



Tarım Bilimleri Dergisi
Tar. Bil. Der.

Dergi web sayfası:
www.agri.ankara.edu.tr/dergi

Journal of Agricultural Sciences

Journal homepage:
www.agri.ankara.edu.tr/journal

Tavuklarda Marek Hastalığı'na Karşı Dirençli Genlerin SNP Genetik Markerlerinden Yararlanılarak Belirlenmesi

Hasan MEYDAN^a, Mehmet Ali YILDIZ^a, Hans H. CHENG^b

^aAkdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Hayvan Biyoteknolojisi Anabilim Dalı, 07058, Antalya, TÜRKİYE

^bAnkara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootehni Bölümü, Biyometri ve Genetik Anabilim Dalı, 06100, Ankara, TÜRKİYE

^cUSDA, ARS, Avian Disease and Oncology Laboratory, 48823, East Lansing, MI, USA

ESER BİLGİSİ

Araştırma Makalesi

Sorumlu Yazar: Hasan MEYDAN, E-posta: meydan@akdeniz.edu.tr, Tel: +90 (242) 227 44 00

Geliş Tarihi: 14 Mart 2014, Düzeltmelerin Gelişi: 13 Ağustos 2014, Kabul: 22 Eylül 2014

ÖZET

Tavukçuluk endüstrisini tehdit eden hastalıklardan birisi olan Marek Hastalığı (MH), alfa-herpesviruslerden biri olan Marek Hastalık Virüsü (MHV)'nün neden olduğu, bulaşıcı ve kanserojen bir hastalıktır. MH'ye karşı dayanıklılığı arttırmak için başlıca yöntem günlük civcivlerin aşılmasıdır. Aşılama sonucunda bağışıklık sisteminde meydana gelen yetersizliklerden dolayı MH ile mücadelede diğer bir yöntem MH'ye genetik olarak dirençli tavukların yetiştirilmesidir. Bu çalışmada, tavuklarda *ENO1*, *TPT1* ve *RBBP4* genlerinin MH'ye karşı dayanıklılığa katkı sağlayıp sağlamadığı allele özgü ekspresyon tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Araştırmada, materyal olarak MH'ye dayanıklı (hat 6) ve duyarlı (hat 7) tavuk hatlarının resiprokal melezlenmesi sonucunda elde edilen F₁ döllerini kullanılmıştır. Tavukların *Bursa fabricius*, timus ve dalak organlarından RNA izole edilmiş ve pirosekanslama yöntemi ile her bir allelin ekspresyon seviyesi belirlenmiştir. Araştırma sonuçları, *TPT1* ve *RBBP4* genlerinin cis-acting elemente sahip olduğunu, ancak bu cis-acting elementlerin MH'na karşı direnç oluşturmada rol oynamadığını ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: *ENO1*; *TPT1*; *RBBP4*; ASE; Pirosekanslama; Genetik dirençlilik

Identification of the Genes that Confer Genetic Resistance to Marek's Disease in Chicken Using SNP Markers

ARTICLE INFO

Research Article

Corresponding Author: Hasan MEYDAN, E-mail: meydan@akdeniz.edu.tr, Tel: +90 (242) 227 44 00

Received: 14 March 2014, Received in Revised Form: 13 August 2014, Accepted: 22 September 2014

ABSTRACT

Marek's disease (MD), one of the most threatening diseases to poultry industry, is contagious disease of domestic chickens induced by the Marek's disease virus (MDV), a highly infectious and naturally oncogenic alphaherpesvirus. Enhancing resistance to MD in poultry is an attractive method to augment MD vaccines. Because the inadequacy in immune system occurs as a result of vaccine, the other method for avoiding from MD is to breed the chickens that are resistant to MD. In this study, *ENO1*, *TPT1* and *RBBP4* genes in chickens were screened whether they played a role in

resistance to MD by using allele-specific expression (ASE). The F₁ progeny of reciprocal intermatings between highly inbred chicken line 6 (MD resistant) and line 7 (MD susceptible) were sampled for this study. RNA was isolated from three organ tissues (*Bursa fabricius*, thymus and spleen) and the relative expression levels of each allele were monitored by using pyrosequencing method. The results suggested that *TPT1* and *RBBP4* genes have the cis-acting regulatory elements but these cis-acting elements do not play any role in conferring genetic resistance to MD.

Keywords: *ENO1*; *TPT1*; *RBBP4*; ASE; Pyrosequencing; Genetic resistance

© Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi

1. Giriş

Modern hayvancılık faaliyetleri sayesinde, tüketicilerin yüksek kaliteli ve daha güvenli hayvansal ürünlere artan istekleri başarıyla karşılanabilmektedir. Tavukçuluk endüstrisi de bu eğilimin yüksek seviyede gerçekleştirildiği bir hayvancılık faaliyetidir. Diğer türlerle kıyaslandığında tavukçuluktaki büyümenin ana nedeni ekonomik değeri yüksek olan özelliklerin ıslahında sağlanan büyük ilerlemelerdir. Bu amaçla, son yıllarda yapılan ıslah çalışmaları sonucunda genetik potansiyeli daha iyi ticari tavuk hatları elde edilmiştir (Havenstein et al 2003).

Hayvansal üretimin artırılabilmesi için çeşitli hastalıklara karşı dirençli, çevre koşullarına uyum sağlamış, yüksek verimli hatların geliştirilebilmesi gerekmektedir. Ticari tavuk hatlarının geliştirilmesinde bu hatların Marek Hastalığı (MH)'na karşı genetik olarak dirençli olması arzu edilmektedir. MH tavukçulukta ekonomik kayıplara neden olan en önemli hastalıkların başında gelmektedir. MH, Marek Hastalığı Virüsü (MHV)'nden kaynaklanan, kanserojen ve tümör oluşturan bir T hücre lenfoma hastalığıdır (Marek 1907). Hastalık özellikle evcil tavuklarda görülmesine rağmen çok nadir olarak hindi ve bildircinleri da etkileyebilmektedir (Nair et al 2008). Bu hastalık periferik sinirlerde, yumurtalıklarda, iç organlarda, gonadlarda, iriste, kaslarda ve deride meydana gelen yapısal bozukluklar, tümörler ve ölüm ile karakterize edilmektedir.

1970'lerden beri MH, öncelikli olarak civcivlerin aşılama ile kontrol altında tutulmaya çalışılmaktadır. Ancak aşılama rağmen MH'nin neden olduğu yıllık kayıp, et ve yumurta üretiminin

azalması sonucu dünya çapında milyarlarca dolara ulaşmaktadır (Purchase 1985). Aşılama ile MH belirtileri ve görülme sıklığı büyük oranda azaltılmasına rağmen MHV'nin çoğalması ve yayılması engellenememekte ve oluşan yetersiz bağışıklık nedeniyle tehdit olmaya devam etmektedir (Purchase & Okazaki 1971; Witter et al 1980; Schat et al 1981; Calnek 1998; Osterrieder et al 2006). Aşılama sonrası MHV'nin daha virulent hatlarının periyodik olarak ortaya çıkışı ile MH kontrolü daha etkili ve yeni aşılama geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır (Schat et al 1991; Witter 1997). Bu nedenle hastalıklara karşı dayanıklılığa katkı sağlayan genlerin belirlenmesi ve bu genler bakımından seleksiyon yapılması zorunlu hale gelmiştir. Moleküler genetik alanındaki gelişmeler sayesinde hastalıklara karşı dirençli olan genotipler belirlenebilmektedir. Kantitatif özellik lokuslarının (QTL) ve tarımsal önemi olan özellikleri belirleyen genlerin tanımlanması ve markere dayalı seleksiyon (MAS) yoluyla hastalıklara karşı genetik direnci artırmak mümkün olabilecektir.

MH'ye karşı dayanıklılığa katkı sağladığı belirlenen ilk genler, B kompleksi olarak bilinen ve tavuk bağışıklık sistemi ile ilişkili olan majör histokompatibilite kompleksi (MHC) genleridir (Bacon & Witter 1994a; 1994b). Yapılan çalışmalar *B²¹* alleleline sahip tavukların MH'ye karşı daha dayanıklı olduğunu, *B¹*, *B³*, *B⁵*, *B¹³*, *B¹⁵*, *B¹⁹* ve *B²⁷* allellerinin ise MH'ye karşı duyarlılıkla ilişkili olduğunu gösterilmiştir (Cheng 2003). Aynı *B* haplotipine sahip tavuk hatlarının MH'ye karşı dayanıklılıklarının farklı olduğu tespit edilince MHC olmayan genlerin de MH ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır (Lee et al 1981). Yapılan çalışmalar sonucunda birçok QTL lokusunun MH'ye karşı

dayanıklılıkla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Vallejo et al 1998; Yonash et al 1999; Cheng et al 2007). QTL lokuslarının yanı sıra bazı genlerin de MH'ye karşı dayanıklılığa katkı sağladığı ortaya koyulmuştur. İlk olarak tavuklarda büyüme hormonu geninin (*GHI*) MH'ye karşı dayanıklılıkla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Liu et al 2001). Daha sonra kök hücre antijeni 2 (*SCA2* veya *LY6E*) geninin tavuklarda MHV enfeksiyonundan sonra tümörlerin oluşma oranı ve tümörlerin hayatta kalabilme özellikleri ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Liu et al 2003). *CD79B* geninin MHV enfeksiyonuna yanıt veren bir cis-acting mekanizmasına sahip olduğu ve büyüme hormonu geni (*GHI*) ile birlikte MH'ye karşı direnç oluşturmada rol aldığı ortaya konulmuştur (Meydan et al 2011). RNA dizilemesi sonucunda 3773 gende bulunan 1089 SNP'nin MHV enfeksiyonundan sorumlu olduğu belirlenmiştir (MacEachern et al 2012). Son olarak da yumurtacı tavuklarda 434, broylerde ise 548 genin MHV enfeksiyonundan sonra ekspresyon seviyelerinin değiştiği ortaya konulmuştur (Perumbakkam et al 2013).

Son yıllarda Allele Özgü Ekspresyon (ASE) olarak adlandırılan bir teknik dikkat çekmekte olup, bu teknik ile heterozigot olduğuna karar verilmiş SNP bölgeleri için her allelin ekspresyon seviyesi ölçülebilmektedir. Herhangi bir gende allele özgü farklı ekspresyon gözlemlendiğinde allelik varyasyon cis-acting etkinin yansması olduğundan (Stamatoyannopoulos 2004), o gen için polimorfik bir cis-acting elementinin mevcut olduğu rahatlıkla söylenebilir. Aslında bu durum ASE yaklaşımının esasını oluşturmaktadır. Çünkü her iki allel de bir diploid hücrede yer aldığından, alleller arasındaki farklı ekspresyon seviyesi mutlaka bir cis-acting elementin etkisine bağlı olmalıdır (Cheung et al 2010; MacEachern et al 2012).

ENO1 geni enolaz enziminin izoenzimlerinden olan α -enolaz enzimini kodlamaktadır. α -enolaz genellikle olgun dokularda bulunmaktadır. *ENO1* geni ayrıca T ve B hücreleri gibi hematopoetik (kan yapıcı) hücrelerin yüzeyinde bulunmaktadır. *ENO1* ekspresyonu ile tümör oluşumu arasındaki doğrudan ilişki nedeni ile *ENO1*, birçok kanser ve nörolojik hastalık için tanımlayıcı bir marker

olarak önerilmektedir (Tanaka et al 1995). MHV proteinleri ile tavuk proteinlerinin etkileşimini ortaya koyan çalışmalar sonucunda α -enolaz ile MDV004 proteininin (136 amino asitten oluşan bir MHV proteini) etkileşime girdiği belirlenmiş ve MH'ye karşı dayanıklılık ile ilgili aday gen olarak gösterilmiştir (Niikura et al 2004).

TPT1 geni, TCTP proteininin sentezinden sorumludur. TCTP proteininin biyolojik aktivitesi hücre büyümesi ve farklılaşması ile ilişkilidir ve kanser hücre hatlarının mitogenik aktivitesi ile bağlantılıdır. Ayrıca TCTP'nin B hücresi büyüme faktörü gibi davranma özelliği olduğu da bildirilmektedir (Yubero et al 2009). MHV proteinleri ile tavuk proteinlerinin etkileşimini ortaya koyan çalışmalar sonucunda TCTP proteini ile R-LORF12 proteininin (115 amino asitten oluşan bir MHV proteini) etkileşime girdiği belirlenmiş ve MH'ye karşı dayanıklılık ile ilgili aday gen olarak gösterilmiştir (Niikura et al 2004).

RBBP4 geni retinoblastoma bağlanma proteini 4'ü kodlamaktadır. Retinoblastoma, retina hücrelerinde hızlı şekilde gelişen bir kanserdir. Ayrıca, bu protein hücre çoğalması için retinoblastoma proteinine doğrudan bağlanan birçok hücre proteininin içinde yer almaktadır (Neer et al 1994). MHV proteinleri ile tavuk proteinlerinin etkileşimini ortaya koyan çalışmalar sonucunda *RBBP4* proteini ile US1 proteininin (179 amino asitten oluşan bir MHV proteini) etkileşime girdiği belirlenmiş ve MH'ye karşı dayanıklılık ile ilgili aday gen olarak gösterilmiştir (Niikura et al 2004).

Bu çalışmada, tümör oluşumu ile ilgili olan ve MH'ye karşı dayanıklılığın belirlenmesine yönelik çalışmalar için aday gen olarak gösterilen *ENO1*, *TPT1* ve *RBBP4* genleri üzerinde bulunan 5 farklı SNP'teki allellerin ekspresyon seviyesi farklılıkları, pirosekanslama tekniği ile belirlenmiştir. Allellerin ekspresyon seviyesi farklılıklarına bakılarak MHV enfeksiyonuna cevap veren cis-acting elementlerin bulunması ve dolayısıyla MH'ye karşı dirençliliğe katkı sağlayan genlerin tespit edilmesi bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Canlı materyal ve örnekleme

Araştırmanın materyalini, Amerika Tarım Bakanlığı (USDA), Kanatlı Hastalıkları ve Kanser Laboratuvarı (ADOL) bünyesinde bulunan kümeslerde akrabalı yetiştirilmiş MH'ye dayanıklı (hat 6) ve duyarlı (hat 7) hatların resiprokal melezlenmesi sonucunda elde edilen F₁ dölleri oluşturmuştur. Hat 6 (♀) X hat 7 (♂) çiftleştirmesinden 60 tavuk, hat 7 (♀) X hat 6 (♂) çiftleştirmesinden 60 tavuk olmak üzere toplam 120 F₁ tavuğu materyal olarak kullanılmıştır. Hem hat 6 (♀) X hat 7 (♂) hem de hat 7 (♀) X hat 6 (♂) çiftleştirmeleri sonucunda elde edilen F₁ döllerinin yarısı (30 tavuk) kontrol grubu olarak ayrılmış, diğer yarısına (30 tavuk) ise 2 haftalık yaşta 2000 pfu JM hattı MHV enfekte edilmiştir. Her bir muamele grubundan 6 tavuk MHV enfekte edildikten sonra farklı zaman noktalarında (1., 4., 11. ve 15. günlerde) CO₂ uygulaması ile öldürülmüş ve *Bursa fabricius*, timus ve dalak organları alınarak RNAlater (Ambion, Austin, TX) içerisine konulmuştur. Üzerinde durulan SNP'lerdeki allellerin öncelikle MHV çoğalmasında erken sitolitik dönem olan 4. gün ve MHV çoğalmasında ikinci sitolitik dönem olan 15. gündeki ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. *ENO1*, *TPT1-1*, *TPT1-2* ve *RBBP4-1* genlerinde bulunan allellerin ekspresyon seviyelerinde 4. ve 15. günlerde önemli farklılıklar gözlenmediği için 1. ve 11. gündeki ekspresyon seviyeleri verilmemiştir. Ancak *RBBP4-2* geninde bulunan allellerin ekspresyon seviyeleri 4. ve 15. günde önemli farklılıklar gösterdiği için 1. ve 11. gündeki ekspresyon seviyeleri de sunulmuştur. Tavukların örneklenmesi ve yapılan her türlü işlem, Kanatlı Hastalıkları ve Kanser Laboratuvarı protokolleri doğrultusunda uygulanmıştır.

2.2. RNA izolasyonu ve cDNA elde edilmesi

Bu çalışma kapsamında *Bursa fabricius*, timus ve dalak organlarından RNA izolasyonu, RNA Miniprep Kit (Stratagene, Santa Clara, CA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RNA örnekleri kullanılıncaya kadar 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Elde edilen RNA'nın miktar ve kalitesi Agilent Bioanalyzer 2100 kullanılarak ölçülmüştür.

RNA örneklerinden cDNA elde edilmesi için High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) kullanılmıştır. RNA'dan cDNA elde edilip edilmediği, edildiyse kontaminasyon olup olmadığı standart kontrol geni olarak kullanılan Beta-Actin geninin PCR'da çoğalıp çoğalmadığına bakılarak saptanmıştır. Elde edilen cDNA'lar, PCR ve pirosekanslama işlemine kadar 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve pirosekanslama

Bu çalışmada tümör oluşumu ile ilgili olan ve MH'ye karşı dayanıklılığın belirlenmesine yönelik çalışmalar için aday gen olarak gösterilen *TPT1* ve *RBBP4* genleri için 2 SNP, *ENO1* geni için ise 1 SNP olmak üzere toplam 5 SNP üzerinde durulmuştur. Bu SNP'lerde T ve G (*ENO1*), A ve G (*TPT1-1*), A ve T (*TPT1-2*), C ve T (*RBBP4-1*) ile C ve A (*RBBP4-2*) allelleri bulunmaktadır. Elde edilen cDNA'larda bulunan söz konusu SNP'leri içeren bölgeler Çizelge 1'de verilen ileri (forward) ve ters (reverse) primerler kullanılarak PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Çizelge 1'de verilen primerler, bu çalışma için Pyrosequencing Assay Design Software (version 1.0; Biotage, Uppsala, Sweden) programı kullanılarak tasarlanmıştır. Her bir SNP bölgesi için elde edilen PCR ürünü, SNP'lerin ilgili genlerdeki nükleotit pozisyonu ve referans dizilere ait GenBank erişim numaraları Çizelge 2'de verilmiştir.

cDNA'larda üzerinde durulan bölgelerin PCR ile çoğalıp çoğalmadığı kontrol edildikten sonra pirosekanslama işlemine geçilmiş ve Çizelge 1'de verilen dizileme primerleri kullanılmıştır. Pirosekanslama işlemi için PSQ™ 96MA System (Biotage, Uppsala, Sweden) cihazı ve üretici firmadan temin edilen PSQ™ 96 SNP Reagent Kit (Biotage, Uppsala, Sweden) kullanılmış ve elde edilen sonuçlar PSQ™ 96MA Software (version 2.1; Biotage, Uppsala, Sweden) programı ile değerlendirilmiştir.

Çizelge 1- PCR ve pirosekanslama için kullanılan ileri, ters ve dizileme primerleri

Table 1- Forward, reverse and sequencing primers used for PCR and pyrosequencing

Gen	İleri (forward) primer	Ters (reverse) primer	Dizileme (sekans) primeri
<i>ENO1</i>	AAGGGCAGCTGAAGGAAAAA	CCACACAAAACCCCACTGAGAC	GAGAGGACCTGCAAAACT
<i>TPT1-1</i>	GACAGAGGGTCAAATTGATGACT	CTTGTACGACTCTTTTGTGAAGC	GGTTTACTACTATATCCACA
<i>TPT1-2</i>	CGGCAATGTTTAAACAAGTACT	TTAGACAACCTACATGACAGATGG	ATTTGGAGTGGAGGC
<i>RBBP4-1</i>	TCTTTCAATCCCTACAGTGAGTTT	ATAGTTTCATTGTGGGGAGACC	GGTTCCTCAAGTCCCA
<i>RBBP4-2</i>	TGGGGCCACAAAGTTGTAAGG	CAGTTTGCCACGTCTCATTACT	CCAGCGATGTACCAC

Çizelge 2- Her bir SNP bölgesi için elde edilen PCR ürünü, SNP'lerin nükleotit pozisyonu ve referans dizilerin GenBank erişim numaraları

Table 2- The PCR product of each SNP region, nucleotide position of SNPs and GenBank accession numbers of the reference sequences

Gen	PCR ürünü	SNP pozisyonu	GenBank erişim numarası
<i>ENO1</i>	147 bç	1440	NM_205120
<i>TPT1-1</i>	154 bç	275	NM_205398
<i>TPT1-2</i>	129 bç	749	NM_205398
<i>RBBP4-1</i>	158 bç	976	NM_204852
<i>RBBP4-2</i>	124 bç	2188	NM_204852

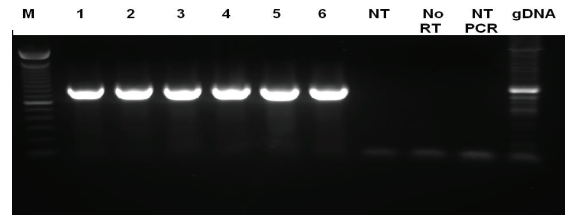
2.4. İstatistik analizler

Kontrol ve MHV enfekte F₁ grupları arasındaki ve çiftleştirme kombinasyonları arasındaki farkın karşılaştırılmasında t-testi, organlar arasındaki farkların karşılaştırılmasında varyans analizi tekniği kullanılmıştır. Varyans analizi sonucunda farklı grupların belirlenmesinde ise Tukey testi kullanılmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

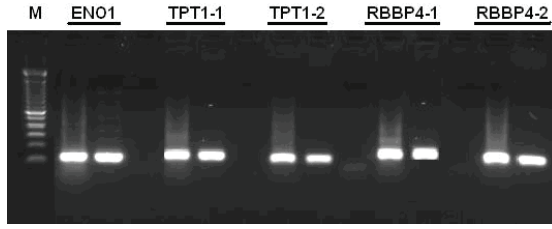
RNA izolasyonu sonucunda izole edilen RNA moleküllerinin ortalama ve standart hatası 292.4±26.8 ng µL⁻¹ olarak hesaplanmış olup izole edilen RNA moleküllerine ait RIN (RNA integrity number) değerleri 7.5 ile 10 arasındadır. Kontrol amaçlı Beta-actin geninin PCR ile çoğaltılması işlemi sonucunda, sadece elde edilen cDNA'larda amplifikasyon meydana gelmiş, NT, No-RT ve

NT-PCR negatif kontrol örneklerinde herhangi bir çoğalma olmamıştır (Şekil 1). Bu durum cDNA elde edilmesi sırasında herhangi bir problemle karşılaşmadığını ve kontaminasyon olmadığını göstermektedir. Elde edilen cDNA'larda yapılan PCR sonucunda, üzerinde durulan *ENO1*, *TPT1* ve *RBBP4* genlerindeki SNP bölgelerine ait PCR ürünleri Şekil 2'de görülmektedir.



Şekil 1- Beta-Actin genine ait PCR ürünlerinin % 2'lik agaroz jelde kontrol edilmesi; 1-6 numaralı örnekler: RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri; NT, cDNA elde edilmesi sırasında tüpe herhangi bir RNA örneği koyulmayan negatif kontrol örneği; No-RT, cDNA elde edilmesi sırasında Reverse Transkriptaz enzimi koyulmayan negatif kontrol örneği; NT-PCR, PCR işlemi sırasında herhangi bir cDNA örneği koyulmayan negatif kontrol örneği, M, 100 bç DNA ladder

Figure 1- Checking of PCR products belonging to Beta-actin gene on 2% agarose gel; line 1-6: cDNA samples converted from RNA; NT, negative control sample containing no RNA template during the cDNA obtaining, No-RT, negative control sample containing no Reverse Transcriptase enzyme during the cDNA obtaining; NT-PCR, negative control sample containing no cDNA sample during PCR; M, 100 bp DNA ladder



Şekil 2- ENO1, TPT1 ve RBBP4 genlerinde bulunan SNP bölgelerine ait PCR ürünleri

Figure 2- PCR products of the SNPs regions in ENO1, TPT1 and RBBP4 gene

Üzerinde durulan bölgelerin PCR ile çoğaltıldığı belirlendikten sonra pirosekanslama işlemine geçilmiş ve ENO1, TPT1 ve RBBP4 genlerinde bulunan allellerin ekspresyon seviyeleri izlenmiştir. Araştırma materyali dayanıklı ve duyarlı tavuk hatlarının F₁ döller olduğu için her bir SNP bölgesi heterozigot durumdadır ve DNA molekülünde bu allellerin nispi frekansı % 50 : % 50'dir. Araştırma materyali RNA'dan elde edilen cDNA olduğu için bu allellerin ekspresyon seviyeleri cis-acting mekanizmasının olduğu durumlarda değişebilir. Daha önce yapılmış çalışmalar (Cowles et al 2002; Yan et al 2002; Bray et al 2003; Serre et al 2008), allellerin ekspresyon seviyeleri arasında 1.5 kat (% 40 : % 60) veya daha fazla farklılık olduğunda burada kesin bir cis-acting mekanizmasının varlığından bahsedilebileceğini ortaya koymuştur. Dolayısıyla allellerin oranları 1.5 kat veya daha fazla değişiyor ise burada cis-acting element bulunduğu ve allellerin ekspresyon seviyeleri arasında biyolojik bir farklılığın olduğu söylenebilir. Cis-acting elementlerin etkilediği allellerin ekspresyon seviyeleri, MHV enfeksiyonundan sonra değişiyorsa, bu genin MH'ye karşı direnç oluşturmada rol oynadığı düşünülür.

Pirosekanslama sonuçlarına göre, hem kontrol hem de MHV enfekte edilmiş gruplarda, her bir çiftleştirme kombinasyonu, organ ve zaman noktasında üzerinde durulan SNP'lerden T ve G (ENO1), A ve G (TPT1-1) ile C ve T (RBBP4-1) allellerinin ekspresyon seviyeleri arasında biyolojik açıdan herhangi bir farklılık görülmemiştir (Çizelge

3). Ayrıca her bir çiftleştirme kombinasyonu, zaman noktası ve organ bakımından, kontrol ve MHV enfekte edilmiş F₁ grupları arasında bir farklılık tespit edilmemiştir. Yani MHV enfeksiyonunun allellerin ekspresyon seviyeleri üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı, dolayısıyla bu allellerin MH ile ilişkili olmadığı ortaya koyulmuştur.

TPT1 genindeki T ve A (TPT1-2) allellerine ait ekspresyon seviyeleri arasında bazı organ ve zaman noktalarında biyolojik farklılıklar (1.5 kat civarı) tespit edilmiştir. Hat 6 (♀) X hat 7 (♂) çiftleştirme kombinasyonundan 4. günde alınan timus organından elde edilen cDNA'da, bu allellerin ekspresyon seviyeleri kontrol grubu için % 39.1 T : % 60.9 A, MHV enfekte edilmiş grup için ise % 39.3 T : % 60.7 A olarak tespit edilmiştir. Ayrıca hat 7 (♀) X hat 6 (♂) çiftleştirme kombinasyonundan 15. günde alınan dalaktan elde edilen cDNA'da, bu allellerin ekspresyon seviyeleri kontrol grubu için % 39.9 T : % 60.1 A, MHV enfekte edilmiş grup için ise % 37.9 T : % 62.1 A olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3). Bahsi geçen alleller arasındaki bu farklılıklar 1.5 kat civarındadır. Dolayısıyla bu gen için bir cis-acting element bulunduğu söylenebilir. Ancak kontrol ve MHV enfekte edilmiş F₁ grupları arasında bir farklılık görülmemiş, yani MHV enfekte edilmesi T veya A allelinin ekspresyon seviyesini değiştirmemiştir. Bu sonuçlara göre; TPT1 geni için bir cis-acting mekanizması olduğu, ancak bu mekanizmanın MH'na karşı direnç oluşturmada rol oynamadığı ortaya çıkmaktadır.

RBBP4 genindeki C ve A (RBBP4-2) allellerine ait ekspresyon seviyeleri arasında da bazı organ ve zaman noktalarında biyolojik farklılıklar (1.5 kat veya fazlası) tespit edilmiştir. Hat 7 (♀) X hat 6 (♂) çiftleştirme kombinasyonundan 15. günde alınan Bursa fabricius organından elde edilen cDNA'da, bu allellerin ekspresyon seviyeleri kontrol grubu için % 35.6 C : % 64.4 A, MHV enfekte edilmiş grup için ise % 35.7 C : % 64.3 A olarak tespit edilmiştir. Ayrıca yine hat 7 (♀) X hat 6 (♂) çiftleştirme kombinasyonundan 15. günde alınan timustan elde edilen cDNA'da, bu allellerin ekspresyon seviyeleri kontrol grubu için % 36.4 C : % 63.6 A, MHV enfekte edilmiş grup için ise % 35.6 C :

Çizelge 3- Enfekte edilmemiş ve MHV ile enfekte edilmiş hat 6 (♀) X hat 7 (♂) ve hat 7 (♀) X hat 6 (♂) F₁ döllerinde Bursa fabricius, timus ve dalak için ENO1, TPT1-1, TPT1-2, RBBP4-1 ve RBBP4-2 genlerine ait allellerin değişik zaman noktalarındaki ekspresyon seviyeleri (%)

Table 3- The expression levels of alleles (%) of the ENO1, TPT1-1, TPT1-2, RBBP4-1 and RBBP4-2 genes in the Bursa fabricius, thymus, and spleen at various time points in uninfected and MDV-infected line 6 (♀) X line 7 (♂) F₁ and line 7 (♀) X line 6 (♂) F₁ progeny

Gen	hat 6 (♀) X hat 7 (♂) F ₁						hat 6 (♀) X hat 7 (♂) F ₁						
	Bursa		Timus		Dalak		Bursa		Timus		Dalak		
ENO1	4U	%G 55.4	%T 44.6	%G 52.3	%T 47.7	%G 49.5	%T 50.5	%G 51.6	%T 48.4	%G 52.5	%T 47.5	%G 48.4	%T 51.6
	4I	53.3	46.7	52.4	47.6	50.5	49.5	52.9	47.1	51.6	48.4	49.2	50.8
	15U	51.2	48.8	51.5	48.5	51.0	49.0	52.5	47.5	51.0	49.0	46.9	53.1
	15I	54.4	45.6	49.5	50.5	48.9	51.1	53.1	47.0	52.6	47.4	48.1	51.9
TPT1-1	4U	%A 57.5	%G 42.5	%A 54.8	%G 45.2	%A 55.2	%G 44.8	%A 56.6	%G 43.4	%A 58.0	%G 42.1	%A 56.3	%G 43.7
	4I	57.9	42.2	54.1	45.9	56.4	43.6	56.0	44.0	56.9	43.1	56.3	43.8
	15U	56.5	43.5	54.7	45.3	55.6	44.5	57.3	42.7	56.3	43.7	57.8	42.3
	15I	57.8	42.2	57.5	42.5	56.5	43.5	56.0	44.0	56.9	43.1	56.1	43.9
TPT1-2	4U	%T 43.7	%A 56.3	%T 39.1 ^A	%A 60.9 ^B	%T 40.9	%A 59.1	%T 42.8	%A 57.2	%T 43.5	%A 56.5	%T 40.5	%A 59.5
	4I	43.6	56.4	39.3 ^A	60.7 ^B	40.6	59.4	41.1	58.9	42.6	57.4	41.1	58.9
	15U	45.5	54.5	43.9	56.1	41.0	59.0	41.5	58.5	41.3	58.7	39.9 ^A	60.1 ^B
	15I	40.4	59.6	41.6	58.4	42.6	57.4	42.6	57.4	41.4	58.6	37.9 ^A	62.1 ^B
RBBP4-1	4U	%T 50.6	%C 49.4	%T 50.8	%C 49.2	%T 47.4	%C 52.7	%T 50.5	%C 49.5	%T 51.8	%C 48.2	%T 46.6	%C 53.5
	4I	49.1	50.9	49.4	50.6	48.3	51.8	49.2	50.9	49.9	50.1	48.5	51.5
	15U	49.7	50.3	51.2	48.8	46.5	53.6	48.3	51.7	48.0	52.0	47.3	52.7
	15I	49.2	50.8	48.9	51.1	47.7	52.3	50.9	49.1	47.7	52.3	48.0	52.0
RBBP4-2	1U	A% 53.0	C% 47.0	A% 50.6	C% 49.4	A% 51.8	C% 48.2	A% 50.6	C% 49.5	A% 49.7	C% 50.3	A% 50.3	C% 49.7
	1I	48.1	51.9	46.0	54.0	51.0	49.0	52.1	48.0	50.9	49.1	50.2	49.8
	4U	56.2	43.8	54.9	45.1	53.4	46.6	42.1 ¹	57.0	42.2 ¹	57.8	49.5 ²	50.5
	4I	50.5	49.5	52.8	47.2	52.0	48.0	41.6 ¹	58.4	42.9 ¹	57.1	49.1 ²	50.9
	11U	51.7	48.4	46.9	53.2	51.3	48.7	50.8	49.2	51.2	48.8	53.8	46.2
	11I	51.2	48.8	47.9	52.1	52.1	47.9	51.2	48.8	50.9	49.1	48.4	51.6
	15U	49.0 ^a	51.0	53.9 ^a	46.1	50.8	49.2	35.6 ^{Ab1}	64.4 ^B	36.4 ^{Ab1}	63.6 ^B	51.3 ²	48.7
	15I	45.1 ^a	54.9	54.0 ^a	46.0	47.7	52.3	35.7 ^{Ab1}	64.3 ^B	35.6 ^{Ab1}	64.4 ^B	50.3 ²	49.7

Büyük harfler, aynı çiftleştirme kombinasyonu, aynı organ ve aynı zaman noktasındaki sütunların (allellerin ekspresyon seviyelerinin) biyolojik açıdan (1.5 kat) karşılaştırılması için kullanılmıştır. Küçük harfler ise aynı organ ve aynı zaman noktasında çiftleştirme kombinasyonları bakımından karşılaştırılma için kullanılmıştır. Üst simge olarak yazılan rakamlar, aynı çiftleştirme kombinasyonu ve aynı zaman noktasındaki organların karşılaştırılması için kullanılmıştır. 1U, 1. günde enfekte edilmemiş kontrol grubu; 1I, 1. günde MHV ile enfekte edilmiş grup; 4U, 4. günde enfekte edilmemiş kontrol grubu; 4I, 4. günde MHV ile enfekte edilmiş grup; 11U, 11. günde enfekte edilmemiş kontrol grubu; 11I, 11. günde MHV ile enfekte edilmiş grup; 15U, 15. günde enfekte edilmemiş kontrol grubu; 15I, 15. günde MHV ile enfekte edilmiş grup

% 64.4 A olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3). Bahsi geçen çiftleştirme kombinasyonu, organ ve zaman noktalarında, alleller arasındaki farklılıklar 1.5 kattan daha fazla olduğu için RBBP4 genine ait bir cis-acting element bulunduğu söylenebilir. Ancak

MHV enfekte edilmiş ve edilmemiş F₁ grupları arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir. Bu durum RBBP4 genine ait cis-acting elementin MHV'na karşı direnç oluşturmada rol oynamadığını göstermektedir. C ve A (RBBP4-2) allellerinin

ekspresyon seviyeleri hat 6 (♀) X hat 7 (♂) ve hat 7 (♀) X hat 6 (♂) çiftleştirme kombinasyonları bakımından karşılaştırıldığı zaman, *Bursa fabricius* ve timustan izole edilen RNA'larda allellerin ekspresyon seviyeleri arasında 15. günde önemli bir farklılık olduğu görülmüştür ($P < 0.05$; Çizelge 3). Ayrıca hat 7 (♀) X hat 6 (♂) çiftleştirmesinin kontrol ve MHV enfekte edilmiş F_1 gruplarında 4. ve 15. günlerde allellerin ekspresyon seviyeleri *Bursa fabricius* ve timustan izole edilen RNA'larda birbirine benzerlik gösterirken, dalakta farklılık göstermiştir ($P < 0.05$; Çizelge 3). Bu farklılığın nedeni *Bursa fabricius* ve timusun dalağa göre daha yüksek seviyede B hücreleri ve T hücreleri içermesi, 4. günün MHV çoğalmasında erken sitolitik dönem olması ve 15. günün MHV çoğalmasında ikinci sitolitik dönem olması ile açıklanabilir.

ASE ile ilgili olarak yapılan öncü çalışmada CEPH familyasına ait 96 hücre hattında bulunan 13 genden 6'sında allellerin önemli ölçüde farklı eksprese edildiği (1.3 ile 4.3 kat) bulunmuştur (Yan et al 2002). Bray et al (2003) tarafından yapılan çalışmada hücre hattı yerine insan beyni dokusu kullanılmış ve çalışılan 15 genden 7'sinde allellerin önemli ölçüde farklı eksprese edildiği bulunmuştur. ASE ile ilgili başka bir çalışmada ise akrabalı yetiştirilmiş 4 farklı fare hattından 2 set F_1 döllerinde elde edilmiş ve 69 gen değerlendirildikten sonra, 4 gende bulunan allellerin önemli ölçüde farklı eksprese edildiği (1.5 kat veya daha fazla) ortaya konulmuştur (Cowles et al 2002). ASE yaklaşımı ile 80 insanın genomu kullanılarak yürütülen başka bir çalışmada ise 1380 gen üzerinde bulunan 2968 SNP'teki allellerin ekspresyon seviyeleri tespit edilmiş ve 2 allel arasında 1.5 kat (% 60 : % 40) veya daha fazla farklılık olduğunda kesin bir cis-acting mekanizması olduğu ortaya konulmuştur (Serre et al 2008). Bu çalışmada da kontrol ve MHV enfekte edilmiş F_1 grupları için bazı çiftleştirme kombinasyonu, organ ve zaman noktalarında, *TPT1-2* ve *RBBP4-2* genlerinde bulunan SNP'lerdeki allellerin önemli ölçüde farklı eksprese edildiği (1.5 kat veya daha fazla) ve bu genler için birer cis-acting mekanizması olduğu ortaya konulmuştur

4. Sonuçlar

Dayanıklılığa katkı sağlayan genlerin belirlenmesiyle MH'ye karşı dirençli bireylerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar hızla artmıştır. Özellikle son yıllarda ASE görüntülenmesinin hastalıklara karşı direnç oluşturmaya katkı sağlayan genlerin belirlenmesi için güvenilir ve etkili bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır. Bu çalışmada da pirosekanslama yöntemi ile her bir allelin ekspresyon seviyesine (ASE) bakılarak MHV enfeksiyonuna cevap veren cis-acting elementlerin bulunması amaçlanmıştır. Böylece tümör oluşumu ile ilgili olan ve MH'ye karşı dayanıklılık ile ilgili aday gen olarak gösterilen *TPT1*, *ENO1* ve *RBBP4* genlerinin tavuklarda MH'ye karşı direnç oluşturmaya katkı sağlayan genler arasında değerlendirilip değerlendirilemeyecekleri üzerinde durulmuştur. Sonuç olarak *TPT1* ve *RBBP4* genlerinin cis-acting elemente sahip olduğu, ancak bu cis-acting elementlerin MH'ye karşı direnç oluşturmada rol oynamadığı belirlenmiştir.

Teşekkür

Bu çalışma, Hasan Meydan'ın doktora tez çalışmasının bir kısmından özetlenmiş olup diğer kısmı daha önce araştırma notu olarak yayınlanmıştır (Meydan et al 2011). Laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Laurie Molitor'a ve sonuçların değerlendirilmesi konusunda katkı sağlayan Prof. Dr. Jerry Dodgson'a teşekkür ediyoruz. Ayrıca çalışmaya ekonomik destek sağlayan (Grant no: 2007-04201) USDA-NIFA (United States Department of Agriculture, The National Institute of Food and Agriculture)'ya şükranlarımızı sunuyoruz.

Kaynaklar

- Bacon L D & Witter R L (1994a). Serotype specificity of B-Haplotype influence on the relative efficacy of Marek's disease virus. *Avian Diseases* **38**: 65-71
- Bacon L D & Witter R L (1994b). B-haplotype influence on the relative efficacy of Marek's disease vaccines in commercial chickens. *Poultry Science* **73**: 481-487

- Bray N J, Buckland P R, Owen M J & O'Donovan M C (2003). Cis-acting variation in the expression of a high proportion of genes in human brain. *Human Genetics* **113**: 149–153
- Calnek B W (1998). Lymphomagenesis in Marek's disease. *Avian Pathology* **27**: 54–64
- Cheng H H (2003). Selection for disease resistance: Molecular genetics techniques. In: W M Muir & S E Aggrey (Eds), *Poultry Genetics, Breeding and Biotechnology*, CABI Publishing, Trowbridge, UK, pp. 385-398
- Cheng H H, Zhang Y & Muir W M (2007). Evidence for widespread epistatic interactions influencing Marek's disease virus viremia levels in chicken. *Cytogenetic and Genome Research* **117**: 313–318
- Cheung V G, Nayak R R, Wang I X, Elwyn S, Cousins S M, Morley M & Spielman R S (2010). Polymorphic cis- and transregulation of human gene expression. *PLoS Biology* **8**(9): e1000480
- Cowles C R, Hirschhorn J N, Altshuler D & Lander E S (2002). Detection of regulatory variation in mouse genes. *Nature Genetics* **32**: 432–437
- Havenstein G B, Ferket P R & Qureshi M A (2003). Carcass composition and yield of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Science* **82**: 1509-1518
- Lee L F, Powell P C, Rennie M, Ross L J N & Payne L N (1981). Nature of genetic resistance to Marek's disease in chickens. *Journal of the National Cancer Institute* **66**: 789-796
- Liu H C, Kung H J, Fulton J E, Morgan R W & Cheng H H (2001). Growth hormone interacts with the Marek's disease virus SORF2 protein and is associated with disease resistance in chicken. *Proceedings of the National Academy of Science* **98**: 9203–9208
- Liu H C, Niikura M, Fulton J & Cheng H H (2003). Identification of chicken stem lymphocyte antigen 6 complex, locus E (LY6E, alias SCA2) as a putative Marek's disease resistance gene via a virus-host protein interaction screen. *Cytogenetic and Genome Research* **102**: 304–308
- MacEachern S, Muir W M, Crosby S D & Cheng H H (2012). Genome-wide identification and quantification of cis- and trans-regulated genes responding to Marek's disease virus infection via analysis of allele-specific expression. *Frontiers in Genetics* **2**: 113
- Marek J (1907). Multiple Nervenentzündung (Polyneuritis) bei Hühnern. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* **15**: 417-421
- Meydan H, Yildiz M A, Dodgson J B & Cheng H H (2011). Allele-specific expression analysis reveals *CD79B* has a cis-acting regulatory element that responds to Marek's disease virus infection in chickens. *Poultry Science* **90**: 1206–1211
- Nair V, Jones C R & Gough R E (2008). Viral Diseases. In: D J Alexander (Ed), *Poultry Diseases*, Saunders Elsevier, China, pp. 258-275
- Neer E J, Schmidt C J, Nambudripad R & Smith T F (1994). The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **371**(6495): 297-300
- Niikura M, Liu H C, Dodgson J B & Cheng H H (2004). A comprehensive screen for chicken proteins that interact with proteins unique to virulent strains of Marek's disease virus. *Poultry Science* **83**: 1117–1123
- Osterrieder N, Kamil J P, Schumacher D, Tischer B K & Trap S (2006). Marek's disease virus: from miasma to model. *Nature Review Microbiology* **4**: 283-294
- Perumbakkam S, Muir W M, Black-Pyrkosz A, Okimoto R & Cheng H H (2013). Comparison and contrast of genes and biological pathways responding to Marek's disease virus infection using allele-specific expression and differential expression in broiler and layer chickens. *BMC Genomics* **14**: 64
- Purchase H G (1985). Clinical disease and its economic impact. In: L N Payne (Ed), *Marek's Disease, Scientific Basis and Methods of Control*. Martinus Nijhoff Publishing, Boston, pp. 17-42
- Purchase H G & Okazaki W (1971). Effect of vaccination with herpesvirus of turkeys (HVT) on horizontal spread of Marek's disease herpesvirus. *Avian Disease* **15**: 391-397
- Schat K A, Calnek B W, Fabricant J & Abplanalp H (1981). Influence of oncogenicity of Marek's disease virus on evaluation of genetic resistance. *Poultry Science* **60**: 2559-2566
- Schat K A, Chen C L H, Calnek B W & Char D (1991). Transformation of T-lymphocyte subsets by Marek's disease herpesvirus. *Journal of Virology* **65**: 1408-1413
- Serre D, Gurd S, Ge B, Sladek R, Sinnett D, Harmsen E, Bibikova M, Chudin E, Barker D L, Dickinson T, Fan J B & Hudson T J (2008). Differential allelic expression in the human genome: A robust approach to identify genetic and epigenetic cis-acting mechanisms regulating gene expression. *PLoS Genetics* **4**(2): e1000006.

- Stamatoyannopoulos J A (2004). The genomics of gene expression. *Genomics* **84**: 449-457
- Tanaka M, Maeda K & Nakashima K (1995). Chicken alpha-enolase but not beta-enolase has a Src-dependent tyrosine-phosphorylation site: cDNA cloning and nucleotide sequence analysis. *Journal of Biochemistry* **117**: 554-559
- Vallejo R L, Bacon L D, Liu H C, Witter R L, Groenen M A M, Hillel J & Cheng H H (1998). Genetic mapping of quantitative trait loci affecting susceptibility to Marek's disease virus induced tumors in F2 intercross chickens. *Genetics* **148**: 349-360
- Witter R L, Sharma J M & Fadly A M (1980). Pathogenicity of variants Marek's disease isolates in vaccinated and unvaccinated chickens. *Avian Disease* **24**: 210-232
- Witter R L (1997). Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Diseases* **41**: 149-163
- Yan H, Yuan W, Velculescu V E, Vogelstein B & Kinzler K W (2002). Allelic variation in human gene expression. *Science* **297**: 1143
- Yonash N, Bacon L D, Witter R L & Cheng H H (1999). High resolution mapping and identification of new quantitative trait loci (QTL) affecting susceptibility to Marek's disease. *Animal Genetics* **30**: 126-135
- Yubero N, Estes G, Cardona H, Morera L, Garrido J J & Barbancho M (2009). Molecular cloning, expression analysis and chromosome localization of the Tpt1 gene coding for the pig translationally controlled tumor protein (TCTP). *Molecular Biology Reports* **36**: 1957-1965