının anatomik ve histolojik olarak incelenmesi, hastalıklarla ilişkilendirilen bazı lokuslardaki polimorfizmin araştırılması (SSR ya da PCR-RFLP markörleri kullanılarak) ve Gerze et lezzetine etki eden genlerin ekspresyonu üzerinedir (Şekeroğlu 1993; Şekeroğlu ve Nihat 1997; Mercan 2010; Lenger 2011; Fahdıl 2014; Özdemir vd. 2016; Meydan vd. 2017; Özdemir ve Cassandro 2018; İnce vd. 2018; Mercan vd. 2019; Alan vd. 2020; İlhan ve Muhammet 2022; Toparslan 2023). Literatür araştırmaları sonucunda Denizli ve Gerze ırklarına Tavuk toll benzeri reseptörlerinin (*ChTLR*) polimorfizmi ve hücre kültüründe gen ekspresyonu ile ilgili herhangi bir çalışma tespit edilmemiştir. Bu çalışma, "Denizli ve Gerze tavuk ırklarında *TLR3 TLR4 TLR5* ve *TLR15* reseptörlerinin *in vivo* ve *in vitro* şartlarda genetik polimorfizminin araştırılması" bakımından ilk olma niteliğini taşımaktadır.

2.2. Denizli tavuk ırkı

Türkiye, coğrafi konumu nedeniyle zengin bir biyoçeşitliliğe sahip olup, bu zenginlik içinde Denizli tavuk ırkı önemli bir yer tutmaktadır. Denizli tavuk ırkı, uzun yıllar boyunca Denizli ili ve çevresine başarıyla adapte olduğu düşünülen ve bu özellikleri sayesinde dikkat çekici bir genetik kaynaktır (Kaya 2008; Kaya ve Yıldız 2014; Özdemir ve Cassandro 2018; Özdemir 2019). Bu tavuk ırkı, tüy rengi, etin lezzeti, uzun ötüşü gibi farklı özellikleriyle yetiştiriciler tarafından hobi, süs, yumurta ve et üretimi gibi çeşitli amaçlarla yetiştirilmektedir. Denizli horozu özellikle uzun ötüşü ile tanınır ve bu özellik, onu hobi amaçlı yetiştiriciler için cazip kılmaktadır. Denizli tavuk ırkı, "pekmez kefi", "pamuk kırı", "demir kırı", "şarabi" ve "siyah" gibi farklı renk varyetelerine sahiptir. Ayrıca, siyah gözler, sürmeli, canlı ve parlak göz yapısı, yılan derisine benzer gri bacaklar, balta ibik yapısı, siyah gaga, kırmızı kulakçıklar veya kırmızı kulakçıklar

üzerindeki beyaz benekler gibi belirgin özellikler göstermektedir (Tatman 1971; Şekeroğlu ve Nihat 1997). Denizli tavukları, yaklaşık 8 ayda erginliğe ulaşmakta ve yıllık yumurta verimleri 80-100 adet arasında değişmektedir. Ağırlıkları 2-2,5 kg arasında olup, horozlar 6-7 aylıkken ilk ötüşlerini yapmaya başlar. Horozların dış görünüşü, yüksek bacaklar, uzun ve güçlü boyun, geniş göğüs yapısı, parlak ibik ve dik kuyruk özellikleriyle dikkat çeker (Şekil 2.1). Bu tavukların ötüş süreleri 15-16 saniye arasında olup, ses tonları ince, davudi ve kalın ses olarak üç sınıfa ayrılmaktadır (Şekeroğlu ve Nihat 1997; Atasoy 2000). Denizli tavuk ırkının canlı ağırlık açısından Rhode Island Kırmızısı ile benzerlik gösterdiği ancak yumurta verimi bakımından Leghorn, Fayoumi ve Dandarawi gibi yumurtacı tavuk ırklarından düşük olduğu bildirilmiştir (Atasoy 2000; Atasoy ve Gürcan 2000).

Şekil 2. 1. Denizli tavuğu ve horozunun 15 haftalık renk varyetelerinden kırmızı

2.3. Gerze tavuk ırkı

Gerze tavuk ırkı, Türkiye'nin Sinop ilinin Gerze ilçesine özgü bir yerli ırk olup, yörede "Hacıkadı" tavuğu olarak da bilinir. Bu ırk, bulunduğu coğrafyaya başarılı bir şekilde adapte olduğu düşünülmektedir. Gerze tavuklarının genel vücut özellikleri arasında çatal ibik, orta uzunlukta ve hafif tüylü yüz, her iki tarafta oldukça belirgin, büyük ve beyaz kulak lobları yer alır. Kulak lobları, kısa tüylerle çevrilidir. Gözleri kahverengi, yuvarlak ve orta büyüklükte olup, gri renkli gaga orta uzunluktadır ve büyük burun delikleri ile gaga üzerinde çıkıntılar bulunur. Vücut tamamen siyah tüylerle kaplıdır ve göğüs orta derinliktedir. Irkın dişilerinin boyun yapısı orta uzunluktayken, erkeklerde boyun daha uzundur. Her iki cinste de tüyler siyah renkte olup, ışık altında yeşil-siyah renkte görünmektedir. Ayak derisi beyaz olan bu ırkın geniş ve büyük kanat yapısı ile gösterişli kuyruk yapısına sahip olduğu gözlemlenir. Dişiler kısa bacak yapısına sahipken,

erkeklerin bacak yapısı daha sağlamdır. Erkeklerin bacakları incik, ayak derisi ve pulları gri renkte, tüysüz, dört parmaklı ve mahmuzludur (Şekil 2.2). Gerze tavuklarının yumurta kabuk rengi beyaz olup, yıllık ortalama 88 ± 6,35 adet yumurta verimi tespit edilmiştir. Yumurta ağırlıkları ise 49,62 ± 0,77 g'dır (Özdoğan ve Gürcan 2006). Ergin canlı ağırlık ise horozlarda 3,5-4 kg, dişilerde ise 2,7-3,5 kg arasında değişmektedir (Şekeroğlu ve Nihat 1997; Toparslan 2023).

Şekil 2. 2. Gerze tavuğu ve horozu (Toparslan 2023'ten uyarlanmıştır.)

Tescil edilmiş Denizli ve Gerze tavuk ırklarımıza ait ilk yazılı kaynak Salih Zeki (1931) tarafından yazılan "ASRÎ TAVUKÇULUK" kitabıdır. Bu kitapta o dönemlerde ülkemizde tavuk yetiştiriciliği ile ilgili "Maateessüf bugün nesilleri kesilen hakiki 'Gerze' ve 'Mısri' tavuklarıyla, tepeli Fizan, paçalı Nemse ırklarının pek çok meraklıları vardı. Yakışıklı ve nefis etli Hacıkadın tavuklarını, uzun ve kalın öten 'Denizli', ince ve uzun sesli 'Berat' horozlarını zevk için besleyenler çoktu." şeklinde bahsetmektedir (Ekimci 1931). Salih Zeki 1930'lu yıllarda Gerze tavuk ırkının neslinin tükenmek üzere olduğunu ve yine aynı kitabında bu ırkın "Hacıkadın" tavuğu olarak isimlendirildiği ve bu ırkın "etlerinin nefaseti ve şekillerinin zarafeti ile meşhur ırktır" olarak tanımlamış ayrıca Denizli, Berat ve Sultan tavuk ırklarına da değinmiştir (Ekimci 1931).

2.3. Kanatlı immün sistemi ve hastalıklar

Kanatlılar entansif sistemlerde yetiştirilmelerinden dolayı özellikle kanatlı hayvan sağlığı yetiştiricilerin öncelikli konuları arasında önemini korumuştur. Kanatlı hayvanlarda bağışıklık sistemi spesifik (sonradan kazanılan) ve spesifik olmayan (doğuştan gelen) olmak üzere iki temel mekanizmaya dayanmaktadır. Her iki mekanizmada da patojen etmenlere karşı inflamatuar yanıt başlatılarak hastalık etmeni ortadan kaldırılmaya çalışılmaktadır (Nawab vd. 2019). Kanatlı vücudunda hastalık etmenlerine karşı ilk yanıtı oluşturan ve hastalık etkeni ile karşılaştığı anda aktive olan immun savunma mekanizması doğuştan gelen savunma mekanizmasıdır. Bu yanıt esnasında mikroorganizmaların taşıdığı özgül moleküllerin immun sistem tarafından tanınmasını sağlamaktadır. Ancak hastalık etkenine özgü değildir. Hastalık etmeni mikroorganizmanın ortadan kaldırılmasında en etkili mekanizma sonradan kazanılan

(edinsel bağışıklık yanıt (hücresel/salgısal)) mekanizmalarının uyarılması ile sağlanmaktadır. Epitelyal bariyerler, fagositler (monosit/makrofaj, nötrofil vb) ve doğal savunmada rol alan hücreler ("natural killer cells", NKC) (Kaiser 2010; Hofmann vd. 2020) edinsel bağışıklık yanıt elemanlarını oluşturmaktadır (Zijpp vd. 1983; Wigley 2004; Berndt vd. 2007; Keestra vd. 2013; Paul vd. 2013; Paul vd. 2011; Wigley 2013; Nawab vd. 2019). Doğal bağışıklık yanıt sistemi hastalık etmenlerine karşı her zaman ilk kez karşılaşılıyormuş gibi savunmaya geçer. Edinsel bağışıklık ise dokulara enfekte olan mikroorganizmalara özgü moleküllerdir ve diğer yabancı antijenlere karşı ortaya çıkan hastalık etmenine özgü ve güçlü bir bağışıklık yanıtının ortaya çıkmasını sağlayan mekanizmalardır. Edinsel bağışıklık yanıtından sorumlu olan hücreler lenfositlerdir. Bunlar B (Bursa Fabrisius kökenli) lenfositleri ve bunların salgıları olan antikorlar hücre dışındaki (ekstraselüler) patojenlerin ortadan kaldırılmasında rol alırken, efektör T (Timus kökenli) lenfositleri (Kaufman 2021; Miller ve Taylor 2016) ise hücre içi (intraselüler) patojenlerin ortadan kaldırılmasında rol almaktadırlar (Davison, 2003; Zekarias vd. 2002b). Yalnızca omurgalılarda bulunan spesifik bağışıklık sistemi, B ve T hücreleri aracılığıyla patojen etmenleri tanıyarak adaptif bir bağışıklık tepkisi oluşturmaktadır (Davison 2003; Pattison vd. 2007; Kannaki vd. 2010; Duc vd. 2018; Nawab vd. 2019; Mahesh vd. 2020; Suklek vd. 2020). B ve T hücrelerinin hastalığı tanıma hafızası bulunmaktadır, hücrede tekrarlayan hastalık etmeni ile karşılaştıklarında daha hızlı ve etkili bir bağışıklık yanıtının oluşmasını sağlamaktadırlar (Broom ve Kogut 2019; Kaufman 2021; Zekarias vd. 2002b).

Hastalıklar ile mücadelede, edinilmiş bağışıklıkta B-lenfositlerinin oluşturduğu antikorlar, patojen ve patojenlerin oluşturduğu inflamasyonunun ortadan kaldırılmasında etkin rol oynamaktadırlar. B lenfositleri dolaşım, gastrointestinal sistem, solunum sistemi ve genitoüriner sistemlerin mukozal salgılarında bulunan antikorlar enfeksiyona neden olan mikroorganizmalarla savaşarak bunların çoğalmasını ve dokulara invazyonunu engellemektedirler. T-lenfositleri ise hücrede hem fagositlerin aktive edilip doğal immun yanıt mekanizmalarının uyarılmasında, hem de B-lenfositlerinin aktive edilip hücresel salgı salınımına dayalı bağışıklık mekanizmalarının çalışmasını sağlamaktadırlar. Hücresel immun yanıtında T-lenfositleri sadece protein yapıdaki antijenlerin tanınması ve onlara karşı yanıt oluşturulmasında rol oynarlar. Enfeksiyon durumunda hücresel yanıt mekanizmasının antijeni tanıma ve antijene özgü bağışıklık yanıtının aktive olmasında rol alan B ve T-hücreleri, antijen ile karşılaştıklarında efektör hücrelere veya antijene özgü bağışıklık mekanizmasını aktive ederek antijenin ortadan kaldırılması için antikor ve sitokin salınımını artırırlar. Periferal lenfoid organlarda ayrı ayrı lokalize olan B ve T hücreleri, lenf bezinde, B-lenfositleri folliküllerde, folliküler dendritik hücrelerle (FDC) bulunmaktadırlar. Hücrede B-lenfositleri herhangi bir antijen tarafından uyarıldığında FDC'ler, B-lenfositlerinin salgıladığı sitokin salgısı ile B-lenfositleri folliküllere yerleşir. T-lenfositleri ise follikülün hemen dışında, "parakorteks" antijen salınımı yapan dendritik hücrelerle birlikte bulunması kemokin üretimini sağlamaktadır. Lenfosit hücreleri, herhangi bir antijen ile aktive olduğunda kemokin reseptörünün ekspresyonunun azalması ile T ve B lenfositleri birbirlerine doğru yaklaşarak follikül sınırında karşılaşırlar (Abbas vd. 2019). T hücrelerinin uyarımı ile B-lenfositlerinin plazma hücrelerine dönüşerek antikor salgılanması başlar. Dokular arasında her zaman bulunan lenfositler, dokuda enfeksiyon oluşması durumunda etkenin elimine edileceği alana doğru göç T-

lenfositlerinde daha belirgin olarak gözlemlenmektedir. T-lenfositleri lenf nodlarına yerleşen antijenlerle karşılaştığında aktive olur, farklılaşır ve çoğalırlar.

Farklılaşma esnasında eksprese olan adezyon molekülleri ve kemokin reseptörleri değişime uğrayarak kana karışır, enfeksiyon etmeninin bulunduğu dokuya gider ve böylece mikroorganizmanın ortadan kaldırılmasında rol alır. Efektör B-lenfositleri lenfoid organlarda kalır ve burada salgıladıkları antikorlar kana karışarak hastalık etmeninin bulunduğu alana (hücre/doku) ulaşır ve hastalık etmeni ile savaşır (Abbas vd. 2019). Yardımcı T-hücreleri (Th) sitokin salgılanmasında, sitotoksik T-hücreleri (Tc) konak hücrelerinde oluşan sitotoksik etkilerinin ortadan kaldırılmasında rol alırlar. Antijen ortadan kaldırıldıktan sonra hücrede antijenin aktive ettiği efektör hücrelerinin çoğu apoptoz ile öldükten sonra fagositler tarafından ortadan kaldırılırlar. Geride kalan hücreler organizmada ilgili hastalığın tanınmasında rol alan hafıza hücrelerini oluştururlar. Hafıza hücreleri organizmada uzun yıllar kalabilmekte ve tekrar aynı antijen ile karşılaştığında hücrede hızlı bir şekilde bağışıklık yanıtını oluşturur (Kaufman 2021; Miller ve Taylor 2016; Abbas vd. 2019).

Kanatlılarda ve memelilerde bağışıklık tepkileri benzerlik göstermekte, ancak immünolojik hücreler, genler, lenfoid doku ve antikorlar (granülosit varlığı, nötrofil ve eozinofil eksikliği gibi) farklılık gösterebilmektedir (Barjesteh vd. 2016; Barjesteh vd. 2019). Çoğunlukla kapalı kafes ve dar alanlarda yetiştiriciliği yapılan tavuklar arasında mikroorganizmaların neden olduğu hastalıklar hızla yayılım göstermekte ve popülasyonun ciddi bir şekilde olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır. Tavukların ticari öneminden dolayı kanatlı sağlığı (bağışıklık ve hastalıklar) ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Jovanović vd. 2002; Davison 2003; Muir ve Aggrey 2003; Zhou ve Lamont 2003; Akira vd. 2006; Oner vd. 2006; Higgs vd. 2006; Akira vd. 2006; Woods vd. 2009; St. Paul vd. 2012; St Paul vd. 2013; Wigley 2013; Swaggerty vd. 2014; Swaggerty vd. 2014; Smith vd. 2015; Wieczorek vd. 2017; J. Zhang vd. 2018; Nawab vd. 2019; Silva ve Gallardo 2020). Bu çalışmalarda etkin olarak çeşitli bakteri, virüs ve parazit kaynaklı hastalıkların immun yanıtında rolü olan genler üzerine çalışılmıştır.

Tavuklarda kuluçka sonrası kazanılan bağışıklık mekanizmasını aydınlatmaya yönelik ilk çalışmalardan bir tanesi de Toll benzeri genler üzerine yapılmıştır. İlk Toll geni, yetişkin meyve sineklerinde (*Drosophila melanogaster*) spesifik olmayan bağışıklık sisteminin mantar enfeksiyonlarına karşı tepki incelenirken keşfedilmiştir (Lemaitre vd. 1996; Leulier ve Lemaitre 2008; Nawab vd. 2019). 1981 de ilk antimikrobiyal peptit keşfedilmiş (Steiner vd. 1981) ve 1985 yılında Alman bilim insanlarının laboratuvarda sirke sineği embriyolarında çalışma yaparken embriyonun farklı bir şekilde gelişimini sağlayan gen için harika anlamına gelen “das ist ja toll” “thats great” kullanılmış ve böylece literatüre toll olarak geçmiştir. Toll benzeri reseptörün (TLRs), *Drosophila melanogaster*'ın toll proteininden kaynaklandığı ve yalnızca *D. melanogaster* dorsoventral organında polarite oluşumu sürecine katılımı ve aynı zamanda *D. melanogaster*'ın doğrudan mikrop enfeksiyonuna karşı doğal bağışıklık üretmesine aracılık edebildiği bildirilmiştir (Anderson vd. 1985; Volhard 2022; Weiss ve O’Neill 2022). Toll geni ilk kez 1988 de klonlanmış ve bu genlerin özellikleri ve farklı organizmalardaki görevleri üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır (Takeda ve Akira 2015; Brennan ve Gilmore 2018; Nawab vd. 2019; Weiss ve O’Neill 2022). Daha sonra

omurgalı genomunda (memeli, Zebra balığı ve tavuk) Toll-benzeri reseptörler (TLR) ile ilgili yapılan çalışmalar da bir dizi TLR geni tanımlanmıştır (Aderem ve Ulevitch 2000; Roach vd. 2005; Nawab vd. 2019; Suklek vd. 2020).

Çoklu gen ailesi olan TLR'ler, organizmalarda mikrobiyal enfeksiyonun anahtar sensörleri konumundadır. Bu reseptörler enfeksiyon durumunda hücresel ilk yanıt oluşumunda enfeksiyona karşı ilk savunma hattını oluştururlar. Buradaki görevleri, adaptif bağışıklık sistemi devreye girmeden önce enfeksiyonun kontrol altına alınması veya ortadan kaldırılmasıdır (Brownlie ve Allan 2011; Volhard 2022). TLR ailesi hem omurgasız hem de omurgalılarda spesifik olmayan bağışıklık sistemi reseptörlerinin tanınmasında rol almaktadırlar (Kaiser 2010). Hastalık etmeni patojenin immun sistemine tanıtılmasında rolü olan TLR'ler hem hücre içinde hem de hücre dışında çeşitli mikrobiyal ligandları tanırlar (Nawab vd. 2019). TLR'ler patojenlerin temel bileşenleri olan lipopolisakkarit, lipopeptit, peptidoglikan, flagellin, bakteriyel DNA ve viral çift sarmallı RNA'yı (dsRNA) patojenle ilişkili moleküler modeller (PAMP) olarak bilinen korunmuş mikrobiyal uyaranlar aracılığıyla tanır ve bunlara yanıt olarak kodlanırlar. Bu nedenle bu reseptörler model tanıma reseptörleri (PRR) olarak da tanımlanmaktadır (Akira 2004; Temperley vd. 2008). Hem omurgalılar hem de omurgasızlarda bulunan spesifik olmayan bağışıklık sisteminde patojenler, yapısal olarak korunmuş olan PRR'ler aracılığıyla tanınmaktadır (Jin ve Lee 2008; Ruan vd. 2015; Nawab vd. 2019). Bugüne kadar sığır (Cargill ve Womack 2007; McGuire vd. 2006), koyun (Chang vd. 2009; Menzies ve Ingham 2006), köpek (Chang vd. 2009; Swerdlow vd. 2006), fare (12 TLR) (Chang vd. 2009), domuz (Shinkai vd. 2006) ve tavuk (Paul vd. 2012; Temperley vd. 2008) dahil olmak üzere çiftlik hayvanlarında 10 TLR geni tanımlanmıştır (Mucha vd. 2009; Chuang ve Ulevitch 2000; Ballingall vd. 2010; Kannaki vd. 2010; Tirumurugaan vd. 2010; Keestra vd. 2013; Dhanasekaran vd. 2014; Nawab vd. 2019; Noh vd. 2020). Tavuklarda hastalık etmenlerinin önemli ekonomik kayıplara yol açması sebebiyle tavuklara özgü TLR genleri üzerine bağışıklık tepkisi ve bunların hastalık direncindeki rolleri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Medzhitov 2001; Akira vd. 2006; Temperley vd. 2008; Jin ve Lee 2008; Keestra 2008; Kannaki vd. 2010; Ruan vd. 2012; Boyd vd. 2012; Schat vd. 2013; Ruan vd. 2015; Wang vd. 2016; Abdul-Cader vd. 2017; Velová vd. 2018 Dar vd. 2018; Nawab vd. 2019; Gupta vd. 2020; Mahesh vd. 2020; Suklek vd. 2020; Bener ve Özdemir 2020; Kannaki vd. 2021).

Tavuklarda enfeksiyon durumunda spesifik olmayan bağışıklığının patojen varlığının saptanması ve kontrol altına alınması hastalık sürecinin önemli bir aşamasıdır. Spesifik olmayan bağışıklığın aktivasyonunda önemli olan tavuk TLR (*ChTLR*) reseptörleri hastalık etmenlerini tanımaktadır. Evrimsel olarak korunmuş özelliklere sahip ve patojenlere karşı konakçı hücrede yanıt vermeye aracılık eden *ChTLR*'lerinin tür içinde varyasyonlara sahip olduğu bildirilmiştir (Medzhitov 2001; Paul vd. 2011; Paul vd. 2013; Nawab vd. 2019). Yapılan filogenetik analizler, *ChTLR*'lerinin memeli ve balıklar ile ortolog özellik gösterdiği tespit edilmiş (Temperley vd. 2008) ve 10 farklı *ChTLR (ChTLR1*(alt tip 1-2), *ChTLR2*(1-2), *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5, ChTLR7, ChTLR15* ve *ChTLR21*) belirlenmiştir (Temperley vd. 2008; Velová vd. 2018; Nawab vd. 2019; Wigley 2021). Bu reseptörlerden beş tanesinin (*TLR2a, TLR2b, TLR4, TLR5, TLR7*) insanlar ve fareler ile ortolog olduğu bildirilmiştir (Gupta vd. 2014; Nawab vd.

2019). Ayrıca *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR7* diğer omurgalılar ile de doğrudan ortolog özellik gösterdiği (Velová vd. 2018) ve *ChTLR15* filogenetik olarak *TLR2* ile ilişkili olduğu ancak tavuklara özgü bir reseptör olduğu bildirilmiştir (Temperley vd. 2008). *ChTLR21'*in balık ve amfibiler ile ortolog olduğu bildirilmiştir (Nawab vd. 2019).

Tavuklarda tanımlanmış olan *ChTLR* ailesi bulundukları yere bağlı olarak hücre yüzeyinde ve hücre içi kompartımanlarda bulunanlar olmak üzere iki aileden oluşmaktadır. Hücre yüzeyinde bulunan *ChTLR1* (alt tip 1-2), *ChTLR2* (alt tip 1-2), *ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* reseptörleri, esas olarak lipidler, lipoproteinler ve peptidoglikan gibi mikrobiyal membran bileşenlerini tanımaktadır. *ChTLR3, ChTLR7* ve *ChTLR21* ise hücre içi bölmelerde lokalize olmuş ve bazı viral hastalıklar ile ilişkilendirilmişlerdir (Şekil 1.3A) (Karpala vd. 2008; Ruan vd. 2012; Ruan vd. 2015; Nawab vd. 2019). Yapılan çalışmalarda, *ChTLR* reseptörlerinin tavuklarda dalak, bursa fabricius, karaciğer, yumurtalık, kan ve testis gibi çeşitli doku ve hücrelerde farklı seviyelerde ifade edildiği bildirilmiştir (Yilmaz vd. 2005; Ruan vd. 2015; Neerukonda ve Katneni 2020; Suklek vd. 2020). Bu reseptörler ile ilgili tavuklarda farklı doku ve hücrelerde yapılan araştırmalar, *ChTLR*'lerin hem virüs hem de bakteri kaynaklı hastalık etmenine karşı immun yanıtın oluşmasında rol aldıkları bildirilmiştir (Beutler 2005; de Iqbal vd. 2005a; Kogut vd. 2005; Philbin vd. 2005; Thitithanyanont vd. 2007; Zoete vd. 2010; Brownlie ve Allan 2011; Keestra vd. 2013; Cheng vd. 2017; Ruan vd. 2012; Velová vd. 2018; Suklek vd. 2020). Kısaca TLR'ler; 1) Lipopolisakkaritlerin (LPS), lipopeptitlerin, flagellinlerin, dsRNA veya sitozine-fosfat-guanin oligodeoksnükleotit (CpG) DNA motiflerinin tanınması ve konakçının immün yanıtını oluşturulmasında önemli rol oynarlar (Werling 2009). 2) TLR'ler nematodlarda, böceklerde, bitkilerde, balıklarda, memelilerde ve kuşlarda homologları bulunmaktadır ve evrimsel süreçte korunmuşlardır (Beutler 2002). 3) Önemli rolleri olan ve tanımlanan TLR genleri, tavuk ve balıklar da dahil olmak üzere omurgalılarda tanımlanmıştır (Roach ve KD 2005). 4) Günümüzde *TLR1* (tip1 ve tip2), *TLR2* (tip1 ve tip2), *TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR15* ve *TLR21* kanatlı TLR ailesinde 10 üyesi tanımlanmıştır (Yilmaz vd. 2005). 5) Kanatlılarda bulunan *TLR1* (tip1 ve tip2), memeli *TLR1* ve *TLR6* ile kanatlı *TLR2* (tip1 ve tip2), memeli *TLR2* ile ortolog özelliğe sahiptirler (Yilmaz vd. 2005). 6) Kanatlı *TLR3, TLR4, TLR5* ve *TLR7*, diğer omurgalı TLR'leri ile doğrudan ortolog özelliktedirler (Nawab vd. 2019). 7) Kanatlılara özgü olan *TLR15* ve *TLR21*, balık ve amfibilerin *TLR21*'i ile ortologtur (Brownlie ve Allan 2011; Temperley vd. 2008). İnsan beslenmesinde önemli protein kaynağı olan tavuklarda belirlenen 10 *ChTLR* üyesi (Higuchi vd. 2008; Nawab vd. 2019; Paul vd. 2013) ile ilgili bilgi sırasıyla aşağıda verilmiştir.

2.3.1. Tavuk toll benzeri reseptörü 1 (*ChTLR1*)

Tavuklarda tanımlanan *ChTLR1*'in amino asit dizilerinin, insan *TLR1* ve *TLR6* ile büyük benzerlik göstermesi nedeniyle bu reseptör, *ChTLR1* (Tip 1) (uzun yapı) ve *ChTLR1* (Tip 2) (kısa yapı) olarak adlandırılmıştır (Ruan ve Zheng 2011; Yılmaz vd., 2005). *ChTLR1*'in bu iki alt tipi, tavuklarda hemen hemen tüm dokularda ifade edilmektedir. *ChTLR1* (Tip 1) uzunluğu 7188 baz çifti (bç), *ChTLR1* (Tip 2) ise 7959 bç uzunluğunda olup, her ikisi de 4. kromozom üzerinde bulunmaktadır (NCBI 2023a; NCBI

2023b; Yılmaz vd. 2005). Hücrelerin transmembran yüzeyinde bulunan *ChTLR1* (Tip 1 ve Tip 2), lipoprotein özelliği taşıyan yapılarıyla bakteriyel kökenli hastalık etmenlerine karşı inflamasyon oluşturarak yanıt verir. Gram-pozitif bakterilerden kaynaklanan hastalıklara duyarlılıkla ilişkilendirilmiştir (Yılmaz vd. 2005; Hawn 2007; Wurfel 2008). Genetik varyasyon sergileyen bu reseptör, sepsiste organ fonksiyon bozukluğu ve bazı hastalıkların riskini etkileyebilmektedir. Örneğin, insan *TLR1*'in I602S varyantı, cüzzam vakalarının azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (Johnson 2007). Tavuklarda ise *ChTLR1* (Tip 1 ve Tip 2), patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı lipidlerin (örneğin N-palmitoil-S-dipalmitoilgliseril ve Cys-Ser-(Lys)) tanınmasında rol oynar (Jin 2008). Çeşitli çalışmalarda farklı tavuk ırklarında *ChTLR1* varyasyonunun korunduğu ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı duyarlılık ile direncin bu reseptörle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Ruan ve Zheng 2011)

2.3.2. Tavuk toll benzeri reseptörü 2 (*ChTLR2*)

Çeşitli türlerde tanımlanan *ChTLR2* ve *ChTLR1, TLR6* ile heterodimer oluşturabilir ve peptit komplekslerinin sinyal iletiminde aktif rol oynar. *ChTLR2* (Tip 1) 29,504 bç (NCBI 2023d), *ChTLR2* (Tip 2) ise 17,739 bç uzunluğundadır (NCBI 2023c). Her iki tip de 4. kromozom üzerinde bulunur. Moleküler analizi tam olarak yapılmamış olan *ChTLR2,* memeli *TLR2*/*TLR1* ve *TLR2*/*TLR6* ile karşılaştırıldığında daha geniş ligand özgüllüğüne sahiptir ve *ChTLR1* ile benzer protein izoformlarına sahiptir (Ruan ve Zheng; 2011 Keestra vd. 2013). Tavuklarda ileum ve dalak gibi farklı dokularda bulunur ve farklı ırklar arasında gözlenen varyasyonun hastalığa dirençlilikte etkili olduğu belirtilmiştir (Ruan vd. 2012; Nawab vd. 2019). Bununla birlikte *ChTLR1* ve *ChTLR2,* peptidoglikan (PGN), liposakkarit (LPS) ve lipid gibi bakteriyel bileşenleri tanımada rol oynar (Ruan vd. 2015).

2.3.3. Tavuk toll benzeri reseptörü 3 (*ChTLR3*)

Hücre içerisinde lokalize olan *ChTLR3*, çift sarmallı RNA'yı (dsRNA) tanıyan bir reseptördür ve Poli(I:C) (polisiyonik polisitidilik asit) analoğu ile çalışır. 4. kromozom üzerinde 12,497 bç uzunluğunda olup (NCBI 2023e) viral hastalıkların direnci ile ilişkilendirilmiştir (Ruan vd. 2015; Nawab vd. 2019). *ChTLR3*, farklı tavuk ırklarında genetik varyasyon göstermekte ve bu varyasyon hastalıklara karşı duyarlılığı etkileyebilmektedir (Huang vd. 2012). *ChTLR3,* poli(I:C) ile çift sarmallı RNA bağlanması sonucu hücre yüzeyiyle etkileşime girerek homodimerizasyonu tetikler ve Tip 1 interferon (IFN) eksprese eden TRIF sinyal yolunu aktive eder (Yamamoto vd. 2003). Tip I interferonlar, viral enfeksiyonlara karşı koruma sağlamada önemlidir. poli(I:C) uygulanan tavuk hücrelerinde *ChTLR3* aktivitesi ile Tip I IFN üretimi artırılırken, gen susturulduğunda bu yanıtın baskılandığı bildirilmiştir (Karpala vd. 2008). Tavuklarda poli(I:C) içerikli aşıların kuş gribi, Marek hastalığı ve Newcastle hastalığına karşı adjuvan etkisi olduğu tespit edilmiştir (Liang 2013; Nawab vd. 2019; Parvizi 2012). poli (I:C)'nin hücre içi kompartımanlara lokalizasyonu nedeniyle, sinyal iletimi MyD88'den bağımsız gerçekleşir ve NF-κB, sitokin ile Tip I IFN indüksiyonu sağlanır (Kawai ve Akira 2007). *ChTLR3*'ün polimorfizminin hastalıklarla ilişkisini incelemek, bu reseptörün yerli tavuk ırklarındaki genetik potansiyelini anlamak açısından önemlidir.

2.3.4. Tavuk toll benzeri reseptörü 4 (*ChTLR4*)

Tavuk *TLR4*, 17. kromozom üzerinde 11.092 bç uzunluğunda (NC_052548.1 *Gallus gallus* isolate bGalGal1 chromosome 17), tavuklarda farklı doku ve hücrede immun savunma sisteminde rol oynamaktadır (NCBI 2023f). Tavuklarda *Bursa Fabricius*, dalak, akciğer ve hücrelerde eksprese olmaktadır. *ChTLR4* tavuklarda hücre membranında MD kompleksi (Miyelin farklılaşma kompleksi) ile birlikte hücresel yanıt mekanizmasında, ana ligandı bakteriyel liposakkaritin (LPS) tanınmasında rol oynar (Ruan vd. 2015). LPS'ler hücre dışı proteinlerle etkileşiminden (*TLR4* +CD14 +MD2), CD14 (farklılaşma kümesi 14) ve MD2'den (miyeloid farklılaşma proteini 2) oluşan bir komplekstir. *ChTLR4*/MD kompleksinin dimerizasyonu ve aktivasyonu, bakteriyel ligand zincirlerinin uzunluğuna, sayısına ve bakteriyel glikolipidin fosforilasyon olup olmamasına göre değişiklik göstermektedir (Hajjar vd. 2002; Ohto vd. 2012). Hücrelerin LPS'ye yanıt vermesi, insan ve murin *TLR4* kompleksi, farklı LPS formlarına karşı farklı ligand özgüllüğü sergilemektedir (Steeghs vd. 2008). Dolayısıyla hücre yüzeyinin membranında *ChTLR4*/MD2 kompleksinin bulunması bakteriyel LPS'ye yanıt verdiğinin kanıtıdır (Keestra vd. 2013). Yapılan çalışmalarda memelilerde bulunan CD14'ün serum proteini olan liposakkarit bağlayıcı proteinden MD-2/*TLR4* kompleksine LPS'nin transferini kolaylaştırdığı ve tavuklarda da varlığı tartışılan CD14 ortologunun benzer işlev yapabileceği düşünülmüştür (Wu vd. 2009; Keestra ve Putten 2008). *ChTLR4* ve MD-2 kompleksi, %43 ve %31 oranında insan ortoloğu ile homolog özellik göstermektedir. ChCD14 ile insan CD14 %34 benzer protein homolojisine sahiptir ve korunmuş LRR'ler (lösince zengin tekrarlar) ve sisteinler gibi çeşitli yapısal özellikleri paylaşmaktadırlar (Nawab vd. 2019). Memelilerde hücre içi sinyal yolakları MyD88/TIRAP ve TRAM/TRIF bağlı olarak iki farklı şekli ile *TLR4* diğer reseptörlerden ayrılmaktadır (O'Neill ve Bowie 2007). Bu sinyal yolaklarından MyD88/TIRAP'ın aktivasyonu, hücrede erken NF-kB (Nükleer faktör-kB) aktivasyonuna ve proinflamatuar özellikteki sitokinlerin üretimini sağlar. TRAM/TRIF sinyal yolağının aktivasyonu ise NF-kB aktivasyonu ve IRF3'ün aktive olmasıyla sonuçlanır. Bu transkripsiyon faktörleri hücrede endotoksik şok gelişiminde önemli olan tip1 interferon üretimini uyarmaktadır (Karaghiosoff vd. 2003). Tavuklarda MyD88 ve TRIF ortologları olduğu fakat *ChTLR4* ve TRIF arasında bulunan ve köprü görevi gören protein yapıdaki TRAM'dan yoksun olabileceği düşünülmüştür. Hücrede TRAM'ın eksikliğinin olması durumunda bakteriyel LPS'ye yanıt veren IFNb transkripsiyonunun meydana gelmemesi ve bu durumda tavukta LPS'in neden olduğu toksik etkilere karşı direnç göstermesine katkı sağlayabileceği bildirilmiştir (Nawab vd. 2019; Ruan vd. 2012).

Çalışmalar doğuştan gelen bağışıklık ile spesifik bağışıklık arasında *ChTLR4*'ün önemli bir bağlantı olarak rol aldığı bildirilmiş ve bununla ilgili çalışmalar devam etmektedir (Liu vd. 2011). Çeşitli bakteri kaynaklı lipopolisakariti tanıma yeteneği yüksek olan *ChTLR4* üzerine ve genlerinin kodlama bölgesinin polimofizminin bu farklılıkların neden olduğu gen varyasyonu üzerine çalışmalar yapılmıştır (Werling ve Jungi 2003; Machida vd. 2006; Akira ve Takeda 2004; Werling ve Jungi 2003; Poltorak vd. 2000). Tavuklarda *TLR2* ve *TLR4*'ün hücrede LPS uygulaması ile 20 saate kadar ekspresyon sevilerinin yüksek olduğu ve 20. saat sonrası bu reseptörlerde düşüş olduğu

ve dolayısıyla granüloza hücrelerinin gelişimi ve hastalığa karşı direnç mekanizmasında rolü olduğu bildirilmiştir (Woods vd. 2009).

2.3.5. Tavuk toll benzeri reseptörü 5 (*ChTLR5*)

Tavuk *TLR* ailesinin üyesi olan *ChTLR5,* 3. kromozom üzerinde (NC_052534.1:17528808-17565492 *Gallus gallus* isolate bGalGal1 chromosome 3) 36.685 bç (NCBI 2024a) uzunluğunda ve birçok doku (kolon, dalak, böbrek, akciğer, kalp ve testislerden) ve hücrede (İmmün hücre fraksiyonlarıyla, monosit türevi makrofajlar, heterofiller ve B ve T hücresi alt grupları da dahil olmak üzere tüm hücre) etkin rol almakta ve ifade edilmektedir. *ChTLR5* tavuklarda bağışıklık sistemi tarafından tanınan bakteriyel flagellinin tanınması ve flagellin bağlanması durumunda NF-kB'nin aktive edip TNF-α, IL-1 ve IL-8 sitokinlerin üretimini uyarır. Bu sitokinler doğuştan gelen bağışıklık yanıt sistemine ve patojenlere karşı inflamatuar tepki oluşturulmasına aracılık ederler (Sebastiani vd. 2000). Bakteriyel enfeksiyona karşı üretilen bu sitokinler sadece tavuklarda değil aynı zamanda farelerde, insanlarda ve ördeklerde *Salmonella* enfeksiyonlarına karşın kritik öneme sahiptir. Kanatlılarda ve insanlarda etkili olan *Salmonella*'nın flagellini *ChTLR5*'e bağlanarak hücresel yanıt oluşumunda etkili NF-kB'yi aktive eder (Keestra vd. 2008; Cheng vd. 2015).

Bağışıklık sistemi türler arasında farklılık göstermektedir. Örneğin tavuklar ve memelilerin bağışıklık sistemleri birbirinden farklı yapıdadır (Kaiser 2010; Cornelissen vd. 2012). Su kuşları olan ördeklerin *TLR*'leri ve PRR'leri (Patern Tanıma Reseptörleri), tavukların *TLR* ve PRR'lerinden farklılık göstermektedir (Zhang vd. 2015). Su kuşlarının bağışıklık sistemi, tavuklardan farklı olarak Newcastle hastalığı (ND) ve kuş gribi (H5N1 suşu) gibi bazı hastalıklara karşı direnç göstermektedir (Barber vd. 2010). Yangzhou beyaz kazında *TLR5*'in amino asit sekansı, insan (*Homo sapiens*) ile %50,5, fare (*Mus musculus*) ile %49,8 ve tavuk (*Gallus gallus*) ile %82,7 oranında homologluk gösterdiği bildirilmiştir (Qiang vd. 2012). Memeli *TLR5*, bakteriyel flagelline yanıt verirken, *ChTLR5*'in ekspresyonu, *Salmonella* kaynaklı bakteriyel flagelline güçlü bir tepki verdiği bildirilmiştir (Keestra vd. 2008). İnsan ve *ChTLR5* arasında bazı küçük farklılıklar bulunmaktadır (Keestra vd. 2008; de Zoete vd. 2010b). Tavuklar, flagellin içermeyen *Salmonella Typhimurium*'a karşı sistemik enfeksiyonlara karşı gelişmiş bir korunma yeteneği sergilemektedir (Iqbal vd. 2005b). Farelerde *TLR5*'in idrar yolu enfeksiyonuna karşı artan duyarlılık ile ilişkili olduğu ve enfeksiyonlara karşı dirençte önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Nissen vd. 2007; Kumar vd. 2007). Bazı patojenlerin (örneğin, *Salmonella*), konak hücre içinde yayılmak için *TLR5*'in aktivasyonunu ve dendritik hücre göçünü kullandığı belirtilmiştir (Uematsu ve Akira 2009).

Tavuk *TLR5* reseptörünün bağlanma bölgesi, hayvan türleri arasında oldukça korunmuş bir yapıya sahiptir. *ChTLR5*'in *Salmonella Typhimurium* enfeksiyonlarına karşı bağışıklık yanıtında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Iqbal vd. 2005a). Bu bağlamda, bakteriyel enfeksiyöz hastalıkların daha iyi anlaşılması, yerli tavuk ırklarında yapılacak çalışmalarla mevcut bağışıklık durumunun belirlenmesi açısından önem taşımaktadır.

2.3.6. Tavuk toll benzeri reseptörü 7 (*ChTLR7*)

Tavuk *TLR7* reseptörü, 1. kromozom üzerinde yer almakta (bGalGal1.mat.broiler.GRCg7b NC_052532.1) ve 8788 bp uzunluğundadır (NCBI 2024b). Bu gen, dalak, çekum, bademcik ve diğer periferik dokular gibi farklı doku ve hücrelerde eksprese edilmektedir (Philbin vd. 2004). Tavuk *TLR7*, tek sarmallı RNA (ssRNA) virüslerine veya sentetik analoglarına (resiquimod, imiquimod, gardiquimod ve ioxoribin) karşı hücresel bir yanıt oluşturarak interlökin (IL), interferon (IFN) ve tümör nekroz faktör alfa (TNF-α) gibi çeşitli sitokinlerin üretimini teşvik eder (Dockrell ve Kinghorn 2001). Hastalık durumunda, *ChTLR7* bağışıklık hücrelerinin toplanmasını ve proinflamatuar sitokinlerin üretimini tetiklemektedir. Tavuklarda, ssRNA'ya sahip Enfeksiyöz bursal hastalık (IBD) virüsüne karşı bağışıklık hücreleri toplanarak antiviral bir yanıt oluşturur (Sarjoon ve Cader 2018). Kanatlılarda *TLR7* geninin bulunduğu, ancak evrimsel süreçte *TLR8* geninin kaybolduğu düşünülmektedir (Philbin vd. 2005; Yılmaz vd. 2005).

Tavuk *TLR7*'nin amino asit dizisi, insan ve fare *TLR7* ile %60'tan fazla homoloji göstermektedir (Yılmaz vd. 2012). Türler arasında farklılıklar olsa da tavuk, ördek ve kazlar arasında bu reseptörün amino asit sekansı yüksek derecede benzerlik göstermektedir (Qi vd. 2015; Tachibana 2020). Tavuk *TLR7*, çeşitli viral kaynaklı hastalıkların tanınmasında ve hücresel yanıtların oluşturulmasında önemli bir rol oynar. Örneğin, *ChTLR7*'nin enfeksiyöz bronşit virüsü (IBV), şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüsü (SARS-CoV) ve domuz salgını ishal virüsü (PEDV) gibi hastalıkların tanınması ve bağışıklık yanıtlarının oluşumunda görev aldığı bildirilmiştir (Iqbal vd. 2005; Philbin vd. 2005; Swaggerty vd. 2014; Sarjoon ve Cader 2018; Ruan 2020). Ayrıca, *TLR7* agonistlerinin farelerde anoreksi, adipsi, hipotermi ve hiperaktivite gibi fizyolojik ve davranışsal değişikliklere yol açtığı, bu reseptörün memelilerde iltihaplanma ve spesifik olmayan semptomlarda önemli bir rol oynadığına işaret etmektedir (Hayashi vd. 2008; Tachibana 2020).

2.3.7. Tavuk toll benzeri reseptörü 15 (*ChTLR15*)

Sadece kuşlar ve sürüngenlerde bulunan *ChTLR15*, 3. kromozom üzerinde yer alır ve 5424 baz çifti uzunluğundadır (NC_052534.1:c3203514-3199343 *Gallus gallus* isolate bGalGal1 chromosome 3). Bu reseptör hücre membranında lokalize olmuş bir yapıya sahiptir (Boyd 2012; NCBI 2023g). Kuşlara özgü olmasına rağmen, protein yapısında bulunan 23 LLR (lösince zengin tekrarlar), ektodomendeki N-glikosilasyon, membran domaini ve hücre içindeki TIR domaini gibi yapısal özellikleri diğer *TLR*'lerle ortaktır (Keestra vd. 2013). *ChTLR15*, tavuklarda dalak, bursa, kemik iliği, duodenum ve jejunum mukozasında, eritrosit, heterofil ve makrofaj hücrelerinde eksprese edilmektedir (Roach vd. 2005; Higgs vd. 2006; Nerren 2010). Bu reseptör, bakteriyel bileşenleri tanır ve *Salmonella enterica serovar typhimurium* (ST), *Salmonella enterica serovar enteritidis* (SE), *Escherichia coli* (E. coli) ve *Enterococcus*'a karşı immün yanıtın başlamasında rol oynar (Schwarz 2007; Nawab vd. 2019).

Hücre yüzeyinde proteolitik aktivitenin algılanmasında, mantar ve MyD88'e bağımlı yolak aracılığıyla NF-κB ve sitokin üretiminin aktivasyonunu indükler. Proteazlara yanıt olarak proteolitik aktivasyon sağlarken, diğer *TLR* reseptörlerinden farklı bir şekilde işlev gördüğü ve proteaz içeren tedavi sonrası bu immün yanıtın başka bir TLR tarafından gözlemlenmediği bildirilmiştir (Keestra vd. 2013). Bununla birlikte, proteaz aktivitesine verilen immün yanıtın hücre membranında yoğun ekstraselüler yapıya sahip dokularda risk oluşturabileceği, bu nedenle bağırsak koruyucu mukus tabakası ve salgılanan proteaz inhibitörleri aracılığıyla bu inflamasyonun önlenebileceği belirtilmiştir (Bergenfeldt vd. 1996; Nawab vd. 2019). *ChTLR15*'in mRNA ekspresyonunun, bakteriyel enfeksiyonlar sırasında tavuk embriyonik fibroblastlarında ısı ya da formalinle öldürülmüş S. *enterica serovar typhimurium* ile düzenlenmesinde artış gösterdiği bildirilmiştir (Nawab vd. 2019). Ayrıca, *ChTLR15*'in ekspresyonu tavuk makrofaj (HD11) hücre hattında interlökin 1β (IL-1β) ve miyeloid farklılaşma birincil yanıt geni 88 (MYD88) tarafından aktive edilir. Tip B ve Tip C metillenmemiş CpG oligodeoksinükleotid motifleri (CpG-ODN) aracılığıyla bu reseptörün anlamlı şekilde up-regüle olduğu gözlemlenmiştir.

ChTLR15 hem bakteriyel hem de antiviral immün yanıtta önemli bir rol oynar. Örneğin, Marek hastalığı virüsüyle enfekte tavuklarda dalaklarda bu reseptörün gen ekspresyonunun enfeksiyondan sonraki 28. günde önemli ölçüde down-regüle olduğu, buna karşılık bursa fabricius'ta *ChTLR3* ve *ChTLR15* gen ekspresyonunun enfeksiyondan 7. ve 4. günlerde up-regüle olduğu rapor edilmiştir (Zhou vd. 2013). Bu bulgular, tavuklarda erken yaşta hastalık bulaşması durumunda doku ve hücrelerde hastalıkların kontrol altına alınmasında *ChTLR15*'in kritik bir rol oynadığını ortaya koymaktadır.

2.3.8. Tavuk toll benzeri reseptörü 21 (*ChTLR21*)

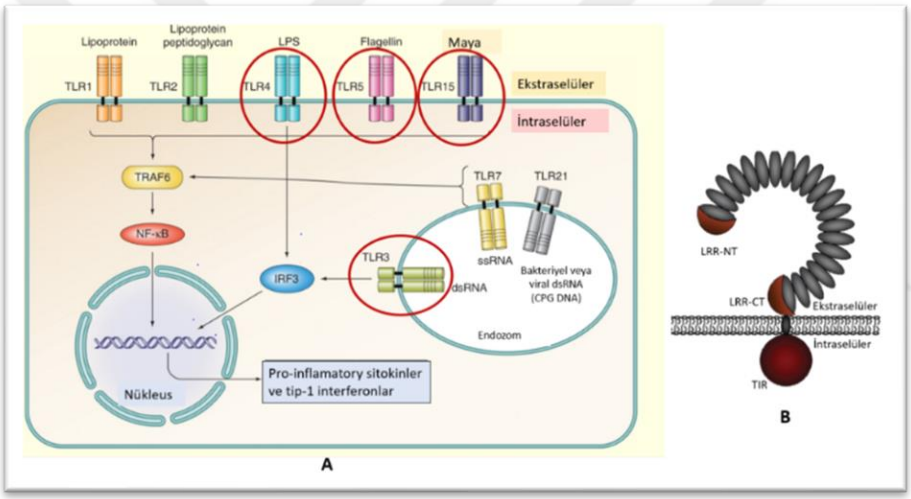
Tavuk *TLR21*, 11. kromozom üzerinde bulunur (NC_052542.1) ve 34,561 nükleotit uzunluğundadır (NCBI 2023h). Bu reseptör, memeli TLR'leriyle ortolog olmamakla birlikte, balık *TLR21* ile benzer amino asit dizisi göstermektedir (Keestra vd. 2010; Palti 2011; Keestra vd. 2013; Nawab vd. 2019). İşlevsel açıdan ise *ChTLR21*'in memeli *TLR9* ile homolog olduğu ve her iki reseptörün de hücre içinde lokalize olduğu rapor edilmiştir. Tavuk *TLR21*'in, mikrobiyal DNA'yı tanıyarak doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini ve adaptif bağışıklığı başlatma yeteneğine sahip olduğu belirtilmiştir (Keestra vd. 2013; Nawab vd. 2019). Memelilerde TLR9'un ligandı olan CpG oligodeoksinükleotidler (CpG-ODN), tavuklarda bulunmamasına rağmen, *ChTLR21*'in benzer bir immünolojik yanıtı uyarmak için CpG-ODN'yi tanıyabildiği bildirilmiştir. *TLR9* ile işlevsel paralellik göstermesine rağmen, amino asit düzeyindeki benzerliğin düşük olduğu, bunun TLR'lerin paralel evrimi ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Keestra vd. 2013; Nawab vd. 2019).

Hung ve arkadaşları (2011), kuş gribi virüsüne (AIV) karşı CpG-ODN'nin bir ligand aşı olarak uygulanmasının, tavuklarda hümoral bağışıklık tepkilerini ve Th1 bağışıklığını artırabildiğini rapor etmişlerdir. *ChTLR21*'in CpG-ODN'ye bağlanması, makrofajlar ve B hücreleri gibi çeşitli hücrelerde tespit edilmiştir (Brownlie ve Allan 2011; Nawab vd. 2019). Ayrıca, *ChTLR21*'in farklı CpG DNA moleküllerini tanıyabildiği ve bakteri kaynaklı kromozomal DNA'ya da yanıt verdiği belirtilmiştir (Bauer vd. 2001).

ChTLR21'in immün yanıt oluşturma mekanizması, proteolitik aktiviteye yanıt verme ve polimorfizm gibi sorular açısından daha fazla araştırmaya ihtiyaç duymaktadır.

2.3.9. Toll benzeri reseptörlerin sinyal iletim mekanizması

Toll benzeri reseptörler, model tanıma reseptör ailesinin en geniş üyelerinden biridir. *TLR*'ler yapısal olarak hücre içi membrana TIR (Toll/interleukin-1 receptor) domainiyle bağlıdır ve hücre dışında 19-27 lösin zengin tekrarlar (LRR) içeren ligand bağlama domainine sahiptir. TIR domaini, N-terminal ve C-terminal LRR'ler (NT-LRR ve CT-LRR) ile örtülü sinyal iletim bölgesine sahip tip-1 transmembran proteinidir (Şekil 2.3 B) (Keestra ve Van 2008). Genel olarak TIR domainleri, TLR ailesi içinde yüksek düzeyde korunmuş bir yapıya sahiptir (Yamamoto vd. 2004; Shizuo ve Takeda 2004; Yilmaz vd. 2005). Enfeksiyon durumunda, *TLR*'lerin TIR domaininden gelen sinyal, tümör nekroz faktör reseptörü ile ilişkili faktör 6 (TRAF6)'yı aktive eder. TRAF6, hücre tiplerinde bulunan transkripsiyon faktörü NF-κB'yi sinyal yoluyla uyarır ve bu mekanizma tip-1 interferon ile sitokin üretimini başlatır (Şekil 1A) (Keestra vd. 2013; Gupta vd. 2014).



Şekil 2. 3. A) Toll-benzeri reseptörlerin hücresel konumu ve hücrede sinyal iletiminin şematik gösterimi. B) Bir Toll-benzeri reseptörünün yapısının şematik gösterimi (Gupta vd. 2014 ve Keestra, 2008' den uyarlanmıştır.)

2.4. Toll benzeri reseptörlerin hücresel yanıt sistemi bileşenleri

2.4.1. Transkripsiyon faktörü (NF-KB)

Bağışıklık yanıtında *TLR* sinyal yolakları; makrofajlar, B ve T hücreleri, TRAF6, TIR ve NF-κB gibi moleküllerin katılımıyla çalışır. *TLR*'ler, homodimer veya heterodimer yapılarıyla mikrobiyal yüzeydeki spesifik moleküler yapıları tanır (Wang vd. 2009). Tavuk *TLR* sinyal yolaklarında birçok *TLR* geninin ifade edildiği belirtilmiştir (Keestra vd. 2013; Nawab vd. 2019). Araştırmalarda, *ChTLR3*/4 sinyal yolaklarının IFN üretimini indüklediği, *ChTLR2* ve *ChTLR5*'in ise bu etkiyi göstermediği rapor edilmiştir

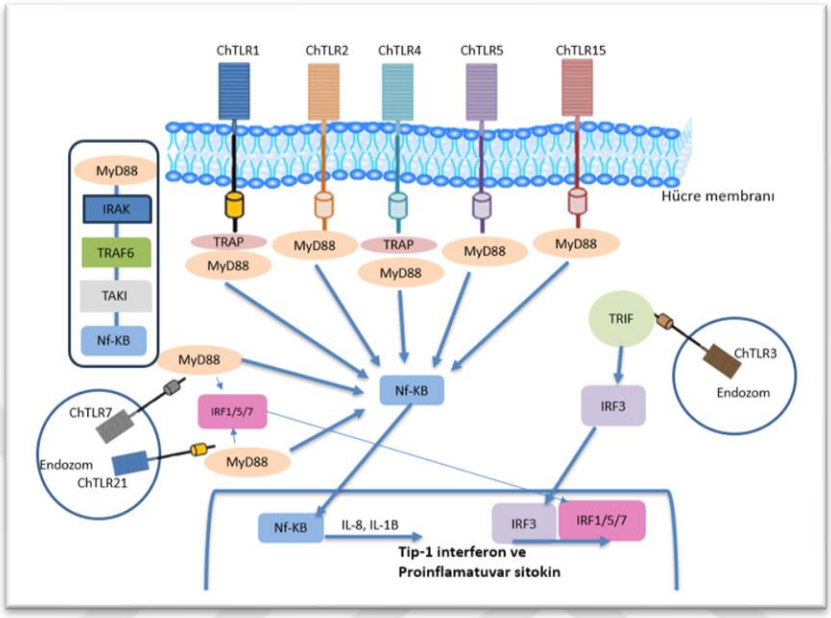
(Jie 2013; Parvizi 2012). Ayrıca, *ChTLR7*'nin IFN'leri farklı mekanizmalarla aktive ettiği belirtilmiştir (de Zoete vd. 2010; Nawab vd. 2019; Parvizi 2012). Hastalık durumlarında, *ChTLR3, ChTLR4* ve *ChTLR15*'in ifade düzeylerinde belirgin artış gözlenmiştir (Zhou vd. 2013). Tavuk *TLR3* ve *TLR7*'nin, sentetik ligand poli I:C'ye (polisiyonik polisitidilik asit) spesifik yanıt verdiği ve *ChTLR3*'ün infeksiyöz bursal hastalık virüsü (IBDV) varlığında IFN-β ve kemokin IL-8 ekspresyonunda antiviral savunmada önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Schwarz 2007; He 2017). Li ve arkadaşları (2021), tavuklarda eimeria enfeksiyonu sırasında *ChTLR15* ile birlikte sinyal yolaklarında MyD88, NF-κB, NLRP3 (N-terminal lösin zengin tekrarlar içeren reseptör 3), Caspase-1, IL-1β ve IL-18 mRNA ekspresyon düzeylerinde önemli artış gözlemlemiştir (Li vd. 2021).

Dünya genelinde kanatlı endüstrisini tehdit eden marek hastalığı, kuş gribi, newcastle, infeksiyöz bursal hastalığı (IBDV), salmonella ve enfeksiyöz bronşit gibi hastalıklar, tavuklarda ciddi akut enfeksiyonlara, göz rahatsızlıklarına, solunum ve sindirim sistemi problemlerine yol açmaktadır (Gast ve Porter 2020; Ruan vd. 2013; Nawab vd. 2019). Bu hastalıklarla mücadelede kullanılan adjuvan içeren aşıların, hücrede interferon ve NF-κB'yi aktive ederek MyD88'e bağımlı veya bağımsız TIR domain sinyal yolaklarını tetiklediği belirtilmiştir. Bu mekanizma, Tip I IFN ve inflamatuar sitokinlerin üretimini ve hücresel bağışıklık tepkisini destekler. Tavuk *TLR*'leri için ortak adaptör molekül olan MyD88, sinyal iletiminde hem bağımlı hem de bağımsız mekanizmalarla çalışabilir (Nawab vd. 2019).

2.4.2. MyD88'e bağımlı ve bağımsız sinyal iletimi

TLR sinyal iletiminde adaptör molekül olarak rol oynayan MyD88, TIR domaini aracılığıyla IL-1 reseptörlerine bağlanır (Abdul-Cader 2016). MyD88'e bağımlı sinyal iletim mekanizmasında, IRAK (IL-1 reseptörüyle ilişkili kinaz) fosforile olur ve TRAF6 ile birleşerek TAK1'i (dönüştürücü büyüme faktörü beta etkileşim faktörü 1) aktive eder (Leveque vd. 2003; Nawab vd. 2019). TAK1, JNK (Janus Kinaz) ve NF-κB'yi aktive ederek, IL-1, TNF-α, iNOS (indüklenebilir nitrik oksit sentaz) ve IL-6 gibi genlerin ekspresyonunu düzenler ve inflamatuar yanıtları başlatır (Akira 2004; Hoshino 2002; Nawab vd. 2019). Tavuk *TLR4*'ün aktive olması, TRIF'in mRNA ekspresyon seviyesini artırarak düzenlenirken, bakteriyel protein LPS-*TLR4* ile birleşmesi yalnızca MyD88'e bağımlı sinyal mekanizmasını başlatır. Memelilerde ise her iki sinyal iletim mekanizması birlikte çalışabilir (Saitoh 2004). Bu durum, kanatlı türlerinde MyD88'den bağımsız veya TRIF'e bağımlı sinyal iletiminin farklı şekilde düzenlendiğini düşündürmektedir (Nawab vd. 2019; Tubak 2009). Araştırmacılar, *ChTLR4*'ün TRIF alımında köprü görevi gören TRAM ortoloğunun bulunmamasının bu durumu açıklayabileceğini öne sürmüştür (Deguine ve Barton, 2014). Ancak farklı çalışmalarda, *ChTLR4* sinyal yolunun hem MyD88'e bağımlı hem de bağımsız mekanizmalarla etkinleştirildiği rapor edilmiş, ancak bu mekanizmanın tam nedeni hala netlik kazanmamıştır (Sato vd. 2003). MyD88'den bağımsız veya TRIF'e bağımlı sinyal iletim mekanizmalarında, TIR domaini, RIP1 (reseptörle etkileşime giren protein kinaz 1) ve TRAF6 adaptör moleküllerinin TAK1'i aktifleştirmek için TRIF'e bağlanmasıyla bu süreci başlatır (Gay vd. 2014). MyD88'e bağımlı sinyal iletim yolunda, NF-κB'nin aktive olması (Kannaki vd. 2008; Sasai vd. 2010; Gay vd. 2014), TRIF, TRAF3 ve TANK aracılığıyla TBK1-IKK komplekslerinin fosforilasyonunu indükler. Bu süreç, pro-inflamatuar sitokinler ile IRF3 ve IRF7'nin

aktivasyonunu sağlayarak inflamatuar yanıtların oluşmasına neden olur. Ayrıca, tavuk *TLR3*'ün sinyal iletim yolunun IRF3'ü tetiklediği ve MyD88'den bağımsız olarak IFN-β salgıladığı bildirilmiştir. Hücre içi sinyal iletiminde hem *ChTLR3* hem de *ChTLR4*, IFN-β üretimini MyD88'den bağımsız sinyal iletim mekanizmasıyla gerçekleştirmektedir (Cheng vd. 2017) (Şekil 2. 4).



Şekil 2. 4. Tavuk toll benzeri reseptörlerinin hücredeki yerleri ve sinyal iletim şeması (Keestra vd. 2013'ten uyarlanmıştır.)

2.4.3. Tümör nekroz faktör reseptörü ile ilişkili faktör 6 (TRAF6)

TRAF6, Toll benzeri reseptörler aracılığıyla MyD88 ve TIR domainleri üzerinden hücre içi sinyal iletimini indükler ve NF-κB ile MAPK yollarını aktive ederek sinyal iletim sürecini başlatır (Barton ve Medzhitov 2003). Organizmadaki farklı TLR'ler, her biri spesifik agonist olarak hareket eden ve çeşitli patojenle ilişkili moleküler modelleri (PAMP) tanıyan reseptörlerdir. Bu agonistler; gram negatif bakteriler (*TLR4*) için lipopolisakkarit, gram pozitif bakteriler (*TLR1, TLR 2* ve *TLR 6*) için lipoprotein ve peptidoglikan, bakteriyel flagellin (*TLR5*), çift sarmallı RNA (*TLR3*), metillenmemiş CpG dinükleotid motifleri (*TLR9*), tek sarmallı RNA (*TLR7*) ve sentetik antiviral R-848 (*TLR7* ve *TLR8*) gibi çeşitli bileşikleri içerir (Leveque vd. 2003).

Hücrede, kendine özgü ligandla aktive olan *TLR*'ler, kemokin veya efektör moleküllerin üretimini sağlar ve hücresel çoğalma, olgunlaşma, nitrik oksit ve reaktif oksijen ara ürünleri gibi çeşitli immün yanıtları tetikler (Uszynski vd. 2000; Iqbal vd. 2005). Araştırmalarda, *TLR2* ve *TLR4*'ün, *TLR7* ve *TLR8* ile kombinasyonlarının IFN-γ ve IL-12p70 üretimini; *TLR5* ve *TLR9*'un insan PBMC'lerinde IL-10 ve IFN-γ üretimini artırdığı bildirilmiştir. Ayrıca, *TLR3* ve *TLR4*'ün kombinasyonlarının insan dendritik hücrelerinde TNF-α ve IL-12'nin düzenlenmesini artırdığı; *TLR7* ve *TLR9*'un birlikte

etkileşiminin ise IFN-α üretimini yükselttiği gösterilmiştir (Leveque vd. 2003; Ichinohe vd. 2005; Napolitani vd. 2005; Marshall vd. 2007; Merlo vd. 2007).

TLR'lerin aracılık ettiği TNF biyosentezine dahil olan sinyal moleküllerinin görevleri ve diğer moleküllerle olan etkileşimlerinin mekanizmaları hâlâ yeterince aydınlatılmamıştır. Özellikle ligandlar aracılığıyla bu reseptörlerin sinyal yollarını nasıl aktive ettiklerine dair bilgi sınırlıdır. Virüs veya bakteri algılama mekanizmalarına aracılık eden *TLR* sinyal yolları üzerine yapılan araştırmalar yakın zamanda tavuklarda başlamıştır (Breiman vd. 2005). Bununla birlikte, çevresel zorluklara karşı adaptasyonu yüksek yerli tavuk ırklarında bu tür çalışmaların yürütülmesi büyük önem taşımaktadır. Yerli tavuk ırklarında *TLR*'lerin sadece sinyal iletimi değil, aynı zamanda korunmuş polimorfik özellikler göstermesi nedeniyle ileri moleküler analizler ve hücresel düzeyde gen ekspresyonu belirlemek amacıyla moleküler yöntemlerden yararlanılmaktadır.

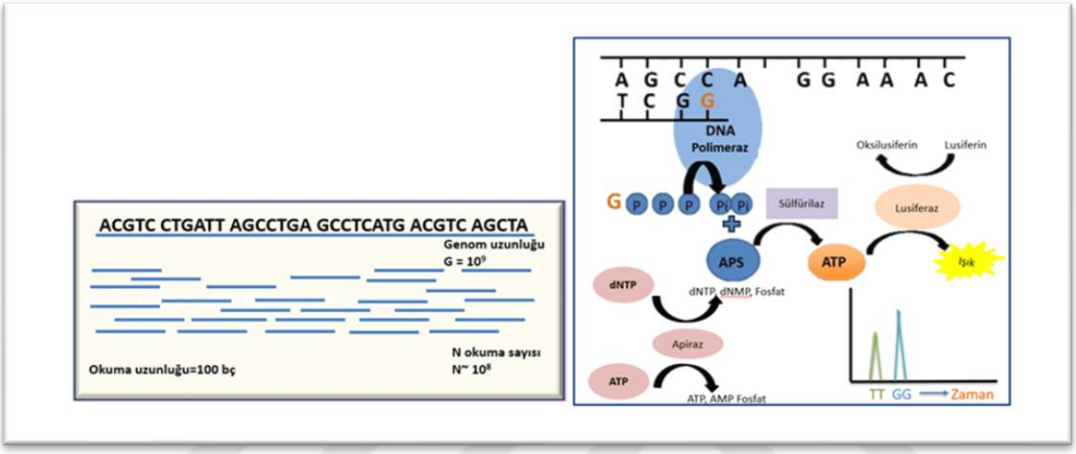
2.4.4. Moleküler çalışmalarda kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu, sekans ve analiz teknikleri

DNA'nın üç boyutlu yapısının keşfi (Watson ve Crick 1953) sonrasında, 1965 yılında Robert Holley tarafından tRNA (taşıyıcı RNA) dizisinin sekans analizi gerçekleştirilmiştir (Holley vd. 1965). Bu gelişmeyi, 1971 yılında DNA'nın kendini onarma mekanizmasının keşfi (Jou vd. 1972) ve ardından DNA polimeraz zincir reaksiyonları (PCR, (Polymerase chain reaction)), sekanslama ve floresan boyama tekniklerinin kullanımı izlemiştir (Friedberg 2016). Moleküler analizlerin temelini oluşturan PCR, laboratuvar ortamında hedef organizmanın belirli bir gen bölgesini çoğaltmak için denatürasyon, bağlanma ve uzama prensiplerine dayalı bir enzimatik reaksiyondur. Bu süreç, primerler, polimeraz enzimi, bağlanma sıcaklığı (Tm), DNTP konsantrasyonu ve diğer reaksiyon koşullarının uyumuna bağlıdır. PCR teknolojilerinin gelişimi, bitki ve hayvanlarda hastalık tanısı, genetik parmak izi ve ebeveynlik testleri gibi alanlarda önemli moleküler çalışmalara olanak sağlamıştır (Rahman vd. 2013).

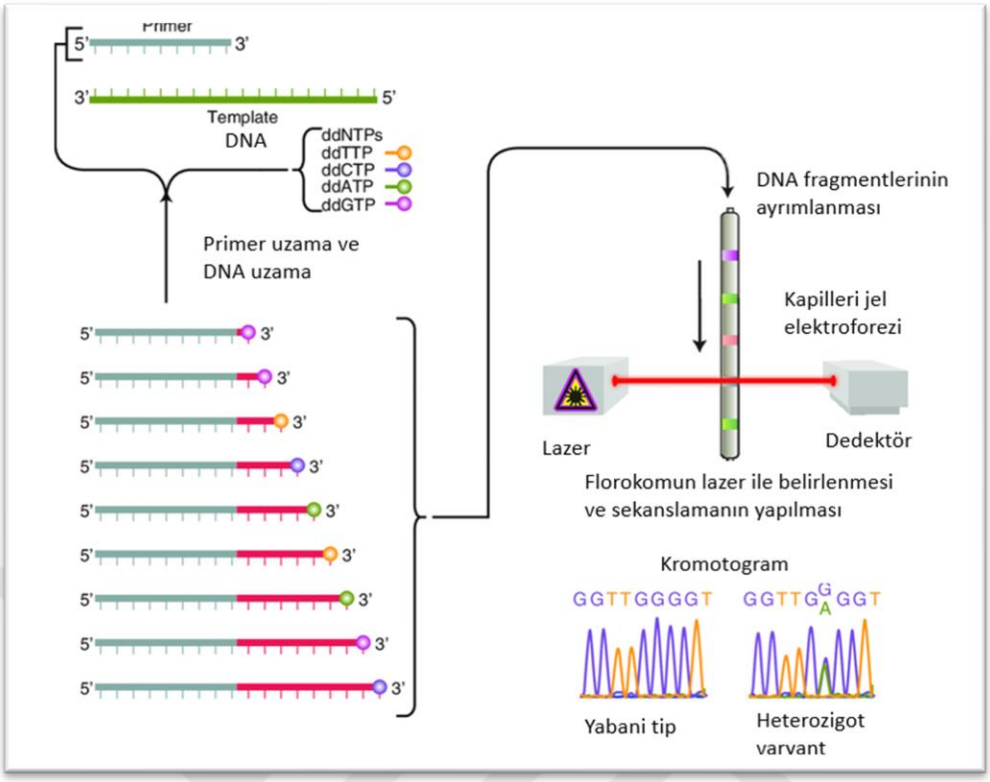
Spesifik DNA veya RNA dizilerinin analizinde, Sanger (tek yönlü veya çift yönlü okuma), Maxam-Gilbert, shotgun, pyrosekans ve yeni nesil dizileme (NGS) gibi yöntemler sıklıkla tercih edilmektedir (Ahmadian vd. 2006). Sanger sekanslama, 1977'de geliştirilen ve DNA polimerazın dNTP (deoksiribonükleozid trifosfat) ve ddNTP (dideoksiribonükleozid trifosfat) kullanılarak DNA dizilerinin okunmasını sağlayan bir yöntemdir (Sanger vd. 1977; Waters ve Lemaire 2016) (Şekil 2.6). Maxam-Gilbert sekanslama, DNA zincirinin 5' ucunun radyoaktif fosfat grubu (32P) ile işaretlenmesi ve ardından farklı kimyasal reaksiyonlarla G, A+G, C ve C+T nükleotidlerini ayırt etmek üzere elektroforez ile analiz edilmesi esasına dayanır (Kızmaz vd. 2017).

Shotgun sekanslama, büyük DNA parçalarının daha küçük parçalara ayrılarak rastgele dizilenmesi esasına dayanır. Ancak, fragmentlerin birleştirilmesi ve yüksek okuma sayısı gerekliliği gibi dezavantajlara sahiptir (Motahari vd. 2013). Pyrosekanslama, gerçek zamanlı DNA sentezi ile dizi analizini gerçekleştiren bir yöntemdir ve genellikle hızlı sonuçlar elde etmek için kullanılır (Şekil 2.5).

Yeni nesil dizileme (NGS) yöntemleri, yüksek doğruluk, düşük hata oranı ve derin okuma kapasitesi ile geniş hedef bölgelerin analizi için tercih edilmektedir. İllumina sekanslama teknolojileri, amplifikasyon, dizileme ve analiz süreçlerini entegre bir şekilde yürütür. Örneğin, Miseq cihazı, kısa sürede 15 GB'a kadar veri sağlayabilir ve amplikon dizilimi, metagenomik çalışmalar ve gen ekspresyon analizleri için idealdir (Ravi vd. 2018). Hiseq cihazı ise daha uzun DNA fragmanlarını 6 gün içinde 1 TB'a kadar yüksek doğrulukla okuyabilir (Ambardar vd. 2016). Dizilenen sekans verilerinin analizi, genetik benzerlik ve uzaklık, haplotip ve haplo grup belirleme, maternal/paternal köken analizi gibi çeşitli biyoinformatik yazılımlar kullanılarak gerçekleştirilir (Zoglauer vd. 2004; Brzinsky-Fay ve Kohler 2010; Reuter vd. 2015; Kronthaler ve Zöllner 2021).

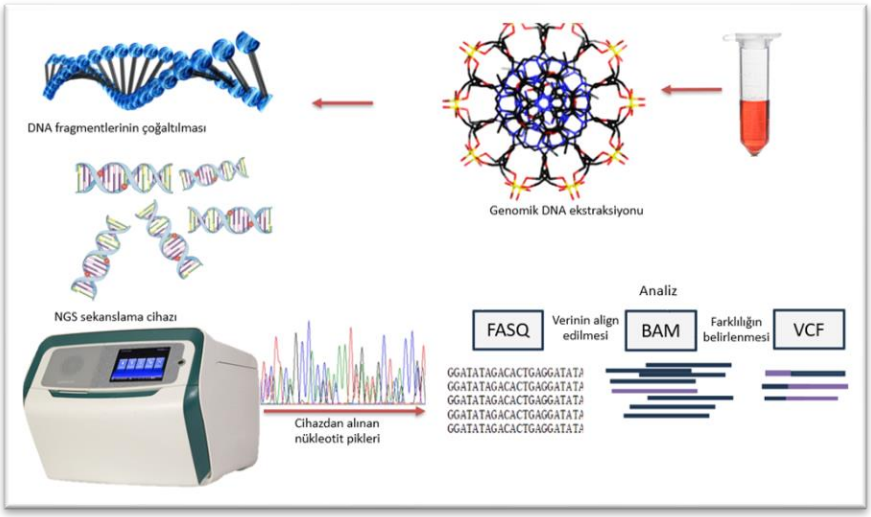


Şekil 2. 5. Shotgun sekanslama şeması ve Pyrosekanslama tekniğinin gösterimi (Motahari vd. 2013'ten uyarlanmıştır.)



Şekil 2. 6. Sanger dizileme metodu (Waters ve Lemaire, 2016'dan uyarlanmıştır.)

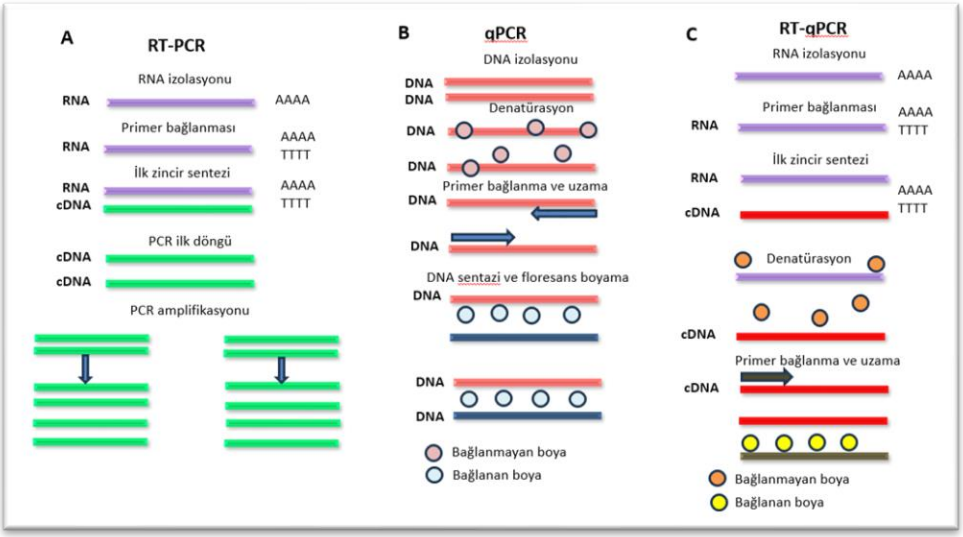
Yeni nesil DNA dizileme çalışmalarının hızla artması, daha karmaşık genom araştırmalarına zemin hazırlamıştır (Şekil 2.7). Bu bağlamda, Herpes virüsü ve *Escherichia coli* bakterisinin genom çalışmalarına (Watson 1990) başlanmış ve 1986'da Amerika'da İnsan Genomu Araştırma Merkezi'nin kurulmasıyla tüm genom projesi önerisi gündeme getirilmiştir (Dulbecco 1986; Palca 1986). 1990 yılında başlatılan İnsan Genom Projesi (HGP), 13 yıl süren çalışmalarla tamamlanmıştır. 2004 yılında tavuk genomu için genom taslağı oluşturulmuş, tavuk mtDNA (Shen vd. 2014; Wang vd. 2013), mtDNA, UCE (ultra korunmuş lokuslar) ve nükleer DNA (nDNA) (Hosner vd. 2016) gibi analizler yapılmış ve tüm genom çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Lawal vd. 2020; Mariadassou vd. 2021). Genom projesinin tamamlanması, ilaç geliştirme, gen düzenleme, immünoterapi, filogenetik analizler ve kanser araştırmaları gibi pek çok alanda yeni araştırmaların yapılmasına olanak sağlamıştır (Watson 1990; Collins vd. 1998; Bentley 2000; Mariadassou vd. 2021; Gibbs 2020; Keller 2022; Aryal 2022).



Şekil 2. 7. Şematize edilmiş yeni nesil sekanslama (Aryal 2022 uyarlanmıştır.)

2.4.5. Kantitatif gerçek zamanlı RT-qPCR

Fonksiyonel ve anlamlı bir ürünü kodlayan DNA dizileri, gen olarak tanımlanmaktadır. Bu genlerdeki anlamlı diziler, belirli enzimler tarafından okunarak mesajcı RNA'ya ("mRNA") aktarılır (transkripsiyon) ve mRNA sekansının amino asit dizisine (protein) dönüştürülmesiyle translasyon gerçekleşir. Gen ifadesi, genetik bilginin proteine dönüşümü olarak tanımlanır. Genlerin ifade seviyeleri, doku, hücre ve ilgili hücre tipinin farklılaşma/aktivasyon durumuna bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Gen ürünlerinin ifade seviyeleri ve miktarı, yalnızca hücresel faktörlere değil, aynı zamanda hücrenin mikro-çevresindeki faktörlere de bağlı olarak değişir. Ekspresyon seviyesinin gücü, transkripsiyon miktarının yüksekliğiyle ilişkilidir. Gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden biri RT-qPCR'dır (ters transkripsiyon- kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) (Krause vd. 2021). Moleküler teşhis alanında devrim niteliğinde olan RT-qPCR, hassas, spesifik ve tekrarlanabilir nükleik asit miktar tayini sağlayan bir teknolojidir. Günümüzde hızla yaygınlaşan bu teknolojinin temel prensipleri, çift sarmallı DNA-interkalasyon ajanı SYBR, hidroliz probları, ikili hibridizasyon probları ve moleküler işaretçiler kullanımıdır. Gen ifadesinin belirlenmesinde, RT-PCR ile RNA ve ters transkriptaz enzimi yardımıyla (Şekil 2.8 A), tek iplikli cDNA (tamamlayıcı DNA) elde edilerek, ilgilenilen genlerin moleküler kopyası çıkarılır; bu işlem RT-qPCR analizinin ilk adımını oluşturur (Adams 2020; Arya vd. 2005). qPCR analizinde ise DNA'nın eş zamanlı olarak PCR amplifikasyonu gerçekleştirilir ve hedef DNA dizilerinin kopya sayısı, boya veya floresan bir probla ölçülerek belirlenir (Şekil 2.8 B). RT-qPCR analizinde ise, cDNA kullanılarak qPCR reaksiyonunda RNA seviyeleri ve gen ifade değişiklikleri belirlenir (Şekil 2.8C) (Adams 2020; Schneeberger vd. 1995). Bu süreç, her PCR döngüsünde, replike olan DNA miktarına orantılı olarak floresans (SYBR) sinyalinin ölçülmesine dayanır (Nolan vd. 2006).

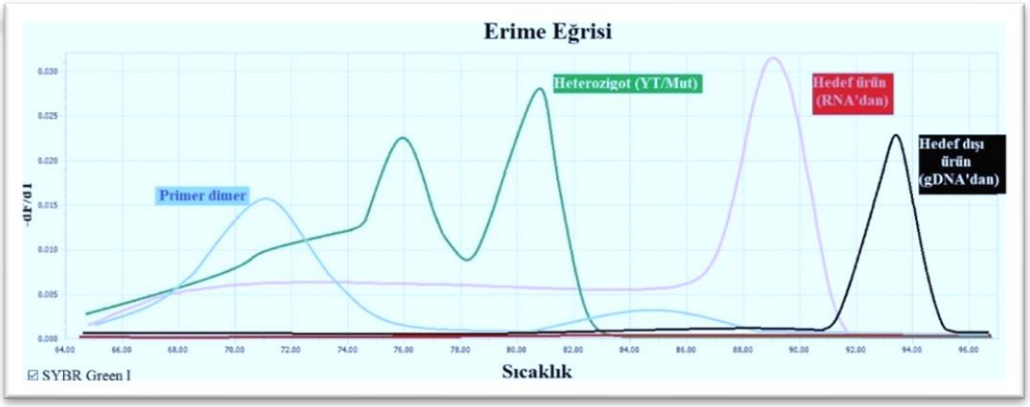


Şekil 2. 8. Gen ifadesinin belirlenmesinde kullanılan üç farklı PCR analizinin reaksiyon basamakları; (A); RT-PCR, (B); qPCR, (C); RT-qPCR (Adams 2020'den uyarlanmıştır.)

Üç basamaktan oluşan RT-qPCR analizi şu aşamalardan oluşmaktadır: i) İlk olarak, RNA'nın ters transkriptaz enzimiyle cDNA'ya dönüştürülmesi, ii) Devamında, cDNA'nın PCR ile amplifikasyonu ve iii) Amplifikasyon ürünlerinin eş zamanlı olarak miktarının belirlenmesi (Nolan vd. 2006; Krause vd. 2021). Amplifikasyon sırasında, DNA zincirinin çift iplikli yapısına giren ve bir floresans sinyali olarak tespit edilmesini sağlayan SYBR Green, moleküler çalışmalarda hassasiyet gerektiren düşük konsantrasyonlarda iyi sonuç veren en yaygın kullanılan interkalasyon boyasıdır (Adams 2020). Ancak, yüksek konsantrasyona sahip PCR reaksiyonlarını inhibe etme, spesifik DNA dizilerine bağlanma ve düşük cDNA erime eğrilerinin yorumlanmasındaki zorluklar gibi dezavantajlara da sahiptir (Schneeberger vd. 1995; Buh vd. 2008; Bener vd. 2019). Analiz sırasında, ne kadar çok cDNA amplifikasyon ürünü üretilirse, floresans ışıma o kadar fazla algılanır.

Kolay uygulanabilir prob hibridizasyonuna dayalı spesifik olmayan interkalasyon boyaları (örneğin, TaqMan prob minör oyuk bağlama (MGB); Minor Groove Binding ve kilitli nükleik asit (LNA); Locked Nucleic Acid gibi) kullanıldığında, belirlenen sinyalin ilgilenilen hedef mRNA'ya ait olup olmadığından emin olmak için erime eğrisi analizi yapılması gerekmektedir (Adams 2020). RT-qPCR analizinin son aşaması olan erime eğrisi analizinde, çoğaltılan fragmentler belirli bir sıcaklık aralığında (55°C-95°C) kademeli olarak inkübe edilir. Bu durumda, amplikonların %GC oranı ve büyüklüğüne göre dsDNA'nın çift zincirli yapısı ayrılır ve tek iplikli yapıya dönüşür. Çift iplikli cDNA'nın denatürasyonu ile floresans içerikli boya salınır ve amplifiye edilen her bir amplikonun özgün dizilerine bağlı olarak floresans boya salınımı anındaki sıcaklıkla ilişkilendirilen erime sıcaklığı (Tm) değeri belirlenir. RT-qPCR analizlerinin doğruluğu, güvenilirliği ve etkinliği, hedef genin mRNA ekspresyon seviyesinin referans gen ile karşılaştırılmasıyla belirlenebilir.

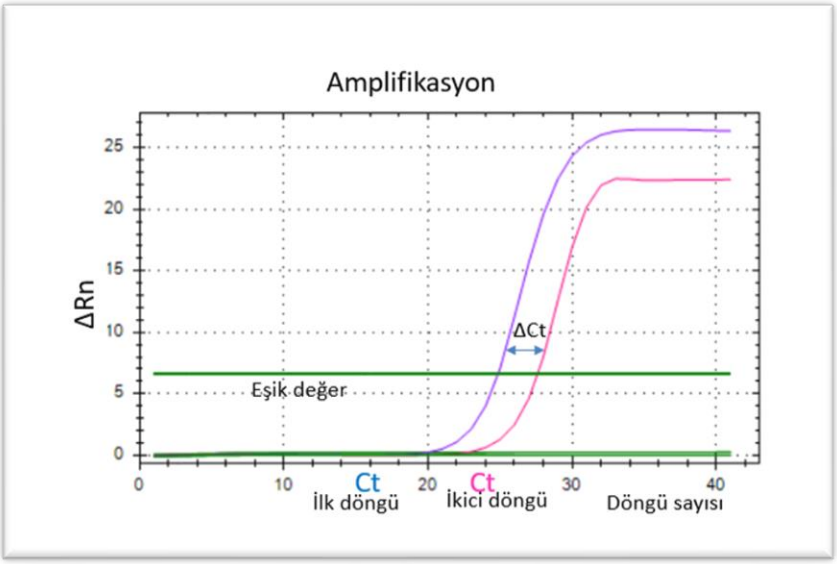
RT-qPCR amplifikasyon ürünlerinin etkinliği, kalibrasyon eğrisine göreceli olarak saptanır (Şekil 2.9). Kalibrasyon eğrisi, cDNA örneklerinin $>10^1$ ile $<10^{10}$ dilüsyon aralığında yapılan oranlar ile belirlenir. Bu oranlardan elde edilen sonuçlara dayanarak, kalibrasyon eğrisi ile ilişkili regresyon katsayısı hesaplanır. RT-qPCR amplifikasyon ürünlerinin erime eğrisinin tepe noktaları, erime eğrisinin diferansiyelinin ilk negatif türev (dF/dT) alınarak hesaplanır (Bustin vd. 2009). Tepe noktaları, çalışmanın sonunda cDNA ürünlerinin nitel izlenmesini sağlar. Kısa primer dimerleri, uzun hedef amplikon ürünlerine göre daha düşük sıcaklıkta erir ve dolayısıyla, kontaminasyon olmadığında gDNA (genomik DNA) kalıntısı ya da spesifik olmayan fragmentler bulunmadığında, tek bir cDNA'nın tek bir pik vermesi beklenir. Ancak, primer dimerler veya farklı DNA türleri nedeniyle iki ve/veya daha fazla pik oluşma olasılığı vardır (Cheong vd. 2009; Ahmed vd. 2017; Adams 2020). Bu nedenle, çalışma tasarlanırken primerlerin dikkatli bir şekilde seçilmesi ve uygun yazılım/veri/program tabanları ile doğrulanıp uygulanması önemlidir.



Şekil 2. 9. RT-qPCR analizi sonucu elde edilen erime eğrisi grafiği ve olası fragmentler (Toparslan 2023'ten uyarlanmıştır.)

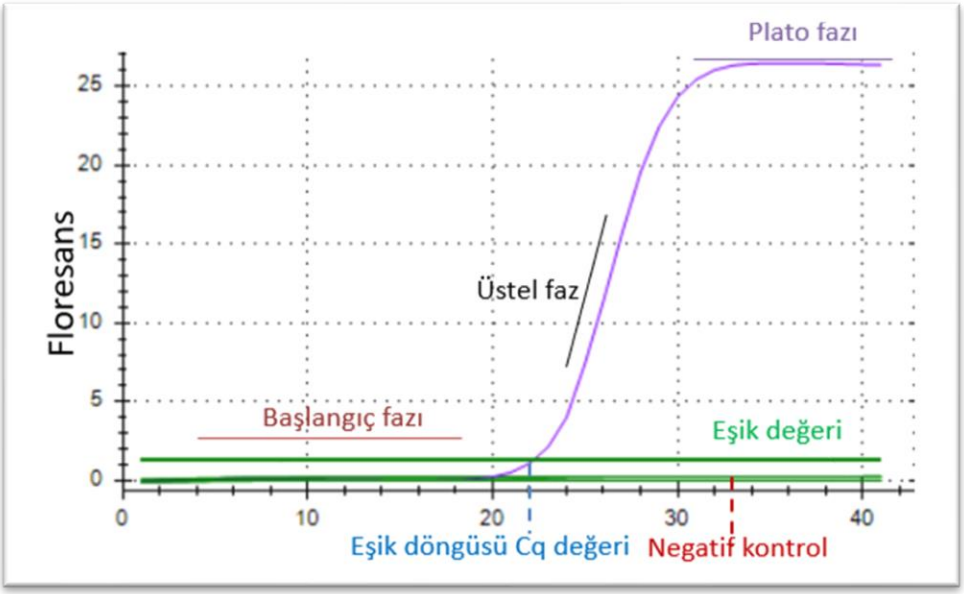
RT-qPCR çalışmalarında, birden fazla referans geninin kullanımını kolaylaştırmak ve referans genlerinin stabilitesini sağlamak amacıyla çeşitli algoritmalar (Excel tabanlı BestKeeper, geNorm ve NormFinder) geliştirilmiştir. Bu bağlamda, örnekler arasındaki konsantrasyon farklarının belirlenmesinde ve RT-qPCR verilerinin analizinde yaygın olarak "$2^{-\Delta Ct}$" yöntemi kullanılmaktadır (Şekil 2.10). Bu algoritmalar, karşılaştırmalı CT yönteminde en kararlı referans genin belirlenmesine olanak tanıyan araçlardır (Spiegelaere vd. 2015). Referans gen ile normalizasyonu sağlamak için kullanılan matematiksel modelde, R şöyle ifade edilir:

R = (E_çalışılan gen ΔCt_çalışılan gen (kontrol-örnek)) / (E_kontrol gen ΔCt_kontrol gen (kontrol-örnek)). Bu denklem, RT-qPCR'ın logaritmik olarak artan eğrisine eşittir (Spiegelaere vd. 2015; Ağaoğlu ve Sidekli 2020).



Şekil 2. 10. RT-qPCR analizi sonucunda elde edilen ΔCt grafiğinde tespit edilebilecek olası pikler

RT-qPCR döngüsünde, amplifikasyonların gerçek zamanlı olarak başlangıç, üstel ve plato fazlarını içeren bir sonuç eğrisi elde edilir (Şekil 2.11). Bu eğri kantitasyon temelini oluşturur. Amplifikasyon başladığında floresans ışıma seviyesi düşüktür ve bu değer, temel floresans ışıma seviyesini ayarlamak için kullanılır. Eşik değeri, reaksiyon üstel faz büyümeye doğru ilerledikçe, floresans taban çizgisinden belirgin şekilde daha yüksek bir seviyeye ulaşmasıyla belirlenir. Çalışılan örneğin bu eşiği geçtiği nokta C_q değeri olarak adlandırılır ve kantitasyon için büyük önem taşır (Adams 2020; Bustin vd. 2009). Üstel fazda elde edilen ve okuma sırasında belirlenen C_q değerleri, plato fazındaki reaktif eksikliklerinden kaynaklanabilecek okuma hatalarından etkilenmez.



Şekil 2. 11. RT-qPCR analizinde gerçek zamanlı tespit sonrası oluşan başlama, üstel ve plato fazları

Amplifikasyon başladıktan sonra, kuyucukların floresan sinyalleri cihaz tarafından kaydedilir. Başlangıç materyalinde fazla hedef gen ürünü varsa C_q değeri düşük olur. Bu durumda, başlangıçta ne kadar çok hedeflenen ürün varsa, amplifikasyon o kadar hızlı başlar, eşik değerini aşar ve floresans ışınlar erken tespit edilir. Böylece, sinyalin aştığı daha küçük döngülerde C_q değerleri ölçülür. Gen ifadesiyle ilişkili C_q değeri, floresans ve amplifiye edilen ürün miktarı arasındaki korelasyonu geniş bir dinamik aralıkta hedef moleküllerin doğru miktarının belirlenmesine olanak tanır (Nolan vd. 2006). Ölçülen C_q değeri bilinen endojen referans genlerinden biriyle karşılaştırılabilir. Endojen referans gen olarak GAPDH ve β-aktin gibi genler sıklıkla tercih edilmektedir. Çalışılan hedef mRNA miktarının belirlenmesi için, referans genin ve ilgilenilen genin RT-qPCR analizindeki C_q değerleri kullanılır. Dolayısıyla bu iki genin PCR amplifikasyon verimliliklerinin güçlü olması ve birbirine yakın değerlerde olması önemlidir. Endojen referans gen ile çalışılan hedef gen arasındaki C_q değerlerinin farkı, hedef genin güçlü ya da zayıf bir ifadeye sahip olup olmadığını gösterir. Gen ifadesindeki farklılıklar ilgilenilen genin ΔC_q değerleri kontrol örnekleriyle karşılaştırılarak belirlenir.

RT-qPCR amplifikasyon verimliliğinin en önemli değeri, hedef genin endojen referans gen aracılığıyla göreceli kantitatif mRNA seviyesinin belirlenmesidir. Bu, standart eğri grafiği (slope-eğim değeri) ile hesaplanır ve kalibrasyon, ortalama RT-qPCR verimliliğinin, analitik duyarlılığının ve test sağlamlığının basit, hızlı ve tekrarlanabilir bir göstergesidir. Amplifikasyon verimliliği, belirli bir dilüsyon oranında hazırlanan örneklerin cDNA konsantrasyonlarına karşılık gelen C_q değerleri ile çizilen eğim değerinden standart eğri hesaplanarak belirlenir. İlk olarak cDNA konsantrasyonunun logaritması (log_{10}) x eksenine, C_q değeri ise y eksenine çizildiğinde elde edilen eğim değeri ile PCR verimliliği, $E = 10^{-1/\text{eğim}} - 1$ formülüyle hesaplanır. Bu ölçümler, teorik olarak maksimum korelasyon katsayısının (R2) 1'e yakın (veya %100'e yakın) olduğu durumlarda, PCR ürün miktarının her döngüde ikiye katlandığını varsayar (Nolan vd. 2006). Bu sayede RT-qPCR verimliliğinde oluşabilecek farklılıklar, farklı eğimlere sahip kalibrasyon eğrilerinin elde edilmesine yol açar. Amplifikasyon sonrası ürünlerin şablon miktarları değiştikçe, hedeflenen genlerin ve referans genlerin C_q değerleri arasındaki değişen farklar ve bağıl konsantrasyonların hesaplamaları hatalı ve yanıltıcı sonuçlara neden olabilir (Bustin vd. 2009). Bu nedenle, başarılı bir RT-qPCR analizi için hem referans genin hem de hedef genin qPCR amplifikasyon verimliliğinin 1'e eşit ya da buna yakın olması gerekmektedir. Hedeflenen genin izafi kantitatif mRNA'sının hesaplanmasında endojen referans geninin C_q değeri normalizasyon hesaplamasında ($2^{-\Delta Cq}$) kullanılır ve amplifikasyon verimliliklerinin 1'e eşit ya da oldukça yakın olması büyük önem taşır (Schmittgen ve Livak 2008).

Literatür çalışmalarında kabul edilebilir RT-qPCR verimliliği %93 ile %105 arasında, eğim değeri -3,2 ile -3,5 arasında ve R2 değeri ise ≥ 0,98 olarak bildirilmiştir (Nolan vd. 2006). RT-qPCR amplifikasyonu sonucunda C_q>40 değeri hesaplanan örnekler, bağlanma seviyesinin düşük olması nedeniyle analize dahil edilmemektedir. Analize dahil edilmeyen bu veriler, hem geçerli sonuçları ortadan kaldıracak kadar düşük

hem de hatalı pozitif sonuçları artıracak kadar yüksek olabilmektedir (Burns ve Valdivia 2008; Bustin vd. 2009).

RT-qPCR analizinden elde edilen verileri analiz etmek için kullanılan iki ölçümden biri mutlak kantitasyon olup, her reaksiyonun log konsantrasyonları ve C_q değerlerinden endojen referans gen için oluşturulan standart bir eğri ve çalışılan hedef gen için konsantrasyon standardı oluşturulmasını gerektirir. Bu ölçümlerin ikinci yaklaşımı ise göreceli kantitasyondur; bu yaklaşım, referans gen ile ilgilenilen gen arasındaki oranın hesaplanmasını sağlar. Bu ölçümlerin doğruluğu, analizde kullanılan referans gene bağlıdır; dolayısıyla hatalı sonuçları önlemek için referans genin C_q değerlerinin tüm biyolojik numunelerde değişmeden kalması gerekmektedir. Çalışılan genin mRNA ifade seviyesinin belirlenebilmesi için referans gen ve ilgilenilen gen arasındaki C_q değer farkı ($2^{-\Delta Cq}$) hesaplanır ve bu yöntem delta C_q yöntemi ($2^{-\Delta Cq}$) olarak adlandırılır (Bustin vd. 2009; Schmittgen ve Livak 2008). Endojen referans genin C_q değeri, örnek hazırlama hatalarını azaltmak için ilgilenilen genin C_q değerinden çıkarılır. Bu işlem ile tüm örnekler için özgün ΔC_q değerleri elde edilir. Devamında elde edilen ΔC_q değeri, RT-qPCR verimliliğinin 1 (ya da 1'e yakın) olması gerektiği varsayarak, gen ifadesi seviyesi $2^{-\Delta Cq}$ değeri olarak hesaplanır (Schmittgen ve Livak 2008). Çalışılan iki farklı örneğin hedef mRNA ifade seviyesi karşılaştırılacaksa $2^{-\Delta Cq}$ değerlerinden, bir örneğin zamana bağlı değişen gen ifadesi seviyesi karşılaştırılacaksa $2^{-\Delta Cq}$ (son örnek) / $2^{-\Delta Cq}$ (ilk örnek) hesaplama değerlerinden yararlanılır (Schmittgen ve Livak 2008). Bu karşılaştırmaların doğru yapılabilmesi için, referans ve hedef genin karşılaştırılabilir RT-qPCR amplifikasyon verimliliklerine sahip olması gerekmektedir (Bustin vd. 2009).

2.5. Damlacık dijital polimeraz zincir reaksiyonu (ddPCR)

Gen ifadesinin belirlenmesinde kullanılan güncel üçüncü nesil analizlerden biri damlacık dijital PCR (droplet digital PCR, ddPCR)'dir. ddPCR, kalibrasyona ihtiyaç duymadan önceden doğrulanmış primer veya primer/prob analizlerinin kullanılarak karmaşık örneklerden hedef DNA fragmentinin amplifikasyonu için standart bir PCR reaksiyonunda Taq polimerazı kullanım esasına dayanmaktadır. Bu analiz metodu temel olarak iki belirgin özelliğe sahiptir: 1) amplifikasyonda kullanılan reaksiyon "plate"'i binlerce ayrı reaksiyona böler, 2) reaksiyonun son aşamasında çalışılan örneklerin verileri elde edilir (Dingle vd. 2013; Taylor vd. 2015; Yang vd. 2014). Üçüncü nesil analizlerden bir diğeri ise BS-dqPCR (base-stacking digital-quantitative-PCR) olup, hızlı sonuç alınmasını sağladığı için miRNA çalışmalarında tercih edilmektedir (Mai vd. 2023). Hem zaman ve maliyet açısından avantaj sağlar hem de tek bir ürün kopya sayısının verisini elde edebilme imkânı sunar. RT-qPCR'a kıyasla daha kesin ve tekrarlanabilir veriler sağlarken, standart eğriye ihtiyaç duymadan cDNA'nın doğrudan gen ifade miktarının belirlenmesini sağlar. Ayrıca, qPCR analizlerinde Cq değerleri tespit edilemeyen düşük miktarda cDNA içeren ve kontamine olmuş örneklerden düşük hedefli nicelik belirlemede kullanılabilme avantajı da sunar (Mai vd. 2023). Dijital PCR, kullanılacak kimyasallar ve kendine özgü platelere sahip olması nedeniyle gelecekte araştırmacıların ilgi odağı olacaktır.

2.6. *İn vitro* hücre kültürü

İn vitro hücre kültürü, laboratuvar ortamında kontrollü bir şekilde, belirli bir medyum içerisine çeşitli parametrelerin (aminoasitler, karbonhidratlar, mineraller, vitaminler, karbondioksit, oksijen, hormonlar ve antibiyotikler) eklenerek hücrelerin büyümesi, çoğalması veya farklı uygulamalar için çalışıldığı yöntemlerdir. Hücre kültürü, ilk olarak çocuk felci virüslerinin başarılı bir şekilde kültüre alınmasıyla başlamıştır (Enders vd. 1949). Hücre kültürü, tek bir hücre üzerinde yapılabildiği gibi birden fazla hücre, doku veya hastalık etmenleri (örneğin, bakteri ve virüsler) üzerinde çalışma imkânı da sunar (Al-Rubeai 2015; Enders vd. 1949). Laboratuvar koşullarında hücreler, doğal ortamlarının dışında farklı muamele ve uygulamalara tabi tutularak incelenir. Bu süreçte pH ve sıcaklık kontrolü gerektiren koşullar sağlanır. Fizyolojik, biyolojik ve farmakolojik aktivitelerin incelenmesi, aşı üretimi gibi amaçlar için hücre kültür ortamlarında genellikle %5 CO_2, %95 O_2 ve 37-38 °C'de çalışan inkübatörler kullanılır (Zijpp vd. 1983; Lee vd. 2008; Yao ve Asayama 2017; Bener 2018; Bener ve Özdemir 2018). Hücreler, kültür ortamına alındığında, doğal ortamlarındaki gibi yaşamsal döngülerini devam ettirirler. Primer hücre kültüründen alınan hücreler, alt kültüre geçirilerek hücre hatları ve hücre suşları elde edilir. Bu hücre hatları, farklı uygulamalar ve ortamlar kullanılarak yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılır (Yao ve Asayama 2017).

Kültür ortamlarında, yüksek oksijen miktarının hücreler üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmak ve ortamın pH dengesini sağlamak amacıyla %5 CO_2, %5 O_2 ve uygun sıcaklık bileşimleri kullanılmaktadır (Bener 2018; McKee ve Komarova 2017; Yao ve Asayama 2017). Hücrelerin kültüre alınması sırasında dikkat edilmesi gereken hususlar şunlardır:

a) Çalışılacak hücre ve doku kültürü ortamı kimyasal olarak tam anlamıyla tanımlanmalıdır.
b) Hücre kültüründe kullanılan veya kullanılacak *in vitro* yöntemler kimyasal olarak belirlenmiş olmalıdır.
c) *İn vitro* hücre kültüründe kullanılacak kimyasallar titizlikle seçilmelidir.
d) *İn vitro* hücre kültüründe kullanılacak ürünler benzer özelliklere sahip olsa da formülasyonları farklılık gösterebilir (Yao ve Asayama 2017).

2.6.1. Eritrosit

Kan, insan ve hayvanlarda oksijenin (O_2) akciğerlere taşınması; hormonlar, vitaminler, proteinler ve karbonhidratlar gibi hayati maddelerin doku ve hücrelere iletilmesi; karbondioksit (CO_2) gibi zararlı gazların vücuttan uzaklaştırılması; bağışıklık yanıtının düzenlenmesi ve homeostasisin sağlanması gibi önemli işlevlere sahiptir. Eritrositler kan dolaşımında en çok bulunan hücre grubudur ve temel görevi akciğer ve dokular arasında oksijen taşıyarak gaz değişimini sağlamaktır. Evrimsel süreçte omurgalılar arasında korunmuş olmalarına rağmen, morfoloji ve işlev bakımından türlere özgü farklılıklar göstermektedirler. İnsanlarda olgun eritrositler çekirdeksizdir. Ancak balık, sürüngen, amfibi ve kuş gibi türlerde çekirdekli olgun eritrositler bulunur (Morera ve MacKenzie 2011; Paul vd. 2011; Workenhe vd. 2008; Paul vd. 2013). Memelilerin aksine tavuk eritrositleri yaşamları boyunca çekirdekli yapısını korur (Désert vd. 2016).

Bu durum, hücre kültürü çalışmalarında kanın çekirdekli yapısını korumaya yönelik önlemlerin alınmasını gerektirir. Tavukların kanında koagülasyon oranı 3,82–6,25, kırmızı kan hücreleri (eritrosit) 1,93–2,96 ($x10^6/\mu L$) ve beyaz kan hücreleri 962–1.868/mm^3'tür (Mmereole 1996; Lee vd. 2007). Civcivlerde kan oranı %8 iken ergin tavuklarda bu oran %6'dır. Kanın %75'i su, %25'i ise kuru maddeden oluşur (Kiepper 2009). Kan hücrelerinin *in vitro* kültür çalışmalarına alınması sırasında, hücrelerin canlılığını ve bütünlüğünü koruyacak uygun sıcaklık ve taşıma koşullarının sağlanması gereklidir. Laboratuvar analizleri için kanın uzak mesafeye uygun sıcaklıklarda taşınması ve bu sırada bütünlüğünün korunması önem arz eder. Kırmızı kan hücrelerinin (RBC) uzun süre korunmasını sağlayan CPD (Sitrat-fosfat-dekstroz) ve ALS (Alsever solüsyonu) gibi protektanlar, taşımada ve laboratuvar çalışmalarında yaygın olarak kullanılır (Hess ve Greenwalt 2002; Lagerberg vd. 2007).

Araştırmalar, tavuk Toll-benzeri reseptörlerle ilişkili adjuvanların, kanatlılarda spesifik olmayan bağışıklık yanıtını artırarak viral, bakteriyel ve paraziter hastalıklara karşı kritik bir rol oynadığını göstermektedir (Bhadouriya vd. 2019). Hastalık direncinin artırılması ve ilaç kalıntılarının azaltılması için genetik tabanlı geliştirme programlarına ihtiyaç duyulmaktadır (Gupta vd. 2014; Nawab vd. 2019; Bhadouriya vd. 2019). Bu bağlamda, genetik iyileştirme programlarının uygulanması, hastalık direncini artıran genlerin daha iyi anlaşılmasını ve bu direncin belirlenmesini sağlayacaktır. Kan, insan ve hayvanlarda oksijenin (O_2) akciğerlere taşınması; hormonlar, vitaminler, proteinler ve karbonhidratlar gibi hayati maddelerin doku ve hücrelere iletilmesi; karbondioksit (CO_2) gibi zararlı gazların vücuttan uzaklaştırılması; bağışıklık yanıtının düzenlenmesi ve homeostasisin sağlanması gibi önemli işlevlere sahiptir. Eritrositler, kan dolaşımında en çok bulunan hücre grubudur ve temel görevi akciğer ve dokular arasında oksijen taşıyarak gaz değişimini sağlamaktır. Evrimsel süreçte omurgalılar arasında korunmuş olmalarına rağmen, morfoloji ve işlev bakımından türlere özgü farklılıklar göstermektedirler. İnsanlarda olgun eritrositler çekirdeksizdir, ancak balık, sürüngen, amfibi ve kuş gibi türlerde çekirdekli olgun eritrositler bulunur (Workenhe vd. 2008; Morera ve MacKenzie 2011; Paul vd. 2011; Paul vd. 2013). Memelilerin aksine tavuk eritrositleri yaşamları boyunca çekirdekli yapısını korur (Désert vd. 2016). Bu durum, hücre kültürü çalışmalarında kanın çekirdekli yapısını korumaya yönelik önlemlerin alınmasını gerektirir. Tavukların kanında koagülasyon oranı 3,82–6,25, kırmızı kan hücreleri (eritrosit) 1,93–2,96 ($x10^6/\mu L$) ve beyaz kan hücreleri 962–1.868/mm^3'tür (Lee vd. 2007; Mmereole 1996). Civcivlerde kan oranı %8 iken ergin tavuklarda bu oran %6'dır. Kanın %75'i su, %25'i ise kuru maddeden oluşur (Kiepper 2009). Kan hücrelerinin *in vitro* kültür çalışmalarına alınması sırasında, hücrelerin canlılığını ve bütünlüğünü koruyacak uygun sıcaklık ve taşıma koşullarının sağlanması gereklidir. Laboratuvar analizleri için kanın uzak mesafeye uygun sıcaklıklarda taşınması ve bu sırada bütünlüğünün korunması önem arz eder. Kırmızı kan hücrelerinin (RBC) uzun süre korunmasını sağlayan CPD (Sitrat-fosfat-dekstroz) ve ALS (Alsever solüsyonu) gibi protektanlar, taşımada ve laboratuvar çalışmalarında yaygın olarak kullanılır (Hess ve Greenwalt 2002; Lagerberg vd. 2007; Bhadouriya vd. 2019).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

İki aşamada tamamlanan doktora tez projesinin hayvan materyali, Samsun ili Atakum ilçesinde "Ondokuz Mayıs Üniversitesi" Zootekni Anabilim Dalı'nda yetiştirilen Gerze tavuk ırkına ait konservasyon sürüsü bireyleri ile Denizli ili "Türkiye Süs Tavukları ve Bahçe Hayvanları Federasyonu" (TSHF) üyesi Denizli Horozu Yetiştiricileri Derneği tarafından yetiştirilen saf Denizli tavuk ırkı bireylerinden sağlanmıştır. Örnekler, 1409/2021.03.005 numaralı etik kurul izniyle toplanmıştır.

Proje, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji ve Bitki Koruma Bölümü Laboratuvarları'nda iki aşamada gerçekleştirilmiştir:

1. Tavuk Toll-benzeri reseptörlerinin polimorfizminin incelenmesi (Denizli 6, Gerze 6).
2. Hücre kültürü çalışmaları (Denizli 4, Gerze 4) (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Deney gruplarına ait örneklem zamanları, ırklar ve birey sayıları

Irk	Lokasyon	Polimorfizm Örneklem Grubu	Hücre Kültürü Örneklem Grubu
Gerze	Samsun	6 birey (3 tavuk ve 3 Horoz)	4 birey (2 tavuk ve 2 Horoz)
Denizli	Denizli	6 birey (3 tavuk ve 3 Horoz)	4 birey (2 tavuk ve 2 Horoz)

3.1.1. Araç ve gereç

Bu çalışmanın uygulama aşamaları, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Hayvansal Biyoteknoloji ve Bitki Koruma Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Gen ifadelerinin kantitatif analizi için Bitki Koruma Bölümü laboratuvarında bulunan RT-qPCR cihazı kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan tüm laboratuvar ekipmanları Çizelge 3.2'de detaylı olarak verilmiştir.

Çizelge 3. 2. Araştırmada kullanılan ekipmanlar ve kullanım amaçları

Mevcut Altyapı/Ekipman	**Modeli Mevcut Olduğu Kurum ve Kuruluş**	**Türü, Kullanım Amacı**
İnkübatör (Thermo Scientific)	Akdeniz Ün. Ziraat Fak. Tarımsal Biyoteknoloji ve Bitki Koruma Bölümleri Laboratuvarları	Hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin istenilen sıcaklıklarda inkübe edilmesi.
Laminar flow kabin (Thermo Scientific Safe 2020)		Hücre kültürü çalışmalarında steril ortamda medyum hazırlanması, hücrelerin yıkanması ve kültüre alınması
Soğutmalı santrifüj (Hettich 32 A)		DNA izolasyonu ve PCR analizlerinde sıcağa hassas örneklerin bozulmadan Santrifüj edilmesi
-20°C derin dondurucu/buzdolabı (Vestel)		Çeşitli sarf malzemelerin saklanması
-80°C derin dondurucu		Kan/RNA örneklerinin saklanması
Biodrop (µlite)		RNA örneklerinin saflık ve yoğunlukların ölçülmesi
RT-qPCR Cihazı (BioRad)		Genlerin kantitatif düzeyde ifade seviyelerinin belirlenmesi
Hassas terazi (DESIS-TM600)		Hassas ölçümlerin yapılması
Yatay elektroforez sistemi (BioRad)		RNA örneklerinin ve PCR ürünlerinin agaroz jel sisteminde belirlenmesi,
Manyetik heat plate karıştırıcı (MTOPSM300)		Tampon çözeltilerin hazırlanması
Mini vorteks (Biosan multi-vorteks V-32)		Tampon çözeltilerin hazırlanması ve RNA izolasyonu
Mini micro dalga fırın (Beko)		Agaroz jel hazırlanmasında
Otomatik pipet seti (Ependorf)		Mikro seviyede sıvı karışımların hazırlanması
pH metre (HANNA-PH211)		Tampon ve çözeltilerin hazırlanması için gerekli pH ’nın belirlenmesi
Su banyosu ()		RNA izolasyonu sonrası örneklerin ısıtılıp soğutulması

3.1.2. Tamponların ve solüsyonların hazırlanması

Doktora tez projesinin laboratuvar çalışmalarına başlamadan önce gerekli olan tüm tampon/çözelti ve kimyasalların sterilizasyonu yapılmış/hazırlanmış ve her biri uygun koşullarda muhafaza edilmiştir.

3.1.2.1. Jel yürütmede kullanılan 1X TAE (Tris Asetat EDTA) tamponunun hazırlanması

Moleküler çalışmalarda, özellikle agaroz jel elektroforezinde, DNA ve RNA gibi nükleik asitlerin veya büyük fragmentlerin ayrılması için TAE tamponu kullanılmaktadır. Bu çalışmada, 50X yoğunluktaki stok solüsyon (EcoTech, Türkiye) 1X yoğunluğa seyreltilmiştir. 1X konsantrasyonda 1 litre tampon hazırlamak için 50X stoktan 20 ml alınarak üzerine 980 ml çift distile su (ddH_2O, Multicell, Kanada) eklenmiştir.

3.1.2.2. Jel görüntüleme sisteminde kullanılan %2'lik agaroz jel hazırlanması

Çalışmada, tüm fragmentlerin PCR sonrası kontrolü için yatay agaroz jel elektroforez sistemi (Cleaver Scientific, ABD) kullanılmıştır. Kullanılan agaroz jelin yoğunluğu, genlerin fragment büyüklüklerine göre belirlenmiştir:

- 115 bp-600 bp fragmentler için %2 yoğunluk,
- 1000 bp ve üzeri fragmentler için %1 yoğunluk tercih edilmiştir.

Jelin hazırlanışı şu şekilde gerçekleştirilmiştir: Hassas terazide (Shimadzu, Japonya) 2 g agaroz (Bioshop, Kanada) tartılmıştır. 100 ml 1X TAE tamponu içinde agaroz homojen olana kadar karıştırılmış ve mikrodalga fırında (Beko, Türkiye) kaynatılmıştır. Kaynama sırasında düzenli olarak karıştırılmıştır. Karışım oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve içerisine 1.2 µl etidyum bromür (EtBr, Sigma-Aldrich, Almanya) eklenerek iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım elektroforez jel kasetine dökülmüş, jelleşmesi için beklenmiştir.

3.1.2.3. RNA/cDNA jel yürütmede kullanılan DEPC'li tampon hazırlama

Laboratuvar ortamında hassas çalışmalarda RNaz enziminin uzaklaştırılması amacıyla diethylpyrocarbonate (DEPC) solüsyonu (BioBasic, Kanada) kullanılmıştır. DEPC'li tampon şu şekilde hazırlanmıştır:

1. 1 ml DEPC solüsyonu, 1000 ml otoklavlanmış ddH_2O ile karıştırılarak %0.1'lik DEPC'li su hazırlanmıştır.
2. Solüsyon, bir gece boyunca manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında karıştırılmıştır.
3. Hazırlanan DEPC'li su otoklavlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.1.2.4. Primerlerin hazırlanması

Projenin hem polimorfizm hem de gen ekspresyonunda kullanılacak primerler önce ana stok (100 mM) daha sonra ara stok (10 mM) olacak şekilde üretici firmanın ürün bilgi formunda belirttiği şekilde hazırlanmıştır.

3.2. Yöntem

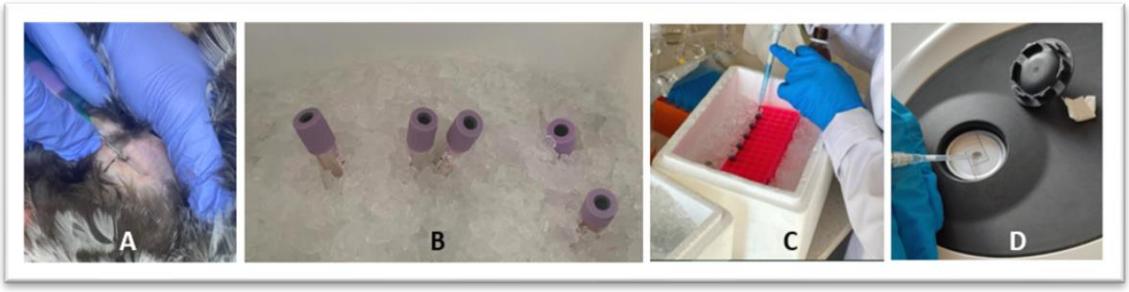
3.2.1. Toll-benzeri reseptörlerin polimorfizmi

3.2.1.1. Kan örneklerinin toplanması

Doktora tez projesinin ilk aşamasında, Denizli ve Gerze yerli tavuk ırklarından pedigri kaydı bulunan aynı yaşta 6 tavuk ve 6 horozdan toplamda 2 ml kan örneği toplanmıştır. Kan örnekleri, kanat altı toplardamarından (Şekil 3.2.1 A) vakumlu EDTA'lı (K3 EDTA, Türkiye, lot: 649) tüplere alınmıştır. Alınan örnekler, buz üzerinde laboratuvara ulaştırılmıştır (Şekil 3.2.1 B). Polimorfizm analizi kapsamında, her bir ırktan 6 birey (3 tavuk ve 3 horoz) olmak üzere toplamda 12 bireyden 4 farklı reseptör üzerinde çalışma yapılmış ve iki ırk için toplamda 48 adet NGS dizileme gerçekleştirilmesi planlanmıştır.

3.2.1.2. DNA ekstraksiyonu

Örnekler toplandıktan sonra en kısa sürede laboratuvara getirilmiş ve kan örneklerinden DNA izolasyonu, ticari kit protokolüne (Zymo Research, USA) uygun olarak ürün bilgi protokolünde belirtilen kullanım basamakları takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Yerli tavuk ırklarından alınan kan örneği, kit protokolünde belirtildiği gibi 100 µl kan mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine 400 µl liziz buffer eklenmiştir. Kan örneğinin tamamen parçalanması için oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiş, ardından örnekler 10.900 xg'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Süpernatant, RNaz içermeyen yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Bu aşamada protein, yağ, polisakkarit, kas ve bitki fibrillerinden arındırma amaçlanmıştır. Santrifüj sonrasında, örneğin üzerine 200 µl etanol eklenmiş ve 15 saniye boyunca vorteks ile homojen hale gelene kadar karıştırılmıştır. Karışım, spin kolona aktarılmış ve 4°C'de 10.900 xg'de 30 saniye santrifüj edilerek filtrenin altındaki tüpte toplanan sıvı atılmıştır. Filtreye 400 µl ön yıkama buffer eklenmiş, 10.900 xg'de 30 saniye santrifüj edilmiş ve altta kalan lizatı içeren toplama tüpü atılmıştır. Daha sonra filtreye 700 µl yıkama tamponu eklenerek 10.900 xg'de 30 saniye santrifüj edilmiş ve altta kalan lizat atılmıştır. Ardından 400 µl yıkama tamponu eklenerek 10.900 xg'de 2 dakika boyunca santrifüj edilerek filtrenin kuruması sağlanmıştır. Filtreli membran kolon, RNA/DNA içermeyen 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilmiştir. Membranın merkezine direkt olarak 50 µl dsH2O su eklenmiş, örnek 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra 8.000 xg'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Mikrosantrifüj tüpünde toplanan DNA, -20°C'de muhafaza edilmiştir. DNA'ların yoğunluğu ve saflıkları Biodrop µLite (Biochrom, UK) cihazı ile ölçülmüştür (Şekil 3.2.1 C-D).



Şekil 3.2. 1. Polimorfizm için A) tavuk kanat altı toplar damarından kan alımı, B) kan örneklerinin serin ortamda laboratuvara taşınması C) Kan örneklerinden DNA izolasyonu D) DNA örneklerinin Biodropta konsantrasyon ve yoğunluğunun ölçümü

3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Polimorfizm analizi için yerli tavuk ırklarımız Denizli ve Gerze'nin DNA örneklerinin PCR amplifikasyonu, ilk olarak optimum bağlanma sıcaklığını belirlemek amacıyla gradiyent yapılmıştır. Örneklerin PCR'a hazırlanması aşamasında, her bir örnek için 1 µl, her bir primer için 2 µl, polimeraz 0,5(Myfi, Bioline UK, Lot; MF-323110A), reaksiyon buffer (Myfi, Lot; MFB-718203A) 10 µl ve son volume 50 µl olacak şekilde dH2O ile tamamlanmıştır (Çizelge 3.3). Ardından, amplifikasyon işlemi şu koşullarda yapılmıştır: başlangıç sıcaklığı 94°C'de 3 dakika, denatürasyon 94°C'de 30 saniye, bağlanma sıcaklığı 53-59,5°C'de 30 saniye, uzama sıcaklığı ise 72°C'de 5 dakika, toplamda 38 döngü ve son uzama aşaması 72°C'de 7 dakika olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.4). PCR amplifikonlarının varlığı, %1'lik agaroz jelle doğrulanmıştır (Şekil 3.2.2). Doğrulama işleminden sonra, PCR amplifikonlarının yoğunlukları spektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiş ve 0,2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde dizileme için 70 µl olacak şekilde hazırlanarak hizmet alımı için SenteBiolab (Türkiye) firmasına gönderilmiştir.

Şekil 3.2. 2. Polimorfizm için kullanılan polimeraz enzimi, PCR cihazı, jel elektroforez ve görüntüleme sistemi

Çizelge 3. 3. DNA örneklerinin PCR bileşenleri ve miktarı

PCR Bileşenleri	Miktar (µl)
Kalıp cDNA	2
Her bir primerden	2
Myfi DNA polimeraz	1
10X buffer	10
ddH_2O	50'ye tamamlanır

Çizelge 3. 4. PCR reaktifleri, sıcaklık, süre ve döngü sayısı

PCR Reaktifleri	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	94	3 dk	
Denatürasyon	94	30 sn	-
Bağlanma (Annealing)	59,5	30 sn	38
Uzama	72	5 dk	-
Son uzama	72	7 dk	
Reaksiyon sonrası saklama	4	∞	

3.2.3. Primerlerin tasarlanması ve kullanıma hazırlanması

Polimorfizm analizi için kullanılacak 9 çift primer, NCBI, GenBank, Primer3 Plus, SnapGene Viewer v.6.2.2 ve Amplify4 v.1.0 (Mac OSX 10.9) yazılımları kullanılarak tasarlanmıştır (Şekil 3.2.3). PCR analizinde genomik DNA'nın bağlanma etkinliğini artırmak amacıyla, sekanslanacak her bir reseptöre ait uzun bölge, iki fragment olacak şekilde primerler tasarlanmıştır (Şekil 3.2.3). 4 reseptöre ait referans dizileri GenBank veri tabanından indirilmiş ve bu diziler üzerinde primerlerin lokasyonu SnapGene Viewer v.6.2.2 yazılımında açılarak, her primerin başlangıç ve bitiş dizileri belirlenmiştir. Bu diziler göz önünde bulundurularak, iki farklı fragment oluşturulan reseptörlerin sekanslama esnasında arada boşluk olmamasına özen gösterilerek tasarlama yapılmıştır. Çalışılan dört reseptörden *ChTLR3* için üç fragment, diğerleri için ise iki fragment olarak primerler tasarlanmıştır (Çizelge 3.5).

Şekil 3.2. 3. *ChTLR4* için SnapGene programında birinci fragment geri ile ikinci fragment ileri primer dizi görüntüsü

Çizelge 3. 5. Polimorfizm analizi için fragmentlerin dizisi, amplikon uzunlukları ve bağlanma sıcaklıkları

Gen	Primer dizisi (5'-3')	Uzunluk (bp)	Bağlanma sıcaklığı (°C)
ChTLR3	F 5'GCCGAGATAAAACTATGGGATG 3' R 5' TGCAAGCTGGAATTAGCAAG 3'	2916	59
	F_1 5' CATTTGTATCACTTGCTAATTCCAG 3' R_1 5' GTTGAACTGGAATCTCATCAAAG 3'	534	58
	F_2 5' ATGGCTTTGATGAGATTCCA 3' R_2 5' CTGCACCATGGATCCTGTA 3'	775	55
ChTLR4	F_1 5' GGTCCTTTGCTCTGCATCC 3' R_1 5' CGAAGCACTCTCAACTCCTTAAA 3'	3062	60
	F_2 5' GCTGTCTCTTTTTAAGGAGTTGAGA 3' R_2 5' CTGCCTCCAGAAGATATGCCT 3'	1414	60
ChTLR5	F_1 5' ACTGGCCAACAGAAAATGGA 3' R_1 5' TGTTTTCCTTGGAAGCTGGT 3'	4455	60
	F_2 5' CAAAACTTCATCCACACCCCT 3' R_2 5' CAGCGAGTAAAAATAATGGTTGAC 3'	1516	58
ChTLR15	F_1 5' TGACCAGCTCTCCCATTTTC 3' R_1 5' CCTGGTTTCTGACCAAGGA 3'	2439	59
	F_2 5' CTGGAACTGTACAAATCAGCG 3' R_2 5' TTCAGCAGCTTCCTGAGTTTG 3'	1378	60

3.2.4. Hücre kültürünün hazırlanması

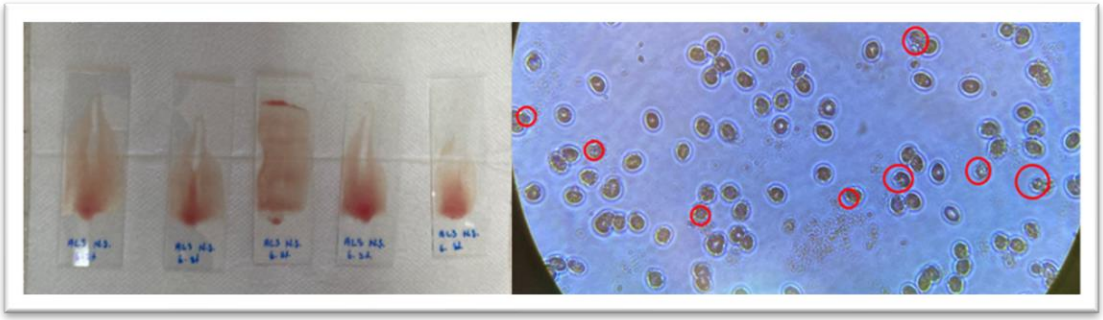
3.2.4.1. Tavuk kan hücresi eritrositlerin canlılık testi

Çalışmada kullanılacak kan örneklerinin, uzak mesafeden laboratuvara getirilene kadar kan hücrelerinin canlılıklarını ve yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmeleri

önemlidir. Proje kapsamında, çalışılacak tavukların kan hücrelerinden eritrositlerin *in vitro* hücre kültürüne alınmadan önce, hücrelerin yapısal olarak canlılıklarını ve yaşamsal faaliyetlerinin devam edip etmediğini belirlemek amacıyla canlılık testi yapılmıştır. Bu amaçla, 4 tavuktan kanat altı toplar damardan 2 ml kan EDTA'lı tüplere alınmıştır. Hücre koruyucu solüsyona ALS total kan 1/1 oranında eklenmiş ve örnekler en kısa sürede laboratuvara getirilmiştir. Kullanılacak toplam kan ve hücrelerin (eritrosit) kültüre alınmadan önce canlılık testi *in vitro* ortamda Alsever solüsyonu (ALS) kullanılarak, hem normal şartlar (NŞ) hem de +4 °C'de ön hazırlık testi yapılmıştır. Deney grupları, Tam Kan Kontrol (1), ALS Tam Kan (3), Eritrosit Kontrol (1a), ALS Eritrosit (3a), ve ALS Eritrosit (4a) olarak tasarlanmıştır (Şekil 3.2.4). Uygulama yapılan gruplar, 6, 8, 11, ve 22 saat olmak üzere belirlenmiş, kontrol grupları (eritrosit kontrol ve tam kan kontrol) ise 11. saat sonunda tamamen bozulduğundan, diğer saatlerde ALS ile hem normal şartlarda hem de +4 °C'de devam edilmiştir.

Toplam kandan eritrositlerin ayrılması işlemi, +4 °C'de 500g ile 5 dakika santrifüj edilerek yapılmıştır. Santrifüj sonrası tüpün üst kısmında biriken plazma ve sıvı faz uzaklaştırılmıştır. Ardından 500 µl ALS eklenerek tekrar +4 °C'de 500g ile 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem üç defa tekrarlanmış ve son aşamada mikrosantrifüj tüpünün en alt kısmında toplanan alyuvarların üzerine eşit oranda ALS eklenerek hazırlanmıştır. Her bir çalışma grubundan belirtilen saatlerde hücre canlılık kontrolü için 5 slide üzerinde sürüntü oluşturulmuştur. Sürüntüler kuruduktan sonra hücre canlılık testi için Trypan Blue (Gibco, USA, Lot:1665084) ile boyama yapılmıştır. Boyama sonrası, slide'lar af su ile yıkanıp kurumaya bırakılmıştır. Ardından hücrelerden görüntü almak için stereo mikroskop (Zeiss) kullanılarak 40X büyütme ile görüntü alınmıştır (Şekil 3.2.5).

Şekil 3.2. 4. Hücre canlılık testi için tavuktan kan alımı ve ALS solüsyonlarının eklenmesi



Şekil 3.2. 5. Eritrosit canlılık testinde 6. saat sonrası sürüntü oluşturma ve mikroskop altında canlı hücrelerin görüntüsü

3.2.4.2. Hücre kültüründe kullanılacak stok solüsyonların hazırlanması

3.2.4.2.1. İnaktive fetal calf serumun (FCS) hazırlanması

RPMI1640 medyum (Ecotech, Türkiye, Lot: RP211027) içerisinde %10 FCS (Sigma, USA) iyice çözdürülerek hazırlanmıştır.

3.2.4.2.2. Stok fosfat tamponlu tuz çözeltisinin hazırlanması

Hücre kültüründe *TLR* reseptörlerine ligand olarak kullanılacak olan stok PBS (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi) (Sigma P-4417; PBS) 300 ml çift distile (ddH2O) suda 3 gr çözdürülerek elde edilmiş ve 4 °C'de depolanmıştır.

3.2.4.2.3. *İn vitro* eritrosit yıkama medyumunun hazırlanması

Eritrosit hücrelerinin inkübasyon öncesi yıkama amacıyla kullanılacak yıkama medyumu 50'lik falkon tüp içerisinde %10 FCS, 200 U/mL penisilin (Sigma, USA), 80 µg/mL streptomisin (Sigma, USA), 25 mg gentamisin (Sigma, USA, Lot: 099M4814V), 10 mM HEPES tamponu (Diagnovum, Almanya, Lot: D5030), 50 lM β-merkaptoetanol (Merck, Almanya) ve 2 mM L-glutamin (Cegrogen Almanya, Lot:C3675) olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.2.4.2.4. Hücre kültüründe kullanılacak ligandların hazırlanması

Hücre kültüründe ligand eritrositlerde olarak kullanılacak olan Poly I:C, (Sigma-Aldrich-Kanada) ve sentetik sınıf B CpG ODN (oligodeoxynucleotides) 2007 [50 TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTT-30], (IDT, USA, Lot: 238282190), ve kontrol grubu için ise sadece medyum hazırlanmıştır. Kullanılan ligandların tümü, steril fosfat tamponlu salinde (PBS, pH 7.4) yeniden ürün bilgi formatına uygun olarak süspanse edilmiştir.

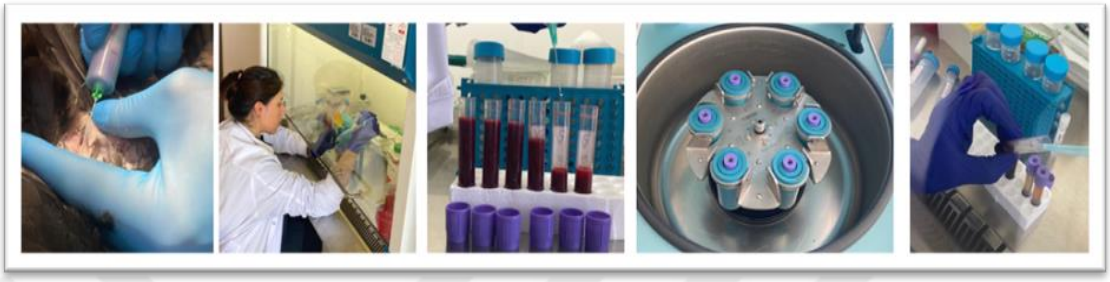
3.2.4.2.5. İnkübatörün hazırlanması

Hücre kültüründe hücrelerin yaşamsal faaliyetlerini *in vitro* olarak sağlayabileceği uygun sıcaklık ve pH ortamı için inkübatör cihazı önceden temizlenip, sterilizasyon yapılmıştır. Deneye başlamadan önce cihaz 41°C ve %5 CO_2 olacak şekilde olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.5. Hayvan materyali ve eritrosit hücrelerinin kültüre hazırlanması

Doktora tez projesinin ikinci aşamasında, hayvan materyali Samsun ili Atakum ilçesinde bulunan "Ondokuz Mayıs Üniversitesi" Zootekni Anabilim Dalında yetiştirilen Gerze tavuk ırkına ait konservasyon sürüsü bireyleri ve Denizli ili "Türkiye Süs Tavukları ve Bahçe Hayvanları Federasyonu" (TSHF) üyesi Denizli Horozu Yetiştiricileri Derneği tarafından yetiştirilen saf Denizli tavuk ırkı bireylerinden (4 tavuk ve 4 horoz) kanat altı toplar damardan (birey başına 5 mL) enjektör yardımıyla 5 ml kan alınmıştır. Alınan kan örnekleri 1/1 oranında ALS solüsyon ile karıştırılmış ve yavaşça çalkalandıktan sonra, kan toplama tüpleri strafor içerisinde buz aküsü ile laboratuvara getirilmiştir.

Laboratuvara getirilen kan örnekleri, kültüre hazırlanana kadar +4°C'de saklanmıştır. Devamında, hücre koruyucu solüsyonun uzaklaştırılması amacıyla örnekler 800 g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası, total kandan eritrositlerin ayrılması için 1 ml kana 3 ml Histopaque-1119 (Biolegend, Almanya) eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra örnekler tekrar 800 g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüpün alt kısmında toplanan eritrositler, pipet yardımıyla alt katmandan toplanarak (Şekil 3.2.6) ayrılmıştır.

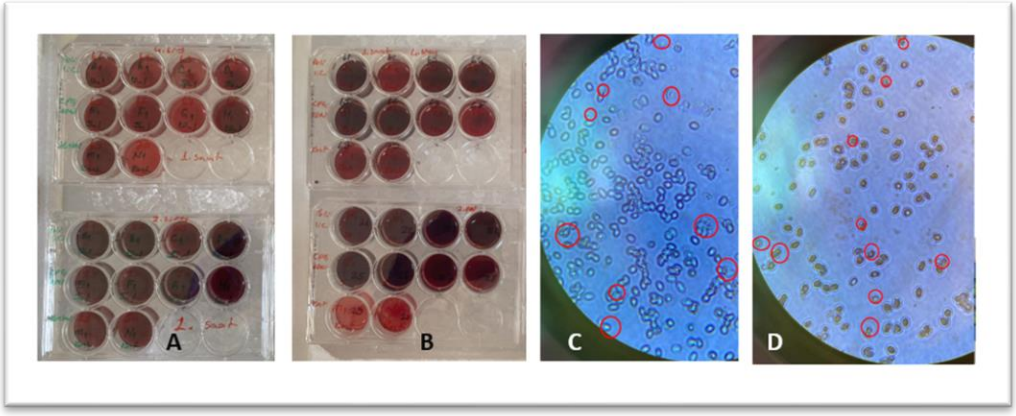


Şekil 3.2. 6. Hücre kültüründe kullanılan kanın toplanması, eritrositlerin histopaque ile ayrımlanması

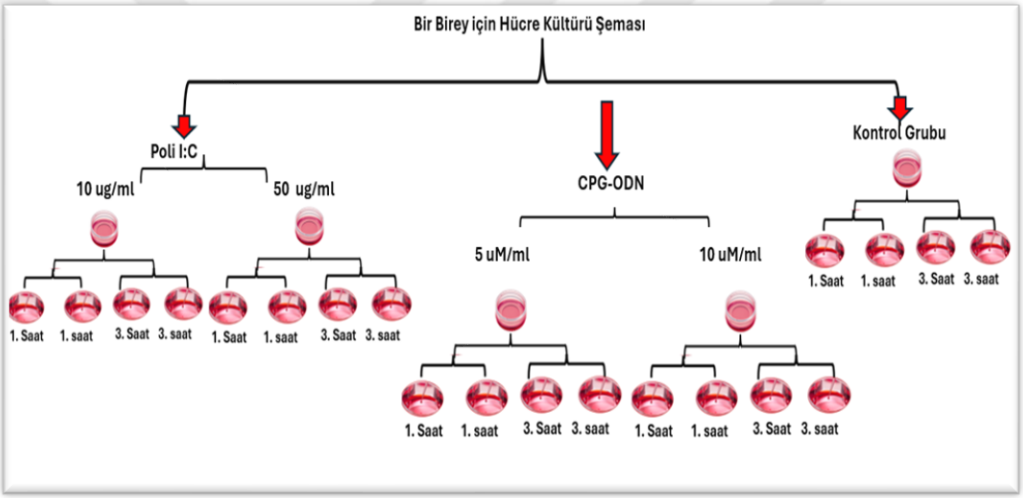
Eritrositler RPMI-1640 içinde 2 ml kan örnek üzerine 3ml yıkama medyumu eklenerek 800 g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem 3 defa tekrar edilmiş ve yıkama sonrası eritrosit hücreleri hücre kültürüne hazırlanmıştır. Hücreler kültüre alınmadan önce kontaminasyonu önlemek için T75 doku kültürü petriye (Biologix, Malezya) alınarak 41°C'de 1,5 saat inkübe edilmiştir (Şekil 3.2.7).

Şekil 3.2. 7. Hücrelerin T75 petrisinde inkübasyona bırakılması

İnkübasyondan sonra eritrositler T75 petrilerinden alınıp farklı konsantrasyonlarda hazırlanan düşük (10 ug/ml) ve yüksek (50 ug/ml) poli I:C ve düşük (5 mM/ml) ve yüksek (10 mM/ml) sentetik sınıf B CpG ODN RPMI medyum içerisinde seyreltilerek 12 kuyucuklu (Biofil, Çin) petri kabında hazırlanmış ve petrinin her bir kuyucuğuna 10^7/ml eritrosit olacak şekilde eklenmiş ve 41°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Çalışılan örnek gruplarının hepsi ikili tekerrürlü olarak hazırlanmıştır (Şekil 3.2.8-9). Kontrol gruplarında sadece medyum kullanılmıştır. İnkübasyondan sonra eritrositler, RNA ekstraksiyonu için 1, ve 3, saat inkübasyondan alınıp RNA izolasyon aşamasına geçilmiştir.



Şekil 3.2. 8. Hücre kültürüne alınan eritrositlerin plate şablonu (A-B) ve inkübasyon sonrası eritrositlerin C) 1. saat sonrası ve D) 3. saat sonrası mikroskop altında görüntülenmesi (kırmızı halka içerisinde belirtilen hücreler ölü hücrelerdir)



Şekil 3.2. 9. Hücre kültürüne alınan örneklerin şablon üzerinde gösterimi

3.2.6. RNA izolasyonu

Örneklerin RNA izolasyonu, ticari kit kullanılarak (Zymo Research, USA) gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2.10). Bu işlem için inkübasyondan alınan hücreler, petri kuyucuklarından mikrosantrifüj tüplerine alınmış ve 10.900 xg'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Mikrosantrifüj tüpünün alt kısmında toplanan eritrositlerden medyum uzaklaştırılmıştır. Ardından, hücrelerin üzerine 400 µl liziz buffer eklenmiş ve eritrositlerin tamamen parçalanmasının ardından 10.900 xg'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası mikrosantrifüj tüpünün üst fazı olan süpernatant, yeni bir RNaz bulundurmayan mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Bu aşamada, protein, yağ, polisakkarit, kas ve bitki fibrillerinden arınma amaçlanmıştır. Süpernatanta eşit volümde EtOH eklenip iyice karıştırılmıştır. Karışım, filtreli membran bulunan tüpe aktarılmış ve karışım 10.900 xg'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Filtrenin altındaki tüpte toplanan lizat atılmıştır. Kolona 400 µl DNA/RNA yıkama tamponu eklenip, 10.900 xg'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Daha sonra, ortamdan DNA'nın uzaklaştırılması amacıyla DNaz uygulaması yapılmış, 400 µl DNA yıkama tamponuna 80 µl DNaz eklenerek karışım

hazırlanmış ve her bir örneğe 80 µl membrana eklenip oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Filtreye 400 µl DNA/RNA ön yıkama tamponu eklenip, 10.900 xg'de 30 saniye santrifüj edilmiş ve toplama tüpünde altta kalan lizat atılmıştır. Ardından, 700 µl DNA/RNA yıkama tamponu eklenip, 10.900 xg'de 30 saniye santrifüj edilmiştir ve altta kalan lizat atılmıştır. Bu işlem, 400 µl DNA/RNA yıkama tamponu eklenerek 10.900 xg'de 2 dakika santrifüj edilip, altta kalan lizat atılarak bir kez daha tekrarlanmıştır. Filtreli membran kolonu RNA/DNA içermeyen 1,5 ml'lik yeni mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilmiş ve doğrudan membranın merkezine 60 µl ddH_2O eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. Son olarak, 8000 xg'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Mikrosantrifüj tüpünde toplanan RNA, -80°C'de muhafaza edilmiştir. RNA'ların yoğunluğu ve saflıkları Biodrop µLite (Biochrom, UK) cihazı ile ölçülmüştür. Spektrofotometrik ölçümler Biodrop cihazında yapılmış ve tez projesinde belirtilen tavuk Toll-benzeri reseptörlerin primerlerinin optimum bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla gradiyent PCR yapılmıştır. Ardından, ilgili tüm örneklerin gen ekspresyonunu belirlemek için cDNA sentezi aşamasına geçilmiştir.

Şekil 3.2. 10. A) Hücre kültürü sonrası medyumu uzaklaştırılan eritrositler B) RNA izolasyonunda kullanılan ticari kit C) RNA izolasyonu için hazırlanan tüpler

3.2.7. Gen ekspresyonu için örneklerin cDNA sentezi

İzolasyon sonrası spektrofotometrik ölçümleri belirlenen örneklerin cDNA sentezi, ticari bir kit (ABM One Script, Kanada) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2.11). Protokole uygun olarak, 1 ng RNA örnekleri, Superscript II cDNA sentez kiti ve oligo-dT primerleri kullanılarak (Çizelge 3.6), toplam hacmi 20 µl olacak şekilde cDNA'ya dönüştürülmüştür. Karışım, RNA ve tüm reaktifler 0,2 ml hacmindeki mikrosantrifüj tüpüne eklenip yavaşça karıştırılarak hazırlanmış ve tüm işlem buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Karışım sırasıyla 25°C'de 10 dakika, 50°C'de 50 dakika ve 85°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Sonuç olarak, 20 µl hacminde 1000 ng cDNA (50 ng/µl) elde edilmiştir. Elde edilen cDNA'lar, RT-qPCR analizinde kullanılmak üzere

20°C'de muhafaza edilmiştir.

Şekil 3.2. 11. RNA örneklerinin cDNA sentezinde kullanılan ticari kit

Çizelge 3. 6. cDNA kitinin bileşenleri ve miktarları

Reaktif	Miktar
RNA	1 µg
OneScript® Plus RTase	1 µl
5X RT Buffer	4 µl
Random Primers (10 µM)	1 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
ddH_2O	20 µl'ye tamamlanmıştır.

3.2.8. RT-qPCR analizi için kullanılacak primerlerin tasarlanması ve analize hazırlanması

RT-qPCR analizinde kullanılan referans gen *GAPDH* (Toparslan, 2023) ve 4 çift primerin tasarımı, NCBI, DnaStar, GenBank, Primer3 Plus, SnapGene Viewer v.6.2.2 ve Amplify4 v.1.0 (Mac OSX 10.9) yazılımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2.5). Genomik DNA kontaminasyonunu önlemek amacıyla, primerler çalışılan genlerin ekzon başlangıç ve bitiş dizilerini kapsayacak şekilde tasarlanmıştır (Şekil 3.2.13). Bu amaçla, 4 genin mRNA dizi verileri GenBank'tan .fas uzantılı dosya olarak indirilmiş ve ekzon dizilerinin lokasyonları veri tabanından alınmıştır. Ardından, SnapGene Viewer v.6.2.2 yazılımında mRNA dosyaları açılarak, her ekzonun bitişine ve bir sonraki ekzonun başlangıç dizisine denk gelecek şekilde (her iki ekzon için en az 7, en fazla 12 baz tamamlayacak şekilde) uygun primer çiftleri tasarlanmıştır (Çizelge 3.7).

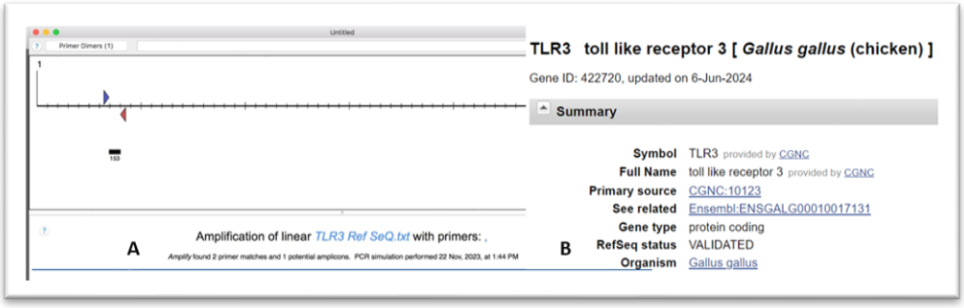
Çizelge 3. 7. qPCR analizinde kullanılan primerlerin dizisi, amplikon uzunlukları ve bağlanma sıcaklıkları

Gen	Primer dizisi (5'-3')	Uzunluk (BP)	Bağlanma sıcaklığı (°C)
GAPDH	F: 5' GTCTTATGACCACTGTCCATGC 3' R: 5' TTCCAGTAAGCTTCCCATTCAG 3'	174	59
ChTLR3	F 5' CCTGAAAGAGTTTCACACAGGA 3' R 5' GTGCGAAAGCTTCACATGG 3'	163	59
ChTLR4	F 5' CTTTCAGATGCACAGGACAGAAC 3' R 5' TGCAGTTTGGGTACTGATGAAAAA3'	133	61
ChTLR5	F 5' ATTCATGATGTTACATCAACGGCT 3' R 5' CACCTGTGAGGTTGCAAGAA 3'	128	60
ChTLR15	F 5' CACTGGAAACAGGAGGATGAG 3' R 5' TGGGAAGGAAGACACTGGAG 3'	121	59

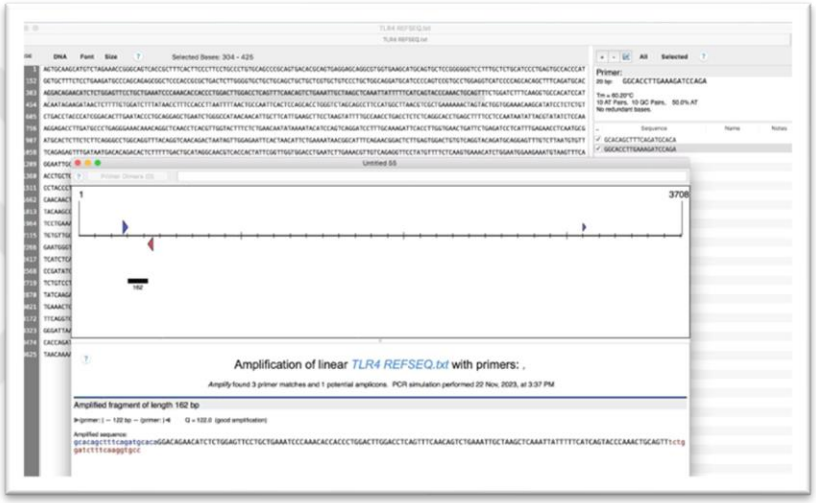
Ekzon-ekzon noktaları seçilemeyen primer çiftleri için, NCBI veri tabanından genin uzun intron dizileri (>2 kb) seçilerek, intronun her iki tarafındaki ekzon dizilerinden yararlanılmıştır. Ekzon geçişine uygun olan primerin pozisyonuna göre, diğer primer intron bölgesinin öncesinde ya da sonrasında bulunan ekzon dizisinin içerisinde kalacak şekilde primer çiftleri tasarlanmıştır. Bu sayede, genomik DNA kalıntısı bulunsa bile, tez çalışmasında kullanılan polimerazın hedef dışı bir amplifikon çoğaltması engellenmiştir.

Tez projesinde kullanılan reseptörlerin primer çiftleri tasarlanırken, primerlerin 100-250 baz çifti (bç) uzunluğunda ve GC oranının %45-60 arasında olmasına dikkat edilmiştir (Şekil 3.2.12). RT-qPCR'da kullanılacak primerlerin amplifikasyon gücü, dimer ya da kendi üzerine katlanma (hairpin) gibi olasılıkları Primer3 Plus ve Amplify4 yazılımlarından yararlanarak kontrol edilmiştir (Şekil 3.2.12-13). Tasarım sırasında, zayıf ya da non-spesifik amplikon üretme potansiyeline sahip primer çiftleri analize dahil edilmemiş ve güçlü bağlanma gösteren primerler seçilmiştir.

Hizmet alımı ile temin edilen primerler (liyofilize), üretici firmanın ürün bilgi formuna göre belirtilen miktarlarda ddH_2O eklenerek 100 µM stok primerler hazırlanmıştır. Ardından, RT-qPCR analizinde kullanılmak üzere ana stoktan 10 µl alınıp üzerine 90 µl ddH_2O eklenerek 10 µM kullanım ara stokları hazırlanmış ve primerler iyice vortekslenip -20°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2. 12. RT-qPCR analizinde kullanılan primerlerin tasarımı; A) GenBank veri tabanındaki *ChTLR3* geninin referans mRNA dizisi baz alınarak tasarlana 153 bç primer B) *ChTLR3* geninin ekzon dizilerinin GenBank veri tabanındaki bilgileri



Şekil 3.2. 13. Tabanındaki *ChTLR4* geninin referans mRNA dizisi baz alınarak tasarlanan 162 bç primerin Amplify4 Programına ait görsel

3.2.9. Tavuk Toll benzeri reseptörlerin polimorfizmleri

Sekanslama hizmeti kapsamında, *ChTLR3*, *ChTLR4*, *ChTLR5* ve *ChTLR15* genleri için yerli tavuk ırklarımız Denizli ve Gerze'ye ait NGS dizi verileri analiz edilmiştir. Bu süreçte her genin dizi verisi MEGA11 yazılımında referans genlerle hizalanmış ve ardından diğer ırklara ait NCBI'da bulunan dizi verileri ile karşılaştırılmıştır.

***ChTLR3*:**

Yerli tavuk ırklarımız Denizli ve Gerze için 4162 bç uzunluğundaki NGS dizi verisi sekanslanmıştır. Sekans verisi, referans gen *Gallus gallus* (NC_0525335) ile önce kendi aralarında hizalanmış, ardından NCBI veri tabanında yer alan diğer ırklara ait şu dizi verileri ile hizalanmıştır:

• *ChTLR3* (1647 bç), (FJ915437 *Gallus gallus isolate* 187 (GG1)), (KM486598), (JF273967 *Gallus gallus* (GG2)), (EF137861 *Gallus gallus* (GG3)), (DQ780341 *Gallus gallus* (GG4)), (KU255222 Silkie (SL1)), (KU235221 Czech (CZ1)), (KU235220 Game

Shamo (GS1)), (KU235219 Game Shamo (GS2)), (KU235218 Frizzle (FR1)), (KU235218 Araucana (AC1)), (KU235208 Czech (CZ2)), (KU235206 Minorka (MN1)), (KU235201 Orloff (OR1)), (KU235198 Orloff (OR2)), (KU235197 Malay (ML1)), (KU235196 La-fleche (LF1)), (KU235178 La-fleche (LF2)), (KU235175 Araucana (AC2)), (KU235174 Aseel (AS1)).

***ChTLR4*:**

Yerli ırklarımıza ait 4431 bç uzunluğundaki NGS dizi verisi sekanslanmış ve referans gen *Gallus gallus* (NC_052548) ile hizalanmıştır. Daha sonra şu ırklara ait dizi verileri ile karşılaştırılmıştır:

• (FJ915485 *Gallus gallus isolate* (GG3)), (KU235225 Barne Velder Bantam (BV1)), (KU235226 Brahma Bantam (BB1)), (KU235228 Czech (CZ1)), (KU235229 Czech (CZ2)), (KU235233 Aseel (AS1)), (KU235234 Araucana (AC1)), (KU235237 Malay (ML1)), (KU235238 Minorka (MN1)), (KU235239 Orloff (OR1)), (KU235244 Silkie (SL1)), (KU235249 Minorca (MN2)), (KU235253 Araucana (AC2)), (KU235260 Game Shamo (GS1)), (KU235264 Malay (ML2)), (KU235267 La-fleche (LF1)), (KU235270 Aseel (AS2)), (KU235287 La-fleche (LF2)), (KU235288 La-fleche (LF3)), (KU235290 Sebright (SB1)), (KU235299 Frizzle (FZ1)), (KU235303 Frizzle (FZ2)), (KU235315 Orloff (OR2)), (JQ711147 Royal (RY1)), (JQ711148 Luiwu Black (LB1)), (JQ711149 Hy-Line Variety Brown (HY1)), (JQ711152 Beijing Fatty (BF1)), (KF421483 Beijing Fatty (BF2)), (KF421485 Leghorn (LG1)), (KF421486 Leghorn (LG2)), (KF476603 Lingnan Yellow (LY1)), (KP410249 Arian (AR1)).

***ChTLR5*:**

5953 bç uzunluğundaki NGS dizi verisi sekanslanmış, referans gen *Gallus gallus* (NC_052534) ile hizalanmış ve şu ırklarla karşılaştırılmıştır:

• (JX573117 Aseel (AS1)), (JF767219 Leghorn (LG1)), (JF767217 Beijing Fatty (BF1)), (JF767213 Hy-Line Variety Brown (HB1)), (JF767212 Laivu Black (LB1)), (JF767211 Royal (RY1)), (DQ004555 *Gallus gallus* (GG2)), (KU235394 La-fleche (LF1)), (KU235387 La-fleche (LF2)), (KU235360 Minorka (MN1)), (KU235388 Orloff (OR1)), (KU235385 Czech (CZ1)), (KU235376 Minorca (MN2)), (KU235369 Czech (CZ2)), (KU235375 Malay (ML1)), (KU235379 Sebright (SB1)), (KU235358 Frizzle (FZ1)), (KU235346 Araucana (AC1)), (KU235347 Araucana (AC2)), (HQ896207 Longxima (LX1)), (HQ896208 Anka (AN1)), (HQ896211 Luhua (LH1)), (HQ896112 Xianju (XJ2)), (HQ896213 A.A Broiler (AB1)), (HQ896214 Qingke (QK1)), (JN102329 Sanhuang (SN1)), (JN102331 Xueshancao (XU1)), (JX096949 Chongrenma (CH1)), (HQ292045 Shigiza (SG1)), (HM747028 Lonshan (LS1)), (FJ915552 *Gallus gallus* (GG3)), (FJ915549 *Gallus gallus* (GG4)), (FJ915544 *Gallus gallus* (GG5)), (FJ915539 *Gallus gallus* (GG6)).

***ChTLR15*:**

3766 bç uzunluğundaki NGS dizi verisi sekanslanmış ve referans gen *Gallus gallus* (NC_052575) ile hizalanmıştır. Ayrıca NCBI veri bankasında bulunan şu dizilerle karşılaştırılmıştır:

• (MH143572 *Gallus gallus* (GG2)), (JN544189 Beijing Fatty (FT1)), (JN544187 Nongda (ND1)), (JN544186 Luhua (LH1)), (JN544185 Hy-Line Variety Brown (HL1)), (JN544184 Black (BL1)), (JN544183 Royal (RY)), (JN544182 White Leghorn (WL1)), (JN544181 White (WH1)), (HM773175 Kadaknath (KD1)), (HM773174 Aseel (AS1)), (JX096951 Chongrenma (CH1)), (JN112029 Zhongbai (ZH1)), (JN112028 Xueshanma (XU1)), (JN112027 Xueshanhuang (XU2)), (JN112026 Xueshancao (XU3)), (JN112025 Wugu (WU1)), (JN112024 Sanhuang (SH1)), (JN112023 Qinjiaoma (QM1)), (JN112022 Qinke (QK1)), (JN112021 A.A Broiler (AB1)), (JN112020 Xianju (XA1)), (JN112019 Luhua (LH2)), (JN112018 White Feather (WF1)), (JN112017 Anka (AN1)), (JN112016 Lanshan (LN1)), (HQ292048 Haisailesi (HS1)), (HQ292047 Shigiza (SG1)), (FJ915254 *Gallus gallus* (GG3)), (FJ915256 *Gallus gallus* (GG4)), (FJ915223 *Gallus gallus* (GG5)), (FJ915224 *Gallus gallus* (GG6)), (FJ915225 *Gallus gallus* (GG7)), (FJ915226 *Gallus gallus* (GG8)), (FJ915227 *Gallus gallus* (GG9)), (FJ915228 *Gallus gallus* (GG10)).

3.2.10. Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR)

Hücre kültürü sonrası RNA izolasyonu yapılan ve ardından cDNA sentezi gerçekleştirilen örnekler, RT-qPCR analizi (BioRad C100Touch, İsviçre) için RealQ Plus SYBR Green 2X qPCR mix (Ampliqon, Danimarka) kullanılarak hazırlanmıştır. RT-qPCR karışımı hazırlanırken, Denizli ve Gerze tavuğuna ait örnekler üçlü tekrarlı olarak 96 kuyucuklu plaka üzerinde (1x RealQ Plus 2X mix, 0,2 µg primer, 100 ng cDNA ve toplam hacim 10 µl olacak şekilde) hazırlanmıştır. RT-qPCR koşulları, 95 °C'de 15 dakika boyunca ön inkübasyon, ardından 95 °C'de 30 saniye denatürasyon, 59,3 °C'de 30 saniye primer bağlanma, 72 °C'de 30 saniye uzama ve 72 °C'de 10 dakika son uzama şeklinde uygulanmıştır (Çizelge 3.8-9).

Çizelge 3. 8. RT-qPCR termal döngü, süre ve sayısı

Reaktif	Sıcaklık(°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön inkübasyon	95	5dk	-
Denatürasyon	95	1dk	
Bağlanma (Annealing)	59,3	30sn	45X
Uzama	72	30sn	-
	72	10dk	

Çizelge 3. 9. RT-qPCR'da kullanılan bileşenler

PCR Bileşenleri	Miktar	Konsantrasyon
Kalıp cDNA	5 µl	100 ng
Her bir primerden	0,25 µl	10 pmol
2X qPCR Master Mix	6 µl	
ddH_2O	0,5 µl	
Toplam Hacim	10 µl	

3.2.11. Gerçek zamanlı-kantitatif polimeraz zincir raksiyonu (RT-qPCR) analizi

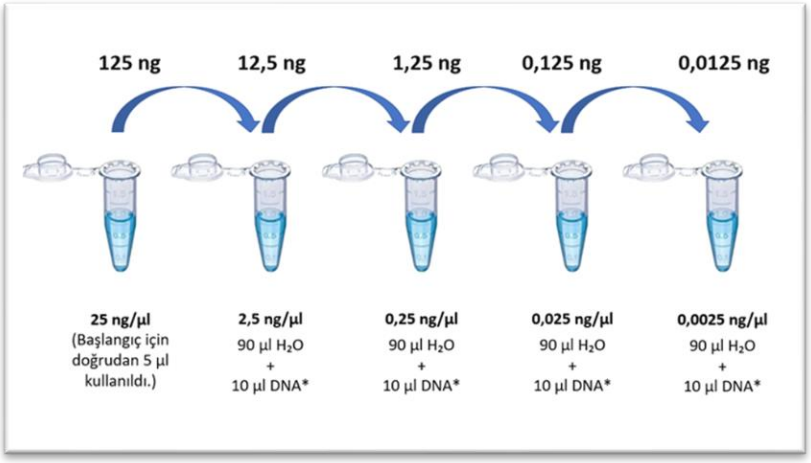
3.2.11.1. Primerler için standart eğri oluşturulması

Çalışmaya başlamadan önce Denizli tavuk ırkına ait 2 adet cDNA örneği (5 ve 13 numaralı) kullanılarak, tüm primerler PCR analizi ve agaroz jel elektroforezi ile doğrulanmış ve ardından RT-qPCR analiz aşamasına geçilmiştir. 4 adet reseptör genine özgü tasarlanan primerlerin RT-qPCR analizindeki verimliliğini belirlemek ve en uygun cDNA bağlanma konsantrasyonunu tespit etmek amacıyla bir ön çalışma olarak standart eğri analizi yapılmıştır. Bu analizde, SYBR Green floresan tabanlı bir polimeraz kiti olan RealQ Plus 2X Master Mix Green kullanılmıştır (Şekil 3.2.15). Denizli tavuk ırkının 13 numaralı cDNA örneği, 1:10 oranında 5 farklı dilüsyon (125 ng, 12,5 ng, 1,25 ng, 0,125 ng, 0,0125 ng) olacak şekilde seyreltilmiş ve house keeping gen (*GAPDH*) ile birlikte 5 adet primer çifti kullanılarak RT-qPCR analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2.14). Başlangıçta, bazı primerler 4 dilüsyon için başarılı amplifikasyon vermediği için çalışma 1:2 ve 1:4 oranlarında 5 dilüsyon cDNA numunesiyle tekrar edilmiştir (sırasıyla *GAPDH* ve *ChTLR15*). Daha sonra, tüm primerler için ilk dilüsyon örneklerinde 100 ng/µl ana stok cDNA 1:1 oranında seyreltilerek 50 ng/µl cDNA ara stoğu hazırlanmış ve başlangıç dilüsyonu olarak doğrudan 5 µl cDNA kullanılmıştır. Böylece, tüm standart dilüsyonlar için (1:10, 1:4 ve 1:2 oranlarında) başlangıç cDNA miktarı 125 ng olarak ayarlanmıştır.

1:10 oranında yapılan cDNA dilüsyonu için, ara stok cDNA'dan (25 ng/µl) 10 µl alınarak üzerine 90 µl ddH_2O eklenmiş ve 2,5 ng/µl konsantrasyonda cDNA elde edilmiştir. Her dilüsyon, bir önceki dilüsyondan 10 µl alınarak ve 90 µl ddH_2O eklenerek hazırlanmıştır. RT-qPCR analizi için, her cDNA dilüsyonundan son hacimde 5 µl örnek kullanılmıştır (125 ng, 12,5 ng, 1,25 ng, 0,125 ng, 0,0125 ng).

1:4 oranında seyreltilen cDNA dilüsyonu için, ara stok cDNA'dan (25 ng/µl) 12,5 µl alınarak üzerine 87,5 µl ddH_2O eklenmiş ve 3,125 ng/µl konsantrasyonda cDNA elde edilmiştir. Her dilüsyon, bir önceki dilüsyondan 12,5 µl alınarak ve 87,5 µl ddH_2O eklenerek hazırlanmıştır. RT-qPCR analizi için her cDNA dilüsyonundan 5 µl kullanılmıştır (125 ng, 15,625 ng, 1,95312 ng, 0,24414 ng, 0,03051 ng). Bu dilüsyon serisinde yalnızca *ChTLR15* genine özgü tasarlanan primer kullanılmıştır.

1:2 oranında seyreltilen cDNA dilüsyonu için, ara stok cDNA'dan (25 ng/µl) 25 µl alınarak üzerine 50 µl ddH_2O eklenmiş ve 6,25 ng/µl konsantrasyonda cDNA elde edilmiştir. Her dilüsyon, bir önceki dilüsyondan 25 µl alınarak ve 50 µl ddH_2O eklenerek hazırlanmıştır. RT-qPCR analizi için, her dilüsyon serisinden son hacimde 5 µl cDNA kullanılmıştır (125 ng, 31,25 ng, 7,8125 ng, 1,95312 ng). Bu dilüsyon serisinde yalnızca *ChTLR5* genine özgü tasarlanan primer kullanılmıştır.



Şekil 3.2. 14. Standart eğri analizi için 1:10 oranında hazırlanan 5 farklı cDNA dilüsyonu. Tüplerin alt kısmında belirtilen konsantrasyonlar, dilüe edilmiş cDNA miktarlarını ifade etmektedir. Standart eğri analizinde her dilüsyondan 5 µl cDNA kullanılmıştır. Tüplerin üzerindeki konsantrasyonlar ise RT-qPCR analizinde kullanılan son cDNA yoğunluk miktarlarını göstermektedir.

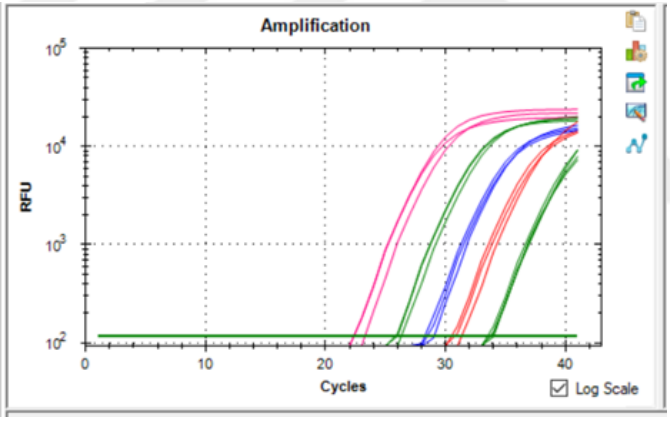
Dilüsyon sonrası standart eğri analizi için, C100 TouchCycler® Termal Cycler yazılımı kullanılarak 96'lık plate (Thermo Scientific, Çin) üzerinde cDNA örneklerinin dilüsyonları, kuyucuk yerleşimleri ve döngü program bilgileri Şekil 3.2.15'te verilmiştir. Her 96'lık plate için 4 gen analizi gerçekleştirilmiştir. Her gen için, her dilüsyon 3 tekrarlı olacak şekilde (5 dilüsyon x 3 tekrar = 15 örnek) analiz yapılmıştır. Negatif kontrol örnekleri 5 tekrar olarak çalışılmıştır ve bu örneklerde cDNA yerine aynı miktarda (10 µl) ddH_2O kullanılmıştır.

RT-qPCR analizi için, ticari kit protokolünde belirtilen talimatlara uygun şekilde 24 örnekten oluşan reaksiyon karışımları hazırlanmıştır. Her bir gen için reaksiyon karışımları ayrı ayrı oluşturulmuştur. Kullanılan reaktifler ve miktarları Çizelge 3.7'de gösterilmiştir. Hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 10 µl reaksiyon karışımı eklenmiş, ardından her dilüsyondan 5 µl cDNA ilave edilmiştir. RT-qPCR analizi, C100 TouchCycler® Termal Cycler System (BioRad, BAE) cihazında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2.15).

Şekil 3.2. 15. Standart eğri analizi için kullanılan RT-qPCR cihazı, örneklerin plate şablonu ve SYBR Green tabanlı master mix

Analiz sonucunda, cDNA içerisinde herhangi bir genomik DNA kontaminasyonu olup olmadığı veya primerlerin spesifik olmayan bölgelere bağlanarak başka bir amplikon üretip üretmediği, analiz sırasında oluşturulan ve C100 TouchCycler® Termal Cycler yazılımı ile desteklenen erime eğrisi grafikleri ile kontrol edilmiştir (Şekil 3. 16). Analiz sonunda, her kuyucuktaki primer çiftinin amplifikasyon başarı tablosu ve bu primerlerin amplifikasyonu sonucu elde edilen amplifikasyon eğrisi grafikleri elde edilmiştir. cDNA dilüsyonlarına karşılık gelen Cq değerleri, C100 TouchCycler® Termal Cycler yazılımı tarafından belirlenmiştir. Tüm reseptör genleri için R^2 değeri ≥ 0.99 şartı sağlanana kadar RT-qPCR analizi tekrarlanmıştır. RT-qPCR analizinin verimliliği, Bio-Rad CFX Maestro yazılımı tarafından standart eğri çizelgesinde verilen eğim değeri kullanılarak hesaplanmıştır. Her primer çifti için RT-qPCR verimliliği hesaplama formülü 3.1'de sunulmuştur (Y. Wang vd. 2023).

$$E = \left(10^{(-1/slope)} - 1\right) \times 100 \tag{3.1}$$



Şekil 3.2. 16. *GAPDH*, primeri için cDNA dilüsyon pik görüntüsü

3.2.11.2. RT-qPCR analizi ile genlerin ifadelerinin belirlenmesi

Standart eğri analizi sonucunda, tüm primerler için $R^2 > 0.99$ değeri sağlanmış ve 5 primer çifti için en verimli cDNA konsantrasyonu 100-125 ng olarak belirlenmiştir. Daha sonra, her iki ırkın (Gerze ve Denizli) her bir bireyinden (4+4 birey) toplanan 5 ml kan dokusundan *in vitro* hücre kültürü ile elde edilen cDNA'lardaki 4 genin ifade seviyeleri (*GAPDH* endojen referans geni ile birlikte) RT-qPCR analiziyle tespit edilmiştir (Şekil 3.2.16). Gen ifadelerinin belirlenmesinde SYBR Green floresan tabanlı bir polimeraz kiti ve Bio-Rad C100 TouchCycler® Termal Cycler cihazı kullanılmıştır. Tüm analizler, RT-qPCR 96'lık mat plate (AB-3496, Çin) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hücre kültüründen ikili tekrar olarak alınan örneklerin cDNA'ları, her bir gen için 3 tekrar olacak şekilde analiz edilmiştir. Kullanılan kit bileşenleri ve miktarları Çizelge 3.8'de, RT-qPCR analizinde uygulanan sıcaklık döngü programı ise Çizelge 3.9'da verilmiştir. Analiz sonucunda, her bir örnek ve tekrarlı çalışılan tüm primerler için gen ifade

seviyeleri, "Bio-Rad CFX Maestro" yazılımı tarafından C_q değerleri olarak belirlenmiştir. RT-qPCR analizi sonucunda elde edilen amplikonlar, %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek doğrulanmıştır.

3.2.11.3. Göreceli kantitatif mRNA ifade seviyelerinin belirlenmesi

Göreceli kantitatif mRNA ifade seviyesinin belirlenmesi için bir dizi denklem kullanılarak belirlenmektedir. Bu denklemlerden Schmittgen ve Livak (2008) tarafından geliştirilen $2^{\wedge(\llbracket -\Delta C \rrbracket_{-q})}$ yöntemi, çalışılan kontrol ve muamele gruplarının ya da bir deneme grubunun zamana bağlı gen ifade seviyelerinin değişikliklerinin ($2^{-\Delta Cq}$) karşılaştırılmasında kullanılmaktadır. Yerli Gerze ve Denizli tavuk ırklarına ait örneklerin göreceli kantitatif mRNA ifade seviyeleri $2^{-\Delta Cq}$ yöntemine göre hesaplanmıştır. Her iki tavuk ırkının sahip olduğu gen ifadesi değişimi $2^{-\Delta Cq}$(düşük konsantrasyon) / $2^{-\Delta Cq}$(yüksek konsantrasyon) (kat değişimi) yöntemine göre hesaplanmıştır (Schmittgen ve Livak 2008). $2^{\wedge(\llbracket -\Delta C \rrbracket_{-q})}$ değerinin hesaplanması için RT-qPCR analizinin üstel fazında gerçekleşen amplifikasyonu tanımlayan

$$X_n = X_0 \times (1 + E_x)^n \tag{3.2}$$

denklemi oluşturulmuştur (3.2).

X_n, amplifikasyonun n'inci döngüsünde hedef mRNA'nın miktarını belirtirken X_0, hedef mRNA'nın başlangıç miktarını belirtmekte ve E_x, ise hedef mRNA'nın PCR verimliliğini ve n'de döngü sayısını göstermektedir. Eşik döngüsü/değeri (C_q), amplifiye olan hedef mRNA miktarının sabit bir eşiği belirten kesirli döngü sayısını belirtmektedir. Bu nedenle denklem

$$X_q = X_0 \times (1 + E_x)^{C_{q,x}} = K_x \tag{3.3}$$

olacak şekilde düzenlenmektedir (3.3);

X_q, çoğaltılması hedeflenen molekülün eşik sayısı, C_q, hedef mRNA'nın amplifikasyonundaki eşik döngü sayısını belirtirken, K_x de bu denklemden elde edilen bir sabit sayıyı belirtmektedir. House keeping referans gen için de benzer bir eşitlik oluşturulduğunda

$$X_q = X_0 \times (1 + E_x)^{C_{q,x}} = K_x \tag{3.4}$$

denklemi elde edilmektedir (3.4).

R_q, referans molekülün eşik sayısını belirtmekte R_0, referans mRNA'nın başlangıç miktarını ve E_R, referans mRNA'nın qPCR verimliliğini temsil etmektedir. $C_{q,R}$, referans mRNA'nın amplifikasyonu için eşik döngü sayısını ve K_R'de bu denklemden elde edilen bir sabit sayıyı temsil etmektedir. X_q değerinin R_q değerine bölünmesinden,

$$\frac{X_q}{R_q} = \frac{X_0 \times (1+E_x)^{-C_{q,x}}}{R_0 \times (1+E_R)^{-C_{q,R}}} = \frac{K_x}{K_R} = K \quad (3.5)$$

denklemi elde edilmektedir (3.5).

İfade edilen hedef mRNA ve housekeeping referans genin mRNA amplifikasyon verimliliklerinin eşit olduğu varsayımında (3.6-8);

$$E_x = E_R = E \quad (3.6)$$

$$\frac{X_0}{R_0} \times (1+E)^{C_{q,x} - C_{q,R}} = K \quad (3.7)$$

$$X_N \times (1+E)^{\Delta C_q} = K \quad (3.8)$$

X_N, hedef mRNA'nın normalize edilen miktarı belirtirken (X_0/R_0) ve ΔCq, hedef ve referans mRNA'nın C_q değerleri arasındaki farka ($C_{q,X} - C_{q,R}$) eşittir. Denklem düzenlendiğinde elde edilen eşitlik;

$$X_N = K \times (1+E)^{-\Delta C_q} \quad (3.9)$$

olmaktadır (3.9).

Oluşturulan bu denklemler $2^{-\wedge\Delta Cq}$ değerini verdiğinden hedef ve endojen referans mRNA'ların RT-qPCR verimliliğinin 1'e yakın olması ve (E = ~1 ya da %93-105) arasında olması gerekmektedir (Kuang vd. 2018; Nolan vd. 2006; Schmittgen ve Livak 2008). Denklemin Schmittgen ve Livak 2008' de belirttikleri

$$Göreceli\ Kantitatif\ mRNA\ miktarı = 2^{-\Delta C_q} \quad (3.10)$$

şeklinde olmaktadır (Schmittgen ve Livak 2008) (3.10).

Örneğin TLR15 geninin Gerze ve Deniz tavuk ırkları için göreceli kantitatif ifade seviyesi

$\Delta C_{qDenizli,ChTLR15} = C_{qortalama,ChTLR15} - C_{qortalamaGAPDH}$ (normalizasyon) = $2^{-\Delta CqDenizli,ChTLR15}$

$\Delta C_{qGerze,ChTLR15} = C_{qortalama,ChTLR15} - C_{qortalama,GAPDH}$ (normalizasyon) = $2^{-\Delta CqGerze,\ ChTLR15}$

şeklinde olmaktadır.

3.2.12. İstatistiki analizler

Hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilen tez projesinin ilk aşamasında, polimorfizm örneklerine ait NGS analizi sonrası elde edilen Toll benzeri reseptörlerin dizi verileri,

firma tarafından tarafımıza iletilmiştir. Toplam 12 örneğe ait 48 okuma, 4 reseptöre ait gen bölgesi dizisi MEGA v.6.0 (Tamura vd., 2013) yazılımında hizalanarak bir sonraki analiz için hazırlanmıştır. Analizlerin kolaylığı açısından örnek isimleri yeniden kodlanmıştır; örneğin, Gerze popülasyonuna ait örnekler GRZ1-6, Denizli popülasyonuna ait örnekler ise DNZ1-6 olarak adlandırılmıştır. Bu nedenle bazı analiz çıktılarında örnek kodları bu şekilde belirtilmiştir.

Denizli ve Gerze tavuk ırklarına ait *TLR* dizilerine dayalı nükleotid polimorfizmleri, haplotipler ve haplotip frekansları, RStudio v.4.0.3 (Racine 2012) yazılımı kullanılarak yazılan kısa kodlarla elde edilmiştir (Toparslan vd., 2020). Haplotipler arasındaki genetik uzaklık ve ilişki ağı görselleştirmesi, pegas paketi (v.0.14) (Paradis 2010) ile gerçekleştirilmiştir. Haplotip çeşitliliği (Hd) ve nükleotid çeşitliliği (π) gibi parametrik ölçümler, DnaSP v.3.5 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır (Librado ve Rozas 2009). Denizli, Gerze ve NCBI veritabanından alınan diğer tavuk ırkları arasındaki filogenetik ilişki, Neighbor-Joining yöntemi (Saitou ve Nei 1987) kullanılarak RStudio (v.4.0.3) yazılımının ape, stats, ggtree ve ggplot2 paketleri ile görselleştirilmiştir (Paradis vd. 2008; Team 1999). Ayrıca, dört reseptöre ait protein sekans dizileri NCBI Multiple Sequence Alignment Viewer (v.1.25.2) online veritabanında hizalanarak test edilmiştir.

Tez projesinin ikinci aşamasında, hücre canlılık testi ve hücre kültürü sonuçlarına dayanarak Gerze ve Denizli tavuk ırklarından elde edilen göreceli kantitatif mRNA seviyelerinin ($2^{\wedge(-\Delta Cq)}$) ırk içi ve ırklar arası farklılıkları, SPSS v.23 yazılımı kullanılarak bağımsız örneklem t-testi ile analiz edilmiştir (Schmittgen ve Livak 2008). Çalışılan iki örneklem grubunun ortalamalarını karşılaştırmak için bağımsız örneklem t-testi uygulanmıştır (Kim 2015).

Gen ifadesi üzerine, ırk, uygulama konsantrasyonları (UK) ve ırk*UK etkileşiminin önem düzeyi, tek değişkenli varyans analizi ile SPSS v.28 yazılımında varyans ve standart sapma değerleri hesaplanarak Genel Doğrusal Model (GLM) modülü kullanılarak test edilmiştir (SPSS 2001; Kim 2015; Lee vd. 2015). Ayrıca *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* reseptörlerine ait sekans verileri MEGA 11 kullanılarak protein sekansı olarak dönüştürülmüştür. Ardından protein polimorfizm için NCBI protein Blast kullanılarak analiz edilmiştir. *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* reseptörlerine ait protein sekans verileri (SMART service; http://smart.embl-heidelberg.de) online analiz programı kullanılarak analiz edilmiş ve görselleştirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. DNA/RNA örneklerinin kalite ve kantite sonuçları

Polimorfizm ve hücre kültürü olarak iki aşamada tamamlanan doktora tez çalışmasında, Gerze ve Denizli tavuk ırklarına ait kan örnekleri iki farklı amaçla toplanmıştır. Polimorfizm çalışması için her iki ırkta 6'şar bireyden (3T+3H), hücre kültürü çalışması için ise her iki ırktan 4'er bireyden (2T+2H) kan örnekleri alınmıştır.

Gerze ve Denizli tavuk ırklarına ait DNA/RNA örneklerinin izolasyonu sonrası, nükleik asitlerin saflık ve absorbans oranları 260/280 nm ve 260/230 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçümlerle değerlendirilmiştir. Ölçümlerde 260/280 nm dalga boyundaki absorbans oranının RNA için yaklaşık 2.0, DNA için ise yaklaşık 1.8 olması beklenmiştir. Bu durum, timin nükleotidinin urasil nükleotidine oranla daha düşük absorbansa sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Timin: 1.47; Urasil: 4.00) (Sanchez vd. 2015). Nükleik asit saflığının ikincil bir göstergesi olan 260/230 nm dalga boyundaki absorbans oranının ise 2.0-2.2 aralığında olması gerekmektedir (Sanchez vd. 2015).

Çalışmanın her iki aşamasında, Gerze ve Denizli tavuk ırklarından elde edilen DNA örneklerinin saflık ve yoğunluk değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. İzolasyon sonrası yapılan ölçümler, DNA örneklerinin 260/280 ve 260/230 nm dalga boylarındaki absorbans oranlarının, "saf" olarak değerlendirilebilecek aralıklarda olduğunu göstermiştir. DNA miktarları 101-186 ng ile 1.8-2.4 µg arasında değişmiştir.

Çizelge 4. 1. Denizli ve Gerze tavuk ırklarına ait polimorfizm çalışılan örneklerin DNA saflık ve yoğunlukları

Birey	Gerze			Denizli		
	Yoğunluk (ng/ul)	260-230%	260-280%	Yoğunluk (ng/ul)	260-230%	260-280%
1	118	2,08	1,90	128	2,00	1,80
2	101	2,10	1,90	116	2,10	2,10
3	124	2,10	1,90	125	2,02	1,90
4	186	2,10	2,40	120	2,10	2,01
5	184	2,00	1,90	143	2,20	2,04
6	126	2,00	1,80	158	2,10	2,03

Her iki ırka ait DNA örnekleri, *ChTLR3* (F1R1, F2R2, F3R3), *ChTLR4* (F1R1, F2R2), *ChTLR5* (F1R1, F2R2) ve *ChTLR15* (F1R1, F2R2) primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Her bir fragmente ait PCR amplikonlarının biodrop ölçümleri yapılmış ve yeteri miktarda çoğaltım yapılan örnekler NGS analizi için hazırlanmıştır.

Hücre kültüründe farklı sürelerde ve farklı ligand muamelesi uygulanmış Denizli ve Gerze tavuk ırklarına ait RNA örneklerinin de saflık ve yoğunluk ölçümleri, 260/280 ve 260/230 nm dalga boylarında Biodrop cihazı ile yapılmıştır. RNA örneklerinin değerleri 40-450 ng ile 1.7-2.09 µg arasında tespit edilmiştir. Her iki ırka ait ölçümler Çizelge 4.2-3 ve EK 1-6'da verilmiştir.

Çizelge 4. 2. Denizli ve Gerze tavuk ırklarına ait hücre kültürü çalışılan birinci bireyin birinci saat sonrası örneklerin RNA saflık ve yoğunlukları

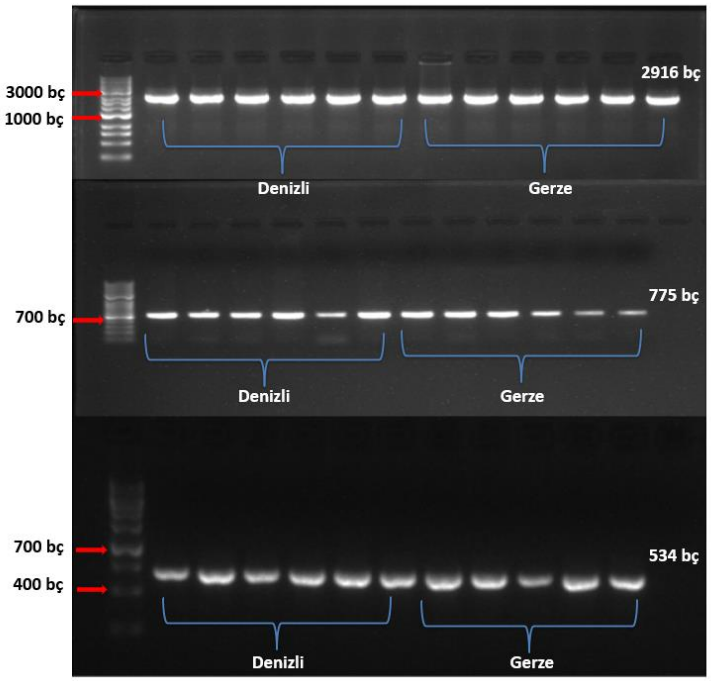
Birinci Birey 1. Saat	Örnek Kodu	Gerze			Denizli		
		Yoğunluk (ng/ul)	260-230%	260-280%	Yoğunluk (ng/ul)	260-230%	260-280%
1	1	174	2,03	2,09	57	1,90	2,00
1	2	127	2,01	1,80	51	2,01	2,10
1	3	262	2,00	2,02	53	1,80	1,90
1	4	150	2,03	2,09	77	1,70	1,80
1	5	142	2,06	2,01	61	2,02	2,04
1	6	71	1,90	2,00	63	2,01	1,09
1	7	66	2,10	1,80	58	1,80	2,01
1	8	76	2,03	1,90	114	1,70	1,90
1	9	58	1,90	2,00	87	1,90	2,03
1	10	62	1,80	1,90	92	2,04	2,01

Çizelge 4. 3. Denizli ve Gerze tavuk ırklarının hücre kültürü birinci bireyin üçüncü saat sonrası örneklerin RNA saflık ve yoğunlukları

Birinci Birey 3. Saat	Örnek Kodu	Gerze			Denizli		
		Yoğunluk (ng/ul)	260-230%	260-280%	Yoğunluk (ng/ul)	260-230%	260-280%
1	11	150	1,83	2,07	120	1,70	1,80
1	12	170	1,81	2, 08	93	1,91	2,01
1	13	212	2,01	1,92	216	1,83	1,90
1	14	238	2,04	2,01	176	1,81	1,83
1	15	242	2,05	2,01	63	2,02	1,84
1	16	74	1,78	2,09	68	2,01	1,08
1	17	65	2,01	1,80	78	1,80	1,91
1	18	72	2,00	1,90	84	1,70	1,90
1	19	68	1,90	2,03	82	1,80	2,00
1	20	82	1,88	1,93	91	2,03	2,06

4.2. PCR analizi ile primerlerin kontrol edilmesi

Denizli ve Gerze tavuk ırklarına ait *ChTLR3* (F1R1, F2R2, F3R3), *ChTLR4* (F1R1, F2R2), *ChTLR5* (F1R1, F2R2) ve *ChTLR15* (F1R1, F2R2) primerleri kullanılarak PCR analizi yapılmış ve test edilmiştir (Gerze: 6 ve Denizli: 6). *ChTLR3* için üç fragment (F1R1-1216, F2R2-543, F3R3-772) (Şekil 4.1), iki fragment *ChTLR4* (F1R1-1142, F2R2-1414) (EK-7), *ChTLR5* (F1R1-1301, F2R2-1516) (EK-8) ve *ChTLR15* (F1R1-1423, F2R2-1378) (EK-9) primerleri tasarlanarak PCR'da test edilmiştir. PCR sonrası, her bir reseptöre ait başarılı amplifikasyon, agaroz jel elektroforezi ile doğrulanmıştır (Şekil 4.1). Tüm örneklerde hedeflenen bölgenin başarılı bir şekilde çoğaltıldığı doğrulanmıştır. PCR amplikonlarının NGS sekans verileri, hizmet alımı yoluyla başarıyla sekanslanmıştır.



Şekil 4. 1. Gerze ve Denizli tavuk ırklarına ait DNA örneklerinin *ChTLR3* primerinin üç fragmentine ait jel görüntüsü

Denizli ve Gerze tavuk ırklarına ait kan (eritrosit) örneklerinden izole edilen RNA, ticari bir kit kullanılarak başarılı bir şekilde cDNA'ya dönüştürülmüş ve *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* primerleri RT-qPCR kullanılarak test edilmiştir (Gerze: 4 ve Denizli: 4). RT-qPCR sonrası, her bir reseptörün başarılı amplifikasyonu agaroz (%2) jel elektroforezi ile test edilmiştir.

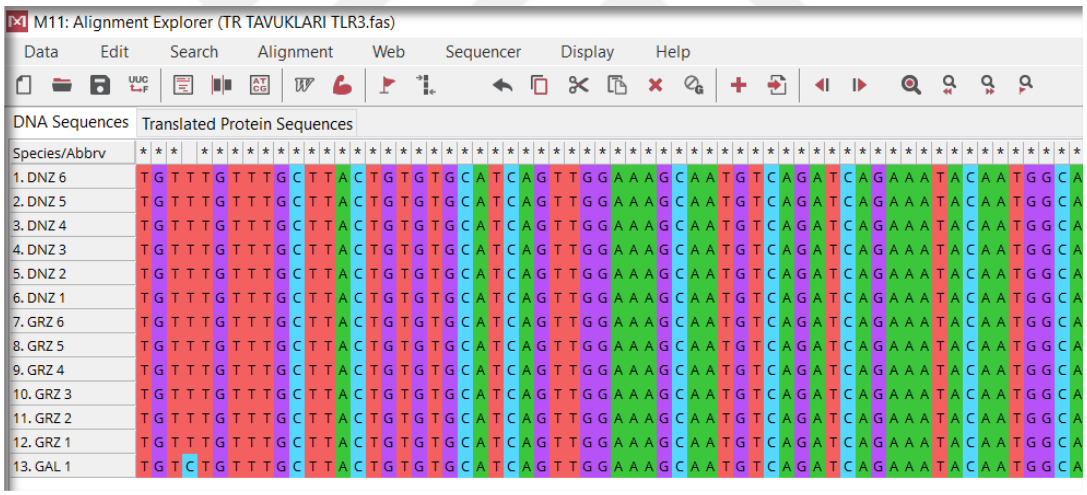
4.3. Denizli ve Gerze ırklarının tavuk *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* 'in polimorfizmi

Denizli ve Gerze tavuk ırklarına ait *ChTLR3* genine ait NGS sekans verileri başarıyla elde edilmiş ve firma tarafından tarafımıza iletilmiştir. Referans genom olarak *Gallus gallus* (GenBank: NC_0525335) kullanılmıştır. Her bir reseptör için analiz ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. *ChTLR3* gen bölgesini kapsayan 4162 bp uzunluğundaki dizi MEGA11 programında hizalanmış (Şekil 4.2) ve popülasyon içi ile popülasyonlar arası filogenetik ağaçlar elde edilmiştir (Şekil 4.5 ve 4.9). Daha sonra DnaSp5.10 programında yapılan analiz sonucunda Denizli ve Gerze tavuk ırklarına ait 17 adet SNP tespit edilmiştir (Şekil 4.2).

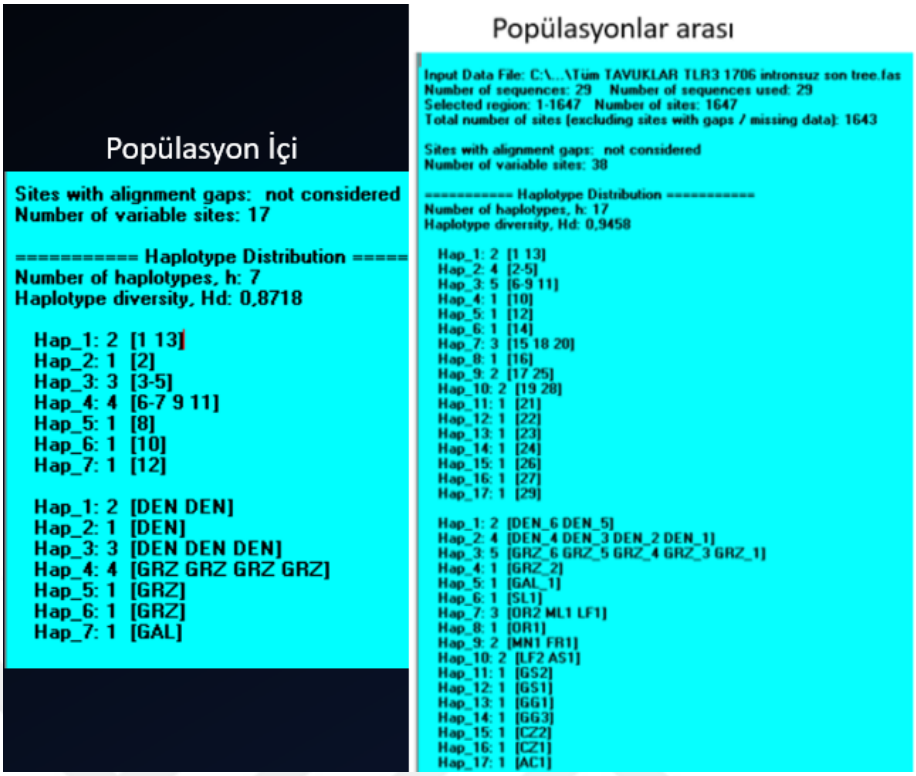
Denizli ve Gerze tavuk ırkları kendi içinde kıyaslandığında 9 haplotip ve 17 nükleotit farklılığı, diğer ırklarla kıyaslandığında ise 18 adet haplotip ve 38 nükleotit varyasyonu (1-1647 baz çifti aralığında) tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Haplotip dizileri, veri setindeki frekansı ve veri setindeki yüzdesi Şekil 4.3'te verilmiştir. Tüm nükleotid pozisyonlarında iki nükleotid varyasyonu gözlemlenmiştir. Popülasyonlar içi ve popülasyonlar arası haplotip çeşitliliği (Hd) sırasıyla 0,8718 ve 0,9458 olarak belirlenmiştir. Denizli tavuk popülasyonu, H1, H2, H3, H4 ve H5 haplotiplerinde yer alırken, Gerze ırkının bireyleri H7, H8 ve H9 haplotiplerinde yer aldığı saptanmıştır

(Şekil 4.4). R-studio programından alınan popülasyonlar arası haplotip çeşitliliği ve nükleotit pozisyonları Şekil 4.8'te verilmiştir. Denizli ve Gerze tavuk ırklarının *ChTLR3* reseptörüne ait sekans verilerinin R-studio programında yapılan popülasyon içi ve popülasyonlar arası haplotip ağı Şekil 4.6 ve 4.10'de verilmiştir. Denizli ve Gerze tavuklarına ait *ChTLR3* reseptörüne ait sekans verileri, R-sudio programı kullanılarak oluşturulan popülasyon içi dendogram şekil 4.5'da popülasyonlar arası dendogram 4.9'da verilmiştir.

Denizli ve Gerze tavuk ırklarının *ChTLR3* reseptörüne ait sekans verileri, R-Studio programı kullanılarak oluşturulan dendogramda, her iki ırkın kendi içinde kümelendiği ve diğer ırklarla kıyaslandığında bakteriyel hastalıklara dirençli olduğu bildirilen Orlof (OR) gibi ırklarla yakın kümelerde yer aldığı gözlemlenmiştir. Denizli ve Gerze tavuk ırklarının *ChTLR3* reseptörüne ait sekans verilerinin R-studio programında yapılan popülasyon içi ve popülasyonlar arası ısı haritaları Şekil 4.8 ve 4.11'de verilmiştir. Ayrıca *ChTLR3*'e ait 547 protein nükleotid dizisinin analizi sonucunda (9 polimorfik bölge) polimorfik özellik gösteren amino asit pozisyonları ve diğer ırklarla benzerlikleri EK-12'de verilmiştir (Şekil 4.12). *ChTLR3* haplotip çeşitliliği Denizli ve Gerze tavuklarının diğer ırklar ile analizi incelendiğinde1'e (0,9854) yakın değer aldığı ve analiz edilen 17 ırkın her birinin kendi içinde ayrı haplo grupta yer aldığı saptanmıştır. Çalışılan ırkların her birinin sahip olduğu farklılık dolayısıyla hastalığa direnç bakımından *ChTLR3*'ün biyo-belirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.



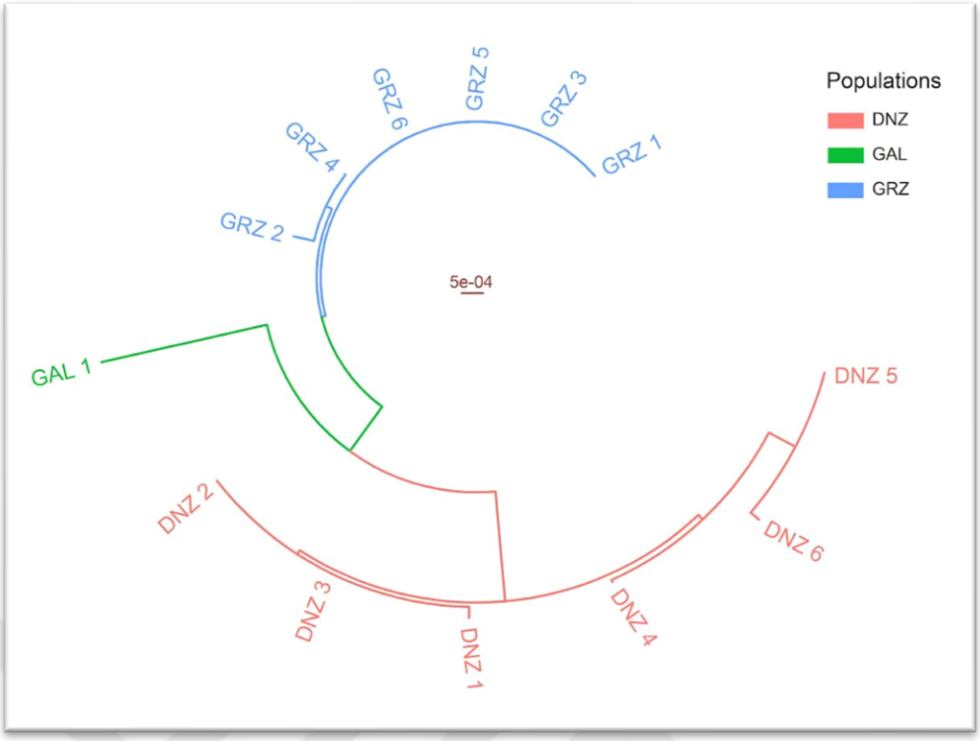
Şekil 4. 2. *ChTLR3* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarına ait sekans dizisinin referans gen ile Mega11'de hizalanması



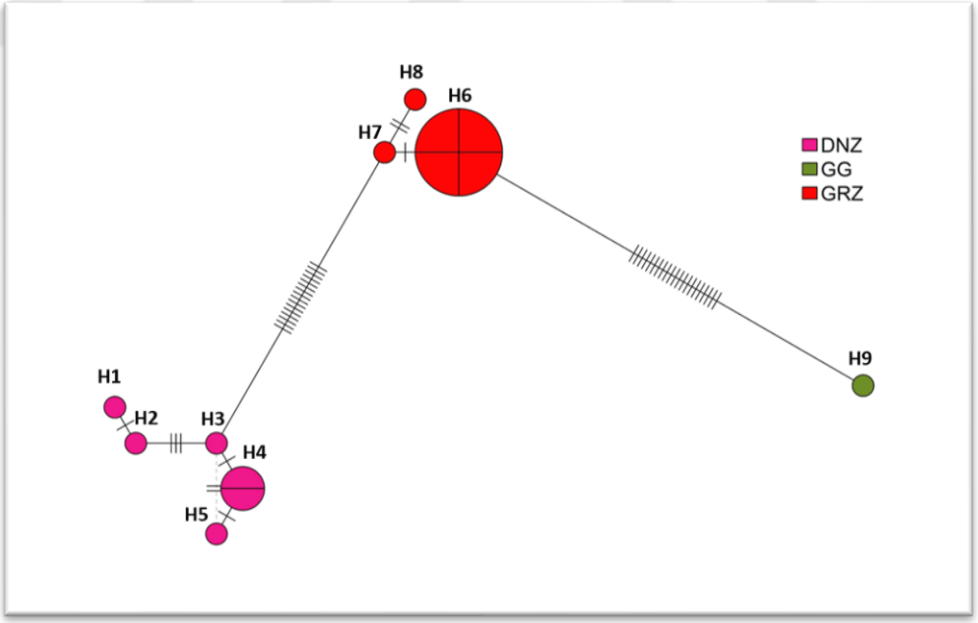
Şekil 4. 3. *ChTLR3* reseptörünün popülasyon içi popülasyonlar arası haplotip dağılımı. (*Gallus gallus* (GG), (Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ)).

Haplotip	Nükleotit pozisyonu	Birey sayısı	Frekans
H1	TAAAGATGTGCTGACCCCCGCTTGCGCTAGTGGGCTA	1	7.69
H2	....A.....	1	7.69
H3	....A.....GGA.....	1	7.69
H4	....A.....GGA.....T	2	15.38
H5	....A.....A.....GGA.....T	1	7.69
H6	...GAGA.....T..G.TGA.ACAAATGGAC....CT	4	30.77
H7	...GAGA.....T..G.TGA.ACAAATGGAC....C.	1	7.69
H8	...GAGA.....T..G.TGA.ACAAATG..C....C.	1	7.69
H9	CTCGAC.TCAT.TTG.TTGATA.A.ATGGACCTAT.T	1	7.69

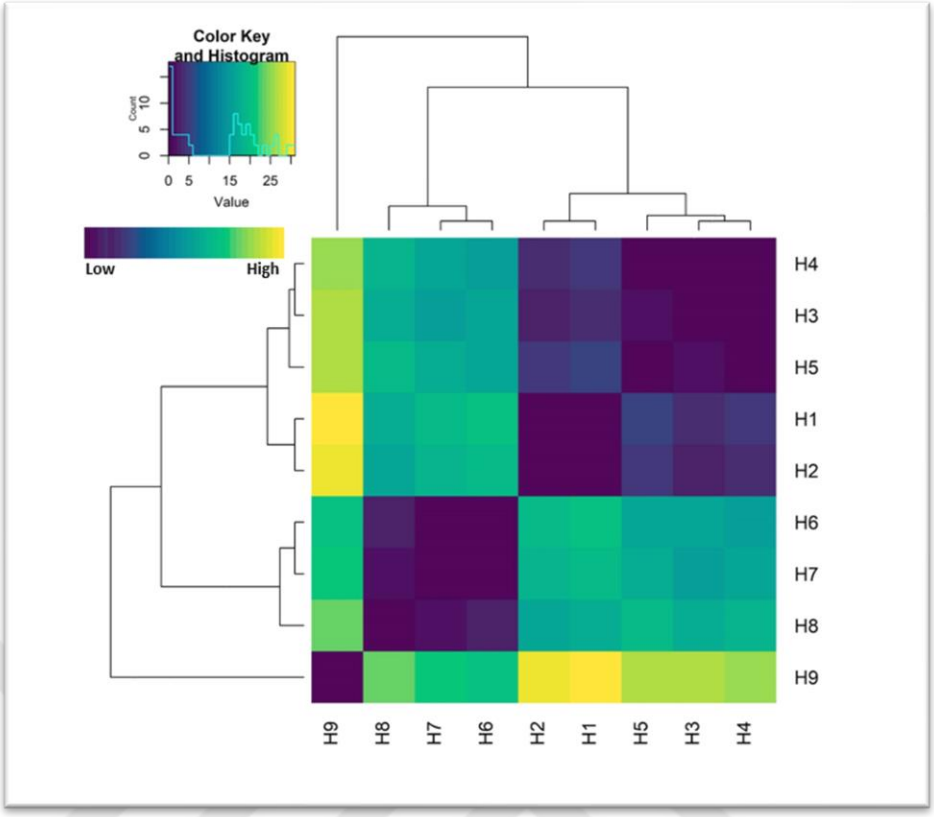
Şekil 4. 4. *ChTLR3* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarında popülasyon arası haplotip nükleotit pozisyonu



Şekil 4. 5. *ChTLR3* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarına ait dendogram (*Gallus gallus* (GG), (Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ)).



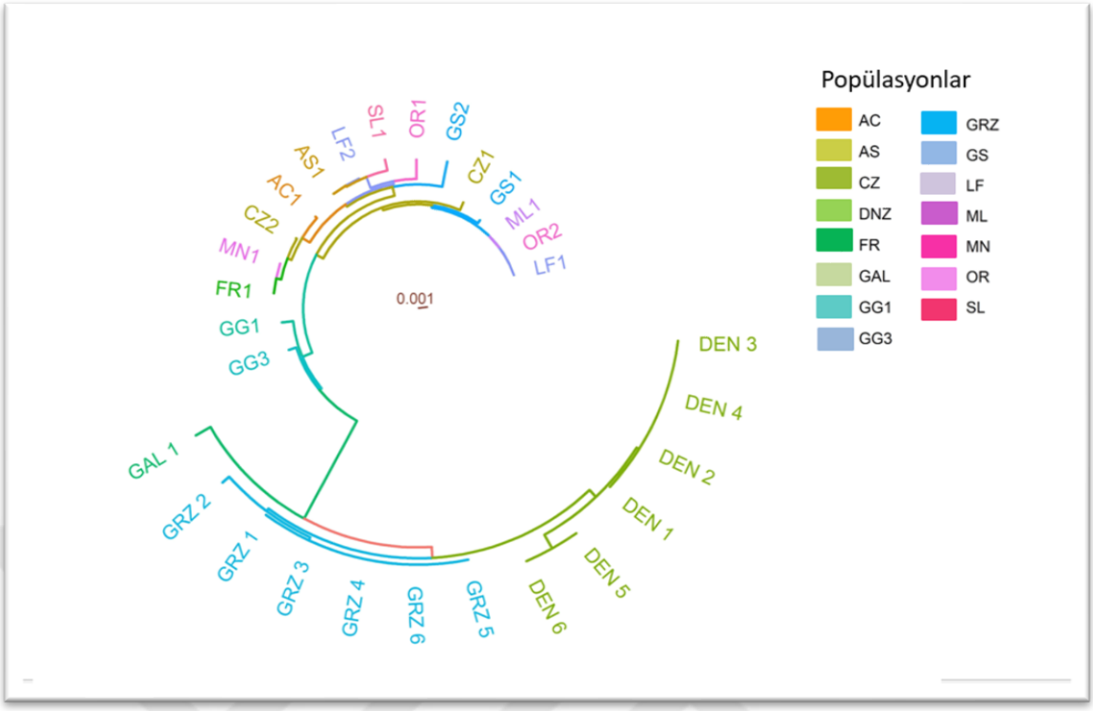
Şekil 4. 6. *ChTLR3* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarına ait haplotip ağı *Gallus gallus* (GG), (Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ).



Şekil 4. 7. *ChTLR3* reseptörü polimorfizminin Denizli ve Gerze tavuklarına popülasyonlarında oluşturulan ısı haritası

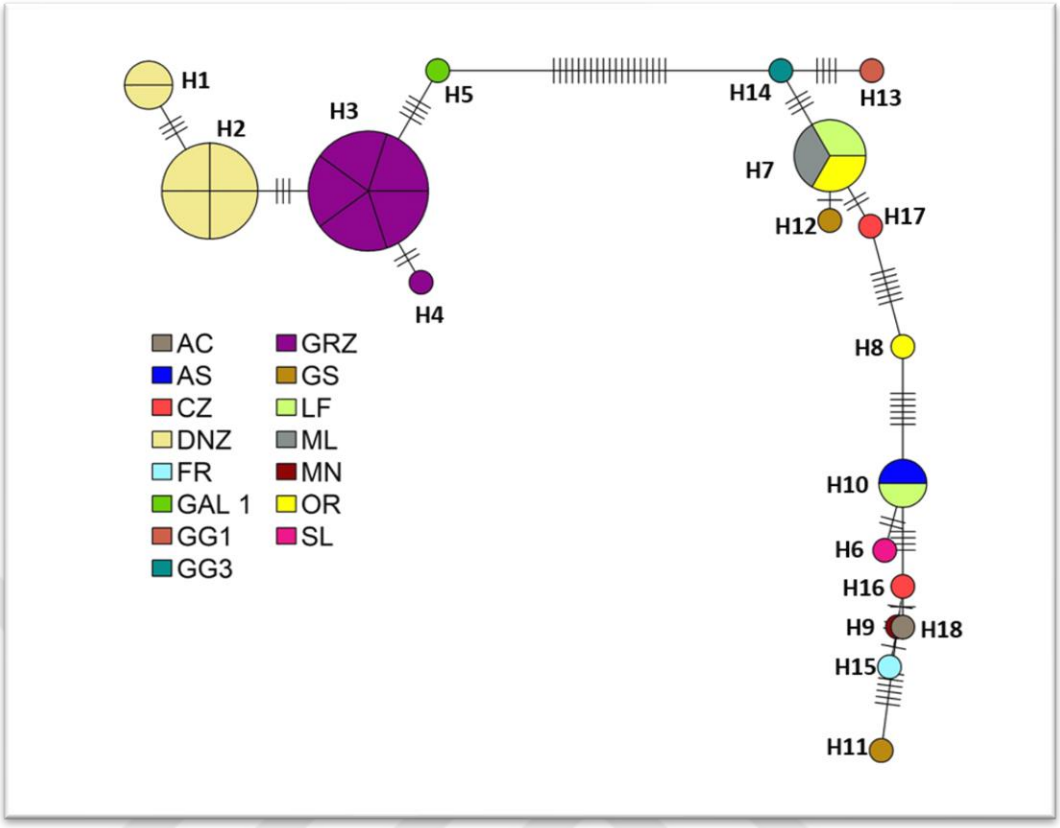
Haplotip	Nükleotit pozisyonu	Birey sayısı	Frekans
H1	TACCAACGGGAGAGCATCAAGTCGCCTGTGTACT-AGGTGA	2	6.9
H2	.....G.A....	4	13.79
H3	.....G.....A..TG.GA....	5	17.24
H4	.....G.....A..TG.....	1	3.45
H5	CT..CG....T.....A..TG.GA....	1	3.45
H6	...T...--..TTATCCTGGACGAGAAAC....GGGAACAT	1	3.45
H7	CT..CG.--.TTTATCCTGGACGAGACACA..TGCGAACAT	3	10.34
H8	C.....T--..TTATCCTGGACGAGAAACAGTTGCGAACAT	1	3.45
H9	.....--..TTATCCTGGACGAGAAACA..TGG..ACAT	1	3.45
H10	C.....--..TTATCCTGGACGAGAAAC....GGGAACAT	2	6.9
H11	.TT.C..--A.TTATCCTGGACGAGAAAC...TGGG.ACAT	1	3.45
H12	CT..CG.--.TTTATCCTGGACGAGAAACA..TGCGAACAT	1	3.45
H13	CT.....--..TTATCCTGGACGAGAAACA..TGCGAA...	1	3.45
H14	CT..CG.--.TTTATCCTGGACGAGACACA..TGCGAA...	1	3.45
H15	.....--..TTATCCTGGACGAGAAACA..TGC..ACAT	1	3.45
H16	C.....--..TTATCCTGGACGAGAAACA..TGG..ACAT	1	3.45
H17	CT..CG.--..TTATCCTGGACGAGACACAG.TGCGAACAT	1	3.45
H18	CT.....--..TTATCCTGGACGAGAAACA..TGG..ACAT	1	3.45

Şekil 4. 8. *ChTLR3* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarının diğer popülasyonların haplotip nükleotit pozisyonu



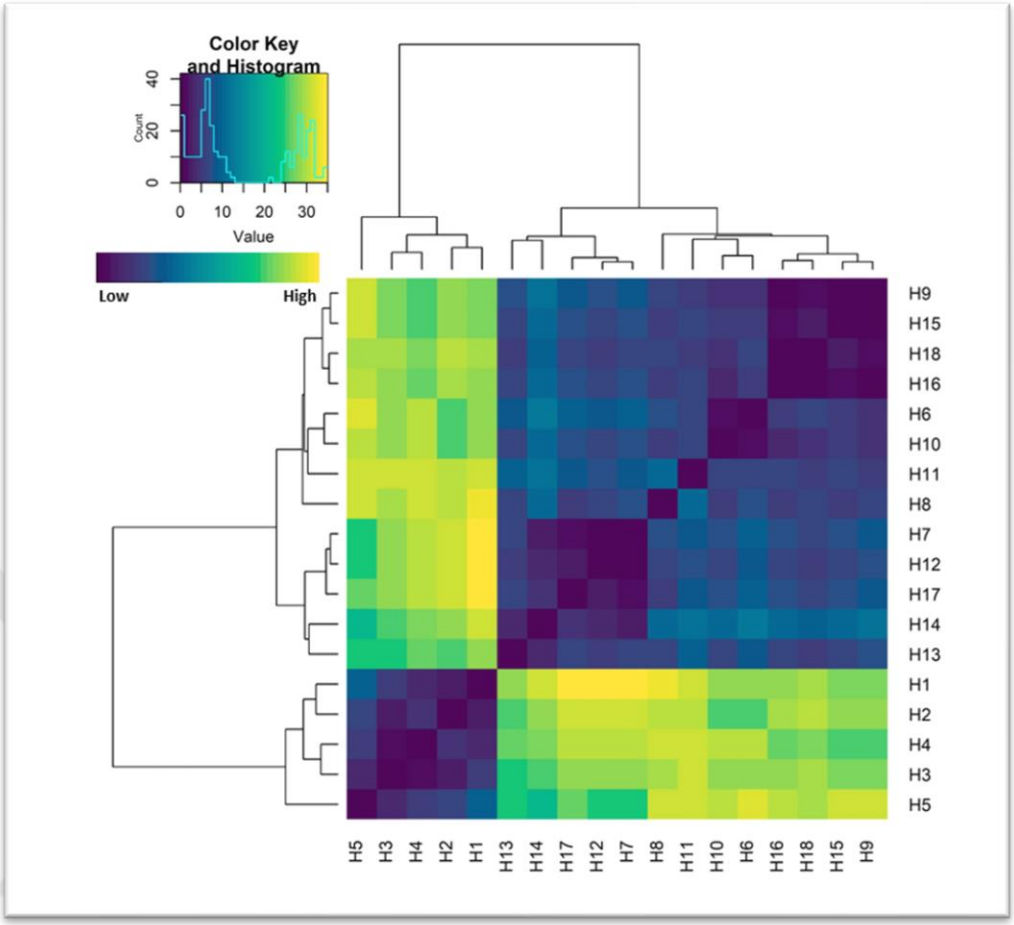
Şekil 4. 9. *ChTLR3* reseptörünün Denizli ve Gerze tavukları ve diğer ırklara ait dendogram

Not: (*Gallus Gallus* (GG1), *Gallus gallus* (GG2), *Gallus gallus* (GG3), Silkie (SL1), Czech (CZ1)), Game shamo (GS1), Game shamo (GS2), Frizzle (FR1), Araucana (AC1), Czech (CZ2)), Minorka (MN1), Orloff (OR1), Orloff (OR2), Malay (ML1), La fleche (LF1), La-fleche (LF2), Araucana (AC2), Aseel (AS1)), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ).

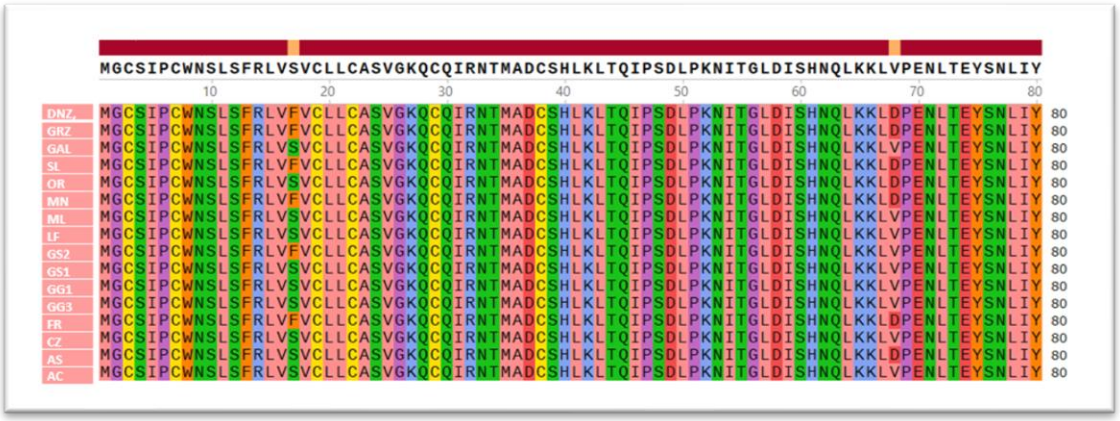


Şekil 4. 10. *ChTLR3* reseptörünün Denizli ve Gerze tavukları ve diğer ırklara ait haplotip ağı

Not: *Gallus Gallus* (GG1), *Gallus gallus* (GG2), *Gallus gallus* (GG3), Silkie (SL1), Czech (CZ1)), Game shamo (GS1), Game shamo (GS2), Frizzle (FR1), Araucana (AC1), Czech (CZ2)), Minorka (MN1), Orloff (OR1), Orloff (OR2), Malay (ML1), La-fleche (LF1), La-fleche (LF2), Araucana (AC2), Aseel (AS1), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ).



Şekil 4. 11. *ChTLR3* reseptörü polimorfizminin Denizli ve Gerze tavukları ve diğer popülasyonlara ait ısı haritası



Şekil 4. 12. *ChTLR3* reseptörünün protein sekans dizisinin Denizli ve Gerze tavuklarının diğer popülasyonlar ile hizalanması ile elde edilen görüntü

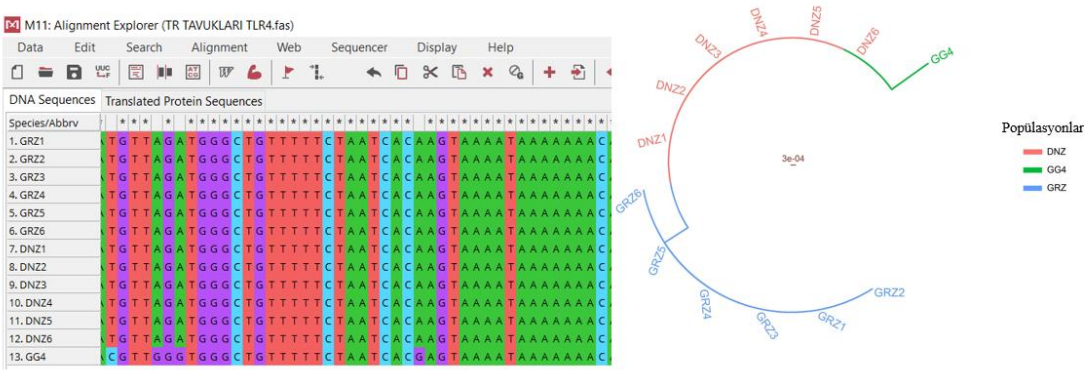
Not: *Gallus gallus* (GG1), *Gallus gallus* (GG2), *Gallus gallus* (GG3), Silkie (SL1), Czech (CZ1)), Game shamo (GS1), Game shamo (GS2), Frizzle (FR1), Araucana (AC1), Czech (CZ2)), Minorka (MN1), Orloff (OR1), Orloff (OR2), Malay (ML1), La-

fleche (LF1), La-fleche (LF2), Araucana (AC2), Aseel (AS1)), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ).

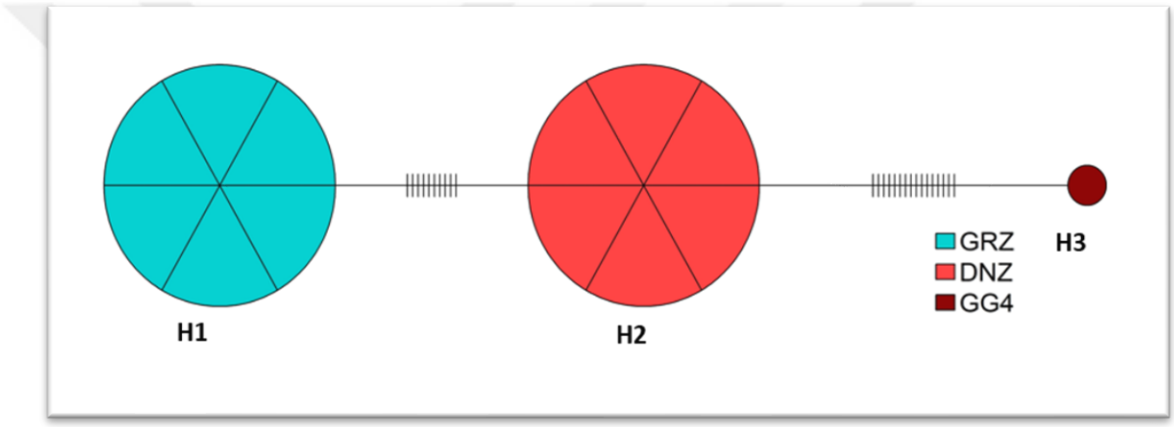
Denizli ve Gerze tavuk ırklarının *ChTLR4*'e ait NGS sekans dizisi, referans genom olarak *Gallus gallus* (NC_052548) kullanılarak elde edilmiştir. *ChTLR4* gen bölgesini kapsayan 4431 baz çifti uzunluğundaki dizi, MEGA11 programında hizalanmış (Şekil 4.14) ve popülasyon içi ve popülasyonlar arası genetik ağaçlar oluşturulmuştur (Şekil 4.14-4.18). Daha sonra DnaSp5.10 programı ile yapılan analiz sonucunda Denizli ve Gerze tavuklarına ait 3 adet haplotip saptanmıştır (Şekil 4.20). Diğer ırklarla kıyaslandığında 28 adet haplotip varyasyonu (1-1190 baz çifti aralığında) tespit edilmiştir. Haplotiplerin nükleotid pozisyonları (Şekil 4.12 ve 4.16), veri setindeki frekansları ve yüzdeleri Şekil 4.21'de verilmiştir. Tüm nükleotid pozisyonlarında iki nükleotid varyasyonu gözlemlenmiştir. 13 örnekten oluşan veri setinde, popülasyon içi haplotip çeşitliliği ve popülasyonlar arası haplotip çeşitliliği (Hd) sırasıyla 0,6154 ve 0,9488 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.21). Denizli tavuk popülasyonunu oluşturan bireylerin H1 haplotipinde yer alırken, Gerze ırklarına ait bireyler H2 haplotipinde yer aldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.15-4.19). Diğer ırklarla yapılan karşılaştırmalar sonucunda haplotipler (Şekil 4.18), genetik ağaç (Şekil 4.17-4.20) ve ısı haritası (Şekil 4.16-4.20 elde edilmiştir. Yerli tavuk ırklarına ait sekans dizileri, NCBI veri tabanında bulunan diğer tavuk ırklarıyla kıyaslanmış ve elde edilen dendogramda her iki ırkın kendi içinde kümelenirken, diğer ırklarla kıyaslandığında genetik olarak hastalıklara dirençli olduğu bildirilen AR (Arian), LY (Lignan Yellow) ve HY (Hy-line variety brown) tavuk ırklarına yakın kümelerde yer aldıkları gözlemlenmiştir (Şekil 4.14, Şekil 4.18). *ChTLR4*'e ait 636 nükleotit dizisinin analiz edilmesi sonucu (9 polimorfik bölge) polimorfik özellik gösteren amino asit pozisyonları ve diğer ırklarla benzerlikler EK-13'te verilmiştir (Şekil 4.22). *ChTLR4* haplotip çeşitliliği Denizli ve Gerze tavuklarının diğer ırklar ile analizi incelendiğinde (0,9888) 1'e yakın değer aldığı ve analiz edilen 25 ırkın genel olarak ayrı haplo gruplarda yer aldığı saptanmıştır.

Haplotip	Nükleotit pozisyonu	Birey sayısı	Frekans
H1	AGACTCGCTCGGTAAATGATAGGGGA	6	46.15
H2	.....AT.....GAGTAACG	6	46.15
H3	GAGTATCAATAACGGGCCGAGTAACG	1	7.69

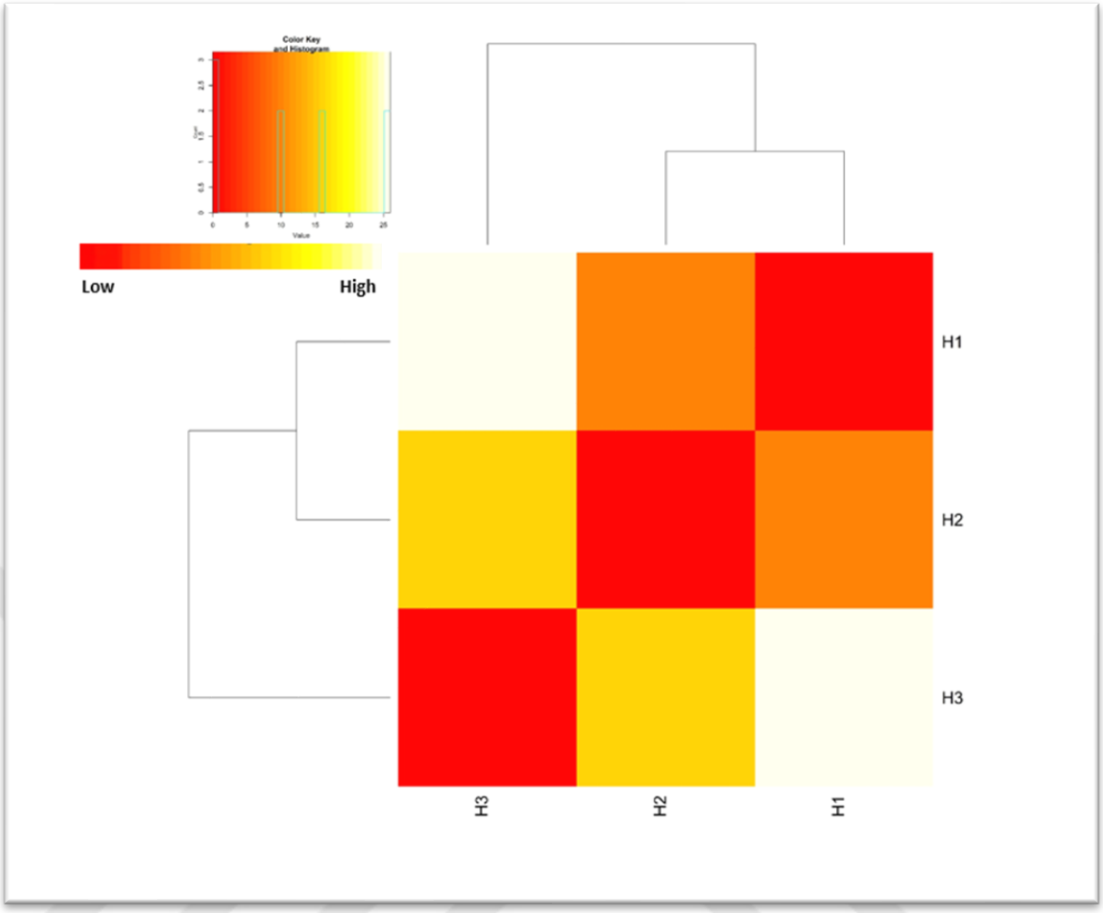
Şekil 4. 13. *ChTLR4* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarında popülasyon içi haplotip nükleotit pozisyonu



Şekil 4. 14. *ChTLR4* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarına ait sekans dizisinin referans gen ile Mega11'de hizalanması ve bu popülasyonlara ait dendogram (*Gallus gallus* (GG), (Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ))



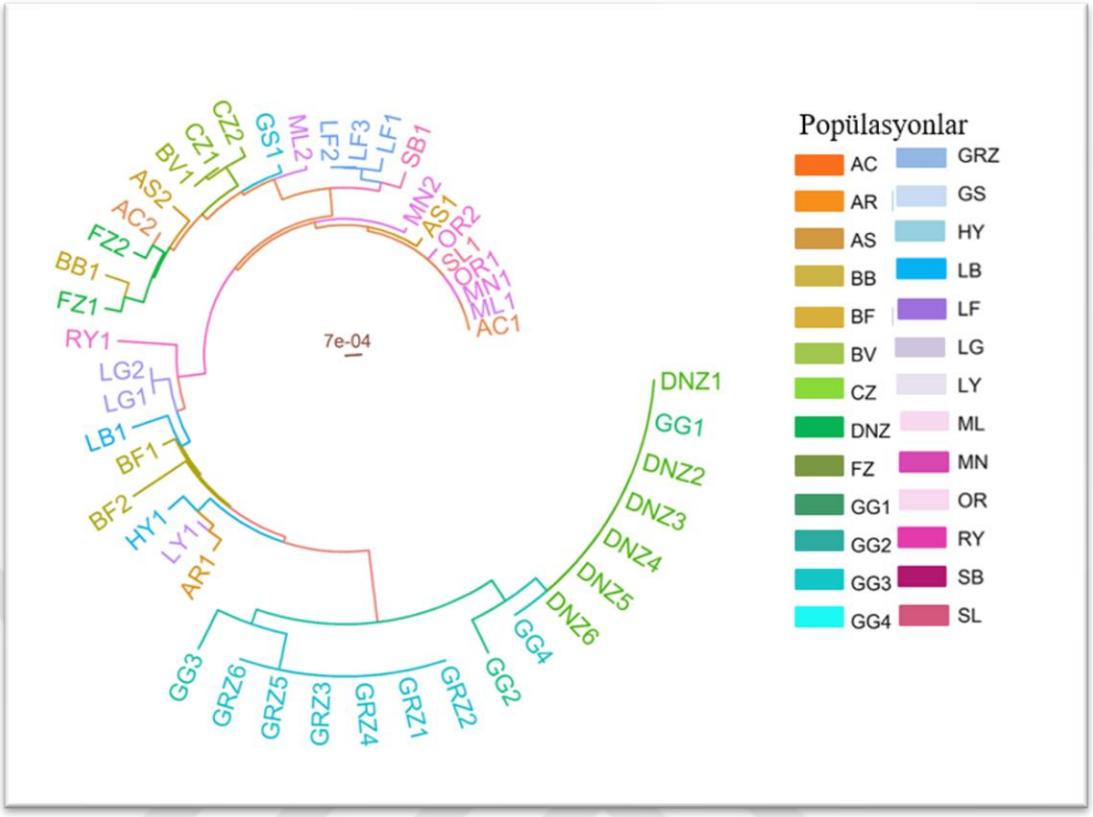
Şekil 4. 15. *ChTLR4* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarına ait haplotip ağı (Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ))



Şekil 4. 16. *ChTLR4* reseptörü polimorfizminin Denizli ve Gerze tavuklarına ait ısı haritası

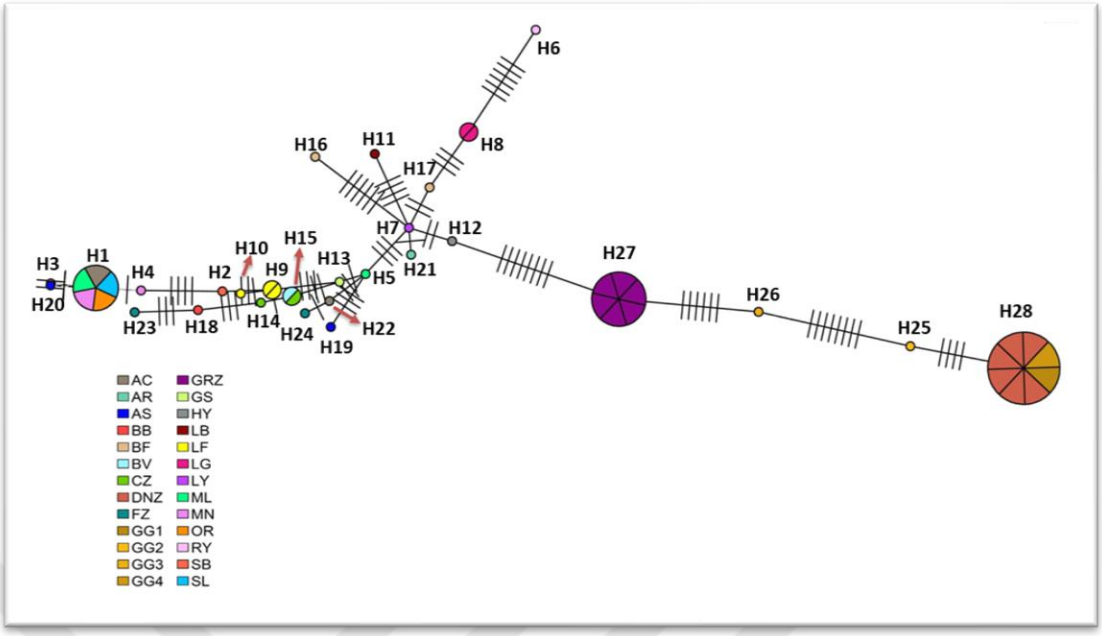
Haplotip	Nükleotit pozisyonu	Birey sayısı	Frekans
H1	GTCCCGAAGTGGAGCTATGACTAGTCCCCAAAGCG	5	10.64
H2	..T.....A.T...G.....A	1	2.13
H3	.A.....	1	2.13
H4	.....A.....	1	2.13
H5	.....A.T..GG..G.....	1	2.13
H6	.....CAG...GCCC...	1	2.13
H7	.....A.T..GG..G.....GCC....	1	2.13
H8	.....A.....GGCC....	2	4.26
H9	.....A.T...G.....G.....A	2	4.26
H10	.....A.TA..G.....G.....A	1	2.13
H11	.....A.TA..G....C.....GCC....	1	2.13
H12	.....A.T..GG..G.....GGCC...A	1	2.13
H13	.....A.T..GG..G.....G.....	1	2.13
H14	.....A.T..GG..GT.....G....A.A	1	2.13
H15	.....A.T..GG..GT.....G....A..	2	4.26
H16	.....A...T.GGAGT.....GCC....	1	2.13
H17	.....A.T.....G.....GCC....	1	2.13
H18	.....A.T..GG..GT....TT.....A.A	1	2.13
H19	.....A.T.TGG..G.....A.A	1	2.13
H20	.....G.....	1	2.13
H21	.....A.T..GG..G.....GCC..A.	1	2.13
H22	.....A.T.TGG..G.....T.....	1	2.13
H23	.....AAT..GG..G.....TT.....A	1	2.13
H24	.....AAT.TGG..G.....T.....	1	2.13
H25	A..AGTGTTCA.....GGCC.A..	1	2.13
H26	...AGTGTTCA.T.TGG..G.....T..GCC.A..	1	2.13
H27	...AGTGTTC.....GCC....	8	17.02
H28	...AGTGTTCA.TA.GG..G.....GGCC...A	6	12.77

Şekil 4. 17. *ChTLR4* reseptörünün Denizli, Gerze ve diğer tavuklar ile popülasyon içi popülasyonlar arası haplotip nükleotit pozisyonu



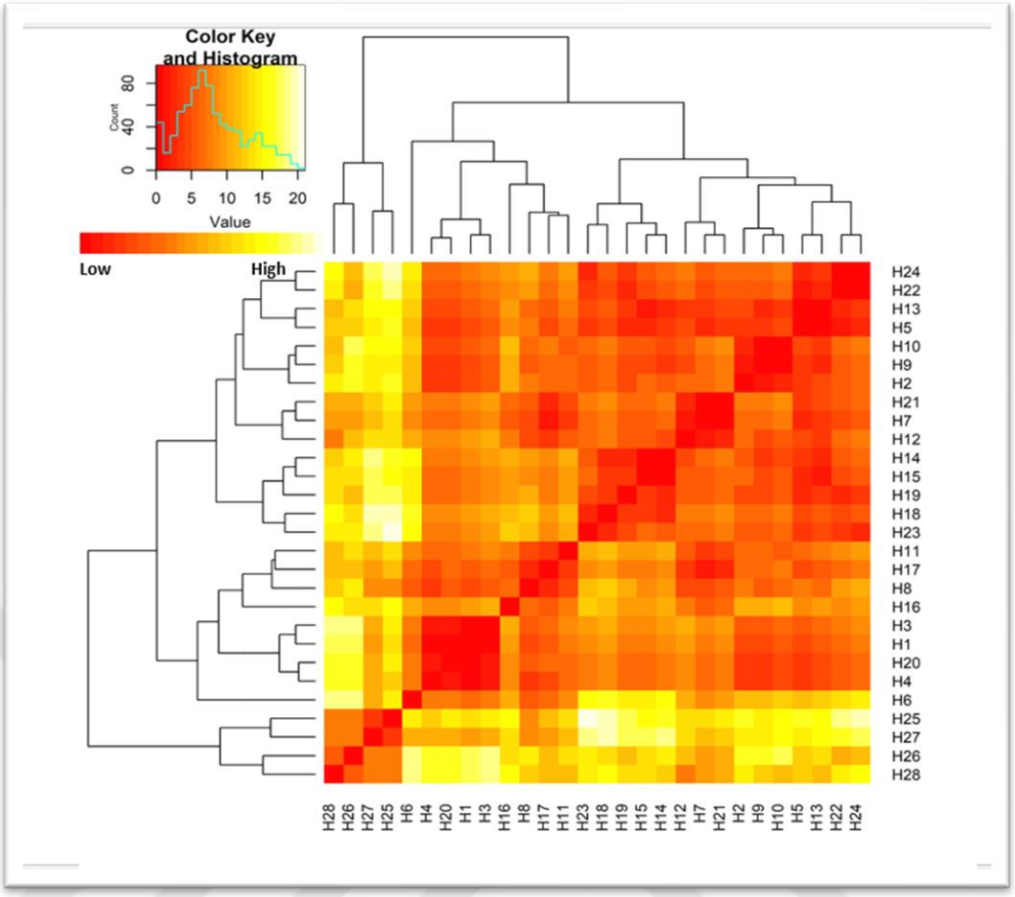
Şekil 4. 18. *ChTLR4* reseptörünün Denizli, Gerze ve diğer tavuk popülasyonlarına ait dendogram

Not: *Gallus gallus* (GG1), *Gallus gallus* (GG2), *Gallus Gallus* (GG3), *Gallus gallus* (GG4), Barne velder bantam (BV1), Brahma bantam (BB1), Czech (CZ1), Czech (CZ2), Aseel (AS1), Araucana (AC1), Malay (ML1), Minorka (MN1), Orloff (OR1), Silkie (SL1), Minorca (MN2), Araucana (AC2), Game shamo (GS1), Malay (ML2), La-fleche (LF1), Aseel (AS2), La-fleche (LF2), La-fleche (LF3), Sebright (SB1), Frizzle (FZ1), Frizzle (FZ2), Orloff (OR2), Royal (RY1), Luiwu black (LB1), Hy-linevariety brown (HY1), Beijing fatty (BF1), Beijing fatty (BF2), Leghorn (LG1), Leghorn (LG2), Lingnan yellow (LY1) ve Arian (AR1), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ).

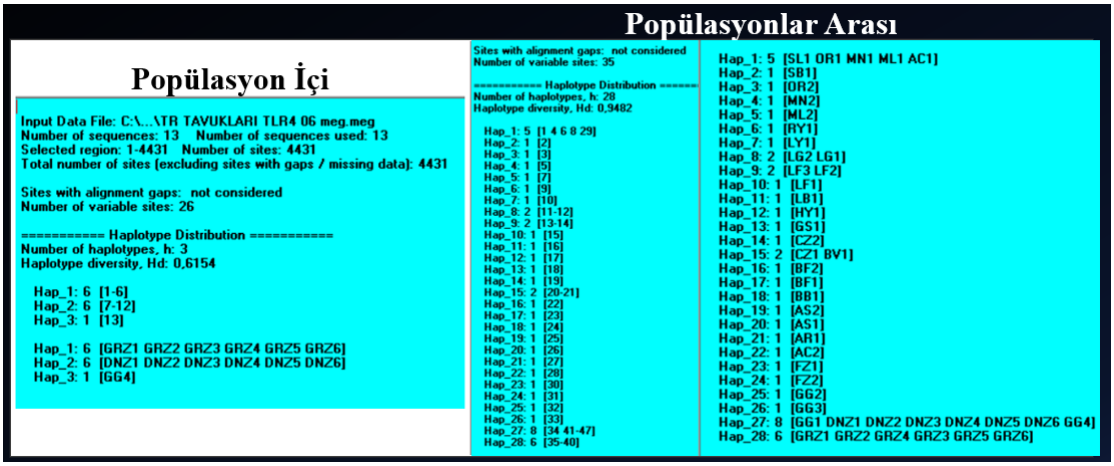


Şekil 4. 19. *ChTLR4* reseptörünün Denizli ve Gerze tavukları ve diğer ırklar ile kıyaslanmasından oluşturulan haplotip ağı

Not: *Gallus gallus* (GG1), *Gallus gallus* (GG2), *Gallus Gallus* (GG3), *Gallus gallus* (GG4), Barne velder bantam (BV1), Brahma bantam (BB1), Czech (CZ1), Czech (CZ2), Aseel (AS1), Araucana (AC1), Malay (ML1), Minorka (MN1), Orloff (OR1), Silkie (SL1), Minorca (MN2), Araucana (AC2), Game shamo (GS1), Malay (ML2), La-fleche (LF1), Aseel (AS2), La-fleche (LF2), La-fleche (LF3), Sebright (SB1), Frizzle (FZ1), Frizzle (FZ2), Orloff (OR2), Royal (RY1), Luiwu black (LB1), Hy-linevariety brown (HY1), Beijing fatty (BF1), Beijing fatty (BF2), Leghorn (LG1), Leghorn (LG2), Lingnan yellow (LY1) ve Arian (AR1), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ).



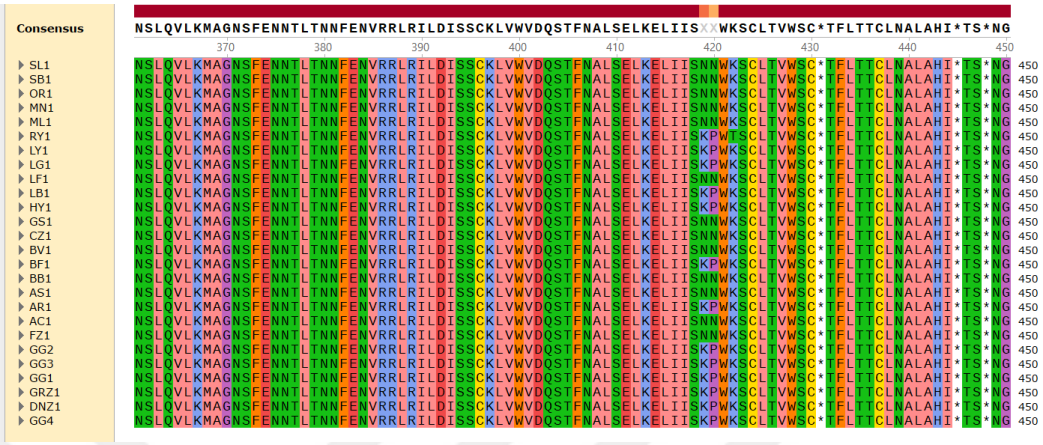
Şekil 4. 19. *ChTLR4* reseptörü polimorfizminin Denizli, Gerze ve diğer tavuk ırklarına ait ısı haritası



Şekil 4. 20. *ChTLR4* reseptörünün popülasyon içi ve popülasyonlar arası haplotip dağılımı

Not: *Gallus gallus* (GG1), *Gallus gallus* (GG2), *Gallus Gallus* (GG3), *Gallus gallus* (GG4), Barne velder bantam (BV1), Brahma bantam (BB1), Czech (CZ1), Czech (CZ2), Aseel (AS1), Araucana (AC1), Malay (ML1), Minorka (MN1), Orloff (OR1), Silkie (SL1), Minorca (MN2), Araucana (AC2), Game shamo (GS1), Malay (ML2), La-

fleche (LF1), Aseel (AS2), La-fleche (LF2), La-fleche (LF3), Sebright (SB1), Frizzle (FZ1), Frizzle (FZ2), Orloff (OR2), Royal (RY1), Luiwu black (LB1), Hy-linevariety brown (HY1), Beijing fatty (BF1), Beijing fatty (BF2), Leghorn (LG1) , Leghorn (LG2), Lingnan yellow (LY1) ve Arian (AR1), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ).



Şekil 4. 21. *ChTLR4* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarının protein sekans dizisinin amino asit dağılımından bir kesit

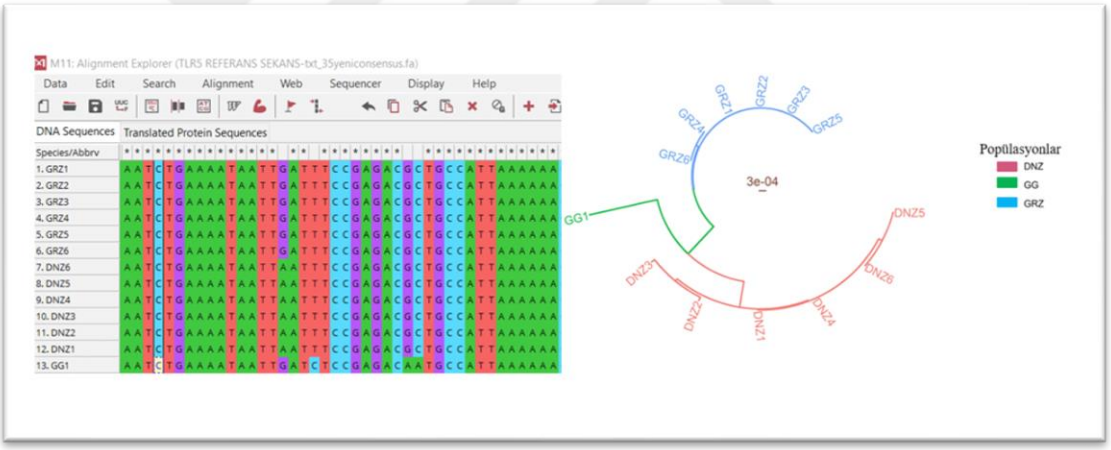
Not: *Gallus gallus* (GG1), *Gallus gallus* (GG2), *Gallus Gallus* (GG3), *Gallus gallus* (GG4), Barne velder bantam (BV1), Brahma bantam (BB1), Czech (CZ1), Czech (CZ2), Aseel (AS1), Araucana (AC1), Malay (ML1), Minorka (MN1), Orloff (OR1), Silkie (SL1), Minorca (MN2), Araucana (AC2), Game shamo (GS1), Malay (ML2), La-fleche (LF1), Aseel (AS2), La-fleche (LF2), La-fleche (LF3), Sebright (SB1), Frizzle (FZ1), Frizzle (FZ2), Orloff (OR2), Royal (RY1), Luiwu black (LB1), Hy-linevariety brown (HY1), Beijing fatty (BF1), Beijing fatty (BF2), Leghorn (LG1), Leghorn (LG2), Lingnan yellow (LY1) ve Arian (AR1), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ).

Denizli ve Gerze tavuklarının *ChTLR5* NGS sekans dizisi referans genom *Gallus gallus* (GenBank: NC_0525334) ile (*TLR5* gen bölgesini de kapsayan 5953 bç) MEGA11 programında hizalanmış (Şekil 4.24) ve popülasyon içi ve popülasyonlar arası ağaç elde edilmiştir (Şekil 4.24-4.29). Daha sonra DnaSp5.10 programında analizi sonucunda Denizli ve Gerze tavuklarına ait 7 haplotip saptanmıştır (Şekil 4.28). Diğer ırklar ile kıyaslandığında 19 adet haplotip varyasyonu (1-1990 baz çifti aralığında) tespit edilmiş olup, haplotip nükleotit pozisyonları (Şekil 4.25 ve 4.27), veri seti içerisindeki frekansı ve veri setindeki yüzdesi Şekil 4.28'de verilmiştir. Popülasyon içi ve popülasyonlar arası veri setinde haplotip çeşitliliği (hd) sırasıyla 0,8846 ve 0,8760 olarak belirlenmiştir. *ChTLR5* haplotip çeşitliliği Denizli ve Gerze tavuklarının diğer ırklar ile analizi incelendiğinde (0,8760) 1'e yakın değer aldığı ve analiz edilen 32 ırkın her birinin genel olarak ayrı haplogrup oluşturduğu saptanmıştır. Denizli tavuk popülasyonunu oluşturan bireyler H3-H6 haplotiplerinde yer alırken, Gerze ırklarına ait bireyleri H1- H2 haplotipinde yer aldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.25). Denizli ve Gerze tavukları ile diğer ırklara ait verilerin R Studio analizi sonucu elde edilen haplotip network Şekil 4. 30'de verilmiştir. Yerli tavuk ırklarımıza ait sekans dizileri NCBI veri bakasında verilen diğer tavuk ırkları ile kıyaslanmış ve elde edilen dendogramda her iki ırk kendi içerisinde küme oluştururken, diğer ırklar ile kıyaslandığında genetik olarak hastalıklara dirençli olduğu bildirilen yumurtacı HB1 (Hy-line Brown) tavuk ırkına yakın kümede yer aldıkları

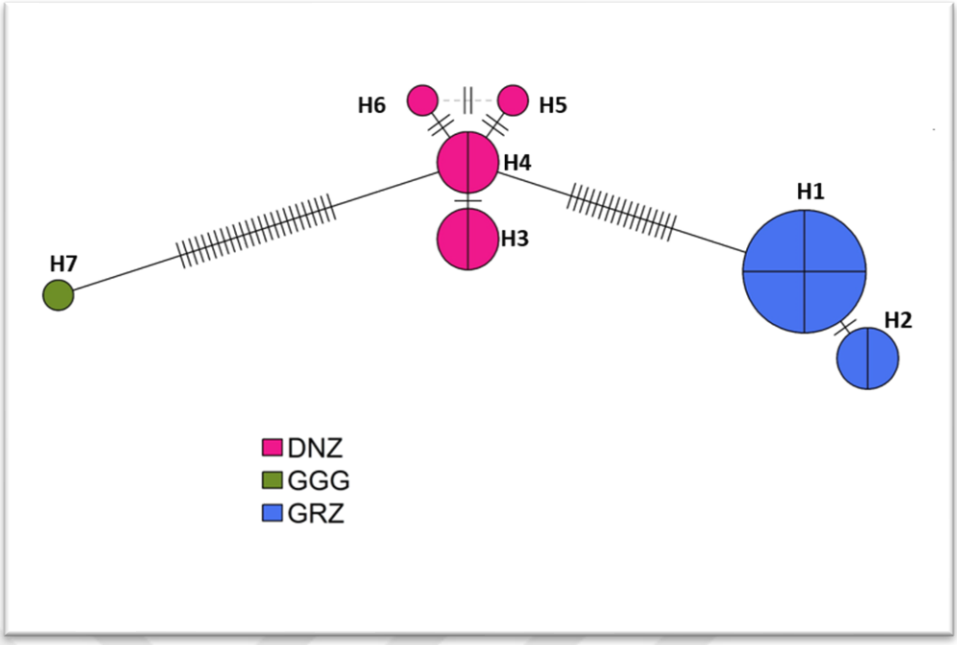
saptanmıştır (Şekil 4.29). Popülasyon içi ve popülasyonlar arası verilerinin ısı haritası oluşturulmuştur (Şekil 4.26-4.31) *ChTLR5*'e ait 663 nükleotit dizisinin analiz edilmesi sonucu (10 polimorfik bölge) polimorfik özellik gösteren amino asit pozisyonları (Şekil 4.32) ve diğer ırklar ile benzerlikleri EK-14'te verilmiştir.

Haplotip	Nükleotit pozisyonu	Birey sayısı	Frekans
H1	GCTCGGCCTATCGATGGAACCACTTGAGGCCCGTGCGCC	4	30.77
H2	.....A.....	2	15.38
H3	A.C.....C.C..CC.A.GA.CA.C..A..AGA...AT.	2	15.38
H4	..C.....C.C..CC.A.GA.CA.C..A..AGA...AT.	2	15.38
H5	..C.....C.C.ACC.A.GA.CA.C..AA.AGA...AT.	1	7.69
H6	..C.....C.C..CC.A.GA.CA.C..AA.AGA...ATA	1	7.69
H7	.TCAAAAACGCA...AAG..TCAA.ATA.GA..CAAAT.	1	7.69

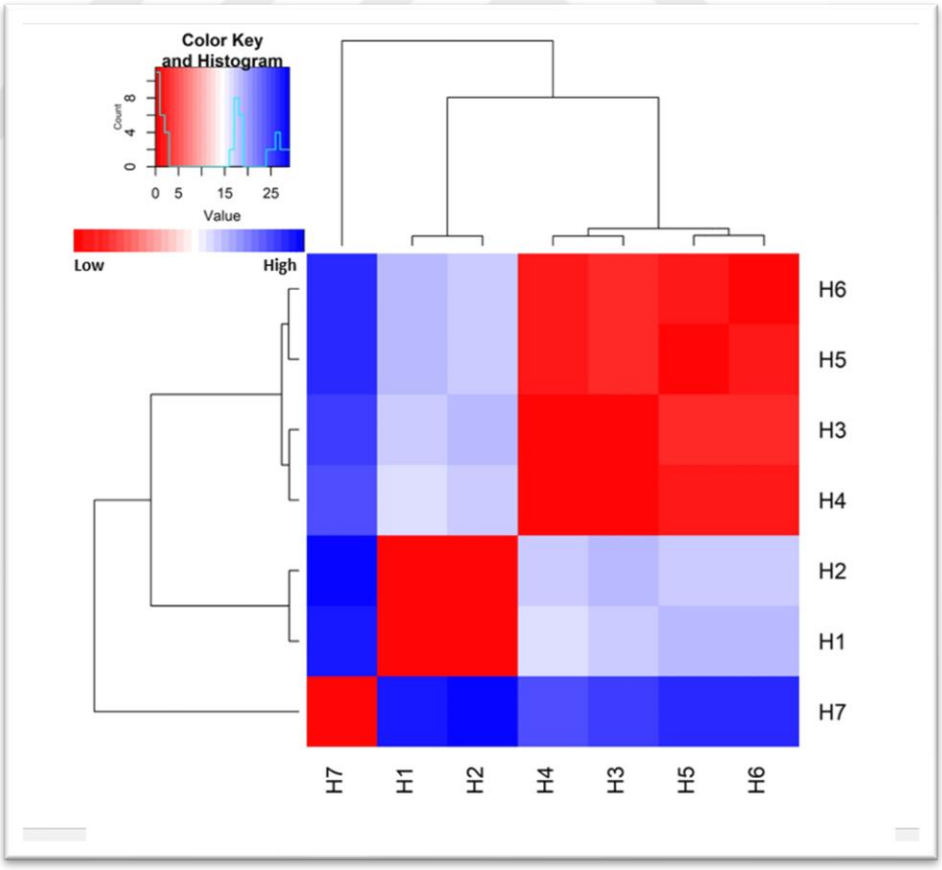
Şekil 4. 22. *ChTLR5* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarında popülasyon arası haplotip nükleotit pozisyonu



Şekil 4. 23. *ChTLR5* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarına ait sekans dizisinin referans gen ile Mega11'de hizalanması ve bu popülasyonlara ait dendogram (*Gallus gallus* (GG), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ))



Şekil 4. 24. *ChTLR5* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarına ait haplotip ağı (*Gallus gallus* (GG), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ))

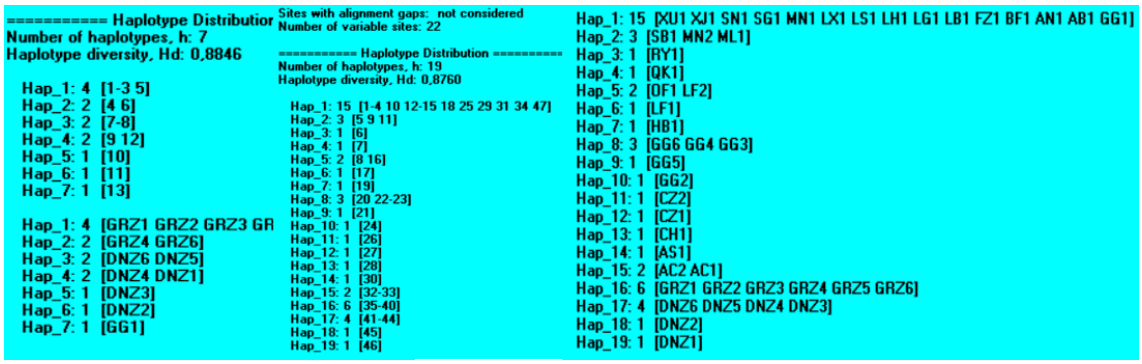


Şekil 4. 25. *ChTLR5* reseptörü polimorfizminin Denizli ve Gerze tavuklarına ait ısı haritası

Haplotip	Nükleotit pozisyonu	Birey sayısı	Frekans
H1	TGGAGTGCAAAACTTTATGCGC	15	31.91
H2	.C.....C.....	3	6.38
H3	..A.....C.....	1	2.13
H4	....A.....G.C.....	1	2.13
H5	.....G.....A	2	4.26
H6	.....G..	1	2.13
H7	G....C....G.....C....	1	2.13
H8	...G.....	3	6.38
H9	.....T.....	1	2.13
H10	.C.....A..C.....	1	2.13
H11	.C.....	1	2.13
H12	.....C.....	1	2.13
H13	.....C.....	1	2.13
H14	.....A...	1	2.13
H15	.....A.	2	4.26
H16	.C.....TGC.G...C.....	6	12.77
H17	.C....ATGC.....	4	8.51
H18	.C....ATGC.....A	1	2.13
H19	.....ATGC.....	1	2.13

Şekil 4. 26. *ChTLR5* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarında popülasyon içi popülasyonlar arası haplotip nükleotit pozisyonu

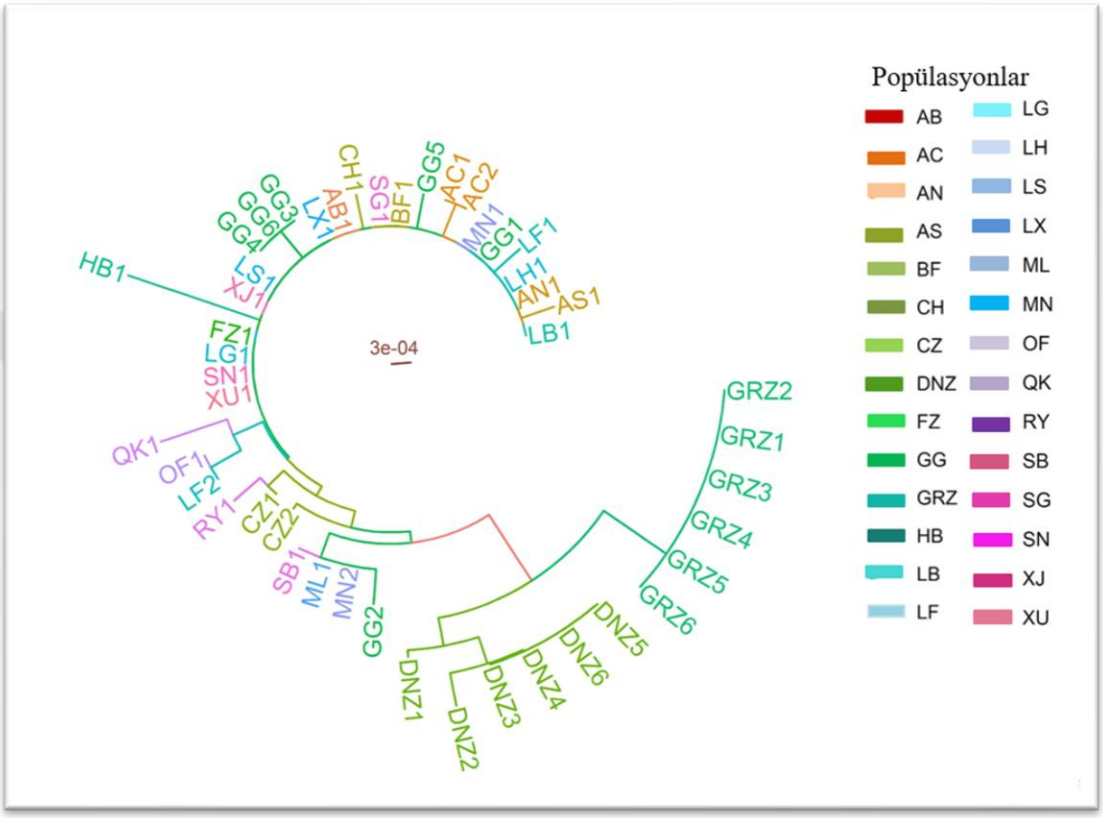
Not: *Gallus gallus* (GG1), Aseel (AS1), Leghorn (LG1), Beijing fatty (BF1), Hyline variety brown (HB1), Laivu black (LB1), Royal (RY1), *Gallus gallus* (GG2), Lafleche (LF1), La-fleche (LF2), Minorka (MN1), Orloff (OR1), Czech (CZ1), Minorca (MN2), Czech (CZ2), Malay (ML1), Sebright (SB1), Frizzle (FZ1), Araucana (AC1), Araucana (AC2), Longxima (LX1), Anka (AN1), Luhua (LH1), Xianju (XJ2), A. A broiler (AB1), Qingke (QK1), Sanhuang (SN1), Xueshancao (XU1), Chongrenma (CH1), Shigiza (SG1), Lonshan (LS1) , *Gallus gallus* (GG3), *Gallus gallus* (GG4), *Gallus gallus* (GG5), *Gallus gallus* (GG6), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ).



Şekil 4. 27. *ChTLR5* reseptörünün popülasyon içi ve popülasyonlar arası haplotip dağılımı

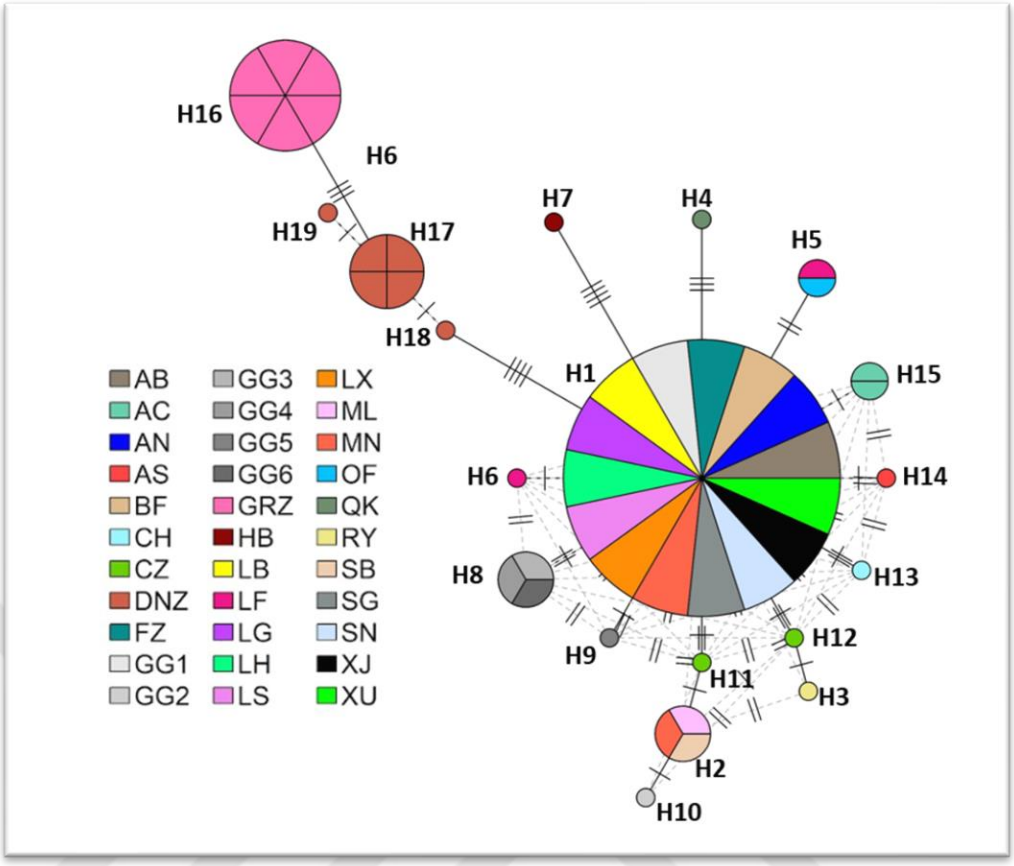
Not: *Gallus gallus* (GG1),Aseel (AS1), Leghorn (LG1), Beijing fatty (BF1), Hyline variety brown (HB1), Laivu black (LB1), Royal (RY1), *Gallus gallus* (GG2), La-

fleche (LF1), La-fleche (LF2), Minorka (MN1), Orloff (OR1), Czech (CZ1), Minorca (MN2), Czech (CZ2), Malay (ML1), Sebright (SB1), Frizzle (FZ1), Araucana (AC1), Araucana (AC2), Longxima (LX1), Anka (AN1), Luhua (LH1), Xianju (XJ2), A. A broiler (AB1), Qingke (QK1), Sanhuang (SN1), Xueshancao (XU1), Chongrenma (CH1), Shigiza (SG1), Lonshan (LS1) , *Gallus gallus* (GG3), *Gallus gallus* (GG4), *Gallus gallus* (GG5), *Gallus gallus* (GG6), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ).



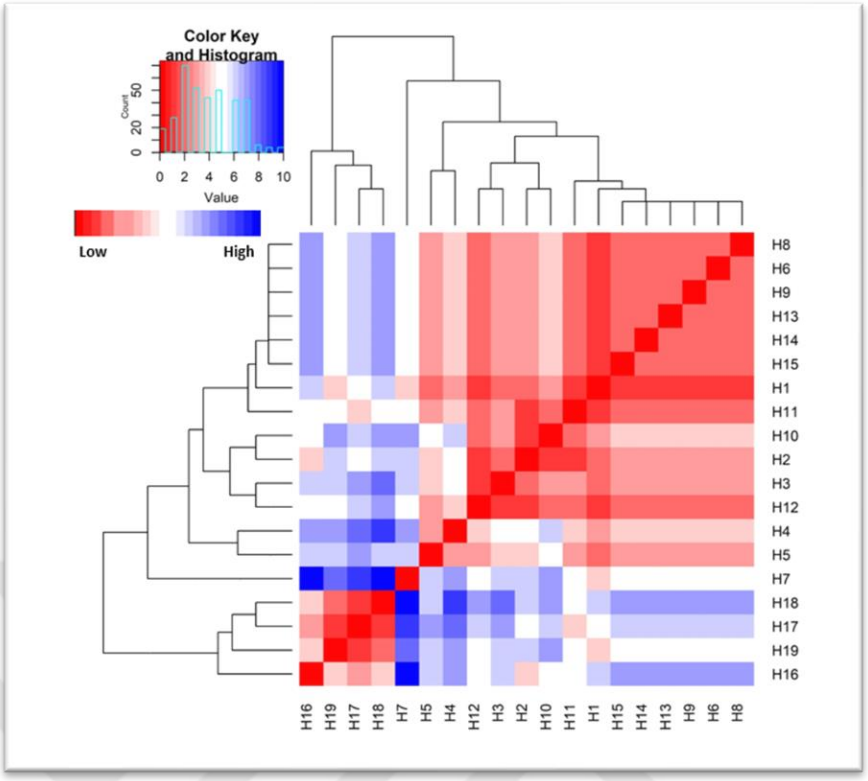
Şekil 4. 28. *ChTLR5* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarında ve diğer popülasyonlara ait filogenetik dendogram

Not: *Gallus gallus* (GG1),Aseel (AS1), Leghorn (LG1), Beijing fatty (BF1), Hy-line variety brown (HB1), Laivu black (LB1), Royal (RY1), *Gallus gallus* (GG2), La-fleche (LF1), La-fleche (LF2), Minorka (MN1), Orloff (OR1), Czech (CZ1), Minorca (MN2), Czech (CZ2), Malay (ML1), Sebright (SB1), Frizzle (FZ1), Araucana (AC1), Araucana (AC2), Longxima (LX1), Anka (AN1), Luhua (LH1), Xianju (XJ2), A. A broiler (AB1), Qingke (QK1), Sanhuang (SN1), Xueshancao (XU1), Chongrenma (CH1), Shigiza (SG1), Lonshan (LS1) , *Gallus gallus* (GG3), *Gallus gallus* (GG4), *Gallus gallus* (GG5), *Gallus gallus* (GG6), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ).

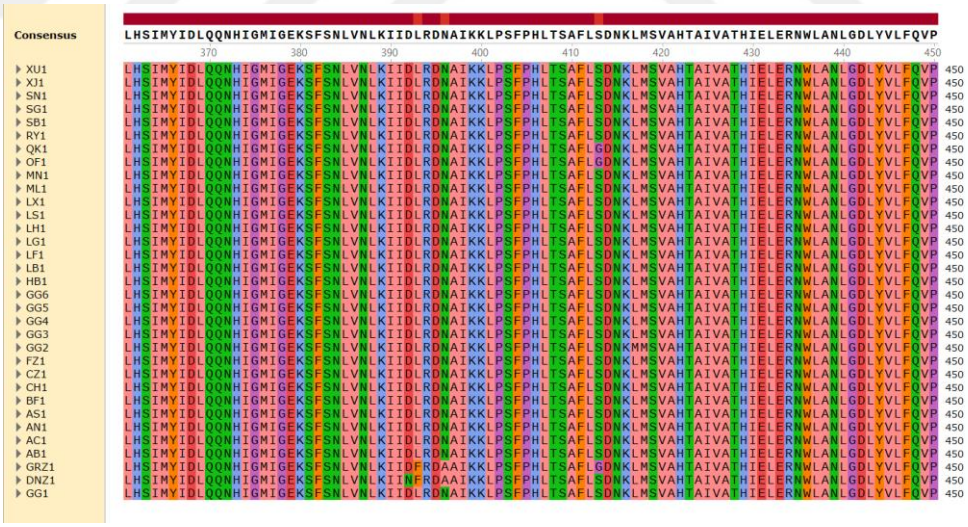


Şekil 4. 29. *ChTLR5* reseptörünün Denizli ve Gerze tavukları ve diğer ırklar ile kıyaslanmasından oluşturulan haplotip ağı

Not: *Gallus gallus* (GG1),Aseel (AS1), Leghorn (LG1), Beijing fatty (BF1), Hy-line variety brown (HB1), Laivu black (LB1), Royal (RY1), *Gallus gallus* (GG2), La-fleche (LF1), La-fleche (LF2), Minorka (MN1), Orloff (OR1), Czech (CZ1), Minorca (MN2), Czech (CZ2), Malay (ML1), Sebright (SB1), Frizzle (FZ1), Araucana (AC1), Araucana (AC2), Longxima (LX1), Anka (AN1), Luhua (LH1), Xianju (XJ2), A. A broiler (AB1), Qingke (QK1), Sanhuang (SN1), Xueshancao (XU1), Chongrenma (CH1), Shigiza (SG1), Lonshan (LS1) , *Gallus gallus* (GG3), *Gallus gallus* (GG4), *Gallus gallus* (GG5), *Gallus gallus* (GG6), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ).



Şekil 4. 30. *ChTLR5* reseptörü polimorfizminin Denizli ve Gerze tavukları diğer popülasyonlarına ait ısı haritası



Şekil 4. 31. *ChTLR5* reseptörünün Denizli ve Gerze tavukları diğer popülasyonlara ait protein sekans dizisinin amino asit polimorfizmi

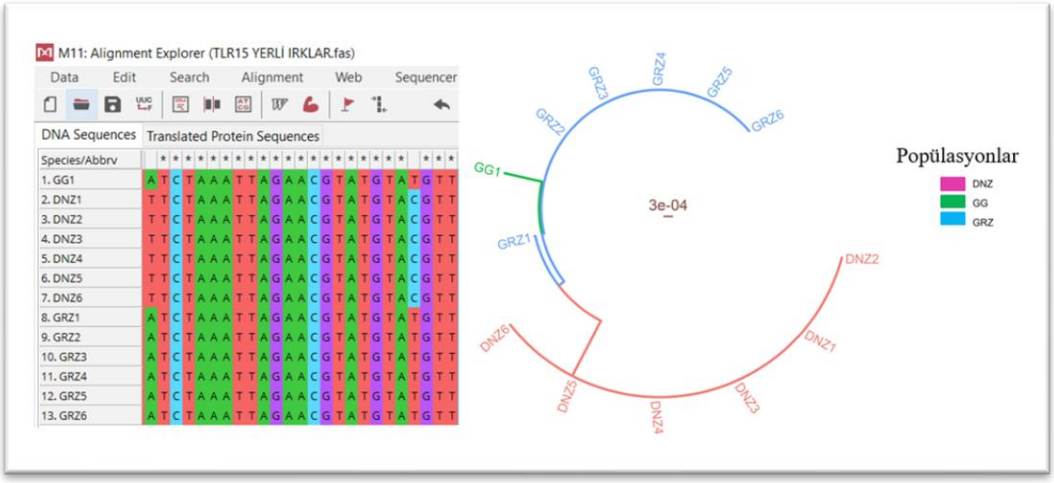
Not: *Gallus gallus* (GG1), Aseel (AS1), Leghorn (LG1), Beijing fatty (BF1), Hy-line variety brown (HB1), Laivu black (LB1), Royal (RY1), *Gallus gallus* (GG2), La-fleche (LF1), La-fleche (LF2), Minorka (MN1), Orloff (OR1), Czech (CZ1), Minorca (MN2), Czech (CZ2), Malay (ML1), Sebright (SB1), Frizzle (FZ1), Araucana (AC1), Araucana (AC2), Longxima (LX1), Anka (AN1), Luhua (LH1), Xianju (XJ2), A. A

broiler (AB1), Qingke (QK1), Sanhuang (SN1), Xueshancao (XU1), Chongrenma (CH1), Shigiza (SG1), Lonshan (LS1) , *Gallus gallus* (GG3), *Gallus gallus* (GG4), *Gallus gallus* (GG5), *Gallus gallus* (GG6), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ).

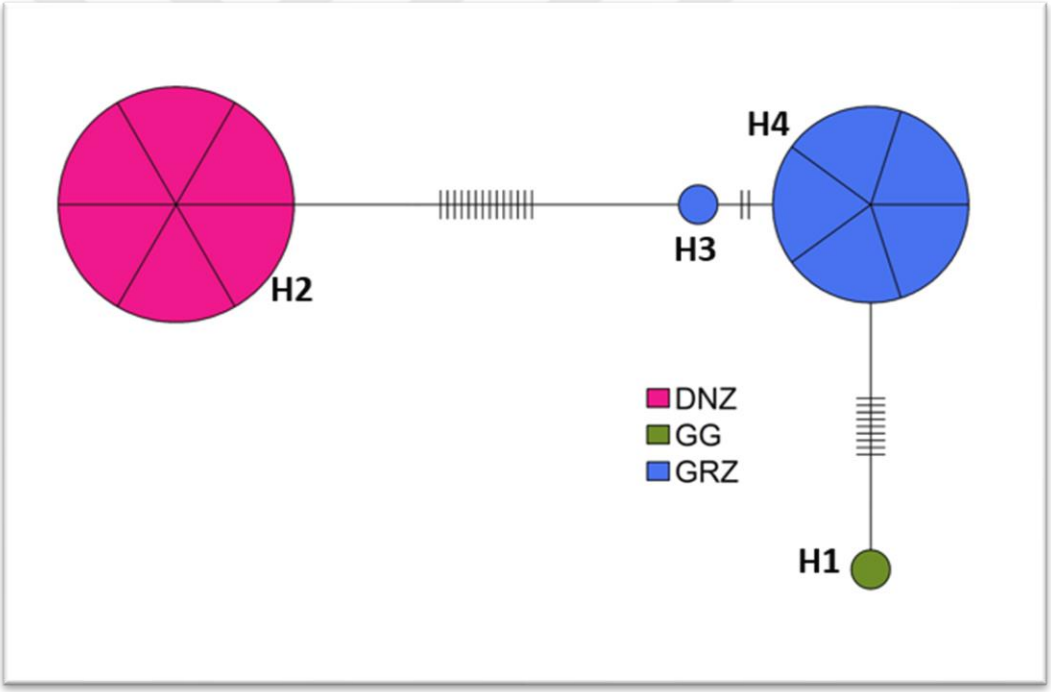
Denizli ve Gerze tavuklarının *ChTLR15* NGS sekans dizisi referans genom *Gallus gallus* (GenBank: NC_052575) ile kıyaslanmış ve *TLR15* (3766 bç) dizisi MEGA11 programında hizalanmış (Şekil 4.34 ve 4.42) ve popülasyon içi ve popülasyonlar arası ağaç elde edilmiştir (Şekil 4.34-4.38). Daha sonra hem DnaSp5.10 hem de Rstudio programında analiz edilmesi sonucunda Denizli ve Gerze tavuklarına ait 4 adet haplotip saptanmıştır (Şekil 4.33). Diğer ırklar ile kıyaslandığında 27 adet haplotip varyasyonu (1-2462 baz çifti aralığında) tespit edilmiş olup (Şekil 4.37), haplotip dizileri, veri seti içerisindeki frekansı ve veri setindeki yüzdesi verilmiştir (Şekil 4.41). Çalışılan popülasyon içi haplotip çeşitliliği ve popülasyonlar arası haplotip çeşitliliği (hd) sırasıyla 0,6154 ve 0,9488 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.41). Popülasyonlara ait haplotip nükleotit pozisyonları Şekil 4.33-4.37'de verilmiştir. Denizli tavuk popülasyonunu oluşturan bireyler H2 haplotiplerinde yer alırken, Gerze ırklarına ait bireyleri H3-4 haplotipinde yer aldığı saptanmıştır (Şekil 4.35). Yerli tavuk ırklarımıza ait sekans dizileri NCBI veri bankasında verilen diğer tavuk ırkları ile kıyaslanmış ve elde edilen dendogramda (Şekil 4. 38), haplotip net work (Şekil 4. 40) ve ısı haritası incelendiğinde (Şekil 4.36-4.40) her iki ırk kendi içerisinde küme oluştururken, diğer ırklar ile kıyaslandığında genetik olarak *Salmonella* ve bakteriyel hastalıklara dirençli olduğu bildirilen yumurtacı KD ve AS (Kadanakth ve Asell) tavuk ırklarına yakın kümede yer aldıkları saptanmıştır (Şekil 4.38). *ChTLR15*'e ait 820 nükleotit dizisinin analiz edilmesi sonucu (11 polimorfik bölge) polimorfik özellik gösteren amino asit pozisyonları ve diğer ırklar ile benzerlikleri EK-15'te verilmiştir (Şekil 4.43). ChTLR15' ait protein sekans dizisinin SMART programından analizi sonucu bu reseptöre ait sonuç alınmıştır (Şekil 4.48). Çalışılan dört reseptöre ait dizi verileri NCBI'da verilen diğer ırk verileri ile Denizli ve Gerze ırklarına ait veriler MEGA'da hizalanıp dendogram elde edilmiştir (EK-24). *ChTLR15* haplotip çeşitliliği Denizli ve Gerze tavuklarının diğer ırklar ile analizi incelendiğinde (0,9854) 1'e yakın değer aldığı ve analiz edilen 27 ırka ait 35 verinin her birinin genel olarak ayrı haplo grupta yer aldığı saptanmıştır.

Haplotip	Nükleotit pozisyonu	Birey sayısı	Frekans
H1	GACTCTTGAAAGCCTCCATAGCCC	1	7.69
H2	AGAGAGCAGG.ATTCATTCTATTT	6	46.15
H3	.G....CA..GA.TC....TA.TT	1	7.69
H4	.G....CA..GA.TC....TA...	5	38.46

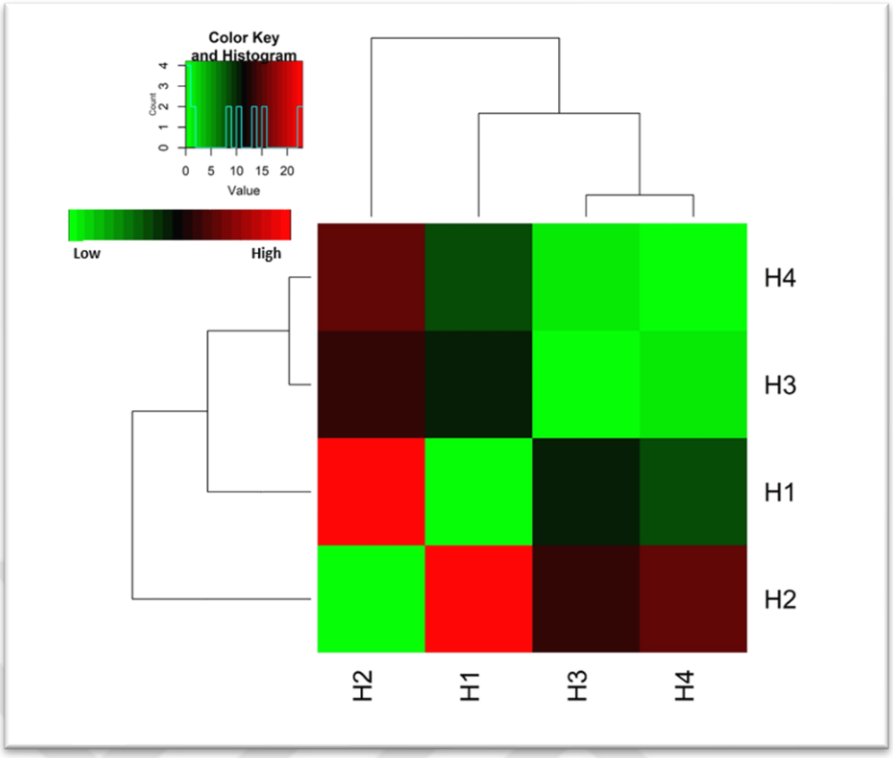
Şekil 4. 32. *ChTLR15* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarında popülasyon içi haplotip nükleotit pozisyonu



Şekil 4. 33. *ChTLR15* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarına ait sekans dizisinin referans gen ile Mega11'de hizalanması ve bu popülasyonlara ait dendogram (*Gallus gallus* (GG), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ)).



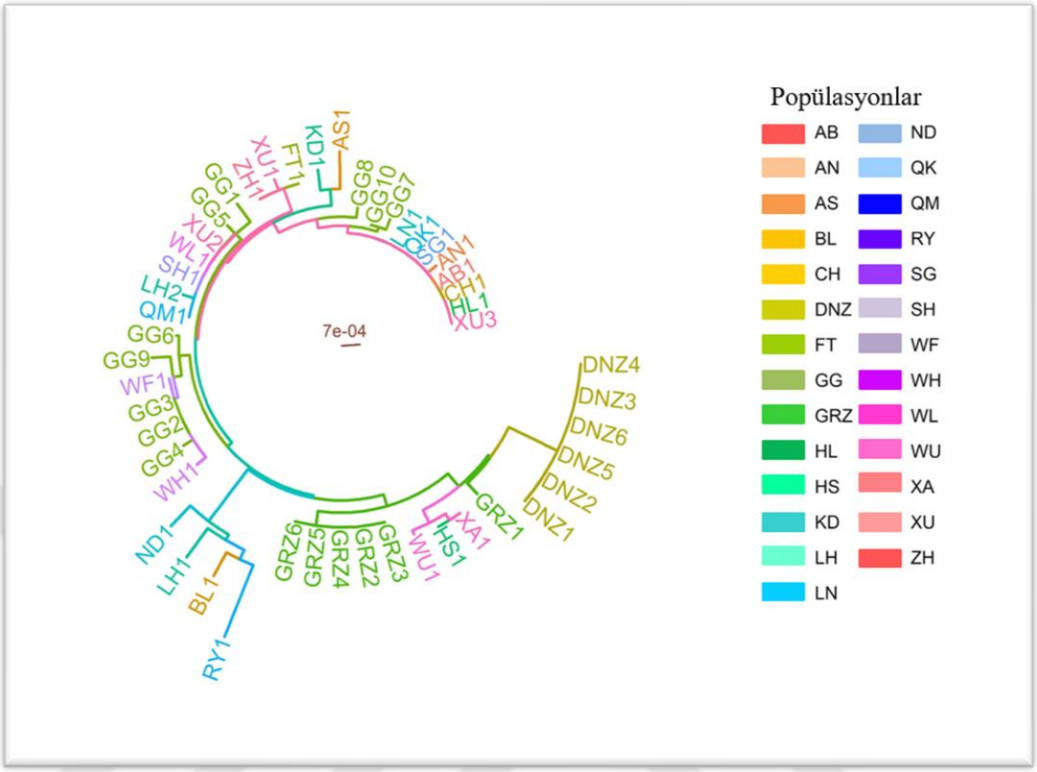
Şekil 4. 34. *ChTLR15* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarına ait haplotip ağı (*Gallus gallus* (GG), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ)).



Şekil 4. 35. *ChTLR15* reseptörü polimorfizminin Denizli ve Gerze tavuklarına ait ısı haritası

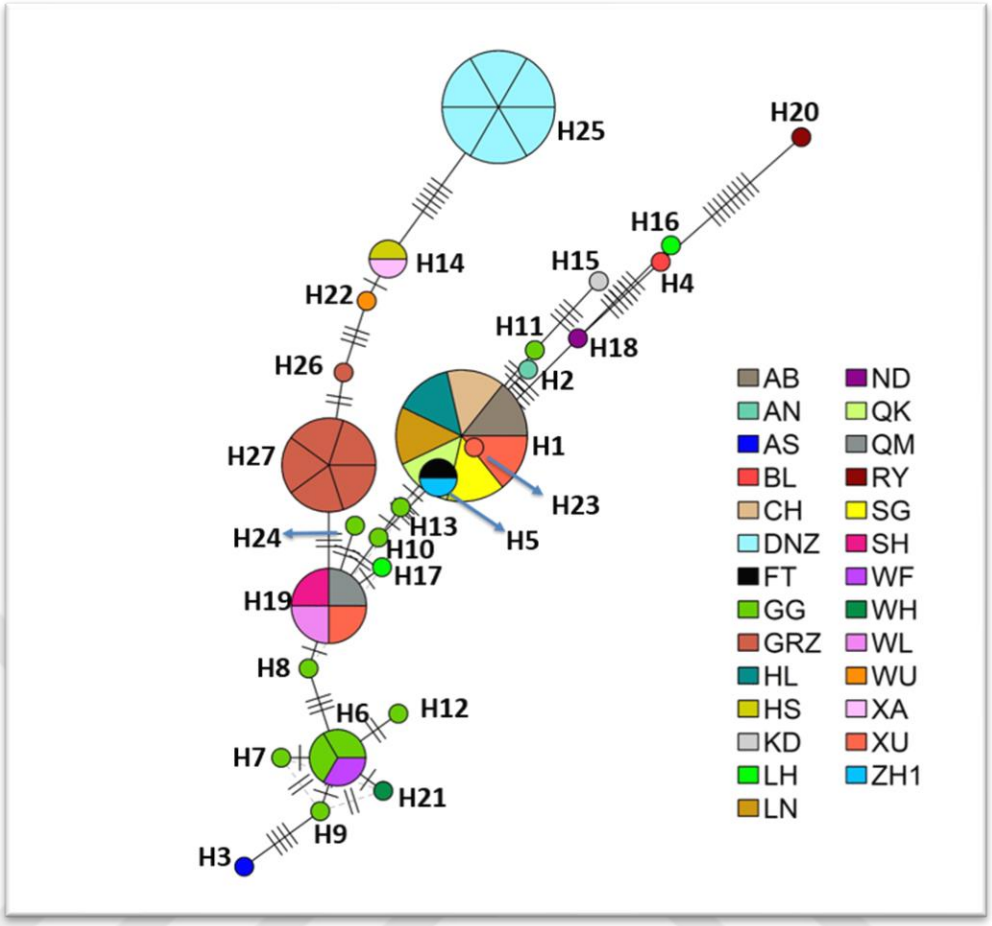
Haplotip	Nükleotit pozisyonu	Birey sayısı	Frekans
H1	GTGGGGACCGTCGGGGGGCCCCTCAGACAGTGCTCCACT	7	14.29
H2	.....C.....	1	2.04
H3	A.....C.....C.T.....GTA	1	2.04
H4	A..A.A..TA...AAA.....C.T...AT..T...	1	2.04
H5	.....A.GC.T....T.....	2	4.08
H6	A.....C.....A.A..C.T.....	3	6.12
H7	A.....C.....A.A..C.TT.....	1	2.04
H8	.....A.AT.C.T.....	1	2.04
H9	A.....C.....A..C.T.....	1	2.04
H10	.....A....T.....	1	2.04
H11	.....T.C.....	1	2.04
H12	A.....C.....A.A..C...A.....	1	2.04
H13	.....T.....	1	2.04
H14	A.....T.....C.T...A..TT...	2	4.08
H15	.....T.C.T....T....TA	1	2.04
H16	A..A.A...AC..AAA..T..T...C.T.....	1	2.04
H17	.....AT.C.T..C.....	1	2.04
H18	A.TA.A...A...AAA.....A..C.T....T.....	1	2.04
H19	.....AT.C.T.....	4	8.16
H20	A..ACAC..AC..AAACA.TA....C.T...A...T...	1	2.04
H21	AC.....C.....A.A..C.T.....	1	2.04
H22	A.....T..A..C.T...A..TT...	1	2.04
H23	.....A.....A.GC.T....T.....	1	2.04
H24	.....CT.....AT.C.T.....	1	2.04
H25	A.....T.....AT...CTT...AT.TT...	6	12.24
H26	A.....AT.CTT...A..TT...	1	2.04
H27	A.....AT.CTT...A.....	5	10.2

Şekil 4. 36. *ChTLR5* reseptörünün Denizli ve Gerze tavuklarında popülasyon içi popülasyonlar arası haplotip nükleotit pozisyonu



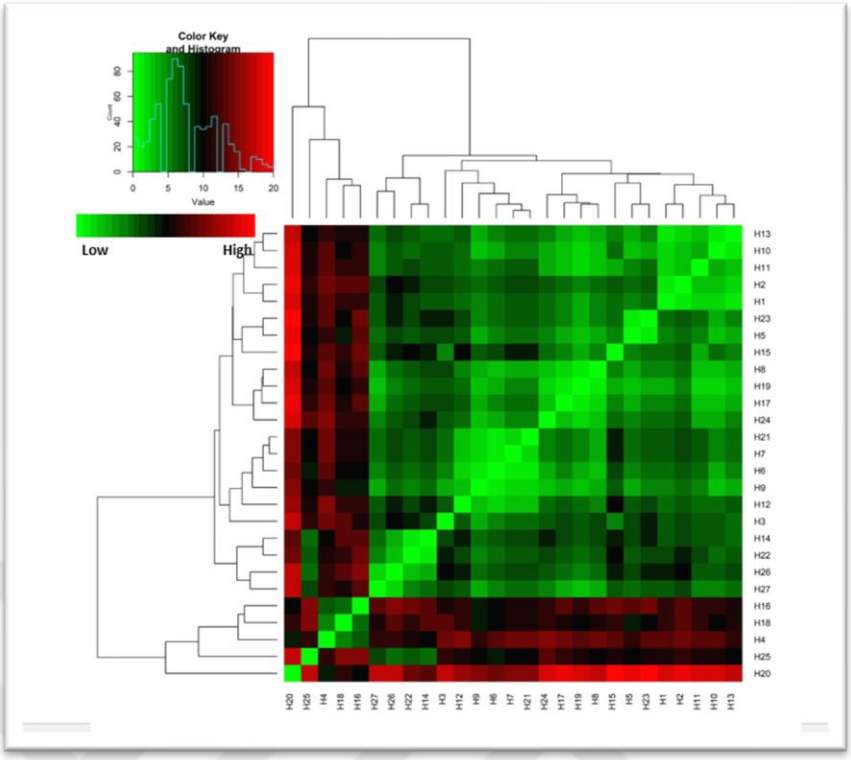
Şekil 4.37. *ChTLR15* reseptörünün popülasyonlar arası alınan dendogram

Not: *Gallus gallus* (GG1), *Gallus gallus* (GG2), Beijing fatty (FT1), Nongda (ND1), Luhua (LH1), Hy-line variety brown (HL1), Black (BL1), Royal (RY), White leghorn (WL1), White (WH1), Kadaknath (KD1), Aseel (AS1), Chongrenma (CH1), Zhongbai (ZH1), Xueshanma (XU1), Xueshanhuang (XU2), Xueshancao (XU3), Wugu (WU1), Sanhuang (SH1), Qinjiaoma (QM1), Qinke (QK1), A.A broiler (AB1), Xianju (XA1), Luhua (LH2), White feather (WF1), Anka (AN1), Lanshan (LN1), Haisailesi (HS1), Shigiza (SG1), *Gallus gallus* (GG3), *Gallus gallus* (GG4) , *Gallus gallus* (GG5), *Gallus gallus* (GG6), *Gallus gallus* (GG7), *Gallus gallus* (GG8), *Gallus gallus* (GG9), *Gallus gallus* (GG10), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ).

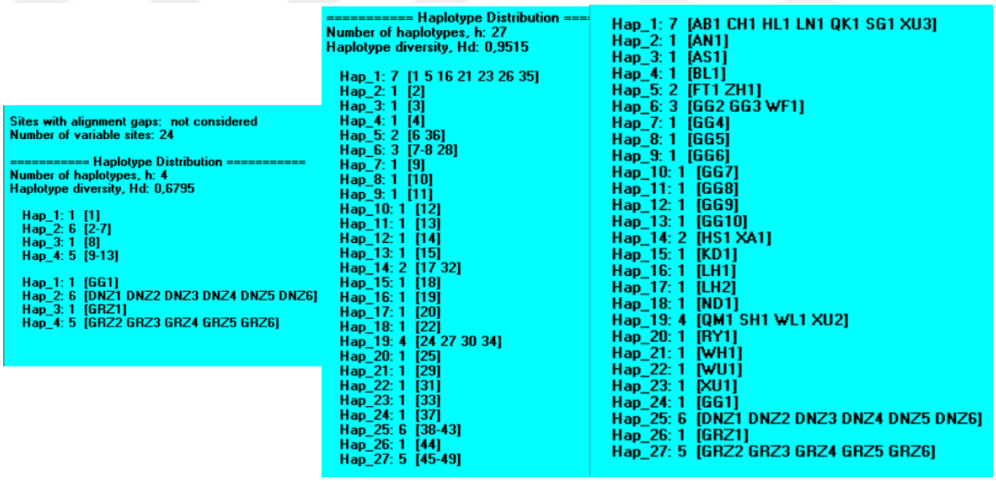


Şekil 4. 38. *ChTLR15* reseptörünün Denizli ve Gerze tavukları ve diğer ırklar ile kıyaslanmasından oluşturulan haplotip ağı

Not: *Gallus gallus* (GG1), *Gallus gallus* (GG2), Beijing fatty (FT1), Nongda (ND1), Luhua (LH1), Hy-line variety brown (HL1), Black (BL1), Royal (RY), White leghorn (WL1), White (WH1), Kadaknath (KD1), Aseel (AS1), Chongrenma (CH1), Zhongbai (ZH1), Xueshanma (XU1), Xueshanhuang (XU2), Xueshancao (XU3), Wugu (WU1), Sanhuang (SH1), Qinjiaoma (QM1), Qinke (QK1), A.A broiler (AB1), Xianju (XA1), Luhua (LH2), White feather (WF1), Anka (AN1), Lanshan (LN1), Haisailesi (HS1), Shigiza (SG1), *Gallus gallus* (GG3), *Gallus gallus* (GG4) , *Gallus gallus* (GG5), *Gallus gallus* (GG6), *Gallus gallus* (GG7), *Gallus gallus* (GG8), *Gallus gallus* (GG9), *Gallus gallus* (GG10), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ).



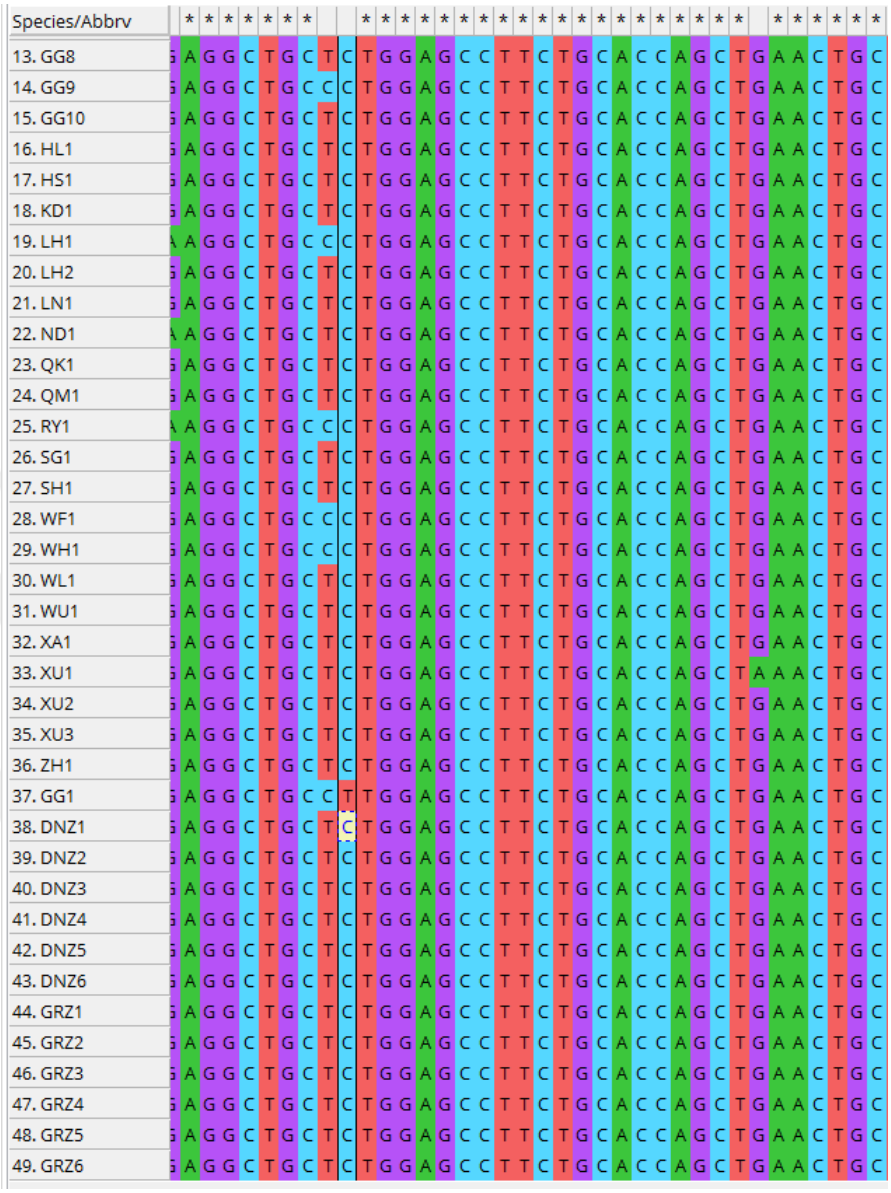
Şekil 4. 39. *ChTLR15* reseptörü polimorfizminin Denizli ve Gerze tavukları ve diğer popülasyonlara ait ısı haritası



Şekil 4. 40. *ChTLR15* reseptörünün popülasyon içi ve popülasyonlar arası haplotip dağılımı

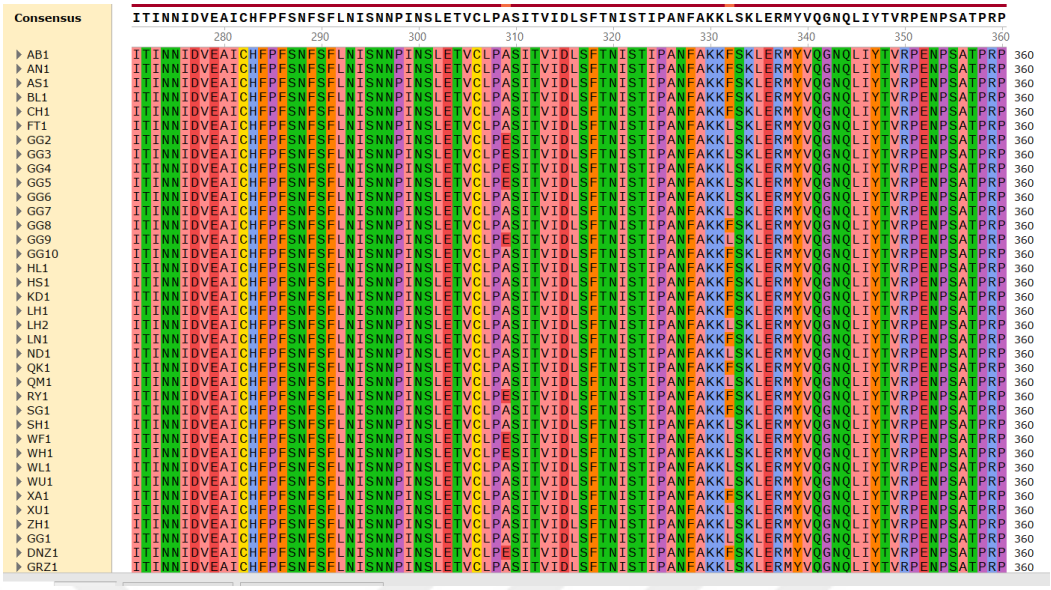
Not: *Gallus gallus* (GG1), *Gallus gallus* (GG2), Beijing fatty (FT1), Nongda (ND1), Luhua (LH1), Hy-line variety brown (HL1), Black (BL1), Royal (RY), White leghorn (WL1), White (WH1), Kadaknath (KD1), Aseel (AS1), Chongrenma (CH1), Zhongbai (ZH1), Xueshanma (XU1), Xueshanhuang (XU2), Xueshancao (XU3), Wugu (WU1), Sanhuang (SH1), Qinjiaoma (QM1), Qinke (QK1), A.A broiler (AB1), Xianju (XA1), Luhua (LH2), White feather (WF1), Anka (AN1), Lanshan (LN1), Haisailesi (HS1), Shigiza (SG1), *Gallus gallus* (GG3), *Gallus gallus* (GG4) , *Gallus gallus* (GG5),

Gallus gallus (GG6), *Gallus gallus* (GG7), *Gallus gallus* (GG8), *Gallus gallus* (GG9), *Gallus gallus* (GG10), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ).

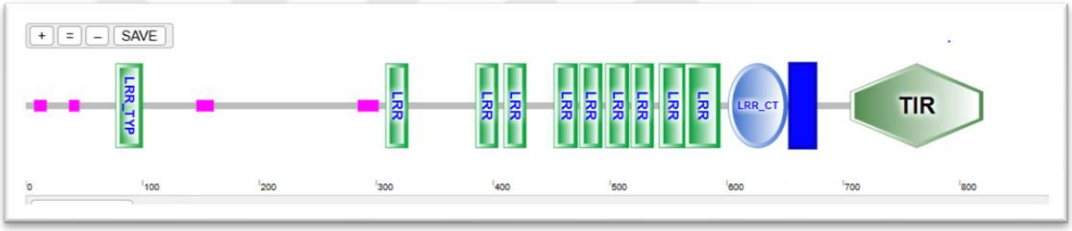


Şekil 4. 41. *ChTLR15* reseptörünün Denizli ve Gerze tavukları ile referans gen ve diğer tavuk ırkları ile Mega11'de kıyaslanması ile elde edilen resim

Not: *Gallus gallus* (GG1), *Gallus gallus* (GG2), Beijing fatty (FT1), Nongda (ND1), Luhua (LH1), Hy-line variety brown (HL1), Black (BL1), Royal (RY), White leghorn (WL1), White (WH1), Kadaknath (KD1), Aseel (AS1), Chongrenma (CH1), Zhongbai (ZH1), Xueshanma (XU1), Xueshanhuang (XU2), Xueshancao (XU3), Wugu (WU1), Sanhuang (SH1), Qinjiaoma (QM1), Qinke (QK1), A.A broiler (AB1), Xianju (XA1), Luhua (LH2), White feather (WF1), Anka (AN1), Lanshan (LN1), Haisailesi (HS1), Shigiza (SG1), *Gallus gallus* (GG3), *Gallus gallus* (GG4) , *Gallus gallus* (GG5), *Gallus gallus* (GG6), *Gallus gallus* (GG7), *Gallus gallus* (GG8), *Gallus gallus* (GG9), *Gallus gallus* (GG10), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ).



Şekil 4. 42. *ChTLR15* reseptörünün Denizli ve Gerze tavukları diğer popülasyonlara ait protein sekans dizisinin amino asit polimorfizminden bir kesit



Şekil 4. 43. Tavuk toll benzeri reseptör *ChTLR15*'in yapısı. Koyu mavi dikdörtgen transmembran protein alanını temsil eder ve yeşil bantlar patojenle ilişkili moleküler desen tanımada yer alan lösince zengin tekrarları (LRR) gösterir. Açık mavi daire C terminal LRR'yi (CTLRR) ve TIR (toll–IL-1) reseptörünü temsil eder. Analiz (SMART service;http://smart.embl-heidelberg.de) sağlanmıştır.

4.3. Denizli ve Gerze tavuk kan örneklerinin hücre kültürü sonrası RT-qPCR analizi

RT-PCR analiziyle, Gerze ve Denizli tavuk ırklarının hücre kültüründe farklı süreler (1. saat ve 3. saat) ve ligand muamelesine ait cDNA örneklerinin ve 5 adet primer çiftinin kontrol edilip doğrulanmasının ardından, tüm cDNA örnekleri ve genler için RT-qPCR analizine geçilmiştir. RT-qPCR analizinde, öncelikle primerlerin PCR verimliliğini belirlemek ve doğru cDNA konsantrasyonunu tespit etmek amacıyla yapılan ön çalışmada, Denizli tavuk ırkının 5 numaralı cDNA örneği kullanılmıştır. 5 farklı dilüsyon serisi (1:10, 1:8 (*GAPDH* primer çifti için) ve 1:4 (*ChTLR15* primer çifti için)) oranlarında hazırlanan cDNA örnekleri ile tüm primer çiftleri kullanılarak RT-qPCR analizi yapılmıştır. Bu çalışma sayesinde, sabit primer konsantrasyonlarına karşılık seyreltilmiş cDNA örneklerinin PCR verimlilikleri, standart eğri, erime eğrisi ve amplifikasyon eğrisi grafikleri elde edilmiştir.

4.3.1. Standart eğri

Denizli ırkına ait 5 numaralı cDNA örneği, 5 farklı dilüsyonda (125 ng, 12,5 ng, 1,25 ng, 0,125 ng, 0,0125 ng) seyreltilmiş ve 5 primer çifti kullanılarak RT-qPCR'da standart eğri oluşturmak amacıyla analiz edilmiştir. Analiz sonucunda C_q değerleri ile standart eğri grafikleri oluşturulmuş ve RT-qPCR verimlilikleri, standart eğri grafiğindeki eğim değerlerine göre hesaplanmıştır. Literatürde, RT-qPCR bağlanma verimliliği %93 ile %105 arasında, eğim değeri ise -3,2 ile -3,5 arasında ve $R^2 \geq 0,98$ olarak kabul edilebilir değerler olarak belirtilmiştir (Nolan vd. 2006; Kuang vd. 2018). Araştırmacılar, Cq değerinin (Kuang vd. 2018) 20 ile 30 arasında olması durumunda, RT-qPCR analizi için primer ve cDNA konsantrasyonlarının esas çalışma için seçilmesini önermektedir (Nolan vd. 2006). Bu doktora tez çalışmasında, her primer çifti için 5 farklı dilüsyonda cDNA kullanılarak standart eğri grafikleri oluşturulmuştur. Standart eğri analiz sonuçlarına göre, *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5, ChTLR15* ve *GAPDH* genleri için yapılan RT-qPCR analizinde ilk 5 dilüsyon cDNA'da amplifikasyon tespit edilmiştir.

4.4. RT-qPCR analizi ile genlerin ifade seviyelerinin belirlenmesi

Gerze ve Denizli tavuk ırklarının farklı süre ve ligand konsantrasyonlarına ait gen ifadesi analizi sonucunda elde edilen verilerin sonuç ekranı ve amplifikasyon eğrisi grafikleri her birey için EK-25-38'de verilmiştir. Erime eğrisi grafikleri, hedef mRNA fragmentleri dışında herhangi bir amplifikasyon olmadığını göstermiştir. Hücre kültürü sonrası çalışılan 5 primere ait C_q değerleri SPSS analiz programında test edilmiş, bu değerin maksimum, minimum ve ortalama değerleri Çizelge 4.5-4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4. 4. Gerze ve Denizli tavuk ırklarına ait farklı süre ve ligand uygulaması yapılan örneklem döneminden elde edilen C_q değerleri ile ΔC_q değerleri

Denizli	***GAPDH***	***TLR3***	***TLR4***	***TLR5***	***TLR15***
Minimum C_q	32,49	27,46	26,02	25,29	25,73
Maksimum C_q	29,92	25,92	25,38	32,05	24,99
Ortalama $C_q \pm$ SS	31,20±0,14	26,69±0,11	25,73±0,14	25,69±0,15	25,35±0,19
Ortalama $\Delta C_q \pm$ SS		3,51±0,001	5,47±0,11	5,50±0,17	5,85±0,19
Gerze	***GAPDH***	***TLR3***	***TLR4***	***TLR5***	***TLR15***
Minimum C_q	33,30	30,43	27,17	26,55	27,10
Maksimum C_q	32,79	29,87	26,65	25,96	26,54
Ortalama $C_q \pm$ SS	33,05±0,12	30,16±0,14	26,90±0,13	26,23±0,15	26,81±0,14
Ortalama $\Delta C_q \pm$ SS		2,88±0,17	6,14±0,15	6,81±0,18	6,23±0,15

SS: Standart sapma

NOT: ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$ değerleri, ligand muamele

gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir.

Çizelge 4. 5. Gerze ve Denizli tavuk ırklarının cinsiyete ait (horoz ve tavuk) örneklerin C_q değerleri ile ΔC_q değerleri

Horoz	***GAPDH***	***TLR3***	***TLR4***	***TLR5***	***TLR15***
Minimum C_q	32,31	29,57	26,53	26,37	26,48
Maksimum C_q	31,78	29,07	25,99	25,78	25,83
Ortalama $C_q \pm$ SS	32,04±0,13	29,32±0,12	25,73±0,13	26,07±0,15	26,16±0,16
Ortalama $\Delta C_q \pm$ SS		3,51±0,12	5,47±0,11	5,50±0,17	5,85±0,19
Tavuk	***GAPDH***	***TLR3***	***TLR4***	***TLR5***	***TLR15***
Minimum C_q	32,47	28,79	26,64	26.15	26,33
Maksimum C_q	31,94	22,28	26,10	25.56	25,68
Ortalama $C_q \pm$ SS	32,21±0,13	28,53±0,12	26,37±0,13	25,86±0,15	26,00±0,16
Ortalama $\Delta C_q \pm$ SS		2,88±0,17	6,14±0,15	6,81±0,18	6,23±0,15

SS: Standart sapma

NOT: ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$ değerleri, ligand muamele gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan 5 adet genin mRNA seviyeleri, Denizli ve Gerze tavuk ırklarının kanının (Eritrosit) hücre kültürü sonrası farklı süre ve konsantrasyonda ligand uygulama döneminden elde edilen C_q değerlerinden $2^{\Delta Cq}$ değerinin hesaplanmasıyla belirlenmiştir. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$ değerleri, ligand muamele gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir. Hem Denizli hem de Gerze ırklarının tavuk/horoza ait ΔCq değerleri hesaplanmıştır.

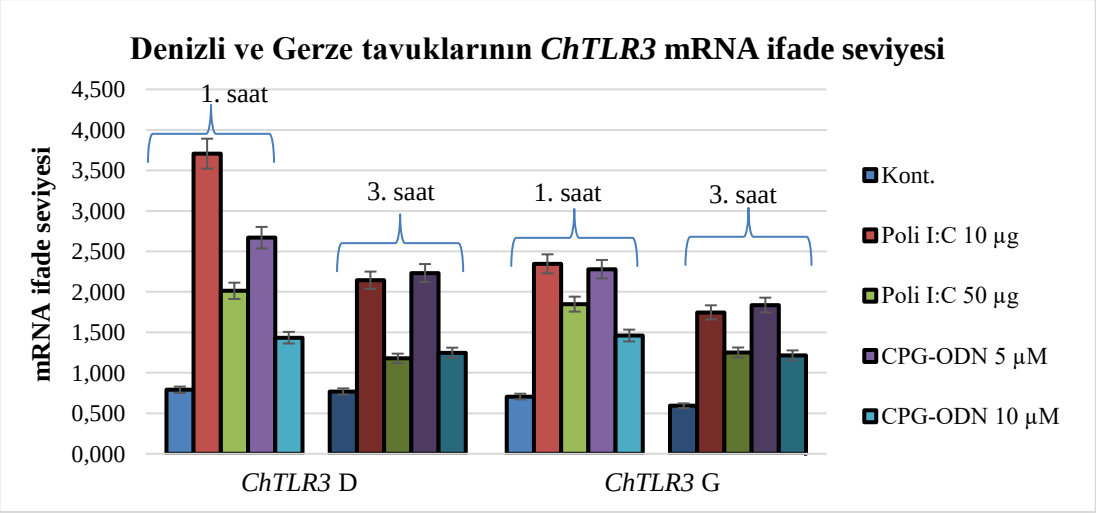
Elde edilen gen ifade seviyeleri "göreceli kantitatif (GK) mRNA seviyeleri" olarak tanımlanmış ve sonuçlar $2^{-\Delta Cq}$ şeklinde logaritmik ölçekte *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* sırasıyla sunulmuştur (Şekil 4.44-4.45-4.46-4.47). Elde edilen $2^{\Delta Cq}$ değerleri bakımından ırklar arasında ve her ırkın ırk bazında ve muamele süreleri arasındaki fark bağımsız örneklem t-testi ile analiz edilmiştir (Çizelge 4.4.3) (Ek-10). Ayrıca, her iki ırkın hücre kültürü sonunda gösterdikleri gen ifadesi seviyelerindeki değişiklikler logaritma 2 tabanında hesaplanarak test edilmiştir (Jebessa vd. 2018), elde edilen gen ifadesi seviyelerine ırk, cinsiyet ve ırk*cinsiyet interaksiyonun etkisi tek değişkenli varyans analizi ile test edilmiştir (Ek-11).

Denizli ve Gerze ırklarına ait örneklemlerden (Gerze; 4 (2T+2H), Denizli; 4 (2T+2H)) elde edilen mRNA seviyelerinin normal dağılım testi istatistikleri EK-10'da verilmiştir. T-testi sonucunda, yerli iki ırk arasında 5 genin ifade seviyelerindeki farkın anlamlı olduğu bulunmuştur ($P<0.001$). Elde edilen veriler, ilk ve üçüncü saat hücre kültürü sonrası örneklem dönemi için tüm genlerin Denizli ve Gerze tavuk ırklarında anlamlı seviyede daha fazla ifade edildiğini göstermiştir (Şekil 4.49). Denizli ve Gerze tavuk ırklarına ait hücre kültürü sonrası *ChTLR*'lerin gruplar arası/içi (ırk, cinsiyet, ligand

ve süre) varyans analizi yapılmıştır (EK-10). Çalışılan reseptörlerden *ChTLR3*'ün gruplar arası varyans analizi, ırk ve cinsiyet bakımından önemsiz bulunurken, diğer değerler ise tüm reseptörler bakımından önemli bulunmuştur (EK-11).

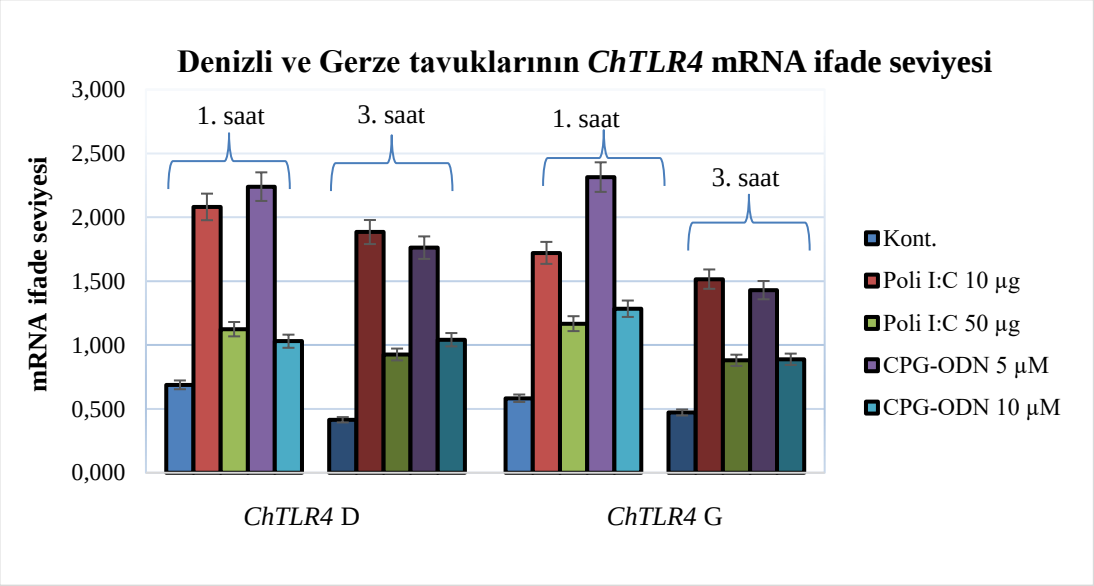
Hücre kültürü sonrası Gerze ve Denizli tavuk ırklarının farklı süre ve konsantrasyonlardaki poli I:C ve sentetik B sınıfı CpG ODN 2007'ye ait gen ifadesi analizi sonucunda elde edilen veriler, her bir reseptör için ayrı ayrı ve kontrol grubu verileriyle kıyaslanmıştır. *ChTLR*'lerin gruplar arası/içi (ırk, cinsiyet, ligand ve süre) varyans analizi değerleri kıyaslanmıştır. Gruplar arası kıyaslama sonucunda; *ChTLR3* ırk (0,189) ve cinsiyet (0,189), *ChTLR5* cinsiyet (0,084) ve *ChTLR15* cinsiyet (0,053) önemsiz bulunmuştur (EK-10) ($P<0.05$). Veriler, ırk, cinsiyet, ligand muamelesi, muamele süresi, ırk * cinsiyet, ırk * ligand muamelesi, ırk * muamele süresi, cinsiyet * ligand muamelesi, cinsiyet * muamele süresi, ligand muamelesi * muamele süresi, ırk * cinsiyet * ligand muamelesi, ırk * cinsiyet * muamele süresi, ırk * ligand muamelesi * muamele süresi, cinsiyet * ligand muamelesi * muamele süresi ve ırk * cinsiyet * ligand muamelesi * muamele süresi bakımından ikili, üçlü ve dörtlü etkileşim olarak kıyaslanmıştır. Kıyaslama sonucunda, reseptörler sırasıyla *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15*; ırk * muamele süresi (0,484, 0,484, 0,485 ve 0,385) ve ırk * ligand muamelesi * muamele süresi (0,019, 0,019, 0,017 ve 0,079) tüm reseptörler bakımından önemsiz bulunmuştur. Cinsiyet * ligand muamelesi (*ChTLR3, ChTLR4 ve ChTLR5*; 0,234, 0,231 ve 0,201) bakımından ise, *ChTLR15* (0,000) gen ekspresyon düzeyi önemli bulunmuş, diğer üç reseptör bakımından önemsiz olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, reseptör 15'in tavuklara özgü olmasıyla ilişkilendirilebilir (St. Paul vd. 2013). Ayrıca, ırk * cinsiyet muamelesinde, *ChTLR3 ve ChTLR4* (0,130, 0,130) önemsiz bulunurken, *ChTLR5* ve *ChTLR15* önemli bulunmuştur (EK-11) ($P<0.05$).

Dört adet genin mRNA seviyeleri, Gerze ve Denizli tavuk ırklarının hücre kültürü sonrası, iki farklı süre ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan iki ligandın C_q değerlerinden $2^{-\Delta Cq}$ değeri hesaplanarak belirlenmiştir. Elde edilen ifade seviyeleri "göreceli kantitatif (GK) mRNA seviyeleri" olarak tanımlanmış ve sonuçlar $2^{-\Delta Cq}$ x 1,000,000 şeklinde logaritmik ölçekte sunulmuştur (Şekil 4.43, Şekil 4.44, Şekil 4.45, Şekil 4.46) ($P<0.001$).



Şekil 4. 44. Gerze ve Denizli tavuk ırklarının 4 adet gen için 1. Saat ve 3. Saat elde edilen göreceli kantitatif mRNA seviyeleri (*: P<0.05, **: p<0.001). Görsel sırasıyla Denizli 1. Saat ve 3. Saat ve Gerze 1. Saat ve 3. Saat olarak verilmiştir (D: Denizli, G: Gerze, Kont. Kontrol grubu)

Not: mRNA ifade sevilerinin ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$ değerleri, ligand muamele gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir.

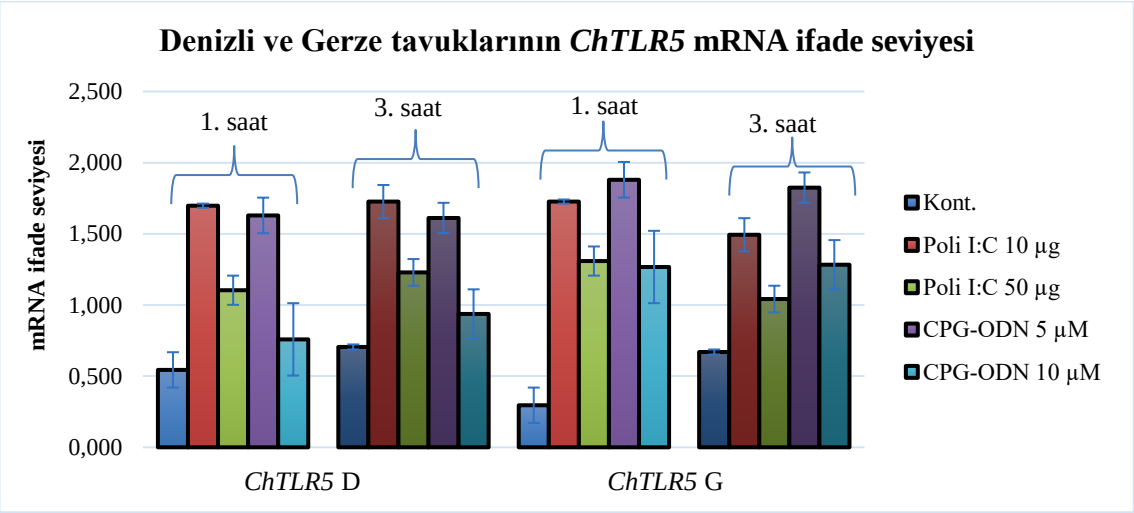


Şekil 4. 45. Gerze ve Denizli tavuk ırklarının 4 adet gen için 1. Saat ve 3. Saat elde edilen göreceli kantitatif mRNA seviyeleri (*: P<0.05, **: p<0.001). Görsel sırasıyla Denizli 1. Saat ve 3. Saat ve Gerze 1. Saat ve 3. Saat olarak verilmiştir (D: Denizli, G: Gerze, Kont. Kontrol grubu)

Not: mRNA ifade sevilerinin ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$ değerleri, ligand muamele gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir.

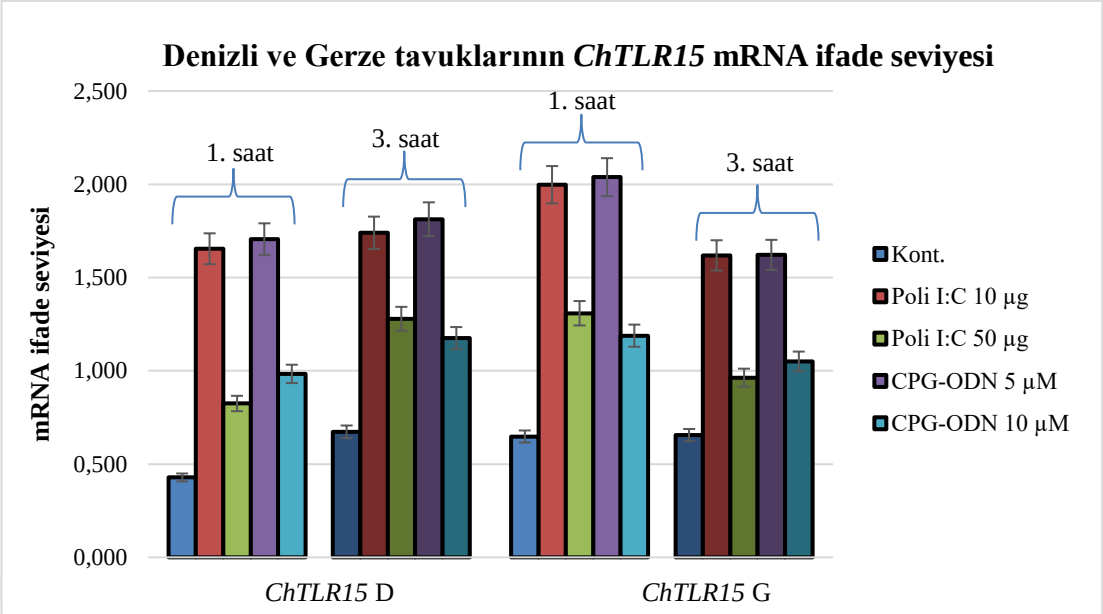
Denizli ve Gerze tavuklarından kan alımı sonrası hücre kültürüne alınan eritrositlerin RT-qPCR'dan elde edilen mRNA'nın göreceli gen ekspresyon değerlerinin (*ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15*) süre bakımından (1. saat ve 3. saat) seviyeleri analiz edilmiştir. Analiz sonucunda, 4 genin de farklı konsantrasyondaki ligand uygulama ve farklı süre bakımından ifade seviyelerindeki farklar önemli bulunmuştur (P<0.05 ve P<0.001). Her iki ırkın ligand uygulama ve farklı 1. saat ve 3. saat RNA gen ekspresyon seviyeleri, birinci saat üçüncü saatten kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunmuştur. Muamele uygulama sonucunda, Denizli tavuk ırkı *ChTLR3* bakımından 1. saat ve 3. saat sürelerinde RNA ekspresyon seviyesi Gerze tavuk ırkından daha yüksek olduğu belirlenmiştir (P<0.05 ve P<0.001) (Şekil 4.43). Her iki ırkın *ChTLR4* bakımından, 1. saat sürelerinde RNA ekspresyon seviyeleri benzerlik gösterirken, 3. saat sürelerinde RNA ekspresyon seviyesi Denizli ırkının Gerze tavuk ırkından daha yüksek olduğu

saptanmıştır (P<0.05 ve P<0.001) (Şekil 4.44). Denizli ve Gerze tavuk ırkı *ChTLR5* bakımından, 1. saat ve 3. saat sürelerinde RNA ekspresyon seviyeleri birbirine yakın değerlerde gözlemlenmiştir (P<0.05 ve P<0.001) (Şekil 4.45). Her iki ırkın *ChTLR15* bakımından, 1. saat sürelerinde RNA ekspresyon seviyeleri Gerze ırkında yüksek ekspresyon gösterirken, 3. saat sürelerinde RNA ekspresyon seviyesi Denizli ırkının Gerze tavuk ırkından daha yüksek olarak saptanmıştır (P<0.05 ve P<0.001) (Şekil 4.46). Denizli ve Gerze tavuklarına ait RNA gen ekspresyon seviyesi, *GAPDH* referans alınarak reseptör seviyesinde incelenmiştir (Şekil 4.47).



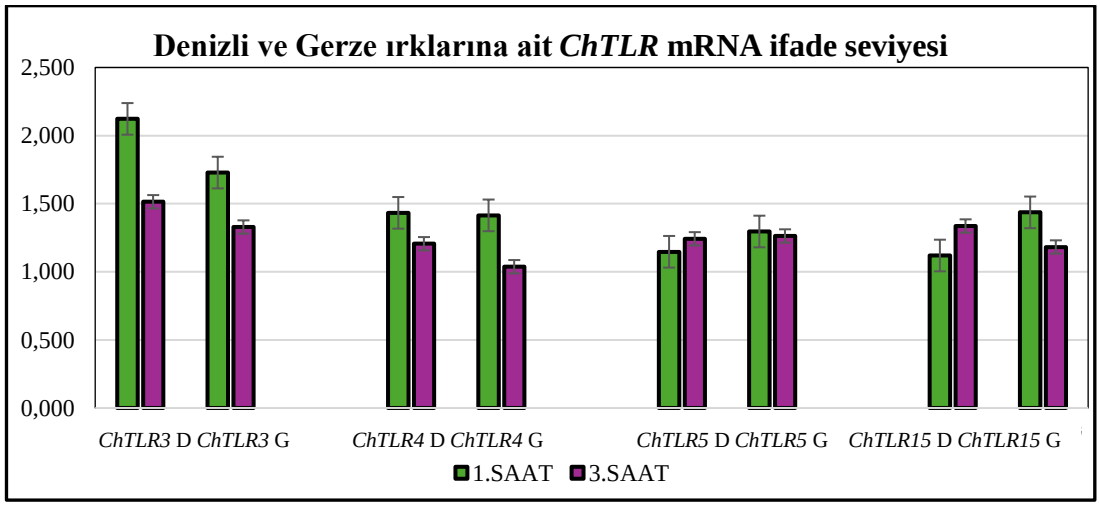
Şekil 4. 46. Gerze ve Denizli tavuk ırklarının 4 adet gen için 1. Saat ve 3. Saat elde edilen göreceli kantitatif mRNA seviyeleri (*: P<0.05, **: p<0.001). Görsel sırasıyla Denizli 1. Saat ve 3. Saat ve Gerze 1. Saat ve 3. Saat olarak verilmiştir (D: Denizli, G: Gerze, Kont. Kontrol grubu)

Not: mRNA ifade sevilerinin ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$ değerleri, ligand muamele gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir.



Şekil 4. 47. Gerze ve Denizli tavuk ırklarının 4 adet gen için 1. Saat ve 3. Saat elde edilen göreceli kantitatif mRNA seviyeleri (*: P<0.05, **: p<0.001). Görsel sırasıyla Denizli 1. Saat ve 3. Saat ve Gerze 1. Saat ve 3. Saat olarak verilmiştir (D: Denizli, G: Gerze, Kont. Kontrol grubu)

Not: mRNA ifade sevilerinin ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$ değerleri, ligand muamele gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir.

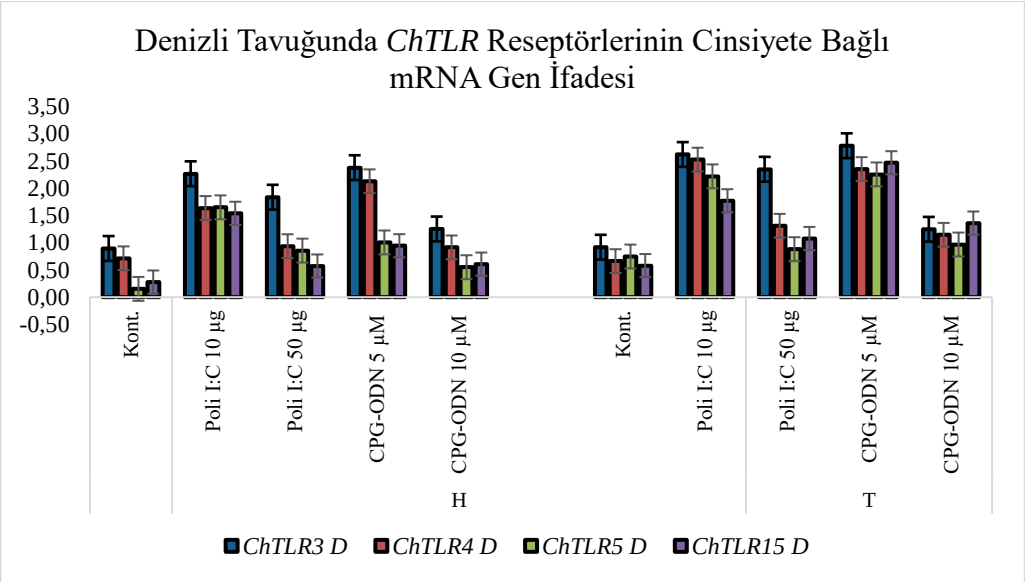


Şekil 4. 48. Gerze ve Denizli tavuk ırklarının 4 adet gen için 1. Saat ve 3. Saat elde edilen göreceli kantitatif mRNA seviyeleri (P<0.05, p<0.001) (D, Denizli ve G, Gerze, Kont. Kontrol grubu)

Not: mRNA ifade sevilerinin ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$

değerleri, ligand muamele gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir.

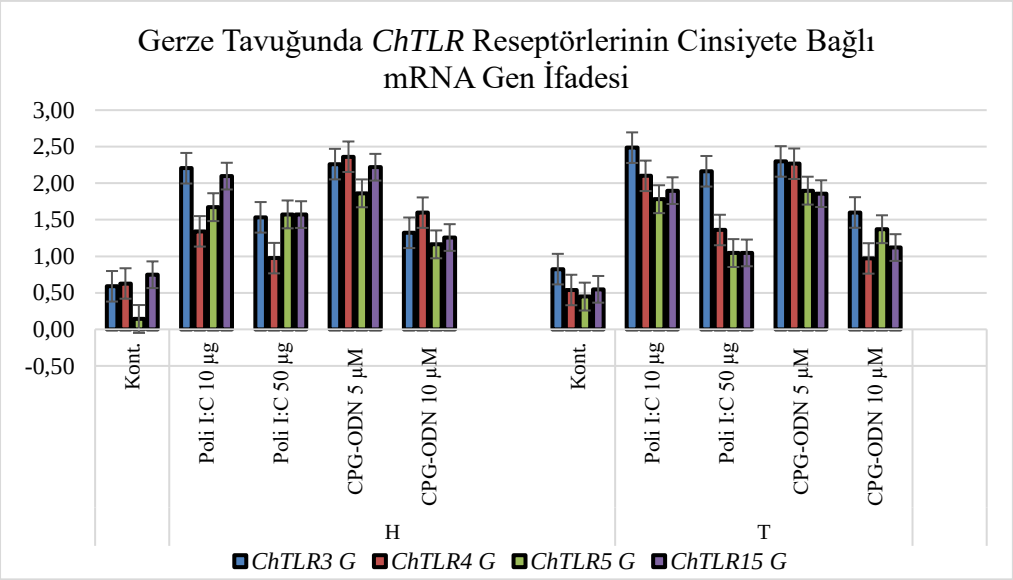
Kanatlı hayvanların üreme performansının önemli göstergesi olan yumurta üretimini etkileyen başlıca faktörlerden biri çeşitli hastalıklardır. Bunların başında yumurtada kontaminasyonlara sebep olan *Salmonella Enteritidis* tavuklarda yumurta kanalı ve ovaryumda etkili olabilmektedir (Van Immerseel 2010; Anastasiadou vd. 2016). Hastalıklara karşı etkili olan doğuştan gelen bağışıklık mekanizmasında etkili olan ve hastalık etmenini immün sisteme tanıtan TLR'lerin dişilerin üreme organlarında ifade edildiği bildirilmiştir (Ozoe vd. 2009; Michailidis vd. 2010; Michailidis vd.2011; Anastasiadou vd. 2016). *Salmonella* enfeksiyonlarını tanıyan *ChTLR4*'ün, genç yumurtacı tavukların ovaryumunda *Salmonella enteritidis* (S.E) karşı eksprese olduğu fakat yaşlı tavuklarda eksprese olmadığı bildirilmiştir (Kogut vd. 2005; Michailidis vd. 2015). Yapılan çalışmalar *ChTLR4*'ün tavuklarda epitelyumun mukozal yüzeylerinde ve oviduct stroma hücrelerinde lokalize olduğu ve LPS uygulama sonrası ekspresyon seviyesinde artış olduğu (Ozoe et al. 2009), S.E enfeksiyonunun ovaryumda farklı seviyelerde eksprese olduğu bildirilmiştir (Michailidis vd. 2014; Huang vd. 2022). Çalışmada yapılan analiz ile gen ifadesi seviyelerine ırk, cinsiyet ve ırk*cinsiyet interaksiyonun etkisi tek değişkenli varyans analizi sonucu cinsiyete bağlı interaksiyonlarının önemli bulunması Michailidis ve arkadaşarı (2014) ve Huang ve arkadaşlarının araştırma bulgularını destekler niteliktedir ($P<0.05$). Analiz sonucu RNA gen ekspresyon seviyeleri ırk düzeyinde incelendiğinde tavuklarda (T) hem Denizli hem de Gerze ırkında horozlara kıyasla *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15*'te daha yüksek eksprese olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.49-50). Çalışılan *ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* reseptörlerinin yerli ırklarımızda yüksek ifade edilmesi bu reseptörlerin dişilerde üreme kanalında *Salmonella* enfeksiyonuna karşı koruyucu bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 4. 49. Denizli tavuk ırkının 4 adet gen için cinsiyete bağlı elde edilen göreceli kantitatif mRNA seviyeleri ($P<0.05$, $p<0.001$) ((D) Denizli, (G) Gerze, (T) tavuk ve (H) horoz)

Not: mRNA ifade sevilerinin ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$ değerleri, ligand muamele gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir.

Tavuklarda erkek üreme organları, bulaşıcı virüsler ve gram-negatif ve-pozitif bakterileri gibi çeşitli patojenik mikroorganizmalardan etkilenmekte (Boltz vd. 2006; Villarreal vd. 2007; Monleon vd. 2008) bu durum epididimiste sperm depolama ve taşımanın azalmasına neden olabilmektedir. Bu durumlarda yerli konakçının sahip olduğu doğuştan gelen savunma mekanizmaları bu tür enfeksiyonların önlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu organlarda anti-spermlerin antikor sentezleme yeteneğinin daha az gelişmiş olması B hücrelerinin nispeten küçük olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür (Yoshimura vd. 2004; Anastasiadou vd. 2016). Testis ve epididimiste doğuştan ve hücresel bağışıklık CD4, CD8, T hücreleri ve makrofajlar lokalize olduğundan (Yoshimura vd. 2004) kuş β-defensinleri ve antimikrobiyal peptitlerin eksprese olmasından dolayı aktive edilebileceği bildirilmiştir (Zhang vd. 2012). Horoz testisleri ve epididimiste *TLR* ifade seviyesinin yüksek olduğu ve bunun LPS, *TLR*4'ü uyararak proinflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin ifade seviyesinde artış olduğu ve bu tür bir immün yanıtın, erkek üreme organlarında enfeksiyona karşı lokal savunmada rol oynadığı bildirilmiştir (Zhang vd. 2012). Literatürde bildirilen çalışma sonuçları ile uyumlu olarak *ChTLR4* ekspresyonu Denizli ve Gerze horozlarında tavuklara kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca horoz epididimisin doğuştan gelen bağışıklık işlevlerine sahip olduğunu ve *Salmonella,* AvBD ve *TLR* gen ailelerinin belirli üyelerinin aktive edildiği bildirilmiştir (Anastasiadou vd. 2013). Horoz sertoli hücrelerinin LPS uyarımı, testisteki patojenlere karşı bağışıklık tepkilerine aracılık edebilen *TLR*'ler, AvBD'ler ve inflamatuar sitokinlerin üretimini başlattığı bildirilmiştir (Michailidis vd. 2014). Bu verilerin bağışıklık ile ilişkili genlerin horoz sertoli hücrelerinin ve seminifer epitelinin istilacı patojenlerden ve antijenlerden korunmasında önemli roller oynadığını bildirmişlerdir (Michailidis vd. 2014). Çalışmada yapılan analiz ile gen ifadesi seviyelerine ırk, cinsiyet ve ırk*cinsiyet interaksiyonun etkisi tek değişkenli varyans analizi sonucu, cinsiyete bağlı interaksiyonda tüm reseptörlerde farklı seviyelerde ifade edildiği saptanmıştır ($P<0.05$). RNA gen ekspresyon seviyeleri ırk düzeyinde incelendiğinde hem Denizli hem de Gerze ırklarında horozlarda *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* reseptörlerinin anlamlı düzeyde eksprese olduğu belirlenmiştir (Şekil 4, 49–50). Özellikle *ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* reseptörlerinin Denizli ve Gerze horozlarında yüksek ifade edilmesi, bu ırkların Salmonella gibi patojenlere karşı dirençli olma potansiyelini desteklemektedir.



Şekil 4. 50. Gerze tavuk ırkının 4 adet gen için cinsiyete bağlı elde edilen göreceli kantitatif mRNA seviyeleri (P<0.05, p<0.001) ((D) Denizli, (G) Gerze, (T) tavuk ve (H) horoz, Kont. Kontrol grubu)

Not: mRNA ifade sevilerinin ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$ değerleri, ligand muamele gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir.

4.4.1. Tavuklarda immün sistemde görev alan genlerin polimorfizminin incelenmesi

İmmün sisteminin savunma mekanizmalarında önemli bir rol oynayan moleküller arasında, güçlü biyo-belirteçler olarak değerlendirilen Toll Benzeri Reseptörler, kanatlılarda bakteri ve virüs kökenli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Beutler 2005; Keestra vd. 2013). Bu reseptörlerden *ChTLR3* geni, tavuklarda immün yanıtla ilişkili olarak virüs kaynaklı hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Nawab vd. 2019).

Araştırmacılar, *ChTLR3* geninin kanatlılarda viral hastalıklara karşı duyarlılık ve dirençle ilişkili olduğunu ve bu genin ifade seviyesinin artışının Marek hastalığı virüsü, Newcastle hastalığı virüsü, bulaşıcı bursa hastalığı virüsü ve kuş gribi virüsü ile bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir (Cheng vd. 2014; Guo vd. 2012; Hu vd. 2014; Paul vd. 2012). Ayrıca, tavuk ırkları arasında kuş gribi virüsü, kuş leukosis virüsü, bulaşıcı bronşit virüsü ve laringotrakeit virüsüne duyarlılıkta farklılıklar gözlemlenmiştir (Bumstead vd. 1993; Otsuki vd. 1990; Poulsen vd. 1998; Sironi vd. 2008). Doğuştan gelen bağışıklık, konak savunmasının ilk hattı olduğu için, *ChTLR3*'teki varyasyonun konak savunmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (Sun vd. 2021).

Tavukların *ChTLR3* bakımından polimorfik bölgelere sahip olması, viral hastalıklara karşı dirençlerinin yüksek olabileceğine dair bazı ipuçları sunmaktadır. Ruan ve Wu (2015) bu çalışmada, tavuklardaki nükleotit polimorfizminin, hücredeki patojen varlığını tanımada rol oynayan PAMP'ları tanımayı ve dolayısıyla reseptör ligand bağlanmasını etkileyebileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada, Denizli ve Gerze

tavuklarında *ChTLR3*'te 17 polimorfik bölgeye sahip olmaları, yerli ırkların *ChTLR3* ile ilişkilendirilen kanatlı virüs hastalıklarına karşı dirençli olma ihtimalini düşündürmektedir. Ayrıca, Denizli ve Gerze tavuk ırklarının polimorfizm analizinde, kendi içinde küme oluşturmaları ve literatürlerde hastalıklara dirençli olduğu bildirilen OR (Orloff), LF (La-fleche) ve ML (Malay) gibi tavuk ırklarına yakın kümelerde yer almaları, bu ırkların virüs kaynaklı hastalıklara karşı dirençli olabileceğini göstermektedir.

Poliinosinik-polisitidilik asit (poli I:C), dsRNA analoğu olup, dendritik hücreler, bağırsak epitel ve fibroblast hücreleri gibi birçok hücre tipinde NF-kB ve IRF3 aktivasyonu yoluyla tip I ve tip II IFN üretimini indükleyen bir *TLR3* agonistidir (Matsumoto vd. 2004). Tavuk heterofilleri poli I:C'ye yanıt vererek *ChTLR3* ekspresyonunu artırmış, fosfolipaz C, fosfatidilinositol 3-kinaz ve hücre içi Ca2+ içeren bir sinyal yoluyla heterofillerin patlaması ve degranülasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Kogut vd. 2005; He vd. 2008). Ayrıca, poli I:C'nin tavuk monositlerinde nitrik oksit (NO) üretimini uyarımının düşük olduğu, ancak tavuk makrofaj hücre hattı olan HD11 hücreleri üzerinde poli I:C ile uyarıldığında NO üretiminin arttığı bildirilmiştir (He vd. 2007).

Cheng ve arkadaşları (2014), *TLR3*'ün interferon aracılığıyla immün yanıtın aktivasyonu ile influenza virüsünün ve solunum sinsityal virüsünün (RSV) replikasyonunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Virüs kaynaklı hastalıklar, hücrede IFNβ üretimini artırmaktadır ve IFNβ, IL-6 ve IL-8 gibi enflamasyon öncesi sitokinlerin ekspresyonunu da uyarır. Tavuklara aşı olarak uygulanan poli I:C veya NDV enfeksiyonundan sonra mRNA seviyelerinde önemli artışlar gözlemlenmiştir. *TLR3*'ün devre dışı bırakılması durumunda, hücre içi sinyal iletiminin önemli bileşeni olan NF-kB'nin aktivitesinin bozulduğu bildirilmiştir. Buna bağlı olarak hücrede sitokin üretiminde sıkıntılar olabileceği ve *TLR3*'ün aşırı ekspresyonu, sentetik dsRNA ve NDV ile mücadelede daha yüksek IL-6 ve IL-8 mRNA seviyelerine yol açtığı bildirilmiştir (Cheng vd. 2014). Bu durum, hücresel immün yanıt sisteminde *ChTLR3*'ün virüs kaynaklı hastalıklara karşı dirençteki önemini vurgulamaktadır.

Enfeksiyonlara karşı koruma sağlayan Tip I interferonların Poli(I:C) uygulanan tavuk hücrelerinde *ChTLR3*'ün ifade edilmesinde Tip I IFN üretimi artarkenken, gen susturulduğunda ise bu yanıtın baskılandığı Karpala vd. tarafından bildirilmiştir (Karpala vd. 2008). Yapılan çalışmada *ChTLR3*'ün farklı konsantrasyonlarda uygulanan poli I:C'nin hem Denizli hem de Gerze ırklarında 1. ve 3. saat sürelerinde Karpala vd. ile benzer bulunmuştur. Bu durum uygulama sonrası eritrosit hücrelerinde interferon artışı olabileceğini düşündürmüştür. Tavuklarda Poli(I:C) içerikli yapılan aşıların kuş gribi, Marek hastalığı ve Newcastle hastalığına karşı adjuvan etkisi olduğu bildirilmiştir (Liang 2013; Nawab vd. 2019; Parvizi 2012). *ChTLR3*'ün hücre içi kompartımanlara lokalizasyonu nedeniyle, sinyal iletimi MyD88'den bağımsız gerçekleşmekte ve NF-κB, sitokin ile Tip I IFN indüksiyonunu sağlamaktadır (Kawai ve Akira 2007). *ChTLR3*'ün polimorfizminin hastalıklarla ilişkisini incelemek ve Tip I IFN'nun ifade seviyesini belirlemek için bu reseptörün yerli tavuk ırklarındaki genetik potansiyelini anlamak açısından önemlidir.

Bu çalışmada, Denizli ve Gerze tavuk ırklarında hücre kültürü sürecinde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan poli I:C ile her ırka ait eritrosit örneklerinde, *ChTLR3*

geninin 1. saat sonrası Denizli ırkında (poli I:C 10 mg) yüksek ekspresyon gösterdiği, diğer ligand muamele gruplarının ise Gerze tavuk ırkı ile benzer oranda ekspresyon gösterdiği gözlemlenmiştir ($p<0.001$). Bu durum, Matsumoto ve diğerlerinin (2004) ve Kogut ve arkadaşlarının (2005) bildirdikleri gibi, poli I:C'nin hücrede IFN üretimini artırmış olabileceğini düşündürmektedir. Diğer yandan, Denizli ve Gerze tavuk ırklarının üçüncü saat ligand muamele örneklerinde, ilk saat ligand muamele dönemine kıyasla *ChTLR3* mRNA seviyesinde bir azalma tespit edilmiştir. Ancak bu fark anlamlı bulunmamış ($P>0.05$) ve literatürle uyumlu bir ekspresyon seviyesi gözlemlenmiştir. Ayrıca, sadece medyum kullanılan kontrol grubuna kıyasla, her iki saat ve farklı konsantrasyondaki ligand muamelesine ait RNA gen ifade seviyeleri önemli ölçüde yüksek bulunmuştur ($P>0.05$).

Denizli ve Gerze tavuk ırklarında, hücre kültürü sonrası farklı süre ve konsantrasyonlardaki sentetik B sınıfı CpG ODN 2007'nin ifade seviyeleri de tespit edilmiştir ($P>0.05$). Her ırka ait eritrosit örneklerinde, *ChTLR3* geninin 1. saat sonrası Denizli ve Gerze ırklarında sentetik B sınıfı CpG ODN 2007 5 µM ile yüksek oranda ve yakın seviyelerde ekspresyon gösterirken, sentetik B sınıfı CpG ODN 2007 10 µM ligand muamele gruplarının, her iki tavuk ırkında benzer oranda ekspresyon gösterdiği ve üçüncü saat ligand muamelesine kıyasla daha düşük ekspresyon gözlemlendiği tespit edilmiştir ($p<0.001$). Paul ve arkadaşlarının (2013) bildirdiği gibi, eritrosit hücrelerine farklı süre konsantrasyonlarda CpG ODN muamelesi hücrede IFN-α ve IFN-β üretimini artırmıştır. Bu çalışmada, aynı konsantrasyonlarda ligand muamelesinin *ChTLR3* RNA ekspresyon seviyelerinin benzer olması, yerli tavuk ırklarında IFN-α ve IFN-β üretimini artırmış olabileceğini düşündürmüştür. Diğer yandan, Denizli ve Gerze tavuk ırklarının üçüncü saat CpG ODN ligand muamele örneklerinde, ilk saat ligand muamele dönemine kıyasla *ChTLR3* mRNA seviyesinde bir azalma tespit edilmiştir, ancak bu fark anlamlı bulunmamış ($P>0.05$) ve literatürle uyumlu bir ekspresyon gözlemlenmiştir. Ayrıca, yalnızca medyum kullanılan kontrol grubuna kıyasla, her iki saat ve farklı konsantrasyondaki ligand muamelesine ait RNA gen ifade seviyeleri önemli ölçüde yüksek bulunmuştur ($P>0.05$).

İmmün sistemin önemli bileşenlerinden biri olan TLR'ler, bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesinde ve patojenlere karşı savunmada kritik rol oynamaktadır. Karpala ve arkadaşları (2008), tavuk dalak hücrelerinin poli I:C ile tedavisinde *ChTLR3*'e bağlı tip I interferonların (IFN) indüksiyonunu gözlemlemişlerdir. Çalışmada poli I:C'nin, organizmada immün yanıtı düzenleyen IFN genlerinin yukarı regülasyonuna ve bu ligandın intramüsküler enjeksiyonunun dalakta ve akciğerlerde 2,5 oligoadenilat sentetaz (OAS) ve tip I IFN transkriptlerinin ifade edilmesine yol açtığı bildirilmiştir (Parvizi vd. 2012). Bu bulgulara paralel olarak, yerli tavuk ırklarımız Denizli ve Gerze'de poli I:C ligand uygulamasının farklı süre ve konsantrasyonlarda ifade düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla yüksek olduğu, bunun da eritrosit hücrelerinde IFN üretiminin artışına neden olmuş olabileceği düşünülmektedir.

Tavukların et ve yumurta üretimi konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen, hastalık direnci ve yetiştirme programları ile ilgili stratejilerin geliştirilmesi sürmektedir. Bu doğrultuda, hastalık direnci veya bağışıklık fonksiyonu için kantitatif özellik lokuslarının (QTL) tespiti üzerine yoğunlaşılmaktadır. Tavuklarda Salmonella enterica gibi zoonoz hastalıkların duyarlılığı ile ilişkilendirilen QTL'lerden biri, *ChTLR4*'tür. *ChTLR4* hücrede membran yüzeyinde bulunur ve bakteriyel

hastalıkların duyarlılığıyla ilişkilendirilmiştir (Leveque 2003). *TLR* genleri üzerindeki SNP'ler ile ilgili yapılan fonksiyonel analizler, *TLR* alelleri ile hastalık duyarlılığı arasındaki ilişkiyi açıklığa kavuşturmayı amaçlamaktadır. Ayrıca, *TLR* ligandlarının adjuvan olarak kullanımı ve bu adjuvanların güçlü bir aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Dar vd. 2022; Taghavi vd. 2014). Yapılan çalışmalar, Kırmızı Orman tavuğu ve Tibet tavuğu gibi bazı tavuk ırklarının hastalıklara karşı yüksek direnç gösterdiğini ve *ChTLR4* geninin bu ırklarda yüksek oranda korunduğunu ortaya koymuştur (Kogut vd. 2005). Leveque ve arkadaşları, farklı tavuk soylarında yaptıkları analizlerde 22 dizi varyasyonu ve 5 farklı haplotip tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise Denizli ve Gerze popülasyonlarında 3 farklı haplotip ve 26 dizi varyasyonu, popülasyonlar arası ise 28 haplotip ve 35 dizi varyasyonu saptanmıştır ($P>0.05$).

Evrimsel bir bakış açısından, patojenler ve konakçıları arasındaki doğrudan ilişki, bağışıklık reseptör genlerindeki çeşitlilik ile evrimsel adaptasyonun tahmin edilebilmesine olanak tanımaktadır (Vinkler ve Albrecht 2009). Toll Benzeri Reseptörler, enfeksiyonun erken dönemlerinde patojen ligandlarının tespiti için doğuştan gelen bağışıklık sensörleri olarak görev yapmaktadır. Yerli tavuk ırklarının çevrelerine adaptasyonu, *ChTLR*'lerde büyük bir immüno-genetik çeşitlilik oluşturmaktadır. Ayrıca, doğal seçilim süreciyle şekillenen *ChTLR*'lerin, tavukların bulaşıcı hastalıklara karşı gösterdiği direncin genetik temeline dair fikirler sunduğu bildirilmiştir (Anderson vd. 2015; Świderská vd. 2018). Bu bilgiler ışığında, yerli tavuk ırklarımız Denizli ve Gerze'nin Salmonella gibi bakteriyel hastalıklarla ilişkilendirilen *ChTLR4*'teki nükleotit çeşitliliği sayesinde dirençli olabileceği düşünülmektedir.

TLR4 geninin, doğuştan gelen bağışıklıkla birlikte kanatlı üreme sisteminde de önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Chen vd. 2014; Kannaki vd. 2015; Suryohastari vd. 2024). Woods ve arkadaşları (2009), ovülasyon öncesindeki (F1) folikülündeki granüloza hücrelerinde *TLR2* ve *TLR4* mRNA seviyelerinde artış gözlemlerken, ovülasyon sonrası (F2) foliküllerde de benzer bir artış kaydetmişlerdir. Aynı çalışma, F2 foliküllerindeki granüloza hücrelerinde LPS tedavisi sonrasında *ChTLR2* ve *ChTLR4* mRNA ekspresyon seviyelerinde artış gözlemiştir (Woods vd., 2009). Bu bulgulara paralel olarak, hücre kültürü sonrası 1. ve 3. saatlerde yapılan poli I:C uygulamaları ile her iki ırkın gen ifade düzeylerinin benzer olduğu ve istatistiksel analizlerin, cinsiyet, süre, ligand muamele ve ırkların etkileşimlerinin anlamlı olduğunu göstermiştir. Bu durum, *ChTLR4*'ün her iki tavuk ırkında üreme sistemi üzerinde ifade edilmiş olabileceğini ve bu reseptörün bakteriyel hastalıklara karşı kullanımını araştıracak çalışmalar için ön çalışma niteliği taşıdığını düşündürmektedir.

Kannaki ve arkadaşları (2010), bakteriyel flagellini tanıyan *TLR5*'in Kadaknath, Dwarf, Naked Neck, White Leghorn ve Aseel ırklarında diğer saf hatlara kıyasla daha yüksek oranda ifade edildiğini bildirmiştir. Benzer şekilde, yerli tavuk ırklarımız Denizli ve Gerze'de yapılan dizi analizi ve dendrogram sonuçlarına göre, literatür çalışmalarında bakteri ve stres kaynaklı hastalıklara karşı dirençli olduğu bildirilen Minorca ve Malay tavukları ile yakın kümede yer aldıkları gözlemlenmiştir. Ayrıca, Frizzle tavuğuna daha uzak bir kümede yer aldıkları tespit edilmiştir. Bu bulgular, yerli tavuk ırklarımız Denizli ve Gerze'nin hem polimorfizm analizi hem de hücre kültürü sonrası poli I:C'ye yanıtlarının yüksek olması nedeniyle, özellikle Salmonella gibi bakteriyel hastalıklara karşı dirençli olabileceğini düşündürmektedir.

Literatür araştırmalarında, polimorfik olan *ChTLR4* geninin civcivlerin *Salmonella enterica serovar typhimurium*'a karşı direnç/hassasiyet ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Dil ve Qureshi 2002; Leveque vd. 2003). Tavuk hatları arasında makrofajların hücre yüzeyinde lokalize olan *ChTLR4* reseptör moleküllerinin sayısının farklılık gösterdiği, bu nedenle suşlar arasında LPS bağlayıcı reseptörlerin ekspresyonunun değişiklik gösterdiği belirtilmiştir (Dil ve Qureshi 2002). *ChTLR4* genindeki tek nükleotid polimorfizminin *Salmonella enteritidis* ile ilişkili olduğu ve araştırma sonuçlarının, Salmonella'ya karşı immün yanıtı artırmak amacıyla moleküler marker seçiminde fenotipik varyasyon için belirteçler olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir (Malek vd. 2004; Kannaki vd. 2010). Çalışma sonuçları, *ChTLR4* geninin polimorfik olduğunu destekler niteliktedir.

Careem vd. (2009), Clostridium perfringens mikrobu ile teması olan tavukların dalağında *ChTLR4* ve *ChTLR7*'nin yüksek ifade seviyelerinin yukarı yönlü regüle edildiğini belirtmişlerdir. Ancak, RT-qPCR analizi sonucu sinyal iletim yolaklarında rol oynayan MyD88 veya TRAF6 moleküllerindeki değişikliklerin önemli ölçüde değerlendirilemediği bildirilmiştir (Lu vd. 2009; Careem vd. 2009). Denizli ve Gerze tavuklarının *ChTLR4* reseptörünün farklı süre ve ligand uygulamaları altında RT-qPCR analizi yapılmış ve önemli ölçüde yüksek ekspresyon seviyeleri gözlemlenmiştir. Ancak sinyal iletim yolaklarının tam olarak anlaşılabilmesi için MyD88 ve TRAF6 ile ilgili yapılacak çalışmalara öncül olma niteliği taşımaktadır.

Isı muamelesi ile öldürülmüş *Salmonella enterica serovar typhimurium* ile yapılan stimülasyon sonrasında, Salmonella ile enfekte olan tavukların çekumunda ve tavuk embriyonik fibroblast hücrelerinde tavuk *ChTLR2* (tip 2), *ChTLR3* ve *ChTLR15* mRNA ekspresyon seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (Higgs vd. 2006). Bununla birlikte, tavuk bağırsak epitel hücrelerinde *Salmonella* enfeksiyonu sonrasında *ChTLR5* ekspresyon seviyesinin azaldığı belirtilmiştir (Iqbal vd. 2005b; Abasht vd. 2008). Bu durum, büyük olasılıkla yüksek bakteriyel kolonizasyonun olduğu bir alanda aşırı uyarımın sınırlanması için gereken negatif geri beslemeye bağlı olabileceği düşünülmektedir (Iqbal vd. 2005b; Abasht vd. 2008). Sonuç olarak, *ChTLR5* ve *ChTLR15* gen ekspresyonunda önemli artışlar gözlemlenirken, S. *typhimurium*'a karşı yanıt tespit edilmiştir, ancak C. *jejuni*'ye karşı bu yanıt tespit edilmemiştir (Kannaki vd. 2010).

Genetik dizi analizi, *ChTLR5*'in, hindi ve zebra ispinozunun sekans dizileri ile birlikte 11 farklı türün (1 adi sülün, 1 Gine tavuğu ve 9 tavuk) sekans dizi karşılaştırılması sonucunda; kanatlılarda *TLR5*'in açık okuma çerçevesinin (ORF), 862 amino asidi kodlayan 2586 baz çifti karşılaştırılmıştır (Ruan vd. 2011). Bu analiz sonucunda, adi sülün ve Gine tavuğu ORF bölgelerinin karşılaştırılması sonucu 87 farklı amino asit bölgesi tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda, tavuk *TLR5* sekanslarında az sayıda polimorfizm olduğu, adi sülün ve Gine tavuklarının *TLR5* dizilerinin *ChTLR5* ile %95,8 oranında yüksek homolojiye sahipken, diğer *ChTLR*'ler (TLR1 tip 1 ve tip 2, *TLR3, TLR4, TLR7, TLR15* ve *TLR21*) ile daha düşük homolojiye (%19,1-22,6) sahip olduğu bildirilmiştir (Ruan vd. 2011). Denizli ve Gerze tavuklarının *ChTLR5* dizi analizi sonucu 7 haplotip ve 39 nükleotit çeşitliliği saptanmıştır ($P>0.05$). NCBI'da yer alan diğer ırklarla (1990 bç) kıyaslandığında ise 19 haplotip ve 22 nükleotit çeşitliliği tespit edilmiştir.

Yüksek polimorfik özelliğiyle *ChTLR15*, hücrede ekstraselüler domeinde lokalize olup mikrobiyal hastalık etmenlerini tanımaktadır (Ruan vd. 2012). Nerren vd. (2009), Salmonella'ya dirençli tavukların heterofillerinde gen ekspresyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada, *ChTLR15* ekspresyon seviyelerinin daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir (Nerren vd. 2009). Ayrıca, *ChTLR15*'in *Salmonella*'nın farklı suşlarının bazı bileşenlerini tanıdığı ve kanatlı bağışıklık tepkisinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Nerren 2010). Yapılan çalışmada, Denizli ve Gerze ırklarında *ChTLR15*'in RNA ekspresyon seviyelerinin, diğer reseptörlere kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Yerli Çin tavuk hatları olan WU (Wugu) ve XU (Xueshanma) tavuklarında *Salmonella*'ya karşı *ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* RNA ekspresyon seviyelerinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Pan vd. 2012). Denizli ve Gerze tavuk ırklarında yapılan hem polimorfizm analizleri hem de RNA ekspresyon seviyeleri açısından WU ve XU tavuklarına yakın kümelerde yer almış olmaları, bu ırkların *Salmonella*'ya karşı dirençli olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, Gerze tavuk ırkının etin lezzetiyle ünlü yerli tavuk ırklarıyla yakın kümelerde yer alması ve yine literatür çalışmalarında hastalıklara dirençli olduğu bildirilen tavuklarla benzerlik göstermesi, bu ırkın *Salmonella* gibi hastalıklara dirençli olma ihtimalini güçlendirmektedir.

Denizli tavuk ırkı, yumurta verimi ve et kalitesi açısından yüksek verime sahip New Hampshire ırkına renk ve cüsse bakımından benzerlik göstermektedir. Ayrıca, beyaz yumurtacı tavuklarının yüksek derecede patojenik kuş gribi H7N1 virüsüne karşı kısmen dirençli olduğu ve yüksek polimorfik bölgeye sahip olduğu bildirilmiştir (Sironi vd. 2008). Yerli tavuk ırkları olan Denizli ve Gerze, yapılan polimorfizm analizlerinde WH (White) ile yakın kümede yer almış olup, bu iki ırkın patojenik kuş gribine karşı dirençli olma potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

Bu doktora tez çalışmasında, tavuk eritrositlerinde *ChTLR*'lerin transkriptleri tespit edilmiş olmasına rağmen, bu reseptörlerin ifadesi henüz tam olarak belirlenememiştir. Poli I:C ve sentetik B sınıfı CpG ODN 2007 varlığında TLR ligandları ile uyarılmaya karşı tepkiler belirlenememiştir. Bu çalışmada, yerli tavuk ırkları Denizli ve Gerze'de *TLR3, TLR4, TLR5* ve *TLR15*'in çeşitli hastalık ligandları ile bağışıklık sisteminde genetik ekspresyonu kontrol eden reseptörlerin immünolojik rolü araştırılmaktadır. Pattern tanıma reseptörleri olan TLR'ler, yapısal olarak korunmuş patojenler ile ilişkili paternleri tanımaktadır. Paul vd. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, *ChTLR3*'ün transkriptlerinin ekspresyonu bildirilmiş ve çift sarmallı RNA'nın sentetik analoğu olan poli I:C ile IFN-α transkriptlerinin düzenlendiği belirtilmiştir. Çalışmamızda, benzer şekilde, *ChTLR3*'ün poli I:C varlığında ekspresyonunun hem 1. saatte hem de 3. saatte yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Tavuk ırkları arasında yapılan *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* amino asit sekans analizi sonucunda, sırasıyla 9, 9, 10 ve 11 polimorfik bölgeye sahip oldukları tespit edilmiştir. *TLR3* genindeki bir polimorfizmin hepatit B virüsü enfeksiyonu, kronik hepatit C ve idiyopatik pulmoner fibrozise duyarlılıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Al-Qahtani vd. 2012; Ruan vd. 2015). Literatür çalışmalarında, insanlarda viral RNA'yı tanıma yeteneği bakımından *TLR3*'e benzeyen *TLR7*'deki polimorfizmlerin, kronik hepatit C gibi viral hastalıklara karşı duyarlılık ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Schott vd. 2007). *TLR3* ve *TLR7* polimorfizminin, çeşitli virüslere karşı konak tepkileri üzerinde daha derin bir etkiye sahip olabileceği ve bunun viral hastalık direnci ya da duyarlılığı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Ruan vd. 2015).

ChTLR4 reseptör genlerinin tavuklarda *Salmonella* ve suşlarının tanınmasında rol oynadığı ve bu reseptörün sahip olduğu polimorfizmin, S. *enteritidis*'e karşı Malezya yerli tavuklarının dirençli olduğunu bildiren bir çalışma bulunmaktadır (Tohidi vd. 2012). Çalışmada, *ChTLR4*'ün hem genomik hem de protein düzeyinde polimorfik olduğu, ayrıca hücre kültürü sonrası farklı süre ve ligand uygulamalarında RNA gen ekspresyon düzeylerinin her iki ırkta da yüksek olduğu belirlenmiştir. Kuş *TLR5*'in, insan *TLR5*'e kıyasla S. *typhimurium* flagellin'e karşı daha güçlü bir proinflamatuar yanıt verdiği bildirilmiştir (Keestra vd. 2008). Polimorfik olan *ChTLR5*, PAMP'lerin tanınmasında ve bağışıklık tepkilerinin başlatılmasında önemli roller oynayabilir. Amino asitlerdeki farklılıklar, proteinin yapısındaki küçük değişikliklerle ligand-reseptör bağlanmasının değişmesine yol açabilir (de Zoete vd. 2010; Ruan vd. 2012b).

Çalışmada elde edilen *ChTLR15*'in polimorfik amino asitleri arasında E158K, D165N, A191P, E217K ve E309A yer almaktadır. Ruan ve arkadaşları (2012), bu reseptörün hücrede ekstraselüler membranda yer aldığını ve L332F'nin sitoplazmik alanda bulunduğunu bildirmiştir. Amino asitlerdeki polimorfik bölgelerin çoğunun N-terminal alanının distal üçte birinde yer alması, *ChTLR15*'in tanıma işlevini etkileyebileceğini düşündürmektedir (Ruan vd. 2012a).

TLR'ler için ligandlar, belirli bakteri ve virüslerin genetik materyallerinde bulunan CpG DNA motiflerini içermektedir (Akira 2004; Akira vd. 2006; Keestra vd. 2010; Keestra vd. 2013). Bu motifler bir kez uyarıldığında, *TLR*'ler hücresel olarak aktive olur ve sitokin üretimine yol açar (Medzhitov 2001). Hücre kültürü ortamında sentetik ODN varlığında bakteriyel hastalıklarla ilişkilendirilen *ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* reseptörlerinin gen ekspresyon seviyelerinin, yüksek konsantrasyonlu kültürün 3. saatinde yüksek olması, eritrositlerde muhtemel sitokin üretimini artırmış olabilir. Bu da polimorfizm sonucu oldukça polimorfik olan reseptörlerin birbirini destekler nitelikte olduğunu göstermektedir.

Tavuk üreme sistemi dokuları, farklı *ChTLR* ve kanatlı beta-defensin (avian beta-defensins, AvBDs) algılayan antimikrobiyal peptidleri içermektedir (Li vd. 2017; Wigley vd. 2021). *TLR*'ler ve ligandlar arasındaki etkileşim, proinflamatuar sitokinlerin ve AvBD gibi konak savunma moleküllerinin sentezlenmesinde rol oynamaktadır (Sonoda vd. 2013; Taha-Abdelaziz vd. 2017). Tavuklarda 14 AvBD bulunmakta (Zhang vd. 2020) ve bunlardan 11'i üreme sisteminde ifade edilmektedir (Abdelsalam vd. 2012). Yumurtalıklarda AvBD'lerin ifade seviyesi kademeli olarak artmakta ve bu sentez, *Salmonella enteritidis* (SE) enfeksiyonuna yanıt olarak da artabilir (Michailidis vd. 2011). Ayrıca, AvBD'ler lipopolisakkarit (LPS) ile tedavi sonrası da ifade seviyelerinde düzenleme gösterebilir (Rengaraj vd. 2018). Yumurtalıklarda AvBD'ler ifade edilmekte (Yoshimura 2015) ve LPS ile stimüle edilmesi, yumurta kanallarındaki ifadelerini artırırken, CpG-ODN'nin interlökin (IL)-1B üretimini artırarak yanıt oluşumuna katkı sağlar (Sonoda vd. 2013).

ChTLR4'ün polimorfizmi, tavuklarda *Salmonella typhimurium*'a karşı direncin, bakteri ile aşılamadan 7 gün sonra yüksek oranda olduğunu göstermektedir (Leveque vd. 2003). Bakteri kaynaklı bir protein olan LPS, *ChTLR4* sinyal iletim yoluyla makrofajların aktive edilmesini sağlar (Lorenz vd. 2002). S. *enteritidis*, LPS ile makrofaj hücresinin yüzeyinde bulunan reseptör CD14 ile temasa geçerek *TLR*-4/MD-2 kompleksini uyarır ve sinyal üretiminde rol oynar (Carvajal vd. 2008). Literatür araştırmaları, hücre

yüzeyindeki MD-2 proteininin LPS'yi *TLR4*'e bağladığını bildirmiştir (Shimazu vd. 1999) ve MD-2 geninin tavuklarda hastalık direnci ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Malek vd. 2004). Yerli tavuk ırklarımızda bir polisakkarit olan poli I:C'nin her iki ırkta yüksek ekspresyon göstermesi ve polimorfizm açısından oldukça zengin olması, *ChTLR4* bakımından S. *typhimurium*'a karşı dirençli olabileceklerini düşündürmektedir.

4.4.2. Tavuklarda farklı konsantrasyonda hazırlanan poli I:C uygulama sonrası TLR genlerin ifade seviyelerinin incelenmesi

Polinosinik-polisitidilik asit (poli I:C), bir dsRNA analoğu olup, dendritik hücreler, bağırsak epitel hücreleri ve fibroblastlar gibi birçok hücrede NF-κB ve IRF3'ün aktive olmasıyla tip I ve tip II interferonları (IFN) indüklemektedir (Matsumoto vd. 2004). Anti-influenza özelliği ile poli I:C TIR domaini IFN-β sinyal yoluyla uyararak tip I interferonların (IFN-α ve IFN-β) üretimini sağlamaktadır. Tip I interferonlar, virüs transkripsiyonunu ve viral proteini inhibe etme, enfekte olan hücre ölümlerini destekleme ve antijen hücrelerini aktive etmek gibi birçok anti-viral işleve sahiptirler (Akira ve Takeda 2004). Akira ve Takeda poli I:C ile tedavi edilen tavukların akciğerlerinde tip I IFN'lerin ifadesinde artış gözlendiği ve tavukları influenza virüslerine karşı koruduğunu bildirmişlerdir. Gerze ve Denizli tavuk ırklarının eritrosit hücrelerinin hücre kültürü ortamında, farklı süre ve konsantrasyonlarda hazırlanan poli I:C ortamına ait cDNA numunelerine yönelik RT-qPCR RNA gen ifade analizi dört reseptöre ait primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir (EK-25-39). Buna göre, hem 1. saat hem de 3. saat sonunda, poli I:C 10 µg ve poli I:C 50 µg gruplarında dört reseptörde önemli ölçüde ifade artışı gözlemlenmiştir. Her iki tavuk ırkında viral hastalıklarla ilişkilendirilen *ChTLR3*, 1. saatte (poli I:C 10 µg) yüksek ifade edilmiştir. Üçüncü saat sonunda düşüş olsa da ekspresyon seviyeleri literatürde (Ruan vd. 2013) bildirilenlerle benzer sonuçlar göstermiştir ($P<0.05$).

Bakteriyel hastalıklarla ilişkilendirilen *ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* her iki ırkta hem süreye hem de farklı konsantrasyonlara bağlı olarak birbirine yakın RNA gen ekspresyon seviyeleri göstermiştir ($P<0.05$). *Salmonella enteritidis* ve *Streptococcus* gibi bakterilere karşı direnç ile ilişkilendirilen *ChTLR4*, kontrol grubuna kıyasla her iki tavuk ırkında da 1. saatte (poli I:C 10 µg) yüksek ifade edilmiştir ($P<0.05$). Üçüncü saat sonunda (poli I:C 50 µg) kısmi bir düşüş olsa da kontrol muamele gruplarına kıyasla ekspresyon seviyeleri önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Kanatlı influenza virüsüne poli I:C uygulaması sonrası hastalık belirtisinin azaldığı ve *ChTLR4*'ün ifade seviyesinde artış gözlendiği Barjesteh vd. (2014) bildirmişlerdir. Tavuklara ligand uygulama sonrası TLR ekspresyon seviyesinde artış olduğu ve aynı zamanda hücrede viral replikasyonunun azaldığı bildirilmiştir (Barjesteh vd. 2014). Çalışmada *in vitro* hücre kültürü sonrası eritrositlerde farklı konsantrasyonlarda uygulanan poli I:C'nin mRNA gen ekspresyonu süre bakımından incelendiğinde *ChTLR4*'ün ifade seviyesi Barjesteh vd. ile benzer bulunmuştur.

Literatür çalışmalarında *ChTLR15* hem bakteriyel hem de antiviral immün yanıtta önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir. Örneğin, *in vivo* olarak Marek hastalığı virüsüyle enfekte tavukların dalaklarında bu reseptörün gen ekspresyonunun enfeksiyondan sonraki 28. günde önemli ölçüde düşük ifade edildiği, buna karşılık bursa fabricius'ta *ChTLR3* ve *ChTLR15* gen ekspresyonunun enfeksiyondan 7. ve 4. günlerde ifade seviyesinin yüksek olduğu rapor edilmiştir (Zhou vd. 2013). Ayrıca bakteriyel flagellin tanıma özelliğine

sahip *ChTLR5,* çalışmada kontrol grubuna kıyasla her iki tavuk ırkında da 1. saatte (poli I:C 10 µg) yüksek ifade edilmiştir (P<0.05). Üçüncü saat sonunda (poli I:C 50 µg) bir düşüş gözlemlense de ekspresyon seviyeleri yine önemli ölçüde yüksek olmuştur. Kuşlara özgü *ChTLR15*, 1. saatte Gerze tavuk ırkında Denizli ırkına göre daha yüksek RNA gen ekspresyonu gösterirken, 3. saatte Denizli ırkının RNA gen ekspresyonu, Gerze ırkına kıyasla daha yüksek ifade edilmesi Zhou vd. ile ifade seviyesi benzer bulunmuştur.

4.4.3. Tavuklarda farklı konsantrasyonlarda hazırlanan sentetik B sınıfı CpG ODN 2007 uygulama sonrası *TLR* genlerinin ifade seviyelerinin incelenmesi

İmmün adjuvanları olan CpG-ODN, patojenlere karşı direnç artırma, kanser terapisi ve anti-alerjenler gibi çeşitli terapötik amaçlar için kullanılmaktadır (Akira ve Takeda 2004). Sentetik B sınıfı CpG ODN 2007, bir dsRNA analoğu olarak, yerli Gerze ve Denizli tavuk ırklarının farklı süre ve konsantrasyonlarda hazırlanan medyumda, 41°C ve %5 CO2 ortamında inkübe edilmesinin ardından, cDNA örneklerine ait gen ifade seviyelerinin analizi RT-qPCR yöntemiyle 5 çift primer kullanılarak gerçekleştirilmiştir (P<0.05).

Tavuklarda yüksek ölümlere yol açan ve zoonoz özellik gösteren *Salmonella Enterica*, yumurta ve et yoluyla insanlara hızla bulaşabilmektedir (Anastasiadou vd. 2011). S. *Enterica*'nın yumurta kanalı aracılığıyla tavuk ovaryumuna bulaşması ve burada ilk immün savunma hattının TLR'ler aracılığıyla başlatılması, bakteriyel hastalıkların tespitinde önemli bir rol oynamaktadır. S. *Enterica* kaynaklı hastalıklar, tavuklarda *TLR4* ve *TLR5* bakteriyel flagelini tanırken (Suryohastari vd. 2024), *TLR15* ve *TLR21* ise CpG-ODN'yi tanıma sürecinde görev almaktadır (Li vd. 2017; Suryohastari vd. 2024). Suryohastari vd. *in vivo* olarak tavuk üreme kanalına sentetik CPG-ODN'nin muamelesi sonrası jejunum ve yumurta kanalında SE (Salmonella enteritidis) AvBD5 ve AvBD11 ifade seviyesinde önemli derecede artış olduğunu bildirilmişlerdir. Çalışmada farklı konsantrasyonlarda kullanılan sentetik B sınıf CPG-ODN tavuklarda ifade seviyesi Suryohastari vd. ile benzer bulunmuş ve gelecekte yerli ırklarımızda *in vivo* çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

Çalışmada, yerel Gerze ve Denizli tavuk ırklarına ait kandan, Histopaque yardımıyla plazma ve primer kan hücrelerinden ayrılmış eritrosit hücrelerinin inkübasyon sonrası cDNA örneklerine ait RT-qPCR RNA gen ifade analizi, sentetik B sınıfı CpG ODN 2007 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Burada, referans endojen gen ve dört reseptöre ait primerler kullanılmıştır (EK-25-38). RNA gen ekspresyon seviyeleri logaritmik olarak hesaplanan ve elde edilen tabloda, yerel tavuk ırklarımız Denizli ve Gerze için hem 1. saat hem de 3. saat sonunda (CpG ODN 5 µg ve CpG ODN 10 µg) inkübe edilen gruplarda dört reseptörde önemli ölçüde ifade artışı gözlemlenmiştir (P<0.05). Her iki tavuk ırkında, virüs kaynaklı hastalıklarla ilişkilendirilen *ChTLR3,* 1. saatte (CpG ODN 5 µg) Denizli ırkında Gerze'ye kıyasla daha yüksek ifade edilmiştir (P<0.05). Üçüncü saat sonunda ise her iki ırkta RNA ekspresyon seviyeleri birbirine yakın bulunmuştur. Bu oranlar, literatürle (Paul vd. 2013) benzer sonuçlar göstermiştir (P<0.05).

Bakteriyel hastalıklarla ilişkilendirilen *ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15,* her iki ırkta sentetik B sınıfı CpG ODN 2007 için hem süreye hem de farklı konsantrasyonlara bağlı olarak benzer RNA gen ekspresyon seviyeleri sergilemiştir (P<0.05). *Salmonella*

enteritidis ve *Streptococcus* gibi bakterilere karşı dirençle ilişkilendirilen *ChTLR4,* kontrol grubuna kıyasla her iki tavuk ırkında da 1. saatte (CpG ODN 5 µg) yüksek ifade edilmiştir (P<0.05). Üçüncü saatte ise (CpG ODN 10 µg), birinci saatteki seviyelere kıyasla daha düşük olmasına rağmen, ekspresyon seviyeleri hala önemli ölçüde yüksek bulunmuştur.

Bakteriyel flagellini tanıyan *ChTLR5*, kontrol grubuna kıyasla Gerze ırkında Denizli'den 1. saatte (CpG ODN 5 µg) daha yüksek ifade edilmiştir (P<0.05). Üçüncü saat sonunda (CpG ODN 10 µg) bir düşüş gözlemlense de Gerze ırkında ekspresyon seviyeleri Denizli ırkına göre daha yüksek bulunmuştur. Kuşlara özgü olan *ChTLR15,* 1. saatte (CpG ODN 5 µg) Gerze tavuk ırkında Denizli ırkına oranla daha yüksek RNA gen ekspresyonu gösterirken, 3. saat sonunda (CpG ODN 10 µg) Gerze ırkının RNA gen ekspresyonu, Denizli ırkına kıyasla daha yüksek eksprese olmuştur (P<0.05).

Tüm bu bulgular ışığında, Denizli ve Gerze tavuk ırklarının genetik polimorfizm, protein polimorfizmi ve hücre kültürü sonrası eritrosit hücrelerinde RNA gen ekspresyonu bakımından önemli bilgiler sunduğu görülmüştür. Genetik polimorfizm analizinde, Denizli ve Gerze tavuklarının birbirine yakın kümeler oluşturması ve literatürde hastalıklara karşı dirençli oldukları bildirilen ırklarla yakın kümelerde yer alması, incelenen *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* reseptörlerinin hastalıklara karşı dirençli olma potansiyelini desteklemektedir. Ayrıca, protein düzeyinde polimorfik amino asitler bulunması bu bulguyu pekiştiren anlamlı veriler sunmuştur. Hücre kültürü sonrası, tavuk eritrositlerinde bu reseptörlere ait ligand uygulamaları sonrası RNA ekspresyon seviyeleri de anlamlı bulunmuş ve Denizli ve Gerze tavuklarıyla yapılacak ileriki çalışmalara yönelik önemli bilgiler sağlamaktadır.

5. SONUÇLAR

Günümüzde modern hayvan yetiştiriciliğinde bulaşıcı hastalıklar, besi ve çiftlik hayvanlarının sağlığını olumsuz etkileyerek hayvansal ürünlerin performansını ve kalitesini düşürmekte, dolayısıyla ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Son yıllarda hastalıklara karşı dirençliliğin önemi artmış ve özellikle yerel ırkların bu konudaki özellikleri daha fazla ilgi odağı olmuştur (Liu vd. 2011; Musako ve Abolnik 2012; Nawab vd. 2019; Simbizi vd. 2021; Sumantri vd. 2020). Kapalı ve açık alanlarda yetiştirilen tavukların sağlığını tehdit eden mikroorganizmalar, bakteri, mantar ve virüs kaynaklı olabilmekte ve bu hastalıkların kontrolü hem zor hem de ekonomik olarak maliyetli olabilmektedir. Hastalıklarla mücadelede önemli bir role sahip olan kanatlı bağışıklık sisteminin, zorlu iklim ve çevre koşullarına başarılı bir şekilde adapte olan yerel tavuk ırklarında ticari ırklara kıyasla daha dirençli olduğu düşünülmektedir.

Artan dünya nüfusu ile birlikte hızla büyüyen kanatlı sektörü, yüksek et ve yumurta verimine sahip ticari hibrit tavuklara olan talebi artırmıştır. Bu durum, dünya genelinde kırsal kesimlerde küçük aile işletmelerine katkı sağlayan yerel tavuk ırklarının sayısında ciddi azalmaların yaşanmasına ve yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmalarına neden olmuştur. Bununla birlikte, değişen tüketici talepleri doğrultusunda doğal ve yerel yöntemlerle üretilen tavuk ürünlerine olan ilginin artması, düşük verim özelliklerine sahip yerel ırklara yeniden rağbet gösterilmesini sağlamıştır. Bu gelişmeler, ülkelerin yerel tavuk ırklarını koruma altına alma, ticari ıslah programlarına dahil etme ve tarım turizmi gibi çeşitli alanlarda kullanımını artırma çalışmalarını hızlandırmıştır. Yerel tavuk ırklarının sahip olduğu özelliklerin araştırılmasında moleküler düzeyde NGS (DNA/RNA-dizileme), GWAS ve DNA mikroçip teknolojileri gibi yöntemler, bu ırkların verim ve hastalık direnci genlerinin belirlenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kanatlı sektöründe hayvansal üretimin artırılabilmesi için adaptasyon gücü yüksek, zorlu çevre koşullarına ve çeşitli hastalıklara dirençli ırkların genetik potansiyellerinin ortaya konulması gerekmektedir (Mpenda vd. 2019). Tercih edilmeyen yerel ırkların neslinin devam ettirilmesinin mümkün olmayacağı ve yok olma tehlikesi ile karşı karşıya kalacağı öngörülmektedir. Adaptasyon gücünün yüksek olması, düşük yem tüketimi ve yumurta verimi gibi özelliklerinden dolayı yerel ırklar, küçük aile işletmeleri tarafından daha fazla tercih edilmektedir. Ancak günümüzde geleneksel hibrit kümes hayvanı yetiştiriciliği, yerel ırkların yerini hızla almaktadır. Yerli ırkların toplu olarak itlaf edilmesi gibi durumlar, özellikle pandemiler sırasında bu süreci hızlandırmış ve hem dünya genelinde hem de Türkiye'de yerel ırkların sayısında ciddi azalmalar yaşanmıştır.

Lalahan Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü (TOB LHMAE) tarafından yerli tavuk ırklarımız Denizli ve Gerze'nin sürdürülebilir yetiştiriciliği için stratejiler geliştirilmiştir. Bu stratejilerin başında, bu ırkların et lezzeti, uzun ötüş ve hastalıklara dirençlilik gibi üstün özelliklerinin araştırılması ve geliştirilmesine yönelik ıslah çalışmaları gelmektedir. Bu bağlamda, Denizli ve Gerze tavuk ırklarının hastalıklara direnç özelliklerinin moleküler ve gen ifade düzeyinde araştırılması, mevcut verim özelliklerinin iyileştirilmesi ve bu ırklara ticari ve kültürel katma değer kazandırılması büyük önem taşımaktadır.

Yapılan analizlerde, yerli Denizli ve Gerze tavuk ırklarında bakteriyel ve viral hastalıklarla ilişkilendirilen *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* reseptörlerinin ifade düzeylerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, söz konusu ırkların hayvan ıslahı çalışmalarında kullanılabileceğini göstermektedir. Amino asit düzeyindeki polimorfizmin yüksek olması, tavuk ırkları arasında bakteriyel ve viral hastalıklara karşı farklı direnç düzeylerine sahip olma potansiyelini ortaya koymakta ve gelecekte yapılacak çalışmalara öncül olma niteliği taşımaktadır.

Bu amaçla, tescilli yerel ırklarımız Denizli ve Gerze'nin katma değer sağlayacak özelliklerinin incelendiği bu doktora tez çalışmasında, tavuklarda önemli ekonomik kayıplara neden olan bakteri ve virüs kaynaklı hastalıklarla güçlü bir şekilde ilişkilendirilen *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* reseptörlerinin ifade düzeyleri ve polimorfizmleri incelenmiştir. Tavuklarda hastalık direnci ve hassasiyeti ile ilişkilendirilen bu reseptörlerin araştırılması, ülkemizdeki yerel tavuk ırklarının üstün özelliklerinin ortaya çıkarılmasını ve bu özelliklerden yararlanılarak ticari potansiyellerinin artırılmasını sağlayacaktır. Ayrıca, arka bahçe yetiştiriciliğinin yaygınlaştırılması için yapılan çalışmaların desteklenmesi gerekmektedir.

Dünya genelinde küresel boyutta kanatlı endüstrisini tehdit eden başlıca hastalıklardan marek hastalığı, kuş gribi, newcastle, infeksiyöz bursal hastalığı, salmonella ve enfeksiyöz bronşit gibi hastalıklar tavuklarda ciddi akut, göz, solunum ve sindirim sistemi rahatsızlıklarına yol açmaktadırlar. Adaptasyon gücü yüksek yerli tavuk ırklarında hastalık direncinin belirlenmesi gibi çalışmaların yürütülmesi büyük önem taşımaktadır. Hastalık direnci ile ilişkilendirilen toll reseptörlerinin yerli tavuk ırklarında bu reseptörlerin korunmuş polimorfik özelliklerinin ortaya çıkarılması ve ileri moleküler analizlerle hücresel düzeyde incelenip gen ifade seviyelerinin ortaya çıkarılması gerekmektedir.

Kanatlı hayvan hastalıklarının kontrolünde biyo-belirteç potansiyeline sahip olan tavuk *TLR* reseptörleri ve ligandlarının, gelecekte farklı ırklar üzerinde karşılaştırmalı olarak araştırılması büyük önem taşımaktadır. Hayvan yetiştirme programlarında, hastalık direnci ile ilişkili spesifik özellikler hakkında daha fazla veri sağlamak için moleküler düzeyde araştırmaların yapılması gereklidir. Bu bağlamda, viral, bakteriyel ve paraziter hastalıkların popülasyon sağlığı üzerindeki etkileri hakkında yapılacak çalışmalar hem evcil hem de kanatlı hayvan türlerini etkileyen patojenlerin kontrolüne yönelik önemli katkılar sunacaktır.

Sonuç olarak, hastalık direnci mekanizmalarının belirlenmesi amacıyla SNP çalışmaları, hastalıklara dirençli ticari tavuk ıslahı programlarının geliştirilmesi için kritik bir rol oynamaktadır. Türkiye'nin sahip olduğu genetik çeşitliliğin korunması ve bu potansiyelin süs, et, yumurta ve ticari üretim gibi farklı alanlarda kullanımının artırılması gerekmektedir. Bu çalışmada kullanılan *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* reseptör genlerinin, gelecekteki araştırmalarda hastalık direnci bakımından moleküler belirteç olarak kullanılabileceği öngörülmektedir. Ayrıca gelecekte *in vivo* olarak hastalık etmeni ligand ile muamelesinden Denizli ve Gerze ırklarının bakteri ve virüslere karşı bu reseptörlerinin mRNA tepkisinin belirlenmesi gibi çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

Denizli ve Gerze yerli tavuk ırklarının bağışıklık potansiyelini belirlemek, bu ırkları koruma stratejilerine destek sağlamak ve gelecekte yapılacak çalışmalara temel oluşturmak için *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15*'in genetik polimorfizmi, amino asit düzeyinde polimorfizmini ve ligand muamele sonrası hastalıklarla ilişkisini *in vitro* ve *in vivo* olarak yerli ırklar ile birlikte ticari tavukların da incelenmesi bu ırkların potansiyelini belirlemek açısından önemlidir. Ayrıca *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15*'in hücrede sinyal iletim yolağında rol alan moleküllerin (IFN-α ve Tip I IFN gibi moleküller) ifade seviyesini belirlemek için bu reseptörlerin yerli tavuk ırklarındaki genetik potansiyelini anlamak açısından gelecekte yapılacak çalışmalara önemli katkılar sunması beklenmektedir.

Denizli ve Gerze yerli tavuk ırklarının bağışıklık potansiyelini belirlemek amacıyla moleküler olarak *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15*'in genetik polimorfizmini ve protein düzeyinde polimorfik bölgeleri analiz edilmiştir. Ayrıca *in vitro* olarak eritrosit hücrelerinin farklı kosantrasyon ve sürelerde poli I:C ve sentetik B sınıf CPG-ODN *ChTLR3, ChTLR4, ChTLR5* ve *ChTLR15* mRNA ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Bu çalışmanın gelecekte diğer tavuk reseptörleri ile yapılacak çalışmalara öncül niteliği taşımaktadır. Ayrıca gen ekspresyon düzeyinde hem horoz hem de tavuklarda hücre kültürü sonrası ifade seviyesinin yüksek olması ($P<0.05$) gelecekte cinsiyet üzerine *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile desteklenmesi önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

Abasht, B., Kaiser, M. G., & Lamont, S. J. 2008. Toll-like receptor gene expression in cecum and spleen of advanced intercross line chicks infected with Salmonella enterica serovar Enteritidis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 123(3-4), 314-323.

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. 2019. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System, 6e: Sae-E-Book: *Elsevier India*.

Abdelsalam, M., Isobe, N., & Yoshimura, Y. 2012. Effects of lipopolysaccharide and interleukins on the expression of avian β-defensins in hen ovarian follicular tissue. *Poultry Science*, 91(11), 2877-2884.

Abdul-Cader, M. S., Aruna Amarasinghe, and Mohamed Faizal Abdul-Careem. 2016. Activation of toll-like receptor signaling pathways leading to nitric oxide-mediated antiviral responses. *Archives of virology* 161, 2075-2086.

Adams, G. 2020. A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, 42(3), 48-53.

Aderem, A., & Ulevitch, R. J. 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406(6797), 782-787.

Ağaoğlu, Ö. K., & Sidekli, Ö. 2020. Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) Çalışmalarında Uygun Housekeeping Genlerin (HKGs) Seçimi ve Validasyonu. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(1), 76-83.

Ahmadian, A., Ehn, M., & Hober, S. 2006. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clinica chimica acta*, 363(1-2), 83-94.

Ahmed, F. E., Gouda, M. M., Hussein, L. A., Ahmed, N. C., Vos, P. W., & Mohammad, M. A. 2017. Role of melt curve analysis in interpretation of Nutrigenomics' MicroRNA expression data. *Cancer genomics & proteomics*, 14(6), 469-481.

Ajibike, A. B., Adeleye, O. O., Ilori, B. M., Osinbowale, D. A., Adeniyi, O. A., Durosaro, S. O., . . . Adebambo, A. O. (2017). Genetic diversity, phylogeographic structure and effect of selection at the mitochondrial hypervariable region of Nigerian chicken populations. *Journal of genetics*, 96, 959-968.

Akira, S. 2004. Toll receptor families: structure and function. *Semin Immunol*., 16, 1-2.

Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801.

Aksoy, T., Narinç, D., & Aygün, A. 2022. Dünyadaki Çalışmalar Işığında Denizli Yerli Tavuk Irkı. Hayvansal Üretim, 63(1), 75-83.

Al Mamun, M., Islam, K., & Rahman, M. 2019. Occurrence of poultry diseases at Kishoregonj district of Bangladesh. *MOJ Proteom. Bioinform*, 8, 7-12.

Alan, A., Onuk, B., Alan, E., & Kabak, M. 2020. Light and electron microscopic studies on the pecten oculi showing blood–retina barrier properties in Turkey's native Gerze chicken. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 49(4), 478-485.

Al-Qahtani, A., Al-Ahdal, M., Abdo, A., Sanai, F., Al-Anazi, M., Khalaf, N., ... & Almajhdi, F. N. 2012. Toll-like receptor 3 polymorphism and its association with hepatitis B virus infection in Saudi Arabian patients. *Journal of medical virology*, 84(9), 1353-1359.

Al-Rubeai, Mohamed, … (ed.). 2015. Animal cell culture.

Ambardar, S., Gupta, R., Trakroo, D., Lal, R., & Vakhlu, J. 2016. High throughput sequencing: an overview of sequencing chemistry. *Indian journal of microbiology*, 56, 394-404.

Anastasiadou, M., & Michailidis, G. 2016. Transcriptional changes of cytokines in rooster testis and epididymis during sexual maturation stages and Salmonella infection. Animal reproduction science, 171, 41-48.

Anastasiadou, M., Avdi, M., & Michailidis, G. 2013. Expression of avian β-defensins and Toll-like receptor genes in the rooster epididymis during growth and Salmonella infection. Animal reproduction science, 140(3-4), 224-231.

Anastasiadou, M., Theodoridis, A., Avdi, M., & Michailidis, G. 2011. Changes in the expression of Toll-like receptors in the chicken testis during sexual maturation and Salmonella infection. *Animal reproduction science*, 128(1-4), 93-99.

Anderson, K. L., Brewer, M. T., Rasmussen, M. A., & Carlson, S. A. 2015. Identification of heritage chicken breeds with diminished susceptibility to intestinal colonization by multiple antibiotic-resistant Salmonella spp. *Livestock Science*, 182, 34-37.

Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics*, 5(2), 209-219.

Atasoy, F. 2000. Bir Denizli Tavuğu Sürüsünde Canli Ağirlik ve Yumurta Ağirliği Özellikleri. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 47(03), 265-269.

Atasoy, F., & Gürcan, İ. 2000. The characteristics of body weight and egg weight in a Denizli hen flock. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 47(3), 265-269.

Ballingall, K. T., Rocchi, M. S., McKeever, D. J., & Wright, F. 2010. Trans-species polymorphism and selection in the MHC class II DRA genes of domestic sheep. *PLoS One*, 5(6), e11402.

Barjesteh, N., Alkie, T. N., Hodgins, D. C., Nagy, É., & Sharif, S. 2016. Local innate responses to TLR ligands in the chicken trachea. *Viruses*, 8(7), 207.

Barjesteh, N., Taha-Abdelaziz, K., Kulkarni, R. R., & Sharif, S. 2019. Innate antiviral responses are induced by TLR3 and TLR4 ligands in chicken tracheal epithelial cells: Communication between epithelial cells and macrophages. *Virology*, 534, 132-142.

Bayraktar, E., Umar, S., Yilmaz, A., Turan, N., & Yilmaz, H. 2019. Current scenario of viral diseases in Turkish poultry industry. *World's Poultry Science Journal*, 75(4), 515-534.

Beacon, T. H., & Davie, J. R. 2021. The chicken model organism for epigenomic research. *Genome*, 64(4), 476-489.

Bener, L. 2018. Farklı Sıcaklıklarda *in vitro* Olgunlaştırılan Sığır Oositlerinde Isı Şok Proteini 70'in Belirlenmesi, *Yüksek lisans tezi*, Samsun, 84 s.

Bener, L., & Özdemir, D. 2018. Hayvancılıkta Üç Boyutlu Hücre Kültürü, Avantaj ve Dezavantajları. *International Conference on Multidisciplinary Sciences At: İstanbul.*

Bener, L., Ersal, M., & Yıldız, B. İ. 2019. The comparison of various real time PCR chemistries used in detection and quantification of genetically modified organisms. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7, 133-137.

Bener, L., Ozdemir, D. 2020. The Role of Toll-Lıke Receptors (Tlrs) in Antıvıral Mechanısm of Chıckens. *IV. International Congress on Domestic Animal Breeding, Genetics and Husbandry* - 2020 (ICABGEH-20), 12 – 14 AUGUST 2020, 141-145.

Bentley, D. R. 2000. The human genome project—an overview. *Medicinal research reviews*, 20(3), 189-196.

Berndt, A., Wilhelm, A., Jugert, C., Pieper, J., Sachse, K., & Methner, U. 2007. Chicken cecum immune response to Salmonella enterica serovars of different levels of invasiveness. *Infection and immunity*, 75(12), 5993-6007.

Besbes, B., Tixier-Boichard, M., Hoffmann, I., & Jain, G. 2007. Future trends for poultry genetic resources. Paper presented at the Proceedings of the International conference of poultry in the 21st century: *Avian influenza and beyond*. (pp. 5-7).

Beutler B, R. M. 2002. Evolution of the TIR, tolls and TLRs:functional inferences from computational biology. *Curr Top Microbiol Immunol* 270:1–21.

Beutler, B. 2005. The Toll-like receptors: analysis by forward genetic methods. *Immunogenetics*, 57(6), 385-392.

Bhadouriya, S., Sharma, B. K., Kakker, N. K., & Chhabra, R. 2019. Toll like receptors and cytokines as immunostimulatory adjuvants in poultry vaccines: Current status and future trends. *World's Poultry Science Journal*, 75(3), 417-428.

Bílková, B., Bainová, Z., Janda, J., Zita, L., & Vinkler, M. 2017. Different breeds, different blood: cytometric analysis of whole blood cellular composition in chicken breeds. *Veterinary immunology and immunopathology*, 188, 71-77.

Boltz, D. A., Zimmerman, C. R., Nakai, M., Bunick, D., Scherba, G., & Bahr, J. M. 2006. Epididymal stone formation and decreased sperm production in roosters vaccinated with a killed strain of avian infectious bronchitis virus. Avian diseases, 50(4), 594-598.

Boyd, A. C., Peroval, M. Y., Hammond, J. A., Prickett, M. D., Young, J. R., & Smith, A. L. . 2012. TLR15 is unique to avian and reptilian lineages and recognizes a yeast-derived agonist. *The Journal of Immunology*, 189(10), 4930-4938.

Breiman, A., Grandvaux, N., Lin, R., Ottone, C., Akira, S., Yoneyama, M., ... & Meurs, E. F. 2005. Inhibition of RIG-I-dependent signaling to the interferon pathway during hepatitis C virus expression and restoration of signaling by IKKε. *Journal of virology*, 79(7), 3969-3978.

Brennan, J. J., & Gilmore, T. D. 2018. Evolutionary origins of toll-like receptor signaling. *Molecular biology and evolution*, 35(7), 1576-1587.

Broom, L. J., & Kogut, M. H. 2019. Deciphering desirable immune responses from disease models with resistant and susceptible chickens. *Poultry science*, 98(4), 1634-1642.

Brownlie, R., & Allan, B. 2011. Avian toll-like receptors. *Cell and tissue research*, 343, 121-130.

Brzinsky-Fay, C., & Kohler, U. 2010. New developments in sequence analysis. In (Vol. 38, pp. 359-364): *Sage Publications Sage CA*: *Los Angeles*, CA.

Buh Gašparič, M., Cankar, K., Žel, J., & Gruden, K. 2008. Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms. *BMC biotechnology*, 8, 1-12.

Bumstead, N., Reece, R. L., & COOK, J. K. 1993. Genetic differences in susceptibility of chicken lines to infection with infectious bursal disease virus. *Poultry science*, 72(3), 403-410.

Burns, M., & Valdivia, H. 2008. Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR. *European Food Research and Technology*, 226, 1513-1524.

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., . . . Shipley, G. L. 2009. The MIQE Guidelines: M inimum I nformation for Publication of Q uantitative Real-Time PCR E xperiments. In: *Oxford University Press*.

Çanta, F., & İsmail, O. 2004. Çiftlik hayvanı genetik kaynaklarının korunması ve kullanımı için yapılan küresel çabalar. *Hayvansal Üretim*, 45(1).

Cargill, E., & Womack, J. 2007. Detection of polymorphisms in bovine toll-like receptors 3, 7, 8, and 9. *Genomics*, 89(6), 745-755.

Carvajal, B. G., Methner, U., Pieper, J., & Berndt, A. 2008. Effects of Salmonella enterica serovar Enteritidis on cellular recruitment and cytokine gene expression in caecum of vaccinated chickens. *Vaccine*, 26(42), 5423-5433.

Cendron, F., Mastrangelo, S., Tolone, M., Perini, F., Lasagna, E., & Cassandro, M. 2021. Genome-wide analysis reveals the patterns of genetic diversity and population structure of 8 Italian local chicken breeds. *Poultry science*, 100(2), 441-451.

Chang, C.-S., Chen, C., Berthouly-Salazar, C., Chazara, O., Lee, Y., Chang, C., . . . Tixier-Boichard, M. 2012. A global analysis of molecular markers and phenotypic traits in local chicken breeds in Taiwan. *Animal genetics*, 43(2), 172-182.

Chang, J.-S., Russell, G. C., Jann, O., Glass, E. J., Werling, D., & Haig, D. M. 2009. Molecular cloning and characterization of Toll-like receptors 1-10 in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 127(1-2), 94-105.

Chang, J.-S., Russell, G. C., Jann, O., Glass, E. J., Werling, D., & Haig, D. M. 2009. Molecular cloning and characterization of Toll-like receptors 1-10 in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 127(1-2), 94-105.

Cheng, J., Sun, Y., Zhang, X., Zhang, F., Zhang, S., Yu, S., ... & Ding, C. 2014. Toll-like receptor 3 inhibits Newcastle disease virus replication through activation of pro-

inflammatory cytokines and the type-1 interferon pathway. *Archives of virology*, 159, 2937-2948.

Cheng, P., Wang, T., Li, W., Muhammad, I., Wang, H., Sun, X., . . . Zhang, X. 2017. Baicalin alleviates lipopolysaccharide-induced liver inflammation in chicken by suppressing TLR4-mediated NF-κB pathway. *Frontiers in pharmacology*, 8, 547.

Cheng, Y., Ma, J., Liu, Y., Gao, Q., Yan, Y., Wang, H., ... & Sun, J. 2017. Chicken TBK1 interacts with STING and is involved in IFN-β signaling regulation. *Developmental & Comparative Immunology*, 77, 200-209.

Cheong, A., Fountain, S. J., & Beech, D. J. 2009. Quantitative RT-PCR methods for investigation of low copy potassium channel gene expression in native murine arteries. *Potassium Channels: Methods and Protocols*, 19-33.

Chuang, T.-H., & Ulevitch, R. J. 2000. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *European cytokine network*, 11(3), 372-378.

Collins, F. S., Patrinos, A., Jordan, E., Chakravarti, A., Gesteland, R., Walters, L., . . . groups, N. p. 1998. New goals for the US human genome project: 1998-2003. *Science*, 282(5389), 682-689.

Dar, M. A., Mumtaz, P. T., Bhat, S. A., Nabi, M., Taban, Q., Shah, R. A., ... & Ahmad, S. M. 2018. Genetics of disease resistance in chicken. *Application of Genetics and Genomics in Poultry Science*, 163-174.

Davison, T. 2003. The immunologists' debt to the chicken. *British poultry science*, 44(1), 6-21.

De Spiegelaere, W., Dern-Wieloch, J., Weigel, R., Schumacher, V., Schorle, H., Nettersheim, D., . . . Vandekerckhove, L. 2015. Reference gene validation for RT-qPCR, a note on different available software packages. *PLoS One*, 10(3), e0122515.

de Zoete, M. R., Keestra, A. M., Roszczenko, P., & van Putten, J. P. 2010. Activation of human and chicken toll-like receptors by Campylobacter spp. *Infection and immunity*, 78(3), 1229-1238.

Deguine, J., & Barton, G. M. 2014. MyD88: a central player in innate immune signaling. *F1000prime reports*, 6.

Demir, E., Bilginer, U., Balcioglu, M. S., & Karsli, T. 2021. Direct and indirect contributions of molecular genetics to farm animal welfare: a review. *Animal Health Research Reviews*, *22*(2), 177-186.

Dhanasekaran, S., Biswas, M., Vignesh, A. R., Ramya, R., Raj, G. D., Tirumurugaan, K. G., . . . Subbiah, E. 2014. Toll-like receptor responses to Peste des petits ruminants virus in goats and water buffalo. *PLoS One*, 9(11), e111609.

Dingle, T. C., Sedlak, R. H., Cook, L., & Jerome, K. R. 2013. Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances. *Clinical chemistry*, 59(11), 1670-1672.

Duc, H. M., Son, H. M., Honjoh, K.-i., & Miyamoto, T. 2018. Isolation and application of bacteriophages to reduce Salmonella contamination in raw chicken meat. *Lwt*, 91, 353-360.

Dulbecco, R. 1986. A turning point in cancer research: sequencing the human genome. *Science*, 231(4742), 1055-1056.

Egahi, J., Dim, N., Momoh, O., & Gwaza, D. 2010. Variations in qualitative traits in the Nigerian local chicken. *International Journal of Poultry Science*, 9(10), 978-979.

Ekimci, S. Z. 1931. Hüsnitabiat matbaası İstanbul. *Asri Tavukçuluk*.

El-Sabrout, K., Khalil, M., & Shebl, M. 2015. Analysis of Genetic Diversity among Different Egyptian Chicken Strains Using RAPD and SSR Markers. *J. Am. Sci*, 11(8), 11.

Enders, J. F., Weller, T. H., & Robbins, F. C. 1949. Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science*, 109(2822), 85-87.

Ertuğrul, M., Akin, A. O., Yildirir, M., Dellal, G., Togan, İ., Pabuçcuoğlu, S., ... & Özder, M. 2010. Türkiye Çiftlik Hayvanlari Genetik Kaynaklarinin Korunmasi Ve Sürdürülebilir Kullanimi. Türkiye Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı-1, 212.

Escobedo del Bosque, C. I., Busch, G., Spiller, A., & Risius, A. 2020. My meat does not have feathers: Consumers' associations with pictures of different chicken breeds. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 33, 505-529.

Excoffier, L., & Lischer, H. E. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564-567.

Fahdıl, M. 2014. Gerze Tavuk Irkında Mx Geni Polimorfizminin PCR-RFLP Yöntemi ile Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Samsun, 59 S.

Fan, S., Yuan, P., Li, S., Li, H., Zhai, B., Li, Y., . . . Tian, Y. 2023. Genetic architecture and key regulatory genes of fatty acid composition in Gushi chicken breast muscle determined by GWAS and WGCNA. *BMC genomics*, 24(1), 434.

FAO. 2007. The state of Agricultural biodiversity in the livestock sector: Animal genetic resources and resistance to disease. *In* (pp. 101-111).

Food Agricultural Organization, F. F. a. A. 2007. The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. Edi: Barbara Rischkowsky & Dafydd Pilling. Rome. Italy.

Friedberg, E. C. 2016. A history of the DNA repair and mutagenesis field: The discovery of base excision repair. *DNA repair*, 37, A35-A39.

Gast, R. K., & Porter Jr, R. E. 2020. Salmonella infections. *Diseases of poultry*, 717-753.

Gay, N. J., Symmons, M. F., Gangloff, M., & Bryant, C. E. 2014. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nature Reviews Immunology*, 14(8), 546-558.

Gibbs, R. A. 2020. The human genome project changed everything. *Nature Reviews Genetics*, 21(10), 575-576.

Godinez, C. J. P., Layos, J. K. N., Yamamoto, Y., Kunieda, T., Duangjinda, M., Liao, L. M., . . . Nishibori, M. 2022. Unveiling new perspective of phylogeography, genetic diversity, and population dynamics of Southeast Asian and Pacific chickens. *Scientific reports*, 12(1), 14609.

Gou, Z., Liu, R., Zhao, G., Zheng, M., Li, P., Wang, H., ... & Wen, J. 2012. Epigenetic modification of TLRs in leukocytes is associated with increased susceptibility to Salmonella enteritidis in chickens. *PloS one*, 7(3), e33627.

Gryzińska, M., Andraszek, K., & Jocek, G. 2013. DNA methylation analysis of the gene CDKN2B in Gallus gallus (Chicken). *Folia Biologica* (Kraków), 61(3-4), 165-171.

Gu, L.-H., Wu, R.-R., Zheng, X.-L., Fu, A., Xing, Z.-Y., Chen, Y.-Y., . . . Chen, A.-H. 2024. Genomic insights into local adaptation and phenotypic diversity of Wenchang chickens. *Poultry science*, 103(3), 103376.

Gupta, S. K., Deb, R., Dey, S., & Chellappa, M. M. 2014. Toll-like receptor-based adjuvants: enhancing the immune response to vaccines against infectious diseases of chicken. *Expert review of vaccines*, 13(7), 909-925.

Hawn, T. R., Misch, E. A., Dunstan, S. J., Thwaites, G. E., Lan, N. T., Quy, H. T., ... & Aderem, A. 2007. A common human TLR1 polymorphism regulates the innate immune response to lipopeptides. *European journal of immunology*, 37(8), 2280-2289.

He, H., Genovese, K. J., Nisbet, D. J., & Kogut, M. H. 2007. Synergy of CpG oligodeoxynucleotide and double-stranded RNA (poly I: C) on nitric oxide induction in chicken peripheral blood monocytes. *Molecular immunology*, 44(12), 3234-3242.

He, H., Genovese, K. J., Nisbet, D. J., & Kogut, M. H. 2008. Phospholipase C, phosphatidylinositol 3-kinase, and intracellular [Ca2+] mediate the activation of chicken HD11 macrophage cells by CpG oligodeoxynucleotide. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(10), 1111-1118.

He, X., Chen, Y., Kang, S., Chen, G., & Wei, P. 2017. Differential regulation of chTLR3 by infectious bursal disease viruses with different virulence *in vitro* and *in vivo*. *Viral Immunology*, 30(7), 490-499.

Hedegaard, C. J., Lauridsen, C., & Heegaard, P. M. 2017. Journal Browser. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 4, 09Z.

Hess, J. R., & Greenwalt, T. G. 2002. Storage of red blood cells: new approaches. *Transfusion medicine reviews*, 16(4), 283-295.

Higgs, R., Cormican, P., Cahalane, S., Allan, B., Lloyd, A. T., Meade, K., . . . O'farrelly, C. 2006. Induction of a novel chicken Toll-like receptor following Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. *Infection and immunity*, 74(3), 1692-1698.

Higuchi, M., Matsuo, A., Shingai, M., Shida, K., Ishii, A., Funami, K., . . . Seya, T. 2008. Combinational recognition of bacterial lipoproteins and peptidoglycan by chicken

Toll-like receptor 2 subfamily. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(2), 147-155.

Hofmann, T., Schmucker, S. S., Bessei, W., Grashorn, M., & Stefanski, V. 2020. Impact of housing environment on the immune system in chickens: a review. *Animals*, 10(7), 1138.

Holley, R. W., Apgar, J., Everett, G. A., Madison, J. T., Marquisee, M., Merrill, S. H., . . . Zamir, A. 1965. Structure of a ribonucleic acid. *Science*, 147(3664), 1462-1465.

Hoshino, K., Kaisho, T., Iwabe, T., Takeuchi, O., & Akira, S. 2002. Differential involvement of IFN-β in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *International immunology*, 14(10), 1225-1231.

Hosner, P. A., Faircloth, B. C., Glenn, T. C., Braun, E. L., & Kimball, R. T. 2016. Avoiding missing data biases in phylogenomic inference: an empirical study in the landfowl (Aves: Galliformes). *Molecular biology and evolution*, 33(4), 1110-1125. https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.03.021

https://services.healthtech.dtu.dk/ NetSurfP online protein analiz program erişim 28.11.2024

Hu, X., Xu, W., Qin, A., Wu, G., Qian, K., Shao, H., & Ye, J. 2014. Marek's disease virus may interfere with T cell immunity by TLR3 signals. *Veterinary research communications*, 38, 149-156.

Huang, X., Zhou, W., Cao, H., Zhang, H., Xiang, X., & Yin, Z. (2022). Ovarian transcriptomic analysis of Ninghai indigenous chickens at different egg-laying periods. Genes, 13(4), 595.

Hung, L. H., Tsai, P. C., Wang, C. H., Li, S. L., Huang, C. C., Lien, Y. Y., & Chaung, H. C. 2011. Immunoadjuvant efficacy of plasmids with multiple copies of a CpG motif coadministrated with avian influenza vaccine in chickens. *Vaccine*, 29(29-30), 4668-4675. *Vaccine*, 29(29-30), 4668-4675.

Ichinohe, T., Watanabe, I., Ito, S., Fujii, H., Moriyama, M., Tamura, S.-i., . . . Kurata, T. 2005. Synthetic double-stranded RNA poly (I: C) combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *Journal of Virology*, 79(5), 2910-2919.

ihsan Soysal, M., Ünal, E. Ö., & Gürcan, E. K. 2020. Çiftlik Hayvan Genetik Kaynaklarının Koruma ve Sürdürülebilir Kullanımı. *Hayvan Bilimi ve Ürünleri Dergisi*, 3(2), 210-227.

İlhan, D. D., & Muhammet, K. 2022. Denizli ve Gerze Yerli Tavuk Irklarında TVB Lokusundaki Polimorfizmlerin Araştırılması. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(2), 107-112.

İnce, N., Onuk, B., Alan, E., Sizer, S., Alan, A., & Kabak, M. 2018. Anatomical, histological and electron microscopic studies on tunica fibrosa bulbi of Gerze rooster and chickens (Gallus domesticus). *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 7(1), 40-44.

Iqbal, M., Philbin, V. J., & Smith, A. L. 2005a. Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 104(1-2), 117-127.

Iqbal, M., Philbin, V. J., Withanage, G. S. K., Wigley, P., Beal, R. K., Goodchild, M. J., ... & Smith, A. L. 2005b. Identification and functional characterization of chicken toll-like receptor 5 reveals a fundamental role in the biology of infection with Salmonella enterica serovar typhimurium. *Infection and immunity*, 73(4), 2344-2350.

Jarvis, E. D., Mirarab, S., Aberer, A. J., Li, B., Houde, P., Li, C., . . . Howard, J. T. 2014. Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science*, 346(6215), 1320-1331.

Jia, X., Lu, J., Tang, X., Fan, Y., Huang, S., Ge, Q., & Gao, Y. 2018. Genetic diversity of Jiangsu native chicken breeds assessed with the mitochondrial DNA D-loop region. *British poultry science*, 59(1), 34-39.

Jiang, X., & Groen, A. 2000. Chicken breeding with local breeds in China-a review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 13(10), 1482-1498.

Jie, H., Lian, L., Qu, L. J., Zheng, J. X., Hou, Z. C., Xu, G. Y., ... & Yang, N. 2013. Differential expression of Toll-like receptor genes in lymphoid tissues between Marek's disease virus-infected and noninfected chickens. *Poultry science*, 92(3), 645-654.

Jie, H., Lian, L., Qu, L. J., Zheng, J. X., Hou, Z. C., Xu, G. Y., ... & Yang, N. 2013. Differential expression of Toll-like receptor genes in lymphoid tissues between Marek's disease virus-infected and noninfected chickens. *Poultry science*, 92(3), 645-654.

Jin, M. S., & Lee, J. O. 2008. Structures of TLR–ligand complexes. *Current opinion in immunology*, 20(4), 414-419.

Johansson, A. M., & Nelson, R. M. 2015. Characterization of genetic diversity and gene mapping in two Swedish local chicken breeds. *Frontiers in genetics*, 6, 44.

Johnson, C. M., Lyle, E. A., Omueti, K. O., Stepensky, V. A., Yegin, O., Alpsoy, E., ... & Tapping, R. I. 2007. Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *The Journal of Immunology*, 178(12), 7520-7524.

Jou, W. M., Haegeman, G., Ysebaert, M., & Fiers, W. 1972. Nucleotide sequence of the gene coding for the bacteriophage MS2 coat protein. *Nature*, 237(5350), 82-88.

Jovanović, S., Savić, M., & Živković, D. 2009. Genetic variation in disease resistance among farm animals. *Biotechnology in animal husbandry*, 25(5-6-1), 339-347.

Jovanović, S., Savić, M., & Živković, D. 2009. Genetic variation in disease resistance among farm animals. *Biotechnology in animal husbandry*, 25(5-6-1), 339-347.

Kaiser, P. 2010. Advances in avian immunology—prospects for disease control: a review. *Avian Pathology*, 39(5), 309-324.

Kannaki, T. R., Reddy, M. R., Verma, P. C., & Shanmugam, M. 2015. Differential Toll-like receptor (TLR) mRNA expression patterns during chicken embryological development. *Animal biotechnology*, 26(2), 130-135.

Kannaki, T., Priyanka, E., Abhilash, M., & Haunshi, S. 2022. Differential disease resistance of Indian native chicken breeds to experimental P. multocida infection. *Indian Journal of Animal Research*, 56(2), 239-242.

Kannaki, T., Reddy, M., Shanmugam, M., Verma, P., & Sharma, R. 2010. Chicken toll-like receptors and their role in immunity. *World's Poultry Science Journal*, 66(4), 727-738.

Karpala, A. J., Lowenthal, J. W., & Bean, A. G. 2008. Activation of the TLR3 pathway regulates IFNβ production in chickens. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(4), 435-444.

Karpala, A. J., Lowenthal, J. W., & Bean, A. G. 2008. Activation of the TLR3 pathway regulates IFNβ production in chickens. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(4), 435-444.

Kaufman, J. 2021. Innate immune genes of the chicken MHC and related regions. *Immunogenetics*, 1-11.

Kawai, T., & Akira, S. 2007, February. TLR signaling. *In Seminars in immunology* (Vol. 19, No. 1, pp. 24-32). Academic Press.

Kaya, M. 2008. Denizli ve Gerze tavuk populasyonlarındaki genetik çeşitliliğin bazı mikrosatelit markörler kullanılarak belirlenmesi. PhD Thesis. Ankara Universitesi (Turkey).

Kaya, M., & Yildiz, M. A. 2014. Tavuğun Evcilleştirilmesi ve Türkiye Yerli Tavuk Irkları. *Tavukçuluk Araştırma Dergisi*, 11(2), 21-28.

Keestra, A. M., de Zoete, M. R., Bouwman, L. I., & van Putten, J. P. 2010. Chicken TLR21 is an innate CpG DNA receptor distinct from mammalian TLR9. *The Journal of Immunology*, 185(1), 460-467.

Keestra, A. M., de Zoete, M. R., Bouwman, L. I., Vaezirad, M. M., & van Putten, J. P. 2013. Unique features of chicken Toll-like receptors. *Developmental & Comparative Immunology*, 41(3), 316-323.

Keller, E. F. 2022. Nature, nurture, and the human genome project. *In The Ethics of Biotechnology* (pp. 335-354): Routledge.

Kiepper, B. H. 2009. Processing tip: Back to basics: Revisiting blood collection.

Kim, T. K. 2015. T test as a parametric statistic. *Korean journal of anesthesiology*, 68(6), 540.

Kızmaz, M. Z., Paylan, İ. C., & Erkan, S. 2017. DNA Dizilemenin Tarihsel Gelişimi. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, 6(2), 47-53.

Kogut, M. H., Iqbal, M., He, H., Philbin, V., Kaiser, P., & Smith, A. 2005. Expression and function of Toll-like receptors in chicken heterophils. *Developmental & Comparative Immunology*, 29(9), 791-807.

Kogut, M., He, H., & Kaiser, P. 2005. Lipopolysaccharide binding protein/CD14/TLR4-dependent recognition of Salmonella LPS induces the functional activation of chicken heterophils and up-regulation of pro-inflammatory cytokine and chemokine gene expression in these cells. Animal biotechnology, 16(2), 165-181.

Kraus, R. H., & Wink, M. 2015. Avian genomics: fledging into the wild! *Journal of Ornithology*, 156, 851-865.

Krause, T., Jolkver, E., Bruchhaus, S., Kramer, M., & Hemmje, M. 2021. An RT-qPCR data analysis platform. *Proceedings http://ceur-ws. org ISSN*, 1613, 0073.

Kronthaler, F., & Zöllner, S. 2021. Data analysis with RStudio. *An Easygoing Introduction*, 7-131.

Kuang, J., Yan, X., Genders, A. J., Granata, C., & Bishop, D. J. 2018. An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLoS One*, 13(5), e0196438.

Lagerberg, J. W., Truijens-de Lange, R., De Korte, D., & Verhoeven, A. J. 2007. Altered processing of thawed red cells to improve the *in vitro* quality during postthaw storage at 4 C. *Transfusion*, 47(12), 2242-2249.

Lawal, R. A., Martin, S. H., Vanmechelen, K., Vereijken, A., Silva, P., Al-Atiyat, R. M., . . . Zhang, Y.-P. 2020. The wild species genome ancestry of domestic chickens. *BMC biology*, 18, 1-18.

Lee, D. K., In, J., & Lee, S. 2015. Standard deviation and standard error of the mean. *Korean journal of anesthesiology*, 68(3), 220.

Lee, J. Y., Ji, H. S., & Lee, S. J. 2007. Micro-PIV measurements of blood flow in extraembryonic blood vessels of chicken embryos. *Physiological measurement*, 28(10), 1149.

Lee, J., Cuddihy, M. J., & Kotov, N. A. 2008. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. Tissue engineering part B: *reviews*, 14(1), 61-86.

Lee, S. B., Park, Y. H., Chungu, K., Woo, S. J., Han, S. T., Choi, H. J., ... & Han, J. Y. 2020. Targeted knockout of MDA5 and TLR3 in the DF-1 chicken fibroblast cell line impairs innate immune response against RNA ligands. Frontiers in immunology, 11, 678. *Frontiers in immunology*, 11, 678.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M., & Hoffmann, J. A. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell*, 86(6), 973-983.

Lenger, Ö. F. 2011. Türkiye'deki Yerli Tavuk Irkları ve Ticari Tavuk Tipleri Arasındaki, Mhc Gen Bölgesindeki, Genetik Farklılıkların Belirlenmesi. Dotora tezi. Afyonkarahisar.

Leulier, F., & Lemaitre, B. 2008. Toll-like receptors—taking an evolutionary approach. *Nature Reviews Genetics*, 9(3), 165-178.

Leveque, G., Forgetta, V., Morroll, S., Smith, A. L., Bumstead, N., Barrow, P., ... & Malo, D. 2003. Allelic variation in TLR4 is linked to susceptibility to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in chickens. *Infection and immunity*, 71(3), 1116-1124.

Li, J., Yang, X., Jia, Z., Ma, C., Pan, X., & Ma, D. 2021. Activation of ChTLR15/ChNF-κB-ChNLRP3/ChIL-1β signaling transduction pathway mediated inflammatory responses to E. tenella infection. *Veterinary Research*, 52, 1-14.

Li, S., Wang, G., Liu, D., Liu, Q., & Hu, G. 2017. Cloning and expression analysis of a Toll-like receptor 21 (TLR21) gene from turbot, Scophthalmus maximus. *Developmental & Comparative Immunology*, 73, 163-168.

Li, X., Swaggerty, C. L., Kogut, M. H., Chiang, H.-I., Wang, Y., Genovese, K. J., . . . Zhou, H. 2010. Gene expression profiling of the local cecal response of genetic chicken lines that differ in their susceptibility to Campylobacter jejuni colonization. *PLoS One*, 5(7), e11827.

Liang, J., Fu, J., Kang, H., Lin, J., Yu, Q., & Yang, Q. 2013. Comparison of 3 kinds of Toll-like receptor ligands for inactivated avian H5N1 influenza virus intranasal immunization in chicken. *Poultry science*, 92(10), 2651-2660.

Librado, P., & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.

Liu, W., Miller, M. M., & Lamont, S. J. 2002. Association of MHC class I and class II gene polymorphisms with vaccine or challenge response to Salmonella enteritidis in young chicks. *Immunogenetics*, 54, 582-590.

Liu, Y., Chang, G. B., Hu, G. S., Li, Q., Xu, Q., & Chen, G. H. 2011. Genetic variation at Exon2 of TLR4 gene and its association with resistant traits in chicken. *African Journal of Biotechnology*, 10(42), 8260-8266.

Liu, Y., Zan, L., Zhao, S., Xin, Y., Li, L., Cui, W., ... & Li, K. 2010. Molecular characterization, polymorphism of bovine ZBTB38 gene and association with body measurement traits in native Chinese cattle breeds. Molecular biology reports, 37, 4041-4049.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.

Lorenz, E., Patel, D. D., Hartung, T., & Schwartz, D. A. 2002. Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient murine macrophage cell line as an *in vitro* assay system to show TLR4-independent signaling of Bacteroides fragilis lipopolysaccharide. *Infection and immunity*, 70(9), 4892-4896.

Lu, Y., Sarson, A. J., Gong, J., Zhou, H., Zhu, W., Kang, Z., ... & Han, Y. 2009. Expression profiles of genes in Toll-like receptor-mediated signaling of broilers infected with Clostridium perfringens. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(11), 1639-1647.

Lupiani, B., & Reddy, S. M. 2009. The history of avian influenza. Comparative Immunology, *Microbiology and Infectious Diseases*, 32(4), 311-323.

Mahesh, K., Ngunjiri, J. M., Lee, J., Ahn, J., Elaish, M., Ghorbani, A., . . . Lee, C.-W. 2020. Avian Toll-like receptor 3 isoforms and evaluation of Toll-like receptor 3–mediated immune responses using knockout quail fibroblast cells. *Poultry science*, 99(12), 6513-6524.

Mahmoud, K. G. M., & Nawito, M. F. 2012. Molecular markers for fertility in farm animals. Iranian Journal of Applied Animal Science 2(3), 203-222

Mai, H. T., Vanness, B. C., & Linz, T. H. 2023. Reverse transcription-free digital-quantitative-PCR for microRNA analysis. *Analyst*, 148(13), 3019-3027.

Malek, M., Hasenstein, J. R., & Lamont, S. J. 2004. Analysis of chicken TLR4, CD28, MIF, MD-2, and LITAF genes in a Salmonella enteritidis resource population. *Poultry Science*, 83(4), 544-549.

Manyelo, T. G., Selaledi, L., Hassan, Z. M., & Mabelebele, M. 2020. Local chicken breeds of Africa: Their description, uses and conservation methods. *Animals*, 10(12), 2257.

Manyelo, T. G., Selaledi, L., Hassan, Z. M., & Mabelebele, M. 2020. Local chicken breeds of Africa: Their description, uses and conservation methods. *Animals*, 10(12), 2257.

Mariadassou, M., Suez, M., Sathyakumar, S., Vignal, A., Arca, M., Nicolas, P., . . . Vieaud, A. 2021. Unraveling the history of the genus Gallus through whole genome sequencing. *Molecular phylogenetics and evolution*, 158, 107044.

Marshall, J. D., Heeke, D. S., Gesner, M. L., Livingston, B., & Van Nest, G. 2007. Negative regulation of TLR9-mediated IFN-α induction by a small-molecule, synthetic TLR7 ligand. *Journal of Leucocyte Biology*, 82(3), 497-508.

Matsumoto, M., Funami, K., Oshiumi, H., & Seya, T. 2004. Toll-like receptor 3: a link between toll-like receptor, interferon and viruses. *Microbiology and immunology*, 48(3), 147-154.

McGuire, K., Jones, M., Werling, D., Williams, J., Glass, E., & Jann, O. 2006. Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine Toll-like receptors. *Animal genetics*, 37(1), 47-50.

McKee, T. J., & Komarova, S. V. 2017. Is it time to reinvent basic cell culture medium? In (Vol. 312, pp. C624-C626): *American Physiological Society Bethesda*, MD.

McKnight, P. E., & Najab, J. 2010. Mann-Whitney U Test. *The Corsini encyclopedia of psychology*, 1-1.

Menzies, M., & Ingham, A. 2006. Identification and expression of Toll-like receptors 1–10 in selected bovine and ovine tissues. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 109(1-2), 23-30.

Mercan, L. 2010. Yerli tavuk genotiplerinin ticari genotipler ile olan genetik farklılığının SRR (simple sequence repeats-basit dizi tekrarları) yöntemi ile analizi.

Mercan, L., & Okumuş, A. 2004. Hayvancılıkta Genetik Çeşitlilik ve DAD-IS. 4. *Ulusal Zootekni Bilim Kongresi*. Isparta, 1-3.

Mercan, L., Bilgi, F., & Budak, M. 2019. Saf Gerze tavuğu ve Sinop ili köy tavuğu popülasyonlarının sekiz polimorfik mikrosatellit lokusu bakımından karşılaştırılması. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 34(2), 164-171.

Merlo, A., Calcaterra, C., Mènard, S., & Balsari, A. 2007. Crosstalk between Toll-like receptors 5 and 9 on activation of human immune responses. *Journal of Leucocyte Biology*, 82(3), 509-518.

Meydan, H., Jang, C. P., Yıldız, M. A., & Weigend, S. 2016. Maternal origin of Turkish and Iranian native chickens inferred from mitochondrial DNA D-loop sequences. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 29(11), 1547.

MF, R. 2005. The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis Rheum*, 52, 2313-2322.

Michailidis, G., Anastasiadou, M., Guibert, E., & Froment, P. 2014. Activation of innate immune system in response to lipopolysaccharide in chicken Sertoli cells. *Reproduction*, 148(3), 259-270.

Michailidis, G., Anastasiadou, M., Guibert, E., & Froment, P. 2014. Activation of innate immune system in response to lipopolysaccharide in chicken Sertoli cells. Reproduction, 148(3), 259-270.

Michailidis, G., Theodoridis, A., & Avdi, M. 2010. Transcriptional profiling of Toll-like receptors in chicken embryos and in the ovary during sexual maturation and in response to Salmonella enteritidis infection. Animal reproduction science, 122(3-4), 294-302.

Michailidis, G., Theodoridis, A., & Avdi, M. 2011. Effects of sexual maturation and Salmonella infection on the expression of Toll-like receptors in the chicken vagina. Animal reproduction science, 123(3-4), 234-241.

Miller, M. M., & Taylor Jr, R. L. 2016. Brief review of the chicken major histocompatibility complex: the genes, their distribution on chromosome 16, and their contributions to disease resistance. *Poultry science*, 95(2), 375-392.

Mmereole, F. 1996. The study of haematological parameters in the Nigerian local chicken. *Nigerian Journal of Animal Production*, 23(1), 94-97.

Moges, F., Mellesse, A., & Dessie, T. 2010. Assessment of village chicken production system and evaluation of the productive and reproductive performance of local chicken ecotype in Bure district, North West Ethiopia. *African Journal of Agricultural Research*, 5(13), 1739-1748.

Mohamed Sarjoon Abdul-Cader, U. D. S. S., Eva Nagy, Shayan Sharif and Mohamed Faizal Abdul-Careem. 2018. Antiviral response elicited against avian influenza virus infection following activation of toll-like receptor (TLR)7 signaling pathway is attributable to interleukin (IL)-1β production. Abdul-Cader et al. *BMC Res Notes* https://doi.org/10.1186/s13104-018-3975-4.

Monleon, R., Martin, M. P., & John Barnes, H. 2008. Bacterial orchitis and epididymo-orchitis in broiler breeders. Avian Pathology, 37(6), 613-617.

Morera, D., & MacKenzie, S. A. 2011. Is there a direct role for erythrocytes in the immune response? *Veterinary Research*, 42(1), 1-8.

Motahari, A. S., Bresler, G., & David, N.2013). Information theory of DNA shotgun sequencing. *IEEE Transactions on Information Theory*, 59(10), 6273-6289.

Mpenda, F., Schilling, M., Campbell, Z., Mngumi, E., & Buza, J. 2019. The genetic diversity of local African chickens: A potential for selection of chickens resistant to viral infections. *Journal of Applied Poultry Research*, 28(1), 1-12.

Mtileni, B., Muchadeyi, F., Maiwashe, A., Chimonyo, M., & Dzama, K. 2012. Conservation and utilisation of indigenous chicken genetic resources in Southern Africa. *World's Poultry Science Journal*, 68(4), 727-748.

Mucha, R., Bhide, M., Chakurkar, E., Novak, M., & Mikula Sr, I. 2009. Toll-like receptors TLR1, TLR2 and TLR4 gene mutations and natural resistance to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128(4), 381-388.

Muir, W. M., & Aggrey, S. E. 2003. Poultry genetics, breeding, and biotechnology: *CABI*.

Musako, C., & Abolnik, C. 2012. Determination of the seroprevalence of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1) in Zambian backyard chicken flocks: research communication. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 79(1), 1-4.

Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertoni, F., Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. 2005. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1–polarizing program in dendritic cells. *Nature immunology*, 6(8), 769-776.

Nawab, A., An, L., Wu, J., Li, G., Liu, W., Zhao, Y., . . . Xiao, M. 2019. Chicken toll-like receptors and their significance in immune response and disease resistance. *International Reviews of Immunology*, 38(6), 284-306.

NCBI. 2023a. TLR1A toll-like receptor 1 family member A Gallus gallus (chicken) Gene ID: 426274.

NCBI. 2023b. TLR1B toll-like receptor 1 family member B Gallus gallus (chicken), Gene ID: 771173.

NCBI. 2023c. TLR2 toll like receptor 2B Gallus gallus (chicken) Gene ID: 769014.

NCBI. 2023d. TLR2A toll like receptor 2A Gallus gallus (chicken) Gene ID: 374141.

NCBI. 2023e. TLR3 toll like receptor 3 Gallus gallus (chicken) Gene ID: 422720.

NCBI. 2023f. TLR4 toll like receptor 4 Gallus gallus (chicken), Gene ID: 417241.

NCBI. 2023g. TLR15 toll-like receptor 15 Gallus gallus (chicken), Gene ID: 421219

NCBI. 2023h. TLR21 toll like receptor 21 Gallus gallus (chicken), Gene ID: 415623.

NCBI. 2024a. TLR5 toll like receptor 5 Gallus gallus (chicken), Gene ID: 554217, updated on 5-Mar-2024.

NCBI. 2024b. TLR7 toll like receptor 7 Gallus gallus (chicken), Gene ID: 418638.

Neerukonda, S. N., & Katneni, U. 2020. Avian pattern recognition receptor sensing and signaling. *Veterinary Sciences*, 7(1), 14.

Neeteson, A.-M., Avendaño, S., Koerhuis, A., Duggan, B., Souza, E., Mason, J., . . . Kranis, A. 2023. Evolutions in Commercial Meat Poultry Breeding. *Animals*, 13(19), 3150.

Nerren, J. R., He, H., Genovese, K., & Kogut, M. H. 2010. Expression of the avian-specific toll-like receptor 15 in chicken heterophils is mediated by gram-negative and gram-positive bacteria, but not TLR agonists. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 136(1-2), 151-156.

Nerren, J. R., Swaggerty, C. L., MacKinnon, K. M., Genovese, K. J., He, H., Pevzner, I., & Kogut, M. H. 2009. Differential mRNA expression of the avian-specific toll-

like receptor 15 between heterophils from Salmonella-susceptible and-resistant chickens. *Immunogenetics*, 61, 71-77.

Nguyen, V. G., Do, H. Q., Huynh, T. M. L., Park, Y. H., Park, B. K., & Chung, H. C. 2022. Molecular-based detection, genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus 4 from Korean domestic swine farms. Transboundary and Emerging Diseases, 69(2), 538-548.

Noh, J.-Y., Yoon, S. R., Kim, T.-D., Choi, I., & Jung, H. 2020. Toll-like receptors in natural killer cells and their application for immunotherapy. *Journal of immunology research*, 2020.

Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols*, 1(3), 1559-1582.

Nüsslein-Volhard, C. 2022. The Toll gene in Drosophila pattern formation. *Trends in Genetics*, 38(3), 231-245.

Oecd, F. 2022. OECD-FAO agricultural outlook 2022-2031.

Oncul, O., Turhan, V., & Cavuslu, S. 2006. H5N1 avian influenza: the Turkish dimension. *The Lancet Infectious Diseases*, 6(4), 186-187.

Oner, A. F., Bay, A., Arslan, S., Akdeniz, H., Sahin, H. A., Cesur, Y., . . . Kizilyildiz, B. 2006. Avian influenza A (H5N1) infection in eastern Turkey in 2006. *New England Journal of Medicine*, 355(21), 2179-2185.

Otsuki, K., Huggins, M. B., & Cook, J. K. 1990. Comparison of the susceptibility to avian infectious bronchitis virus infection of two inbred lines of white leghorn chickens. *Avian Pathology*, 19(3), 467-475.

Oyom, W., Mahmud, N., Islam, J., Valizadeh, S., Awuku, R. B., Ibrahim, S. A., & Tahergorabi, R. 2024. Enhancing the oxidative stability, physicochemical and sensory quality of deep-fat fried chicken nuggets using thyme essential oil-loaded oleogel coatings. Progress in Organic Coatings, 186, 107977.

Özdemir, D. 2010. Molecular genetic applications in genetic conservation of poultry International Symposium "Modern Animal Science-Food Safety and Socio-Economic Development. *Romania, Iasia*, 22/04/2010.

ÖZDEMİR, D. 2019. Miniature Fancy Chicken Breed of Turkey: İspenç. Paper presented at the Congress Book.

Özdemir, D. 2019. Poultry Biodiversity and Unregistered Native Chicken Breeds of TURKEY. *Agriculture, Forestry and Aquaculture Sciences Research Papers*, 49.

Özdemir, D., & Cassandro, M. 2018. Assessment of the population structure and genetic diversity of Denizli chicken subpopulations using SSR markers. *Italian Journal of Animal Science*, 17(2), 312-320.

ÖzdemIr, D., Maretto, F., & Cassandro, M. 2016. Comparison of genetic diversity of Turkish and Italian local chicken breeds for further conservation strategies. *European Poultry Science*, 80.

Özdemir, D., Özdemir, E. D., Marchi, M. D., & Cassandro, M. 2013. Conservation of local Turkish and Italian chicken breeds: a case study. *Italian Journal of Animal Science*, 12(2), e49.

Özdoğan, N., & Gürcan, İ. S. 2006. Denizli Ve Gerze Yerli Tavuk Irklarinda Yumurta Verimine Ait Bazi Özellikler. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 46(2), 13-21.

Ozoe, A., Isobe, N., & Yoshimura, Y. 2009. Expression of Toll-like receptors (TLRs) and TLR4 response to lipopolysaccharide in hen oviduct. Veterinary immunology and immunopathology, 127(3-4), 259-268.

Palca, J. 1986. Human genome: Department of Energy on the map. *Nature*, 321(6068), 371-371.

Pan, Z., Fang, Q., Geng, S., Kang, X., Cong, Q., & Jiao, X. 2012. Analysis of immune-related gene expression in chicken peripheral blood mononuclear cells following Salmonella enterica serovar Enteritidis infection *in vitro*. *Research in veterinary science*, 93(2), 716-720.

Paradis, A., Elkinton, J., Hayhoe, K., & Buonaccorsi, J. 2008. Role of winter temperature and climate change on the survival and future range expansion of the hemlock woolly adelgid (Adelges tsugae) in eastern North America. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 13, 541-554.

Paradis, E. 2010. pegas: an R package for population genetics with an integrated–modular approach., 26(3), 419-420.

Parvizi, P., Mallick, A. I., Haq, K., Haghighi, H. R., Orouji, S., Thanthrige-Don, N., ... & Sharif, S. 2012. A toll-like receptor 3 ligand enhances protective effects of vaccination against Marek's disease virus and hinders tumor development in chickens. *Viral immunology*, 25(5), 394-401.

Pattison, M., McMullin, P., Bradbury, J. M., & Alexander, D. (2007). Poultry diseases: Elsevier Health Sciences. *Saunders Elsvier*. P 110-571.

Paul, M. S., Brisbin, J. T., Abdul-Careem, M. F., & Sharif, S. 2013. Immunostimulatory properties of Toll-like receptor ligands in chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152(3-4), 191-199.

Paul, M. S., Mallick, A. I., Haq, K., Orouji, S., Abdul-Careem, M. F., & Sharif, S. 2011. In vivo administration of ligands for chicken toll-like receptors 4 and 21 induces the expression of immune system genes in the spleen. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144(3-4), 228-237.

Pfaffl, M. W. 2007. Relative quantification. In Real-time PCR (pp. 89-108): *Taylor & Francis*.

Philbin, V. J., Iqbal, M., Boyd, Y., Goodchild, M. J., Beal, R. K., Bumstead, N., . . . Smith, A. L. 2005. Identification and characterization of a functional, alternatively spliced Toll-like receptor 7 (TLR7) and genomic disruption of TLR8 in chickens. *Immunology*, 114(4), 507-521.

Poulsen, D. J., Thureen, D. R., & Keeler Jr, C. L. 1998. Comparison of disease susceptibility and resistance in three lines of chickens experimentally infected with infectious laryngotracheitis virus. *Poultry science*, 77(1), 17-21.

Rahman, M. T., Uddin, M. S., Sultana, R., Moue, A., & Setu, M. 2013. Polymerase chain reaction (PCR): a short review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 4(1), 30-36.

Ramos, S., & Girish, C. 2018. Application of Low Protein Diet Concept for Sustainable Poultry Production. Paper presented at the New Zealand Poultry Industry Conference.

Ravi, R. K., Walton, K., & Khosroheidari, M. 2018. MiSeq: a next generation sequencing platform for genomic analysis. Disease gene identification: *methods and protocols*, 223-232.

Ravikumar, R., Chan, J., & Prabakaran, M. 2022. Vaccines against major poultry viral diseases: strategies to improve the breadth and protective efficacy. Viruses, 14(6), 1195. *Viruses*, 14(6), 1195.

Rengaraj, D., Truong, A. D., Lillehoj, H. S., Han, J. Y., & Hong, Y. H. 2018. Expression and regulation of avian beta-defensin 8 protein in immune tissues and cell lines of chickens. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 31(9), 1516.

Reuter, J. A., Spacek, D. V., & Snyder, M. P. 2015. High-throughput sequencing technologies. *Molecular cell*, 58(4), 586-597.

Roach JC, G. G., Rowen L, Kaur A, Purcell MK, Smith, & KD, H. L., Aderem A,. 2005. The evolution of vertebrate. Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci* USA 102(27):9577–9582.

Roach, J. C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M. K., Smith, K. D., . . . Aderem, A. 2005. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(27), 9577-9582.

Ruan, W. K., & Zheng, S. J. 2011. Polymorphisms of chicken toll-like receptor 1 type 1 and type 2 in different breeds. *Poultry science*, 90(9), 1941-1947.

Ruan, W. K., Wu, Y. H., An, J., & Zheng, S. J. 2012a. Polymorphisms of chicken Toll-like receptors 4, 15, and 21 in different breeds. *Poultry Science*, 91(10), 2512-2516.

Ruan, W., An, J., & Wu, Y. 2015. Polymorphisms of chicken TLR3 and 7 in different breeds. *PLoS One*, 10(3), e0119967.

Ruan, W., Wu, Y., & Zheng, S. J. 2012b. Different genetic patterns in avian Toll-like receptor (TLR) 5 genes. *Molecular biology reports*, 39, 3419-3426.

Ruan, W., Wu, Y., An, J., & Zheng, S. 2012. Polymorphisms of chicken Toll-like receptors 4, 15, and 21 in different breeds. *Poultry science*, 91(10), 2512-2516.

Saitoh, S. I., Akashi, S., Yamada, T., Tanimura, N., Kobayashi, M., Konno, K., ... & Miyake, K. 2004. Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. . *International immunology*, 16(7), 961-969.

Saitou, N., & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.

San, J., Du, Y., Wu, G., Xu, R., Yang, J., & Hu, J. 2021. Transcriptome analysis identifies signaling pathways related to meat quality in broiler chickens–the extracellular matrix (ECM) receptor interaction signaling pathway. *Poultry science*, 100(6), 101135.

Sanchez, I., Remm, M., Frasquilho, S., Betsou, F., and Mathieson, W. 2015. How severely is DNA quantification hampered by RNA co-extraction? *Biopreserv. Biobank.*, 13(5): 320-324.

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467.

Sato, S., Sugiyama, M., Yamamoto, M., Watanabe, Y., Kawai, T., Takeda, K., & Akira, S. 2003. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-β (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-κB and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *The Journal of Immunology*, 171(8), 4304-4310.

Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3(6), 1101-1108.

Schneeberger, C., Speiser, P., Kury, F., & Zeillinger, R. 1995. Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *Genome Research*, 4(4), 234-238.

Schott, E., Witt, H., Neumann, K., Taube, S., Oh, D. Y., Schreier, E., ... & Berg, T. 2007. A Toll-like receptor 7 single nucleotide polymorphism protects from advanced inflammation and fibrosis in male patients with chronic HCV-infection. *Journal of hepatology*, 47(2), 203-211.

Schwarz, H., Schneider, K., Ohnemus, A., Lavric, M., Kothlow, S., Bauer, S., ... & Staeheli, P. 2007. Chicken toll-like receptor 3 recognizes its cognate ligand when ectopically expressed in human cells. *J. Interferon Cytokine Res*. 2007;27:97–101. doi:10.1089/ jir.2006.0098.

Şekeroğlu, A. 1993. Gerze ve Denizli Tavuk Irklarının Yumurta Verim ve Kalite Özellikleri. Yüksek Lisans Tezi. Ondokuz Mayıs Üniv Fen Bil Enst, Samsun,

Şekeroğlu, A., & Nihat, Ö. 1997. Gerze (Hacıkadın) ve Denizli Tavuk Irklarının Bazı Verim Özellikleri Bakımından Karşılaştırılması. *Akdeniz University Journal of the Faculty of Agriculture*, 10(1), 41-57.

Shen, Y.-Y., Dai, K., Cao, X., Murphy, R. W., Shen, X.-J., & Zhang, Y.-P. 2014. The updated phylogenies of the Phasianidae based on combined data of nuclear and mitochondrial DNA. *PLoS One*, 9(4), e95786.

Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., & Kimoto, M. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *The Journal of experimental medicine*, 189(11), 1777-1782.

Shinkai, H., Tanaka, M., Morozumi, T., Eguchi-Ogawa, T., Okumura, N., Muneta, Y., . . . Uenishi, H. 2006. Biased distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in porcine Toll-like receptor 1 (TLR1), TLR2, TLR4, TLR5, and TLR6 genes. *Immunogenetics*, 58, 324-330.

Silva, A. P. d., & Gallardo, R. A. 2020. The chicken MHC: insights into genetic resistance, immunity, and inflammation following infectious bronchitis virus infections. *Vaccines*, 8(4), 637.

Simbizi, V., Moerane, R., Ramsay, G., Mubamba, C., Abolnik, C., & Gummow, B. 2021. A study of rural chicken farmers, diseases and remedies in the Eastern Cape Province of South Africa. *Preventive Veterinary Medicine*, 194, 105430.

Sironi, L., Williams, J. L., Moreno-Martin, A. M., Ramelli, P., Stella, A., Jianlin, H., ... & Mariani, P. 2008. Susceptibility of different chicken lines to H7N1 highly pathogenic avian influenza virus and the role of Mx gene polymorphism coding amino acid position 631. *Virology*, 380(1), 152-156.

Smith, J., Sadeyen, J.-R., Cavanagh, D., Kaiser, P., & Burt, D. W. 2015. The early immune response to infection of chickens with Infectious Bronchitis Virus (IBV) in susceptible and resistant birds. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 1-14.

Sonoda, Y., Abdel Mageed, A. M., Isobe, N., & Yoshimura, Y. 2013. Induction of avian b-defensins by CpG oligodeoxynucleotides and proinflammatory cytokines in hen vaginal cells *in vitro*. *Reproduction*, 145(6), 621-63

Spalona, A., Ranvig, H., Cywa-Benko, K., Zanon, A., Sabbioni, A., Szalay, I., . . . Szwaczkowski, T. 2007. Population size in conservation of local chicken breeds in chosen European countries. *Archiv fur Geflugelkunde*, 71(2), 49-55.

SPSS, A. 2001. SPSS 13 für Windows.

St Paul, M., Paolucci, S., Barjesteh, N., Wood, R. D., & Sharif, S. 2013. Chicken erythrocytes respond to Toll-like receptor ligands by up-regulating cytokine transcripts. *Research in veterinary science*, 95(1), 87-91.

St. Paul, M., Paolucci, S., Barjesteh, N., Wood, R. D., Schat, K. A., & Sharif, S. 2012. Characterization of chicken thrombocyte responses to Toll-like receptor ligands. *journals.plos.org*: e43381.

Steiner, H., Hultmark, D., Engström, Å., Bennich, H., & Boman, H. 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 292(5820), 246-248.

Stoler, N., & Nekrutenko, A. 2021. Sequencing error profiles of Illumina sequencing instruments. *NAR genomics and bioinformatics*, 3(1), lqab019.

Suhardi, S., Putra, W. P. B., Rofik, R., Simanjuntak, S., Indana, K., & Wibowo, A. 2022. The Bioinformatics Analysis in the Whole Genome mtDNA Sequence of Chickens (Gallus gallus). *Paper presented at the International Conference on Tropical Agrifood, Feed and Fuel* (ICTAFF 2021).

Suklek, A., Kayan, A., Rattanasrisomporn, J., & Boonkaewwan, C. 2020. Isolation of peripheral blood mononuclear cells and the expression of toll-like receptors in Betong chickens. *Veterinary World*, 13(7), 1372.

Sumantri, C., Khaerunnisa, I., & Gunawan, A. 2020. The genetic quality improvement of native and local chickens to increase production and meat quality in order to build the Indonesian chicken industry. Paper presented at the IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*. (Vol. 492, No. 1, p. 012099). IOP Publishing.

Sun, X., Wang, Z., Shao, C., Yu, J., Liu, H., Chen, H., ... & Li, G. 2021. Analysis of chicken macrophage functions and gene expressions following infectious bronchitis virus M41 infection. *Veterinary research*, 52, 1-15.

Suryohastari RRB, Sumarsono SH, Giri-Rachman EA, Edi SP. 2024. Intravaginally CpG-ODN and Salmonella enteritidis on TLR21, cytokines, and AvBD10 gene expressions in the reproductive tract of native chicken. *Trop Biomed*. Jun 1;41(2):142-148. doi: 10.47665/tb.41.2.002. PMID: 39154265.

Swaggerty, C. L., Pevzner, I. Y., & Kogut, M. H. 2014. Selection for pro-inflammatory mediators yields chickens with increased resistance against Salmonella enterica serovar Enteritidis. *Poultry science*, 93(3), 535-544.

Swayne, D. E. 2013. Diseases of poultry: *John Wiley & Sons*.

Swerdlow, M. P., Kennedy, D. R., Kennedy, J. S., Washabau, R. J., Henthorn, P. S., Moore, P. F., . . . Felsburg, P. J. 2006. Expression and function of TLR2, TLR4, and Nod2 in primary canine colonic epithelial cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114(3-4), 313-319.

Świderská, Z., Šmídová, A., Buchtová, L., Bryjová, A., Fabiánová, A., Munclinger, P., & Vinkler, M. 2018. Avian Toll-like receptor allelic diversity far exceeds human polymorphism: an insight from domestic chicken breeds. *Scientific Reports*, 8(1), 17878.

T. Tachibana, K. T., M. S. I. Khan, R. Makino and M. A. Cline. 2020. Effects of toll-like receptor-7 agonists on feeding behaviour, voluntary activity,cloacal temperature and crop emptying in chicks. British Poultry Science 2020, VOL. 61, NO. 3, 303–310https://doi.org/10.1080/00071668.2020.1720907© 2020 *British Poultry Science* Ltd.

Tadesse, S., Ashenafi, H., & Aschalew, Z. 2005. Seroprevalence study of Newcastle disease in local chickens in central Ethiopia. Int. *J. Appl. Res. Vet. Med*, 3(1), 25-29.

TAGEM. 2009. Türkiye Evcil Hayvan Genetik Kaynakları,T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, ANKARA.

Taghavi, M., Ghorbani-Choboghlo, H., Khosravi, A. R., Erfanmanesh, A., & Balal, A. 2014. Fungal flora of the combs and wattles of Iranian native chickens. *Iranian journal of microbiology*, 6(1), 46.

Taha-Abdelaziz, K., Alkie, T. N., Hodgins, D. C., Yitbarek, A., Shojadoost, B., & Sharif, S. 2017. Gene expression profiling of chicken cecal tonsils and ileum following oral exposure to soluble and PLGA-encapsulated CpG ODN, and lysate of Campylobacter jejuni. *Veterinary Microbiology*, 212, 67-74.

Takeda, K., & Akira, S. 2015. Toll-like receptors. *Current protocols in immunology*, 109(1), 14.12. 11-14.12. 10.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.

Taşkesen, H. O. 2010. Denizli tavuk popülasyonunda mitokondriyal DNA D-LOOP polimorfizmi. *Fen Bilimleri Enstitüsü*, (Master's thesis, Ankara Universitesi (Turkey)).

Tatman, Ö. 1971. Denizli İli Ahalisi ve Tavuklar Üzerine Araştırma, Mezuniyet Tezi (Basılmamış) *Ege Üni. Zir*. Fak., Bomova-İzmir. Ege Üni. Zir. Fak.,.

Taylor, S. C., Carbonneau, J., Shelton, D. N., & Boivin, G. 2015. Optimization of Droplet Digital PCR from RNA and DNA extracts with direct comparison to RT-qPCR: Clinical implications for quantification of Oseltamivir-resistant subpopulations. *Journal of virological methods*, 224, 58-66.

Team, R. C. 1999. Writing R extensions. R Foundation for Statistical Computing.

Temperley, N. D., Berlin, S., Paton, I. R., Griffin, D. K., & Burt, D. W. 2008. Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family: a story of gene gain and gene loss. *BMC genomics*, 9(1), 1-12.

Thitithanyanont, A., Engering, A., Ekchariyawat, P., Wiboon-ut, S., Limsalakpetch, A., Yongvanitchit, K., . . . Sirisinha, S. 2007. High susceptibility of human dendritic cells to avian influenza H5N1 virus infection and protection by IFN-α and TLR ligands. *The Journal of Immunology*, 179(8), 5220-5227.

Tirumurugaan, K., Dhanasekaran, S., Raj, G. D., Raja, A., Kumanan, K., & Ramaswamy, V. 2010. Differential expression of toll-like receptor mRNA in selected tissues of goat (Capra hircus). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 133(2-4), 296-301.

Tohidi, R., Idris, I. B., Panandam, J. M., & Bejo, M. H. 2012. The effects of polymorphisms in IL-2, IFN-g, TGF-b2, IgL, TLR-4, MD-2, and iNOS genes on resistance to Salmonella Enteritidis in indigenous chickens. academia.edu.

Toparslan, E. 2023. Yerli Gerze (Hacıkadı) Tavuk Irkında Et Verimi ve Kalitesi Üzerine Etki Eden Genlerin RNA Düzeyinde Araştırılması, Doktora Tezi, Antalya.

Toparslan, E., Karabag, K., & Bilge, U. 2020. A workflow with R: Phylogenetic analyses and visualizations using mitochondrial cytochrome b gene sequences. *PLoS One*, 15(12), e0243927.

T-TEST, I. S. Independent Samples T-test. ROE Big Cap & Small Cap.

Tubak, V., Határvölgyi, E., Krenács, L., Korpos, É., Kúsz, E., Duda, E., ... & Rauch, T. 2009. Expression of immunoregulatory tumor necrosis factor-like molecule TL1A in chicken chondrocyte differentiation. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 73(1), 34.

Van der Zijpp, A., Frankena, K., Boneschanscher, J., & Nieuwland, M. 1983. Genetic analysis of primary and secondary immune responses in the chicken. *Poultry science*, 62(4), 565-572.

Van Immerseel, F. 2010. Stress-induced survival strategies enable Salmonella Enteritidis to persistently colonize the chicken oviduct tissue and cope with antimicrobial factors in egg white: A hypothesis to explain a pandemic. Gut pathogens, 2, 1-5.

Velová, H., Gutowska-Ding, M. W., Burt, D. W., & Vinkler, M. 2018. Toll-like receptor evolution in birds: gene duplication, pseudogenization, and diversifying selection. *Molecular biology and evolution*, 35(9), 2170-2184.

Villarreal, L. Y. B., Brandão, P. E., Chacón, J. L., Assayag, M. S., Maiorka, P. C., Raffi, P., ... & Ferreira, A. J. P. 2007. Orchitis in roosters with reduced fertility associated with avian infectious bronchitis virus and avian metapneumovirus infections. Avian Diseases, 51(4), 900-904.

Vinkler, M., & Albrecht, T. 2009. The question waiting to be asked: Innate immunity receptors in the perspective of zoological research. *Folia Zoologica*, 58, 15.

Wang, N., Kimball, R. T., Braun, E. L., Liang, B., & Zhang, Z. 2013. Assessing phylogenetic relationships among Galliformes: a multigene phylogeny with expanded taxon sampling in Phasianidae. *PLoS One*, 8(5), e64312.

Wang, Y., Chen, H., Hang, C., Chen, Y., Gao, J., & Qiu, D. (2023). Correlation of lipoprotein lipase gene polymorphism and mRNA expression with intramuscular fat content in Baicheng-Oil chicken. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 107(1), 222-227.

Wang, Y., Shan, C., Ming, S., Liu, Y., Du, Y., & Jiang, G. 2009. Immunoadjuvant effects of bacterial genomic DNA and CpG oligodeoxynucleotides on avian influenza virus subtype H5N1 inactivated oil emulsion vaccine in chicken. *Research in veterinary science*, 86(3), 399-405.

Waters, A., & Lemaire, M. 2016. Genetic Diagnosis of Renal Diseases: Basic Concepts and Testing. *Pediatric Kidney Disease*, 107-149.

Watson, J. D. 1990. The human genome project: past, present, and future. *Science*, 248(4951), 44-49.

Watson, J. D., & Crick, F. H. 1953. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356), 737-738.

Weiss, H. J., & O'Neill, L. A. J. 2022. Of Flies and Men—The Discovery of TLRs. *Cells*, 11(19), 3127.

Wenke Ruan, Jinyan Z. Shuang X. Xueyan L. Jue W. Yueqi J. Weichen H. 2020. Infectious bronchitis virus inhibits activation of the TLR7 pathway, but not the TLR3 pathway. *Archives of Virology* (2020) 165:2037–2043 https://doi.org/10.1007/s00705-020-04690-8.

Werling D, J. O., Offord V, Glass EJ, Coffey TJ,. 2009. Variation matters: TLR structure and species-specific pathogen recognition. *Trends Immunol* 30(3):124–130.

Wieczorek, M., Abualrous, E. T., Sticht, J., Álvaro-Benito, M., Stolzenberg, S., Noé, F., & Freund, C. 2017. Major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II proteins: conformational plasticity in antigen presentation. *Frontiers in immunology*, 8, 292.

Wigley, P. 2004. Genetic resistance to Salmonella infection in domestic animals. *Research in veterinary science*, 76(3), 165-169.

Wigley, P. 2013. Immunity to bacterial infection in the chicken. *Developmental & Comparative Immunology*, 41(3), 413-417.

Wigley, Paul. 2021. "The immune system of the chicken." *Poultry Health: A Guide for Professionals* 8.

Woods, D. C., Schorey, J. S., & Johnson, A. 2009. Toll-like receptor signaling in hen ovarian granulosa cells is dependent on stage of follicle maturation. *Reproduction*, 137(6), 987-996.

Workenhe, S. T., Kibenge, M. J., Wright, G. M., Wadowska, D. W., Groman, D. B., & Kibenge, F. S. 2008. Infectious salmon anaemia virus replication and induction of alpha interferon in Atlantic salmon erythrocytes. *Virology journal*, 5, 1-12.

Wurfel, M. M., Gordon, A. C., Holden, T. D., Radella, F., Strout, J., Kajikawa, O., ... & Martin, T. R. 2008. Toll-like receptor 1 polymorphisms affect innate immune responses and outcomes in sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 178(7), 710-720.

Xiao, C., Sun, T., Yang, Z., Xu, W., Wang, J., Zeng, L., . . . Yang, X. 2021. Transcriptome landscapes of differentially expressed genes related to fat deposits in Nandan-Yao chicken. *Functional & integrative genomics*, 21, 113-124.

Yang, K., Liu, W., & Luo, X. 2014. Differentiation and Phylogenetic Relationship of Different Geographic Populations of Tibetan Chicken, *Gallus gallus* domesticus. *Pakistan Journal of Zoology*, 46(3).

Yang, R., Paparini, A., Monis, P., & Ryan, U. 2014. Comparison of next-generation droplet digital PCR (ddPCR) with quantitative PCR (qPCR) for enumeration of Cryptosporidium oocysts in faecal samples. *International Journal for Parasitology*, 44(14), 1105-1113.

Yang, X., Liu, C.-L., Yang, B.-G., Hu, H.-Q., Ying, G., Yi, G., . . . Zhang, W.-Y. 2022. Investigating genetic diversity and population phylogeny of five Chongqing local chicken populations autosomal using microsatellites. *Animal biotechnology*, 33(6), 1190-1197.

Yao, T., & Asayama, Y. 2017. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive medicine and biology*, 16(2), 99-117.

Yilmaz, A., Shen, S., Adelson, D. L., Xavier, S., & Zhu, J. J. 2005. Identification and sequence analysis of chicken Toll-like receptors. *Immunogenetics*, 56, 743-753.

Yoshimura, Y. 2015. Avian β-defensins expression for the innate immune system in hen reproductive organs. *Poultry Science*, 94(4), 804-809.

Yoshimura, Y., Tamura, Y., Liang, J. X., & Okamoto, T. 2004. Immunolocalization of lymphocyte subsets in the testis and epididymis of roosters. The Journal of Poultry Science, 41(4), 315-321.

Zekarias, B., Ter Huurne, A. A., Landman, W. J., Rebel, J. M., Pol, J. M., & Gruys, E. 2002b. Immunological basis of differences in disease resistance in the chicken. *Veterinary Research*, 33(2), 109-125.

Zhang, J., Kaiser, M. G., Deist, M. S., Gallardo, R. A., Bunn, D. A., Kelly, T. R., . . . Lamont, S. J. 2018. Transcriptome analysis in spleen reveals differential regulation of response to Newcastle disease virus in two chicken lines. *Scientific reports*, 8(1), 1-13.

Zhang, L. Y., Huang, M. Y., Li, Y., Chen, D. Z., & Shi, X. 2020. Association of three beta-defensin gene (AvBD4, AvBD5, AvBD14) polymorphisms with carrier-state susceptibility to salmonella in chickens. *British poultry science*, 61(4), 357-365.

Zhang, M., Nii, T., Isobe, N., & Yoshimura, Y. 2012. Expression of Toll-like receptors and effects of lipopolysaccharide on the expression of proinflammatory cytokines

and chemokine in the testis and epididymis of roosters. Poultry science, 91(8), 1997-2003.

Zhang, T., Liu, H., Yang, L.-K., Yin, Y.-J., Lu, H.-Z., & Wang, L. 2018. The complete mitochondrial genome and molecular phylogeny of Lueyang black-bone chicken. *British poultry science*, 59(6), 618-623.

Zhao, F., Fan, H., Li, G., & Zhang, B. 2016. Complete mitochondrial genome sequence and gene organization of Chinese indigenous chickens with phylogenetic considerations. *Genet Mol Res*, 15(2).

Zhou, H., & Lamont, S. J. 2003. Chicken MHC class I and II gene effects on antibody response kinetics in adult chickens. *Immunogenetics*, 55(3), 133-140.

Zhou, Z., Wang, Z., Cao, L., Hu, S., Zhang, Z., Qin, B., ... & Nie, K. 2013. Upregulation of chicken TLR4, TLR15 and MyD88 in heterophils and monocyte-derived macrophages stimulated with Eimeria tenella *in vitro*. *Experimental parasitology*, 133(4), 427-433.

Zoglauer, A., Andritschke, R., & Kanbach, G. 2004. Data analysis for the MEGA

7. EKLER

EK-1. Denizli ve Gerze tavuk ırklarına ait hücre kültürü çalışılan ikinci bireyin birinci saat sonrası örneklerin RNA saflık ve yoğunlukları

İkinci Birey 1. Saat	**Örnek Kodu**	**Gerze**			**Denizli**		
		Yoğunluk (ng/ul)	**260-230%**	**260-280%**	**Yoğunluk (ng/ul)**	**260-230%**	**260-280%**
2	21	104	2,07	1,79	107	1,73	1,81
2	22	128	1,81	2,08	71	2,01	2,03
2	23	272	2,00	2,04	353	1,80	1,92
2	24	51	2,07	1,99	377	1,80	1,81
2	25	42	2,03	2,01	81	2,02	2,07
2	26	76	1,09	2,02	83	2,01	1,89
2	27	70	2,01	1,85	78	1,85	2,03
2	28	74	2,09	1,91	135	2,07	1,90
2	29	108	1,99	2,01	119	1,90	2,03
2	30	92	1,81	1,93	127	2,08	2,05

EK-2. Denizli ve Gerze tavuk ırklarına ait hücre kültürü çalışılan ikinci bireyin üçüncü saat sonrası örneklerin RNA saflık ve yoğunlukları

İkinci Birey 3. Saat	**Örnek Kodu**	**Gerze**			**Denizli**		
		Yoğunluk (ng/ul)	**260-230%**	**260-280%**	**Yoğunluk (ng/ul)**	**260-230%**	**260-280%**
2	31	447	2,06	2,03	121	1,90	203
2	32	115	2,03	2,08	111	2,01	2,04
2	33	135	2,03	2,02	153	1,91	1,90
2	34	334	2,05	2,05	162	1,74	1,89
2	35	126	1,76	2,01	140	1,72	1,74
2	36	216	1,91	2,01	64	1,79	2,09
2	37	141	2,05	1,80	56	1,80	2,01
2	38	137	2,01	1,99	60	2,07	1,98
2	39	158	1,94	2,02	78	2, 09	2,03
2	40	162	1,85	1,98	74	2,01	2,02

EK-3. Denizli ve Gerze tavuk ırklarına ait hücre kültürü çalışılan üçüncü bireyin birinci saat sonrası örneklerin RNA saflık ve yoğunlukları

Üçüncü Birey 1. Saat	Örnek Kodu	Gerze			Denizli		
		Yoğunluk (ng/ul)	260-230%	260-280%	Yoğunluk (ng/ul)	260-230%	260-280%
3	41	384	1,63	2,05	68	1,60	1,71
3	42	360	2,05	2,08	71	2,01	2,03
3	43	322	2,04	2,02	83	1,80	1,90
3	44	236	2,03	2,09	87	1,93	1,89
3	45	142	2,04	2,02	91	2,09	2,04
3	46	171	1,90	2,01	60	2,07	2,09
3	47	88	2,01	2,09	58	2,08	2,01
3	48	176	2,03	1,99	116	1,82	1,90
3	49	72	1,91	2,01	68	1,98	2,01
3	50	82	1,85	1,99	98	2,01	2,04

EK-4. Denizli ve Gerze tavuk ırklarına ait hücre kültürü çalışılan üçüncü bireyin üçüncü saat sonrası örneklerin RNA saflık ve yoğunlukları

Üçüncü Birey 3. Saat	Örnek Kodu	Gerze			Denizli		
		Yoğunluk (ng/ul)	260-230%	260-280%	Yoğunluk (ng/ul)	260-230%	260-280%
3	51	174	2,03	2,09	57	1,91	2,00
3	52	127	2,01	1,80	61	2,01	1,91
3	53	262	2,00	2,20	96	1,86	1,91
3	54	150	2,03	2,09	97	1,75	1,80
3	55	142	2,06	2,10	71	2,02	2,02
3	56	71	1,90	2,00	80	2,01	1, 90
3	57	66	2,10	1,80	68	1,83	2,01
3	58	76	2,03	1,90	76	1,71	1,90
3	59	58	1,90	2,00	86	1,91	2,01
3	60	62	1,80	1,90	74	2,06	2,04

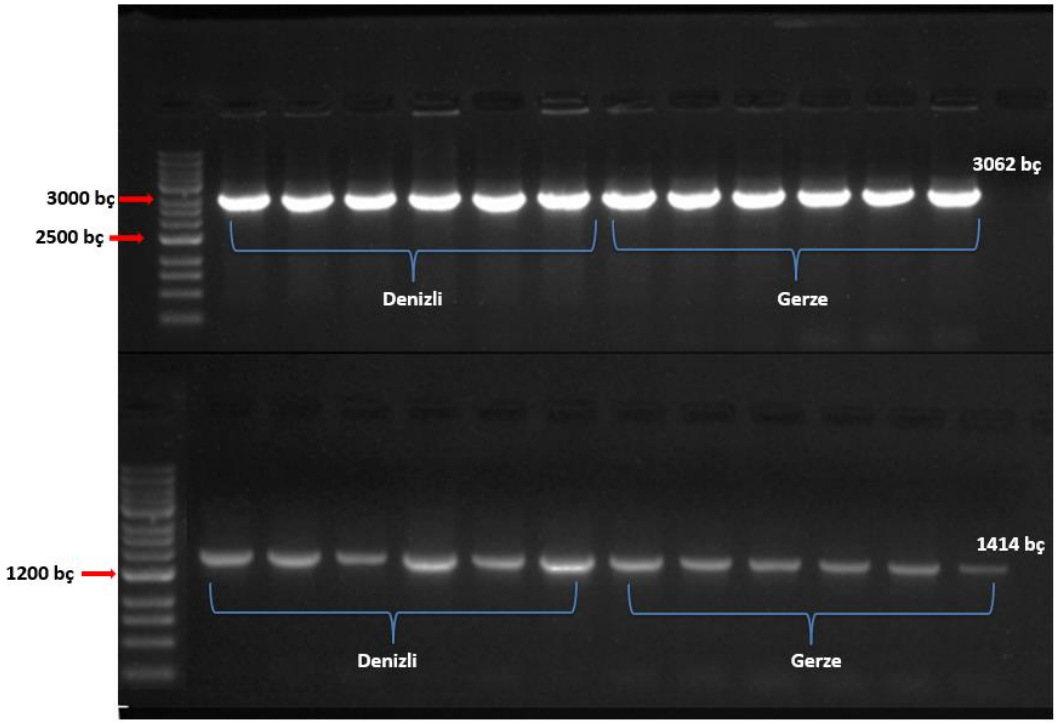
EK-5. Denizli ve Gerze tavuk ırklarına ait hücre kültürü çalışılan dördüncü bireyin birinci saat sonrası örneklerin RNA saflık ve yoğunlukları

Dördüncü Birey 1. Saat	**Örnek Kodu**	**Gerze**			**Denizli**		
		Yoğunluk (ng/ul)	**260-230%**	**260-280%**	**Yoğunluk (ng/ul)**	**260-230%**	**260-280%**
4	61	387	1,76	2,08	135	1,90	2,00
4	62	324	1,74	2,09	91	2,01	2,09
4	63	462	2,04	2,09	132	1,82	1,97
4	64	190	2,03	2,07	116	1,76	1,86
4	65	140	2,01	2,08	112	208	2,09
4	66	72	1,91	2,01	93	2,05	2,09
4	67	62	2,01	1,83	63	1,85	2,08
4	68	80	1,83	1,90	53	1,79	2,00
4	69	68	1,97	2,08	100	1,98	2,03
4	70	72	1,83	1,95	92	2,06	2,08

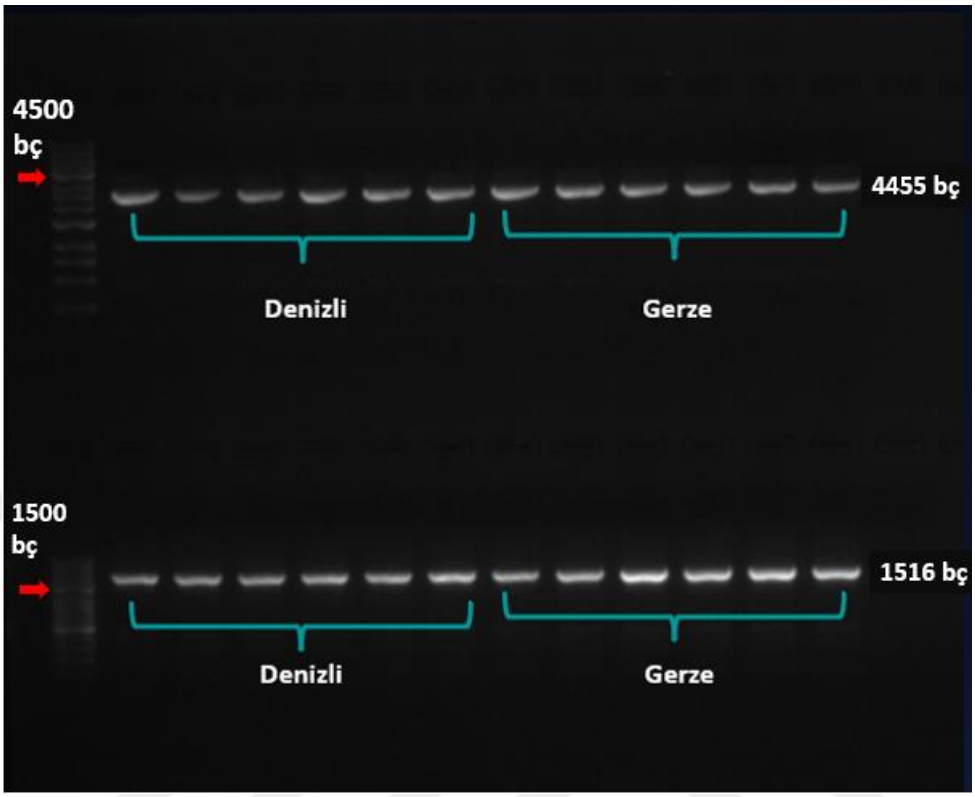
EK-6. Denizli ve Gerze tavuk ırklarına ait hücre kültürü çalışılan dördüncü bireyin üçüncü saat sonrası örneklerin RNA saflık ve yoğunlukları

Dördüncü Birey 3. Saat	Örnek Kodu	Gerze			Denizli		
		Yoğunluk (ng/ul)	260-230%	260-280%	Yoğunluk (ng/ul)	260-230%	260-280%
4	71	446	2,01	2,01	64	1,90	2,03
4	72	316	2,05	2,02	81	1,71	2,01
4	73	420	2,04	2,02	62	2,08	1,98
4	74	443	2,04	2,01	82	1,73	1,87
4	75	83	2,05	2,10	98	2,02	2,04
4	76	91	1,93	2,03	273	2,01	2,01
4	77	90	2,10	1,80	261	1,85	2,09
4	78	76	2,02	1,91	161	1,73	1,91
4	79	68	1,92	2,02	92	1,92	2,01
4	80	86	1,81	1,93	112	2,01	2,03

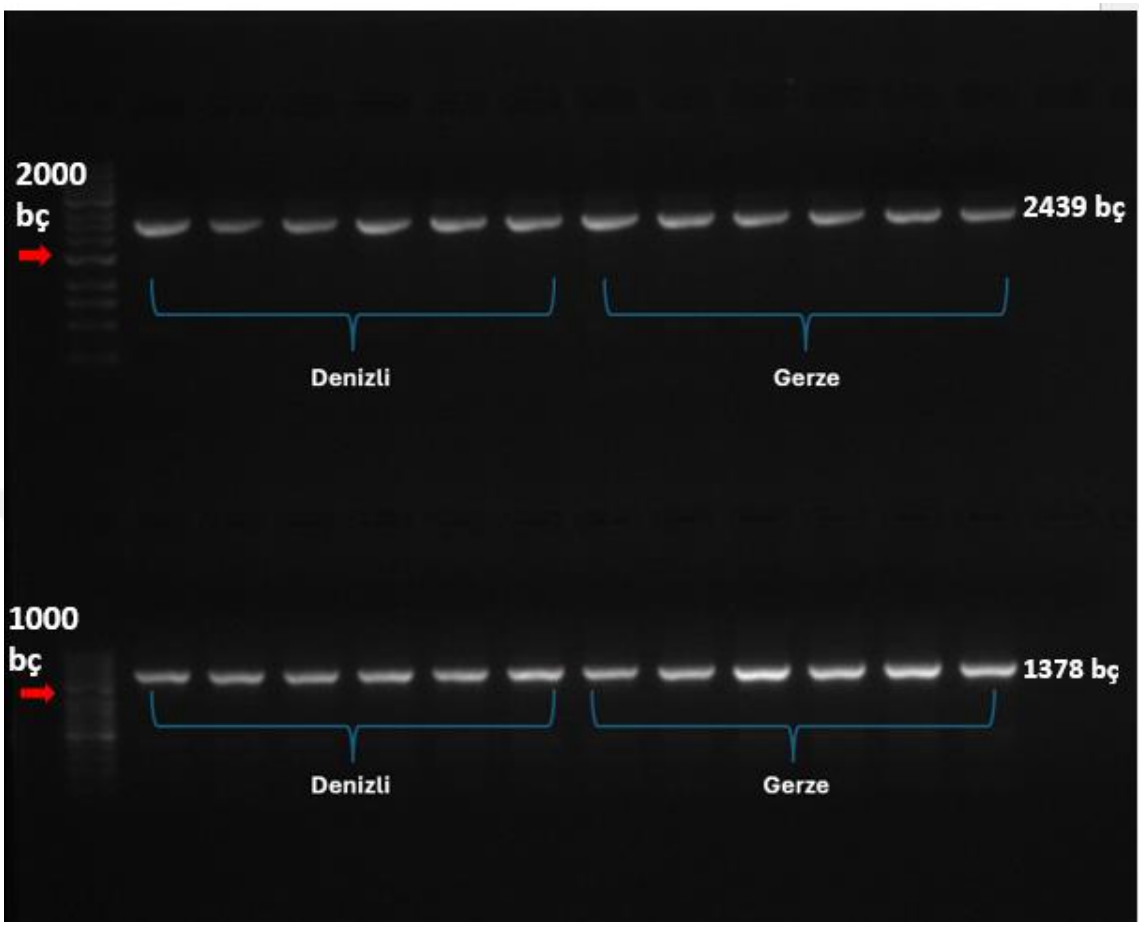
EK-7. *ChTLR4* reseptörüne ait PCR amplifikasyon jel görüntüsü.



EK-8. *ChTLR5* reseptörüne ait PCR amplifikasyon jel görüntüsü.



EK-9. *ChTLR15* reseptörüne ait PCR amplifikasyon jel görüntüsü.



EK-10. Denizli ve Gerze tavuk ırklarına ait hücre kültürü sonrası *ChTLR*'lerin gruplararası/içi (ırk, cinsiyet, ligand ve süre) varyans analizi değerleri

	İnteraksiyon	Irk		Cinsiyet		Ligand		Süre	
		df	Sig.	df	Sig.	df	Sig.	df	Sig.
ChTLR3	Gruplar arası	1	,189	1	,649	4	**,000**	1	**,002**
	Grup içi	478		478		475		478	
ChTLR4	Gruplar arası	1	**,000**	1	,002	4	**,000**	1	**,000**
	Grup içi	478		478		475		478	
ChTLR5	Gruplar arası	1	**,000**	1	,084	4	**,000**	1	**,005**
	Grup içi	478		478		475		478	
ChTLR15	Gruplar arası	1	**,000**	1	,053	4	**,000**	1	**,000**
	Grup içi	478		478		475		478	

Not: Koyu renk ile belirtilen değerler uygulanan süre ve ligand muamelelerinin önemli olduğunu belirtir (P< 0,005).

EK-11. Denizli ve Gerze tavuk ırklarına ait hücre kültürü sonrası *ChTLR*'lerin muamele (ırk, cinsiyet, ligand muamele ve süre) interaksiyonlarının varyans analizi değerleri

	ChTLR3		***ChTLR4***		***ChTLR5***		***ChTLR15***	
	df	Sig.	df	Sig.	df	Sig.	df	Sig.
Irk	1	,048	1	**,000**	1	**,000**	1	**,000**
Cinsiyet	1	,493	1	**,000**	1	**,004**	1	**,001**
Ligand Muamele	4	**,000**	4	**,000**	4	**,000**	4	**,000**
Muamele Süresi	1	**,000**	1	**,000**	1	**,000**	1	**,000**
Irk * Cinsiyet	1	**,000**	1	,130	1	**,000**	1	**,009**
Irk * Ligand Muamele	4	**,000**	4	**,000**	4	**,000**	4	**,003**
Irk * Muamele Süresi	1	**,000**	1	,484	1	,485	1	,385
Cinsiyet * Ligand Muamele	4	,269	4	,234	4	,201	4	**,000**
Cinsiyet * Muamele Süresi	1	**,000**	1	**,000**	1	**,000**	1	**,000**
Ligand Muamele * Muamele Süresi	4	**,000**	4	**,000**	4	**,000**	4	**,000**
Irk * Cinsiyet * Ligand Muamele	4	**,002**	4	**,003**	4	**,000**	4	**,001**
Irk * Cinsiyet * Muamele Süresi	1	**,000**	1	**,000**	1	**,000**	1	**,000**
Irk * Ligand Muamele * Muamele Süresi	4	**,013**	4	**,017**	4	**,019**	4	,079
Cinsiyet * Ligand Muamele * Muamele Süresi	4	**,000**	4	**,000**	4	**,001**	4	**,000**
Irk * Cinsiyet * Ligand Muamele * Muamele Süresi	4	**,001**	4	**,000**	4	**,000**	4	**,000**

Not: Koyu renk ile belirtilen değerler uygulanan süre ve ligand muamelelerinin önemli olduğunu belirtir (P< 0,005).

EK-12. Denizli ve Gerze tavuk ırklarını *ChTLR3* bakımından protein sekans dizisinin 547 nükleotit bölgesinin diğer tavuk ırkları ile kıyaslanması

Pozisyon	Polimorfik amino asit (a.a)	DNZ	GRZ	GAL	SL	OR	MN	ML	LF	GS2	GS1	GG1	GG3	FR	CZ	AS	AC
17	F (fenilalanin)	✓	✓		✓		✓			✓				✓			
17	S (serin)			✓		✓		✓	✓			✓	✓		✓	✓	✓
68	D (aspartic asit),	✓	✓		✓	✓	✓							✓		✓	
68	V (valin)			✓				✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓
92	K(lisin)	✓	✓		✓	✓	✓					✓				✓	✓
92	Q(glutamin)			✓				✓		✓	✓			✓	✓		
166	D (aspartic asit)	✓	✓		✓	✓	✓				✓						
166	V (valin)			✓				✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓
148	G (glisin)	✓	✓	✓													
212	R (arjinin)	✓	✓	✓													
212	S (serin)				✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
222	L (lösin)	✓	✓	✓													
222	K (lisin)				✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
222	T (treonin)							✓	✓				✓		✓		

Not: *Gallus Gallus* (GG1), *Gallus gallus* (GG2), *Gallus gallus* (GG3), Silkie (SL1), Czech (CZ1)), Game shamo (GS1), Game shamo (GS2), Frizzle (FR1), Araucana (AC1), Czech (CZ2)), Minorka (MN1), Orloff (OR1), Orloff (OR2), Malay (ML1), La-fleche (LF1), La-fleche (LF2), Araucana (AC2), Aseel (AS1), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ). (✓ olan ilgili amino asitin varlığını belirtmektedir.)

EK-13. Denizli ve Gerze tavuk ırklarını *ChTLR4* bakımından protein sekans dizisinin 636 nükleotit bölgesinin diğer tavuk ırkları ile kıyaslanması

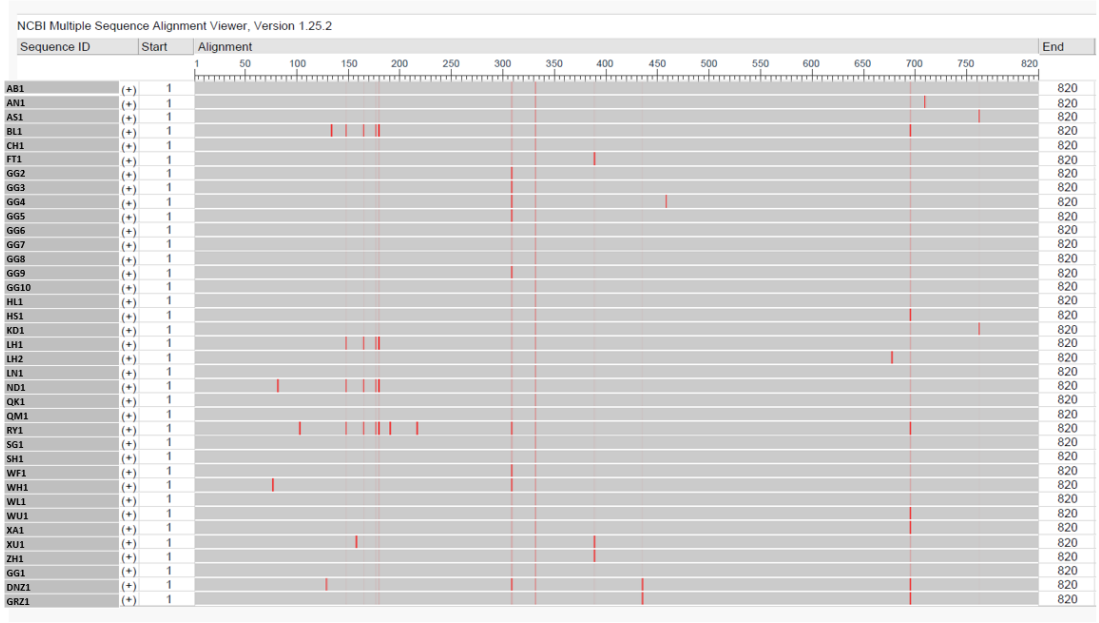
Pozisyon	Polimorfik amino asit (a.a)	SL	SB	OR	MN	ML	RY	LY	LG	LF	LB	HY	GS	CZ	BV	BF	BB	AS	AR	AC	FZ	GG	GG	GG	GRZ	DNZ	GG
40	S (serin																					✓	✓	✓	✓	✓	✓
41	F(fenilalanin)																					✓	✓	✓	✓	✓	✓
42	P(prolin)																					✓	✓	✓	✓	✓	✓
106	G (glisin)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓
264	Y (tirozin)													✓	✓		✓										
264	H (histidin)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
306	G (glisin)	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
419	N (asparjin)	✓	✓	✓	✓	✓				✓			✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓						
419	K (lisin)						✓	✓	✓		✓	✓				✓			✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓
420	N (asparjin)	✓	✓	✓	✓	✓				✓			✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓						
420	P (prolin)						✓	✓	✓		✓	✓				✓			✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓
601	R (arjinin)		✓							✓		✓					✓				✓				✓		
601	G (glisin)	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓

Not: *Gallus gallus* (GG), *Gallus Gallus* (GG), Barne velder bantam (BV), Brahma bantam (BB), Czech (CZ), Aseel (AS), Araucana (AC), Malay (ML), Minorka (MN), Orloff (OR), Silkie (SL), Game shamo (GS), La-fleche (LF), Sebright (SB1), Frizzle (FZ), Royal (RY), Luiwu black (LB), Hy-linevariety brown (HY), Beijing fatty (BF), Leghorn (LG1), Lingnan yellow (LY) ve Arian (AR), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ). (✓ olan ilgili amino asitin varlığını belirtmektedir.)

EK-14. Denizli ve Gerze tavuk ırklarını *ChTLR5* bakımından protein sekans dizisinin 663 nükleotit bölgesinin diğer tavuk ırkları ile kıyaslanması

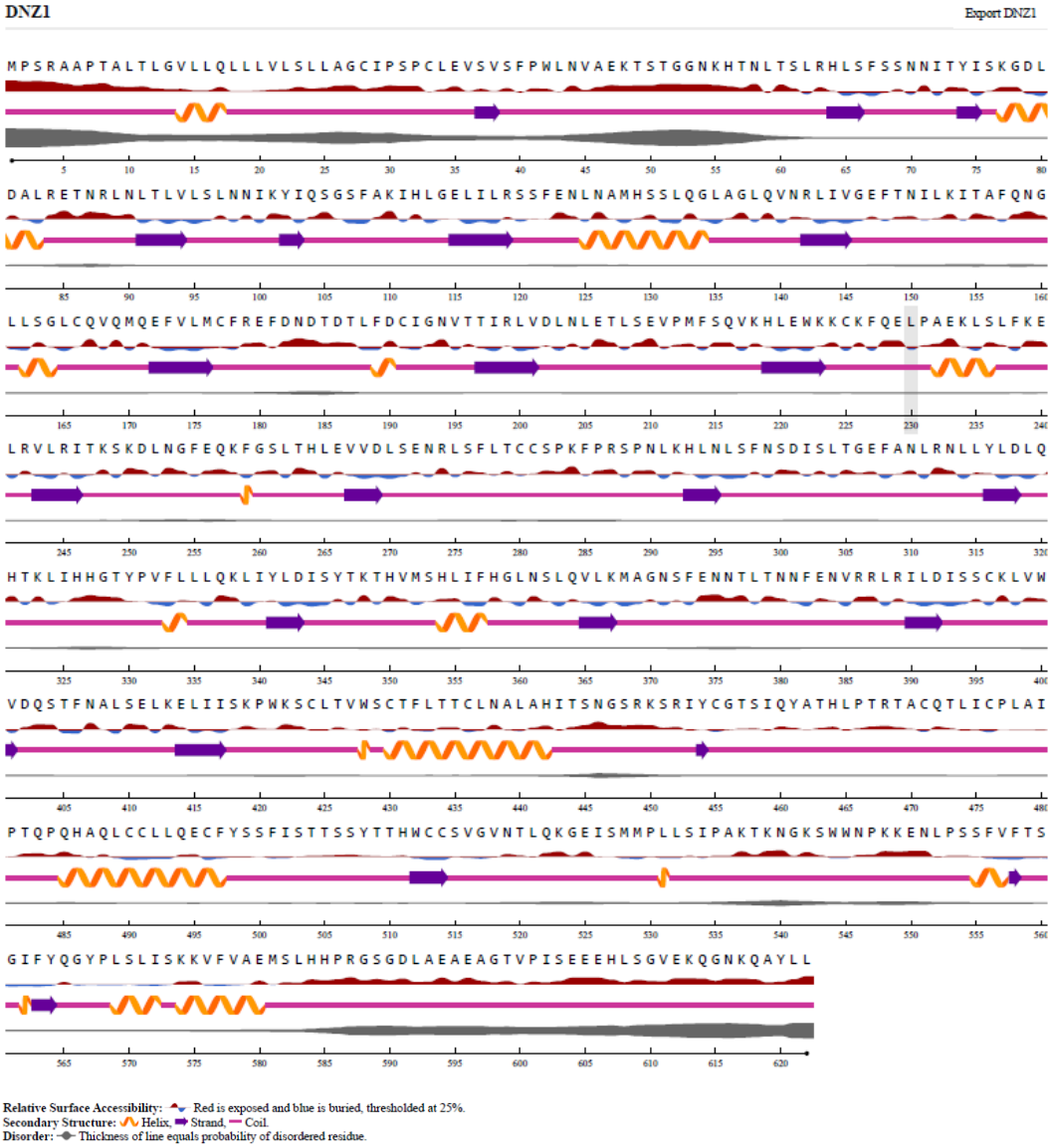
Not: Koyu renkte görünen *ChTLR5*'in Denizli, Gerze ve diğer tavuk ırkları ile olan amino asit dizisindeki farlı nükleotit pozisyonlarını göstermektedir.

EK-15. Denizli ve Gerze tavuk ırklarını *ChTLR15* bakımından protein sekans dizisinin 820 nükleotit bölgesinin diğer tavuk ırkları ile kıyaslanması

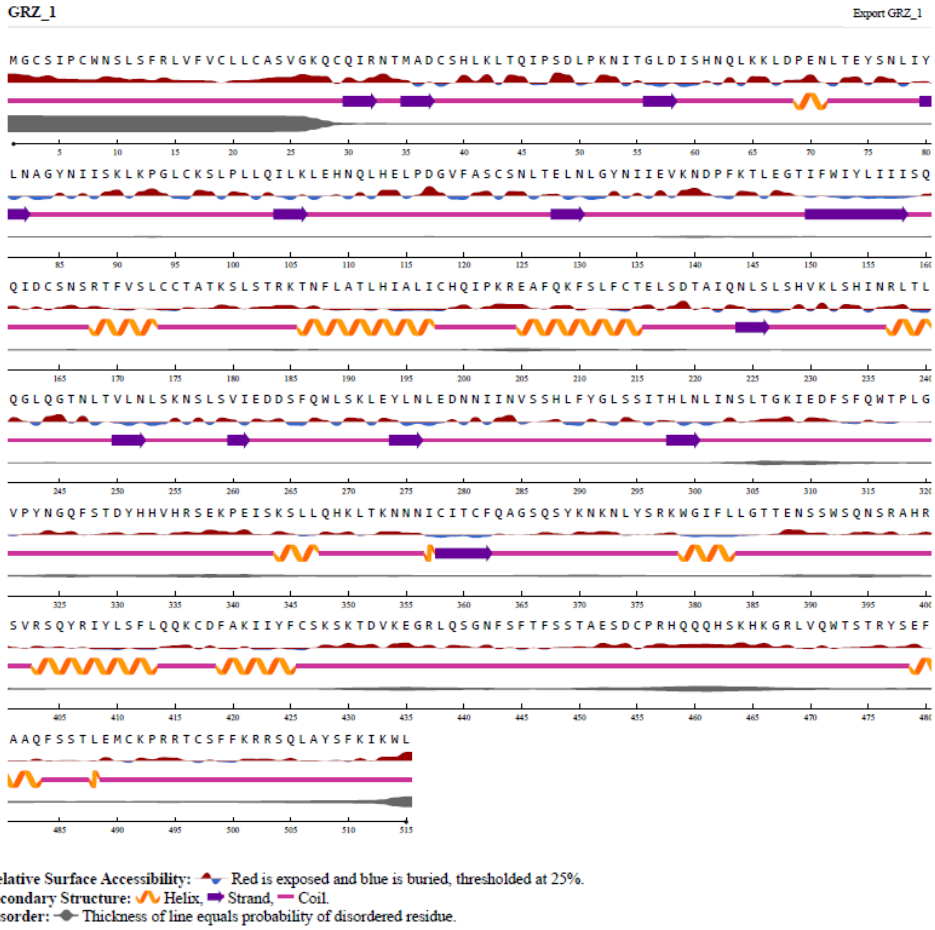


Not: Koyu renkte görünen *ChTLR15*'in Denizli, Gerze ve diğer tavuk ırkları ile olan amino asit dizisindeki farlı nükleotit pozisyonlarını göstermektedir.

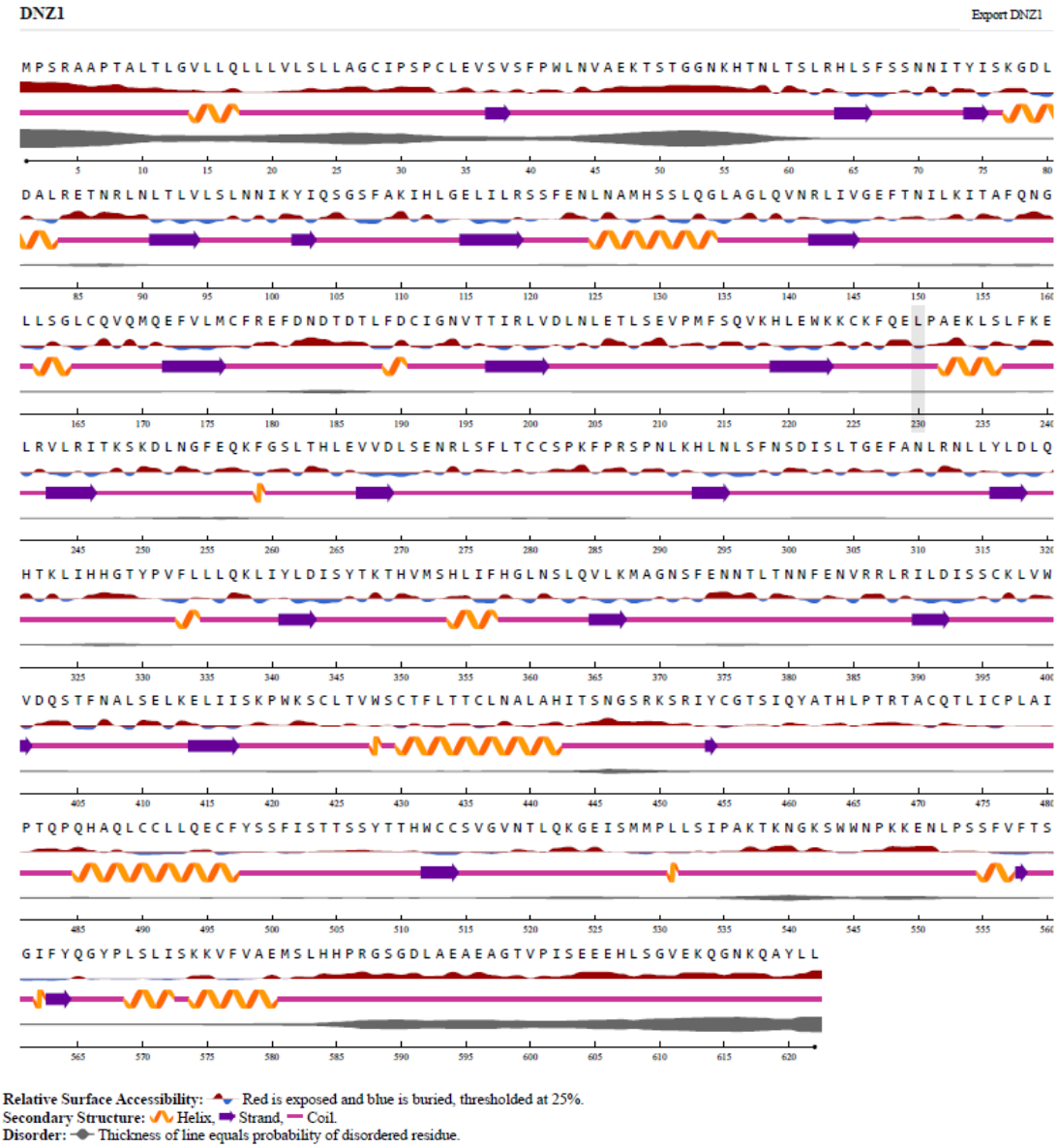
EK-16. Denizli tavuğunun *ChTLR3* 622 nükleotit amino asit residüsüne ait görsel (SMART programından alınmıştır)



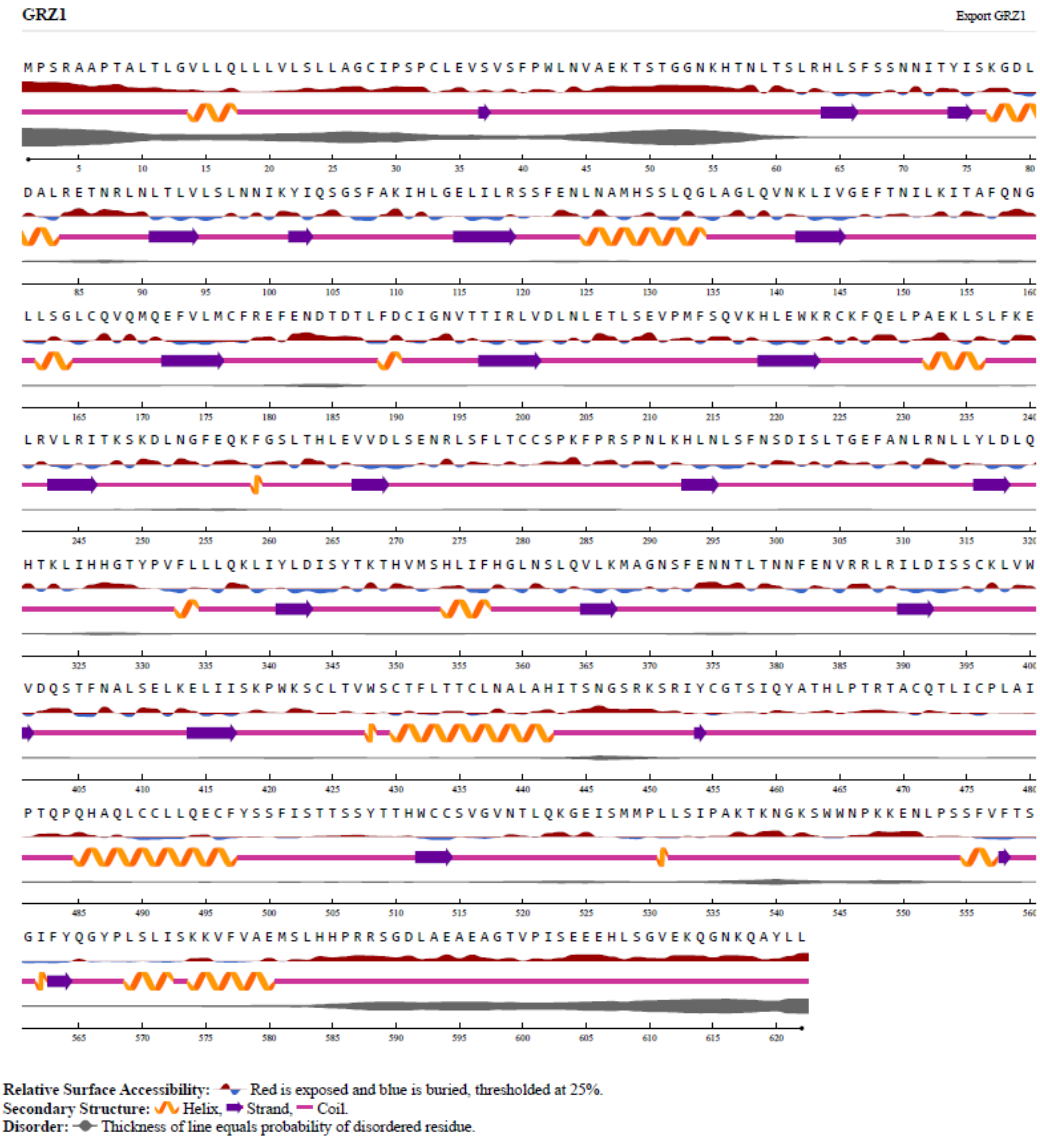
EK-17. Gerze tavuğunun *ChTLR3* 515 nükleotit amino asit residüsüne ait görsel (SMART programından alınmıştır)



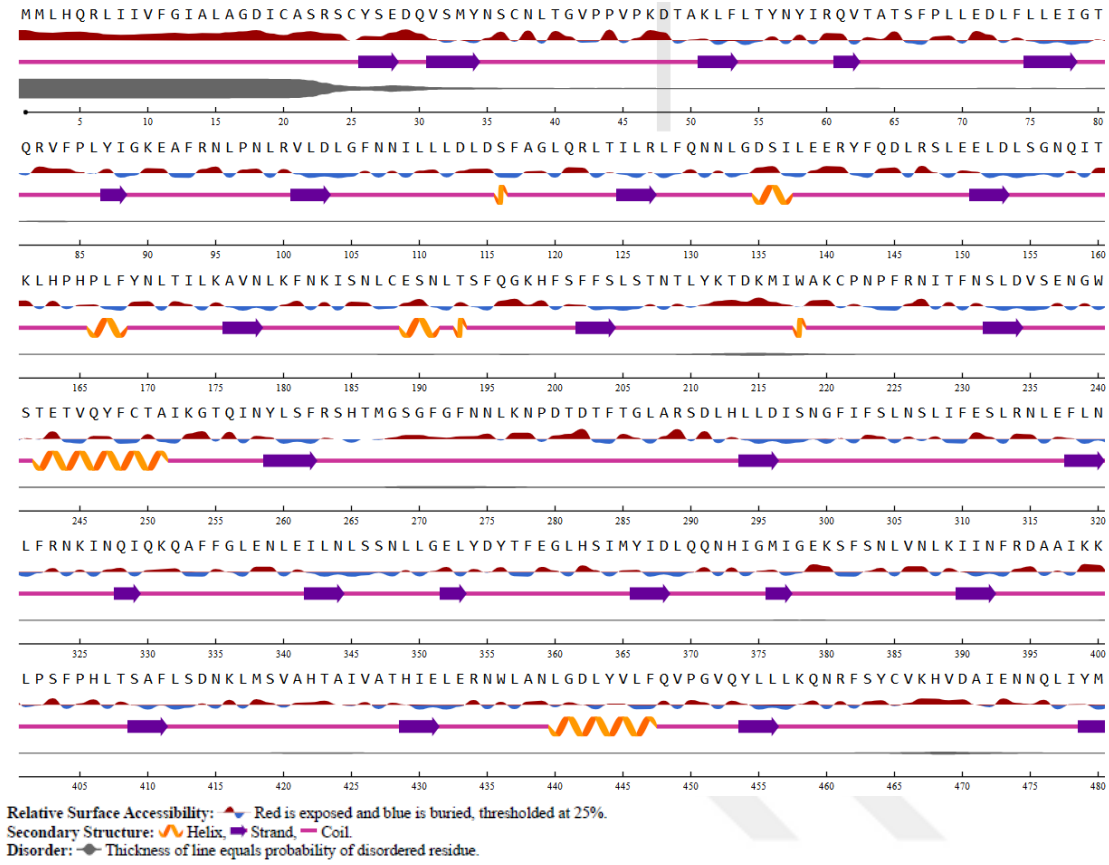
EK-18. Denizli tavuğunun *ChTLR4* 622 nükleotit amino asit residüsüne ait görsel (SMART programından alınmıştır)



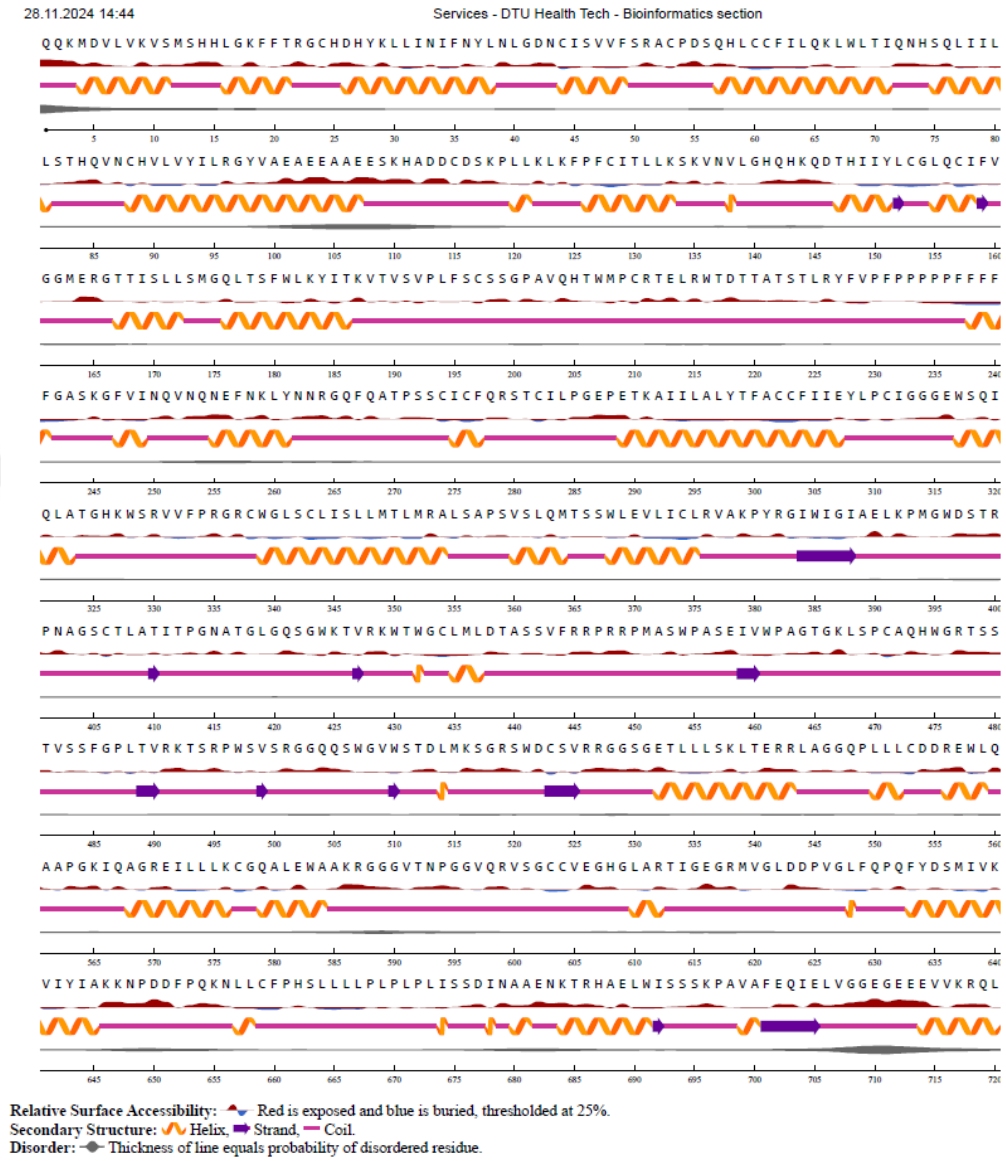
EK-19. Gerze tavuğunun *ChTLR4* 622 nükleotit amino asit residüsüne ait görsel (SMART programından alınmıştır)



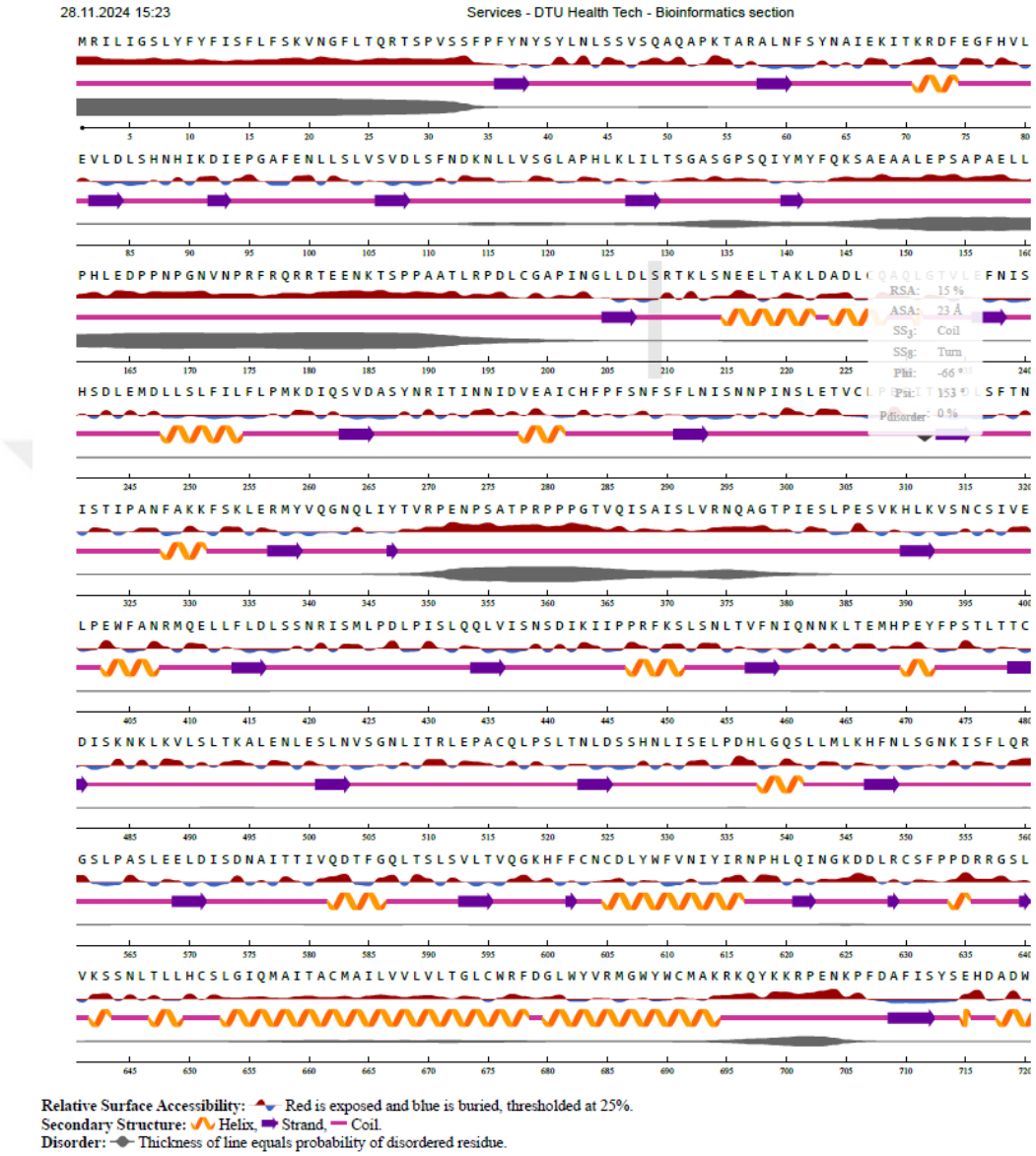
EK-20. Denizli tavuğunun *ChTLR5* 720 nükleotit amino asit residüsüne ait görsel (SMART programından alınmıştır)



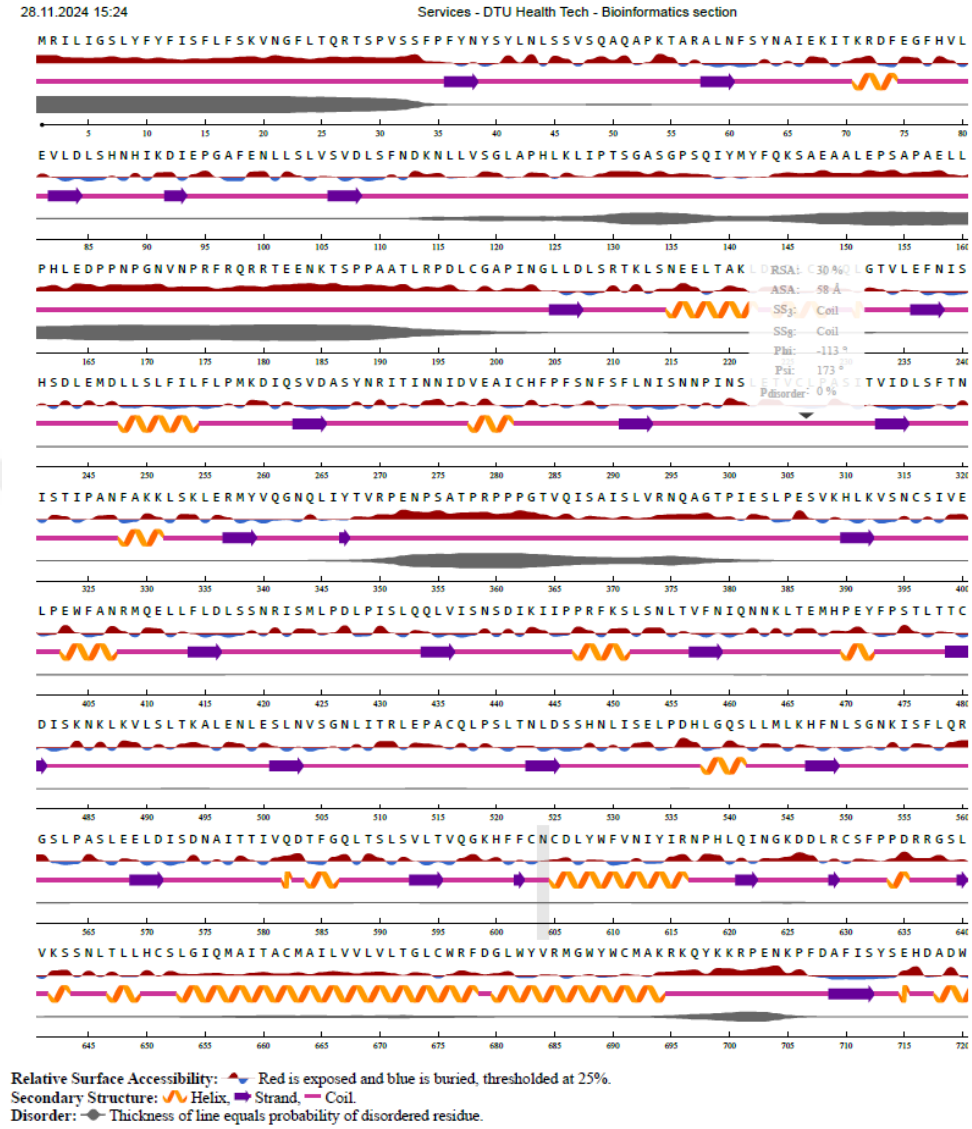
EK-21. Gerze tavuğunun *ChTLR5* 720 nükleotit amino asit residüsüne ait görsel (SMART programından alınmıştır)



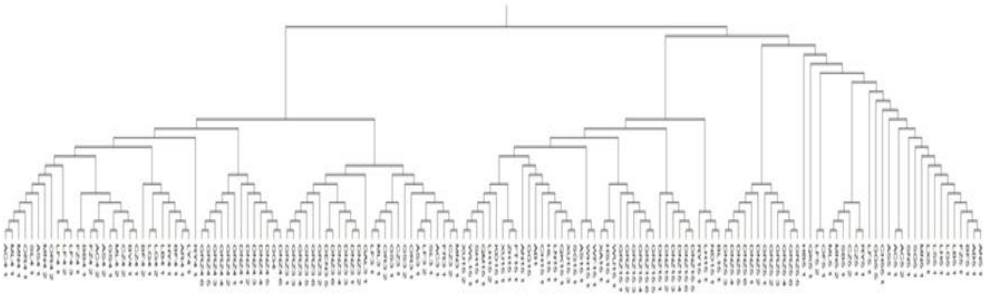
EK-22. Denizli tavuğunun *ChTLR15* 820 nükleotidin bir kesitinin amino asit residüsüne ait görsel (SMART programından alınmıştır)



EK-23. Gerze tavuğunun *ChTLR15* 820 nükleotidin bir kesitinin amino asit residüsüne ait görsel (SMART programından alınmıştır)

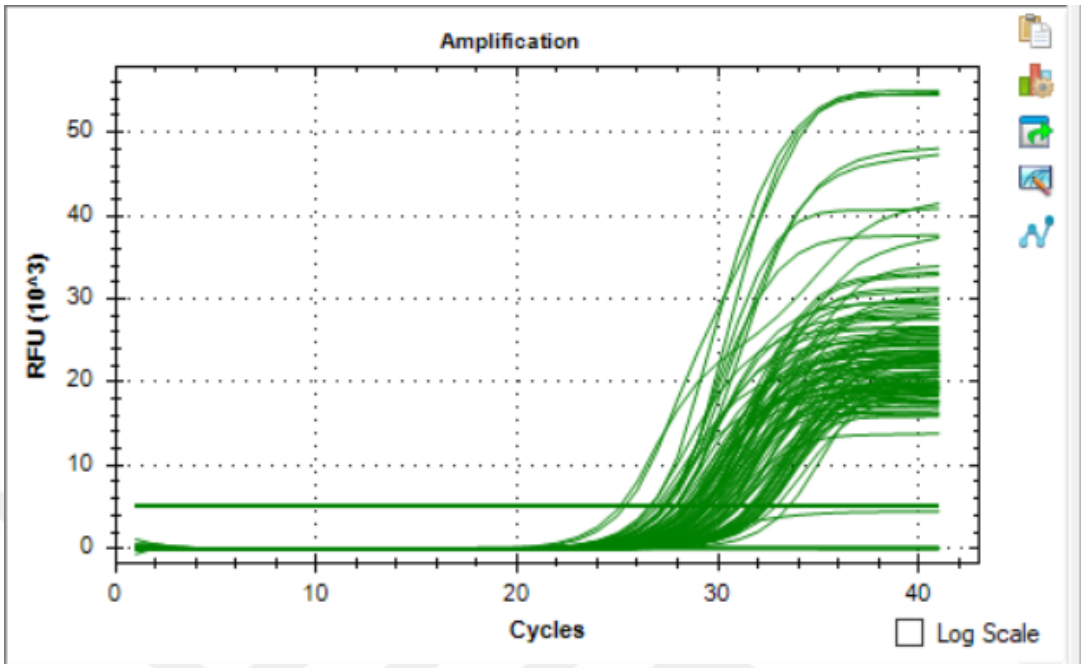


EK-24. Tez kapsamında çalışılan tüm reseptörlere ait NCBI veri bankasında verilen diğer ırklar ile Denizli ve Gerze tavuklarına ait genetik ağaç



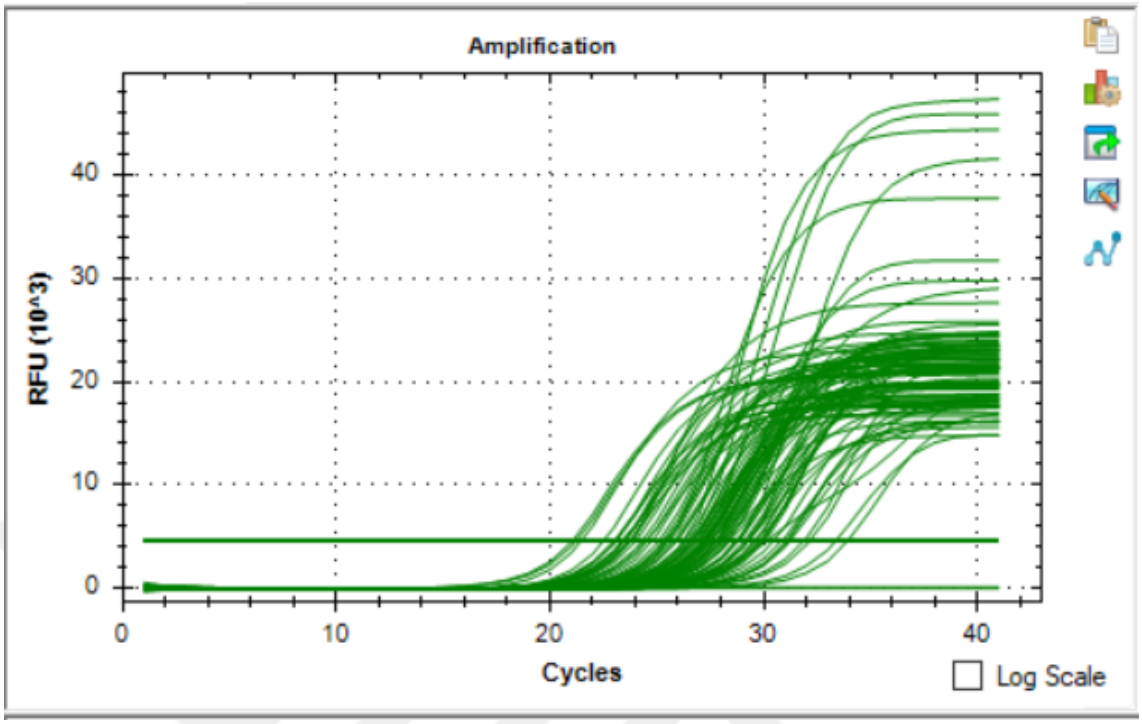
Not: ChTLR3 için *Gallus Gallus* (GG1), *Gallus gallus* (GG2), *Gallus gallus* (GG3), Silkie (SL1), Czech (CZ1)), Game shamo (GS1), Game shamo (GS2), Frizzle (FR1), Araucana (AC1), Czech (CZ2)), Minorka (MN1), Orloff (OR1), Orloff (OR2), Malay (ML1), La-fleche (LF1), La-fleche (LF2), Araucana (AC2), Aseel (AS1), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ). (✓ olan ilgili amino asitin varlığını belirtmektedir.). ChTLR4 için *Gallus gallus* (GG), *Gallus Gallus* (GG), Barne velder bantam (BV), Brahma bantam (BB), Czech (CZ), Aseel (AS), Araucana (AC), Malay (ML), Minorka (MN), Orloff (OR), Silkie (SL), Game shamo (GS), La-fleche (LF), Sebright (SB1), Frizzle (FZ), Royal (RY), Luiwu black (LB), Hy-linevariety brown (HY), Beijing fatty (BF), Leghorn (LG1), Lingnan yellow (LY) ve Arian (AR), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ). ChTLR5 için *Gallus gallus* (GG1), Aseel (AS1), Leghorn (LG1), Beijing fatty (BF1), Hy-line variety brown (HB1), Laivu black (LB1), Royal (RY1), *Gallus gallus* (GG2), La-fleche (LF1), La-fleche (LF2), Minorka (MN1), Orloff (OR1), Czech (CZ1), Minorca (MN2), Czech (CZ2), Malay (ML1), Sebright (SB1), Frizzle (FZ1), Araucana (AC1), Araucana (AC2), Longxima (LX1), Anka (AN1), Luhua (LH1), Xianju (XJ2), A. A broiler (AB1), Qingke (QK1), Sanhuang (SN1), Xueshancao (XU1), Chongrenma (CH1), Shigiza (SG1), Lonshan (LS1) , *Gallus gallus* (GG3), *Gallus gallus* (GG4), *Gallus gallus* (GG5), *Gallus gallus* (GG6), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ). ChTLR15 için *Gallus gallus* (GG1), *Gallus gallus* (GG2), Beijing fatty (FT1), Nongda (ND1), Luhua (LH1), Hy-line variety brown (HL1), Black (BL1), Royal (RY), White leghorn (WL1), White (WH1), Kadaknath (KD1), Aseel (AS1), Chongrenma (CH1), Zhongbai (ZH1), Xueshanma (XU1), Xueshanhuang (XU2), Xueshancao (XU3), Wugu (WU1), Sanhuang (SH1), Qinjiaoma (QM1), Qinke (QK1), A.A broiler (AB1), Xianju (XA1), Luhua (LH2), White feather (WF1), Anka (AN1), Lanshan (LN1), Haisailesi (HS1), Shigiza (SG1), *Gallus gallus* (GG3), *Gallus gallus* (GG4) , *Gallus gallus* (GG5), *Gallus gallus* (GG6), *Gallus gallus* (GG7), *Gallus gallus* (GG8), *Gallus gallus* (GG9), *Gallus gallus* (GG10), Denizli (DNZ) ve Gerze (GRZ).

EK-25. Gerze tavuğuna ait ilk 1-10 örneğin RT-qPCR amlifikasyon grafiği.



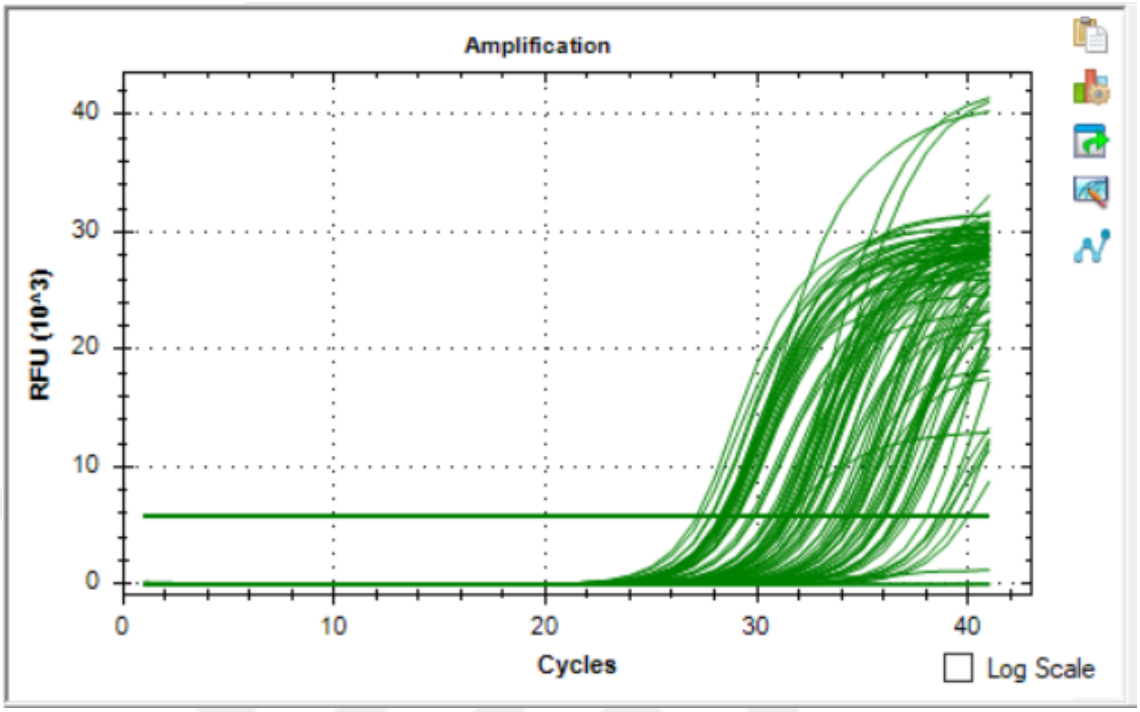
Not: mRNA ifade sevilerinin ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$ değerleri, ligand muamele gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir.

EK-26. Gerze tavuğuna ait ilk 11-20 örneğin RT-qPCR amlifikasyon grafiği.



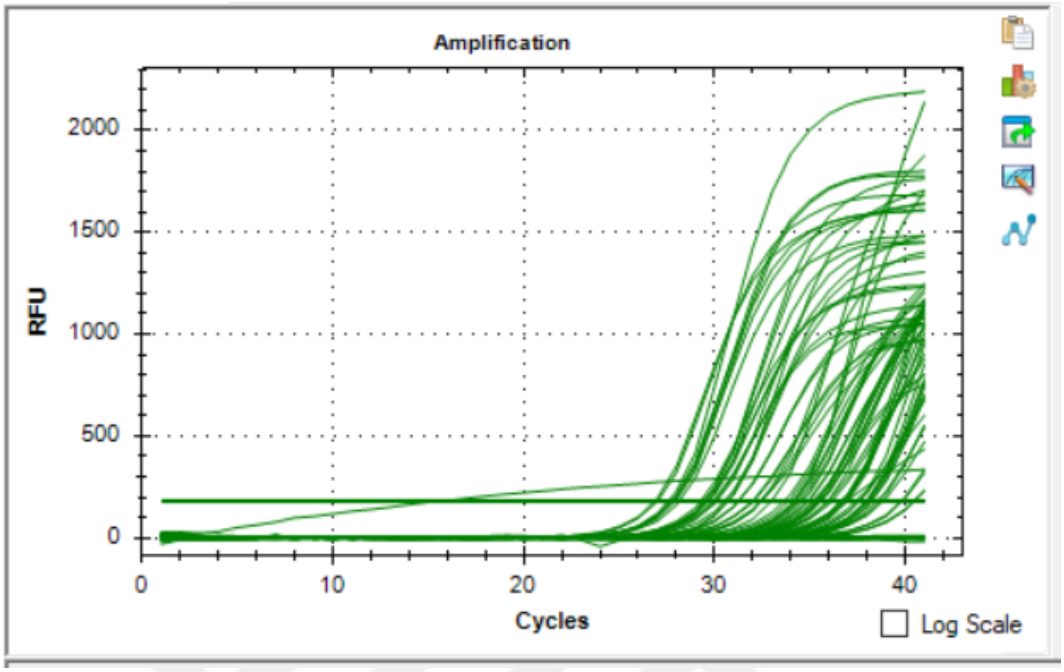
Not: mRNA ifade sevilerinin ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$ değerleri, ligand muamele gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir.

EK-27. Gerze tavuğuna ait ilk 21-30 örneğin RT-qPCR amlifikasyon grafiği.



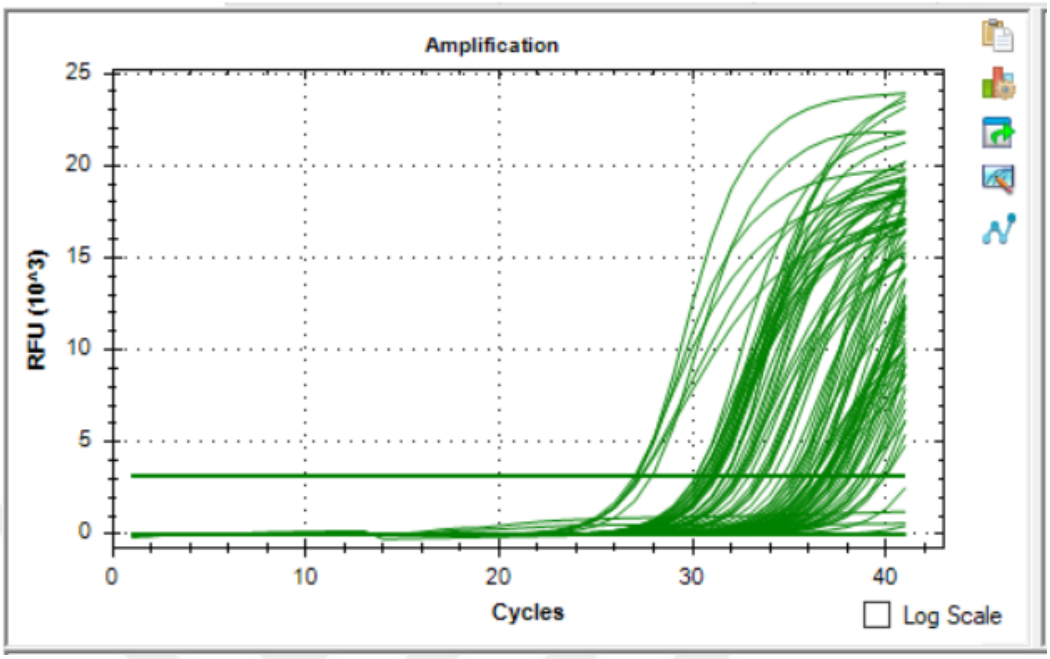
Not: mRNA ifade sevilerinin ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$ değerleri, ligand muamele gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir.

EK-28. Gerze tavuğuna ait ilk 31-40 örneğin RT-qPCR amlifikasyon grafiği.



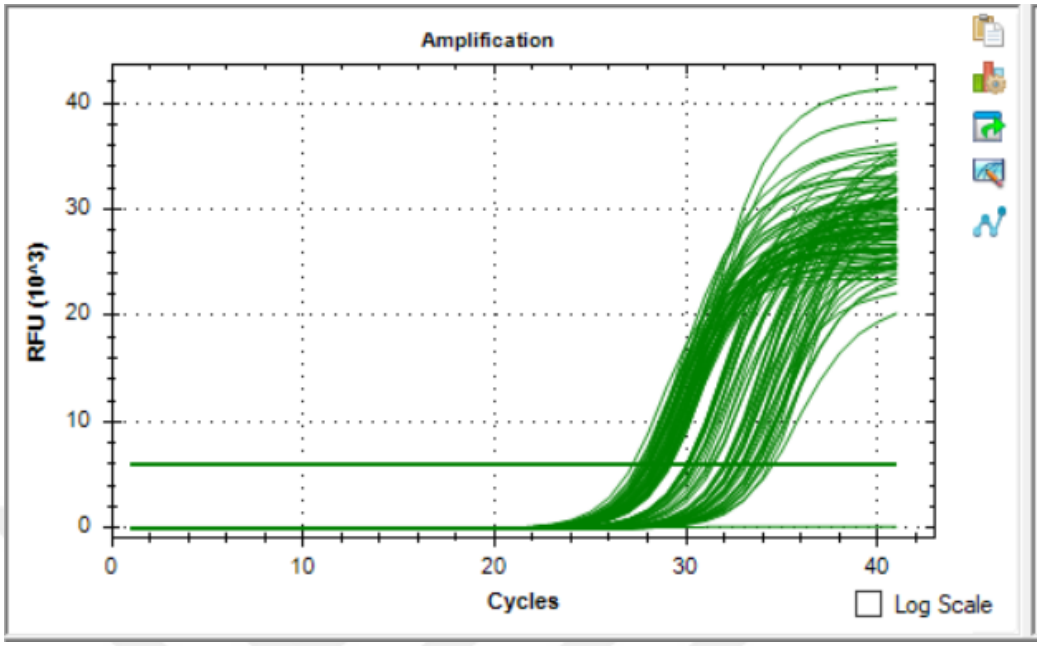
Not: mRNA ifade sevilerinin ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$ değerleri, ligand muamele gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir.

EK-29. Gerze tavuğuna ait ilk 31-40 örneğin RT-qPCR amlifikasyon grafiği.



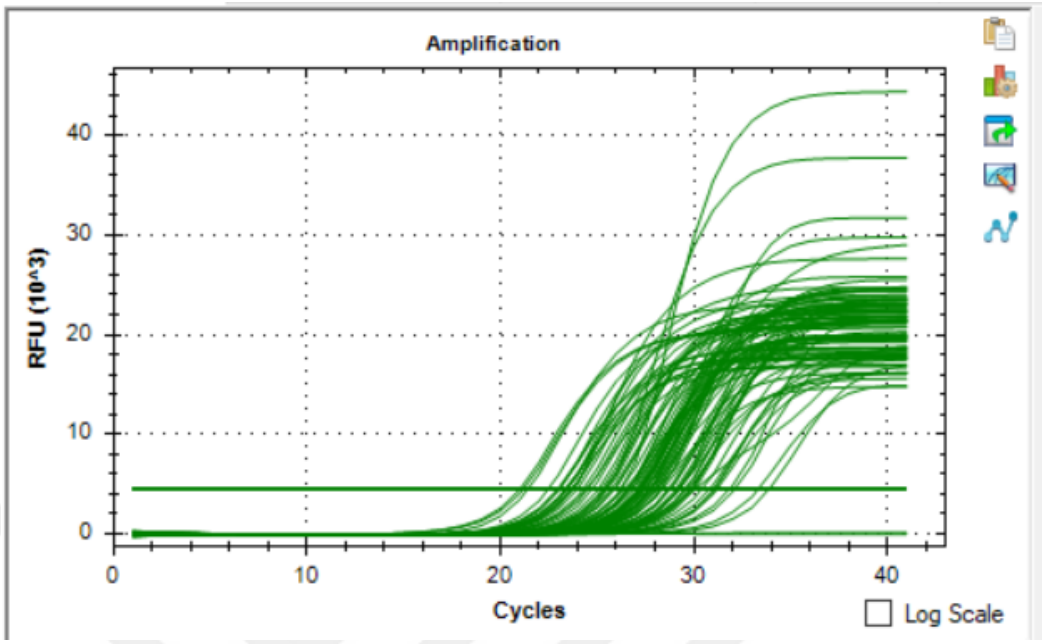
Not: mRNA ifade sevilerinin ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$ değerleri, ligand muamele gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir.

EK-30. Gerze tavuğuna ait ilk 41-50 örneğin RT-qPCR amlifikasyon grafiği.



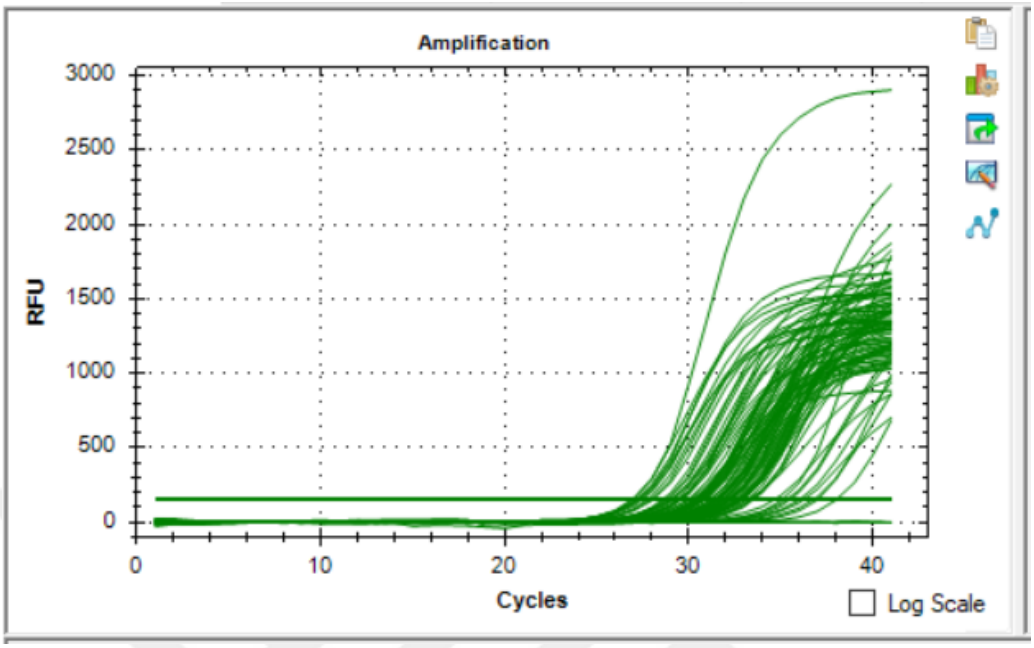
Not: mRNA ifade sevilerinin ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$ değerleri, ligand muamele gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir.

EK-31. Gerze tavuğuna ait ilk 41-50 örneğin RT-qPCR amlifikasyon grafiği.



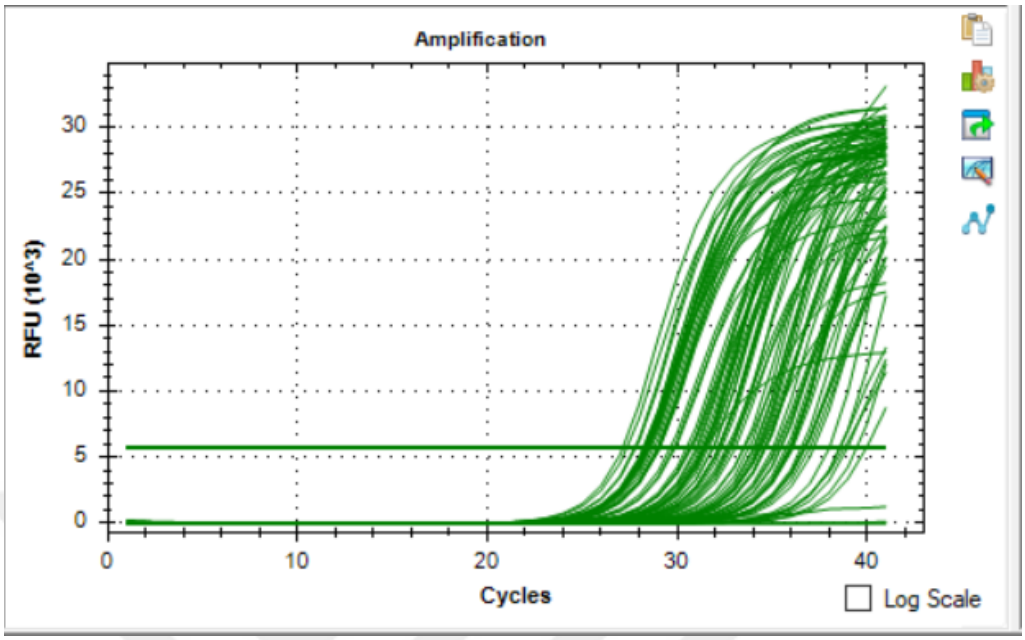
Not: mRNA ifade sevilerinin ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$ değerleri, ligand muamele gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir.

EK-32. Gerze tavuğuna ait ilk 51-60 örneğin RT-qPCR amlifikasyon grafiği.



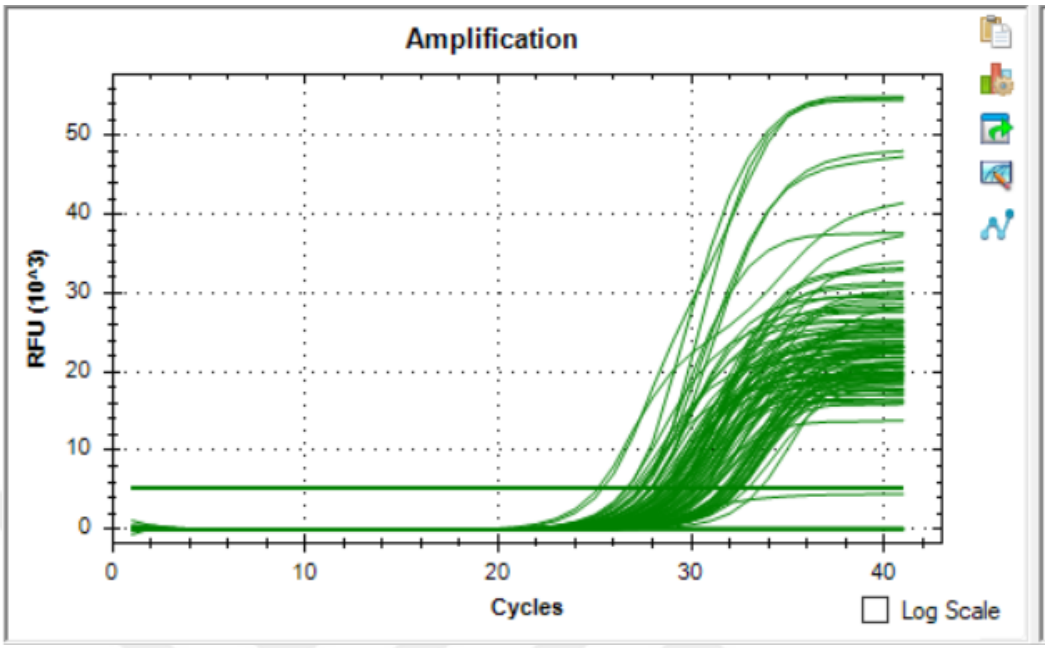
Not: mRNA ifade sevilerinin ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$ değerleri, ligand muamele gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir.

EK-33. Gerze tavuğuna ait ilk 61-70 örneğin RT-qPCR amlifikasyon grafiği.



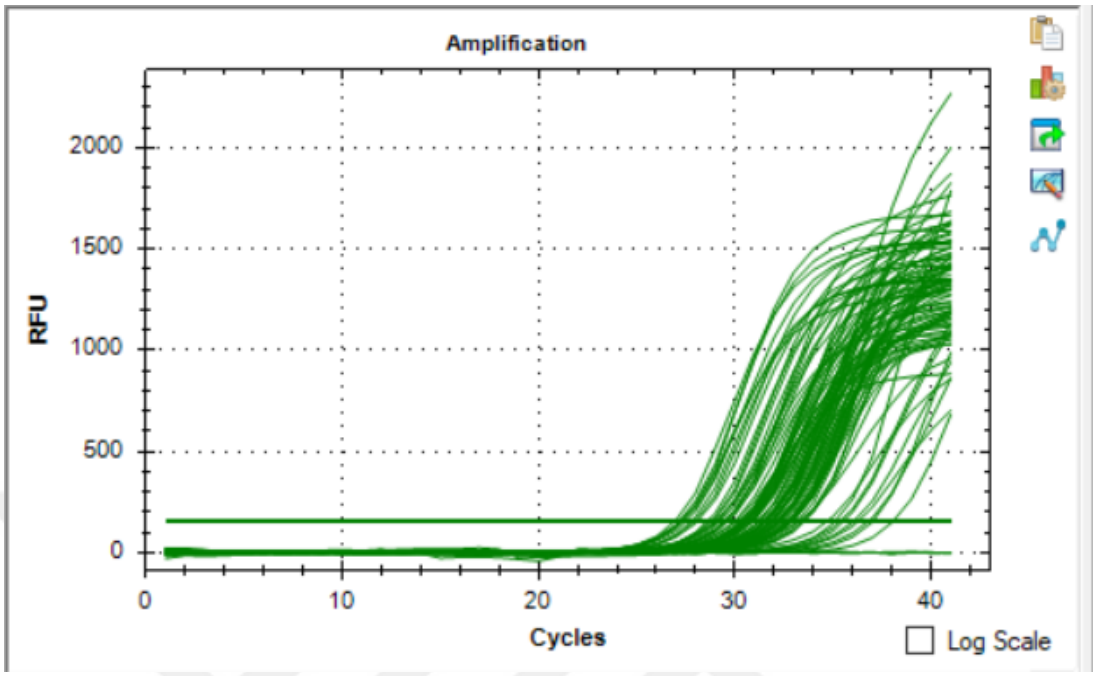
Not: mRNA ifade sevilerinin ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$ değerleri, ligand muamele gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir.

EK-34. Gerze tavuğuna ait ilk 61-70 örneğin RT-qPCR amlifikasyon grafiği.



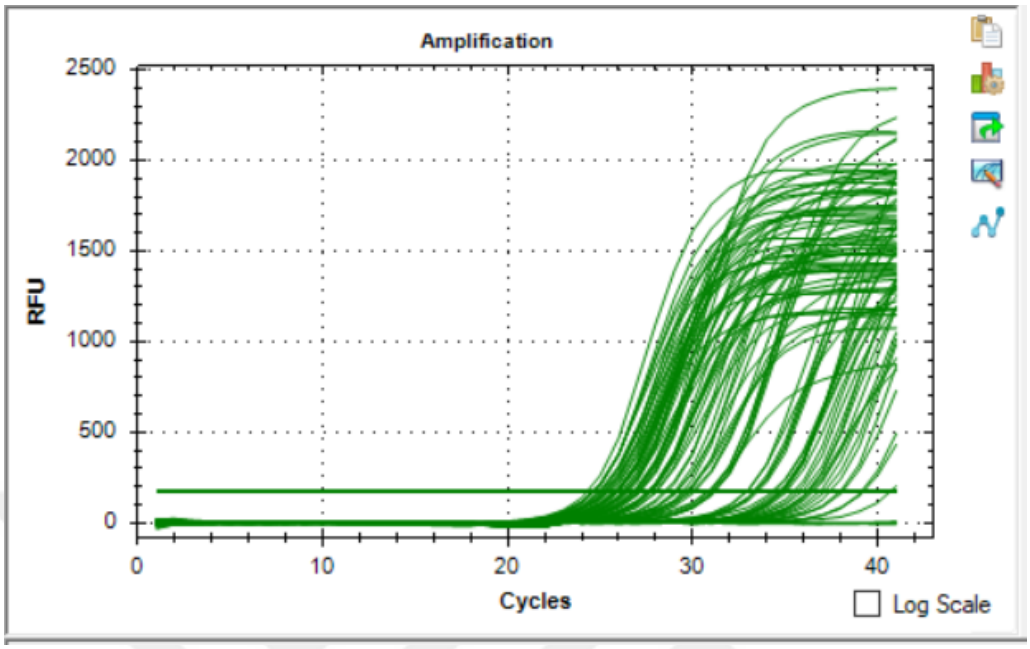
Not: mRNA ifade sevilerinin ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$ değerleri, ligand muamele gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir.

EK-35. Gerze tavuğuna ait 71-80 örneğin RT-qPCR amlifikasyon grafiği.



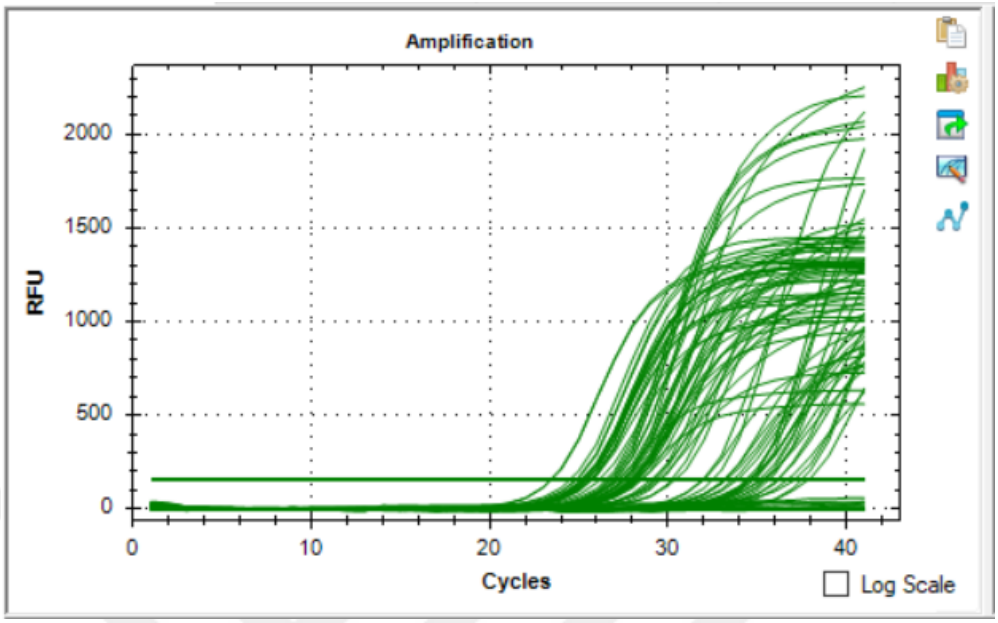
Not: mRNA ifade sevilerinin ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$ değerleri, ligand muamele gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir.

EK-36. Denizli tavuğuna ait 1-10 örneğin RT-qPCR amlifikasyon grafiği.



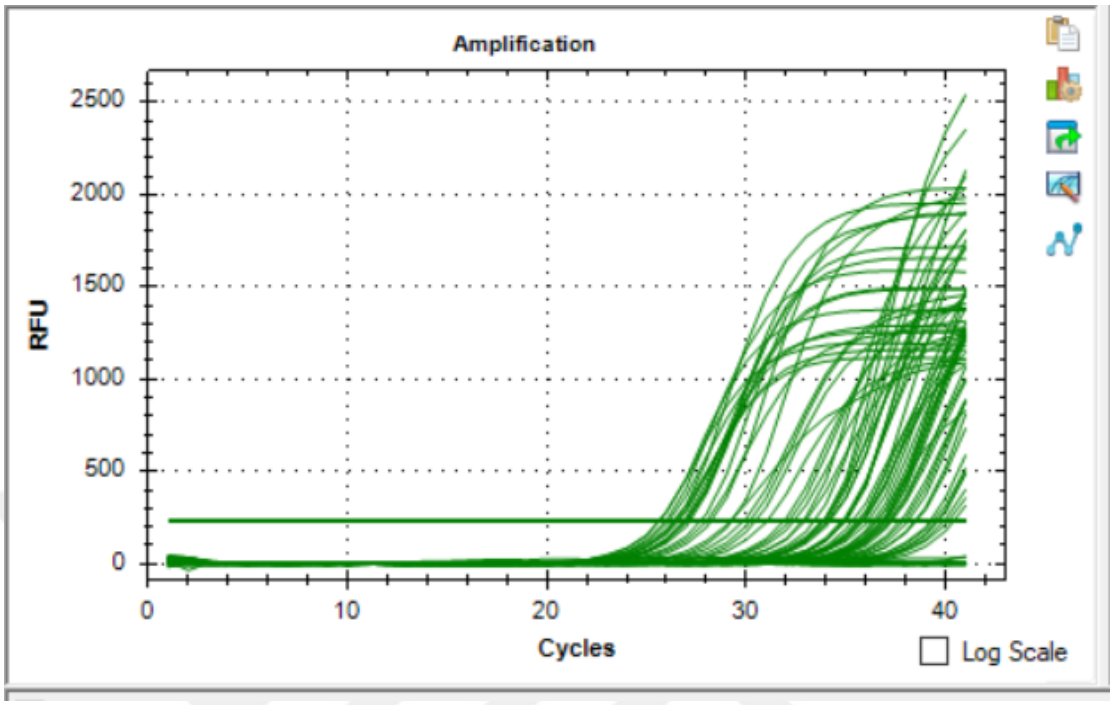
Not: mRNA ifade sevilerinin ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$ değerleri, ligand muamele gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir.

EK-37. Denizli tavuğuna ait 11-20 örneğin RT-qPCR amlifikasyon grafiği.



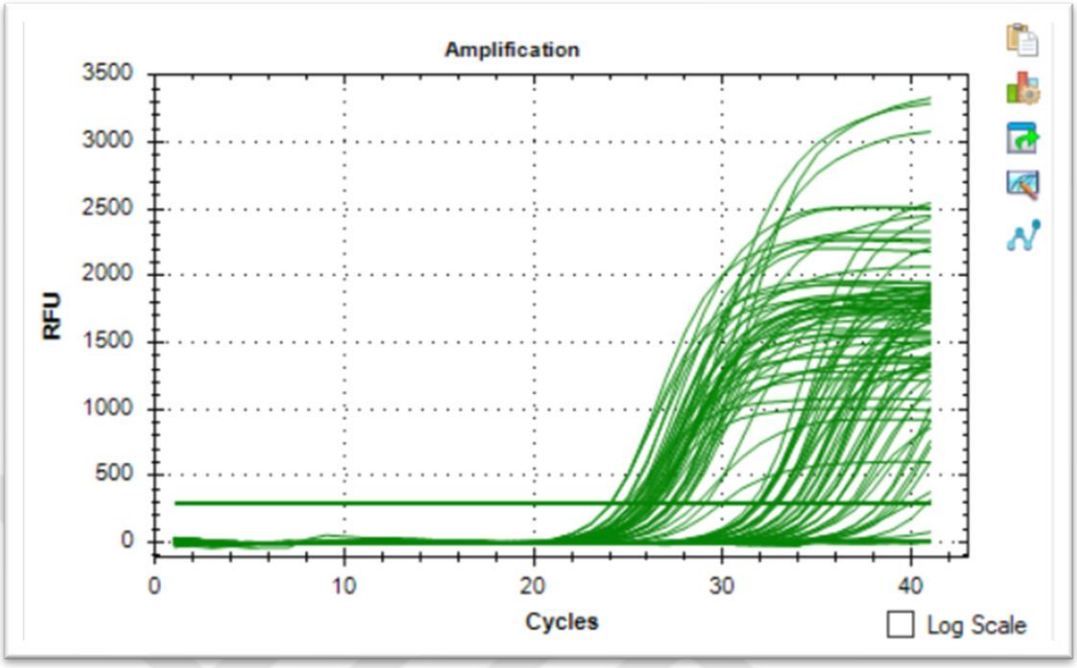
Not: mRNA ifade sevilerinin ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$ değerleri, ligand muamele gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir.

EK-38. Denizli tavuğuna ait 21-30 örneğin RT-qPCR amlifikasyon grafiği.



Not: mRNA ifade sevilerinin ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$ değerleri, ligand muamele gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir.

EK-39. Denizli tavuğuna ait 31-40 örneğin RT-qPCR amlifikasyon grafiği.



Not: mRNA ifade sevilerinin ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır. Muamele gruplarında $\Delta\Delta C_q$ değerleri, ligand muamele gruplarının C_q değerinden kontrol grubunun C_q değerleri arasındaki fark alınarak belirlenmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

Leyla BENER

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2018-2025	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Antalya
Yüksek Lisans 2015-2018	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı Samsun
Lisans 2011-2015	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Samsun

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1- Ozdemir, D., **Bener, L.,** & Akcay, E. T. 2024. Optimizing Genomic DNA Extraction from Avian Feathers: A Modified Phenol–Chloroform Approach for Enhanced Efficiency and Cost-Effectiveness. *Biochemical Genetics*, 1-12.

2- **Bener, L.,** Ersal, M., & Yıldız, B. İ. (2019). Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların Tespiti ve Ölçümünde Kullanılan Farklı Gerçek Zamanlı PCR Kimyasallarının Karşılaştırılması. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7, 133-137.

3- Gültekin, A.K., Özdemir, D., **Bener, L**. Toparslan, E., vd (2023). Identification of local camel populations in Turkiye using morphological, genetic, and breeding info. *Trop Anim Health Prod* 55, 321.

4- **Bener, L.,** Yaşar, R., & Kuran, M. (2018). Isi şok proteinleri ve *in vitro* embriyo. *Black Sea Journal of Agriculture*, 1(3), 89-93.

5- **Bener, L.,** & Kuran, M. (2019). Determination of 70 kDa Proteins for Different Temperatures in Cattle Oocytes Matured *in vitro*. *Black Sea Journal of Engineering and Science*, 2(4), 112-116.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1- **Bener, L.,** & Özdemir, D. (2019, December). Inheritance of Economical Significant Feather Color and Feather Patterns in Hobby and Ornamental Poultry. In *Congress Book* (p. 21). Cumhuriyet University.

2- **Bener, L**., & Özdemir, D. (2018). Hayvancılıkta Üç Boyutlu Hücre Kültürü, Avantaj ve Dezavantajları.

3- **Bener, L.,** & Özdemir, D. (2020). The Role of Toll-Lıke Receptors (Tlrs) ın Antıvıral Mechanısm ın Chıckens. IV. International Congress on Domestic Animal Breeding, Genetics and Husbandry- 2020 (ICABGEH-20) ONLINE, 12 – 14 AUGUST, 2020. S 140.

4- **Bener, L.,** & Özdemir, D. (2019). mtDNA-A Powerful Tool For Phylogenetic and Biodiversity Search in Chickens. September 2019. Conference: International Congress on Domestic Animal Breeding, Genetics and Husbandry (ICABGEH-19) 11 – 13 September 2019, Prague, CZECHIA.

5- **Bener, L.**, Şen, U ve Kuran, M., (2018). Determination of 70 KDA Proteins in Cattle Oocytes Matured Different Heat Conditions. Conference: International Congress on Domestic Animal Breeding, Genetics and Husbandry (ICABGEH-2018 Antalya.

6- Ozdemir, D., **Bener L.**, (2018). Heat Shock Proteins as Bio-Indicators of Stress in Farm Animals. International Conference on Multidisciplinary SciencesAt: İstanbul.

7- **Leyla Bener**, Mustafa Ersal1, Berkant İ. Yıldız, Demir Özdemir, Kemal Karabağ. (2019). Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların Tespiti ve Ölçümünde Kullanılan Farklı Gerçek Zamanlı Pcr Kimyasallarının Karşılaştırılması. 4th International Anatolian Agriculture, Food, Environment and Biology Congress-2019 s. 430.

Projeler

1. Farklı sıcaklıklarda *in vitro* olgunlaştırılan sığır oositlerinde ısı şok proteini 70'in belirlenmesi. 2017-2018. **BAP PYO. ZRT. 1904. 17. 031**

2. Antalya Habitatında Bulunan Bombus terrestris dalmatinus Arılarında Sıcak Şok Proteinleri (Hsp60, Hsp70 ve Hsp90) Bakımından Genetik Potansiyelinin Araştırılması 2019-2021. **BAP-FKA-2019-4461**

3. Yerli İspenç Tavuğunda Genetik Polimorfizmin SSR Markerler ile Belirlenmesi 2019-2021. **BAP-FBA-2019-4824**

4. Denizli ve Gerze Tavuk Irklarında *TLR3 TLR4 TLR5* ve *TLR15* Reseptörlerinin *in vivo* ve *in vitro* Şartlarda Genetik Polimorfizminin Araştırılması 2023-2024. **BAP FDK-2023-6095**

5. Ispenç Tavuk Irkı Popülasyonlarının Mitogenom Dizi Analizine dayalı Genetik Karakterizasyonu 2021-2022. **TÜBİTAK 220O069**

6. Biyoteknoloji Destekli Yerli Hibrit Süs Ayçiçeği Hatlarının Geliştirilmesi 2023-2025. **TÜBITAK-122R004.**

7. Ege ve Akdeniz Bölgelerinde Yerli Olarak Adlandırılan Develerin Bazı Morfolojik, Fizyolojik ve Genetik Özelliklerinin Belirlenmesi Çerçevesinde Etik Değerlendirmesinin Yapılması. **BAP-VTF-20023**

Tezler

1. Lisans, “Bal Enzimleri”. 2015

2. Yüksek Lisans, “Farklı sıcaklıklarda *in vitro* olgunlaştırılan sığır oositlerinde ısı şok proteini 70'in belirlenmesi” 2018.

3. Doktora Tezi, “Denizli ve Gerze tavuk ırklarında *TLR3 TLR4 TLR5* ve *TLR15* reseptörlerinin *in vivo* ve *in vitro* şartlarda genetik polimorfizminin araştırılması” 2025.

Hakemlik

B P International, Innovations in Biological Science, peer-reviewing, 29.05.2024