



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ (VETERİNER) ANABİLİM DALI
VPR- DR- 2014-0002

**REKOMBİNASYON SONRASI *Theileria annulata*
POPÜLASYONLARINDAKİ GENETİK VE ANTİJENİK
ÇEŞİTLİLİK**

Ahmet Hakan ÜNLÜ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Hasan EREN**

AYDIN- 2014

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ (VETERİNER) ANABİLİM DALI
VPR- DR- 2014-0002**

**REKOMBİNASYON SONRASI *Theileria annulata*
POPÜLASYONLARINDAKİ GENETİK VE ANTİJENİK
ÇEŞİTLİLİK**

Ahmet Hakan ÜNLÜ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Hasan EREN**

AYDIN- 2014

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Parazitoloji (Veteriner) Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Ahmet Hakan ÜNLÜ tarafından hazırlanan “Rekombinasyon sonrası *Theileria annulata* popülasyonlarındaki genetik ve antijenik çeşitlilik” başlıklı tez, 07/11/2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası:

1- Prof.Dr. Hasan EREN (Başkan)

ADÜ Veteriner Fakültesi

2- Prof.Dr. Tülin KARAGENÇ

ADÜ Veteriner Fakültesi

3- Prof.Dr. Zati VATANSEVER

KAÜ Veteriner Fakültesi

4- Yrd. Doç. Dr. Serkan BAKIRCI

ADÜ Veteriner Fakültesi

5- Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Bilgin BİLGİÇ

ADÜ Veteriner Fakültesi



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora Tezi Enstitü Yönetim Kurulunun..... sayılı kararıylatarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Güzel DİŞCİGİL

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında polimorfik markerler kullanılarak, klonal olan ve olmayan *Theileria annulata* izolatlarının kenelere aktarımını takiben rekombinasyon sonrası oluşan yeni popülasyonlarındaki genetik ve antijenik düzeydeki farklılaşmalar mini ve mikrosatellit markerler ile antijenlere özgü primerler kullanılarak moleküler düzeyde belirlenmiştir. Yapılan analizler sonrasında rekombinasyon sonrasında klonal olmayan suşlarda klonal olan suşa göre genetik çeşitliliğin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda doğal koşullarda bulunan parazit popülasyonlarında rekombinasyon sonucunda meydana gelen genetik çeşitliliğin oldukça fazla olduğu öngörülmüştür. Bunun yanında rekombinasyonun antijenik özellik gösteren bölgeler üzerinde düşünüldüğü kadar bir etkisinin olmadığı ve parazit popülasyonlarında rekombinasyon sonrası antijenik düzeyde bir farklılaşma görülmediği belirlenmiştir.

TÜBİTAK, 111O718 numaralı projesi kapsamında sağladığı maddi destek ile tezimin yapılmasında önemli katkı sağlamış ve bana bu olanağı sunmuştur. Ayrıca tezim esnasında ailem ve özellikle de eşim hem maddi hem de manevi desteklerini hiç bir zaman esirgememiştir. Tezimi, bunca zorluklar arasında hep yanımda duran ve varlığı ile bana ilham veren eşime ithaf ediyorum.

Sevgili eşime ithaf olunur.....

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ.....	ix
GİRİŞ	1
1.1 <i>Theileria annulata</i>	1
1.2 <i>Theileria annulata</i> 'nın Morfolojisi.....	2
1.3 <i>Theileria annulata</i> 'nın Yaşam Döngüsü	4
1.3.1 Omurgasız Ara Konaktaki Dönem.....	5
1.3.1 Omurgalı Ara Konaktaki Dönem.....	6
1.4 Tropikal Theileriosis'de Tanı ve Tedavi.....	8
1.5 Klinik Bulgular ve Patogenez.....	9
1.6 <i>Theileria annulata</i> 'nın Genomu.....	10
1.7 Popülasyon genetiği.....	11
1.7.1 Popülasyonda bazı değişim örnekleri.....	12
1.8 Genetik Varyasyonun Analizi.....	12
1.8.1 DNA Sekanslama.....	12
1.8.2 Zincir Sonlandırma Yöntemi.....	13
1.8.3 Restriksiyon Parçacık Uzunluğu Polimorfizmi.....	13
1.8.4 Mini ve Mikrosatellit Markerler.....	14
1.9 <i>Theileria spp</i> ve Popülasyon Genetiği.....	15
2. GEREÇ VE YÖNTEM	19
2.1 <i>In vivo</i> Deneyler.....	19
2.1.1 Deneysel Enfeksiyonda Kullanılacak Hayvanın Seçimi.....	19
2.1.2 Hücre Kültürlerinin Seçimi ve Buzdağıda Deneysel Enfeksiyonun Oluşturulması	21
2.2 <i>In vitro</i> Deneyler.....	23
2.2.1 Sporozoit Stabilatlarının Hazırlanması.....	23

2.2.2 PBM Hücrelerinin in vitro Enfeksiyonu ve Klonlanması.....	24
2.2.3 DNA İzolasyonu.....	25
2.3 Moleküler Testler.....	26
2.3.1 Genotiplendirme Kullanılacak Polimorfik Markerlerin Belirlenmesi.....	26
2.3.2 Markerların Belirlenmesinde Kullanılan <i>Theileria annulata</i> izolatları....	29
2.3.3 Spektrofotometrede Ölçüm ve PZR.....	30
2.3.4 Yüksek Rezolüsyonlu Hazır Jeller ile Elektroforez	30
2.3.5 Antijenlerde Boyut Farklılıklarının Belirlenmesi.....	32
3. BULGULAR	34
3.1 Buzağıda Oluşturulan Deneysel Enfeksiyon, Sporozoit Stabilatlarının Hazırlanması, PBM Hücrelerinin <i>In vitro</i> Enfeksiyonu ve Klonlanması.....	34
3.2. Belirlenen Polimorfik Markerlar.....	39
3.2.1 Polimorfik Markerler ile Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi.....	64
3.2.1.1 <i>Theileria annulata</i> /Ankara D7.....	64
3.2.1.2 <i>Theileria annulata</i> /Akçaova A10.....	78
3.2.2 Kromozomlardaki Rekombinasyon Yoğunluğu.....	98
3.3 Antijen Primerlerin Bağlanma Isıları.....	99
3.4 Antijenlerde Boyut Farklılıkları.....	101
4. TARTIŞMA	105
5. SONUÇ	122
ÖZET	124
SUMMARY	125
KAYNAKLAR	126
ÖZGEÇMİŞ	136
TEŞEKKÜR	137

SİMGELER VE KISALTMALAR

A10:	<i>Theileria annulata</i> Akçaova izolatı
bp:	Baz çifti
°C:	Santigrat
CDS:	Protein Kodlayan Bölge
Chr:	Kromozom
CO ₂ :	Karbondioksit
dATP:	Deoksiadenozin Trifosfat
dCTP:	Deoksisitidin Trifosfat
dGTP:	Deoksiguanozin Trifosfat
dTTP:	Deoksitimidin Trifosfat
D7:	<i>Theileria annulata</i> Ankara izolatı
DMSO:	Dimetil sülfoksit
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
EDTA:	Etilendiamin Tetraasetik Asit
ELISA:	Enzim Bağlantılı İmmunosorbent Test
GPI:	Glukoz Fosfat İzomeraz
HexIAN:	<i>Hyalomma excavatum</i> aç nimfleri
HexIDN:	<i>Hyalomma excavatum</i> doymuş nimfleri
HSP90:	Isı şok proteini
IGR:	İntergenik Bölge
IFAT:	İndirekt Floresan Antikor Testi
IgG:	İmmunoglobulin G

M3:	Moleküler boyut belirleyici
Mb:	Megabaz
ml:	mililitre
MSC:	minisatellit bölge
NCBI:	Ulusal Biyoteknoloji Bigi Merkezi
NCS:	Yenidoğmuş Buzağı Serumı
PBM:	Perifer Kan Monosit
PBS:	Fosfat Tampon Çözeltili
PZR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP:	Restriksiyon Parçacık Uzunluğu Polimorfizmi
Rpm:	Dakikadaki devir sayısı
RPMI 1640:	Roswell Park Memorial Institute 1640 Vasatı
Rs:	Rekombinasyon sonrası
SPAG:	Sporozoit Yüzey Antijeni
SVSP:	Sub-telomerik protein
Tams1:	<i>Theileria annulata</i> merozoit yüzey antijeni 1
TaSP:	Yüzey Protein Öncülü
TB:	Tekrarlı bölge
Tmsc:	Mikrosatellit bölge
Tpmr-1:	<i>Theileria parva</i> mikronem rhoptry 1 antijeni
TR:	Tekrarlı motif
Tris-HCL:	Trihidrometil Aminometan Hidroklorik Asit

ÇİZELGELER

	Sayfa
Çizelge 2.1. Polimorfik mini ve mikrosatellitlerin test edilmesinde kullanılan parazit izolatları	29
Çizelge 2.2. Spreadex jeller ile elektroforez	31
Çizelge 2.3. T ve B hücre antijenleri	33
Çizelge 3.1. Mini ve mikrosatellite markerlar	52
Çizelge 3.2. Mini ve mikrosatellit markerların farklı izolatlarla yapılan analiz sonuçları	60
Çizelge 3.3. Genetik çalışmada kullanılmak üzere seçilen polimorfik markerlerin özellikleri	62
Çizelge 3.4. Weir, 2006 tarafından geliştirilen mini ve mikrosatellit markerlar	63
Çizelge 3.5. Rekombinasyon öncesi D7 hücre kültüründeki ve rekombinasyon sonrası D7 sporozoit stabilatları ile in vitro enfeksiyonu takiben elde edilen klonların genotipik yapıları	66
Çizelge 3.6. <i>Theileria annulata</i> /Ankara D7 (rs)'a ait allellerin frekans ve frekans yüzdeleri	77
Çizelge 3.7. <i>T.annulata</i> /Aova A10 kodlu saha izolatlarının klonlanması sonucu elde edilen hücre kültürlerinin polimorfik mini ve mikrosatellit markerler (Weir, 2006) ile elde edilen analiz sonuçları	80
Çizelge 3.8. Rekombinasyon öncesi A10 hücre kültüründeki ve rekombinasyon sonrası A10 sporozoit stabilatları ile in vitro enfeksiyonu takiben elde edilen klonların genotipik yapıları	83
Çizelge 3.9. <i>T. annulata</i> /Akçaova A10(rs)'a ait allellerin frekans ve frekans yüzdeleri	95
Çizelge 3.10. <i>T. annulata</i> /Akçaova A10(rs)'a ait allellerin frekans ve frekans yüzdeleri	96
Çizelge 3.11. T ve B hücre antijenlerinin çoğaltılan bölge uzunlukları	101

ŞEKİLLER

		Sayfa
Şekil 1.1.	<i>T. annulata</i> 'nın coğrafi dağılımı	2
Şekil 1.2.	<i>T. annulata</i> 'nın hayat döngüsü	4
Şekil 1.3.	Sporozoitin lenfosit hücre sine girişi	6
Şekil 3.1.	Mini ve microsatellite bölgelerin <i>T.annulata</i> genomundaki kromozomlar (chr1-4) üzerindeki yerleşim yerleri	42
Şekil 3.2.	Mini ve mikrosatellit bölgelerin genomdaki dağılımı	51
Şekil 3.3.	Genetik çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen polimorfik mini ve microsatellite bölgelerin <i>T.annulata</i> genomundaki kromozomlar (chr1-4) üzerindeki yerleşim yerleri	59
Şekil 3.4.	Rekombinasyon sonrası D7 sporozoit stabilatları ile invitro enfeksiyonu takiben elde edilen klonlara ait allel frekans dağılımları	76
Şekil 3.5.	Rekombinasyon öncesi A10 saha izolatının klonlarına ait allel frekans dağılımları	93
Şekil 3.6.	Rekombinasyon sonrası A10 sporozoit stabilatları ile invitro enfeksiyonu takiben elde edilen klonlara ait allel frekans dağılımları	94
Şekil 3.7.	Kromozomlardaki rekombinasyon yoğunluğu	98

RESİMLER

	Sayfa
Resim 1.1. <i>T. annulata</i> 'nın lenfosit içerisindeki makroşizont formları	3
Resim 1.2. <i>T. annulata</i> 'nın eritrosit içindeki piroplazmik formları	3
Resim 3.1. Sitokrom b1 agaroz jel elektroforezi sonucu	35
Resim 3.2. IFA testi sonucu	35
Resim 3.3. Deneysel enfeksiyon sonrası görülen makroşizont formlar	37
Resim 3.4. Deneysel enfeksiyon sonrası görülen piroplazm formlar	37
Resim 3.5. Enfekte tükürük bezi asini hücreleri (A) ve sporozoitler (B)	39
Resim 3.6. Gradient PZR görüntüleri	56
Resim 3.7. <i>T. annulata</i> 'nın farklı izolatları ile test edilen markerlar	58
Resim 3.8. D7 klonlarına ait Spreadex jel görüntüleri	71
Resim 3.9. <i>T.annulata</i> /Ankara D7 ve <i>T.annulata</i> /Aova A10 saha izolatından üretilmiş klonal hücre kültürlerine ait DNA örneklerinin polimorfik TS6 (A1-4) ve TS15 (B1-3) markerlerine ait görüntüleri	79
Resim 3.10. A10 klonlarına ait Spreadex jel görüntüleri	89
Resim 3.11. Gradient PZR görüntüleri (Antijen bölge)	100
Resim 3.12. Antijen markerlarla %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüleri	104

1. GİRİŞ

1.1. *Theileria annulata*

Theileria annulata sığırlarda tropikal theileriosis'in paraziter etkenidir. Hastalık; sığırlarda verim kaybına, ölümlere ve buna bağlı olarak büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Hastalık yerli sığırlarda genellikle fazla patojen olmayıp, özellikle kültür ırkı sığırlar için patojen özellik göstermektedir. *Theileria* soyunda bulunan türlerin sistematikteki yeri halen tam anlamıyla çözülememiştir. Son yıllarda genetik düzeyde yaşanan gelişmeler ile Apikompleksa kökünde bulunan çoğu türün genom dizilimlerinin belirlenmesi bunların sistematikteki yeri hakkında yeni bilgiler sunmaktadır. *T. annulata*'nın sistematikteki yeri Levine (1988)'a göre aşağıda verilmiştir;

Alem: Animale

Alem altı: Protozoa

Anaç: Apikompleksa

Sınıf: Sporozoea

Sınıf altı: Piroplasmia

Dizi: Piroplasmida

Aile: Theileriidae

Soy: *Theileria*

Tür: *T. annulata* (Dschunkowsky ve Luhs, 1904)

Theileria annulata ilk kez 1904 yılında Transkaukasyan sığırlarında bulunmuştur (Dschunkowsky 1904). Parazitin omurgalı konaktaki şizont döneminin tespitiyle birlikte *Theileria annulata* olarak isimlendirilmiştir (Bettencourt 1907). *T. annulata*; Tropikal theileriosis, Akdeniz sahil humması veya Tropikal piroplasmosis gibi çeşitli isimler ile bilinen hastalığın etkenidir. Sığır, manda, zebu ve bizonlarda görülen etken kan hücrelerinde yaşamaktadır (Mimoğlu ve ark 1969). *T. annulata*, Kuzey Afrika, Güney Avrupa, Hindistan ve Türkiye'yi de içine alan Orta Doğu ile Asya'da geniş bir yayılım göstermektedir

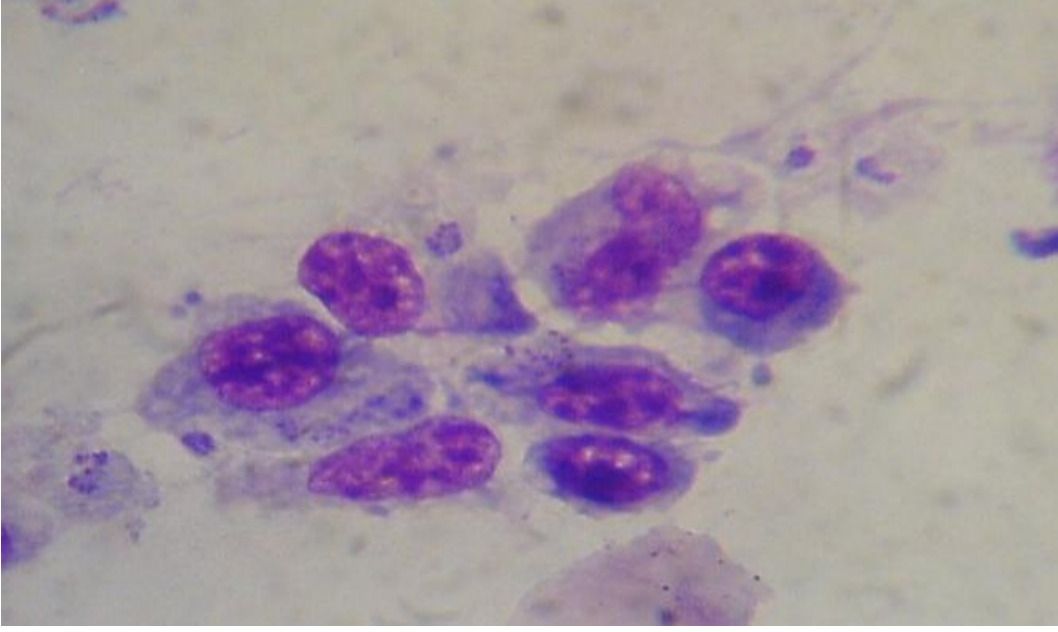
(Şekil 1.1). Hastalığın bu kadar geniş bir coğrafya içinde görülmesi çevre koşullarının *T. annulata*'nın vektörü olan *Hyalomma* soyuna bağlı Ixodid keneler için uygun olmasından kaynaklanmaktadır (Purnell 1978). Keneler tarafından nakledilen hastalıklar tropikal ve ılıman bölgelerde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (de Castro 1997). *Theileria annulata*, iki ya da üç konaklı özellik gösteren keneler tarafından transstadial olarak nakledilirler. Hastalığın nakledilmesinde rol alan 15 adet *Hyalomma* soyuna bağlı tür olduğu belirlenmiştir (Robinson 1982).



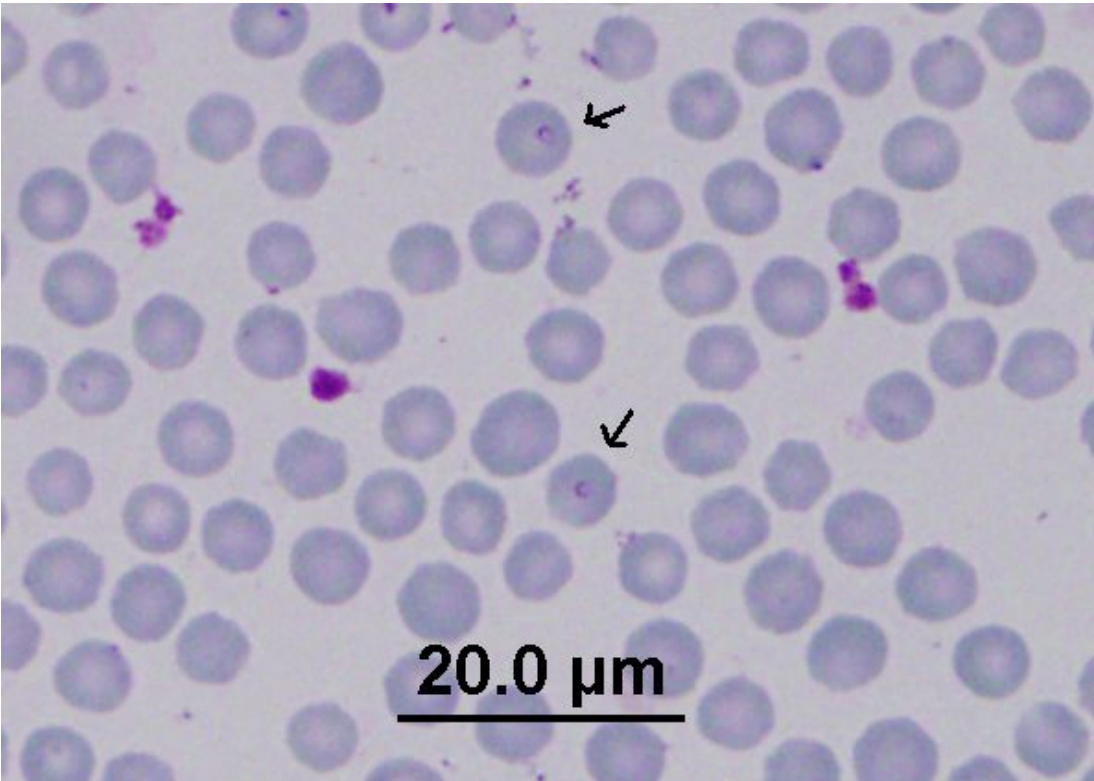
Şekil 1.1. *T. annulata*'nın coğrafi dağılımı (<http://www.cfsph.iastate.edu>)

1.2. *Theileria annulata*'nın Morfolojisi

Theileria türlerinin eritrosit içinde bulunan piroplazm formları morfolojik olarak yuvarlak, çomak, oval, haç, anaplasmod ve virgül şekillerinde bulunabilir (Mimoğlu ve ark 1969, Uilenberg 1981). *Theileria annulata*'nın şizont (Resim 1.1) ve piroplazm (Resim 1.2) (eritrositik) formlarının morfolojisi farklıdır. Lenf yumrusu ve dalaktaki lenfositlerde bulunan şizontları ortalama 8 µm çaptadır. Makroşizontlardaki kromatin taneleri (çekirdekler) 0.4-1.9 µm, mikroşizontların ise 0.3-0.8 µm boyutundadır. Piroplazm formlarının çoğu (%70-80) oval, yuvarlak veya yüzük şeklindedir. *T. annulata* piroplazmları çoğunlukla orta boylu, yuvarlak ve oval formlarda görülür. Geri kalan etkenlerin çoğu toplu iğne veya virgül şeklindedir. Oval olanlar 2x0.6 µm boyutundadır. Bir eritrositte birden fazla piroplazm görülebilmektedir.



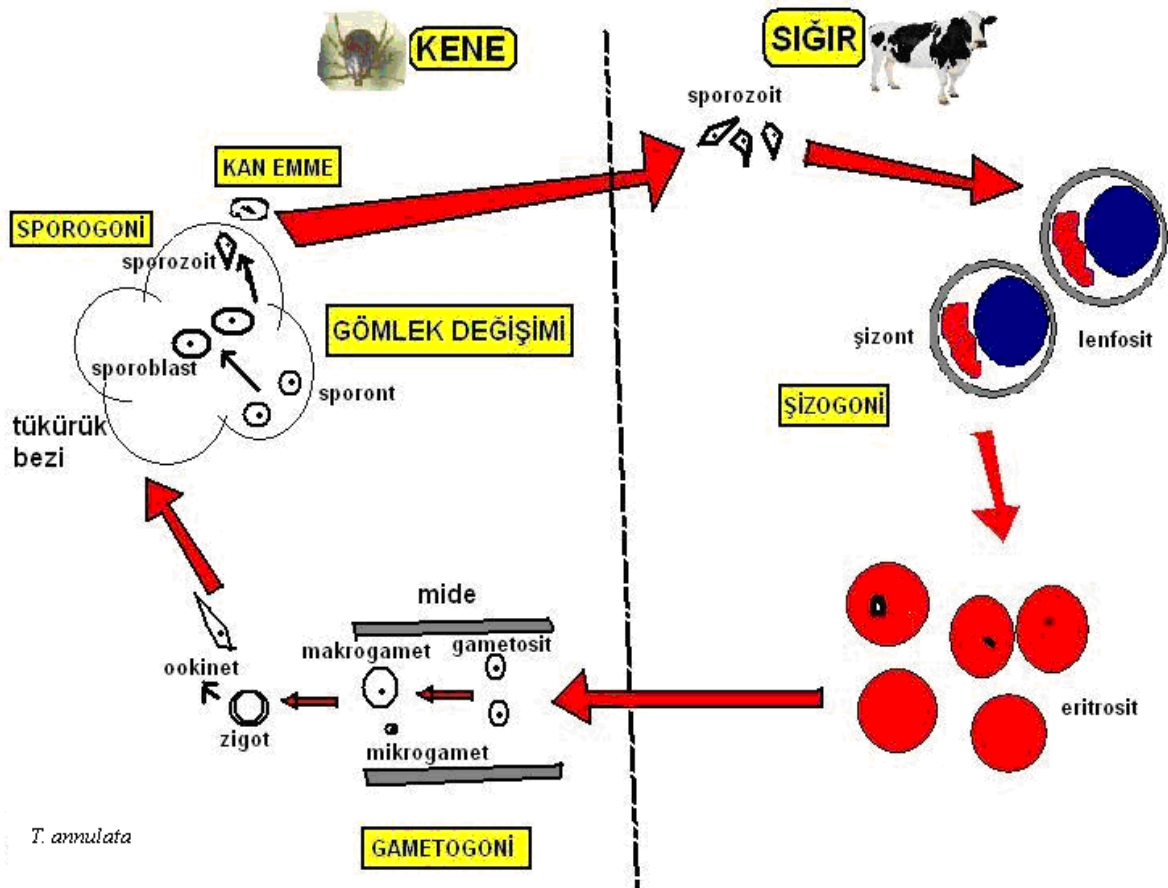
Resim 1.1. *T. annulata*'nın lenfosit içerisindeki makroşizont formları (Orjinal)



Resim 1.2. *T. annulata*'nın eritrosit içindeki piroplazmik formları (Orjinal)

1.3. *Theileria annulata*'nın Yaşam Döngüsü

Theileria'nın kene ve ruminantlarda birbirinden morfolojik olarak farklılık gösteren gelişme basamaklarına sahip bir hayat döngüsü bulunmaktadır (Şekil 1.2). Farklı *Theileria* türlerinin biyolojisinde bulunan farklılıklar gelişme basamaklarının zamanlamasında ve replikasyon seviyesinde gerçekleşmektedir (Shaw 2002). *Theileria* cinsine ait türlerin vektörü Ixodidae (sert kene) keneleridir.



Şekil 1.2. *T. annulata*'nın hayat döngüsü (Orijinal)

Theileria annulata'nın hayat döngüsü; omurgalı konakta şizogoni ve merogoni ve ara konak olan kenelerde gametogoni ve sporogoni dönemlerini kapsayan dört temel dönemden oluşmaktadır.

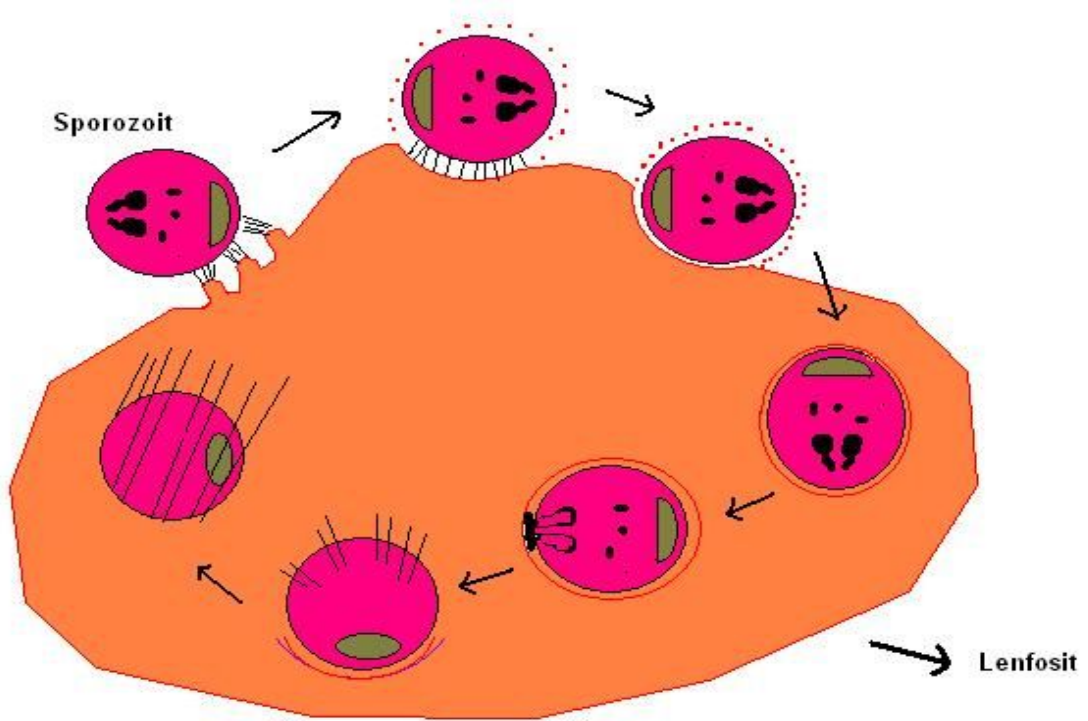
1.3.1. Omurgasız Ara Konaktaki Dönem

Vektör kene, enfekte bir hayvandan kan emme esnasında eritrositlerle birlikte sporozoitleri de alır. *Theileria annulata*'nın ixodid bir kene olan *Hyalomma detritum* tarafından nakledildiği ilk kez Cezayir de yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Sergent 1928). Tropikal theileriosis'i nakleden keneler arasında en önemli olanları *Hyalomma anatolicum anatolicum* ve *Hyalomma detritum* keneleridir (Uilenberg 1981). *T. annulata*, keneler tarafından transtadial olarak nakledilmektedir. Keneler larva ya da nimf dönemlerinde enfekte hayvanlardan kan emerken aldıkları etkenleri, gömlek değiştirip bir sonraki gelişme dönemine geçtiğinde omurgalı konaklara nakledilebilmektedir. *Hyalomma excavatum* keneleri deneysel şartlarda *T. annulata*'yı nakletmektedir, fakat doğal ortamda bu kenenin larva ve nimflerinin kemirgenlerden kan emmeleri sebebiyle olgunları hastalığı nakledememektedir (Barnett 1977). Keneler tarafından alınan eritrositler barsakta lize olarak içerisindeki etkenler açığa çıkmaktadır. Burada gametositler oluşmakta ve mikrogamontların her birinden bölünmeyle 4 adet mikrogamet meydana gelmektedir. Makrogamet ise bölünmeden gelişerek makrogameti oluşturmaktadır. Kene barsağında mikrogamet, makrogameti dölleyerek zigotu oluşturmaktadır. Zigotun görülmesinden sonraki 12–15 gün içerisinde parazitin hareketli formu olan kinetler kenenin hemolenfine geçerek tükürük bezlerine doğru göç etmektedir (Schein ve Friedhoff 1978). Parazitin yaşam çemberinde tek diploid dönem zigot ve kinet dönemleridir. Barsak zarını delen kinet hemolenf yoluyla tükürük bezi hücrelerine girerek sporont formunu almaktadır ve sporonttan sporoblast oluşmaktadır. *Theileria parva*'da çekirdek bölünmesi kinet daha tükürük bezine gitmeden önce başlarken, *T. annulata*'da çekirdek bölünmesi kinet tükürük bezine gittiğinde başlamaktadır. Bu esnada kene gömlek değiştirmesini tamamlar. Sporoblastın gelişmesini sürdürebilmesi için bir sonraki safhaya geçen aç kenenin kan emmesi gerekmektedir. Bu sırada kene duyarlı bir konaktan kan emerse eşeysiz bölünme olan sporogoni ile binlerce sporozoit meydana gelir. Sporozoitler kenenin tükürük kanallarına gelerek kan emdiği duyarlı konağa ikinci veya üçüncü günlerde verilir. Kenede sporogoni dönemi başladıktan sonra oluşan sporozoitler kenenin asini hücrelerini parçalayarak kenenin tükürüğünde serbest hale geçerler. Her bir enfekte asini hücresinde yaklaşık 40 bin sporozoit oluşabilmektedir (Young ve ark 1992). Memeli konağa aktarılan

sporozoitler lenfoid hücelere giriş yaparak burada çok çekirdekli sinsitiyal şizont formunu alır. Bu aşama aynı zamanda hücre transformasyonu ve proliferasyonun indüklediği safhadır (Shaw 2002).

1.3.2. Omurgalı Ara Konaktaki Dönem

Vektör keneler etkenleri sığır üzerinden kan emerken nakletmektedir. Bazen konjenital yolla anneden buzağıya bulaşma olabilmektedir (Levine 1988). Sporozoitler kenenin kan emmesi sırasında en yakın lenfoid hücelere girer. Bu olay kene kan emmeye başladıktan sonraki dönemde yavaş yavaş gerçekleşmektedir. *Theileria parva*; B ve T lenfositleri enfekte ederken, *Theileria annulata*; B lenfositleri ve monositleri enfekte etmektedir (Baldvin ve ark 1988). Sporozoitin lenfosit hücelesine girişi temel olarak üç aşamada gerçekleşir. Bu aşamalar (Şekil 1.3); bağlanma, membranla kaplanıp hücre içine alınma ve membranı lize ederek konak hücre sitoplazmasına serbest olarak yerleşmedir (Shaw, 2002).



Şekil 1.3. Sporozoitin lenfosit hücelesine girişi (Shaw, 2002)

Sporozoit ve konak hücre arasındaki etkileşimde rol oynayan birçok sporozoit yüzey proteini bulunmaktadır. Bağlanma gerçekleştikten sonra lenfosit hücresi yüzey membranı ile sporozoitin etrafı kısmen kaplanmakta ve böylece sporozoit hücre içine alınmaya başlamaktadır. Daha sonra hücre içine giren sporozoitin yüzeyi, lenfosit hücresinin membranı ile tamamen kaplanır. Parazit bu membranı lize ederek kurtulur ve lenfosit hücresi sitoplazmasına serbest olarak yerleşir. Parazitin etrafını saran lenfosit hücre membranından kurtulması ve salgı organellerinin (rhoptry ve mikrosfer) salgılama yapması, eş zamanlı olarak gerçekleşmektedir. Bu esnada lenfosit hücresinden köken alan mikrotübüllerle parazitin etrafı sarılmaktadır (Shaw 2002). Lenfosit hücresi sitoplazmasına serbest olarak yerleşen parazit iki, üç gün içerisinde çok çekirdekli makroşizont formuna farklılaşmaktadır. Makroşizont formlarının görülmesi ve lenfosit transformasyonunun başlaması birbiriyle kesişen olaylardır (Shiels ve ark 2006). *Theileria* parazitinin konak hücrede meydana getirdiği transformasyon; apoptozis, bölünme ve gen ifadesini düzenleyen sinyal transdüksiyon yollarına etki eder. *Theileria annulata* ve *T. parva*, transformasyona uğramış lenfosit hücresinde programlı hücre ölümünün inhibe edilmesini ya da tam tersine aktive edilmesini uyararak kendisinin hücre dışına salınımını sağlar ve böylece yaşam döngüsüne devam edebilir. Konak hücre apoptozisinin inhibe edilmesi ya da kontrolsüz konak hücre bölünmesinden sorumlu olan parazit kaynaklı faktörler hala bilinmemektedir (Shiels ve ark 2006). Heussler'e (2002) göre enfekte olan hücrelerin tamamen transforme olmuş hale gelmesi için dört ana olay gerçekleşmelidir. Bunlar; hücre dışından gelen büyüme uyarıcı sinyallere karşı bağımsız olmak, tümör baskılayıcı protein aktivitesine karşı dirençli hale gelmek, programlı hücre ölümüne karşı direnç geliştirmek ve sınırsız çoğalma kapasitesi elde etmektir. Konak hücredeki merozoitlerin büyüüp genişlemesiyle tek çekirdekli merozoitler oluşur. Lenfositlerin parçalanması sonucu kana geçen mikroşizontlar (merozoitler) invaginasyon yoluyla eritrositlere girerler. Eritrositler içinde farklılaşarak piroplazm formuna dönüşürler. Parazitin bu formları makroşizontların ilk görülmesinden sonraki bir veya üç gün içinde kanda belirlenebilirler. Keneler, enfekte omurgalı konak üzerinde beslenmeleri sırasında piroplazmlarla enfekte olmuş eritrositleri alarak parazitin ara konaktaki yaşam döngüsünün devamını sağlarlar. Enfekte hayvanlar parazitin piroplazm formunu yıllar boyunca taşıyabilirler (Pipano 2006).

1.4. Tropikal Theileriosis'de Tanı ve Tedavi

Hastalığın tanısı genellikle klinik ve makroskopik bulgular ile yaz aylarında hayvan üzerinde görülen kene varlığına dayanarak yapılmaktadır. Laboratuvar şartlarında en sık kullanılan yöntem ise kan frozisinin giemsa ile boyanması ve lenf ya da karaciğer biyopsisinde şizontların veya kanda piroplazmik formlarının görülmesi ile mikroskopik bakıda tanıya gidilebilmektedir (Pipano 1994, Sergent 1945). Hastalığın erken döneminde hazırlanan kan frozilerinde piroplazmlar ile enfekte eritrositler bazen hiç görülmeyebilir, bu durum taşıyıcı konumdaki hayvanlarla rahatlıkla karışmaktadır. *Theileria annulata* enfeksiyonlarında, perifer kandan hazırlanan frozilerde şizontlara nadir olarak rastlanılmaktadır. Piroplazmlarla enfekte eritrosit sayısı hastalığın ilerleyen dönemlerinde artar ve %90 seviyelerine ulaşabilir. Hastalıktan kurtulan hayvanlarda piroplazmlar uzun süre kanda kalır, ancak bu kalıcı piroplazmların direkt mikroskopik bakı ile tanısı her zaman mümkün olamamaktadır (Pipano ve ark 1974).

Theileria annulata'ya karşı oluşan antikorların belirlenmesinde kullanılan en yaygın serolojik yöntem indirekt floresans antikor (IFAT) testidir. IFA testinde piroplazm ya da hücre kültürlerindeki şizontlar kullanarak hazırlanan örnekler antijen olarak kullanılır. IFA, prevalans çalışmaları ve aşılanmış hayvanlardaki antikor yanıtının belirlenmesinde çok sık olarak kullanılan bir testtir (Pipano ve ark 1974). IFA testinin mikroskopik olarak kan frozilerinde piroplazmların belirlenmesine oranla daha iyi bir yöntem olduğu gösterilmiştir (Darghouth ve ark 1996). Fakat bazı diğer *Theileria*, *Babesia* ve *Anaplasma* cinslerine ait piroplazmlarla belli oranlarda çapraz reaksiyon görülmesi testin özgüllüğünü olumsuz etkilemektedir (Burridge ve ark 1974, Kiltz ve ark 1986, Kocan ve ark 2000).

Enzim bağlantılı immunosorbent test (ELISA) hastalıkların tanısında ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanılan ve IFA testine oranla daha duyarlı ve özgül olan, fazla sayıda örneğin incelenebilmesi ve ucuz olması ile daha avantajlı görülmektedir (Kemeny ve Chantler 1988). Tropikal theileriosis görülen hayvanlarda etkene karşı oluşan antikorların belirlenmesi amacıyla bu yöntem kullanılarak çalışmalar yapılmıştır (Beniwal ve ark 1997, Prasanth ve ark

1995). Son yıllarda parazitin omurgalı konaktaki farklı yaşam dönemlerine ait antijenler belirlenmiş ve bunlar ELISA'da kullanılmıştır (Schneider ve ark 2007).

Rekombinant DNA çalışmaları sayesinde parazite özgü DNA bölgeleri plazmid vektörlere klonlanarak, enfekte hayvanlarda *Theileria* DNA'sının varlığı belirlenebilmektedir (Allsopp ve ark 1993). Parazite ait piroplazm ve şizont dönemlerinin morfolojik farklılıklarına göre ayrımları yapılamayan türlerde yine bu yöntemler sayesinde parazit türü ile o türe ait farklı suşların ayrımı sağlanmıştır (Norval ve ark 1992). Birden fazla polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) metodları kullanılarak vektör kenelerde ve omurgalı konakta parazitin teşhisi yapılmıştır (de Kok ve ark 1993, İlhan ve ark 1998).

Tropikal theileriosis tedavisinde kullanılan en etkili ilaç buparvaquone'dur (McHardy ve ark 1985, Singh ve ark 1993). Deneysel olarak enfekte edilmiş sığırlarda, 5 mg/kg veya 2.5 mg/kg dozlarda intramuskuler tek dozluk enjeksiyonun hastalığa yol açan şizont ve piroplazmlara karşı etkili olduğu gösterilmiştir (Singh ve ark 1993). Bununla birlikte, buparvaquone ve parvaquone sırasıyla 90% ve 80% iyileştirme oranlarına sahip oldukları belirlenmiştir (Muraguri ve ark 1999).

1.5. Klinik Bulgular ve Patogenez

Tropikal theileriosis'in inkübasyon periyodu yaklaşık 9-25 gün arasında değişmektedir. Enfeksiyonun şiddeti; hasta hayvanın ırkına ve parazit suşunun virulansına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Sergent 1945, Rayfi ve ark 1965). Hastalığa karşı bağışıklık gösteren hayvanlarda klinik bulgular hafif seyrederek veya hiç görülmez, devamında hayvan kendiliğinden iyileşebilmektedir (Pipano 2006). Hastalık klinik belirtilere göre hafif, perakut, akut, subakut ve kronik olarak sınıflandırılmaktadır (Sergent 1945). Genel belirtiler içerisinde yüksek ateş, kenenin kan emdiği taraftaki yüzeysel lenf yumrularında büyüme, parazitemi esnasında eritrosit sayısında azalmaya bağlı şiddetli anemi, mukozalarda peteşiyal kanamalar, ruminasyonun durması ve seröz burun akıntısı bulunmaktadır. *Theileria annulata*; B lenfosit hücrelerini ve monositleri enfekte etmektedir (Baldwin ve ark 1988). Transforme olmuş

enfekte hücreler lenf nodlarının morfolojisini ve fonksiyonunu bozmaktadır (Campbell ve ark 1995). Ayrıca, bu enfekte hücreler lenfoid dokular yoluyla yayılarak kalp, akciğer ve beyin gibi lenfoid olmayan organlarda hemorajik lezyonlara neden olmaktadır (Forsyth ve ark 1997). En bariz makroskopik lezyonlar subkutan doku ve serozalarda peteşiler, lenf yumrularında hiperplazi, splenomegali, karaciğerde genişleme ve sarı renk oluşumu, idrar kesesinde büyüme, epi-endokardiyal peteşi ve ekimozlar, böbrek korteksinde gri-beyaz odaklar olarak bilinmektedir. Hastalığın en belirgin bulgularından biri abomasumda görülen sigara yanığı şeklindeki ülserlerdir. Bu ve bunun gibi ülserlere ince ve kalın barsak boyunca rastlanabilir. Akciğerler genellikle ödemlidir. Duyarlı sığırlarda ölüm, parazitin virulansına bağlı olarak %40–60 oranları arasında değişmektedir ve ölüm genelde klinik bulguların görülmesinden sonraki 7-14 gün içinde gerçekleşmektedir (Uilenberg 1981). Hastalığı atlatmayı başarabilen hayvanlar parazite uzun süre taşıyıcılık yapmaktadırlar (Sergent 1945).

1.6. *Theileria annulata*'nın Genomu

Theileria annulata'nın genomu 8.35 Mb'dan oluşmaktadır ve birbirleriyle neredeyse tamamen aynı olan 4 adet haploid kromozom içermektedir. Burada yaklaşık 4000 protein kodlayan genler vardır ve bu genlerin sadece 38%'nin fonksiyonu olduğu varsayılmaktadır (Pain ve ark 2005). *T. annulata* ve *T. parva*'nın gen sekans analizleri yapıldığında enfekte konak hücrenin fenotipini değiştirecek birçok parazit genleri tanımlanmıştır. Bu gen bölgelerinden ifade edilen polipeptidlerin konak hücre fenotipini değiştirmeye aday olduğu saptanmıştır (Shiels ve ark 2006). Bu polipeptidleri ifade eden genler çok değişkenlik gösteren bir gen ailesinin subtelomerik kısmına yerleşmiştir ve nasıl bir mekanizma ile etki ettiği tam olarak bilinmesede konak hücre proliferasyonuna, apoptozise ve değişmiş gen ifadesine öncülük ettiği düşünülmektedir.

1.7. Popülasyon Genetiği

Organizmaların tüm popülasyonuna genetik ilkelerin uygulanması popülasyon genetiği konularını oluşturmaktadır. Popülasyon genetiği gruplarla ilgiliyse, o zaman tek bir geni incelemek boşuna bir çaba olmaktadır. Popülasyon çalışmalarında birey geçici bir paket gibidir. Bu paket açılabilen ve genetik olgular yeni bir nesle kolayca geçirilebilmektedir. Popülasyon genetiğinde iki kavram öncelikle ele alınmaktadır. Birincisi, popülasyon; aynı türdeki organizmaların bir grubu olup genetik maddelerin serbest akışını gösteren ve eşeyli limitler içinde rastgele ara eşleşmeler yapan bir topluluktur. İkincisi, gen havuzu; bir popülasyonun üretilen gametlerinin içindeki tüm alellik formlarıyla birlikte bütün genlerden oluşmaktadır. Gen havuzu, bir neslin gelecek nesle sağladığı genetik donanımdır ve bunun için yalnızca bir şeyler yapan genler önemli olmaktadır (Maynard 2002).

Doğada, parazitlerde oluşan seksüel rekombinasyon popülasyonun genetik çeşitliliğinin oluşmasında önemli bir yer tutmaktadır. Parazitlerin meydana getirdiği hastalıklarda uygulanan ilaçlar ve koruyucu amaçlı aşılama popülasyonlar üzerinde seçici etki yaparak popülasyonun yapısını değiştirmekte ve meydana gelen yeni popülasyonda genetik farklılıkların oluşmasına neden olmaktadır. Meydana gelen yeni popülasyonların ilaç direnci göstermesi, koruyucu aşılama etkinliğinin azalması ve yüksek patojeniteye sahip dirençli suşların oluşması gibi yeni risklerin oluşmasına sebebiyet vermektedir.

Eğer bir popülasyonun gen havuzu birçok nesil boyunca değişmez haldeyse popülasyon kendi başına durmaktadır. Gen havuzundaki bir değişim kendini popülasyona yansıtmaktadır. Gen havuzu ne kadar hızlı ya da uç noktalarda değişiyorsa, popülasyonda o kadar hızlı değişmektedir. Popülasyon yapısı sadece farklı türler arasında değil aynı zamanda farklı ekolojilerdeki tek bir türde de farklılık gösterebilmektedir. Parazitlerdeki popülasyon yapısını etkileyen önemli bir etmende vektörler arasındaki cins düzeyinde ve buldukları coğrafik bölgelere adaptasyonları bakımından gözlenen farklılıklardır (Katzer ve ark 2006, Pumpaibool ve ark 2009). Kuşkusuz, tüm gen havuzu bir anda çalışılmamaktadır. Eğer genlerin tamamı tanınsaydı bile bunlarla topluca uğraşmak bir hayli zor olurdu.

1.7.1. Popülasyonda Bazı Değişim Örnekleri

Popülasyonda meydana gelen değişimler farklı yollarla kendini göstermektedir. Örneğin; mutasyon ve göçün etkisi gibi:

Mutasyon; genotipte değişim anlamına gelmekte, translokasyon ve inversiyon gibi kromozomal olayları da içine almaktadır. Mutasyon çoğunlukla bir gendeki kalitatif bir değişimi göstermektedir. Gen havuzlarındaki gen frekanslarını değiştirerek hammadde sağlamakta ve bunun doğal seleksiyonla işlenmesiyle gen frekansında değişim görülmektedir (Bozcuk 2005).

Göçün etkisi; popülasyon içine ve dışına olan göçlerin gen frekansında değişim meydana getirmesiyle olmaktadır. Bireylerin ya da grupların yalıtılmış popülasyonların içine ya da dışına taşınması, gen frekansı üzerinde belirgin bir etki göstermektedir (Bozcuk 2005).

1.8. Genetik Varyasyonun Analizi

Uzun yıllar boyunca popülasyon genetikçileri bir popülasyon içinde ne kadar varyasyon olduğunu saptayamamıştır. İlk defa protein elektroforezi ilkeleri 1966'da doğal popülasyonların araştırılmasında kullanılmıştır (Crow ve Kimura 1970). Elektroforez, genetik varyasyonların belirlenmesinde günümüzde de kullanılmaktadır. Genetik varyasyonun analizinde kullanılan yöntemler alt başlıklar halinde sıralanmıştır.

1.8.1 DNA Sekanslama

DNA sekanslama genetik varyasyonun analizinde kullanılan önemli bir yöntemdir. DNA molekülündeki nükleotit bazlarının (adenin, guanin, sitozin ve timin) sırasının bilinmesi temel biyoloji, biyoteknoloji, adli bilim, tıbbi tanı koyma, popülasyon genetiği gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. İlk DNA dizileri 1970'lerin başlarında üniversite araştırmacıları tarafından iki-boyutlu kromatografiye dayanan zahmetli yöntemlerle elde edilmiştir. Sanger ve arkadaşları artı-eksi dizilemeyi geliştirmiştir (Sanger ve ark 1975). Bu yöntemde tek iplikli DNA üretilebilmesi için okunacak her DNA'nın ayrıca klonlanması gerekmektedir. Harvard Üniversitesi'nden Allan Maxam ve Walter Gilbert, DNA'nın kimyasal modifikasyonu ve devamında spesifik bazlarda kesilmesi esasına dayanan başka bir DNA dizileme yöntemi geliştirmiştir (Maxam ve ark 1977). Otomatik analizle çalışan boya-tabanlı dizileme yöntemlerinin gelişimiyle DNA dizilemesi çok daha kolaylaşmıştır (Pettersson ve ark 2009).

1.8.2 Zincir Sonlandırma Yöntemi

Genetik varyasyonu analizinde kullanılan başka bir yöntem olan zincir sonlandırma yöntemi Maxam ve Gilbert (1977) yöntemine kıyasla daha verimli olduğu, daha az toksik kimyasal ve radyoaktivite gerektirdiği için kısa sürede hızla yaygınlaşmıştır. Daha az işlem gerektirdiğinden ve daha hızlı çalıştığından dolayı, günümüzde otomatik dizileme makinalarının çoğunda boya sonlandırma dizilemesi yapılmaktadır. Boya sonlandırma dizilemesinde floresan boyalarla işaretli nükleotid bazların herbirinin farklı dalga boylarında ışık vermesi ve bunun cihazlarla algılanması yöntemin prensibi olmaktadır.

1.8.3. Restriksiyon Parçacık Uzunluğu Polimorfizmi

RFLP (Restriksiyon parçacık uzunluğu polimorfizmi), genlerin belirli bir dizilişi tanıyan enzimlerce parçalara ayrılması ve farklı boyut ve dizilime sahip parçaların elektrik alanlarından farklı miktarda etkilenmesi prensibine dayanan genetik kod inceleme yöntemidir. DNA polimorfizmlerinin tespitinde kullanılmaktadır. Meydana gelmiş nükleotid değişimi restriksiyon enziminin kesme noktasını silebilmekte veya yeni bir kesme noktası oluşturabilmektedir (Saiki ve ark 1985). Bölgeye uygun primerler kullanılarak yapılan PZR'dan sonra restriksiyon enzimleri kullanılarak, polimorfizmin olduğu bölge tanımlanmaktadır. Son yıllarda yapılan popülasyon genetiği çalışmalarında RFLP yöntemine kıyasla genom üzerinde bulunan peşpeşe sıralı tekrarlı nükleotid bölgeler polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılarak örnekler arasındaki farklı popülasyonlar daha etkili analiz yöntemleri ile belirlenebilmektedir (Weir ve ark 2007).

1.8.4. Mini ve Mikrosatellit Markerler

Genomda bir lokusta arka arkaya gelen rastgele tekrar dizilerine mini ve mikrosatellit denilmektedir. Polimorfik mini ve mikrosatellit markerler kullanılarak yapılan genotiplendirmeler bireyler arasındaki polimorfizmin ölçülmesinde, popülasyon içi ve popülasyonlar arası taşınan genetik bilginin değerlendirilmesinde önem taşımaktadır. 1989 yılında PZR aracılığıyla genom içerisinde art arda tekrarlanan (tandem repeated) DNA sekanslarının bulunduğu ve bunların polimorf olduğunun ya da yüksek düzeyde allelik varyasyon gösterdiğinin bulunmasıyla birlikte bu kısa tekrarlı gen sekansları önem kazanmıştır (Neitzel, 1989). Minisatellitler, motiflerin kopya sayıları bakımından yüksek oranda mutasyona maruz kalan, 7-24 baz çiftinden ibaret olan kısa sıralı tekrarlı DNA motiflerinden oluşan nötral DNA bölgeleri olarak bilinmektedir (Jeffreys ve ark 1988). Mikrosatellitler; genom içinde tekli, ikili, üçlü veya dörtlü nükleotid permütasyonlarının herhangi birisinin art arda dizilmiş olarak tekrarlanmasıyla oluşan nötral polimorfik DNA sekanslarıdır. Minisatellitlerin tekrar sayısı genelde 100'den, mikrosatellitlerin tekrar sayısı ise genelde

1000'den daha az olmaktadır (Liu 1998). Çeşitliliğin nedeni bunların DNA'nın diğer nötr bölgelerine oranla daha yüksek mutasyon oranına sahip olmaları olarak bilinmektedir (Schlotterer 2000). Mayoz bölünme sırasında da rekombinasyon yoluyla bu mutasyonlar meydana gelebilmektedir (Blouin ve ark 1996). Mikrosatellitler ökaryotik genoma büyük ölçüde yayılmış ve bol olarak bulunurlar fakat bunun aksine minisatellitler, kromozomların telomerik ve sentromerik alanlarında görülmektedir. Mikrosatellitler çalışılan çoğu lokusta tekrar bölgesinin sayısında çok farklılıklar göstermesinden dolayı genetik biliminin birçok alanında moleküler işaretçi olarak önem taşımaktadır.

1.9. *Theileria spp* ve Popülasyon Genetiği

Theileria annulata'nın antijen genleriyle yapılan çalışmalarda parazitin izolatları arasında önemli derecede genetik çeşitlilik olduğu görülmüştür (Ben Miled 1993, Ben Miled ve ark 1994). Bu çalışmalarda genel olarak tek bir lokus üzerindeki polimorfizmler analiz edilerek bunun meydana gelen ürünün yapısına ve işlevine olan etkisi incelenmiştir. Doğru bir şekilde genotipleme yapabilmek için uygun sayıda moleküler işaretçiler belirlemek ve uygun yapıda birçok parazit izolatlarına sahip olmak gerekmektedir. Bu yüzden *Theileria* türleri ile yapılan popülasyon genetiği çalışmaları çok sınırlı kalmıştır.

Theileria annulata stokları kullanılarak Tunus' da sınırlı bir alanda çeşitlilik seviyesini ölçmek üzere oldukça kapsamlı bir çalışma yapılmıştır (Ben Miled ve ark 1994). Bölgede görülen polimorfizmin derecesini belirlemek için çeşitliliğin daha geniş alanda mı görüldüğü ya da yüksek seviyedeki varyasyonun sınırlı bir bölgede mi var olduğu olasılıkları değerlendirilmiştir. 51 adet parazit stoğu, 4 biyoiklimsel bölge içinde bulunan 17 farklı alandan toplanmıştır. Bu stoklar makroşizontla enfekte in vitro hücre dizilerinden oluşmaktadır. Geriye kalan stoklar piroplazm hazırlamak için enfekte hayvanın eritrositlerinden purifiye edilmiştir. İzolatlar glukoz fosfat izomeraz (GPI) fenotipi bakımından değerlendirilmiştir. İzoenzimler aynı enzimlerin değişkenidir ve aynı lokusun farklı allellerinden kodlanmaktadır. Popülasyon içerisindeki birçok enzim değişkenlik göstermez ve polimorfik enzimlerin çoğu sadece birkaç değişkene sahiptir. Bu olay genetik farklılıkları

çözmek için izoenzim analizini sınırlandırmasına rağmen zaman ve para açısından sadece birkaç polimorfik protein gerektirmektedir. Çalışmada kullanılan izolatların büyük bir çoğunluğu 7 değişken formdan oluşan birçok üçlü bant vermiştir. Bunlara ek olarak aynı izolatlar kullanılarak iki farklı analiz daha yapılmıştır. Bunlardan biri RFLP metodu, diğeri IFA tekniği kullanılarak polimorfizmler belirlenmiştir. Enfekte hücre dizileriyle yapılan bu çalışmada farklı parazit genotip ve fenotiplerinin sıklığının değişken olduğunu ve karışık popülasyonların homojen popülasyonlardan daha sık olduğunu göstermiştir. Bu sonuç daha önce yapılan çalışmalarla da uyum göstermektedir (Shiels ve ark 1986, Wiliamson ve ark 1989). Bu çalışmalardan birinde monoklonal antikolar kullanılarak farklı ülkelerden elde edilen *T. annulata* izolatlarının değişkenliği gösterilmiştir (Shiels ve ark 1986).

Enfekte *Rhipicephalus appendiculatus* kenelerinden elde edilen *Theileria parva* haploid sporozoit popülasyonları, büyük genom marker analizleri kullanılarak seksüel rekombinasyon açısından değerlendirilmiştir (Katzner ve ark 2006). Sığır lenfositlerinin in vitro enfeksiyonuyla elde edilen 234 adet parazit klonlarının analizi, 64 polimorfik marker bölgesinin 48 ayrı kombinasyonunu ortaya çıkarmıştır. Bir genotip klonların yüzde 75'inden fazlasında sayılmış ve buna göre popülasyonun kendi içinde melezlendiğini göstermiştir. Meydana gelen rekombinasyonun iki farklı genetik materyalin birleşiminden oluştuğu markerlar ile belirlenmiştir. Polimorfik markerlardan 4 tanesi sitotoksik T hücre antijen bölgesini kodlayan bölge içindedir. Bu bölgenin kromozom içinde ve kromozomlar arasında iki farklı genetik materyalin birleşimiyle oluştuğu ve buna bağlı olarak rekombinasyonun immun tanınma üzerinde etkisinin olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca, sığır ve aynı kene kolonisi yoluyla elde edilen 142 klondan köken alan popülasyonun marker analizleri 18 genotip ortaya çıkarmıştır. Bu genotip popülasyonun yüzde 75'inde orijinal dominant genotipi içerirken kalan klonlarda yüksek seviyede melezlenmiş genotipler içermektedir. Ayrı kene kolonileri kullanılarak farklı iki stabilattan elde edilen yeni nesiller; her bir nesilin popülasyon yapısında kaymalar olduğunu, vektör kenenin parazit üzerinde rastgele olmayan seçici bir baskısı olabileceğini göstermektedir (Katzner ve ark 2006).

Theileria annulata'nın büyük ölçüde genetik çeşitliliğe sahip olduğunun bilinmesine rağmen doğal popülasyonlarının genetik yapısı ve konak sığırdaki enfeksiyonun çeşitlilik

seviyesi hakkında detaylı bilgi eksikliği bulunmaktadır. Canlı atenuye aşuların yaygınlık göstermesiyle ve sahada parazite karşı ilaç direnci oluşmasıyla tek bir konakta ve daha geniş popülasyonlarda bulunan parazitin genetik çeşitliliğine şekil veren faktörlerin kavranması önem kazanmaktadır. *T. annulata* popülasyonlarının kapsamlı bir genetik analizden geçirilmesi amacıyla Türkiye ve Tunus gibi endemik bölgelerden elde edilen örneklerde mikro ve mini satellit genotipleme sistemi kullanılarak detaylı bir çalışma yapılmıştır (Weir ve ark 2011). Çalışma sonrasında tüm hayvanların (305 adet) çoklu parazit genotipini barındırdığı ve sadece iki örneğin birbiriyle tamamen aynı baskın çok lokuslu profil içerdiği görülmüştür. Konağın yaşı ile enfeksiyon çeşitliliği doğru orantı göstermiştir. Aşılı hayvanlar da aynı doğru orantıya sahipken bunun basitçe immunize genotip varlığına bağlı olmadığı gösterilmiştir. İmmunize genotipin yayılmasıyla ya da yerel parazit varlığı ile rekombine olması ile ilgili doğrudan bir kanıt ulaşılamamıştır. Genetik analizler parazit popülasyonlarının genel olarak panmiktik (üreyen popülasyon içerisinde rastgele çiftleşme) olduğunu doğrulamıştır.

Theileria parva popülasyonlarının mini ve mikrosatellit markerler kullanılarak yapılan analizlerinde saha izolatlarındaki enfeksiyonlarda önemli oranda genotipik çeşitlilik ve izolatlar arasında yüksek düzeyde farklılık belirlenmiştir (Oura ve ark 2003; Odongo ve ark 2006). Afrika'da yapılan bir çalışmada bufalo ve sığır'da bulunan *T. parva* popülasyonları karşılaştırılmıştır (Oura ve ark 2011). Bu popülasyonların birbirine karışıp karışmadığı ile ilgili mikro satellite işaretçiler ve diğer bazı yöntemler kullanılmış, sonuç olarak bufalo ve sığırdaki gen havuzunun farklı olduğu, bufalo kaynaklı *T. parva* genotipinin sığır popülasyonuna geçişi ile ilgili bir bulguya rastlanmamıştır. Yine *T. parva*'nın endemik olarak görüldüğü Uganda'nın 3 farklı bölgesinde saha izolatlarının popülasyon yapısını belirlemek üzere sığır ve buzağılardan kan örnekleri toplanmıştır (Oura ve ark 2005). Toplanan kan örneklerine 12 adet mini ve mikro satellit işaretçi kullanılarak PZR sonrasında yüksek çözünürlüklü Spreadex jeller kullanılarak analiz yapılmıştır. Her örneğin aynı lokusunda predominant bir allel belirlenmiştir. Sığırların %81'i çoklu genotipe sahipken, buzağuların sadece %35'inin çoklu genotipe sahip olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni, buzağuların parazitle olan limitli etkileşiminden kaynaklanmaktadır. Farklı coğrafik alanlardaki parazit popülasyonları arasındaki alt yapıları belirlemede karşılaşılan zorluk, hayvan alım satımı ya da hayvanların bir bölgeden başka bölgeye taşınmasıyla açıklanabilmektedir.

Bu tez çalışmasında; *Theileria annulata*'nın deneysel olarak ortaya konulamamış olan seksüel döneminin genomik ve antijenik düzeydeki değişimlerini kapsamlı olarak belirleyebilecek bir incelemesi yapılmıştır. Bunun için rekombinasyon sonrası iki farklı (klonal ve klonal olmayan) *T.annulata* izolatu, mini ve mikrosatellit markerler kullanılarak analiz edilerek birbirleriyle karşılaştırılmış ve rekombinasyon sonrası parazit popülasyonlarında oluşan çeşitlilik ile rekombinasyonun antijenik bölgelere olan etkisi araştırılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Theileria annulata'nın klonal ve klonal olmayan parazit popülasyonlarında rekombinasyon sonrası oluşacak genetik ve antijenik çeşitliliğin belirlenmesinde ve birbirleri ile karşılaştırılmasında kullanılan yöntemler *in vivo* ve *in vitro* deneyler, polimorfik mini ve mikrosatellit markerler kullanılarak yapılan moleküler testlerden oluşmaktadır.

In vivo deneyler; *T.annulata* ile enfekte klonal hücre kültüründen sporozoit stabilatının elde edilmesi amacıyla bir buzağıda oluşturulmuş olan deneysel enfeksiyonu kapsamaktadır.

In vitro deneyler ise; buzağılarda oluşturulan deneysel enfeksiyonu takiben kenelere aktarılan parazitlerde rekombinasyon sonrası oluşacak sporozoitlerin izole edilmesi ve sığır PBM (perifer kan monositleri) hücrelerinin enfekte edilmesinden oluşmaktadır.

Oluşan klonal ve klonal olmayan parazit popülasyonlarındaki genetik ve antijenik çeşitlilik sırasıyla mini ve mikrosatellit markerler ile hücrel ve humoral yanıtta sorumlu antijenlere özgü primerler kullanılarak moleküler yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir.

2. 1. *In vivo* Deneyler

2.1.1. Deneysel Enfeksiyonda Kullanılacak Hayvanın Seçimi

Deneysel enfeksiyonda kullanılacak buzağılar, moleküler laboratuvarımızda rutin olarak uygulanan *T.annulata* sitokrom b genine özgü primerlerin kullanıldığı PZR (Bilgiç ve ark 2010) ve *T.annulata* ile enfekte lenfositlerden hazırlanan makroşizont antijenlerinin kullanıldığı IFAT ile test edilmiştir. Bu amaçla, belirlenen 3-6 aylık arası hayvanlardan EDTA'lı ve antikoagülsüz tüplere alınan kan örneklerinden sırasıyla DNA ve serum

örnekleri çıkartılmıştır. Wizard Genomik DNA Ekstraksiyon Kiti (Promega, ABD) kullanılarak kandan DNA ekstraksiyonu yapılmış ve elde edilen DNA + 4°C’de saklanmıştır.

Buzağuların test edilmesi amacıyla yapılan PZR’da 50 µl’lik son hacimde, 45 mM Tris–HCl, pH 8.8, 11 mM (NH₄)₂SO₄, 4.5 mM MgCl₂, 0.113 mg / ml BSA, 4.4 µM EDTA, herbir dATP, dCTP, dGTP ve dTTP’tan (Solis Biodyne, Estonya) 1 mM, 1 U Hot FIREPol DNA polimeraz (Solis Biodyne, Estonya), 1 µM ileri ve geri yönlü primer çifti ile 2 µl DNA örneği kullanılmıştır. Reaksiyon Techne TC–512 marka otomatik termal sikluslu makinede gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon 94°C’de 3 dakikalık ön denaturasyonu takiben, her siklus denaturasyon (95°C’de 50 saniye), bağlanma (50°C’de 50 saniye) ve uzama (72°C’de 1 dakika) aşamalarından oluşmak üzere 30 siklus ve 72°C’de 10 dakikalık son uzama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra her PZR ürününden 10 µl, mililitresinde 0,05 µl SafeView (abm, Kanada) bulunan %1,5’lik agaroz jelde 90 voltluk akımda bir saat onbeş dakika elektroforeze tabi tutulmuş ve son olarak ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir. UV ışık altında 312 bp’lık ürün görülmeyen örnekler negatif kabul edilmiştir.

IFA testinde kullanılacak serum örnekleri ise buzağulardan antikoagülsüz tüplere alınan kan örneklerinin 1500 devirde 10 dakika santrifüj edilerek ayrıştırılmasıyla elde edilmiş ve 1,5 ml’lik ependorflara konularak testte kullanılmaya kadar -20°C’de saklanmıştır. IFA testinde, *T. annulata* ile enfekte hücre kültürlerinden Minami ve arkadaşları (1983) tarafından belirtilen yöntem ile hazırlanan antijenler kullanılmıştır. Bu yöntemde; üreme vasatında [(RPMI 1640+%10 NCS (Gibco, UK) +Penisilin/Streptomisin (Gibco, UK)] bulunan hücrelerin Thoma lamında sayımı yapıldıktan sonra ml’sinde yaklaşık olarak 10⁶ hücre bulunan kültürler 1500 devirde 10 dakika 15 ml’lik falkon tüplerde santrifüj edilerek dipte toplanmaları sağlanmış ve bu hücrelerin üzerine 15 ml 1xPBS, pH 7.2 eklenerek tekrar sulandırılarak yukarıdaki şekilde santrifüj edilmişlerdir. Bu işlem toplam üç kez tekrarlanarak hücreler yıkanmıştır. Son yıkama işleminden sonra dipte toplanan hücreler ml’sinde 5x10⁷ hücre olacak şekilde 1xPBS (fosfat tampon çözeltisi) ile sulandırılmış daha sonra üzerine eşit hacimde soğuk 1/10’luk formalin (%3.7 formaldehid PBS içerisinde sulandırılarak hazırlanmış) damla damla eklenerek karıştırılmış ve bu karışım 10 dakika boyunca buz üzerinde bekletilerek hücrelerin fiksasyonu sağlanmıştır. Fikse edilen hücreler, daha önceden

elmas kalemiyle çizilerek hazırlanan temiz lamalar üzerindeki yuvarlak kuyucuklara, her kuyucuğa bir damla gelecek şekilde, otomatik pipetle damlatıp çekilerek lamaların üzerine konulduktan sonra oda ısısında bir saat kurumaya bırakılmışlardır. Kurutma işleminden sonra üzerinde antijenler bulunan lamalar peçetelere sarılarak içerisinde silika jel bulunan torbalar içinde kullanılmaya kadar - 20°C’de saklanmışlardır. IFA testinde kullanılacak lamalar ilk olarak -20°C’den alınarak +4°C’de yarım saat daha sonra oda ısısında yarım saat bekletilerek kademeli olarak çözdürülmüştür. Sonra lamalar üç kez PBS ile yıkanmıştır. Bu lamlardaki fikse edilmiş hücrelerin üzerine PBS içerisinde 1:160 oranında sulandırılmış birincil antikorlar; (1) şüpheli hayvana ait serum, (2) testin pozitif kontrolü olarak kullanılan ve pozitif hayvana ait serum ve (3) negatif kontrol (negatif olduğu bilinen serum) örnekleri her lam üzerindeki ilgili kuyucuklara 10’ar µl konularak 30 dakika boyunca nemli ortamda, oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır. Bunu takiben lamalar üç kez 1xPBS ile beşer dakika boyunca yıkanarak bağlanmamış antikorlar uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 1:80 oranında sulandırılmış ikincil antikor karışımından [12,5 µl FITC ile işaretli anti-bovine IgG (Sigma, ABD)+12,5 µl Evansblue (Sigma, ABD)+970 µl PBS] her göze 10 µl gelecek şekilde eklenerek yukarıda belirtildiği şekilde 30 dakika boyunca oda ısısında, karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun bitiminde lamalar 1xPBS ile beşer dakika yıkanarak bağlanmamış ikincil antikorlar uzaklaştırılmıştır. Son olarak lamaların üzerine pasteur pipeti yardımıyla birer damla kapama sıvısı (10 ml 50 mM Tris, pH 9.2 + 20 ml gliserol) konularak lamel yardımı ile üzerleri kapatılarak floresans mikroskop (Olympus BX51) altında incelenmiştir. Mikroskop altında incelenen örneklerde görülen yoğun floresan ışımaya (+), az ışımaya ve hiç ışımaya olmaması (-) olarak değerlendirilmiştir. Hem serolojik, hem de moleküler testlerle *T. annulata* negatif olduğu belirlenen hayvanlar çalışmaya dahil edilmiştir.

2.1.2. Hücre Kültürlerinin Seçimi ve Buzağıda Deneysel Enfeksiyonun Oluşturulması

Theileria annulata klonal ve klonal olmayan popülasyonlarında, rekombinasyon sonrasında oluşan genetik ve antijenik çeşitliliğin seviyesinin ve rekombinasyonun yoğun olduğu kromozomal bölgelerin belirlenmesi amacıyla klonal hücre kültüründen elde edilmiş

sporozoit stabilatlarının hazırlanması amacıyla buzağıda oluşturulan deneysel enfeksiyonda klonal *Theileria annulata*/Ankara D7 hücre kültürü kullanılmıştır (Weir 2006).

Bu amaçla yapılan deneysel enfeksiyonda; klonal tipte parazit popülasyonuna sahip olduğu belirlenen *T.annulata*/Ankara D7 hücre kültürü sıvı azot içerisinde %10 DMSO kullanılarak muhafaza edilen klonal D7 hücre kültürü 37°C'de çözündürüldükten sonra içerisinde 9ml RPMI 1640 (%10NCS+ penisilin/streptomisin + L-glutamin) bulunan 15ml'lik falkon tüp içerisine konulmuş ve bu karışım 1500 rpm'de 10dk boyunca, +4°C'de santrifüj edilerek hücrelerin DMSO'dan arınarak dipte toplanması sağlanmıştır. Üstteki sıvı pipet yardımı ile uzaklatılarak, alttaki pelet ml'sinde 2×10^6 hücre olacak şekilde RPMI 1640 vasatı içerisinde sulandırılarak 3-6 aylık erkek/dişi hostayn buzağuların sol preskapular lenf yumrusu üzerine subkutan yolla enjekte edilmiştir. Enfekte edilen hayvanın her gün rektal vücut ısıları alınarak, enfekte edilen taraftaki preskapular lenf yumrusu incelenmiş ve genel durumları not edilmiştir. Parazitolojik ve hematolojik muayeneler için parazitin enjeksiyonu sonrası her iki günde bir 5 ml EDTA'li tüplere Vena jugularis'ten kan alınarak, enfeksiyonun 5. gününden sonra her iki günde bir sol prescapular lenf yumrusundan biyopsi örnekleri alınarak yayma frotiler hazırlanıp Giemsa ile boyandıktan sonra makroşizontlar ile enfekte lenfosit hücrelerinin varlığı yönünden incelenmiştir. Vena jugularis'ten alınan EDTA'lı kan örneklerinden hazırlanan ince yayma kan frotileri Giemsa ile boyanarak eritrositler içerisindeki piroplazmlar yönünden incelenmiştir. İlk piroplazmın görüldüğü gün hayvanın kulak köklerindeki kıllar tıraş bıçağı ile temizlenip uygun kulak torbalarının takılması için hazır hale getirilmiş ve kulak torbası takılan hayvanlar kontrollü bir ortamda kenelerin (ADÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı kene ünitesinde hali hazırda devam etmekte olan *Hyalomma excavatum* (Hex kolonisi) kene kolonisine ait aç nimfler) kulağa konulması amacıyla 28°C ve %80 nem ihtiva eden farklı bir odaya alınmıştır. Bu odada kenelere enfeksiyonun naklini sağlamak amacı ile enfekte edilecek buzağı için yaklaşık 3000 adet aç nimf kullanılmıştır. Aç nimfler buzağuların kulaklarındaki torbalara eşit sayıda dağıtılmıştır (Walker ve ark 1983). Kenelerin yerleştirilmesini takip eden 3. ve 10. günler arasında düzenli olarak kulak torbaları açılarak kontrolleri yapılmıştır. Kulak torbası içerisine doyup düşen nimfler toplanarak 28°C'lik etüvde, %80 nemli koşullarda muhafaza edilerek gömlek değiştirmeleri sağlanmış ve gömlek değiştirip aç olgun hale gelen ve kitinizasyonlarını

tamamlayan keneler +12°C'lik etüve alınarak sporozoit stabilatları hazırlanmaya kadar bekletilmiştir.

2. 2. In vitro Deneyler

2.2.1. Sporozoit Stabilatlarının Hazırlanması

Rekombinasyon sonrası *Theileria annulata*'nın klonal parazit popülasyonlarında oluşacak genetik ve antijenik çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılacak ilk sporozoit stabilatı *T.annulata*/Ankara D7 hücre kültürleri ile enfekte edilen hayvanların üzerinde beslenen kenelerden elde edilmiştir. Enfekte kenelerden sporozoit stabilatları hazırlanması amacıyla tavşanlardan yararlanılmıştır. Enfekte keneler 28°C'lik etüve alınarak üç gün boyunca aktive edilmiş ve bunu takiben kenelerin tükürük bezlerinde sporozoitlerin gelişmesi için tavşan kulağına konularak 72 saat boyunca beslenmeleri sağlanmıştır. Bu amaçla tavşanların her bir kulağına 150 adet aç olgun kene konulmuştur. Uygun şekilde traş edilerek hazırlanan tavşanların kulaklarına takılan torbalar içerisine konan keneler 24 saat sonra kontrol edilmiş ve kulağa tutunmayan keneler uzaklaştırılmıştır. 72 saatin sonunda kulak torbası açılarak kan emen tüm keneler elle toplanıp steril falkon tüplere konularak laboratuvara getirilmiştir. Tavşanın kulağından toplanan kenelerdeki enfeksiyon oranlarını belirlemek amacı ile kenelerin kulaktan düştüğü farklı günlere ait 10 dişi 10 erkek toplam 20 kenenin tükürük bezi diseke edilip metilen green pyronin boyama tekniği ile boyanmıştır (Walker ve ark 1979). Enfeksiyon oranı belirlendikten sonra keneler ezilerek sporozoit stabilatları hazırlanmıştır (Brown 1981). Bu amaçla; 72 saat sonunda tavşan kulağından yukarıda anlatıldığı şekilde toplanan keneler laboratuvara getirilerek doku kültüründe 50 ml'lik falkon tüpler içerisine konularak sırasıyla %1'lik Benzolkonyum klorür ile bir kez, %70 etanol ile üç kez ve içerisinde %20 NCS (Gibco, UK), 2xPenisilin/streptomisin 20U/ml (Gibco, UK) ile 5 mg/ml Amphoterasin-B ihtiva eden RPMI-1640 vasatı ile yıkanmıştır. Daha sonra keneler steril havan içerisinde ml'sinde 4 kene equivalent dozda olacak şekilde vasat eklenerek ezilmiş ve ezinti steril falkon tüplere aktarılmıştır. Falkon tüpler içerisindeki ezinti +4°C'de 100 g'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve sporozoit stabilatlarını içeren süpernatant steril bir falkona

aktarılmıştır. Daha sonra stabilat dondurularak sıvı azot içerisinde saklanıp, PBM hücrelerinin *in vitro* enfeksiyonunda kullanılmıştır.

Rekombinasyon sonrası *Theileria annulata*'nın klonal olmayan parazit popülasyonlarında oluşacak genetik ve antijenik çeşitliliğin belirlenmesinde ise Anabilim Dalında daha önceki çalışmalarda gerçekleştirilen deneysel enfeksiyonlar sonucunda elde ettiğimiz *T.annulata*/Aova A10 saha izolatına ait sporozoit stabilatları kullanılmıştır. *T.annulata*/Aova A10 kodlu saha izolatının polimorfik markerler (TS5, TS6, TS8, TS9, TS12, TS15, TS16, TS20, TS25 ve TS31) ile yapılan incelemesinde A10 izolatına ait 39 klonun %95'inin tek bir allel ihtiva ettiğini ve bu izolatın kullanılmasının uygun olacağını göstermiştir.

2.2.2. PBM Hücrelerinin *in vitro* Enfeksiyonu ve Klonlanması

Enfekte kenelerden elde edilip sıvı azot içerisinde saklanan sporozoit stabilatları çözdürüldükten sonra, enfekte olmayan sağlıklı hayvandan heparinli tüp içerisine steril iğne ucu kullanılarak Vena jugularis'ten alınan 10 ml miktarındaki kan kullanılarak hazırlanmış PBM hücrelerinin enfekte edilmesinde kullanılmıştır. Enfekte olmayan, sağlıklı hayvandan alınan periferik kan mononükleer hücreleri, heparinli tüplere alınan kan örneklerinden steril şartlarda dansite gradient yöntemiyle izole edilmiştir (Brown 1981). 10 ml kan örneği bire bir oranında PBS ile sulandırılmış ve 8 ml ficoll (1,077 g/ml, Biocoll, Biochrom AG, Berlin) solüsyonu üzerine kan karışmayacak şekilde yavaşça ilave edilmiştir. 1000 x g, 30 dakika, 15°C de santrifüj edilmiştir. Densite farkından dolayı falkon tüpte en altta kırmızı kan hücreleri, üzerinde ayırıcı solüsyon ve en üst katmanda kan plazması olmak üzere toplam üç katman oluşmaktadır. Kan plazması ile ayırıcı solüsyon arasında bulunan PBM dikkatlice alınmış 10 ml PBS içerisine konulmuş ve yıkama işlemi 350xg, 10 dakika, 15°C'de gerçekleştirilmiştir. Dipte toplanan beyaz kan hücrelerine aynı yıkama işlemi 3 defa uygulanmıştır. Yıkama işlemleri sonucunda elde edilen pelet içerisinde %20 buzağı serumu (New Born Calf Serum; NCS, Gibco, UK), 10U/ml Penisilin/streptomisin (Gibco, UK) ve 2 Mm L-glutamin (Gibco, UK) içeren komple RPMI-1640 (Gibco, UK) vasatına ekim yapılarak üremenin gerçekleşmesi için %5 CO₂'li etüvde, 37°C'de inkübe edilmiştir. Elde edilen hücre

kültürleri düzenli aralıklarla invert mikroskop altında üreme bakımından kontrol edilmiş ve parazite ait makroşizontların belirlenmesi amacı ile hücre santrifüj tekniğine başvurulmuştur. Bunun için hücre süspansiyonundan hücre yoğunluğuna göre 50-100µl alınarak 200 x g, 5 dk, 25°C'de sitosantrifüj yapılmış ve preparatlar absolut methanol (Sigma, Fransa) içerisinde 5 dk tespit edildikten sonra %5 Giemsa (Merck, Almanya) boyasında 45 dk boyanarak mikroskop altında makroşizont ile enfekte hücreler aranmıştır. Kandan PBM'in izolasyonunu takiben, her iki veya üç günde bir medyum değiştirilmiştir. Elde edilen PBM hücreleri (10^7 hücre) 1 ml RPMI-1640 (hücre kültürü vasatında) içerisinde süspense edilmiş ve ml'sinde bir kene equivalent dozda hücre kültürü vasatında dilüye edilerek hazırlanan eşit hacimdeki kene stabilatı ile karıştırılmıştır. Bu süspansiyon zaman zaman karıştırılmak suretiyle iki saat boyunca 37°C'de inkube edilmiş ve bu sürenin sonunda üzerine 8 ml hücre kültürü vasatı eklenip 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra dipte toplanan enfekte hücreler ml'sinde 2×10^6 hücre olacak şekilde hücre kültürü vasatı ile tekrar süspense edilip 24 kuyulu plaklara her kuyuya 1 ml gelecek şekilde dağıtılıp 48 saat süreyle %5 CO₂'li etüvde, 37°C'de inkübe edilmiştir. Toplanan hücreler trypan blue ile boyanarak ölü/canlı hücreler sayılmış ve hücre kültürü vasatında ml'sinde 10^5 canlı hücre olacak şekilde sulandırılmıştır. Bu süspansiyon 96 kuyulu plaklara her kuyuya 100 mikrolitre gelecek şekilde, her klon için iki kuyucuk kullanarak ve kuyularda sırasıyla 1×10^4 , 3×10^3 , 1×10^3 , 3×10^2 , 1×10^2 ve bir hücre olacak şekilde sulandırılmıştır. Bu plaklar %5 CO₂'li etüvde, 37°C'de inkube edilmiş ve klonal hücreler yönünden incelenmiştir. Pozitif üreme olan kuyucuklardaki hücrelerin üçte birlik kısmından ticari kit kullanılarak (Promega, ABD) DNA izolasyonu yapılmış ve polimorfik satellite markerler kullanılarak hibrit klonlar yönünden PZR ile test edilmiştir. Kuyucuklarda kalan hücreler üzerine taze vasat eklenip tek klonlar üretilerek dondurulmuş ve sıvı nitrojende muhafaza edilmiştir.

2.2.3 DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, ABD) kullanılmıştır. İçerisinde 5×10^6 canlı hücre bulunan vasat steril falkon tüplere aktararak 350 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek hücrelerin dipte toplanması sağlanmıştır. Santrifüj sonunda

üstte kalan süpernatant kısmı dökülerek hücreler 200 µl 1xPBS ile alt üst edilmiş ve steril eppendorf tüplerde toplanmıştır. Daha sonra örnekler 13000–16000 rpm’de 10 saniye santrifüj edilerek üstte kalan PBS uzaklaştırılmış ve hücreler süspansiyon haline gelene kadar 10–15 saniye hafifçe vortekslenmiştir. Üzerine 600 µl nüklei liziz solüsyonu eklenerek hücrelerin lize olması için 5-6 kez pipete edilmiştir. 3 µl RNAse solüsyonu da eklenerek tüpler 2–3 kez alt-üst edilmiş ve ısıtma bloğunda 37°C’de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İşlem sonunda örnekler yaklaşık 5 dakika oda ısısında bekletilmiş, inkübasyon sonucunda 200 µl protein çöktürme solüsyonu ilave edilerek, yüksek devirde 20 saniye vortekslenmiş ve 5 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. Çözünen proteinleri çöktürmek amacıyla örnekler 13000–16000 rpm’de 4 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda dipte kalan beyaz protein pelletine dokunulmadan süpernatant alınmış ve bu üst faz içerisinde 600’er µl’lik isopropanol bulunan 1.5 ml’lik eppendorflara aktarılmıştır. Tüpler DNA bulutu görülünceye kadar hafifçe çalkalanmış ve sonra 13000–16000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. İsoopropanol, DNA yerinden hareket etmeyecek şekilde dikkatlice dökülmüş ve DNA üzerine 600 µl % 70’lik ethanol konularak tüp hafifçe alt-üst edilmiş ve 13000–16000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra üstteki ethanol dikkatli bir şekilde pipet yardımıyla uzaklaştırılmış ve pelletin kuruması için 15–20 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. Tüplere 100 µl DNA Rehidrasyon Solüsyonu eklenerek 65 °C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Tüm bu işlemler sonucunda elde edilen örnekler kullanıma kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

2. 3. Moleküler Testler

2.3.1. Genotiplendirmede Kullanılacak Polimorfik Markerların Belirlenmesi

Rekombinasyon sonrasında klonal ve klonal olmayan iki farklı *Theileria annulata* popülasyonunda oluşacak genetik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda kullanılmış mini ve mikrosatellit markerler (Weir 2006, Weir ve ark 2010) ile bunlara ilave olarak bu çalışmada belirlenmiş yeni polimorfik mini ve mikrosatellite markerler kullanılmıştır. İlave markerler, parental ile klonal kültürlerin ayırımını yapabilen ve *T.annulata*’nın dört kromozomu üzerindeki yerleri bakımından mevcut markerlere oranla

yapılacak analizler için yeterli düzeyde ve daha geniş bir kapsama alanına sahip olup olmamalarına bakılarak belirlenmiştir.

Polimorfik mini ve mikrosatellite markerlerin belirlenmesinde incelenecek genom dizilimi ile tekrarlı bölgelerin eş zamanlı olarak aynı programın farklı sayfalarında görülebilmesine ve verilerin daha kısa sürede, daha etkin olarak analizine olanak sağlayan Unipro UGENE ver.1.9.7 programı (Okonechnikov ve ark 2012) kullanılmıştır. Bu bölgeleri çoğaltmada kullanılacak primerler sıralı tekrarlı dizilimleri içine alacak şekilde korunmuş bölgelerden tasarlanmıştır. Daha sonra her markerin tek bir bölgeyi temsil etmesi, belirlenen uzunluklarda ürünleri çoğaltması, *T.annulata*'ya özgü ve polimorfik yapıda olması ile farklı bölgelere ait izolatları çoğaltabilmesi yönlerinden değerlendirilerek uygun olanlar seçilerek kullanılmıştır.

Unipro UGENE ver.1.9.7 programına yüklenecek olan *Theileria annulata* genomik DNA diziliminin elde edilmesi için; NCBI veri tabanından yer alan 2,632,132 bp uzunluğundaki birinci {Ref. No; NC_011129.1 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/197260935?reportfasta>)}, 1,979,170 bp uzunluğundaki ikinci {Ref. No; NC_011099.1 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/195934691?reportfasta>)}, 1,842,271 bp uzunluğundaki üçüncü {Ref. No; NC_011100.1 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/195671784?reportfasta>)} ve 1,842,271 bp uzunluğundaki dördüncü kromozomlarda {Ref. No; NC_011098.1 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/195670617?reportfasta>)} yer alan linear DNA'lara ait nükleotid dizilimleri fasta formatında indirilerek bilgisayara kaydedilmiştir. Daha sonra tek bir döküman altında birleştirilen toplam 8,352,520 bp uzunluğundaki dört kromozom'a ait nükleotid dizilimler sırasıyla rastgele karıştırılmış dizilimler ve gerçek DNA dizilimi olarak Unipro UGENE ver.1.9.7 programına yüklenerek mini ve mikrosatellite bölgeler taranmıştır. Rastgele karıştırılmış dizilimlere göre gerçek DNA diziliminde 10 kat fazla tekrarlı bölge belirleyen skor eşik değeri olarak belirlenmiştir. Belirlenen bu eşik değeri mini ve mikrosatellite bölgelerde tekrarlı motiflerin benzerliği (%96–100), minimum tekrar sayısı en az üç ve minimum tandem boyutu minisatellite bölgeler için en az üç ve mikrosatellite bölgeler için en az altı olacak şekilde suffix array algoritması kullanılarak ayrı ayrı tüm genom boyunca

taranmıştır. UGENE ver.1.9.7 programı kullanılarak yapılan tarama sonucunda 359 minisatellite ve 8973 mikrosatellite bölge belirlenmiştir. Belirlenen mini ve mikrosatellite bölgeler tüm genom boyunca tek tek taranarak; *T.annulata*'nın dört kromozomu üzerindeki yerleşim yerleri bakımından mevcut markerlere oranla daha iyi dağılıma sahip olmasına dikkat edilmiştir.

Belirlenen bölgeleri çoğaltmada kullanılacak primerler sıralı tekrarlı dizilimleri içine alacak şekilde korunmuş bölgelerden tasarlanmıştır. Bu primerler; *Theileria annulata* GeneDB veri tabanında anote edilmiş halde bulunan *T.annulata* genomu üzerinde gözle tasarlanmıştır. Primerlerin tasarlanmasında; uzun Adenin (A)/ Timin (T) tekrarlı bölgelerin olmamasına, guanin (G) ve sitozin (C) içeriğinin % 30–60 arasında ve Tm derecelerinin mümkün olduğunca birbirlerine yakın olmasına, 3' uçlarının G/C bazları ile bitmesi ve 3' ucunda G/C nükleotid tekrarlarının mümkün olduğunca yer almamasına, ayrıca primerlerin kendi ile veya diğer primerler ile primer-dimer, ikincil yapılar ve hairpin oluşturmaması gibi faktörler göz önünde bulundurularak tasarlanmıştır. Tasarlanan her primer çiftinin tek bir bölgeyi temsil etmesi, *T.annulata*'ya özgü olması, belirlenen uzunluklarda ürün elde edilip edilmediğinin belirlenmesi ve en uygun bağlanma ısılarının tespiti amacıyla *T.annulata*/Ankara C9 DNA'sı kullanılarak yapılan PZR ısı derecelendirmeli (gradient) termal sikluslu makine kullanılmıştır. Bu amaçla uygulanan PZR'da 25 µl'lik son hacimde, 20 mM Tris-HCl, pH 8.7, 11 mM (NH₄)₂SO₄, 1,5 mM MgCl₂, %50 gliserol, 0.1 µM EDTA, her bir dATP, dCTP, dGTP ve dTTP'tan 1 mM, 1U Hot FIREPol DNA polimeraz, 10 µM ileri ve geri yönlü primer çifti ile 1 µl C9 (*T.annulata*/Ankara) DNA örneği kullanılmıştır. Reaksiyon Techne TC-512 marka otomatik termal sikluslu makinede gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonda 94°C'de 12 dakikalık ön denatürasyonu takiben, her siklus için denatürasyon (95°C'de 50 saniye), bağlanma (55°C'de 10°C'lik derecelendirme [50,8–59,2°C isi aralığında] yapılmak suretiyle) ve uzama (72°C'de 1 dakika) aşamalarından oluşmak üzere 30 siklus ve 72°C'de 10 dakikalık son uzama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. PZR ile çoğaltılan ürünler ml'sinde 0,05 µl SafeView (abm, Kanada) bulunan %2'lik agaroz gelde 100 voltluk akımda bir saat elektroforeze tabi tutulup, ultraviole ışık altında görüntülenmiştir. UVP EC3 bioimaging sisteminde yer alan analiz programı kullanılarak yapılan görüntüleme sonrasında PZR ürünlerinin boyutları referans 100 bp'lık (Thermo Scientific, ABD) DNA markeri ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

2.3.2. Markerların Belirlenmesinde Kullanılan *Theileria annulata* İzolatları

Belirlenen polimorfik markerlar 27 farklı *Theileria annulata*, ve 2 farklı *Theileria* (*T. sergenti* ve *T. lestoquardi*) izolatu (Çizelge 2.1.) kullanılarak PZR ile test edilmiş ve her primer çiftinin tek bir bölgeyi temsil etmesi, *T.annulata*'ya özgü olması, belirlenen uzunluklarda ürün elde edilmesine olanak vermesi gibi yönlerden incelenerek en uygun markerler seçilmiştir.

Çizelge 2.1. Polimorfik mini ve mikrosatellitlerin test edilmesinde kullanılan parazit izolatları

Kodu	İzolat Türü	Parazit Dönemi	Tipi	Orijini
1	<i>Theileria sergenti</i>	Şizont	hücre kültürü	Japonya
2	<i>Theileria lestoquardi</i>	Şizont	hücre kültürü	Sudan
3	<i>T.annulata</i> 7	piroplasm	saha izolatu	Tunus
4	<i>T.annulata</i> Soba 2A5	Şizont	hücre kültürü	Sudan
5	<i>T.annulata</i> Razi J3	Şizont	hücre kültürü	İran
6	<i>T.annulata</i> Umbanein	Şizont	hücre kültürü	Sudan
7	<i>T.annulata</i> Tova p15	Şizont	hücre kültürü	İsrail
8	<i>T.annulata</i> Gharb43	Şizont	hücre kültürü	Fas
9	<i>T.annulata</i> Ode p58	Şizont	hücre kültürü	Fas
10	<i>T.annulata</i> JED4 p200	Şizont	hücre kültürü	Tunus
11	<i>T.annulata</i> Aova	Şizont	hücre kültürü	Türkiye
12	<i>T.annulata</i> Dalama	Şizont	hücre kültürü	Türkiye
13	<i>T.annulata</i> Pendik p313	Şizont	hücre kültürü	Türkiye
14	<i>T.annulata</i> Aydın p15	Şizont	hücre kültürü	Türkiye
15	<i>T.annulata</i> D.bakır p107	Şizont	hücre kültürü	Türkiye
16	<i>T.annulata</i> Ank A2	Şizont	hücre kültürü	Türkiye
17	<i>T.annulata</i> Aova	Piroplasm	saha izolatu	Türkiye
18	<i>T.annulata</i> Aova	Piroplasm	saha izolatu	Türkiye
19	<i>T.annulata</i> Aova	Piroplasm	saha izolatu	Türkiye
20	<i>T.annulata</i> Aova	Şizont	klon*	Türkiye
21	<i>T.annulata</i> Aova	Şizont	klon*	Türkiye
22	<i>T.annulata</i> Aova	Şizont	Klon	Türkiye
23	<i>T.annulata</i> Aova	Şizont	Klon	Türkiye
24	<i>T.annulata</i> Aova	Şizont	klon*	Türkiye
25	<i>T.annulata</i> Aova	Şizont	klon*	Türkiye
26	<i>T.annulata</i> Aova	Şizont	Klon	Türkiye
27	<i>T.annulata</i> Aova	Şizont	Klon	Türkiye
28	<i>T.annulata</i> Aova	Şizont	Klon	Türkiye
29	<i>T.annulata</i> Ankara D7	Şizont	Klon	Türkiye

(*);Birden fazla genotip ihtiva ettiği belirlenmiş klonal hücrelerdir.

2.3.3. Spektrofotometrede Ölçüm ve PZR

Rekombinasyon sonrası oluşacak muhtemel genotipik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla mini ve mikrosatellit markerler ile yapılacak olan PZR'da kullanılacak olan DNA miktarlarının birbirlerine yakın olması amacıyla hücre kültüründen hazırlanan DNA örneklerinin içerisindeki DNA miktarları 96 gözlü UV plaklar (Greiner, UV) kullanılarak spektrofotometrede (MultiscanGO, ABD) ölçülmüştür. Daha sonra her klona ait DNA örneği 200 µl son hacimli dilusyonda yaklaşık 2 ng/µl DNA konsantrasyonuna sahip olacak şekilde dilüye edilmiş ve genotiplendirme için belirlenmiş markerler kullanılarak yapılan PZR'lerde kullanılmıştır. Bu doğrultuda uygulanan PZR'da 50 µl'lik son hacimde, 20 mM Tris-HCl, pH 8.7, 11 mM (NH₄)₂SO₄, 1,5 mM MgCl₂, %50 gliserol, 0.1 µM EDTA, her bir dATP, dCTP, dGTP ve dTTP'tan 1 mM, 1 U Hot FIREPol DNA polimeraz, 10 µM ileri ve geri yönlü primer çifti ile 2 µl (4 ng) klonal DNA örneği kullanılmıştır. Reaksiyonlar 94°C'de 12 dakikalık ön denaturasyonu takiben, her siklus için denaturasyon (95°C'de 50 saniye), bağlanma (Çizelge 3.3) ve uzama (72°C'de 1 dakika) aşamalarından oluşmak üzere 30 siklus ve 72°C'de 10 dakikalık son uzama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri yüksek rezolüsyonlu hazır spreadex jellerde (Elchrom Scientific) elektroforezi yapılana kadar 4°C'de tutulmuştur.

2.3.4. Yüksek Rezolüsyonlu Hazır Jeller ile Elektroforez

Spreadex jeller (Elchrom Scientific, İsviçre), DNA parçalarının jelin yapısını oluşturan sentetik polimerlerden kaynaklanan yüksüz bir matrisde elektriksel alan uygulandığında, parçaların büyüklüklerine göre hareket ederek ayrılmasını sağlamaktadır. Spreadex jellerin bir diğer özelliği de belli bir limitin üstündeki DNA parçalarının jel içerisinde göçüne izin vermemesi ve bu sayede daha iyi bir rezolüsyon oluşturmasıdır. EL 1200 geniş mini jeller 250 bp ve 800 bp arasındaki uzunluktaki mini ve mikrosatellit DNA parçalarını ayırmasını sağlarken, EL 800 geniş mini jeller 200–500 bp arasında uzunluğa sahip DNA parçalarını, EL 600 geniş mini jeller 150–350 bp arasında uzunluğa sahip DNA parçalarını, EL 500 geniş mini

jeller ise 100–300 bp arasındaki DNA parçalarının ayırımında kullanılmaktadır. Spreadex jellerin kullanılmasında bir diğer önemli nokta da jele yüklenen DNA miktarıdır. Jelin fazla miktarda DNA ile yüklenmesi rezolüsyonu bozmaktadır. Bu nedenle, PZR ürün miktarlarının ölçümleri spektrofotometre cihazında yapılmıştır. Ölçümler sonucunda belirlenen DNA miktarları dilüye edilerek 10 ng miktarında DNA jele yüklenmiştir. Jeller, Origins (Elchro Scientific, İsviçre) horizontal elektroforez sistemi kullanılarak 55 °C'lik sabit ısıda, üretici firma (Elchro Scientific) tarafından önerilen koşullarda, firmanın websitesinde sunulan Virtual Electrophoresis programından faydalanarak elektroforeze tabi tutulmuştur (Çizelge 2.2.). Optimal koşullar altındaki elektroforez sonrasında jeller 3 bp'a kadar çözünürlük sağlamaktadır. Elektroforez solüsyonu olarak 30 mM TAE kullanılmıştır. Elektroforez sonrasında jeller 40 dakika boyunca 0,4 µg/ml Gelred (Biotium, ABD) ile boyanmış ve 254 nm'lik UV ışık altında görüntülenmiştir. Allellerin boyutları, içerisinde 75 – 622 bp arasında 50 DNA parçası barındıran M3 moleküler markerleri (Elchro Scientific, İsviçre) ile karşılaştırma yapılarak, VisionWorksLS (Versiyon 6.8, ABD) programı ile belirlenmiştir.

Çizelge 2.2. Spreadex jeller ile elektroforez.

Marker	Spreadex Jel Tipi	Voltaj (Volt)	Isı (°C)	Süre (Dakika)
TS5	Spreadex EL 800 Wide Mini S-4x25	120	55	120
TS6	Spreadex EL 1200 Wide Mini S-4x25	120	55	120
TS8	Spreadex EL 800 Wide Mini S-4x25	120	55	120
TS9	Spreadex EL 1200 Wide Mini S-4x25	120	55	120
TS12	Spreadex EL 800 Wide Mini S-4x25	120	55	120
TS15	Spreadex EL 800 Wide Mini S-4x25	120	55	120
TS16	Spreadex EL 1200 Wide Mini S-4x25	120	55	120
TS20	Spreadex EL 800 Wide Mini S-4x25	120	55	120
TS25	Spreadex EL 800 Wide Mini S-4x25	120	55	120
TS31	Spreadex EL 1200 Wide Mini S-4x25	120	55	140
MSC8	Spreadex EL 1200 Wide Mini S-4x25	120	55	260
MSC19	Spreadex EL 1200 Wide Mini S-4x25	120	55	270
MSC14	Spreadex EL 1200 Wide Mini S-4x25	120	55	270
Tmsc75	Spreadex EL 500 Wide Mini S-4x25	120	55	170
Tmsc77	Spreadex EL 600 Wide Mini S-4x25	120	55	140
Tmsc86	Spreadex EL 800 Wide Mini S-4x25	120	55	230
Tmsc31	Spreadex EL 800 Wide Mini S-4x25	120	55	120
Tmsc33	Spreadex EL 600 Wide Mini S-4x25	120	55	115
Tmsc37	Spreadex EL 600 Wide Mini S-4x25	120	55	180
Tmsc45	Spreadex EL 500 Wide Mini S-4x25	120	55	180
Tmsc48	Spreadex EL 800 Wide Mini S-4x25	120	55	120
Tmsc68	Spreadex EL 1200 Wide Mini S-4x25	120	55	260

2.3.5. Antijenlerde Boyut Farklılıklarının Belirlenmesi

Rekombinasyon sonucunda parazite karşı konak B-hücreleri tarafından gelişen humoral yanıtta sorumlu olduğu bilinen toplam 14 protein (SPAG (TA03755), Tams (TA17050), TaSP (TA17315), MeroI (TA13810), Tamr (TA08425), NC1 (TA20980), NC10 (TA16090), TA03155, TA15705, TA15710, TA15685, TA15690, TA15695, TA06510) seçilerek bunları çoğaltmada kullanılacak olan primer çiftleri tasarlanmıştır (Çizelge 2.3). Konak sitotoksik T-hücreleri tarafından hedeflenen antijenlerdeki boyut farklılıklarının belirlenmesinde ise toplam 10 protein (TA15705, TA19865, TA06115, TA03370, TA19320, TA12105, TA11565, TA10060, TA14970 ve TA17545) belirlenerek bu antijenleri çoğaltmada kullanılacak primerler tasarlanmıştır (Çizelge 2.3.). Primerlerin tasarlanmasında, anote edilip veri bankasına (www.genedb.org) kaydedilen *T.annulata* genomundan yararlanılmıştır. Primerlere ait en uygun bağlanma ısılarının tespiti amacıyla *T.annulata*/Ankara C9 DNA'sı kullanılarak yapılan PZR ısı derecelendirmeli (gradient) termal sikluslu makinede gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla uygulanan PZR'da 25 µl'lik son hacimde, 20 mM Tris-HCl, pH 8.7, 11 mM (NH₄)₂SO₄, 1,5 mM MgCl₂, %50 gliserol, 0.1 µM EDTA, her bir dATP, dCTP, dGTP ve dTTP'tan 1 mM, 1 U Hot FIREPol DNA polimeraz, 10 µM ileri ve geri yönlü primer çifti ile 1 µl C9 (*T.annulata*/Ankara) DNA örneği kullanılmıştır. Reaksiyon Techne TC-512 marka otomatik termal sikluslu makinede gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonda 94°C'de 12 dakikalık ön denatürasyonu takiben, her siklus için denatürasyon (95°C'de 50 saniye), bağlanma (55°C'de 10°C'lik derecelendirme [50,8-59,2°C isi aralığında] yapılmak suretiyle) ve uzama (72°C'de 1 dakika) aşamalarından oluşmak üzere 30 siklus ve 72°C'de 10 dakikalık son uzama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Büyüklükleri 1000 bp olan antijen bölgeler için uzama süreleri 1 dakika olurken, uzama süreleri 1000 bp den büyük olan antijen bölgelere her 1000 bp için fazladan 1 dakika uzama süreleri eklenmiştir. PZR ile çoğaltılan ürünler ml'sinde 0,05 µl SafeView (abm, Kanada) bulunan %2'lik agaroz gelde 100 voltluk akımda bir saat elektroforeze tabi tutulup, ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir.

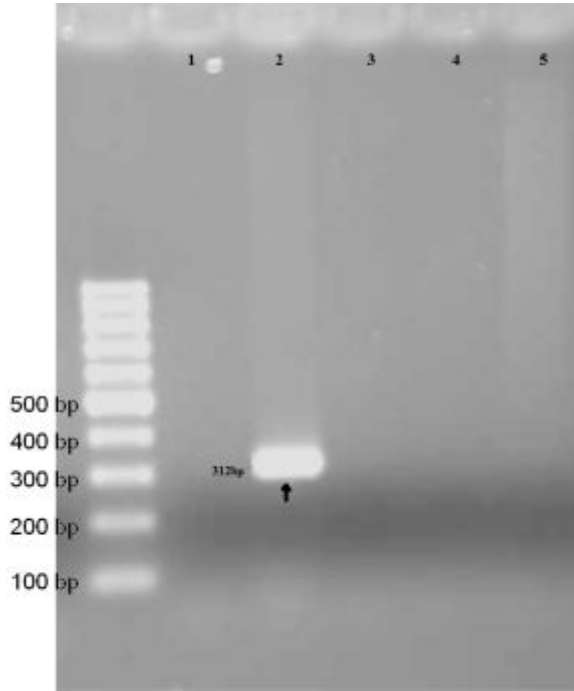
Çizelge 2.3. T ve B hücre antijenleri

<i>T.annulata</i> antijenleri	Kodlanan Protein	Antijenite	Çoğaltılacak bölge uz. (bp)	Primer dizilimleri (5'-3')
TA06510	hipotetik protein	B hücre	1000	For: tgtgttatctttaattttgtacatt Rev: acacattgggattggttita
TA15705	salgısal hipotetik protein	B ve T hücre	1008	For: cctacatagccccgggatgaatctcc Rev: ctctctaatcgattttctaatcc
TA15710	salgısal hipotetik protein	B hücre	1020	For: atggatcctgatggatctgaacct Rev: ttattgttttctatatcacggtt
TA15685	salgısal hipotetik protein	B hücre	848	For: tgattgagatcattttgcatt atggatcctgaagatggatctgag Rev: aaaatttaattggaatgctgataa ttatcttgggttactgtacca
TA15690	salgısal hipotetik protein	B hücre	954	For: atggatcctgatggagctgaacct Rev: tcaagaagtgccttgcataataaa
TA15695	salgısal hipotetik protein	B hücre	474	For: atggatcctgatggagctgatgg Rev: ctaattcttcttccccatgggtt
TA17315	yüzey protein precursor (TaSP)	B hücre	516	For: ggtccatttctcttttagatcgac Rev: cctcgggcgcttatcatgatcgga
TA17050	merozoite-piroplasm yüzey antijeni (Tams1)	B hücre	921	For: cgctcactagtctgccttt Rev: ttgataagttgttacgaacatgg
TA03755	sporozoit yüzey antijeni (SPAG)	B hücre	1700	For2: ctcgatctttcaagaacc Rev2: caccagcgatttgacctctc
TA08425	<i>T.parva</i> microneme-rhoptry antijeni (Tpmr-1)	B hücre	2726	For: atccacaatgaagtttcttg Rev: ttactctgttcgattttgcc
TA13810	ts-chitose type piroplasm yüzey proteini benzeri (MeroI)	B hücre	807	For: caaacggtaaatccgtgacc Rev: agatcgaggggttggaaag
TA20980	proline-rich hypothetical protein (NC1)	B hücre	3151	For: atttacaattccccatagctag Rev: atccacatactgcattattatcc
TA16090	glutenin, putative (NC10)	B hücre	1176	For: tgattcaataacgtaacagagc Rev: gaggtagactgttatattgtt
TA03155	Tash1-benzeri AT-hook proteini	B hücre	1000	For: tggatttaccatctaagtaca Rev: tgtttcatgtctctttttagggtt
TA19865	öncü salgısal yüzey proteini (d proteini), <i>T.sp</i> China	T hücre	599	For: aaatcgttcagttgtttcgat Rev: tcttttagatccttttctca
TA06115	hipotetik protein	T hücre	999	For: tattatagcactttcggcacc Rev: tatgagtgccaatttagaattt
TA03370	T-complex protein 1 subunit	T hücre	2676	For: ttacacggaatctatcaaaag Rev: cttatgtatggattgtatg
TA19320	salgısal, prohibitin homologu	T hücre	1136	For: tatattgtgagtagatagcccc Rev: aaaagtatagtagaggactgagg
TA12105	heat shock proteini (HSP90)	T hücre	2791	For: tacaatggcatcaaaggaag Rev: taattcagcaactctctcc
TA11565	salgısal, cysteine proteinase	T hücre	1259	For: ttacattctacataccgcc Rev: tcttatactgcgtatactgc
TA10060	salgısal coronin	T hücre	1734	For: agatccactccaatttacac Rev: acagagttaaggtttgagg
TA14970	traslasyon inhibisyon faktörü eIF-1A	T hücre	838	For: cgtttccccatggaatctta Rev: tcgtcggaaactttcaciaa
TA17545	<i>Theileria</i> 'ya özgü sub-telomeric protein (SVSP)	T hücre	318	For: ggaccttaccacacctgcacctatagc Rev: cggataaggtttccaggtgaatgaa

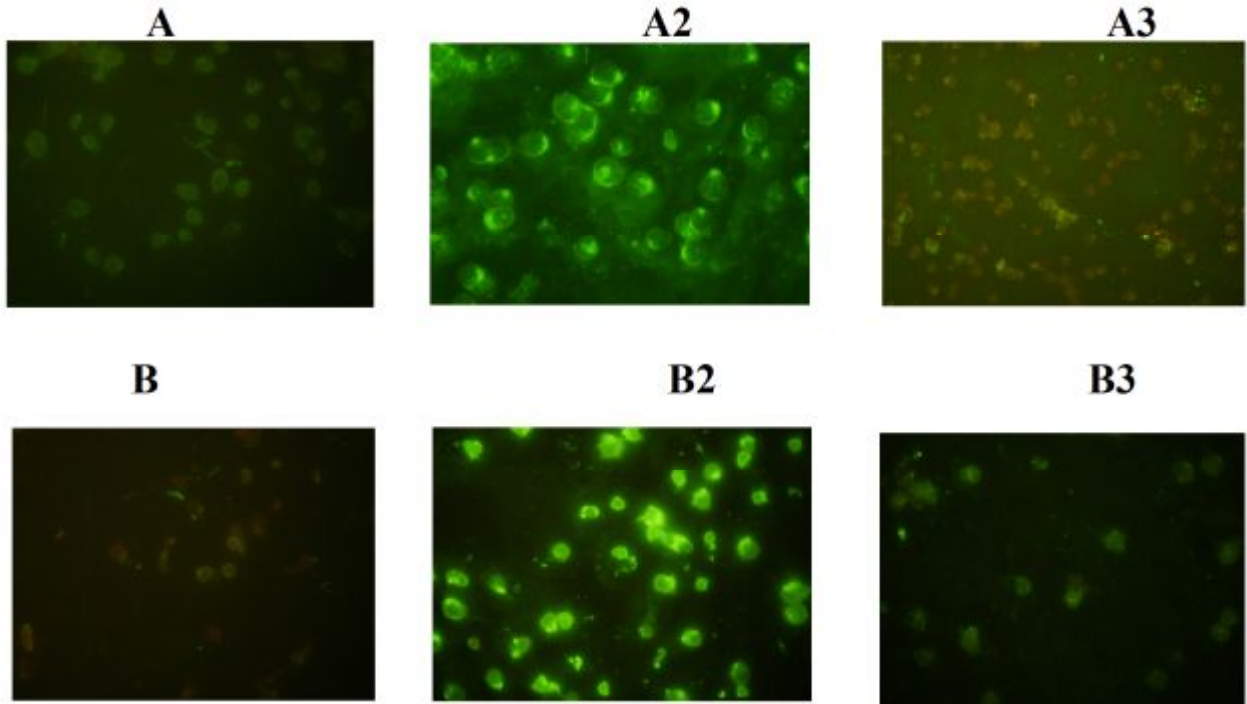
3. BULGULAR

3.1. Buzağıda Oluşturulan Deneysel Enfeksiyon, Sporozoit Stabilatlarının Hazırlanması, PBM Hücrelerinin *In vitro* Enfeksiyonu ve Klonlanması

Deneysel enfeksiyonda kullanılacak buzağı; *Theileria annulata* sitokrom b genine özgü primerler kullanılarak yapılan PZR sonrası agaroz jel elektroforezi ve *T.annulata* ile enfekte lenfositlerden hazırlanan makroşizont antijenlerinin kullanıldığı IFA ile test edilmiştir. PZR sonucunda dört numaralı kuyucukta TR1228859 kulak küpeli ve beş numaralı kuyucukta TR1228860 kulak küpeli buzağılara ait PZR ürünleri negatif sonuç vermiştir (Resim 3.1.). Bir numaralı kuyucukta negatif kontrol yer alırken, iki numaralı kuyucuğa pozitif kontrol yüklenmiştir. Moleküler büyüklük belirleyici olarak 100 bp'lik DNA ladder (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. Cytob1 primer çifti kullanılarak özgül olarak çoğaltılan 312 bp'lik bölge ok işareti ile pozitif kontrol kuyucuğunda gösterilmiştir. IFA testi sonucunda (Resim 3.2.), A ile gösterilen TR1228859 kulak küpeli ve B ile gösterilen TR1228860 kulak küpeli buzağılardan elde edilen serum örneklerinde herhangi bir ışımaya görülmemiştir. A2 ve B2 ile gösterilen resimler, FITC ile işaretli antibovine IgG'ler arasındaki reaksiyon sonucunda oluşan ışımaya (pozitif kontrol) sonuçlarıdır. A3 ve B3 resimlerinde görülen serumlar ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucunda TR1228859 ve TR1228860 kulak küpeli buzağuların deneysel enfeksiyonda kullanılabileceği belirlenmiştir



Resim 3.1. Sitokrom b1 agaroz jel elektroforezi sonucu (1. kuyucuk; negatif kontrol, 2. kuyucuk; pozitif kontrol, 3. kuyucuk; boş, 4. kuyucuk; TR1228859 numaralı buzağı, 5. kuyucuk; TR1228860 numaralı buzağı)

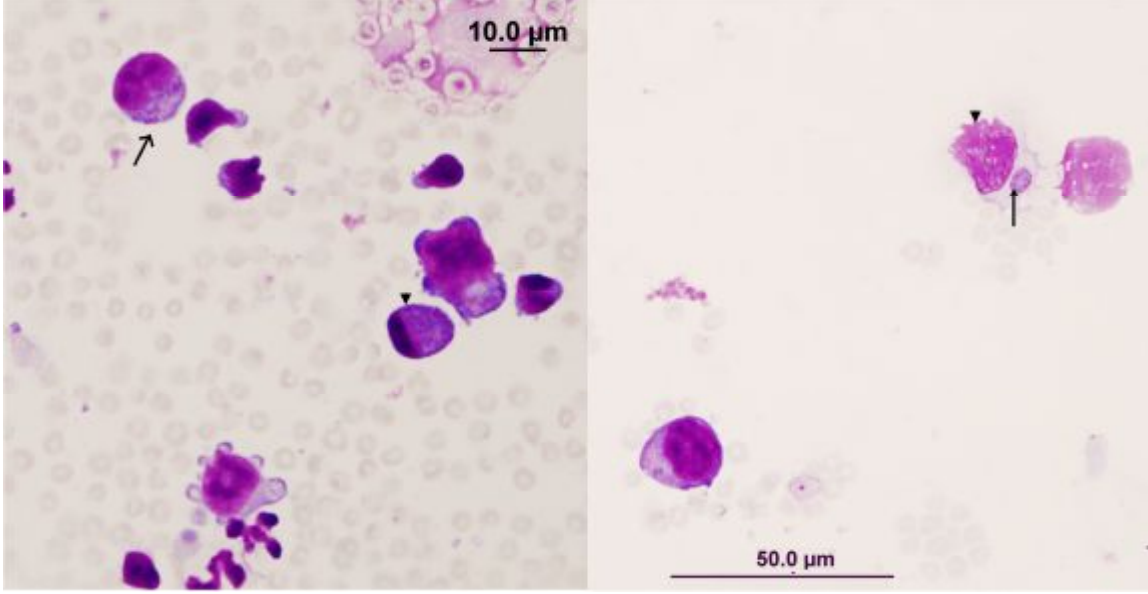


Resim 3.2. IFA testi sonucu (A; TR1228859 numaralı buzağıya ait serum örneği, B; TR1228860 numaralı buzağıya ait serum örneği, A2 ve B2; reaksiyon sonucunda ışımaya veren pozitif kontrollere, A3 ve B3; negatif kontrollere)

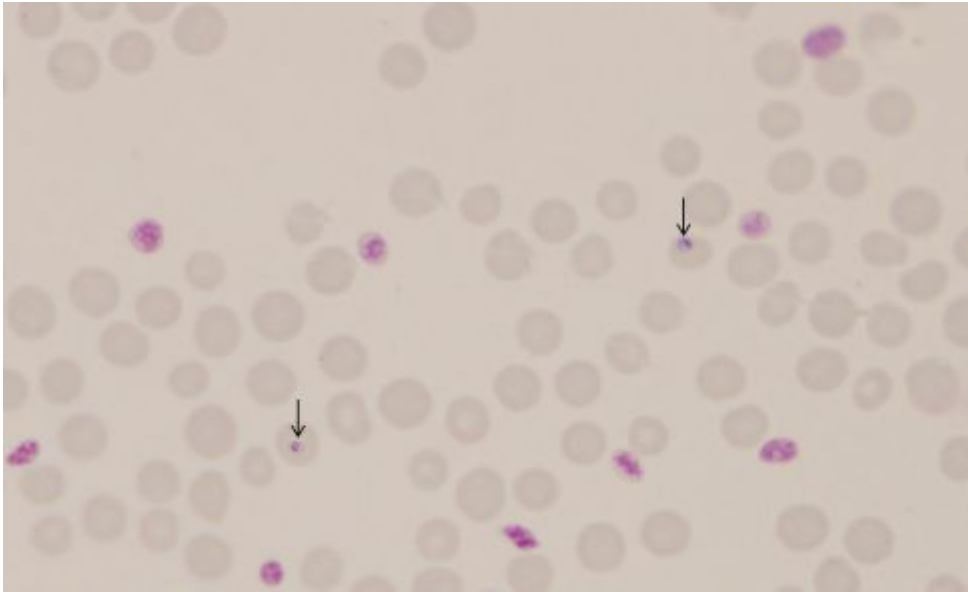
Enfekte edilen buzağının her gün rektal vücut ısısı alınarak kaydedilmiş, enfekte edilen taraftaki preskapular lenf yumrusu incelenmiş ve genel durumu not edilmiştir. Parazitolojik ve hematolojik muayeneler için parazitin enjeksiyonu sonrası her iki günde bir 5 ml EDTA'li tüplere vena jugularis'ten kan alınmış, enfeksiyonun 5. gününden sonra her iki günde bir sol prescapular lenf yumrusundan biyopsi örnekleri alınarak yayma frotiler hazırlanmış Giemsa ile boyandıktan sonra makroşizontlar ile enfekte lenfosit hücrelerinin varlığı yönünden incelenmiştir. Enfeksiyondan sonraki 15. günde sol preskapular lenf yumrusundan alınan biyopsi örneklerinde makroşizontlar ile enfekte lenfosit hücreleri tespit edildiği gün (Resim 3.3.) hayvanın sağ ve sol kulağının kök kısmı traş edilerek kulak torbaları takılmış ve kene koymaya hazır hale getirilmiştir. Kenelerin kulağa konulması amacıyla buzağı 28°C ve %80 nem ihtiva eden kontrollü bir odaya alınmıştır. Enfeksiyondan sonraki 16. günde vena jugularis'ten alınan EDTA'lı kan örneklerinden hazırlanan ince yayma kan frotileri Giemsa ile boyanarak eritrositler içerisinde ilk piroplazmlar tespit edilmiştir (Resim 3.4.). İlk piroplazmanın görüldüğü günden itibaren parazitemi hergün kaydedilmiştir. *T.annulata*/Ankara D7 klonal hücre kültürü kullanılarak yapılan deneysel enfeksiyonda, ilk piroplazmanın görüldüğü 16. günde parazitemi %0,1 olarak belirlenmiştir. Parazitemi seviyesi enfeksiyondan sonraki 17. günde de aynı düzeyde kalmıştır. Bununla birlikte enfeksiyondan sonraki 18, 19 ve 20. günlerde sırasıyla %0,2, %0,4 ve %0,15 olarak belirlenmiştir.

Deneysel enfeksiyon oluşturulduktan sonraki 15. günde (ilk makroşizontun görüldüğü tarih) sol kulağa 1500 adet ve 17.günde sağ kulağa 1500 adet *Hyalomma excavatum* aç nimfleri (ADÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı kene ünitesinde hali hazırda devam etmekte olan HexI kene kolonisindeki HexIAN) konulmuştur. Kenelerin yerleştirilmesini takip eden 3. ve 10. günler arasında düzenli olarak kulak torbaları açılarak kontrolleri yapılmıştır. Toplam 3000 adet HexIAN konulan sağ ve sol kulaktan, enfeksiyonun 20. ve 27. günleri arasında toplamda 2000 adet *Hyalomma excavatum* doymuş nimfleri (HexIDN) elde edilmiştir. Parazitemi Giemsa ile boyalı ince yayma frotilerde ortalama 10000 eritrosit sayılarak bunların içerisinde enfekte olanların yüzdesi alınarak belirlenmiştir. Kulak torbası içerisine doyup düşen nimfler toplanarak 28°C 'lik etüvde, %80 nemli koşullarda muhafaza edilerek gömlek değiştirmeleri sağlanmıştır. Gömlek değiştirip aç olgun hale gelen

ve kitinizasyonlarını tamamlayan keneler +12°C' lik etüve alınarak sporozoit stabilatları hazırlanıncaya kadar bekletilmiştir.



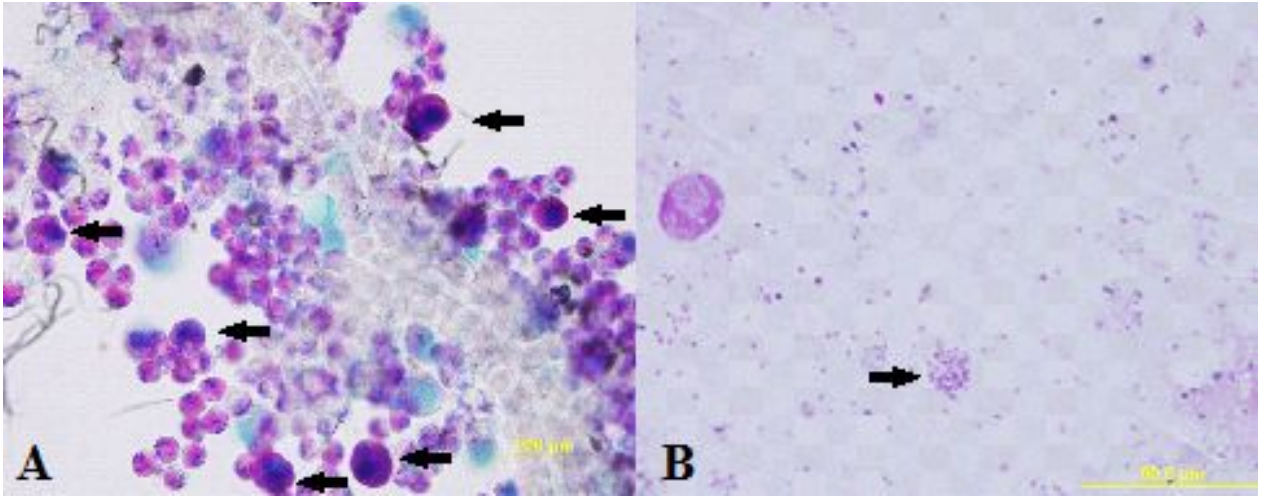
Resim 3.3. Deneysel enfeksiyon sonrası görülen makroşizont formlar



Resim 3.4. . Deneysel enfeksiyon sonrası görülen piroplazm formlar

Enfeksiyondan sonraki 21. ve 26. günler arasında parazitemi seviyesi %0,1 olarak sabit kalmıştır. %0,1 parazitemide beslenen *Hyalomma excavatum* nimflerinin gömlek değiştiren aç erişkin enfekte keneler arasından 10 dişi ve 10 erkek kenenin tükürük bezleri diseke edilip metilen green pyronin boyama tekniği ile boyanmış ve enfekte olan tükürük bezi asini hücreleri sayılarak enfeksiyon oranı belirlenmiştir. Diseke edilerek boyanan tükürük bezi asini hücrelerindeki (Resim 3.5; A) ortalama enfeksiyon oranının %85 olduğu belirlenmiştir. Enfeksiyon oranının belirlenmesini takiben enfekte kenelerden sporozoit stabilatları hazırlanmıştır. *T.annulata*/Ankara D7 ile enfekte edilen buzağının kulağına kene koyulmasını takiben 6–8. günlerde (enfeksiyondan sonraki 21. ve 26. günler) düşen ve gömlek değiştirerek aç erişkin haline gelen 600 adet enfekte kene 28°C'lik etüve alınarak üç gün boyunca aktive edilmiştir. Bunu takiben, kenelerin tükürük bezlerinde sporozoitlerin gelişmesi amacıyla, kenelerin iki farklı tavşanın kulaklarında 72 saat boyunca beslenmeleri sağlanmıştır. Bu amaçla tavşanların her bir kulağına 150'şer adet aç olgun kene konulmuştur. Tavşanların kulaklarına konulan keneler 24 saat sonra kontrol edilerek kulağa tutunmayan keneler uzaklaştırılmıştır. 72 saatin sonunda kulak torbası açılarak kulağa tutunan yaklaşık 550 kene elle toplanmıştır. Keneler tekniğine uygun olarak ezilerek sporozoit stabilatları hazırlanmıştır (Brown 1981). Bu amaçla; 72 saat sonunda tavşan kulağından toplanan keneler, 50 ml'lik falkon tüpler içerisine konularak sırasıyla %1'lik Benzolkonyum klorür ile bir kez, %70 etanol ile üç kez ve içerisinde %20 NCS, 2xPenisilin/streptomisin (20U/ml) ile 5 mg/ml Amphoteresin-B ihtiva eden RPMI–1640 vasatı ile yıkanmıştır. Daha sonra keneler steril havan içerisinde ml'sinde 2 t.e. (tick equivalent=kene eşdeğeri) dozda olacak şekilde vasat eklenecek şekilde ezilmiş ve ezinti steril falkon tüplere aktarılmıştır. Falkon tüpler içerisindeki ezinti +4°C'de 100 g'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve sporozoit stabilatlarını içeren süpernatant steril bir falkona aktarılmıştır. Daha sonra stabilat Brown (1987) tarafından tarif edildiği şekilde dondurularak sıvı azot içerisinde PBM hücrelerinin in vitro enfeksiyonunda kullanılmaya kadar saklanmıştır. Enfekte tükürük bezi asini hücreleri (A) ile kenelerden hazırlan sporozoit stabilatlarının frotilerinin Giemsa ile boyanması sonrasında serbest haldeki sporozoitlerin (B) resimleri görülmektedir (Resim 3.5.). Daha sonra dondurulan sporozoit stabilatının enfektivitesini belirlemek amacıyla sıvı azot içerisinde saklanan sporozoitler yöntemine uygun şekilde çözündürülmüş ve bire iki oranında 12 dilüsyon hazırlanarak enfekte olmayan sağlıklı bir hayvandan dansite gradient yöntemi kullanılarak hazırlanan PBM hücrelerinin enfekte

edilmesinde kullanılmıştır. Bu işlem sonunda *T. annulata*/Ankara D7 stabilatının enfektivitesinin 10'uncu dilüsyona kadar devam ettiği belirlenmiştir. Ayrıca, 1 ml PBM (107 hücre, hücre kültürü vasatı içinde) 1 ml 1 t.e. D7 sporozoit stabilatı ile karıştırılarak 37°C'de %5 CO₂'li etüvde iki saat boyunca inkube edilmiş, PBM hücrelerinin in vitro ortamda enfekte olmaları sağlanmıştır. Enfekte PBM hücreleri yukarıda ayrıntılı olarak anlatıldığı şekilde klonlanmıştır. Daha sonra, klonal hücrelerden DNA izole edilerek polimorfik mini ve mikrosatellite markerler aracılığıyla genetik ve antijenik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.



Resim 3.5. Enfekte tükrük bezi asini hücreleri (A) ve sporozoitler (B)

3.2. Belirlenen Polimorfik Markerlar

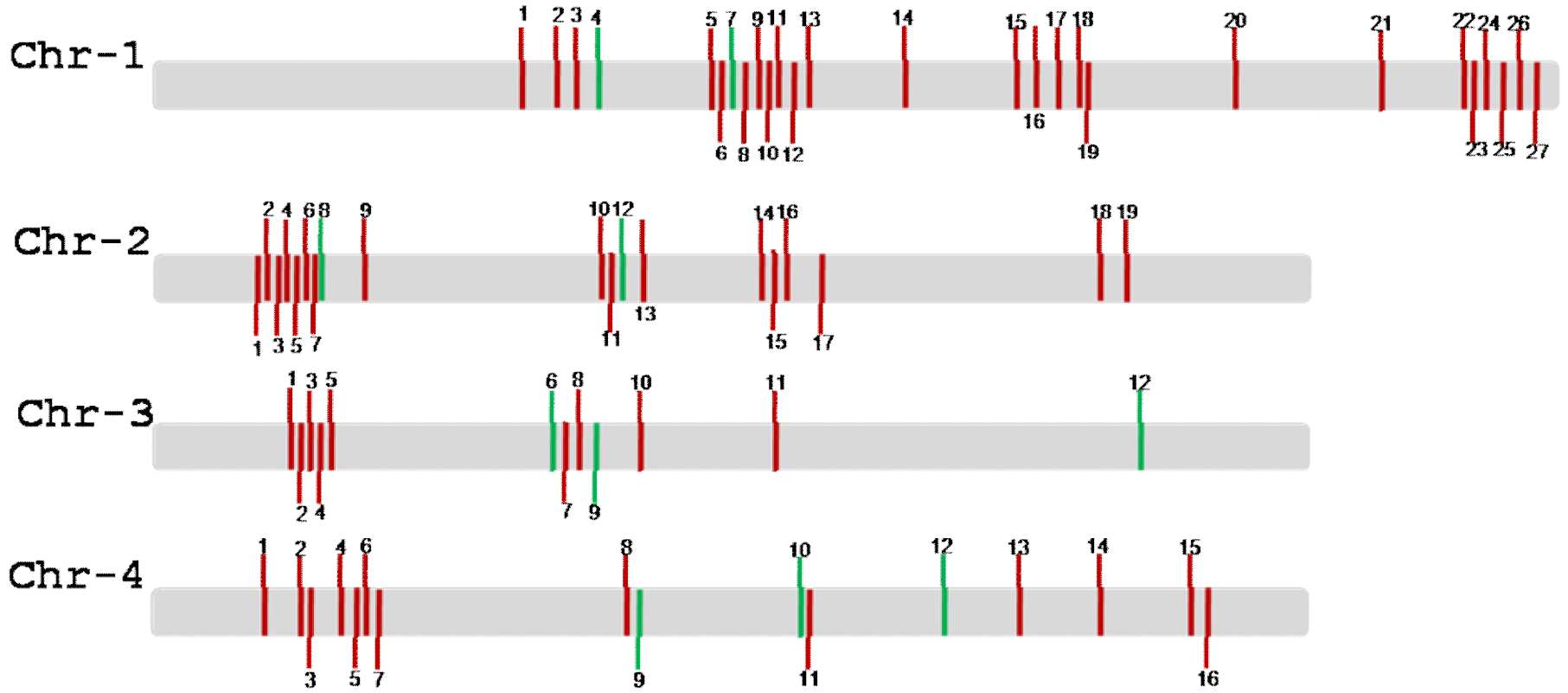
Rekombinasyon sonrasında *Theileria annulata* popülasyonlarında oluşacak genetik çeşitliliğin belirlenmesi ve rekombinasyonun yoğun olduğu kromozomal bölgelerin belirlenmesi amacıyla daha önce yapılan çalışmalarda kullanılmış mini ve mikrosatellit markerlere (Weir ve ark 2007, 2010) ilave olarak yeni polimorfik mini ve mikrosatellit markerler Unipro UGENE ver.1.9.7 (<http://ugene.unipro.ru>) programı (Okenechnikov ve ark 2012) kullanılarak belirlenmiştir.

Theileria annulata genom diziliminde kullanılacak olan eşik değerlerin (cut-off) belirlenmesinde ilk olarak; Unipro UGENE ver.1.9.7 programına yüklenecek olan *T.annulata* genomik DNA diziliminin elde edilmesi için; NCBI veri tabanından yer alan 2,632,132 bp uzunluğundaki birinci {Ref. No; NC_011129.1 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/197260935?reportfasta>)}, 1,979,170 bp uzunluğundaki ikinci {Ref. No; NC_011099.1 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/195934691?reportfasta>)}, 1,842,271 bp uzunluğundaki üçüncü {Ref. No; NC_011100.1 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/195671784?reportfasta>)} ve 1,842,271 bp uzunluğundaki dördüncü kromozomlarda {Ref. No; NC_011098.1 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/195670617?reportfasta>)} yer alan linear DNA'lara ait nükleotid dizilimleri fasta formatında indirilerek bilgisayara kaydedilmiştir. Daha sonra tek bir döküman altında birleştirilen aynı uzunluk ve kompozisyona sahip toplam 8,352,520 bp uzunluğundaki dört kromozom'a ait nükleotid dizilimleri rastgele karıştırılmış olarak Unipro UGENE ver.1.9.7 programına yüklenmiştir. Programdaki bu dizilimler farklı parametreler ile farklı eşik değerler (tekrarlı birim sayısı, tekrarlı birimin uzunluğu, farklı tekrarlı alanlardaki motiflerin benzerliği) ile skorlamalarda kullanılan algoritmalar yönünden mini ve mikrosatellite bölgeler taranarak belirlenmiştir. Daha sonra rastgele karıştırılmış dizilimlerde elde edilen sonuçlar gerçek DNA dizilimi kullanılarak elde edilenler ile karşılaştırılıp, gerçek DNA diziliminde 10 kat fazla TR belirleyen skor eşik değer olarak kullanılmıştır. Belirlenen bu eşik değer mini ve mikrosatellite bölgelerde tekrarlı motiflerin benzerliği (%96–100), minimum tekrar sayısı en az üç ve minimum tandem boyutu minisatellite bölgeler için en az üç ve mikrosatellite bölgeler için en az altı olacak şekilde suffix array algoritması kullanılarak ayrı ayrı tüm genom boyunca taranmıştır.

Unipro UGENE ver.1.9.7 programı kullanılarak yapılan tarama sonucunda 359 minisatellite (7-50 nt) ve 8973 mikrosatellite (1-6 nt) bölge belirlenmiştir. Daha sonra belirlenen mini ve mikrosatellite bölgeler tüm genom boyunca tek tek taranarak; *T.annulata*'nın dört kromozomu üzerindeki yerleşim yerleri bakımından mevcut markerlere oranla yapılacak analizler için yeterli düzeyde ve daha geniş bir kapsama alanına sahip olup olmamalarına, tekrarlı alanlardaki motiflerin benzerliği (>%96), tekrar sayıları ile tek bir bölgeyi temsil etmesi, tekrarlı bölgelerin uzunlukları (<1500 bp; genotiplendirme de yüksek

rezolüsyona ve geniş boyut aralığa sahip Spreadex jeller kullanılacağı için tekrarlı bölgenin uzunluk aralığı oldukça geniş tutulmuştur), bu bölgeleri çoğaltmada kullanılacak primerlerin sıralı tekrarlı dizilimleri içine alacak şekilde tasarlanmaya uygun korunmuş bölgeler içermesi gibi kriterlere bakılarak mini ve mikrosatellite bölgeler ayrı ayrı incelenerek excel programında kromozomlar üzerindeki yerleşim yerlerine göre sıralanmıştır.

Uzunlukları 7-50 nükleotid arasında değişen 359 minisatellite bölge arasından excel programında yapılan incelemeler sonucunda 27 adet (MSC1-27) tekrarlı bölge belirlenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda bu minisatellite bölgelerden MSC15'in daha önceki çalışmalarda belirlenen TS8 kodlu marker (Weir 2006) ile aynı bölgede olduğu, bunun yanında MSC2 ve 4'ün sırasıyla Tmsc6 ve 7 kodlu mikrosatellite bölgeler ile aynı bölgelerde yerleştiği görülmüştür. Geriye kalan 25 minisatellite bölgenin sekiz tanesinin (MSC1, 6, 7, 10, 11, 16, 17, 18) kromozomların (chr1-4) başlangıç veya sonunda yerleşim göstermelerinden dolayı bu bölgeleri çoğaltmada kullanılacak primerler sıralı tekrarlı dizilimleri içine alacak şekilde korunmuş bölgelerden tasarlanamadığından bu bölgeler ilerki çalışmalarda kullanılmamıştır. Geriye kalan 16 tekrarlı bölgenin dördü birinci, üçü ikinci, üçü üçüncü ve altısında dördüncü kromozom üzerinde yerleşim göstermektedir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Mini ve mikrosatellite bölgelerin *T.annulata* genomundaki kromozomlar (chr1-4) üzerindeki yerleşim yerleri. MSC ve Tmsc kodlu markerler sırasıyla mini ve microsatellite bölgeleri göstermektedir. Birinci kromozom (chr-1) üzerindeki yerleşim yerlerine göre 1-27 çizgi sırasıyla Tmsc 1, 2, 75, TS16, Tmsc4, 5, TS15, Tmsc7, 8, MSC3, Tmsc11, 12, 77, 13, 81, 82, 14, MSC27, Tmsc15, 16, 17, 86, MSC26, Tmsc18, 19, 20 ve MSC25 kodlu toplam 4 minisatellite ve 21 mikrosatellite bölgeyi, ikinci kromozom (chr-2) üzerindeki yerleşim yerlerine göre 1-18 çizgi sırasıyla Tmsc22, MSC19, Tmsc23, 26, 24, 27, 28, TS31, Tmsc29, 31, 32, TS20, Tmsc33, 34, MSC8, 9, Tmsc37, 38 kodlu toplam 3 minisatellite ve 14 mikrosatellite, üçüncü kromozom (chr-3) üzerindeki yerleşim yerlerine göre 1-12 çizgi sırasıyla Tmsc89, MSC12, Tmsc45, MSC13, Tmsc48, TS9, MSC14, Tmsc52, TS8, Tmsc53, 55, TS12 kodlu toplam 3 minisatellite ve 6 mikrosatellite, dördüncü kromozom (chr-4) üzerindeki yerleşim yerlerine göre 1-16 çizgi sırasıyla MSC25, Tmsc65, MSC24, Tmsc66, 67, MSC23,20, Tmsc68, TS25, 6, Tmsc30, TS5, MSC21, Tmsc72, MSC22 ve Tmsc73 kodlu toplam 6 minisatellite ve 7 mikrosatellite tekrarlı bölge yer almaktadır. Kromozomlar üzerindeki yeşil renkli çizgiler Weir, 2006 tarafından belirlenmiş ve bu tezde de kullanılmış sırasıyla TS15 ve 16 (chr-1), TS20 ve 31(chr-2), TS8, 9 ve 12 (chr-3) ile TS5, 6 ve 25 (chr-4) markerlerin ilgili kromozomlar üzerindeki yerleşim yerlerini göstermektedir

Minisatellite tekrarlı bölgelerin *Theileria annulata* genomundaki kromozomlar üzerindeki protein kodlayan ve kodlamayan (exon, intron, IGR; intergenik bölge, intron+exon) bölgelere göre dağılımları A1 ve A2’de verilmiştir (Şekil 3.2.). Buna göre birinci kromozom üzerinde yer alan dört tekrarlı bölgenin üç tanesi intergenik bölgede (IGR), bir tanesi ise intron üzerinde, ikinci kromozom üzerinde yer alan üç tekrarlı bölgeden her biri sırasıyla IGR, intron ve hem intron hemde exon (intron+exon) üzerinde, üçüncü kromozom üzerinde yer alan üç tekrarlı bölgeden ikisi IGR ve biride intron üzerinde, dördüncü kromozom üzerinde yer alan altı tekrarlı bölgeden üçü IGR, ikisi exon ve biride intron üzerinde yerleşim göstermektedir. Dördüncü kromozom üzerinde yer alan ve protein kodlayan bölgede (exon) yerleşim gösteren MSC22 tekrarlı bölgesi düşük kompleksiteye sahip proteinleri kodlayan ve kromozomların son kısımlarında yer alan SVSP protein ailesinde yer alan *Theileria*-spesifik sub-telomerik protein (TA09810) ve MSC25 ise hipotetik (kuramsal) protein (TA07890) bölgesi üzerinde yer almaktadır (Çizelge 3.1.). Geriye kalan minisatellite bölgeler ise buldukları kromozomlar üzerinde protein kodlamayan (intron, IGR; intergenik bölge, intron+exon) bölgelerde yerleşim göstermektedir (Çizelge 3.1.). Farklı uzunluklara sahip tekrarlı motifler (TR) içeren minisatellite bölgelerin büyük çoğunluğu (%87,5) protein kodlamayan bölgelerde yerleşim gösterirken, 12 ve 21 nükleotid (nt) uzunluğundaki motiflerin yer aldığı (MSC22, MSC25) iki bölge (%12,5) protein kodlayan exon üzerinde yerleşim göstermektedir (Şekil 3.2, B1 ve B3). Minisatellite bölgelerdeki tekrarlı motif (TR) uzunluklarının protein kodlayan (exon, intron+exon) ve kodlamayan (intron, IGR; intergenik bölge, intron+exon) gen bölgelerindeki AGCT miktarlarına göre dağılımları incelendiğinde protein kodlamayan bölgelerdeki tekrarlı motif uzunlukları az olan bölgelerdeki (MSC 14 hariç MSC7-19) GC miktarlarının da az olduğu, buna karşın tekrarlı motif uzunlukları arttıkça (MSC38 hariç, MSC20-41) G miktarındaki artışa bağlı göreceli olarak GC oranının da arttığı görülmektedir. MSC14 ve 38 kodlu markerlerde ise C haricinde AT ve G miktarlarının birbirine daha yakın olduğu görülmektedir. Protein kodlayan bölgelerde ise 12 nt uzunluğundaki MSC25 haricindeki diğer iki tekrarlı motif (MSC14 ve 22) AT, MSC25’te ise GC miktarının daha fazla olduğu gözlenmektedir (Şekil 3.2, C ve D). Bunun yanında minisatellite bölgelerin ACGT miktarları kendi içerisinde incelendiğinde MSC5, 8, 9, 12, 13, 25 ve 27 kodlu minisatellite bölgelerdeki GC miktarlarının, bunların dışındaki dokuz tekrarlı bölgede ise AT miktarlarının fazla olduğu görülmektedir (Şekil 3.2, E).

1-6 nükleotid arasında değişen uzunluklara sahip 8973 mikrosatellite bölge arasından yapılan incelemeler sonucunda 90 adet (Tmsc1-90) tekrarlı bölge belirlenmiştir. Yapılan incelemelerde bu mikrosatellite bölgelerden Tmsc3, 51, 56, 69 ve 71'in daha önceki çalışmalarda belirlenen sırasıyla TS16, 9, 12, 25, 5 kodlu markerler (Weir 2006) ile aynı bölgede olduğu tespit edilmiştir. Belirlenen mini ve mikrosatellite bölgelerden toplam altı tanesinin Weir, 2006 tarafından belirlenen bölgeler olduğu görülmüştür. Geriye kalan markerler ise yukarıda bahsedilen tekrarlı motiflerin benzerliği (>%96-100), tekrar sayıları, tekrarlı bölgelerin uzunlukları (<1500 bp), tasarlanacak primerlerin sıralı tekrarlı dizilimleri içine alacak şekilde tasarlanmaya uygun korunmuş bölgeler içermesi gibi kriterler göz önüne alınarak değerlendirilmiş ve sonuçta 21 tanesi birinci (chr-1), 14 tanesi ikinci (chr-2), altı tanesi üçüncü (chr-3) ve yedi tanesi dördüncü (chr-4) kromozom üzerinde yerleşim gösteren (Şekil 3.1.) toplam 48 mikrosatellite bölge belirlenmiştir. Birinci kromozom (chr-1) üzerinde yer alan mini ve mikrosatellite bölgelerin 700 kb'lık bölgeden başladığı ve özellikle 700-900 kb, 1-1.2, 1.4-1.5 ve 2.5-2.6 Mb'lık bölgelerde yoğun olduğu (toplam 22 mini- ve mikrosatellite), ikinci kromozom (chr-2) üzerinde yer alan 14 tekrarlı bölgenin 150-250 kb'lık bölgede yoğun olmakla birlikte kromozom üzerinde geniş bir alana dağıldığı, üçüncü (chr-3) ve dördüncü (chr-4) kromozomlar üzerinde yer alan sırasıyla toplam dokuz ve 13 tekrarlı bölgenin ikinci kromozoma benzer şekilde kromozomların başlangıç kısımlarında daha yoğun olmasına rağmen ilgili kromozomlar üzerinde iyi bir dağılım gösterdiği görülmektedir (Şekil 3.1.).

Belirlenen mikrosatellite bölgelerden protein kodlayan gen bölgelerine ait exon ve intronlar üzerinde yer alan toplam 36 tekrarlı bölgeden (27 exon ve 9 intron) 23 tanesinin (18 exon ve 5 intron) hipotetik protein kodlayan gen bölgeleri üzerinde yer almıştır. Geriye kalanlar ise membran, integral membran, serinden zengin, Sfi, protein kinaz, SVSP, DNA'ya bağlanan vb. özellikteki proteinleri kodlayan bölgeler üzerinde yerleşim göstermektedir (Çizelge 3.1.). Bunun yanında intergenik bölgede (IGR) yer alan toplam dokuz tekrarlı bölgenin sadece bir tanesinin hipotetik proteinler arasında, geriye kalanlarının ise farklı fonksiyonlara sahip olduğu proteinleri kodlayan anote edilmiş gen bölgeleri arasında yer almıştır. Hem IGR hemde exonu içerisine alacak şekilde yerleşim gösteren üç mikrosatellite bölgenin hepside hipotetik proteinleri kodlayan gen bölgeleri üzerinde yer almaktadır

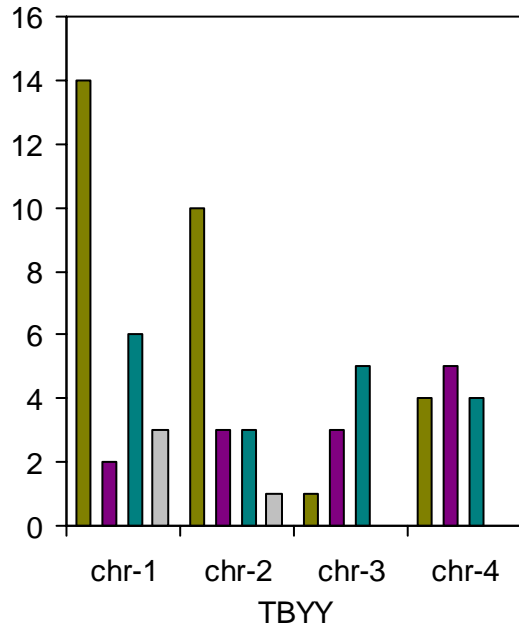
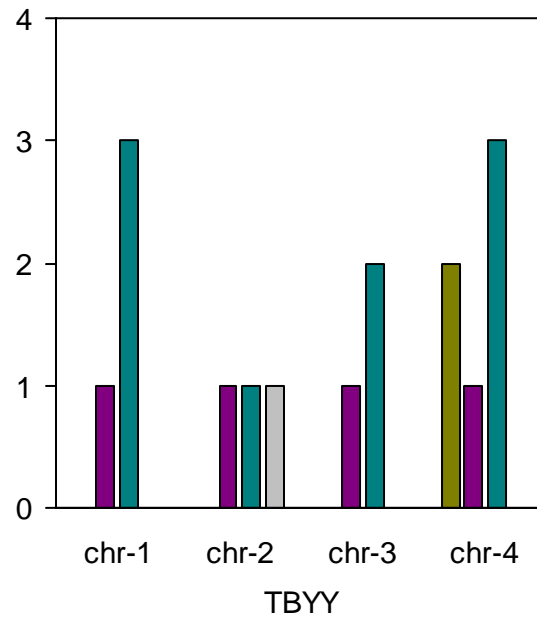
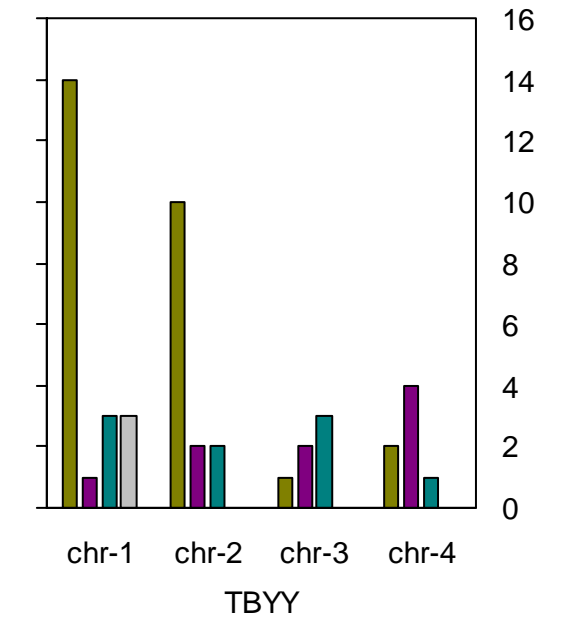
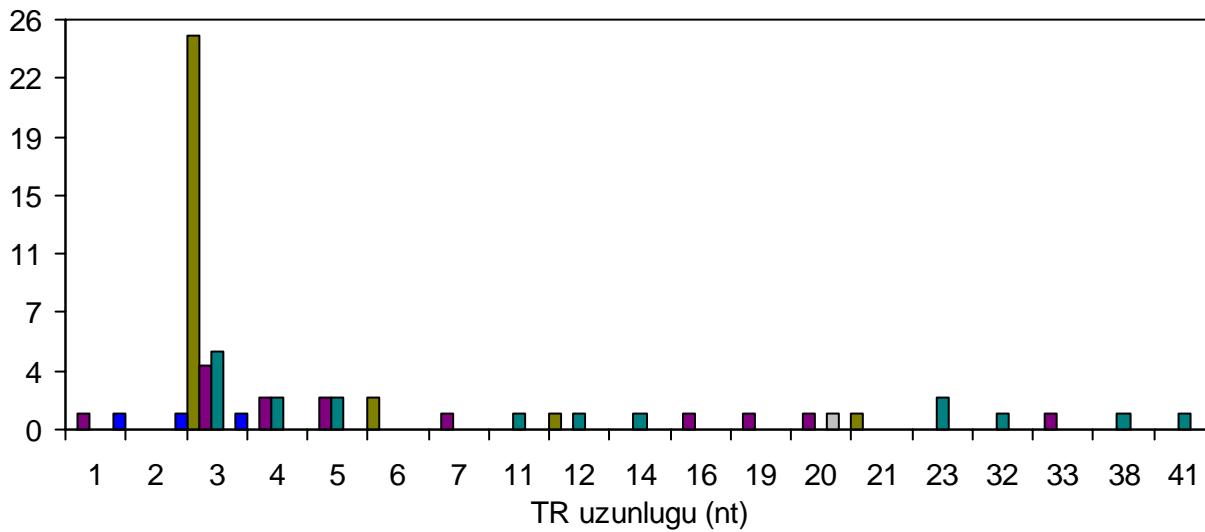
(Çizelge 3.1.). Mikrosatellite bölgeler birinci (chr-1) ve ikinci (chr-2) kromozom üzerinde yoğun olarak exonların yer aldığı üç (chr-3) ve dördüncü (chr-4) kromozomlarda ise daha fazla sayıda sırasıyla IGR ve intronik bölgelerde yerleşim göstermiştir (Şekil 3.2, A1 ve A3). Mikrosatellite bölgelerin tekrarlı motif (TR) uzunluklarına bakıldığında bir, iki, dört ve beş nükleotid uzunluğundaki 13 bölge intron, IGR ve IGR+exon üzerinde yerleşim gösterirken, uzunluğu üç bp olan toplam 35 tekrarlı bölgeden 25 tanesi protein kodlayan (exon), 10 tanesi ise kodlamayan bölgeler (intron, IGR ve IGR+exon) üzerinde yer almıştır (Şekil 3.2, B1 ve B2). Mikrosatellite bölgeler genelde A ve T'den zengin olmalarına karşın, Tmsc7, 13, 17, 20, 21, 29, 38, 52, 55 ve 70 gibi bölgeler göreceli olarak daha fazla GC içermektedir (Şekil 3.2, F).

Belirlenen bölgeleri çoğaltmada kullanılacak primerler sıralı tekrarlı dizilimleri içine alacak şekilde korunmuş bölgelerden tasarlanmıştır (Çizelge 3.1.). Belirlenen mini ve mikrosatellite bölgeleri çoğaltmada kullanılacak primerler *Theileria annulata* GeneDB (<http://old.genedb.org/genedb/annulata/>) veri tabanında anote edilmiş halde bulunan *T.annulata* genomu üzerinde gözle tasarlanmıştır. Primerlerin tasarlanmasında; uzun A/T tekrarlı bölgelerin (>4-5 nt) olmamasına, GC içeriğinin % 30–60 arasında ve Tm derecelerinin mümkün olduğunca birbirlerine yakın olmasına, 3' uçlarının G/C bazları ile bitmesi ve 3' ucunda G/C nükleotid tekrarlarının mümkün olduğunca yer almamasına, düşük kompleksiteye sahip proteinleri kodlayan ve kromozomların sonunda yer alan SVSP veya sfi sub-telomerik genlere ait alanlarda primerlerin tasarlanmamasına, protein kodlayan diğer bölgelerde ise mümkün olduğunca tasarlanacak primerlerin korunmuş bölgelerden seçilmesine ve ayrıca primerlerin kendi ile veya diğer primerler ile primer-dimer, ikincil yapılar ve hairpin oluşturmaması gibi faktörler göz önünde bulundurularak tasarlanmıştır. Bu kriterlere mümkün olduğunca uymaya çalışarak hazırlanan primer çiftleri ve bunların *T. annulata* GeneDB veri tabanında yer alan C9 genom dizilimine göre çoğaltacağı bölgelerin uzunlukları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Daha sonra yukarıda anlatıldığı şekilde tasarlanan her primer çiftinin tek bir bölgeyi temsil etmesi, *Theileria annulata*'ya özgü olması ve belirlenen uzunluklarda ürün elde edilmediğinin belirlenmesi için tasarlanan primer çiftine ait en uygun bağlanma ısıları tespit

edilmiştir. Polimorfik marker primerleri için en uygun bağlanma ısıları, *T.annulata*/Ankara C9 DNA'sı kullanılarak yapılan ısı derecelendirmeli (gradient) PZR sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen bantların yoğunlukları karşılaştırılarak UVP EC3 Bio-Imaging sisteminde yer alan VisionWorksLS (Versiyon 6.8, ABD) programı ile tespit edilmiştir (Resim 3.6.).

Yapılan gradient PZR sonucunda değerlendirilen 64 farklı markeri çoğaltmak için tasarlanan primer çiftlerinden Tmsc4, Tmsc27 ve Tmsc32 markerlerini çoğaltmada kullanılan toplam üç primer çifti ile hiç bir ürün elde edilememiştir (Çizelge 3.2.). Geriye kalan primer çiftleri ile elde edilen ürünler jel elektroforezi sonrası UV ışık altında görüntülenip bilgisayara kayıt edilmiştir. Daha sonra primer çiftlerine ait en uygun bağlanma ısılarının belirlenmesi amacıyla UVP EC3 Bio-Imaging sisteminde yer alan analiz programı kullanılmıştır. Jel görüntüsü üzerinde her bant seçilerek yoğunlukları analiz programı ile belirlenmiştir. Her bantın belirlenen yoğunluğu aynı jele yüklenen ve her bantın yoğunluğu bilinen 100 bp'lik moleküler boyut belirleyiciye ait bantlar (birden fazla bant referans alınmak kaydıyla) referans alınarak düzeltilmiş ve bu veriler her primer çiftine ait bantlar için ayrı ayrı excel formatında kaydedilmiştir. Excel formatındaki bu veriler daha sonra bir araya getirilerek ilgili primer çiftlerine ait Tm değerleri de göz önüne alınarak ilgili primer çiftine ait en uygun bağlanma ısı belirlenmiştir (Çizelge 3.2.). Bağlanma ısılarının yanında çoğaltılacak ürün boyutları ≥ 700 bp'in üzerinde olan MSC9, MSC12, MSC13, MSC25, Tmsc7, Tmsc8, Tmsc13, Tmsc17, Tmsc19, Tmsc20, Tmsc55, Tmsc66 ve Tmsc89 (Çizelge 3.2.) gibi bölgeleri çoğaltan primer çiftleri için her PZR siklusunda yer alan uzama süreleri 1–1,5 dakika olacak şekilde değiştirilmiştir.

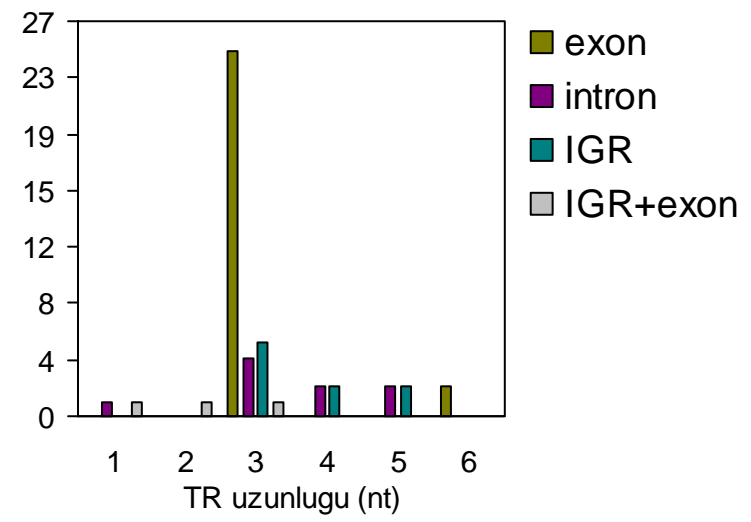
A1**A2****A3****B1**

■ exon ■ intron ■ IGR ■ intron+exon

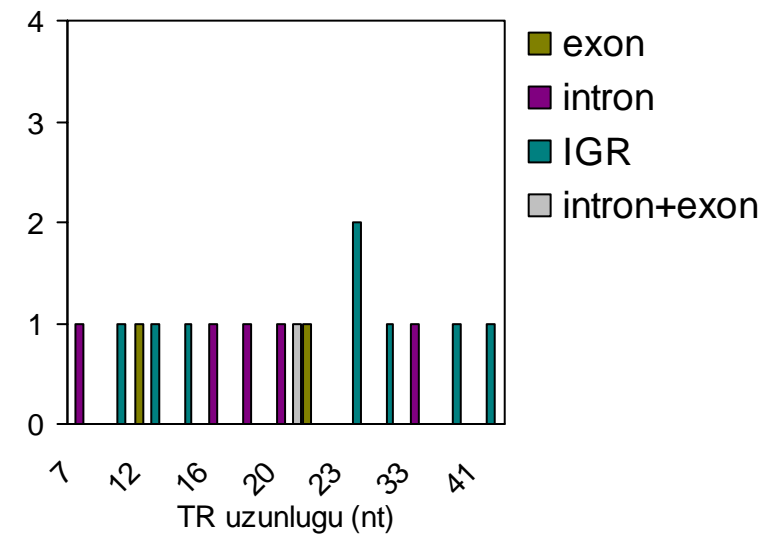
■ exon ■ intron ■ IGR ■ IGR+exon

■ exon
 ■ intron
 ■ IGR
 ■ intron+exon
 ■ IGR+exon

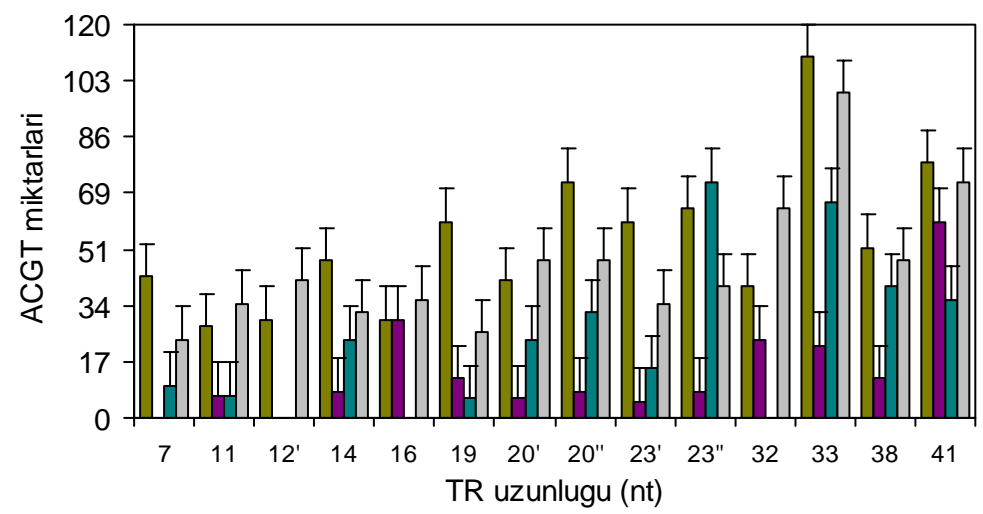
B2



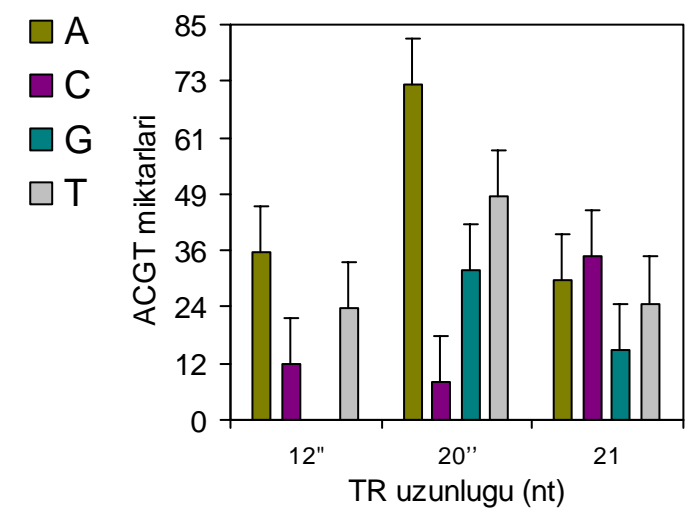
B3

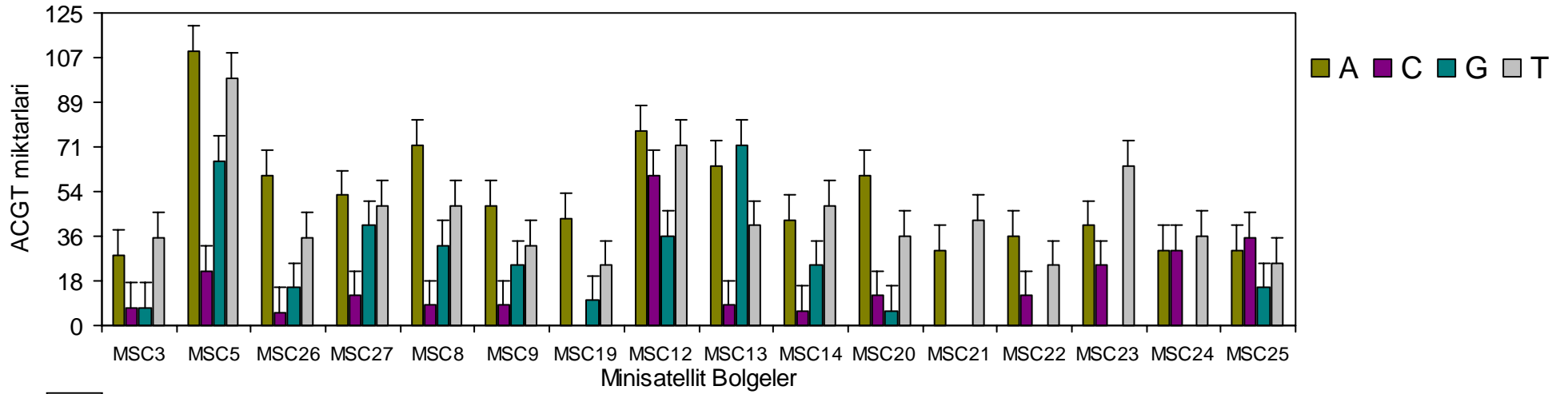
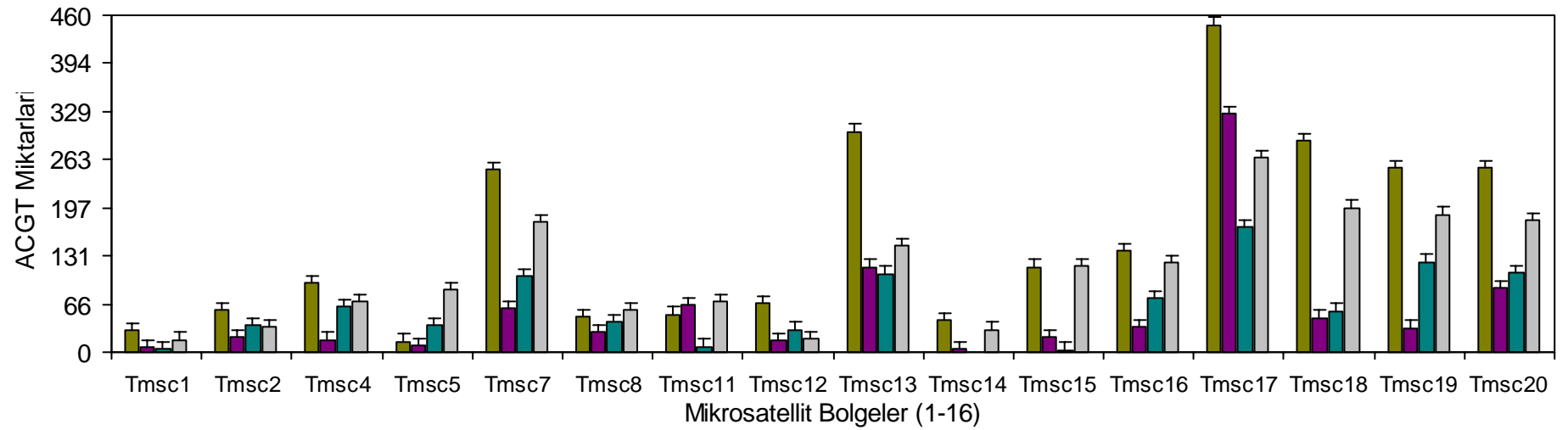


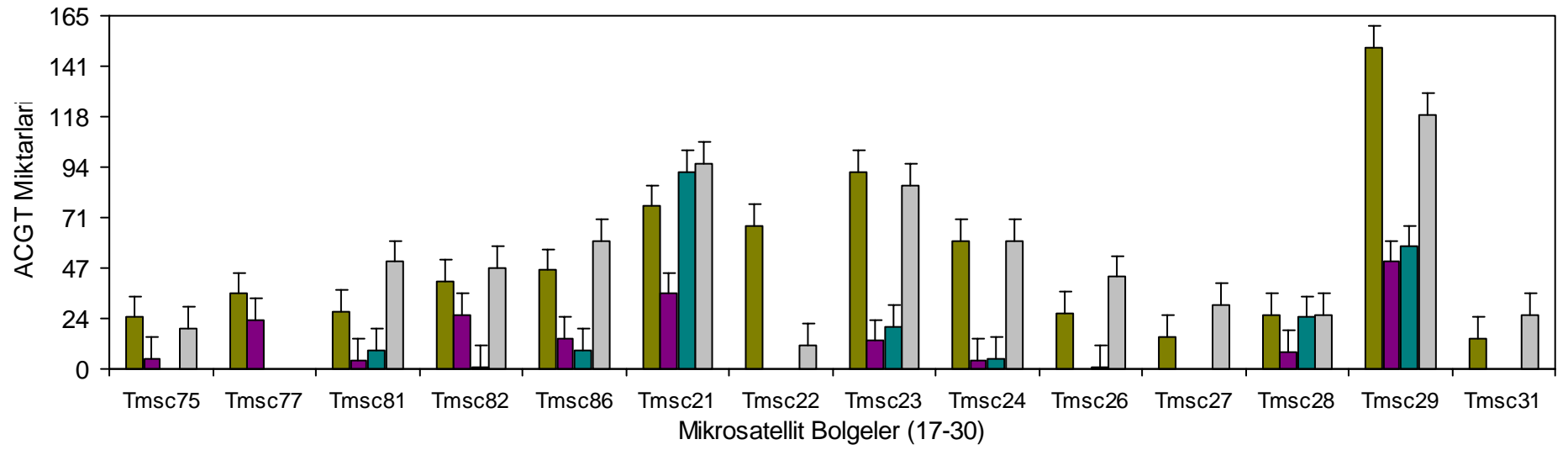
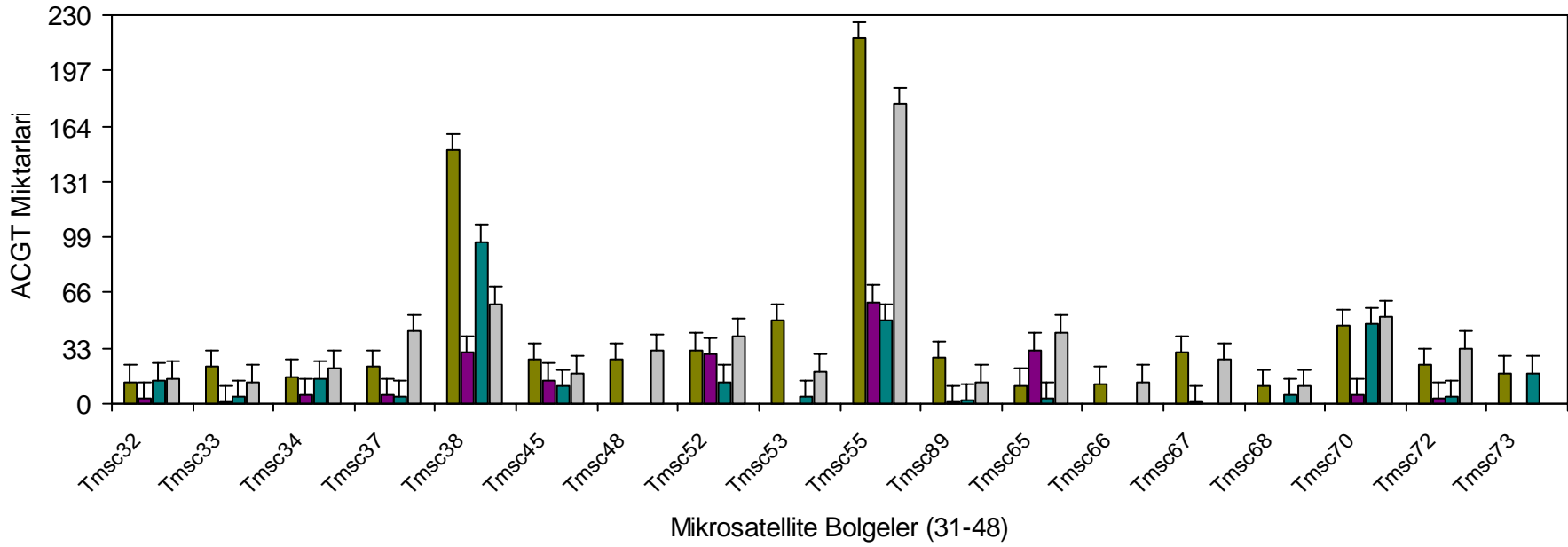
C



D



E**F**



Şekil 3.2. Mini ve mikrosatellit bölgelerin genomdaki dağılımları

(A); Mini ve mikrosatellite tekrarlı bölgelerin birlikte (**A1**) ve ayrı ayrı (**A2**; minisatellite ve **A3**; mikrosatellite) *T.annulata* genomundaki kromozomlar üzerindeki protein kodlayan ve kodlamayan (exon, intron, IGR; intergenik bölge) bölgelere göre dağılımları

(B); Mikro ve minisatellite bölgelerdeki tekrarlı motiflerin (TR) uzunluklarına göre birlikte (**B1**) ve ayrı ayrı (**B2**; mikrosatellite ve **B3**; minisatellite) protein kodlayan ve kodlamayan (exon, intron, IGR; intergenik bölge) bölgelere göre dağılımları

(C); Protein kodlamayan (intron, IGR; intergenik bölge, intron+exon) bölgelerdeki minisatellite tekrarlı motif (TR) uzunluklarının ACGT miktarlarına göre dağılımı

(D); Protein kodlayan (exon, intron+exon) genler üzerindeki minisatellite tekrarlı motif (TR) uzunluklarının ACGT miktarlarına göre dağılımı

(E); Minisatellite bölgelerin ACGT miktarlarına göre dağılımı

(F); Mikrosatellite bölgelerin (1-16, 17-30, 31-48) ACGT miktarlarına göre dağılımı

Çizelge 3.1. Mini ve mikrosatellite markerlar

Kod	chr*	En yakın CDS* (ürün)	TBY* [*]	TR* dizilimi (5'-3')	TR uzunluğu (nt)	TR'nin kopya sayısı (%96-100 benzerlik)	TB* uzunluğu (bp)	Primer dizilimler (5'-3')	PZR ürünü uzunluğu (bp)
MSC3	chr-1	TA20310 ve TA20315 arasında	IGR	TTGTAAATTCA	11	7	77	F;tactagtagtaccataacccttaaagccc R;aatttattgaactcacaacagattcatcc	446
MSC5	chr-1	TA09725	İntron	CAGTAGTCTAGTAGTAAGTA TATAGTA	33	11	297	F;cacctttataagatcttcattaattgtc R;ccataaattccatatctattatattgtcc	535
MSC26	chr-1	TA09560 ve TA09555 arasında	IGR	AAGTGTAAAAGTATTATAA AACT	23	5	115	F;aactccgagtgTTTTTTTcaattc R;atcaactcaaccaatattcaacacaag	398
MSC27	chr-1	TA02760 ve TA02755 arasında	IGR	AGTACTCTACAGTAGTTAGG TAATTAGGAGTAGTTAAG	38	4	152	F;gttgaatcatttagtgaattcg R;caccctatctattattacatgtac	482
MSC8	chr-2	TA13080	intron + III.exon	AGAGGTACATAGTAATATAT	20	8	160	F;tgcattttctctccatatctac R; gatttattcagtagaagaatgtgac	508
MSC9	chr-2	TA13075 ve TA13070 arasında	IGR	ATGTTAGTGAACAA	14	8	112	F;atattcgccattttaataatacaac R;atcgcaagtagtactatgtactcg	883
MSC19	chr-2	TA15640	İntron	AAATTAG	7	11	77	F;gtaattatattagtcctaactagtc R;cataattattacctctattacac	392
MSC12	chr-3	TA04150 ve TA04205	IGR	AGAAACTCCTTTAGTACTAT AAAGCTACTCCCATGGGTCT A	41	6	264	F;cccttatatactatattaccgcc R;aatagagtatagagtaatttaggc	1013
MSC13	chr-3	TA04585 ve TA04640 arasında	IGR	GGTTAGATAAGGGATGACT AAGG	23	8	184	F;ggttactactgttttatagcc R;aacttaaatcccctaattagcgc	766
MSC14	chr-3	TA03890	İntron	TTAGGTATATAAGAGCTATT	20	6	120	F;gatggtatggaatatagaataaattg R;cattattcattttctcaatcattcc	496
MSC20	chr-4	TA07146 ve TA07150 arasında	IGR	TAAATAACTCTAAATAGTA	19	6	114	F; tattgtatttttttcatcagc R;gtaataaacagtaatttatattatcc	551
MSC21	chr-4	TA11375 ve TA11370 arasında	IGR	ATAATTTTATTA	12	6	72	F; caacaagaatccaaataccatcaagc R;caaatgtaaatgagacgatatcagat	282
MSC22	chr-4	TA09810	Exon	CAACAATATTAT	12	6	72	F;caacatatactgtatattatggagacg R;gttgatgtaggtggaactgaatatac	385
MSC23	chr-4	TA07085 ve TA07090 arasında	IGR	TTAACTTATTAAGTTATCTTC ATTTTAACTCA	32	4	128	F;aaaacaccaaatataattgctgatg R;gaataatagaaggaaataatataatg	553
MSC24	chr-4	TA09200	İntron	TACTATACCTTTACAC	16	6	96	F; ccatttcagtattatcatgcgtgttac R; catagtcaagaaaatgtaagcgaagg	659
MSC25	chr-4	TA07890	Exon	AACCCCGAAAAGGTCTTCCT T	21	5	105	F; aattaaattagattcgtatgtgg R; ccaattataaattaatcaatttaaactc	845

Çizelge 3.1. Mini ve mikrosatellite markerlar, *devamı*

Kod	chr*	En yakın CDS* (ürün)	TBYY*	TR* dizilimi (5'-3')	TR uzunluğu (nt)	TR'nin kopya sayısı (%96-100 benzerlik)	TB* uzunluğu (bp)	Primer dizilimler (5'-3')	PZR ürünü uzunluğu (bp)
*Tmsc1	chr-1	TA21235	Exon	AAT	3	9	52	F; agactcatagaaatggaaccgaactg R; catatattgagtgcaaatctccaag	737
Tmsc2	chr-1	TA20980	Exon	TAG	3	10 (max. 21)	150	F; gactaatattgttcagaaatccacg R; tgcaccctgaacctccactccg	364
Tmsc4	chr-1	TA20400	Exon	TAG	3	16 (max. 32)	231	F; ctgaagataactataagacaatgcc R; cattcattctacgacacacacggtg	621
Tmsc5	chr-1	TA20350	Exon	GTT	3	16 (max. 26)	145	F; cttaattctatactgaagattttag R; caaattcggaaatctggacactaatg	447
Tmsc7	chr-1	TA20320	Exon	AAT	3	17 (max. 71)	644	F; aactggtactgttattgctggtacag R; ggtattattctattaatgacattac	756
Tmsc8	chr-1	TA20305 ve TA20310 arasında	IGR	AGT	3	11 (max. 17)	175	F; ttttaagtaataactgatagtaattg R; ggtattagagtattaagttctaggtacc	746
Tmsc11	chr-1	TA20280	Exon	CTA	3	13 (max. 36)	192	F; ttctatctacttatatttaattgac R; taatcatagtttcataatttaac	356
Tmsc12	chr-1	TA20260	Exon	AAG	3	12 (max. 27)	132	F; attaaaccattgaaagaattgatgc R; gtactcagttaaataaattaatgc	259
Tmsc13	chr-1	TA03160	Exon	GAA	3	15 (max. 58)	666	F; acacgaaaaggcactgacgatgac R; gttgaggataattctctgttcagcg	857
Tmsc14	chr-1	TA02755 ve TA02760 arasında	IGR	AAT	3	12 (max. 25)	78	F; gatatacaaaagtataacaattgatttc R; ttattattgtttaattacctgtg	237
Tmsc15	chr-1	TA02755	IGR+exon1	ATT	3	14 (max. 34)	256	F; cggaggaattattgcaattaaatag R; taactctttctaaatttccaag	494
Tmsc16	chr-1	TA05755	Exon	TGT	3	11 (max. 23)	370	F; gagaattgaggagttatttctgctg R; gtaagttagttggaagaattctcattgc	535
Tmsc17	chr-1	TA16090	Exon	CAA	3	24 (max. 132)	1206	F; caaggacctgggtactatgggccta R; tgaggtgtgacgtgtccatgtcc	1343
Tmsc18	chr-1	TA09585	IGR+exon2	A	1	47 (max.290)	588	F; tatttaactgatgtataatttagg R; tatttctgcatattaattaatctc	878
Tmsc19	chr-1	TA09620	Exon	AAT	3	15 (max. 62)	593	F; acaaaatctgtaataaattcgttgg R; tggacctgtgtacctgtggtatcag	725
Tmsc20	chr-1	TA09620	Exon	AAT	3	16 (max. 46)	628	F; gaatctgtcatttacaatgaatcc R; ggtgatgatgtgtggtaaaaatc	766
Tmsc75	chr-1	TA20880	exon5+IGR	TA	2	12 (max. 18)	48	F; gatagtctctatggatgacagttc R; ttacataacatgctgaatcgacatgc	220
Tmsc77	chr-1	TA20250	İntron	AAATT	5	8 (max. 16)	58	F; gtaacggagttaccattaaaattaag R; caagatccaaaactaaattatgtgc	253
Tmsc81	chr-1	TA02810	Exon	TTA	3	10 (max. 14)	90	F; tgaaaagtattaaattttatcagg R; aaaaccacaatttaactaaaggac	239

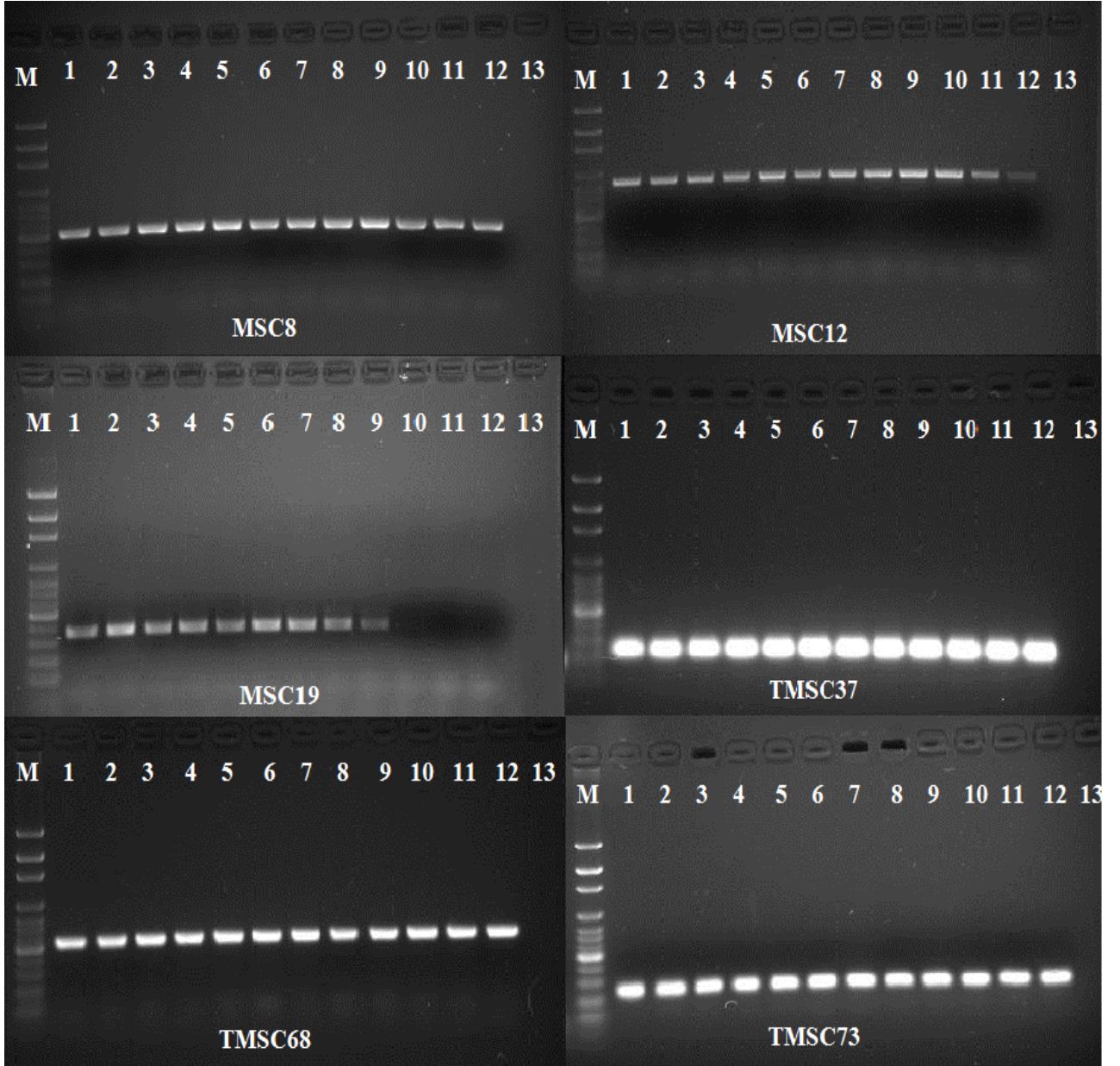
Çizelge 3.1. Mini ve mikrosatellite markerlar, *devamı*

Kod	chr*	En yakın CDS* (ürün)	TBY* ²	TR* dizilimi (5'-3')	TR uzunluğu (nt)	TR'nin kopya sayısı (%96-100 benzerlik)	TB* uzunluğu (bp)	Primer dizilimler (5'-3')	PZR ürünü uzunluğu (bp)
Tmsc82	chr-1	TA02790 ve TA02795 arasında	IGR	ACTAT	5	6 (max. 15)	114	F; atatccagcaagaccagtgtgtagatag R; ccattttcttaccacaaactaaattac	271
Tmsc86	chr-1	TA16655	Exon	ATT	3	10 (max. 18)	129	F; cagataacattagagtcacttaattgc R; acactcaaactcaaataaaaactggtc	330
Tmsc21	chr-2	TA16055	Exon	AGGAGT	6	7 (max. 12)	299	F; taaatgttagttaccaccaaagtagc R; atcaacacatcaatctactcaacctg	423
Tmsc22	chr-2	TA15665	İntron	A	1	45 (max. 67)	78	F; caattattttattatacaaatgtgtagc R; tatgtaaatcacatataatcattg	218
Tmsc23	chr-2	TA15635	Exon	TAA	3	12 (max. 25)	211	F; tcaaaatggaatctggacaattttac R; ttaatagattttctacaagtagaattc	370
Tmsc24	chr-2	TA15590	Exon	TAT	3	10 (max. 15)	129	F; gaattgaccaaatttcagaattaac R; aagcaccgtaattgttaaaattatgg	297
Tmsc26	chr-2	TA15595	Exon	TAT	3	10 (max 48)	70	F; tgggtgtaattagtgttaataataaagc R; tgctggaaataataatataataaacac	347
Tmsc27	chr-2	TA15555 ve TA15545 arasında	IGR	ATT	3	11 (max. 17)	45	F; atggatcaatacaattaattgatcc R; aacgagaaaataaattcatcaaatc	205
Tmsc28	chr-2	TA15545	Exon	AGT	3	12 (max. 12)	82	F; atctttatcagtagtaccactacag R; tttgaaggtctataggtgtagctgc	162
Tmsc29	chr-2	TA15160)	Exon	TAA	3	12 (max. 13)	376	F; actacaattgtgctaaattctattac R; gattccattgttggtgcaccaaactcg	249
Tmsc31	chr-2	TA13875	İntron	ATT	3	9 (max. 11)	39	F; tttagcatttgataacaacattgtg R; tgattattcaaaaaaggaccttaccg	280
Tmsc32	chr-2	TA13875	Exon	AGT	3	9 (max. 11)	45	F; atttaataatctgtggtatctcac R; atgatgagaaaaatcaattagacgac	260
Tmsc33	chr-2	TA13660 ve TA13655 arasında	IGR	AAT	3	9 (max. 9)	40	F; ccattaaactcattatattattatgc R; tacctcactggaatcacatcattgag	194
Tmsc34	chr-2	TA13060	Exon	TAG	3	9 (max. 12)	57	F; atataaagtgtgccccactcttaattg R; ttccaattccatattctacacaatcc	296
Tmsc37	chr-2	TA11770	Exon	ATT	3	13 (max. 13)	75	F; tcgtcaattgtacgctcttccg R; tctacagccgggaatcgaattccagc	192
Tmsc38	chr-2	TA11680	Exon	GAA	3	13 (max. 45)	336	F; attgctcagtagtggttaccatagc R; atacactttctacctaagccaagatgg	455
Tmsc45	chr-3	TA04315	Exon	TAC	3	13 (max 14)	68	F; ctgatgatgtagtacacaggatcac R; aagcgttaagattcttgattgttc	216
Tmsc48	chr-3	TA05285 ve TA05290	IGR	AATT	4	9 (max. 9)	57	F; acccattcaactgcaacgaagcgc R; tcctaacaccttacaatattatcc	304
Tmsc52	chr-3	TA03910	intron	CTA	3	12 (max. 16)	114	F; atctcgatccagaacggtatccaac R; taggagtactetaaagtacactacag	259

Çizelge 3.1. Mini ve mikrosatellite markerlar, *devamı*

Kod	chr*	En yakın CDS* (ürün)	TBY* ^Y	TR* dizilimi (5'-3')	TR uzunluğu (nt)	TR'nin kopya sayısı (%96-100 benzerlik)	TB* uzunluğu (bp)	Primer dizilimler (5'-3')	PZR ürünü uzunluğu (bp)
Tmsc53	chr-3	TA04345	intron	AAAT	4	15 (max. 15)	72	F: gagacctgattacaagttgacagg R: gatgaaatattctgataggttcgac	380
Tmsc55	chr-3	TA04845) ve TA04855 (arasında)	IGR	AATTA	5	8 (max. 18)	504	F: acctgacgggtagtagtaccctagtag R: taccctaccgtactatcttaagg	983
Tmsc89	chr-3	TA04150 ve TA04205 arasında	IGR	TAA	3	10 (max. 11)	43	F: gtactactgtacctacacctaac R: ccttcctcagtagtattatactc	763
Tmsc65	chr-4	TA09170	exon	TCT	3	11 (max. 13)	88	F: ccttagaatgatggaattctctgg R: aaatcagctgtagtagtaag	557
Tmsc66	chr-4	TA09340ve TA09345 arasında	IGR	ATTA	4	6 (max. 22)	25	F: catttggtggattggtctgtagtag R: aacctagagtagtagtaagcttac	757
Tmsc67	chr-4	TA07080	intron	ATTA	4	7 (max. 20)	57	F: cctgtattactaatttaggaactgg R: gaacaagttgatgaatcagaatgc	431
Tmsc68	chr-4	TA08255	intron	TAGTA	5	5 (max. 9)	25	F: ctccaatgtactccaatctcacc R: ctggaagatgctgagtagagaag	554
Tmsc70	chr-4	TA11045	intron	TAG	3	12 (max. 27)	149	F: ttattaatgcactcattctgcctc R: aacttgaagatatgtggcgtagtg	545
Tmsc72	chr-4	TA11070	intron	TAT	3	11 (max. 13)	64	F: agtacacaacggatataatcgaacc R: cagcaagtggttcggaacaactgc	254
Tmsc73	chr-4	TA09785	Exon	GAAGAG	6	6 (max. 6)	36	F: gaaccaacacaacctactactcaac R: attatcgtactctctctcatcc	247

(*): MSC; minisatellit bölge, Tmsc; mikrosatellit bölge, chr; bulunduğu kromozom, CDS; protein kodlayan bölge, IGR; intergenik bölge, TR; tekrarlı motif, TB; tekrarlı bölge kısaltmalarıdır



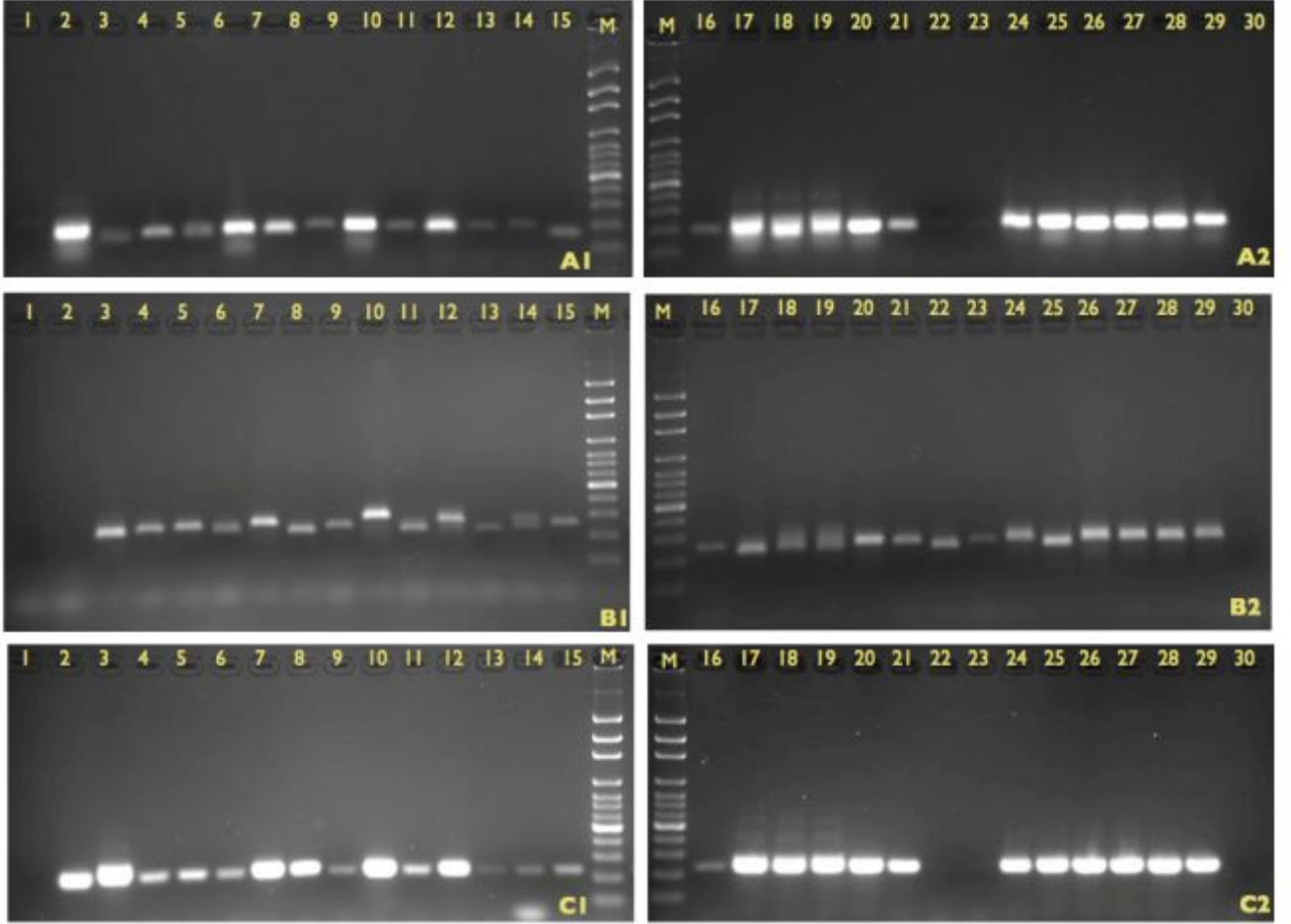
Resim 3.6. Gradient PZR görüntüleri. Farklı markerlere ait tekrarlı bölgeleri çoğaltmak amacıyla tasarlanan primer çiftlerinin en uygun bağlanma ısılarının belirlenmesi amacıyla *T.annulata* Ankara C9 DNA örneği kullanılarak yapılan ısı derecelendirmeli (gradient) PZR sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel elektorforezine ait görüntüleri. (M): 100 bp'lik referans moleküler boyut belirleyici (Thermo Scientific, ABD); 1–12: *T.annulata*/Ankara C9 DNA örneğinin 50,8–59,2°C ısı aralığındaki (55°C'de 10°C'lik derecelendirme) bağlanma ısılarında elde edilen PZR ürünleri; 13: dH₂O (deiyonize su) negatif kontrol.

Yapılan analizlerde tek bir bölgeyi temsil eden ve belirlenen uzunluklarda ürünleri çoğaltıp *Theileria annulata*'ya özgü primer çiftleri farklı bölgelere ait izolatları çoğaltabilmesi ve bunlar arasında polimorfizm gösterip göstermediklerinin belirlenmesi amacıyla Çizelge 2.1'de yer alan izolatlar kullanılarak PZR ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla uygulanan PZR'lar gereç ve yöntemde anlatıldığı şekilde her primer çifti için belirlenen bağlanma ısıları ve uzatma süreleri kullanılarak Techne TC-512 marka otomatik termal sikluslu makinede gerçekleştirilmiştir. Primerlerin farklı izolatları çoğaltması ve bunlar arasında polimorfizm gösterip göstermemeleri yönünden ön incelemeleri agaroz jel elektroforezi ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2'de verilmiştir. MSC21, 24, 25, Tmsc15 ve 24 markerlerine ait bölgeleri çoğaltmak amacıyla tasarlanan primer çiftleri kullanılarak yapılan PZR sonucunda *T.annulata*'nın farklı izolatları kullanılarak yapılan gradient PZR'de hiçbir ürün elde edilmemiştir (Çizelge 3.2.). MSC22, 23 ve 26 ile Tmsc2, 8, 12, 17, 21, 26, 72, 73, 81 ve Tmsc82 markerlerine ait primer çiftleri ile yapılan PZR sonucunda elde edilen ürünlerde çok sayıda non-spesifik bant görülmüştür. İncelenen markerlerden 11 tanesi (MSC14, ve MSC19, Tmsc11, 20, 38, 48, 53, 68, 70, 75 ve Tmsc77) *Theileria lestoquardi*'ye ait DNA örneğinde pozitif bir bant vermiştir. *T.lestoquardi*'ye ait DNA örneğinde 212 ve 120 bp uzunluğunda ürün çoğaltan sırasıyla Tmsc77 ve Tmsc37 markerlerine ait primer çiftlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü Resim 3.7, A1 ve C1'de verilmiştir.

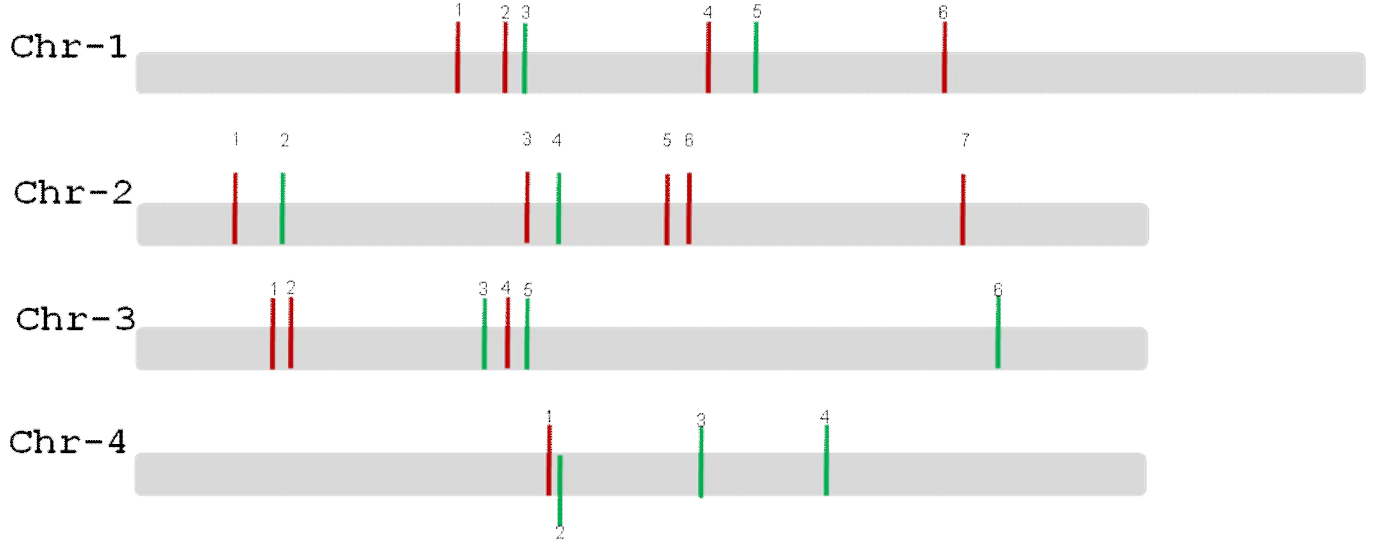
Yapılan PZR sonrasında elde edilen veriler çoğaltılan izolat sayısı arttıkça ilgili markerin gösterdiği polimorfizm ve çoğaltılan allel sayısının arttığını göstermektedir. Örnek olarak; 1-20 adet *T.annulata* izolatını çoğaltabilen primer çiftleri ile 1-6 adet allel görülürken, 22-27 izolatı çoğaltan primer çiftlerinde allel sayısının 5-32 arasında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.2.). İki mini (MSC8 ve MSC19) ile beş mikrosatellite (Tmsc31, 33, 37, 75 ve Tmsc77) markerler kullanılan tüm izolatları çoğaltırken, MSC14, Tmsc1, 86 ve Tmsc45 tek bir izolat dışında diğer tüm izolatları polimorfik olarak çoğaltabilmiştir. Tüm izolatları başarılı bir şekilde çoğaltan Tmsc77, 31 ve Tmsc37'ye ait agaroz jel elektroforez görüntüsü Resim 3.7'de verilmiştir.

%2'lik agaroz jelde yapılan ön incelemeler sonunda *Theileria annulata* popülasyonlarında genetik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla üç mini (MSC8,14 ve MSC19) ile on mikrosatellite (Tmsc1, 31, 33, 37, 45, 48, 68, 75, 77 ve Tmsc86) bölgeden oluşan toplam 13 marker seçilmiştir.

Seçilen markerler ile ilgili ayrıntılı bilgiler Çizelge 3.3'de ve seçilen polimorfik mini ve mikrosatellite bölgelerin *T.annulata* genomundaki kromozomlar (chr1-4) üzerindeki yerleşim yerleri Şekil 3.3'de verilmiştir. Weir, 2006 tarafından geliştirilen 10 adet mini ve mikrosatellit markerler (Çizelge 3.4.) dahil olmak üzere toplamda 23 adet polimorfik marker klonların ayırımı genetik çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.



Resim 3.7. *T.annulata*'nın farklı izolatlarına ait DNA örneklerinin tasarlanan Tmsc77 (A1–4), Tmsc31 (B1–3), Tmsc37 (C1–4) primer çiftleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektorforezine ait görüntüsü. (M): 100 bp'lik referans moleküler boyut belirleyici; **1:** *Theileria sergenti*; **2:** *Theileria lestoquardi*; **3:** *T.annulata*/Tunus 7; **4:** *T.annulata*/Sudan Soba 2A5; **5:** *T.annulata*/İran Razi J3; **6:** *T.annulata*/Sudan Umbanein; **7:** *T.annulata*/İsrail Tova; **8:** *T.annulata*/Fas Gharb43; **9:** *T.annulata*/Fas Ode; **10:** *T.annulata*/Tunus JED4; **11:** *T.annulata*/Türkiye Aova; **12:** *T.annulata*/Türkiye Dalama; **13:** *T.annulata*/Türkiye Pendik; **14:** *T.annulata*/Türkiye Aydın; **15:** *T.annulata*/Türkiye D.bakır; **16:** *T.annulata*/Türkiye Ank A2; **17-28:** *T.annulata*/Türkiye Aova saha izolatları ve klonları; **29:** *T.annulata*/Türkiye Ankara D7; **30:** negatif kontrol (deiyonize su)



Şekil 3.3. Genetik çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen polimorfik mini ve mikrosatellite bölgelerin *T.annulata* genomundaki kromozomlar (chr1-4) üzerindeki yerleşim yerleri. MSC ve Tmsc kodlu markerler sırasıyla mini ve microsatellite bölgeleri göstermektedir. Birinci kromozom (chr-1) üzerindeki yerleşim yerlerine göre 1-6 çizgi sırasıyla Tmsc 1, 75, TS16, TS15, Tmsc77, Tmsc86 kodlu toplam 2 mikrosatellite bölgeyi, ikinci kromozom (chr-2) üzerindeki yerleşim yerlerine göre 1-7 çizgi sırasıyla MSC19, TS31, Tmsc31, TS20, Tmsc33, MSC8, Tmsc37 kodlu toplam 2 minisatellite ve 5 mikrosatellite, üçüncü kromozom (chr-3) üzerindeki yerleşim yerlerine göre 1-6 çizgi sırasıyla Tmsc45, Tmsc48, TS9, MSC14, TS8, TS12 kodlu toplam 1 minisatellite ve 5 mikrosatellite, dördüncü kromozom (chr-4) üzerindeki yerleşim yerlerine göre 1-4 çizgi sırasıyla Tmsc68, TS25, TS6, TS5, kodlu toplam 4 minisatellite tekrarlı bölge yer almaktadır. Kromozomlar üzerindeki yeşil renkli çizgiler Weir, 2006 tarafından belirlenmiş ve bu tez de kullanılmış sırasıyla TS15 ve 16 (chr-1), TS20 ve 31(chr-2), TS8, 9 ve 12 (chr-3) ile TS5, 6 ve 25 (chr-4) markerlerin ilgili kromozomlar üzerindeki yerleşim yerlerini göstermektedir

Çizelge 3.2. Mini ve mikrosatellit markerlerin farklı izolatlarla yapılan analiz sonuçları

Kodu	Çoğaltılan toplam allel sayısı	Çoğaltılmayan <i>T.annulata</i> izolat sayısı	Primerlerin belirlenmiş bağlanma ısıları (°C)	Izolatlarda çoğaltılan ürünlerinin aralığı (bp)	PZR ürününün belirlenen uzunluğu (bp)
*MSC3	4	20	52	290–900	446
MSC5	2	26	57	250–550	535
MSC26 ^b		b			398
MSC27	2	18	54	440–500	482
MSC8	29	-	57	200–800	508
MSC9	2	8	57	850–900	883
MSC19 ^a	10	-	51	400–700	578
MSC12	3	20	56	400–1050	1013
MSC13	32	3	57	300–950	766
MSC14 ^a	15	1	53–56	350–700	496
MSC20	6	15	53–58	300–800	551
MSC21 ^c		c			282
MSC22 ^b		b	58	300–400	385
MSC23 ^b		b			553
MSC24 ^c		c			659
MSC25 ^c		c			845
*TmSc1	5	1	55	700–800	737
TmSc2 ^b		b			364
TmSc4 ^d		d			621
TmSc5	3	23	54	400–500	447
TmSc7	1	26	55	756	756
TmSc8 ^b		b			746
TmSc11 ^a	15	4	51	280–500	356
TmSc12 ^b		b			259
TmSc13	15	4	53	500–1000	857
TmSc14	1	9	54	237	237
TmSc15 ^c		c			494
TmSc16	1	12	53–58	535	535
TmSc17 ^b		b	59		1343
TmSc18	1	18	54	878	878
TmSc19	2	19	57	700–800	725
TmSc20 ^a	11	3	59	700–900	766
TmSc75 ^a	14	-	58	100–300	220
TmSc77 ^a	18	-	55	100–300	212
TmSc81 ^b		b			239
TmSc82 ^b		b			271
TmSc86	16	1	55	300–450	330
TmSc21 ^b		b			423
TmSc22	1	9	55	218	218
TmSc23	2	7	56	150–400	370
TmSc24 ^c		c			297
TmSc26 ^b		b			347

Çizelge 3.2. Mini ve mikrosatellit markerlerin farklı izolatlarla yapılan analiz sonuçları,*devamı*

Kodu	Çoğaltılan toplam allel sayısı	Çoğaltılmayan <i>T.annulata</i> izolat sayısı	Primerlerin belirlenmiş bağlanma ısıları (°C)	Izolatlarda çoğaltılan ürünlerinin aralığı (bp)	PZR ürününün belirlenen uzunluğu (bp)
Tmsec27 ^d		c			205
Tmsec28	2	19	57	150–350	162
Tmsec29	11	3	55–57	650–850	813**
Tmsec31	19	-	55	200–350	280
Tmsec32 ^d		d			260
Tmsec33	15	-	55	100–250	194
Tmsec34	17	5	59	250–400	296
Tmsec37	14	-	55	200–300	248
Tmsec38 ^a	12	3	57	400–600	455
Tmsec45	14	1	58	150–300	216
Tmsec48 ^a	21	2	59	150–550	304
Tmsec52	1	22	59	259	259
Tmsec53 ^a	3	7	57	250–500	380
Tmsec55	1	21	58	983	983
Tmsec89	1	24	55	763	763
Tmsec65	2	11	55	550–600	557
Tmsec66	2	15	59	750–850	757
Tmsec67	2	10	54	400–450	431
Tmsec68 ^a	11	2	59	450–750	554
Tmsec70 ^a	4	12	54	500–850	545
Tmsec72 ^b		b	58		254
Tmsec73 ^b		b	58		247

*(a): *T.lestouardi*'ye ait DNA örneğinde pozitif bir bant çoğaltılan markerleri göstermektedir. (b): Yapılan PZR sonucunda elde edilen ürünlerde çok sayıda non-spesifik bant oluşturan markerleri göstermektedir. (c): Sadece *T.annulata*/Ankara C9 izolatı kullanılarak yapılan gradient PZR'de istenilen boyutta ürün elde edilmiş, ancak *T.annulata*'nın farklı izolatları ile yapılan PZR'de hiçbir bant çoğaltılamamıştır. (d): *T.annulata*/Ankara C9 izolatı kullanılarak yapılan gradient PZR'de hiçbir bant çoğaltılamamıştır. (**): Tmsec29 marker bölgesi için yeni tasarlanan primerleri belirtmektedir

Çizelge 3.3. Genetik çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen polimorfik markerlerin özellikleri

Kod	chr*	En yakın CDS* (ürün)	TBY* ^Y	TR* dizilmi (5'-3')	TR'nin kopya sayısı (%96-100 benzerlik)	<i>T.annulata</i> Çoğaltılan ürün aralığı (bp)	<i>T.lesoquardi</i> uzunluğu (bp)	PZR ürününün muhtemel uzunluğu (bp)	Primer dizilimler (5'-3')	Bağlanma ısısı (°C)
*MSC8	chr-2	TA13080	intron *+exon	AGAGGTACATAGT AATATAT	8	200–800	-	508	F;tactagtactaccaatacccttaaaagecc R;aattattgaactcacaacagattcatcc	57
MSC19	chr-2	TA15640	intron	AAATTAG	11	400–700	363	578	F; ttgtatttaggaattaattgggg R;cataattattacctcttattacac	51
MSC14	chr-3	TA03890	intron	TTAGGTATATAAG AGCTATT	6	350–700	409	496	F;gatggtatggaatatataaaattg R;cattattctttctcaatcttcc	56
*Tmsc1	chr-1	TA21235	Exon	AAT	9	700–800	-	737	F; agactcatagaaatggaaccgaactg R; cattattggaactcaaatctccaag	55
Tmsc75	chr-1	TA20880	exon5+IG R	TA	18	100–300	112	220	F; gatagtctctcatggatgacggtc R; ttacataacatgctgaatcgaatgc	58
Tmsc77	chr-1	TA20250	intron	AAATT	16	100–300	212	212	F; agaactcaatatagtagaaattcac R;caagatccaaaaactaaattatgctc	55
Tmsc86	chr-1	TA16655	Exon	ATT	18	300–450	-	330	F; cagataacattagatcacttaattgc R; aactcaaacactcaataaaactggtc	55
Tmsc31	chr-2	TA13875	intron	ATT	11	200–350	-	280	F; tttagcattgtataacaacattgtg R; tgattattcaaaaaaggaccttacg	55
Tmsc33	chr-2	TA13660	IGR*	AAT	9	100–250	-	194	F; ccattaactccattatattattatgc R; tacctcactggaatcacaacatgag	55
Tmsc37	chr-2	TA11770	exon	ATT	13	200–300	-	248	F; tcttcaattgtacgcctctccg R; tctacagccgggaatcgaattccagc	55
Tmsc45	chr-3	TA04315	exon	TAC	14	150–300	-	216	F; ctgatgatgatgtacacaggatc R; aagcgttaaaagattcttgattgtc	58
Tmsc48	chr-3	TA05285	IGR	AATT	9	150–550	260	304	F; acccattcaactgcaacgaagcg R; tcctaacccttacaatattatcc	59
Tmsc68	chr-4	TA08255	intron	TAGTA	9	450–750	565	554	F; ctccaatgtactccaatctcacc R; cttgaagatgctgagatgagaag	59

(*): MSC;minisatellit bölge, Tmsc; mikrosatellit bölge, chr; bulunduğu kromozom, CDS; protein kodlayan bölge, IGR; intergenik bölge, TR; tekrarlı motif, TB; tekrarlı bölge.

Çizelge 3.4. Weir, 2006 tarafından geliştirilen mini ve mikrosatellit markerlar

Kod	chr*	En yakın CDS* (ürün)	TBYY*	TR* dizilimi (5'-3')	TR'nin kopya sayısı (%96-100 benzerlik)	Primer dizilimler (5'-3')	PZR ürünü uzunluğu (bp)
TS5	chr-4	TA10045	exon	GGTCA	13.8	F, ctggaacatgaattactgtcttcc R, ggacaccaatgagtgacgtgacag	282
TS6	chr-4	TA11040	intron	TAATTATAGG	13.6	F, catccttgacctactgattgtac R, cggtagtaccagttaactgtc	389
TS8	chr-3	TA03940	exon	TATTATTTAATG	11.2	F, taaacgattaaaatcaagtg R, attggaatggtgaaataatgag	306
TS9	chr-3	TA03885	intergenic	ATT	27.3	F, aatgtgtgtacaacatcac R, gatggaatcactactagaagtgg	366
TS12	chr-3	TA18345	exon	AATACT	10	F, gatgatagaggaattgatatgac R, ggaatatcacaattaagattc	267
TS15	chr-1	TA20375	exon	AAGATACTAATGGAAGATT AAGTA	6.7	F, gtacgtaactctggaaatggtag R, gatacaacgttacggagtcagttgg	286
TS16	chr-1	TA20830	intergenic	TAA	35	F, ccaatgtcaacagtatgatg R, gagtaagaagtaccactactg	354
TS20	chr-2	TA13850	intron	ATTATTACTA	11.7	F, ccttcgatctcatctgatgc R, ggctgaatgggtacctgttc	273
TS25	chr-4	TA08330	intron	ATTATACTATACTATT	6.6	F, cgccatcagtagtcatctcag R, gacgaccataactgggaagtcaac	279
TS31	chr-2	Bilinmiyor	Kodlanmayan Bölge	AATTTATCCTGAATTATAGA	9.3	F, gttatcttctgctattatagc R, gtataaaactataagattc	387

(*): Chr; bulunduğu kromozom, CDS; protein kodlayan bölge, IGR; intergenik bölge, TR; tekrarlı motif, TB; tekrarlı bölge kısaltmalarındır

3.2.1. Polimorfik Markerler ile Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi

3.2.1.1. *Theileria annulata*/Ankara D7

Theileria annulata/Ankara D7 sporozoit stabilatı ile in vitro ortamda enfekte edilen PBM hücrelerinden dilüsyon yöntemi ile 76 adet klon elde edilmiştir. Klonlardaki muhtemel rekombinasyonun varlığı, kromozomal lokalizasyonu ile varsa fonksiyonu yönlerinden incelemek üzere; klonların her birinden hazırlanan DNA örnekleri kullanılarak polimorfik mini ve mikrosatellit markerlere ait primerler ile yapılan PZR sonuçları ayrı ayrı incelenmiştir. TS8 ve TS9 haricinde diğer 21 polimorfik marker ile klonlarda en az bir en çok dört allel belirlenmiştir (Çizelge 3.5.). TS8 ve TS9 ile yapılan PZR sonrasında yüksek çözünürlüğe sahip jeller kullanılarak yapılan görüntülemelerde bu bölgelerde herhangi bir allel belirlenmemiştir. TS5 ile yapılan analizde tüm klonlarda 285bp büyüklüğünde bir allel tespit edilmiştir. TS6 ile yapılan analiz sonrası klonlarda 392, 384-392 ve 377-388-392 bp'lik tekli, ikili ve üçlü allellerden oluşan 4 farklı allel belirlenmiştir. 392 bp'lik tek allel 1, 7, 8, 10-12, 15, 23, 57, 60 ve 62 numaralı klonlarda, 377-388 ve 392 bp uzunluklarındaki üçlü allel 13, 14, 40, 44, 69, 72, 74 ve 75 numaralı klonlarda tespit edilmiş, geriye kalan klonlarda ise 384-392 bp'lik iki allel belirlenmiştir. TS12 ve TS15 ile yapılan analizlerde sırasıyla tüm klonlarda 270bp'lik ve 286 bp'lik (Resim 3.8; A) birer allel tespit edilmiştir. TS16 ile yapılan incelemede 7, 11, 15, 22, 26, 30 ve 74 numaralı klonlarda 361 bp'lik bir allel ve geriye kalan tüm klonlarda 352 ve 361 bp'lik iki farklı allel belirlenmiştir (Resim 3.8; B). TS20 ile yapılan analizde 20 numaralı klon haricindeki tüm klonlarda 276 bp'lik tekli ve 269 ve 276 bp'lik iki farklı allel elde edilmiştir. Klon 1, 2, 5 ile 19 arası, 29, 30, 35, 36, 37, 39, 53, 56, 60 ve 76'da 276 bp'lik bir allel ve diğer klonlarda 269 ve 276 bp'lik iki allel tespit edilmiştir. TS25 kullanılarak yapılan incelemede 53 numaralı klon haricinde, 76 numaralı klonda 282 bp'lik bir allel ve diğer tüm klonlarda 275 ve 282 bp'lik iki farklı allel belirlenmiştir. TS31 ile yapılan analizde 1-21 arasındaki klonlar ile 76 numaralı klonda 397 bp'lik bir allele, diğer klonlarda ise 387 ve 397 bp'lik iki farklı allel olduğu belirlenmiştir. MSC8 ile yapılan incelemede 1 numaralı klonda 508 bp'lik bir allel ve geriye kalan tüm klonlarda 491 ve 508 bp'lik iki farklı allel belirlenmiştir. MSC19 ile yapılan analizde tüm klonlarda 571-586-596 bp'lik üçlü

allelere oluşan bir genotip belirlenmiştir. Tmsc1 ile yapılan analizde klon 26 hariç diğer tım klonlarda 292 bp'lik bir allel tespit edilmiştir. Tmsc75 ile yapılan analizde 39, 40, 41, 42, 43, 44, 71 ve 72 numaralı klonlar 225 bp'lik bir allele sahipken, diğer klonların 222 ve 225 bp'lik iki farklı allele sahip olduğu belirlenmiştir. Tmsc77 ile yapılan analizde klonların 214 bp'lik tekli ve 210-214 bp'lik iki farklı allele sahip olduğu belirlenmiştir (Resim 3.8; E). Tmsc86 ile yapılan analizde 1 numaralı klonda 330 bp'lik bir allel belirlenirken diğer tım klonlarda 312-324-330 bp'lik üçlü alleller belirlenmiştir. Tmsc31 ile yapılan analizde tım klonlarda 279 bp'lik bir allel tespit edilmiştir. Tmsc33 ile yapılan analizde 54 numaralı klonda 194 bp'lik bir allel bulunurken diğer klonlarda 194 ve 196 bp'lik iki farklı allel tespit edilmiştir. Tmsc37 ile yapılan analizde 1'den 21'e kadar olan klonlar ile klon 29, 37, 48, 52, 53, 54, 55, 57'den 64'e kadar olan klonlar ve klon 67, 248 bp'lik bir allele sahipken geriye kalan klonların 243 ve 248 bp'lik iki farklı allele sahip olduğu belirlenmiştir. Tmsc45 ile yapılan analizde tım klonlarda 216 ve 226 bp'lik iki farklı allel tespit edilmiştir (Resim 3.8; C). Tmsc48 ile yapılan analizlerde 306, 303-306 ve 300-303-306 bp'lik sırasıyla tekli, ikili ve üçlü alleller belirlenmiştir. Klon 1, 8, 9, 12, 15'de 306 bp'lik bir allel belirlenirken, klon 2, 6, 7, 10, 11, 18, 31, 32, 33, 37, 38, 41, 42'de 303 ve 306 bp'lik iki farklı allel ve kalan diğer klonlarda ise 300, 303 ve 306 bp'lik üç farklı allel belirlenmiştir (Resim 3.8; D). Tmsc68 kullanılarak yapılan analizde tım klonlarda 560 bp'lik tek bir allel belirlenmiştir.

Çizelge 3.5. Rekombinasyon öncesi D7 hücre kültüründeki ve rekombinasyon sonrası D7 sporozoit stabilatları ile in vitro enfeksiyonu takiben elde edilen klonların genotipik yapıları

Polimorfik markerler																						
Klon ID	TS5 (chr-4)	TS6 (chr-4)	TS8/TS9 (chr-3)	TS12 (chr-3)	TS15 (chr-1)	TS16 (chr-1)	TS20 (chr-2)	TS25 (chr-4)	TS31 (chr-2)	MSC8 (chr-2)	MSC19 (chr-2)	MSC14 (chr-3)	Tmsc1 (chr-1)	Tmsc75 (chr-1)	Tmsc77 (chr-1)	Tmsc86 (chr-1)	Tmsc31 (chr-2)	Tmsc33 (chr-2)	Tmsc37 (chr-2)	Tmsc45 (chr-3)	Tmsc48 (chr-3)	Tmsc68 (chr-4)
D7*	284	384-392	306-308/354-381	270-264	286-295	361-371	269-274	264-270	392-400	508	558-580	-	310	218-222	212-214	324-334	-	194-196	240-243	208-213-226	300-306	526-533-550
Polimorfik markerler																						
Klon ID	TS5 (chr-4)	TS6 (chr-4)	TS8/TS9 (chr-3)	TS12 (chr-3)	TS15 (chr-1)	TS16 (chr-1)	TS20 (chr-2)	TS25 (chr-4)	TS31 (chr-2)	MSC8 (chr-2)	MSC19 (chr-2)	MSC14 (chr-3)	Tmsc1 (chr-1)	Tmsc75 (chr-1)	Tmsc77 (chr-1)	Tmsc86 (chr-1)	Tmsc31 (chr-2)	Tmsc33 (chr-2)	Tmsc37 (chr-2)	Tmsc45 (chr-3)	Tmsc48 (chr-3)	Tmsc68 (chr-4)
KL-1	284	392	-	270	286	352-361	276	275-282	397	508	571-586-596	497	292	222-225	214	330	279	194-196	248	216-226	306	560
KL-2	284	384-392	-	270	286	352-361	276	275-282	397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	303-306	560
KL-3	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-4	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-5	284	384-392	-	270	286	352-361	276	275-282	397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-6	284	384-392	-	270	286	352-361	276	275-282	397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	303-306	560
KL-7	284	392	-	270	286	361	276	275-282	397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	303-306	560
KL-8	284	392	-	270	286	352-361	276	275-282	397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	306	560
KL-9	284	384-392	-	270	286	352-361	276	275-282	397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	306	560
KL-10	284	392	-	270	286	352-361	276	275-282	397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	303-306	560
KL-11	284	392	-	270	286	361	276	275-282	397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	303-306	560
KL-12	284	392	-	270	286	352-361	276	275-282	397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	306	560
KL-13	284	377-388-392	-	270	286	352-361	276	275-282	397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-14	284	377-388-392	-	270	286	352-361	276	275-282	397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-15	284	392	-	270	286	361	276	275-282	397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	306	560
KL-16	284	384-392	-	270	286	352-361	276	275-282	397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-17	284	384-392	-	270	286	352-361	276	275-282	397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-18	284	384-392	-	270	286	352-361	276	275-282	397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	303-306	560

Çizelge 3.5. Rekombinasyon öncesi D7 hücre kültüründeki ve rekombinasyon sonrası D7 sporozoit stabilatları ile in vitro enfeksiyonu takiben elde edilen klonların genotipik yapıları, *devamı*

Polimorfik markerler

Klon ID	TS5 (chr-4)	TS6 (chr-4)	TS8/TS9 (chr-3)	TS12 (chr-3)	TS15 (chr-1)	TS16 (chr-1)	TS20 (chr-2)	TS25 (chr-4)	TS31 (chr-2)	MSC8 (chr-2)	MSC19 (chr-2)	MSC14 (chr-3)	Tmsc1 (chr-1)	Tmsc75 (chr-1)	Tmsc77 (chr-1)	Tmsc86 (chr-1)	Tmsc31 (chr-2)	Tmsc33 (chr-2)	Tmsc37 (chr-2)	Tmsc45 (chr-3)	Tmsc48 (chr-3)	Tmsc68 (chr-4)
KL-19	284	384-392	-	270	286	352-361	276	275-282	397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-20	284	384-392	-	270	286	352-361	-	275-282	397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-21	284	384-392	-	270	286	352-361	276	275-282	397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-22	284	384-392	-	270	286	361	276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-23	284	392	-	270	286	352-361	276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-24	284	384-392	-	270	286	352-361	276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	222-225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-25	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	222-225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-26	284	384-392	-	270	286	361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	-	222-225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-27	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	222-225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-28	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	222-225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-29	284	384-392	-	270	286	352-361	276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-30	284	384-392	-	270	286	361	276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	222-225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-31	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	222-225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	303-306	560
KL-32	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	222-225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	303-306	560
KL-33	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	222-225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	303-306	560
KL-34	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	222-225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-35	284	384-392	-	270	286	352-361	276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	222-225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-36	284	384-392	-	270	286	352-361	276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-37	284	384-392	-	270	286	352-361	276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	222-225	210-214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	303-306	560
KL-38	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	222-225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	303-306	560
KL-39	284	384-392	-	270	286	352-361	276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	225	214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560

Çizelge 3.5. Rekombinasyon öncesi D7 hücre kültüründeki ve rekombinasyon sonrası D7 sporozoit stabilatları ile in vitro enfeksiyonu takiben elde edilen klonların genotipik yapıları, *devamı*

Polimorfik markerler

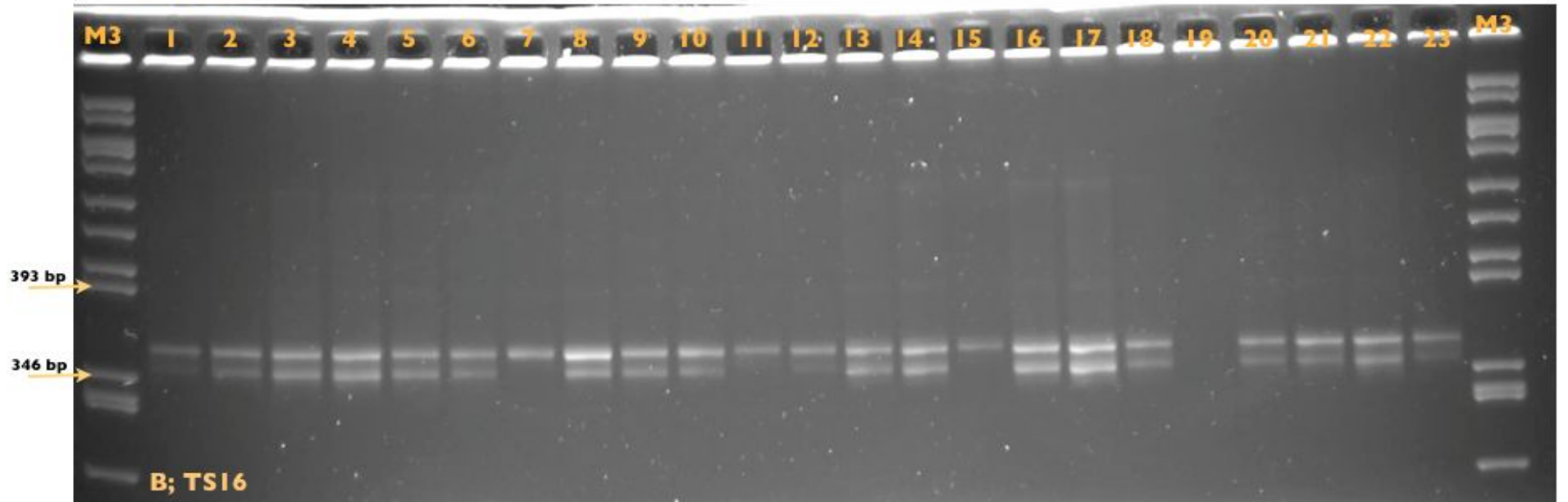
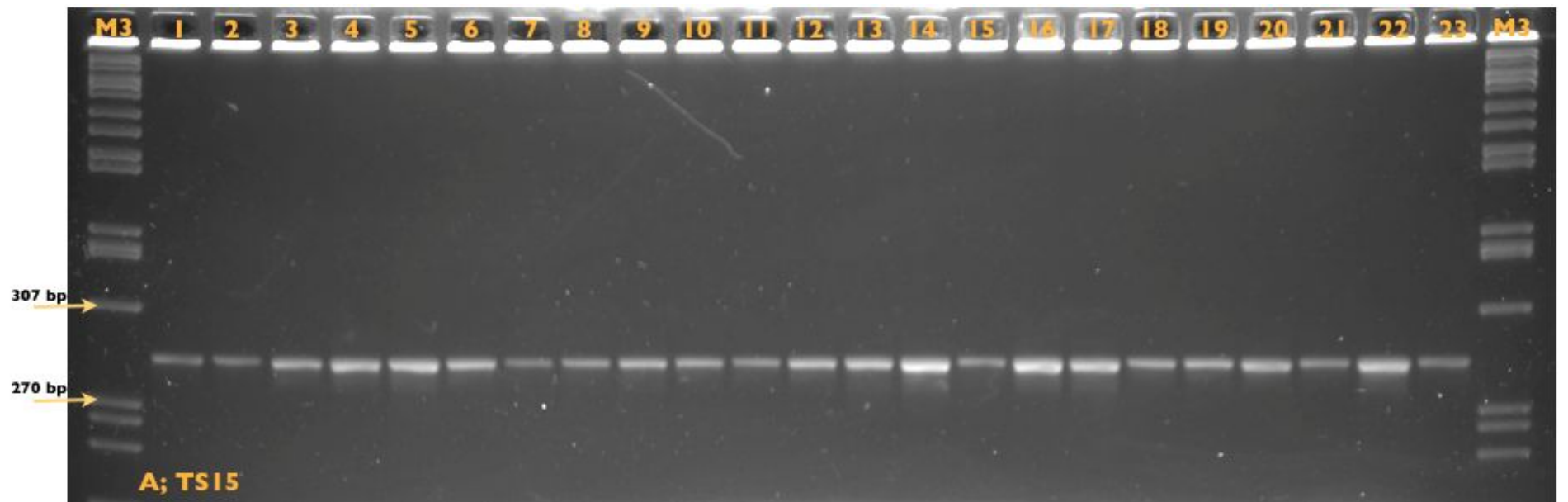
Klon ID	TS5 (chr-4)	TS6 (chr-4)	TS8/TS9 (chr-3)	TS12 (chr-3)	TS15 (chr-1)	TS16 (chr-1)	TS20 (chr-2)	TS25 (chr-4)	TS31 (chr-2)	MSC8 (chr-2)	MSC19 (chr-2)	MSC14 (chr-3)	Tmsc1 (chr-1)	Tmsc75 (chr-1)	Tmsc77 (chr-1)	Tmsc86 (chr-1)	Tmsc31 (chr-2)	Tmsc33 (chr-2)	Tmsc37 (chr-2)	Tmsc45 (chr-3)	Tmsc48 (chr-3)	Tmsc68 (chr-4)
KL-40	284	377-388-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-41	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	303-306	560
KL-42	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	303-306	560
KL-43	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	225	210-214	330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-44	284	377-388-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-45	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	222-225	210-214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-46	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-47	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-48	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-49	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-50	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	210-214	330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-51	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	222-225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-52	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	222-225	210-214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-53	284	384-392	-	270	286	352-361	276	-	387-397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-54	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194	248	216-226	300-303-306	560
KL-55	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-56	284	384-392	-	270	286	352-361	276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-57	284	392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-58	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-59	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-60	284	392	-	270	286	352-361	276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560

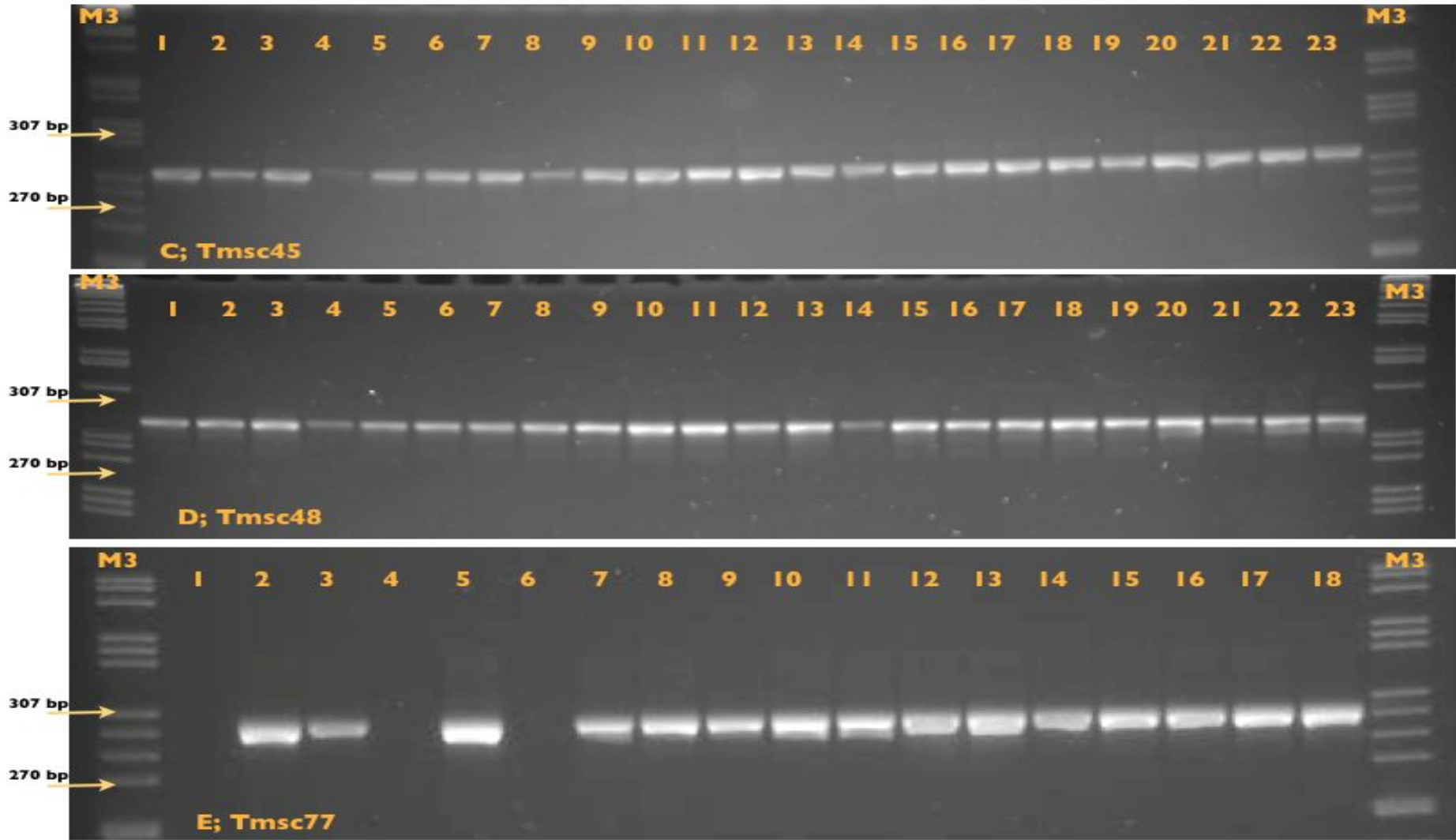
Çizelge 3.5. Rekombinasyon öncesi D7 hücre kültüründeki ve rekombinasyon sonrası D7 sporozoit stabilatları ile in vitro enfeksiyonu takiben elde edilen klonların genotipik yapıları, *devamı*

Polimorfik markerler

Klon ID	TS5 (chr-4)	TS6 (chr-4)	TS8/TS9 (chr-3)	TS12 (chr-3)	TS15 (chr-1)	TS16 (chr-1)	TS20 (chr-2)	TS25 (chr-4)	TS31 (chr-2)	MSC8 (chr-2)	MSC19 (chr-2)	MSC14 (chr-3)	Tmsc1 (chr-1)	Tmsc75 (chr-1)	Tmsc77 (chr-1)	Tmsc86 (chr-1)	Tmsc31 (chr-2)	Tmsc33 (chr-2)	Tmsc37 (chr-2)	Tmsc45 (chr-3)	Tmsc48 (chr-3)	Tmsc68 (chr-4)
KL-61	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-62	284	392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-63	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-64	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-65	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-66	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-67	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	248	216-226	300-303-306	560
KL-68	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-69	284	377-388-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	222-225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-70	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	222-225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-71	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-72	284	377-388-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	225	214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-73	284	384-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	222-225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-74	284	377-388-392	-	270	286	361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	222-225	214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-75	284	377-388-392	-	270	286	352-361	269-276	275-282	387-397	491-508	571-586-596	489-497	292	222-225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560
KL-76	284	384-392	-	270	286	352-361	276	282	397	491-508	571-586-596	489-497	292	222-225	210-214	312-324-330	279	194-196	243-248	216-226	300-303-306	560

*D7; Rekombinasyon öncesine ait klondan elde edilmiştir.





Resim 3.8. D7 klonlarına ait Spreadex jel görüntüleri. D7 sporozoit stabilatları ile invitro enfeksiyonu takiben elde edilen klonal hücre kültürlerine ait DNA örneklerinin TS15 (A), TS16 (B), Tmsc31 (C), Tmsc48 (D), Tmsc77 (E) polimorfik markerine ait primer çiftleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin Spreadex (Elchrom Scientific™, ABD) görüntüsü. (M); M3 (Elchrom Scientific™, ABD) referans moleküler boyut belirleyici. (1-23); 1-23 numaralı D7 klonlarına ait DNA örnekleri

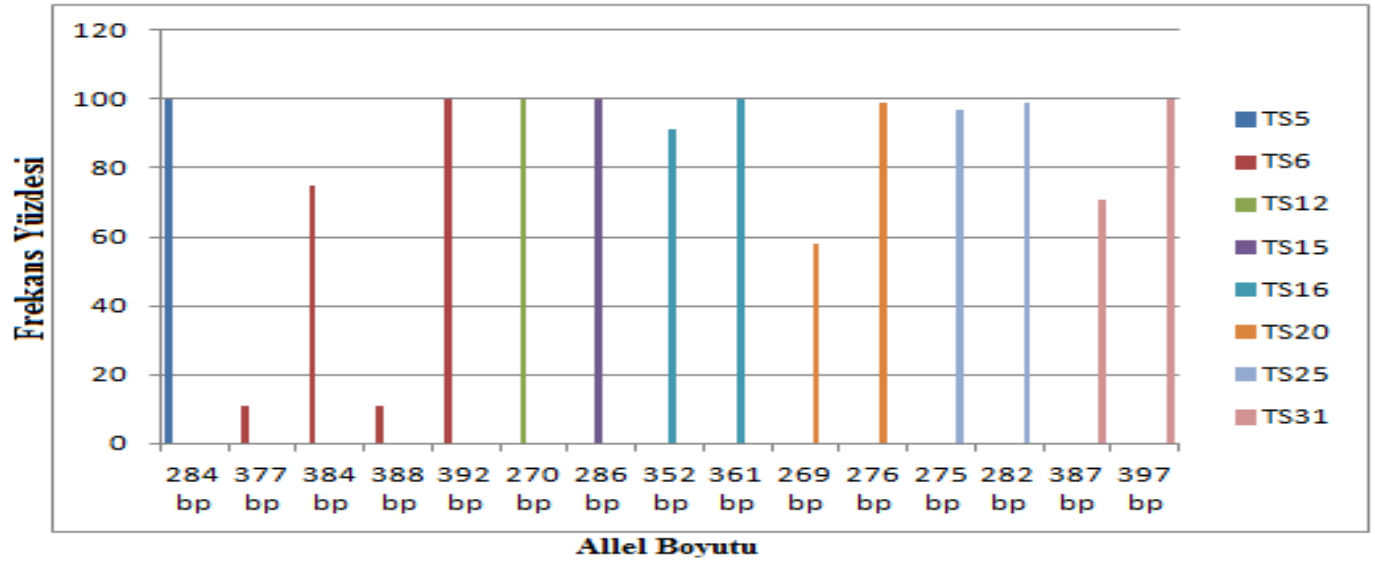
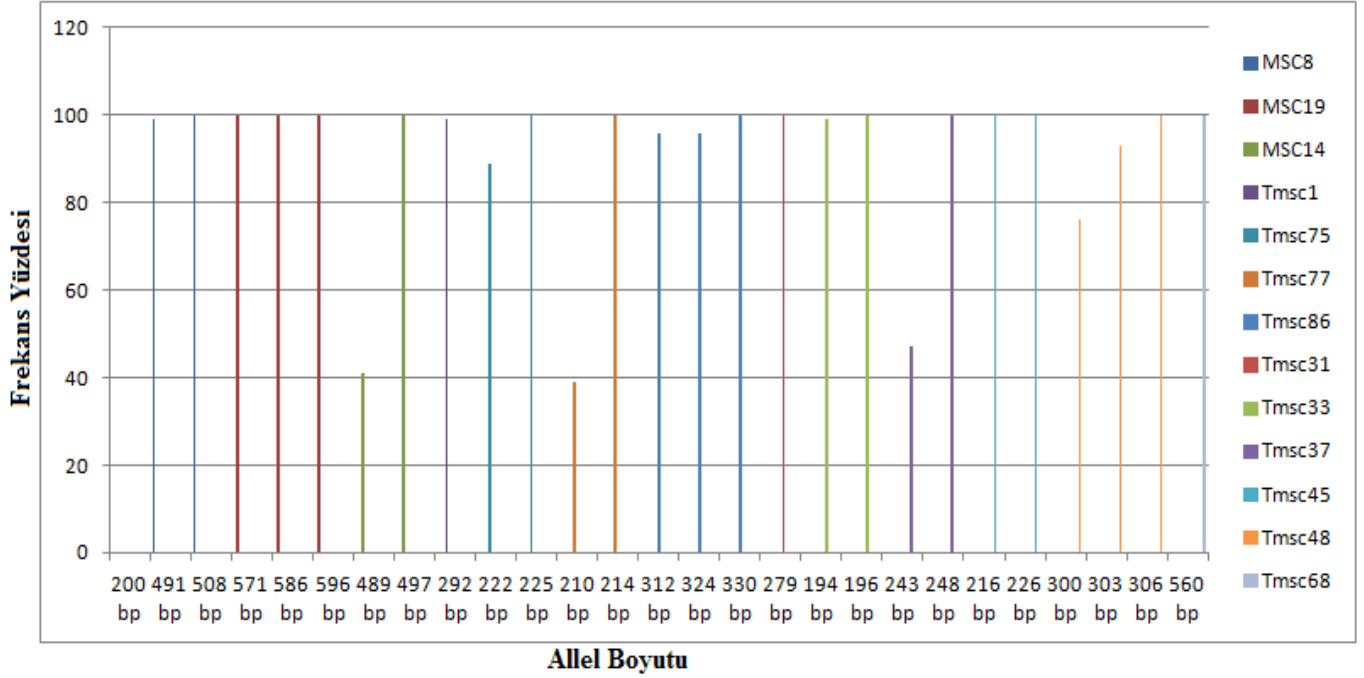
Theileria annulata/Ankara D7 sporozoit stabilatı ile in vitro ortamda enfekte edilen PBM hücrelerinden elde edilen 76 adet klon ile rekombinasyon öncesi D7 hücre kültürünün genotipik yapıları polimorfik 23 adet mini ve mikrosatellit marker ile belirlenmiştir. Rekombinasyon öncesi ve sonrasında tespit edilen alleller karşılaştırılarak, rekombinasyonun yoğun olduğu kromozomal bölgeler ve varsa bu bölgeler fonksiyonları yönünden incelenmiştir. Birinci kromozom üzerinde yer alan (TS15, TS16, Tmsc1, Tmsc75, Tmsc77 ve Tmsc86) polimorfik markerlardan TS15 ile yapılan analizde rekombinasyon öncesindeki D7 hücre kültüründe 285 ve 295 bp'lik iki farklı allel belirlenmiştir. Rekombinasyon sonrasında 295 bp'lik allelin kaybolduğu ve tüm klonlarda sadece 285 bp'lik allel kalarak popülasyonun yapısının değiştiği tespit edilmiştir. TS15 markeri protein kodlayan TA20375 kodlu hipotetik proteinine ait eksonik bölgede yer almaktadır. TS16 ile yapılan analizde rekombinasyondan önce D7 hücrelerinde 361 ve 371 bp'lik iki farklı allel tespit edilirken, rekombinasyon sonrasında 352 ve 361 bp'lik iki farklı allel tespit edilmiştir. Rekombinasyon öncesinde bulunan 371 bp'lik alleli kaybolmuş ve yerine 352 bp'lik yeni bir allelin muhtemel bir kromozomlar arası çaprazlama (crossing over; mikrogamet ve makrogamet kromozomlarındaki karşılıklı parça değişimi) sonucunda popülasyon içerisine katıldığı belirlenmiştir. TS16 protein kodlamayan intergenik bölgede yer almaktadır. Tmsc1 ile yapılan analizde D7'de rekombinasyon öncesinde 310 bp'lik tek bir allel belirlenirken, rekombinasyon sonrasında herhangi bir allele rastlanılmamış bir klon haricinde geriye kalan tüm klonlarda 292 bp'lik yeni bir allelin oluştuğu belirlenmiştir. Tmsc1 markeri protein kodlayan TA21235 kodlu hipotetik proteinine ait eksonik bölgede yer almaktadır. Tmsc75 ile yapılan incelemede rekombinasyondan önce D7 hücrelerinde 218 ve 222 bp'lik iki farklı allel tespit edilirken, rekombinasyondan sonra 222 ve 225 bp'lik iki farklı allel ve bazı klonlarda ise sadece 225 bp'lik allel belirlenmiştir. Rekombinasyon öncesindeki 218 bp'lik allelin rekombinasyon sonrasında kaybolduğu ve yerine 225 bp'lik farklı bir allelin tek başına ya da 222 bp'lik allel ile birlikte bulunduğu belirlenmiştir. Tmsc75 markeri protein kodlayan TA20880 kodlu hipotetik proteinine ait son eksonik bölgenin bir kısmı ile sonraki intergenik bölgede de yer almaktadır. Tmsc77 ile yapılan analizde rekombinasyon öncesinde 212 ve 214 bp'lik iki farklı allel tespit edilirken, rekombinasyon sonrasında 210 ve 214 bp'lik iki farklı allel ve bazı klonlarda yalnız 214 bp'lik tek allel tespit edilmiştir. Tmsc77 markeri protein kodlayan TA20250 kodlu hipotetik proteinine ait intronik bölgede yer almaktadır. Tmsc86

ile yapılan analizde rekombinasyondan önce belirlenen 324 ve 334 bp'lik iki farklı allel, rekombinasyon sonrasında tek bir klonda belirlenen 330 bp'lik bir allel hariç geriye kalan tüm klonlarda yerini 312-324-330 bp uzunluklara sahip üçlü allele bırakmıştır (Çizelge 3.5.). Tmsc86 markeri protein kodlayan TA16655 kodlu hipotetik proteinine ait eksonik bölgede yer almaktadır. İkinci kromozom üzerinde yer alan (TS31, TS20, MSC8, MSC19, Tmsc31, Tmsc33 ve Tmsc37) polimorfik markerlerden biri olan TS31 ile yapılan analizde rekombinasyon öncesinde 392 ve 400 bp'lik iki farklı allel tespit edilirken, rekombinasyon sonrasında tamamen yeni 387 ve 397 bp'lik iki farklı allel ve bazı klonlarda ise sadece 397 bp'lik tek allel tespit edilmiştir. TS31 markeri protein kodlamayan intergenik bölgede yer almaktadır. TS20 ile rekombinasyon öncesinde 269 ve 274 bp'lik iki allel tespit edilirken, rekombinasyon sonrasında bir klon hariç geriye kalan klonlardan %18,42'sinde 276 bp uzunluğunda yeni tek bir allel, %80.2'sinde ise 269 bp'lik rekombinasyon öncesinde görülen aynı allel ile birlikte 276 bp'lik yeni allel çift allel olarak tespit edilmiştir. TS20 markeri protein kodlayan TA13850 kodlu hipotetik proteinine ait intronik bölgede yer almaktadır. MSC8 polimorfik markeri ile rekombinasyon öncesinde 508 bp'lik bir allel belirlenirken, rekombinasyon sonrasında yalnız bir klonda 508 bp'lik aynı allel ve diğer tüm klonlarda ise 491 ve 508 bp'lik iki farklı allel belirlenmiştir. Sadece bir klonda rekombinasyon sonrasında herhangi bir değişim görülmezken, geri kalan klonların hepsinde 508 bp'lik allelin yanında 491 bp'lik yeni bir allel ortaya çıkmıştır. MSC8 markeri protein kodlayan TA13080 kodlu hipotetik proteinine ait intronik ve eksonik bölgede yer almaktadır. MSC19 ile yapılan analizde rekombinasyon öncesinde 558 ve 580 bp'lik iki farklı allel belirlenirken, rekombinasyon sonrasında tüm klonlarda 571-586-596 bp'lik rekombinasyon öncesine göre tamamen farklı üçlü alleller ortaya çıkmıştır. Bu bulgular MSC19 bölgesindeki oluşan yoğun rekombinasyonu göstermektedir. MSC19 markeri protein kodlayan TA15640 kodlu hipotetik proteinine ait intronik bölgede yer almaktadır. Tmsc31 ile yapılan analizde, rekombinasyon öncesinde herhangi bir allel belirlenemezken, rekombinasyon sonrasında 279 bp'lik yeni bir allelin ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Tmsc31 markeri protein kodlayan TA13875 kodlu hipotetik proteinine ait intronik bölgede yer almaktadır. Tmsc33 ile rekombinasyon öncesinde 194 ve 196 bp'lik iki farklı allel rekombinasyon sonrasında sadece bir klonda allel kaybolmuş ve 194 bp'lik tek bir allel belirlenmiş, geriye kalan diğer tüm klonlarda ise rekombinasyon öncesinde olduğu gibi 194 ve 196 bp'lik iki farklı allel varlığını

korumuştur. Bu da ilgili bölgede rekombinasyonun oldukça az (%1.31) oranda gerçekleştiğini göstermiştir. Tmsc33 markeri protein kodlamayan intergenik bölgede yer almaktadır. İkinci kromozom üzerinde yerleşim gösteren son polimorfik marker olan Tmsc37 ile yapılan incelemede rekombinasyon öncesi 240 ve 243 bp'lik iki farklı allel belirlenirken, rekombinasyondan sonra 248 bp'lik bir allel ve 243-248 bp'lik iki farklı allel tespit edilmiştir (Çizelge 3.5.). Tmsc37 markeri protein kodlayan TA11770 kodlu hipotetik proteinine ait eksonik bölgede yer almaktadır. Üçüncü kromozom üzerinde yer alan (TS8, TS9, TS12, MSC14, Tmsc45 ve Tmsc48) polimorfik markerlar dan TS8 ve TS9 ile rekombinasyon öncesinde 306 ve 308 bp'lik ve 354 ve 381 bp'lik iki farklı allel belirlenirken, rekombinasyon sonrasında tüm klonlarda herhangi bir allele rastlanılmamıştır ve rekombinasyon tüm allelerin kaybı ile sonuçlanmıştır. TS8 markeri protein kodlayan TA03940 kodlu korunmuş hipotetik proteinine ait eksonik bölgede, TS9 markeri ise protein kodlamayan intergenik bölgede yer almaktadır. TS12 ile yapılan analizde rekombinasyon öncesindeki D7 hücre kültüründe 264 ve 270 bp'lik iki farklı allel belirlenmiştir. Rekombinasyon sonrasında 264 bp'lik allelin kaybolduğu ve tüm klonlarda sadece 270 bp'lik allel kalarak popülasyonun yapısının değiştiği tespit edilmiştir. TS12 markeri protein kodlayan TA18345 kodlu hipotetik proteinine ait eksonik bölgede yer almaktadır. MSC14 ile yapılan analizde rekombinasyon öncesinde herhangi bir allel belirlenemezken, rekombinasyonun bazı klonlarda 497 bp'lik tek ve bazılarında ise 489 ve 497 bp'lik iki farklı yeni allelin oluşumuna yol açtığı tespit edilmiştir. MSC14 markeri protein kodlayan TA03890 kodlu kromozom ayrılma (SMC) proteinine ait intronik bölgede yer almaktadır. Tmsc45 ile yapılan analizde rekombinasyon öncesinde 208-213-226 bp'lik üçlü allel, rekombinasyon sonrasında tüm klonlarda 216 ve 226 bp'lik iki farklı allel belirlenmiştir. Rekombinasyon öncesindeki 208 ve 213 bp'lik alleller kaybolurken enfeksiyon sonrasında meydana gelen rekombinasyon sonucu 216 bp'lik allelin yanına 226 bp'lik yeni bir allel eklenerek ikili yeni bir allel meydana gelmiştir. Tmsc45 markeri protein kodlayan TA04315 kodlu hipotetik proteinine ait eksonik bölgede yer almaktadır. Tmsc48 ile rekombinasyon öncesinde 300 ve 306 bp'lik iki farklı allel belirlenirken, rekombinasyon sonrası klonlarda 306 bp'lik tek allel, 303-306 bp'lik iki farklı allel ve 300-303-306 bp'lik üç farklı allel kombinasyonları belirlenmiştir. Protein kodlamayan, intergenik bir yerleşim gösteren bu bölgede rekombinasyon yüksek oranda ortaya çıkmıştır. *T.annulata*'nın dördüncü ve son kromozomu üzerindeki polimorfik markerlarından (TS5, TS6, TS25 ve TMS68) biri

olan TS5 ile yapılan analizde rekombinasyon öncesinde 284 bp'lik bir allel belirlenirken, rekombinasyon sonrasında her klonda yine aynı büyüklükte allel tespit edilerek rekombinasyon sonrası ilgili bölgenin etkilenmediği görülmüştür. TS5 markeri protein kodlayan TA10045 kodlu hipotetik proteinine ait eksonik bölgede yer almaktadır. TS6 ile rekombinasyon öncesinde 384 ve 392 bp'lik iki farklı allel belirlenirken, rekombinasyon sonrasında klonların bazılarında 392 bp'lik tekli, bazılarında rekombinasyon öncesindeki gibi 384 ve 392 bp'lik ikili ve kalan az bir kısmında da 377-388-392 bp'lik üçlü alleller belirlenmiştir. Bu bölgede oluşan rekombinasyonun popülasyon içerisindeki yoğunluğunun az olduğu, yeni popülasyonlar içerisinde %10,52'lik kısımda yeni bir allel oluşurken, %13,15'lik kısımda ise allel kaybı görülmüştür. TS6 markeri protein kodlayan TA11040 kodlu hipotetik proteinine ait eksonik bölgede yer almaktadır. TS25 ile yapılan analizde rekombinasyon öncesinde 264 ve 270 bp'lik iki farklı allel tespit edilirken, rekombinasyon sonrası bir klonda hiçbir allel tespit edilememiş, diğer bir klonda ise 282 bp'lik yeni bir allel ve geriye kalan klonlarda 275 ve 282 bp'lik iki farklı allel tespit edilmiştir. TS25 markeri protein kodlayan TA08330 kodlu hipotetik proteinine ait intronik bölgede yer almaktadır. Tmsc68 ile rekombinasyon öncesinde 526-533-550 bp'lik üçlü allel belirlenirken, rekombinasyondan sonra oluşan tüm klonlarda rekombinasyon öncesinde belirlenen üç allelinde kaybolarak yerine 560 bp'lik yeni bir allelin olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.5.). Tmsc68 markeri protein kodlayan TA08255 kodlu DNA-bağlayan şaperon proteinine ait intronik bölgede yer almaktadır.

Theliera annulata/Ankara D7 sporozoit stabilatı ile in vitro ortamda enfekte edilen PBM hücrelerinden elde edilen 76 adet klonun, polimorfik 23 adet mini ve mikrosatellit marker kullanılarak belirlenen tüm allellerin frekans ve frekans yüzdesi bulguları şekil ve tablo olarak vermiştir (Şekil 3.4. ve Çizelge 3.6.).



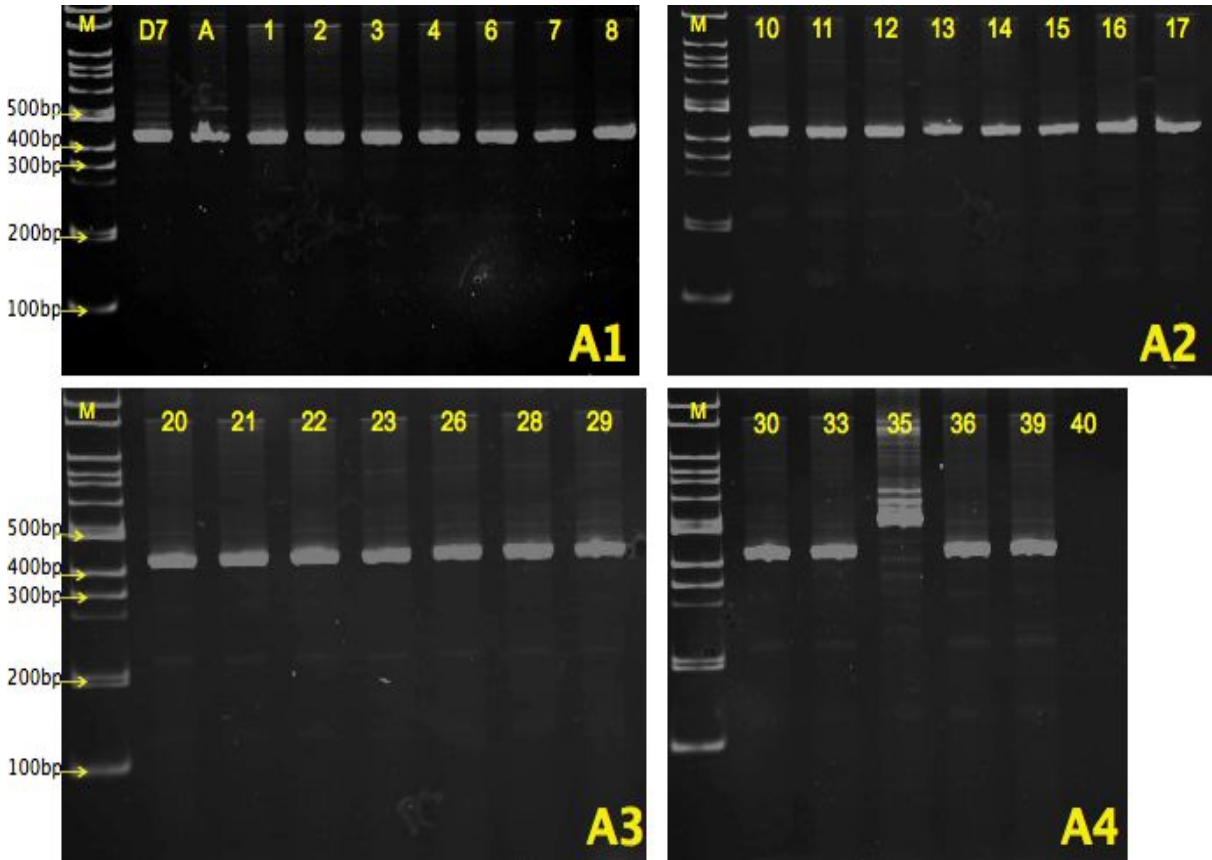
Şekil 3.4. Rekombinasyon sonrası D7 sporozoit stabilatları ile invitro enfeksiyonu takiben elde edilen klonlara ait allel frekans dağılımları

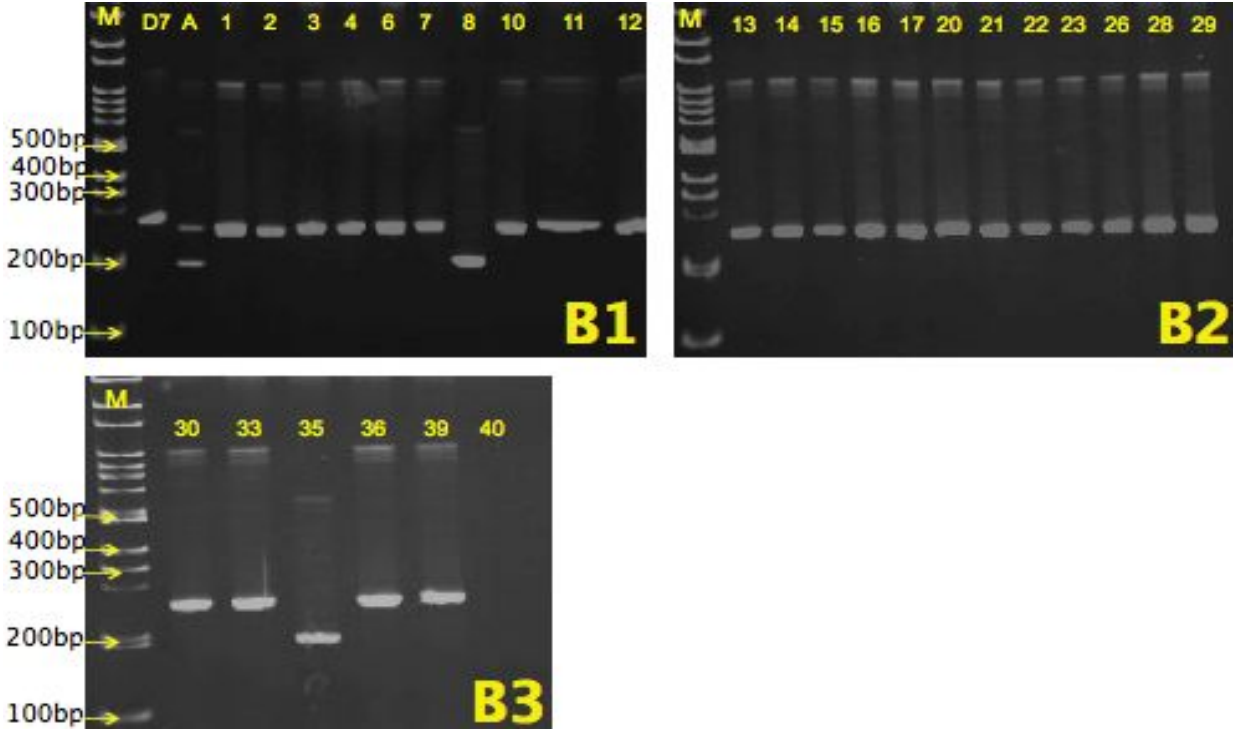
Çizelge 3.6. *Theileria annulata*/Ankara D7 (rs)'a ait allellerin frekans ve frekans yüzdeleri

Mark.	1. Allel		Frekans Yüzdesi	2. Allel		Frekans Yüzdesi	3. Allel		Frekans Yüzdesi	4. Allel		Frekans Yüzdesi
	(bp)	Frekans		(bp)	Frekans		(bp)	Frekans		(bp)	Frekans	
TS5	284	76	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TS6	377	8	0.11	384	57	0.75	388	8	0.11	392	76	1
TS8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TS9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TS12	270	76	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TS15	286	76	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TS16	352	69	0.91	361	76	1	-	-	-	-	-	-
TS20	269	44	0.58	276	75	0.99	-	-	-	-	-	-
TS25	275	74	0.97	282	75	0.99	-	-	-	-	-	-
TS31	387	54	0.71	397	76	1	-	-	-	-	-	-
MSC8	491	75	0.99	508	76	1	-	-	-	-	-	-
MSC19	571	76	1	586	76	1	596	76	1	-	-	-
MSC14	489	31	0.41	497	76	1	-	-	-	-	-	-
TMSC1	292	75	0.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMSC75	222	68	0.89	225	76	1	-	-	-	-	-	-
TMSC77	210	30	0.39	214	76	1	-	-	-	-	-	-
TMSC86	312	73	0.96	324	73	0.96	330	76	1	-	-	-
TMSC31	279	76	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMSC33	194	75	0.99	196	76	1	-	-	-	-	-	-
TMSC37	243	36	0.47	248	76	1	-	-	-	-	-	-
TMSC45	216	76	1	226	76	1	-	-	-	-	-	-
TMSC48	300	58	0.76	303	71	0.93	306	76	1	-	-	-
TMSC68	560	76	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.2.1.2. *Theileria annulata*/Akçaova A10

Theileria annulata/Akçaova A10 kodlu saha izolatının polimorfik markerler (TS5, TS6, TS8, TS9, TS12, TS15, TS16, TS20, TS25 ve TS31) ile rekombinasyon öncesi yapılan incelemesinde A10 izolatına ait 39 klonun %95'inin tek bir allel ihtiva ettiği belirlenerek tez çalışmasında kullanılmıştır (Çizelge 3.7.). TS6 primerleri ile yapılan PZR sonucunda klonal hücrelerde 430–470 bp arasında bantlara rastlanmıştır, 35. klonda birden fazla bant tespit edilmiş, diğer klonlarda sadece tek bir bant çoğaltılmıştır (Resim 3.9.). TS15 primer çifti ile yapılan PZR sonunda 200–340 bp aralığında bantlara rastlanmıştır, 8 no'lu klonda birden fazla bant elde edilmiş, diğer klonlarda sadece tek bir bant çoğaltılmıştır (Resim 3.9.).





Resim 3.9. *T.annulata*/Ankara D7 ve *T.annulata*/Aova A10 saha izolatından üretilmiş klonal hücre kültürlerine ait DNA örneklerinin polimorfik TS6 (A1–4) ve TS15 (B1–3) markerlerine ait primer çiftleri (Weir, 2006) kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin %10 poliakrilamid jel elektorforezlerine (PAGE) ait görüntüleri. (A1–4); TS6 markerlerine ait primer çiftleri kullanılarak *T.annulata*/Ankara D7 (A1; D7) ile klonlanmamış stok hücre kültürü (A1; A), 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 (A1); 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 (A2); 20, 21, 22, 23, 26, 28, 29 (A3); 30, 33, 35, 36, 39 (A4) numaralı klonlarına ait DNA örnekleri ile elde edilen PZR ürünlerinin %10 PAGE görüntüleri, negatif kontrol (A4;40). (B1–3); TS15 markerlerine ait primer çiftleri kullanılarak *T.annulata*/Ankara D7 (B1; D7) ile klonlanmamış ana hücre kültürü (B1;A); 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12 (B1); 13, 14, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 26, 28, 29 (B2); 30, 33, 35, 36, 39 (B3) numaralı klonlarına ait DNA örnekleri ile elde edilen PZR ürünlerinin %10 PAGE görüntüsü, negatif kontrol (A4;40). Her jelin ilk kuyucuğunda 100 bp’lik referans moleküler boyut belirleyici (M) yer almaktadır.

Çizelge 3. 7. *T.annulata*/Aova A10 kodlu saha izolatlarının klonlanması sonucu elde edilen hücre kültürlerinin polimorfik mini ve mikrosatellit markerler (Weir 2006) ile elde edilen analiz sonuçları

KLON İSMİ ve No'su	POLİMORFİK MARKER KODU (Çoğaltılan aralık; bp)									
	TS5 (200- 300bp)	TS6 (400- 500bp)	TS8 (200- 350bp)	TS9 (300- 400bp)	TS12 (200- 400bp)	TS15 (200- 400bp)	TS16 (300- 400bp)	TS20 (200- 300bp)	TS25 (200- 300bp)	TS31 (200- 400bp)
D7	258	460	300	443	248	271	389	386	258	302
A10 stok	242	447	275	466	300-257	252-203	367	252	278-219	276- 220
A10 klon-1	245	453	273	470	255	256	404	252	222	245
A10 klon-2	247	453	275	456	260	252	404	249	219	245
A10 klon-3	242	453	271	456	262	252	404	252	216	247
A10 klon-4	238	453	267	461	264	256	400	252	219	247
A10 klon-6	240	453	267	466	262	256	404	252	219	243
A10 klon-7	235	447	271	475	272	252	404	252	212	234
A10 klon-8	221	460	273	475	295	340-206	378	256	216	243
A10 klon-10	235	438	275	470	251	252	404	260	227	243
A10 klon-11	231	433	278	470	260	256	413	252	223	225
A10 klon-12	231	433	269	466	262	252	400	260	227	256
A10 klon-13	260	438	275	459	260	243	390	254	227	245
A10 klon-14	260	438	275	459	262	247	400	254	227	245
A10 klon-15	260	433	277	464	264	240	390	247	230	243
A10 klon-16	260	450	275	454	267	237	404	251	223	234
A10 klon-17	263	438	273	450	267	240	390	251	220	267
A10 klon-20	268	444	273	454	271	247	400	251	220	256
A10 klon-21	260	438	271	440	256	243	404	251	219	256
A10 klon-22	268	450	269	440	244	240	380	251	223	275
A10 klon-23	260	444	271	440	254	243	404	243	223	247
A10 klon-26	258	462	271	431	265	243	390	243	227	247
A10 klon-28	255	468	271	431	261	233	400	254	225	247
A10 klon-29	251	468	271	440	267	243	372	243	227	244
A10 klon-30	257	447	269	452	265	241	372	252	227	241
A10 klon-33	257	453	269	452	265	245	338	256	225	232
A10 klon-35	262	515-405- 317	267	452	267	200	338	247	217	256
A10 klon-36	268	453	269	452	263	245	372	256	225	247
A10 klon-39	270	453	267	462	267	249	363	252	235	274

Theileria annulata/Akçaova A10 sporozoit stabilatı ile in vitro ortamda enfekte edilen PBM hücrelerinden dilüsyon yöntemi ile 40 adet klon elde edilmiştir. Klonlardaki muhtemel rekombinasyonun varlığı, kromozomal lokalizasyonu ile varsa fonksiyonu yönlerinden incelemek üzere; klonların her birinden hazırlanan DNA örnekleri kullanılarak polimorfik mini ve mikrosatellit markerlara ait primerler ile yapılan PZR sonuçları ayrı ayrı İncelenmiştir. TS31 haricinde diğer 22 polimorfik marker ile klonlarda en az bir en çok sekiz farklı allel belirlenmiştir (Çizelge 3.8.). TS31 ile yapılan PZR sonrasında yüksek çözünürlüğe sahip jeller kullanılarak yapılan görüntülemelerde bu bölgelerde herhangi bir allel belirlenememiştir. TS5 ile yapılan analizde 270 bp ve 249-270-306 bp büyüklüğünde tekli ve üçlü alleller tespit edilmiştir. 11, 23, 32 ve 36 numaralı klonlarda üçlü alleller belirlenirken diğer tüm klonlarda tek bir allel tespit edilmiştir. TS6 ile yapılan analiz sonrası klonlarda 389, 447-451-457, 376-382-389, 376-382-389-457, 382-389-451-457, 376-382-389-451-457 ve 376-382-389-447-451-457 bp'lik tekli, üçlü, dördü, beşli ve altılı allellerden oluşan 6 farklı allel belirlenmiştir. 389 bp'lik tek allel 24 numaralı klonda, 447-451-457 bp uzunluklarındaki üçlü allel 1, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 20, 22, 25, 27, 28, 30, 31 ve 33 numaralı klonlarda, 376-382-389 bp'lik üçlü allel 2, 5, 9, 15, 17, 18, 21, 23, 26, 29, 34, 35, 37, 39, 40 numaralı klonlarda, 376-382-389-457 bp'lik dördü allel 12 numaralı klonda, 382-389-451-457 bp'lik dördü allel 19 numaralı klonda, 376-382-389-451-457 bp'lik beşli allel 11 numaralı klonda ve 376-382-389-447-451-457 bp'lik altılı allel 32, 36, 38 numaralı klonlarda tespit edilmiştir. TS8 ile yapılan analizde tüm klonlarda 260-278-286 bp'lik üçlü alleller belirlenmiştir. TS9 ile yapılan incelemede tüm klonlarda 355-374 bp'lik ikili alleller tespit edilmiştir. TS12 ile yapılan analizde 279-281, 317-323-327 ve 279-281-317-327 bp'lik ikili, üçlü ve dördü allellerden oluşan 5 farklı allel tespit edilmiştir. 279-281 bp'lik ikili allel 1-5, 7-19, 21-29, 32-37, 39 ve 40 numaralı klonlarda, 317-323-327 bp'lik üçlü allel 6, 20, 30 ve 31 numaralı klonlarda, 279-281-317-327 bp'lik dördü allel 38 numaralı klonda tespit edilmiştir. TS15 ile yapılan analizde 1, 3, 4, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 22, 23, 25, 27, 28, 32, 33 ve 36 numaralı klonlarda hiçbir allel belirlenememiş, geriye kalan tüm klonlarda 258-265 bp'lik ikili alleller tespit edilmiştir. TS16 ile yapılan analizde 2, 5, 6, 9, 15, 17, 18, 20, 21, 24, 26, 29, 30, 31, 34, 35, 37, 38, 39 ve 40 numaralı klonlarda hiçbir allel belirlenememiş, geriye kalan tüm klonlarda 346-354 bp'lik ikili alleller tespit edilmiştir. TS20 ile yapılan analizde tüm klonlarda 231- 250 bp'lik ikili alleller belirlenmiştir. TS25 ile yapılan analizde 11 ve 38 numaralı klonlarda 293 bp'lik tek bir allel

tespit edilirken geriye kalan tüm klonlarda herhangi bir allel tespit edilememiştir. MSC8 ile yapılan incelemede 368 bp'lik ve 363-368 bp'lik tekli ve ikili alleller belirlenmiştir. 363-368 bp'lik ikili allel 1-23 ve 39 numaralı klonlarda tespit edilirken geriye kalan tüm klonlarda 368 bp'lik tek bir allel tespit edilmiştir. MSC19 ile yapılan analizde tüm klonlarda 521-524 bp'lik ikili allel belirlenmiştir. MSC14 ile yapılan analizde 395-405 bp'lik ve 395-405-412 bp'lik ikili ve üçlü alleller belirlenmiştir. 395- 405 bp'lik ikili allel 6, 9-11, 14, 16-19 ve 24-28 numaralı klonlarda tespit edilirken geriye kalan tüm klonlarda 395-405-412 bp'lik üçlü alleller tespit edilmiştir. Tmsc1 ile yapılan analizde tüm klonlarda 296 bp'lik bir allel tespit edilmiştir. Tmsc75 ile yapılan analizde 201-226-238 bp'lik ve 204-230-240 bp'lik üçlü allellerden oluşan 6 farklı allel belirlenmiştir. 201-226-238 bp'lik allel 1-4, 7, 8, 10-16, 19, 22, 23, 25, 27, 28, 32, 33, 36 numaralı klonlarda tespit edilirken geriye kalan tüm klonlarda 204-230-240 bp'lik üçlü allel tespit edilmiştir. Tmsc77, Tmsc86 ve Tmsc33 ile yapılan analizde sırasıyla tüm klonlarda 199-201, 320-330, 194-196 bp'lik ikili alleller belirlenmiştir. Tmsc31 ve Tmsc37 ile yapılan analizlerde tüm klonlarda sırasıyla 236-246-252 ve 237-242-249 bp'lik üçlü alleller belirlenmiştir. Tmsc45 ile yapılan analizde 192-210-216-220, 194-212-220-222 ve 194-212-220-222-228 bp'lik dördü ve beşli allellerden oluşan 8 farklı allel belirlenmiştir. 192-210-216-220 bp'lik dördü allel 2, 5, 8-13, 15, 17, 18, 21, 24, 26, 29, 34, 35, 37, 39, 40 numaralı klonlarda, 194-212-220-222 bp'lik dördü allel 1, 3, 6, 7, 14, 16, 20, 22, 25, 27, 28, 30, 31, 33 numaralı klonlarda, 194-212-220-222-228 bp'lik beşli allel 19, 23, 32, 36, 38 numaralı klonlarda tespit edilmiştir. Tmsc48 ile yapılan analizlerde 22, 23, 33 ve 36 numaralı klonlarda 293 bp'lik bir allel belirlenirken geriye kalan tüm klonlarda herhangi bir allel belirlenememiştir. Tmsc68 kullanılarak yapılan analizde 518-527-550 ve 490-502-518 bp'lik üçlü allellerden oluşan 5 farklı allel tespit edilmiştir. 518-527-550 bp'lik üçlü allel 1-5, 7, 9, 11, 12, 14-19, 21-29 ve 32-40 numaralı klonlarda belirlenirken geriye kalan tüm klonlarda 490-502-518 bp'lik üçlü allel belirlenmiştir.

Çizelge 3.8. Rekombinasyon öncesi A10 hücre kültüründeki ve rekombinasyon sonrası A10 sporozoit stabilatları ile in vitro enfeksiyonu takiben elde edilen klonların genotipik yapıları

Polimorfik Markerler (Rekombinasyon Öncesi)

Klon ID	TS5 (chr-4)	TS6 (chr-4)	TS-8 (chr-3)	TS9 (chr-3)	TS12 (chr-3)	TS15 (chr-1)	TS16 (chr-1)	TS20 (chr-2)	TS25 (chr-4)	TS31 (chr-2)	MSC8 (chr-2)	MSC19 (chr-2)	MSC14 (chr-3)	Tmsc1 (chr-1)	Tmsc75 (chr-1)	Tmsc77 (chr-1)	Tmsc86 (chr-1)	Tmsc31 (chr-2)	Tmsc33 (chr-2)	Tmsc37 (chr-2)	Tmsc45 (chr-3)	Tmsc48 (chr-3)	Tmsc68 (chr-4)
KL-1	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	248-258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	326-330	274	194	244-249	222-228	304-308	527-540
KL-2	265-268	370-376-389-450-460	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	248-258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	320-326-330	274	194	244-249	222-228	293-304-308	527-540
KL-3	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	248-258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	320-326-330	274	194	244-249	222-228	293-304-308	527-540
KL-4	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	248-258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	320-326-330	274	194	244-249	222-228	---	527-540
KL-6	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	248-258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	320-326-330	274	194	244-249	194-222-228	293-304-308	527-540
KL-7	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	248-258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	320-326-330	274	194	244-249	194-222-228	304-308	527-540
KL-8	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	317-374	---	344-350	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	320-326-330	274	194	244-249	194-222-228	293-304-308	527-540
KL-10	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	248-258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	320-326-330	274	194	244-249	194-222-228	293-304-308	527-540
KL-11	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	248-258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	320-326-330	274	194	244-249	194-222-228	293-304-308	527-540
KL-12	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	248-258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	320-326-330	274	194	244-249	194-222-228	304-308	527-540
KL-13	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	248-258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	320-326-330	274	194	244-249	194-222-228	293-304-308	527-540
KL-14	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	248-258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	320-326-330	274	194	244-249	194-222-228	293-304-308	527-540
KL-15	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	248-258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	320-326-330	274	194	244-249	222-228	293-304-308	527-540
KL-16	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	248-258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	320-326-330	274	194	244-249	222-228	293-304-308	527-540
KL-17	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	248-258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	320-326-330	274	194	244-249	222-228	293-304-308	527-540
KL-20	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	248-258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	320-326-330	274	194-196	244-249	222-228	293-304-308	527-540
KL-21	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	248-258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	320-326-330	274	194	244-249	222-228	293-304-308	527-540
KL-22	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	248-258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	320-326-330	274	194	244-249	222-228	293-304-308	527-540
KL-23	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	248-258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	320-326-330	274	194	244-249	222-228	293-304-308	527-540
KL-26	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	248-258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	320-326-330	274	194-196	244-249	222-228	293-304-308	527-540
KL-28	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	320-326-330	274	194-196	244-249	222-228	293-304-308	527-540
KL-29	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	248-258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	320-326-330	274	194-196	244-249	222-228	293-304-308	527-540
KL-30	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	248-258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	320-326-330	274	194-196	244-249	222-228	293-304-308	527-540

Çizelge 3.8. Rekombinasyon öncesi A10 hücre kültüründeki ve rekombinasyon sonrası A10 sporozoit stabilatları ile in vitro enfeksiyonu takiben elde edilen klonların genotipik yapıları, *devamı*

Polimorfik Markerler (Rekombinasyon Öncesi)

Klon ID	TS5 (chr-4)	TS6 (chr-4)	TS8 (chr-3)	TS9 (chr-3)	TS12 (chr-3)	TS15 (chr-1)	TS16 (chr-1)	TS20 (chr-2)	TS25 (chr-4)	TS31 (chr-2)	MSC8 (chr-2)	MSC19 (chr-2)	MSC14 (chr-3)	Tmsc1 (chr-1)	Tmsc75 (chr-1)	Tmsc77 (chr-1)	Tmsc86 (chr-1)	Tmsc31 (chr-2)	Tmsc33 (chr-2)	Tmsc37 (chr-2)	Tmsc45 (chr-3)	Tmsc48 (chr-3)	Tmsc68 (chr-4)
KL-33	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	248-258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	326-330	274	194-196	244-249	222-228	304-308	527-540
KL-35	265-268	450-460	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	---	344-350	240-244-255	217	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	326-330	274	194-196	244-249	222-228	293-304-308	527-540
KL-36	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	248-258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	320-326-330	274	194-196	244-249	222-228	293-304-308	527-540
KL-39	265-268	370-376-389	268-278-283	346-366-374-406	253-271-281	248-258-265	346-354	240-244-255	225-230	244-255-260	378-386	500-513	420	296	238-243	201-204	320-326-330	274	194-196	244-249	222-228	293-304-308	527-540

Polimorfik Markerler (Rekombinasyon Sonrası)

Klon ID	TS5 (chr-4)	TS6 (chr-4)	TS8 (chr-3)	TS9 (chr-3)	TS12 (chr-3)	TS15 (chr-1)	TS16 (chr-1)	TS20 (chr-2)	TS25 (chr-4)	TS31 (chr-2)	MSC8 (chr-2)	MSC19 (chr-2)	MSC14 (chr-3)	Tmsc1 (chr-1)	Tmsc75 (chr-1)	Tmsc77 (chr-1)	Tmsc86 (chr-1)	Tmsc31 (chr-2)	Tmsc33 (chr-2)	Tmsc37 (chr-2)	Tmsc45 (chr-3)	Tmsc48 (chr-3)	Tmsc68 (chr-4)
KL-1	270	447-451-457	260-278-286	355-374	279-281	---	346-354	231-250	---	---	363-368	521-524	395-405-412	296	201-226-238	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	194-212-220-222	---	518-527-550
KL-2	270	376-382-389	260-278-286	355-374	279-281	258-265	---	231-250	---	---	363-368	521-524	395-405-412	296	201-226-238	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	192-210-216-220	---	518-527-550
KL-3	270	447-451-457	260-278-286	355-374	279-281	---	346-354	231-250	---	---	363-368	521-524	395-405-412	296	201-226-238	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	194-212-220-222	---	518-527-550
KL-4	270	447-451-457	260-278-286	355-374	279-281	---	346-354	231-250	---	---	363-368	521-524	395-405-412	296	201-226-238	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	194-212-220-222	---	518-527-550
KL-5	270	376-382-389	260-278-286	355-374	279-281	258-265	---	231-250	---	---	363-368	521-524	395-405-412	296	204-230-240	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	192-210-216-220	---	518-527-550
KL-6	270	447-451-457	260-278-286	355-374	317-323-327	258-265	---	231-250	---	---	363-368	521-524	395-405	296	204-230-240	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	194-212-220-222	---	490-502-518
KL-7	270	447-451-457	260-278-286	355-374	279-281	---	346-354	231-250	---	---	363-368	521-524	395-405-412	296	201-226-238	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	194-212-220-222	---	518-527-550
KL-8	270	447-451-457	260-278-286	355-374	279-281	---	346-354	231-250	---	---	363-368	521-524	395-405-412	296	201-226-238	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	192-210-216-220	---	490-502-518
KL-9	270	376-382-389	260-278-286	355-374	279-281	258-265	---	231-250	---	---	363-368	521-524	395-405	296	204-230-240	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	192-210-216-220	---	518-527-550
KL-10	270	447-451-457	260-278-286	355-374	279-281	---	346-354	231-250	---	---	363-368	521-524	395-405	296	201-226-238	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	192-210-216-220	---	490-502-518
KL-11	249-270-306	376-382-389-451-457	260-278-286	355-374	279-281	258-265	346-354	231-250	293	---	363-368	521-524	395-405	296	201-226-238	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	192-210-216-220	---	518-527-550
KL-12	270	376-382-389-457	260-278-286	355-374	279-281	258-265	346-354	231-250	---	---	363-368	521-524	395-405-412	296	201-226-238	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	192-210-216-220	---	518-527-550
KL-13	270	447-451-457	260-278-286	355-374	279-281	---	346-354	231-250	---	---	363-368	521-524	395-405-412	296	201-226-238	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	192-210-216-220	---	490-502-518
KL-14	270	447-451-457	260-278-286	355-374	279-281	---	346-354	231-250	---	---	363-368	521-524	395-405	296	201-226-238	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	194-212-220-222	---	518-527-550
KL-15	270	376-382-389	260-278-286	355-374	279-281	258-265	---	231-250	---	---	363-368	521-524	395-405-412	296	201-226-238	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	192-210-216-220	---	518-527-550
KL-16	270	447-451-457	260-278-286	355-374	279-281	---	346-354	231-250	---	---	363-368	521-524	395-405	296	201-226-238	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	194-212-220-222	---	518-527-550

Çizelge 3.8. Rekombinasyon öncesi A10 hücre kültüründeki ve rekombinasyon sonrası A10 sporozoit stabilatları ile in vitro enfeksiyonu takiben elde edilen klonların genotipik yapıları, *devamı*

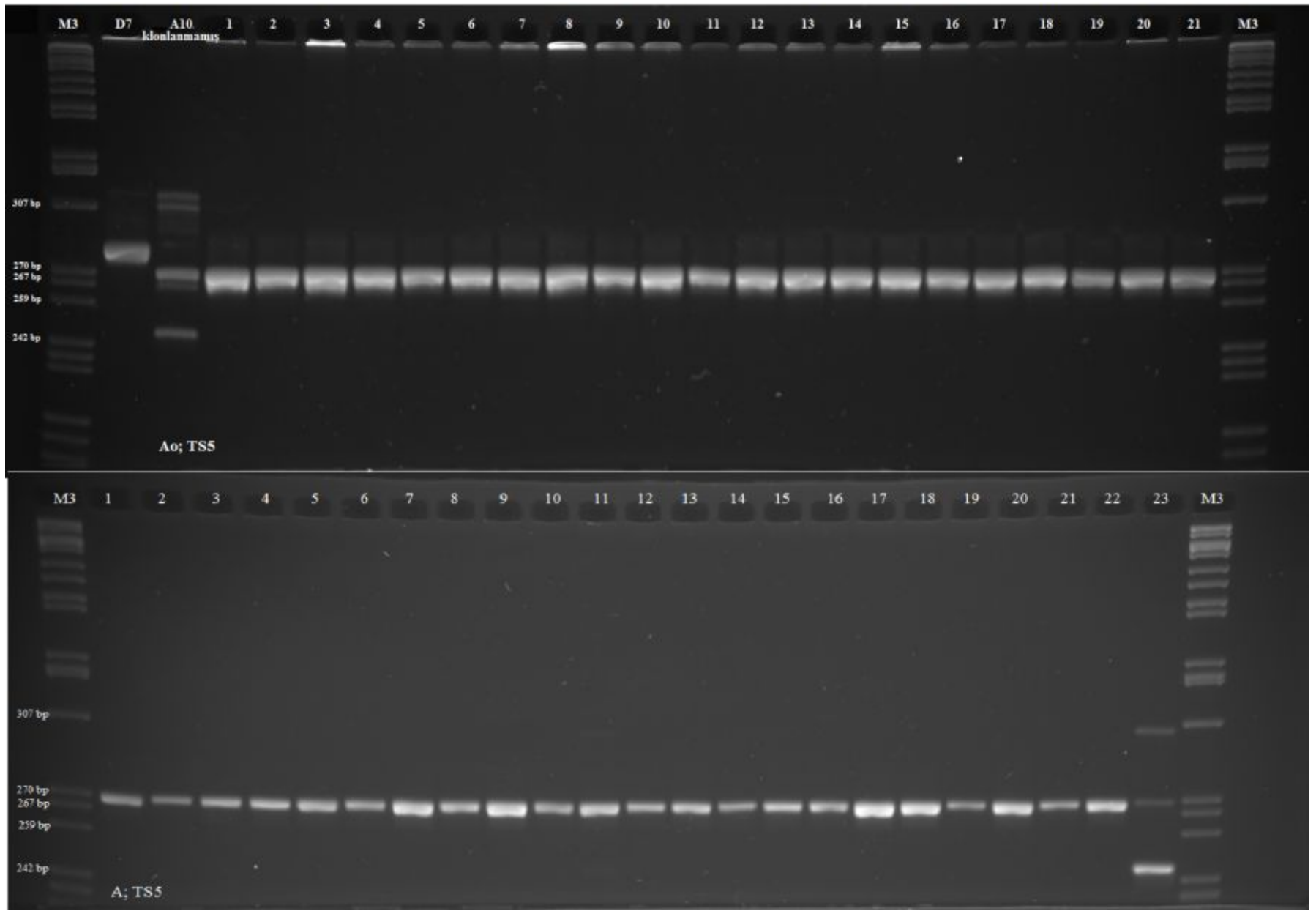
Polimorfik Markerler (Rekombinasyon Sonrası)

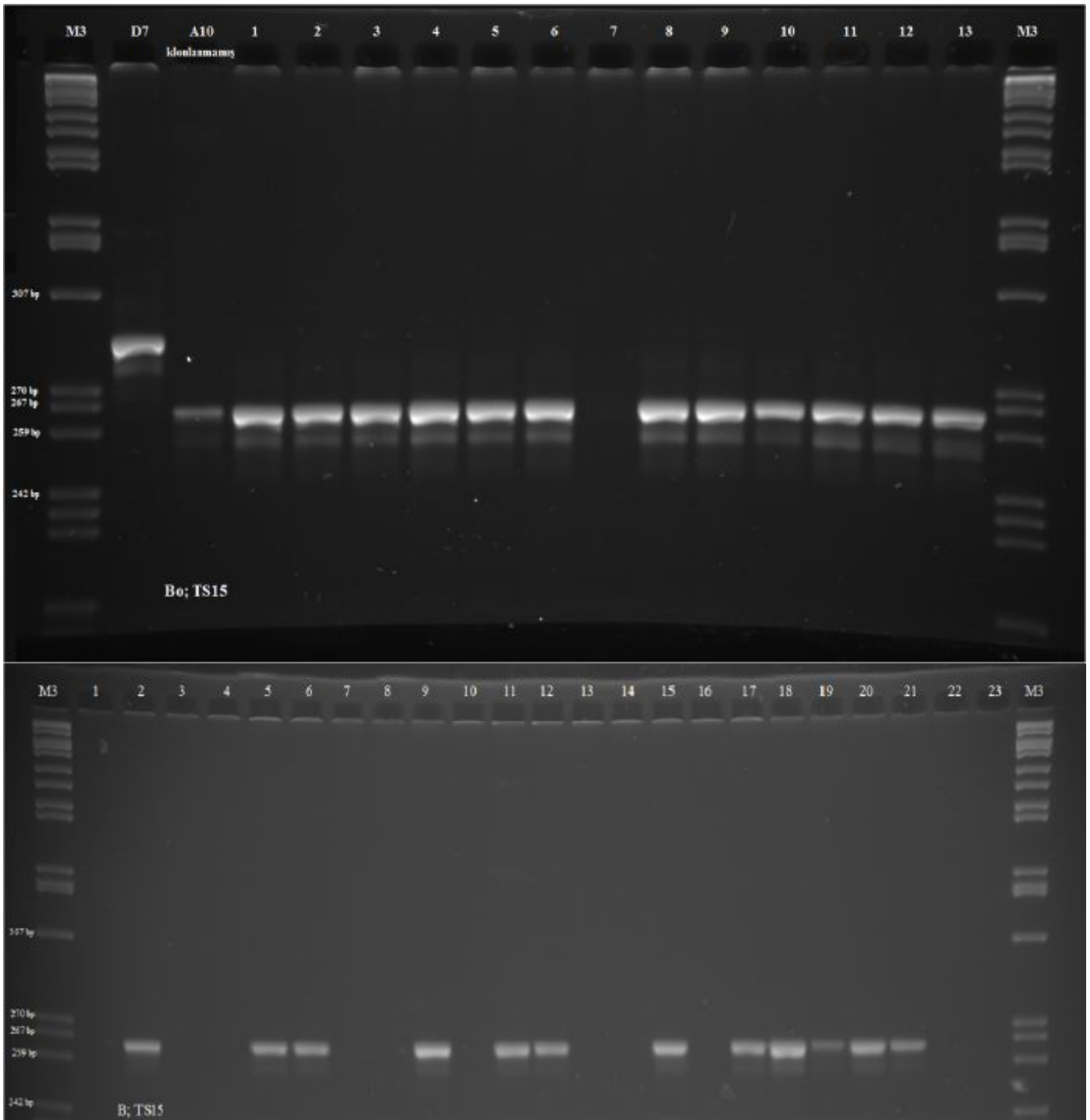
Klon ID	TS5 (chr-4)	TS6 (chr-4)	TS8 (chr-3)	TS9 (chr-3)	TS12 (chr-3)	TS15 (chr-1)	TS16 (chr-1)	TS20 (chr-2)	TS25 (chr-4)	TS31 (chr-2)	MSC8 (chr-2)	MSC19 (chr-2)	MSC14 (chr-3)	Tmsc1 (chr-1)	Tmsc75 (chr-1)	Tmsc77 (chr-1)	Tmsc86 (chr-1)	Tmsc31 (chr-2)	Tmsc33 (chr-2)	Tmsc37 (chr-2)	Tmsc45 (chr-3)	Tmsc48 (chr-3)	Tmsc68 (chr-4)
KL-17	270	376-382-389	260-278-286	355-374	279-281	258-265	---	231-250	---	---	363-368	521-524	395-405	296	204-230-240	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	192-210-216-220	---	518-527-550
KL-18	270	376-382-389	260-278-286	355-374	279-281	258-265	---	231-250	---	---	363-368	521-524	395-405	296	204-230-240	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	192-210-216-220	---	518-527-550
KL-19	270	382-389-451-457	260-278-286	355-374	279-281	258-265	346-354	231-250	---	---	363-368	521-524	395-405	296	201-226-238	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	194-212-220-222-228	---	518-527-550
KL-20	270	447-451-457	260-278-286	355-374	317-323-327	258-265	---	231-250	---	---	363-368	521-524	395-405-412	296	204-230-240	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	194-212-220-222	---	490-502-518
KL-21	270	376-382-389	260-278-286	355-374	279-281	258-265	---	231-250	---	---	363-368	521-524	395-405-412	296	204-230-240	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	192-210-216-220	---	518-527-550
KL-22	270	447-451-457	260-278-286	355-374	279-281	---	346-354	231-250	---	---	363-368	521-524	395-405-412	296	201-226-238	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	194-212-220-222	293	518-527-550
KL-23	249-270-306	376-382-389	260-278-286	355-374	279-281	---	346-354	231-250	---	---	363-368	521-524	395-405-412	296	201-226-238	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	194-212-220-222-228	293	518-527-550
KL-24	270	389	260-278-286	355-374	279-281	258-265	---	231-250	---	---	368	521-524	395-405	296	204-230-240	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	192-210-216-220	---	518-527-550
KL-25	270	447-451-457	260-278-286	355-374	279-281	---	346-354	231-250	---	---	368	521-524	395-405	296	201-226-238	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	194-212-220-222	---	518-527-550
KL-26	270	376-382-389	260-278-286	355-374	279-281	258-265	---	231-250	---	---	368	521-524	395-405	296	204-230-240	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	192-210-216-220	---	518-527-550
KL-27	270	447-451-457	260-278-286	355-374	279-281	---	346-354	231-250	---	---	368	521-524	395-405	296	201-226-238	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	194-212-220-222	---	518-527-550
KL-28	270	447-451-457	260-278-286	355-374	279-281	---	346-354	231-250	---	---	368	521-524	395-405	296	201-226-238	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	194-212-220-222	---	518-527-550
KL-29	270	376-382-389	260-278-286	355-374	279-281	258-265	---	231-250	---	---	368	521-524	395-405-412	296	204-230-240	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	192-210-216-220	---	518-527-550
KL-30	270	447-451-457	260-278-286	355-374	317-323-327	265	---	231-250	---	---	368	521-524	395-405-412	296	204-230-240	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	194-212-220-222	---	490-502-518
KL-31	270	447-451-457	260-278-286	355-374	317-323-327	258-265	---	231-250	---	---	368	521-524	395-405-412	296	204-230-240	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	194-212-220-222	---	490-502-518
KL-32	249-270-306	376-382-389-447-451-457	260-278-286	355-374	279-281	---	346-354	231-250	---	---	368	521-524	395-405-412	296	201-226-238	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	194-212-220-222-228	---	518-527-550
KL-33	270	447-451-457	260-278-286	355-374	279-281	---	346-354	231-250	---	---	368	521-524	395-405-412	296	201-226-238	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	194-212-220-222	293	518-527-550
KL-34	270	376-382-389	260-278-286	355-374	279-281	258-265	---	231-250	---	---	368	521-524	395-405-412	296	204-230-240	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	192-210-216-220	---	518-527-550
KL-35	270	376-382-389	260-278-286	355-374	279-281	258-265	---	231-250	---	---	368	521-524	395-405-412	296	204-230-240	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	192-210-216-220	---	518-527-550
KL-36	249-270-306	376-382-389-447-451-457	260-278-286	355-374	279-281	---	346-354	231-250	---	---	368	521-524	395-405-412	296	201-226-238	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	194-212-220-222-228	293	518-527-550

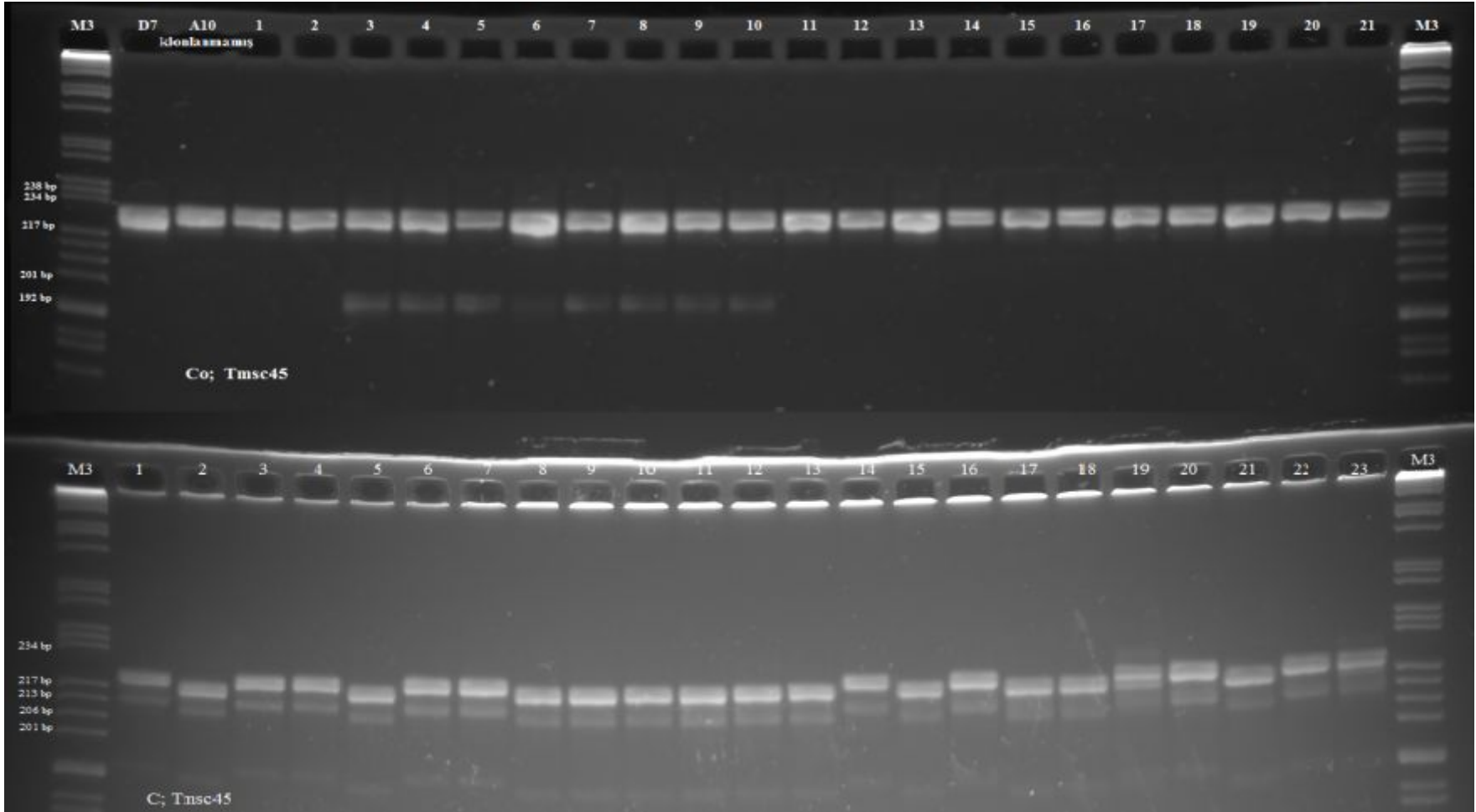
Çizelge 3.8. Rekombinasyon öncesi A10 hücre kültüründeki ve rekombinasyon sonrası A10 sporozoit stabilatları ile in vitro enfeksiyonu takiben elde edilen klonların genotipik yapıları, *devamı*

Polimorfik Markerler (Rekombinasyon Sonrası)

Klon ID	TS5 (chr-4)	TS6 (chr-4)	TS8 (chr-3)	TS9 (chr-3)	TS12 (chr-3)	TS15 (chr-1)	TS16 (chr-1)	TS20 (chr-2)	TS25 (chr-4)	TS31 (chr-2)	MSC8 (chr-2)	MSC19 (chr-2)	MSC14 (chr-3)	Tmsc1 (chr-1)	Tmsc75 (chr-1)	Tmsc77 (chr-1)	Tmsc86 (chr-1)	Tmsc31 (chr-2)	Tmsc33 (chr-2)	Tmsc37 (chr-2)	Tmsc45 (chr-3)	Tmsc48 (chr-3)	Tmsc68 (chr-4)
KL-37	270	376-382-389	260-278-286	355-374	279-281	258-265	---	231-250	---	---	368	521-524	395-405-412	296	204-230-240	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	192-210-216-220	---	518-527-550
KL-38	270	376-382-389-447-451-457	260-278-286	355-374	279-281-317-327	258-265	---	231-250	293	---	368	521-524	395-405-412	296	204-230-240	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	194-212-220-222-228	---	518-527-550
KL-39	270	376-382-389	260-278-286	355-374	279-281	258-265	---	231-250	---	---	363-368	521-524	395-405-412	296	204-230-240	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	192-210-216-220	---	518-527-550
KL-40	270	376-382-389	260-278-286	355-374	279-281	258-265	---	231-250	---	---	368	521-524	395-405-412	296	204-230-240	199-201	320-330	235-246-252	194-196	237-242-249	192-210-216-220	---	518-527-550







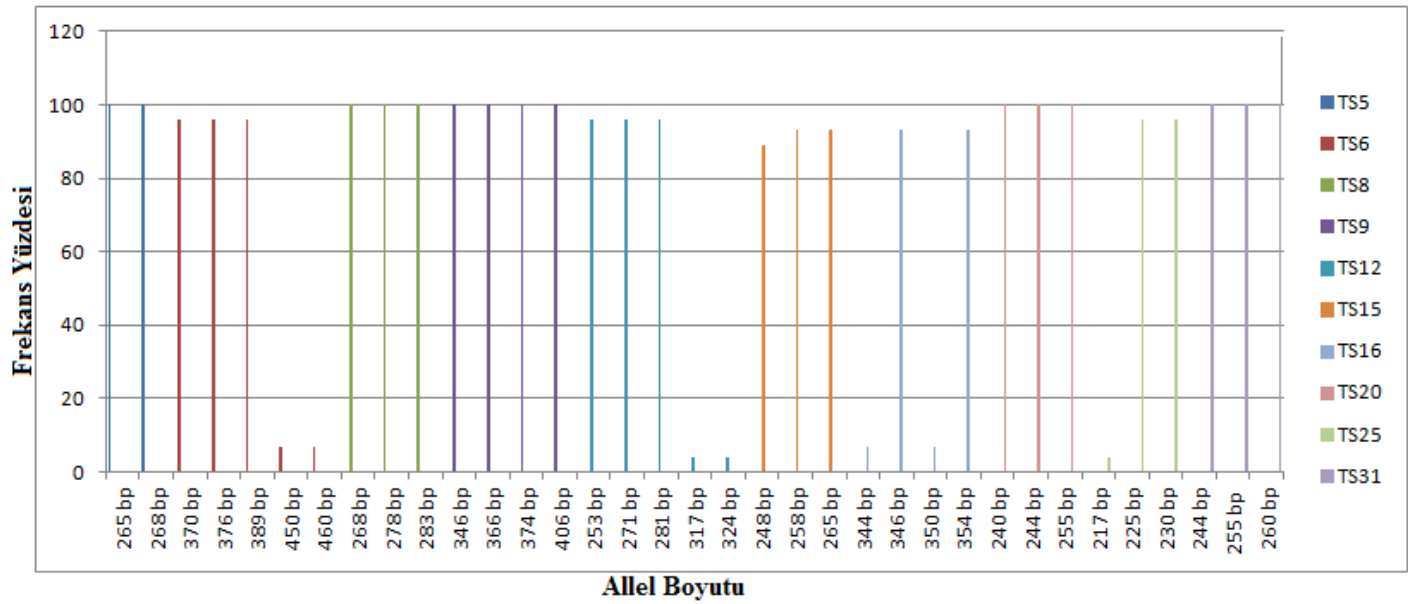
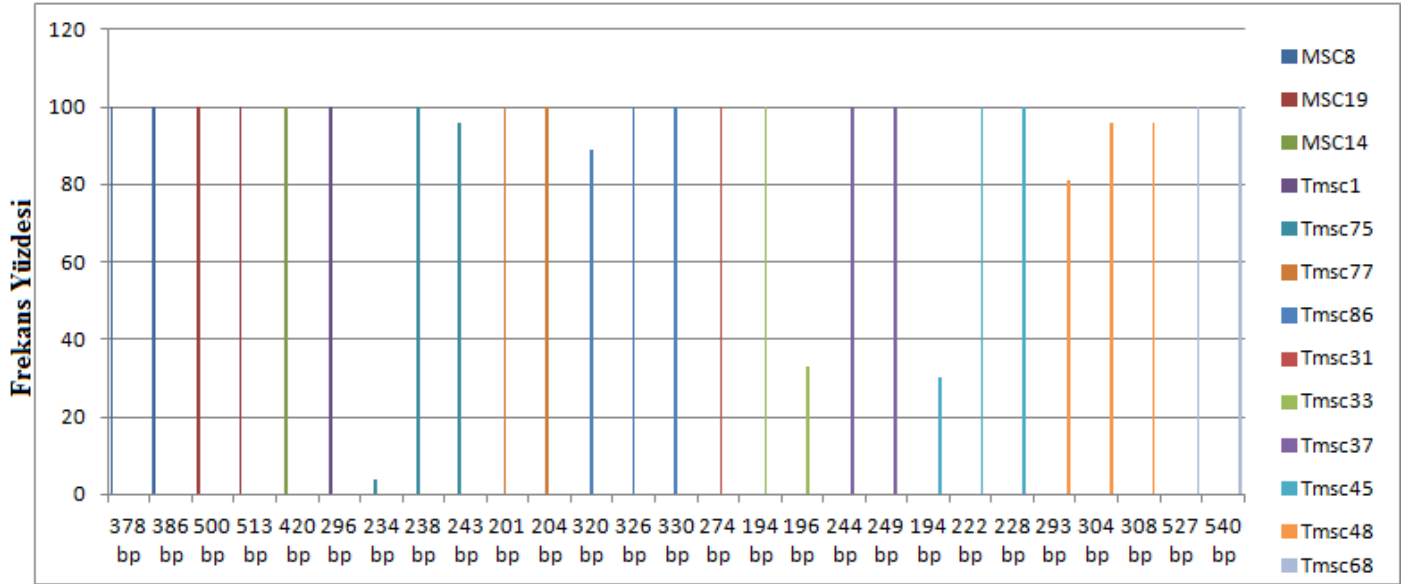
Resim 3.10. A10 klonlarına ait Spreadex jel görüntüleri. A10 sporozoit stabilatları ile invitro enfeksiyonu takiben elde edilen klonal hücre kültürlerine ait DNA örneklerinin TS5 (A), TS15 (B), Tmsc45 (C) ve rekombinasyon öncesi hücre kültüründen elde edilen DNA örneklerinin TS5 (Ao), TS15 (Bo), Tmsc45 (Co) polimorfik markerlerine ait primer çiftleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin Spreadex (Elchrom Scientific™, ABD) görüntüsü. (M); M3 (Elchrom Scientific™) referans moleküler boyut belirleyici. (1-23); 1-23 numaralı A10 klonlarına ait DNA örnekleri

Theileria annulata/Akçaova A10 sporozoit stabilatı ile in vitro ortamda enfekte edilen PBM hücrelerinden elde edilen 40 adet klon ile rekombinasyon öncesi A10 hücre kültüründen elde edilmiş 27 adet klonun genotipik yapıları polimorfik 23 adet mini ve mikrosatellit marker ile belirlenmiştir. Rekombinasyon öncesi ve sonrasında tespit edilen alleller karşılaştırılarak, rekombinasyonun yoğun olduğu kromozomal bölgeler ve varsa bu bölgeler fonksiyonları yönünden incelenmiştir. Birinci kromozom üzerinde yer alan (TS15, TS16, Tmsc1, Tmsc75, Tmsc77 ve Tmsc86) polimorfik markerlardan TS15 ile yapılan analizde rekombinasyon öncesindeki A10 hücre kültüründe 248-258-265 bp'lik üçlü alleller belirlenmiştir. Rekombinasyon sonrasında 248 bp'lik allelin kaybolduğu ve klonlarda 265 bp'lik tekli ve 258-265 bp'lik ikili alleller meydana gelerek popülasyonun yapısının değiştiği tespit edilmiştir (Resim 3.10; B). Rekombinasyon öncesinde ve sonrasında bazı klonlarda hiçbir allel belirlenememiştir. TS16 ile yapılan analizde rekombinasyondan önce A10 hücrelerinde 346-354 bp'lik ikili allel tespit edilmiş ve sadece iki klonda 344-350 bp'lik ikili allel belirlenmiştir. Rekombinasyon sonrasında, öncesinde olduğu gibi 346-354 bp'lik ikili allel tespit edilmiş ve bazı klonlarda hiçbir allel belirlenememiştir. Tmsc1 ile yapılan analizde rekombinasyon öncesinde ve sonrasında 296 bp'lik tek bir allel belirlenmiş ve herhangi bir farklılık tespit edilememiştir. Tmsc75 ile yapılan incelemede rekombinasyondan önce A10 hücrelerinde tüm klonlarda 238-243 bp'lik ikili allel tespit edilirken, rekombinasyondan sonra 201-226-238 ve 204-230-240 bp'lik üçlü allellerden oluşan bir genotip belirlenmiştir. Rekombinasyon sonrasında bir allelin kaybolduğu ve 5 farklı allelin meydana geldiği belirlenmiştir. Tmsc77 ile yapılan analizde rekombinasyon öncesinde tüm klonlarda 201-204 bp'lik ikili allel tespit edilirken, rekombinasyon sonrasında tüm klonlarda 199-201 bp'lik ikili allel tespit edilmiştir. Tmsc86 ile yapılan analizde rekombinasyondan önce 326-330 ve 320-326-330 bp'lik ikili ve üçlü alleller belirlenirken, rekombinasyon sonrası tüm klonlarda 320-330 bp'lik ikili allel belirlenmiştir. Rekombinasyon sonrasında 326 bp'lik allelin kaybolduğu görülmüştür. İkinci kromozom üzerinde yer alan (TS31, TS20, MSC8, MSC19, Tmsc31, Tmsc33 ve Tmsc37) polimorfik markerlardan biri olan TS31 ile yapılan analizde rekombinasyon öncesinde tüm klonlarda 244-255-260 bp'lik üçlü allel tespit edilirken rekombinasyon sonrasında allellerin hepsinin kaybolduğu belirlenmiştir. TS20 ile rekombinasyon öncesinde 240-244-255 bp'lik üçlü allel tespit edilirken, rekombinasyon sonrasında 231-250 bp'lik ikili allel tespit edilmiştir.

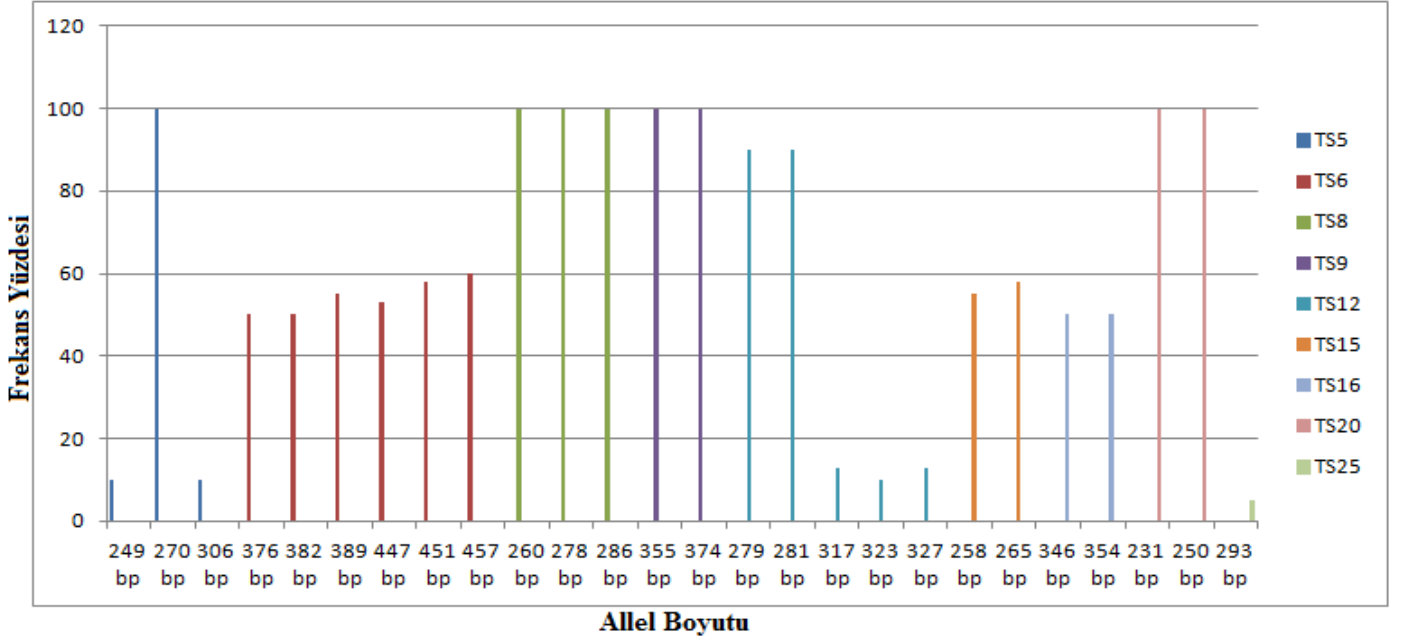
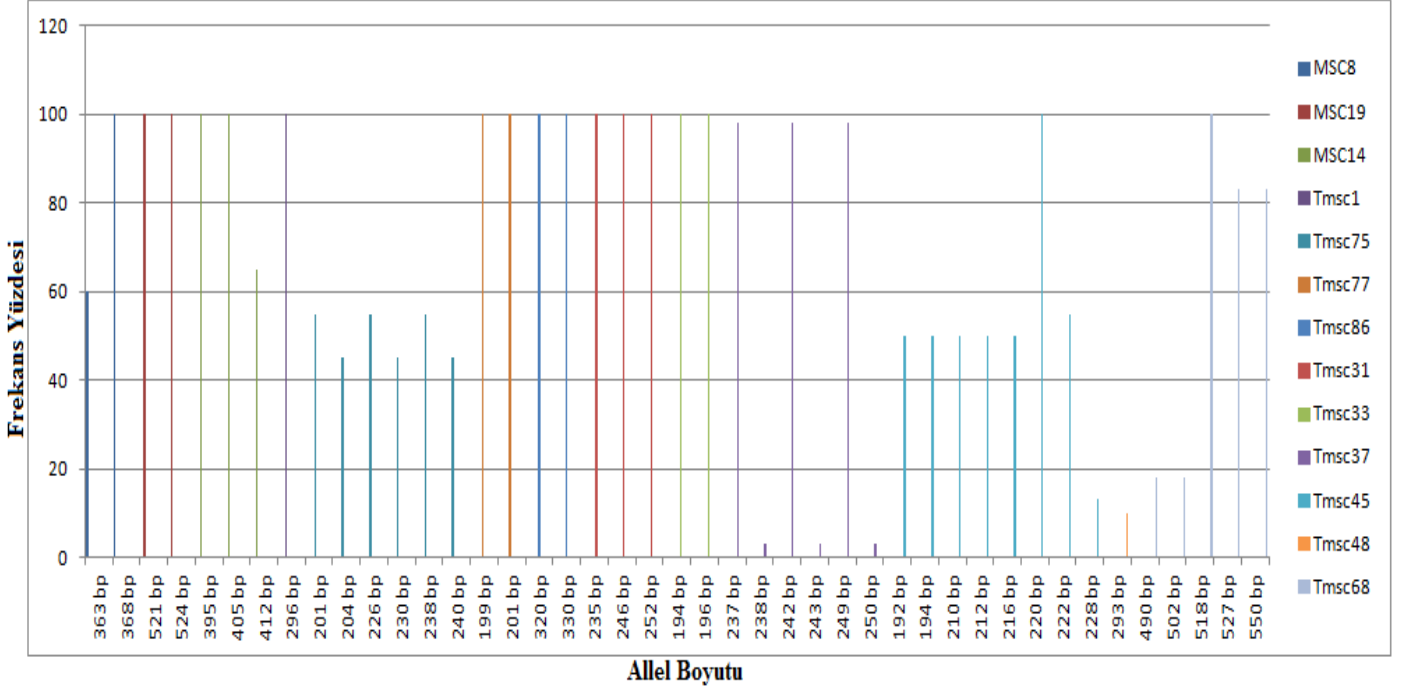
Rekombinasyon öncesinde tespit edilen 3 farklı allel rekombinasyon sonrasında kaybolmuş, yerine 2 farklı allel meydana gelmiştir. Bu bulgular TS20 bölgesindeki yoğun rekombinasyonu göstermektedir. MSC8 polimorfik markeri ile rekombinasyon öncesinde tüm klonlarda 378-386 bp'lik ikili allel belirlenirken, rekombinasyon sonrasında 368 ve 363-368 bp'lik tekli ve ikili alleller belirlenmiştir. MSC19 ile yapılan analizde rekombinasyon öncesinde 500-513 bp'lik ikili allel belirlenirken, rekombinasyon sonrasında tüm klonlarda 521-524 bp'lik rekombinasyon öncesine göre tamamen farklı ikili alleller ortaya çıkmıştır. Tmsc31 ile yapılan analizde, rekombinasyon öncesinde 274 bp'lik allel belirlenirken, rekombinasyon sonrasında 236-246-252 bp'lik üçlü allelin ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Tmsc33 ile rekombinasyon öncesinde 194 bp'lik tekli ve 194-196 bp'lik ikili allel kombinasyonları görülürken, rekombinasyon sonrasında 194-196 bp'lik ikili allel varlığını korumuş ve 194 bp'lik tekli allelin kaybolduğu belirlenmiştir. İkinci kromozom üzerinde yerleşim gösteren son polimorfik marker olan Tmsc37 ile yapılan incelemede rekombinasyon öncesi 244-249 bp'lik ikili allel belirlenirken, rekombinasyon sonrası 237-242-249 bp'lik üçlü alleller belirlenmiştir. Üçüncü kromozom üzerinde yer alan (TS8, TS9, TS12, MSC14, Tmsc45 ve Tmsc48) polimorfik markerlar dan TS8 ile rekombinasyon öncesinde 268-278-283 bp'lik üçlü allel tespit edilirken, rekombinasyon sonrasında tüm klonlarda 260-278-286 bp'lik üçlü alleller belirlenmiştir. TS9 ile yapılan analizde rekombinasyon öncesinde 346-366-374-406 bp'lik dördü allel belirlenirken, rekombinasyon sonrasında 355-374 bp'lik ikili alleller tespit edilmiştir. TS12 ile yapılan analizde rekombinasyon öncesindeki A10 hücre kültüründe bir klon hariç tüm klonlarda 253-271-281 bp'lik üçlü ve kalan bir klonda 317-374 bp'lik ikili allel belirlenirken, rekombinasyon sonrası 279-281, 317-323-327 ve 279-281-317-327 bp'lik ikili, üçlü ve dördü allellerden oluşan 5 farklı allel tespit edilmiştir. Bu bulgular TS12 bölgesindeki yoğun rekombinasyonu göstermektedir. MSC14 ile yapılan analizde rekombinasyon öncesinde 420 bp'lik bir allel belirlenirken, rekombinasyon sonrası yapılan analizde 395-405 bp'lik ve 395-405-412 bp'lik ikili ve üçlü alleller belirlenmiştir. Tmsc45 ile yapılan analizde rekombinasyon öncesinde 222-228 ve 194-222-228 bp'lik ikili ve üçlü alleller belirlenirken, rekombinasyon sonrasında 192-210-216-220, 194-212-220-222 ve 194-212-220-222-228 bp'lik dördü ve beşli allellerden oluşan 8 farklı allel belirlenmiştir (Resim 3.10; C). Tmsc48 ile rekombinasyon öncesinde bir klonda hiçbir allel belirlenemezken iki klonda 304-308 bp'lik ikili allel ve geriye kalan tüm klonlarda 293-304-308 bp'lik üçlü

alleller tespit edilmiştir. Rekombinasyon sonrasında sadece 4 klonunda 293 bp'lik tek bir allel belirlenirken geriye kalan tüm klonlarda hiçbir allel tespit edilememiştir. *T.annulata*'nın dördüncü ve son kromozomu üzerindeki polimorfik markerlarından (TS5, TS6, TS25 ve TMSC68) biri olan TS5 ile yapılan analizde rekombinasyon öncesindeki A10 hücre kültüründe 265-268 bp'lik ikili alleller belirlenmiştir. Rekombinasyon sonrasında bu ikili allelin kaybolduğu ve klonlarda 270 ve 249-270-306 bp'lik tekli ve üçlü alleller meydana gelerek popülasyonun yapısının değiştiği tespit edilmiştir (Resim 3.10; A). TS6 ile rekombinasyon öncesinde tüm klonlarda 370-376-389 bp'lik üçlü allel belirlenirken, rekombinasyon sonrasında 389, 447-451-457, 376-382-389, 376-382-389-457, 382-389-451-457, 376-382-389-451-457 ve 376-382-389-447-451-457 bp'lik tekli, üçlü, dördü, beşli ve altılı allellerden oluşan 5 farklı allel belirlenmiştir. TS25 ile yapılan analizde rekombinasyon öncesinde tüm klonlarda 225-230 bp'lik ikili allel tespit edilirken, rekombinasyon sonrası iki klonunda 293 bp'lik bir allel belirlenmiş ve geriye kalan klonlarda hiçbir allel belirlenememiştir. Tmsc68 ile rekombinasyon öncesinde tüm klonlarda 527-540 bp'lik ikili allel belirlenirken, rekombinasyon sonrası 518-527-550 ve 490-502-518 bp'lik üçlü allellerden oluşan 5 farklı allel tespit edilmiştir.

Kromozom 1 üzerinde bulunan ve bu kromozomdaki en fazla rekombinasyon yoğunluğuna sahip olan TMSC75 markeri ile yapılan analizde klonlardaki rekombinasyon oranı %92,5 olarak belirlenmiştir. Kromozom 2 üzerinde bulunan ve bu kromozomdaki en fazla rekombinasyon yoğunluğuna sahip olan TS20 markeri ile yapılan analizde klonlardaki rekombinasyon oranı %100 olarak belirlenmiştir. Kromozom 3 üzerinde bulunan ve bu kromozomdaki en fazla rekombinasyon yoğunluğuna sahip olan TMSC45 markeri ile yapılan analizde klonlardaki rekombinasyon oranı %80 olarak belirlenmiştir. Kromozom 4 üzerinde bulunan ve bu kromozomdaki en fazla rekombinasyon yoğunluğuna sahip olan TS6 markeri ile yapılan analizde klonlardaki rekombinasyon oranı %83 olarak belirlenmiştir. *Theliera annulata*/Akçaova A10 sporozoit stabilatı ile in vitro ortamda enfekte edilen PBM hücrelerinden elde edilen 40 adet klonun ve rekombinasyon öncesine ait 27 klonun, polimorfik 23 adet mini ve mikrosatellit marker kullanılarak belirlenen tüm allellerin frekans ve frekans yüzdesi bulguları şekil (Şekil 3.5. ve 3.6.) ve tablo (Çizelge 3.9. ve 3.10.) olarak verilmiştir.



Şekil 3.5. Rekombinasyon öncesi A10 saha izolatının klonlarına ait allel frekans dağılımları



Şekil 3.6. Rekombinasyon sonrası A10 sporozoit stabilatları ile invitro enfeksiyonu takiben elde edilen klonlara ait allel frekans dağılımları

Çizelge 3.9. *T. annulata*/Akçaova A10(rö)'a ait allellerin frekans ve frekans yüzdeleri

Mark.	1. Allel			2. Allel			3. Allel			4. Allel			5. Allel		
	(bp)	Frekans	Frekans Yüzdesi	(bp)	Frekans	Frekans Yüzdesi	(bp)	Frekans	Frekans Yüzdesi	(bp)	Frekans	Frekans Yüzdesi	(bp)	Frekans	Frekans Yüzdesi
TS5	265	27	1	268	27	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TS6	370	26	0.96	376	26	0.96	389	26	0.96	450	2	0.07	460	2	0.07
TS8	268	27	1	278	27	1	283	27	1	-	-	-	-	-	-
TS9	346	27	1	366	27	1	374	27	1	406	27	1	-	-	-
TS12	253	26	0.96	271	26	0.96	281	26	0.96	317	1	0.04	324	1	0.04
TS15	248	24	0.89	258	25	0.93	265	25	0.93	-	-	-	-	-	-
TS16	344	2	0.07	346	25	0.93	350	2	0.07	354	25	0.93	-	-	-
TS20	240	27	1	244	27	1	255	27	1	-	-	-	-	-	-
TS25	217	1	0.04	225	26	0.96	230	26	0.96	-	-	-	-	-	-
TS31	244	27	1	255	27	1	260	27	1	-	-	-	-	-	-
MSC8	378	27	1	386	27	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MSC19	500	27	1	513	27	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MSC14	420	27	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMSC1	296	27	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMSC75	234	1	0.04	238	27	1	243	26	0.96	-	-	-	-	-	-
TMSC77	201	27	1	204	27	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMSC86	320	24	0.89	326	27	1	330	27	1	-	-	-	-	-	-
TMSC31	274	27	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMSC33	194	27	1	196	9	0.33	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMSC37	244	27	1	249	27	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMSC45	194	8	0.3	222	27	1	228	27	1	-	-	-	-	-	-
TMSC48	293	22	0.81	304	26	0.96	308	26	0.96	-	-	-	-	-	-
TMSC68	527	27	1	540	27	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 3.10. *T. annulata*/Akçaova A10(rs)'a ait allellerin frekans ve frekans yüzdeleri

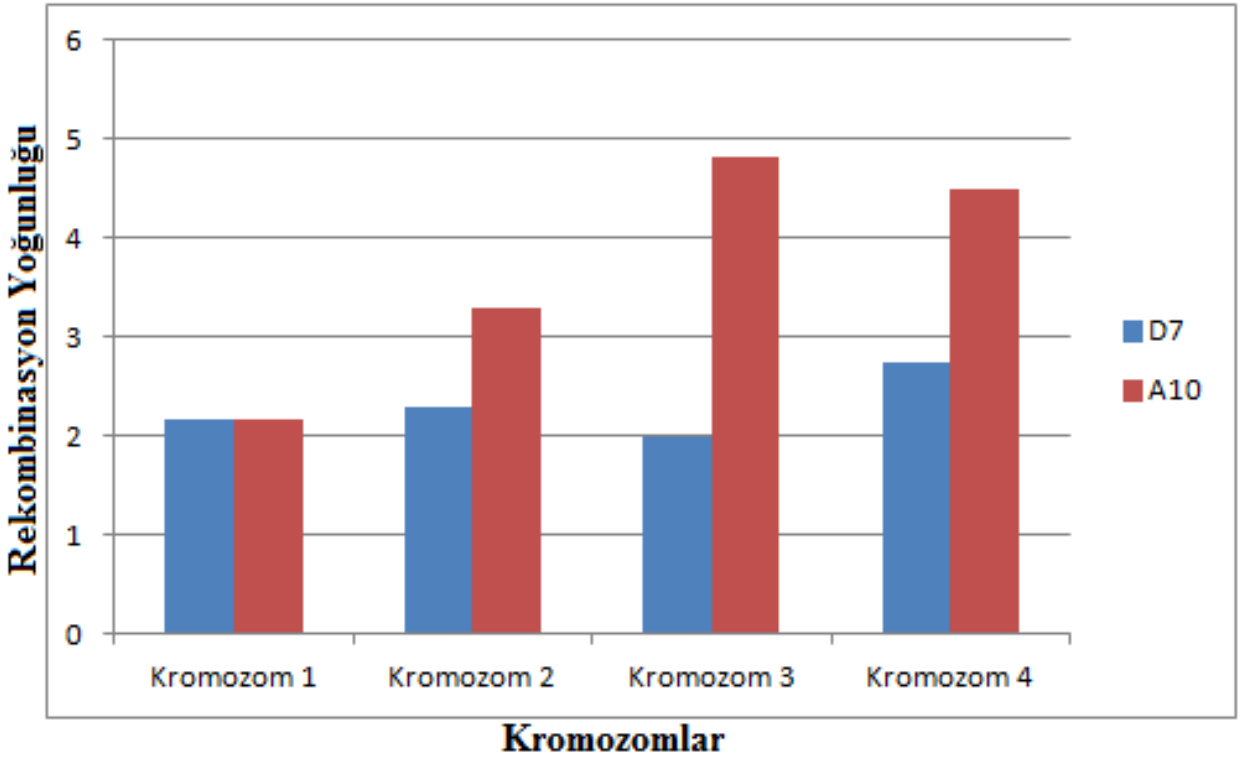
Mark.	1. Allel			2. Allel			3. Allel			4. Allel		
	(bp)	Frekans	Frekans Yüzdesi	(bp)	Frekans	Frekans Yüzdesi	(bp)	Frekans	Frekans Yüzdesi	(bp)	Frekans	Frekans Yüzdesi
TS5	249	4	0.1	270	40	1	306	4	0.1	-	-	-
TS6	376	20	0.5	382	20	0.5	389	22	0.55	447	21	0.53
TS8	260	40	1	278	40	1	286	40	1	-	-	-
TS9	355	40	1	374	40	1	-	-	-	-	-	-
TS12	279	36	0.9	281	36	0.9	317	5	0.13	323	4	0.1
TS15	258	22	0.55	265	23	0.58	-	-	-	-	-	-
TS16	346	20	0.5	354	20	0.5	-	-	-	-	-	-
TS20	231	40	1	250	40	1	-	-	-	-	-	-
TS25	293	2	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TS31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MSC8	363	24	0.6	368	40	1	-	-	-	-	-	-
MSC19	521	40	1	524	40	1	-	-	-	-	-	-
MSC14	395	40	1	405	40	1	412	26	0.65	-	-	-
TMSC1	296	40	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMSC75	201	22	0.55	204	18	0.45	226	22	0.55	230	18	0.45
TMSC77	199	40	1	201	40	1	-	-	-	-	-	-
TMSC86	320	40	1	330	40	1	-	-	-	-	-	-
TMSC31	235	40	1	246	40	1	252	40	1	-	-	-
TMSC33	194	40	1	196	40	1	-	-	-	-	-	-
TMSC37	237	39	0.98	238	1	0.03	242	39	0.98	243	1	0.03
TMSC45	192	20	0.5	194	20	0.5	210	20	0.5	212	20	0.5
TMSC48	293	4	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMSC68	490	7	0.18	502	7	0.18	518	40	1	527	33	0.83

Çizelge 3.10. *T. annulata*/Akçaova A10(rs)'a ait allellerin frekans ve frekans yüzdeleri, *devamı*

Mark.	5. Allel (bp)	Frekans	Frekans Yüzdesi	6. Allel (bp)	Frekans	Frekans Yüzdesi	7. Allel (bp)	Frekans	Frekans Yüzdesi	8. Allel (bp)	Frekans	Frekans Yüzdesi
TS5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TS6	451	23	0.58	457	24	0.6	-	-	-	-	-	-
TS8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TS9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TS12	327	5	0.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TS15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TS16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TS20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TS25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TS31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MSC8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MSC19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MSC14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMSC1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMSC75	238	22	0.55	240	18	0.45	-	-	-	-	-	-
TMSC77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMSC86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMSC31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMSC33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMSC37	249	39	0.98	250	1	0.03	-	-	-	-	-	-
TMSC45	216	20	0.5	220	40	1	222	22	0.55	228	5	0.13
TMSC48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMSC68	550	33	0.83	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.2.2. Kromozomlardaki Rekombinasyon Yoğunluğu

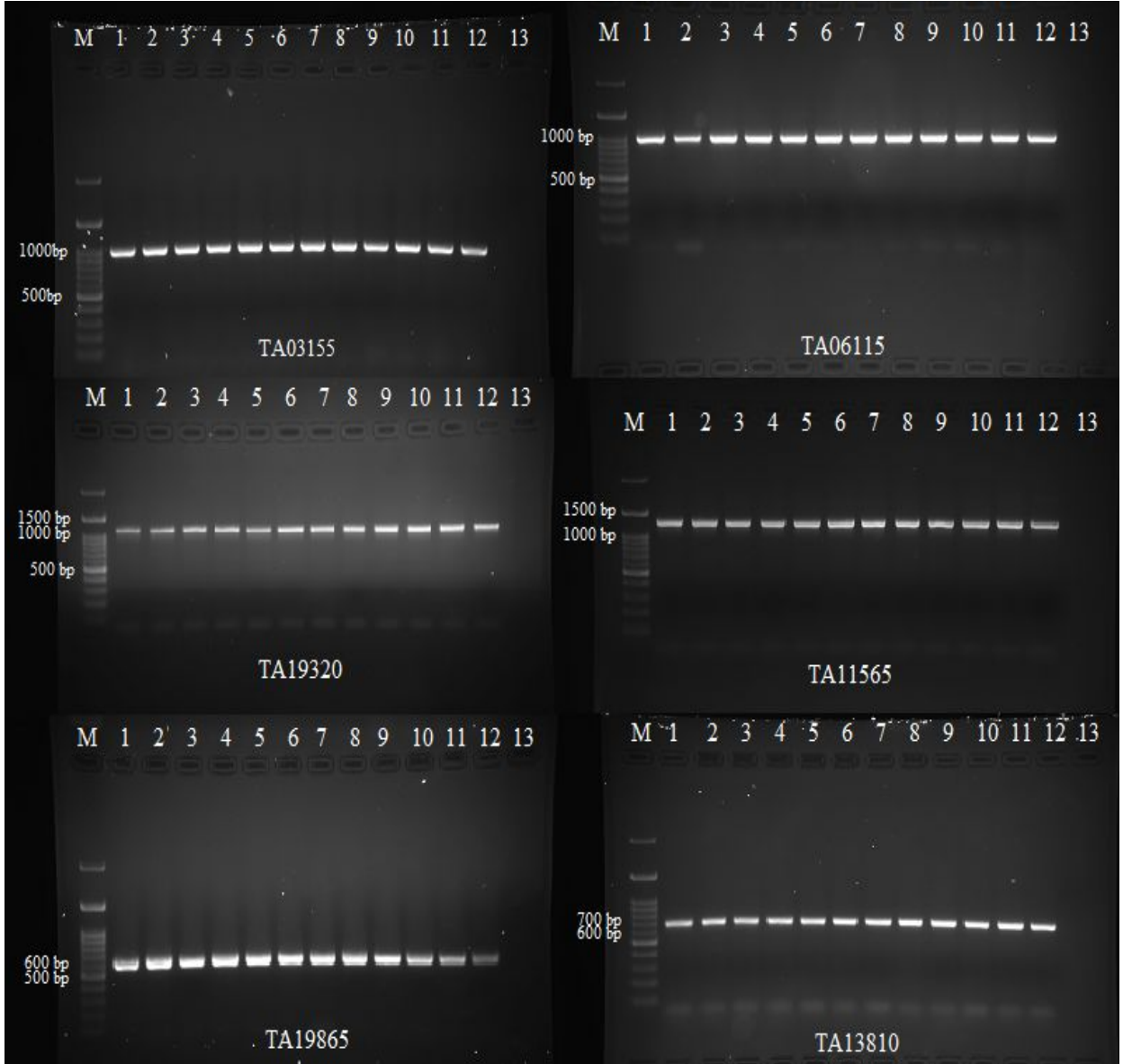
D7 ve A10 izolatlarındaki rekombinasyonun seviyesini belirlemek için; dört kromozom üzerinde yer alan tüm polimorfik markerlarda görülen allel kaybı, yeni allelerin eklenmesi ya da hiç allel görülmemesi gibi değişiklikler değerlendirilerek kromozomlar üzerinde yer alan polimorfik marker sayısına göre sayısal bir oranlama yapılmıştır. Bu oranlamaya göre D7 izolatı için; 1. kromozom: 2.16, 2. kromozom: 2.29, 3. kromozom: 2, 4. kromozom: 2.75 ve A10 izolatı için; 1. kromozom: 2.16, 2. kromozom: 3.29, 3. kromozom: 4.83, 4. kromozom: 4.50 olarak belirlenmiştir. Bu bulguların daha iyi anlaşılması ve sıralamanın ortaya çıkması için grafik olarak sunulmuştur (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. Kromozomlardaki rekombinasyon yoğunluğu

3.3. Antijen Primerlerin Bağlanma Isıları

Antijen primerleri için en uygun bağlanma ısıları, *Theileria annulata*/Ankara C9 DNA'sı kullanılarak yapılan ısı derecelendirmeli (gradient) PZR sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezinde koşulması yoluyla tespit edilmiştir (Resim 3.11). Antijen bölgeleri çoğaltmada kullanılan primerlerin bağlanma ısıları sırasıyla; TA15705 için 50°C, TA06510, TA15710, TA15685, TA15690, TA15695, TA17315, TA17050, TA13810, TA19865, TA03155, TA19320, TA06115, TA14970, TA17545, TA20980, TA03370, TA12105 için 55°C ve TA03755, TA08425, TA11565, TA10060 için 57°C olarak belirlenmiştir. TA16090 için herhangi bir bağlanma ısı belirlenememiştir.



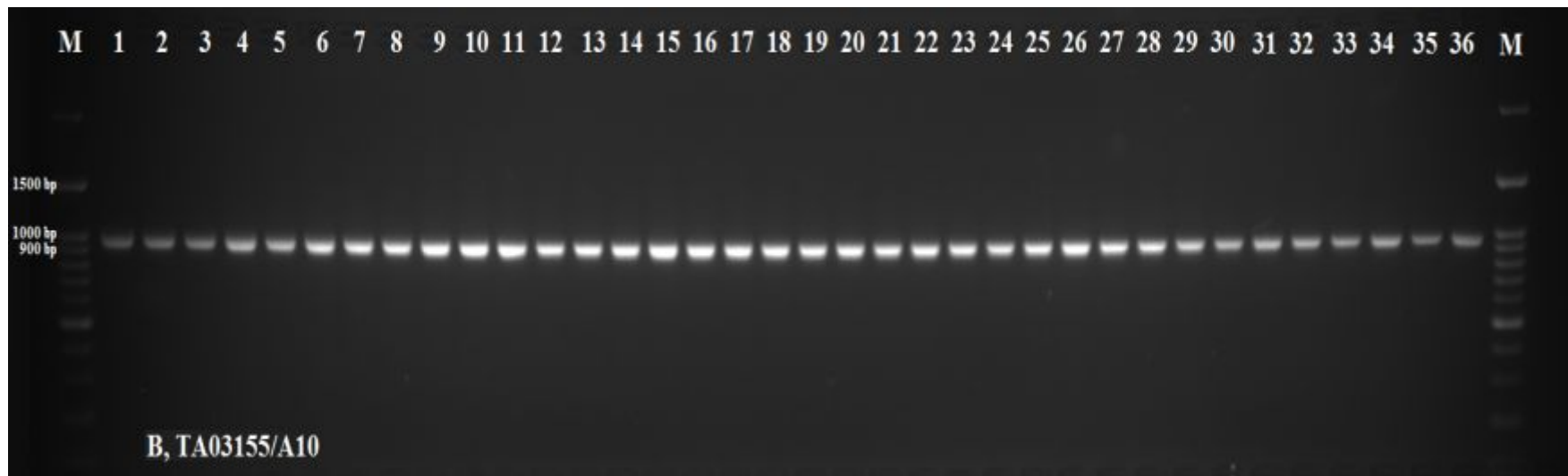
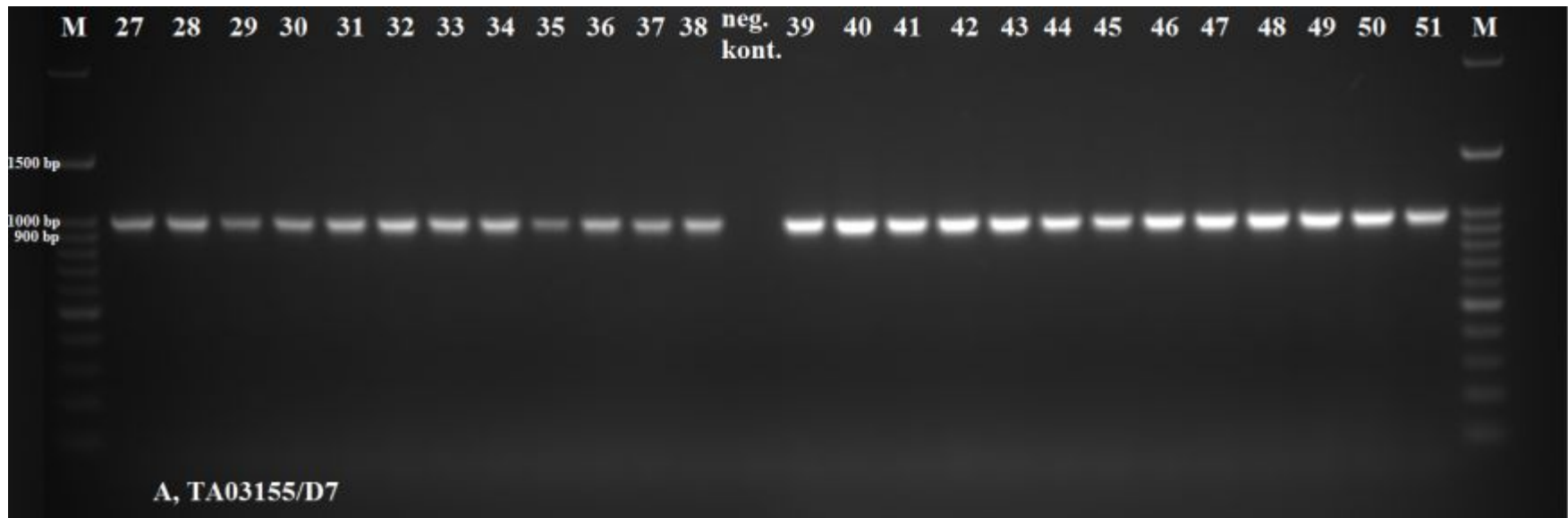
Resim 3.11. Gradient PZR görüntüleri (Antijen bölge). Farklı antijen bölgelerini çoğaltmak amacıyla tasarlanan primer çiftlerinin en uygun bağlanma ısılarının belirlenmesi amacıyla *T.annulata* Ankara C9 DNA örneği kullanılarak yapılan ısı derecelendirmeli (gradient) PZR sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel elektorforezine ait görüntüleri. (M): 100 bp'lik referans moleküler boyut belirleyici (abm, Kanada); 1–12: *T.annulata*/Ankara C9 DNA örneğinin 50,8–59,2°C ısı aralığındaki (55°C'de 10°C'lik derecelendirme) bağlanma ısılarında elde edilen PZR ürünleri; 13: dH₂O (deiyonize su) negatif kontrol

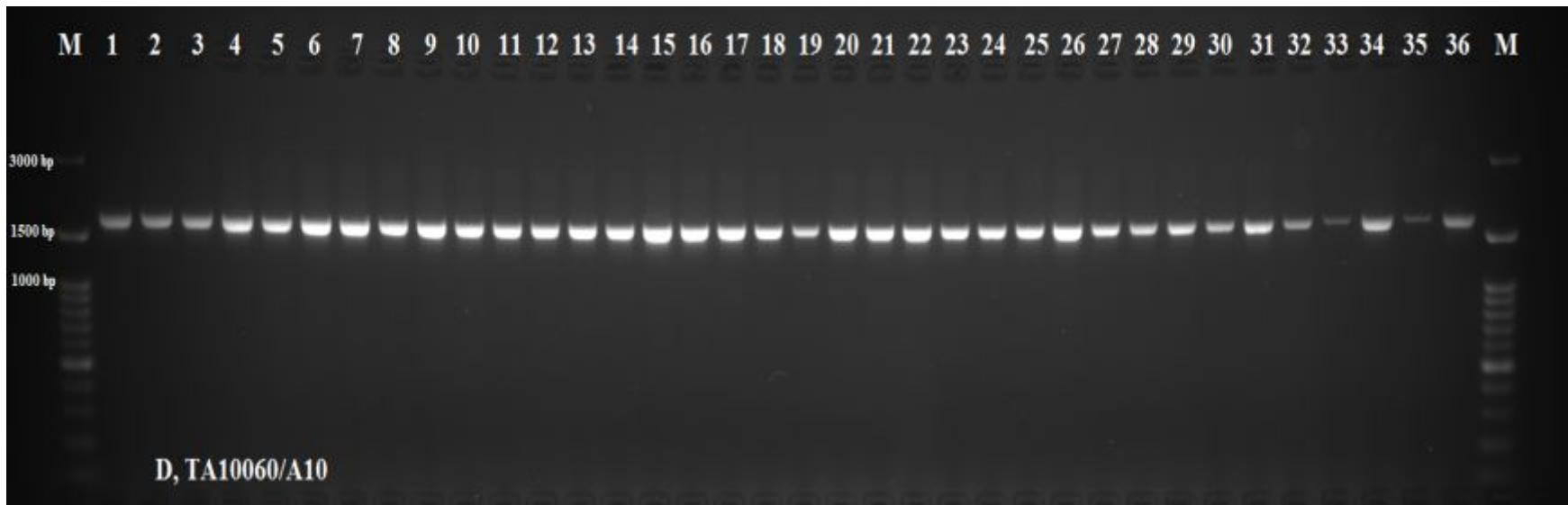
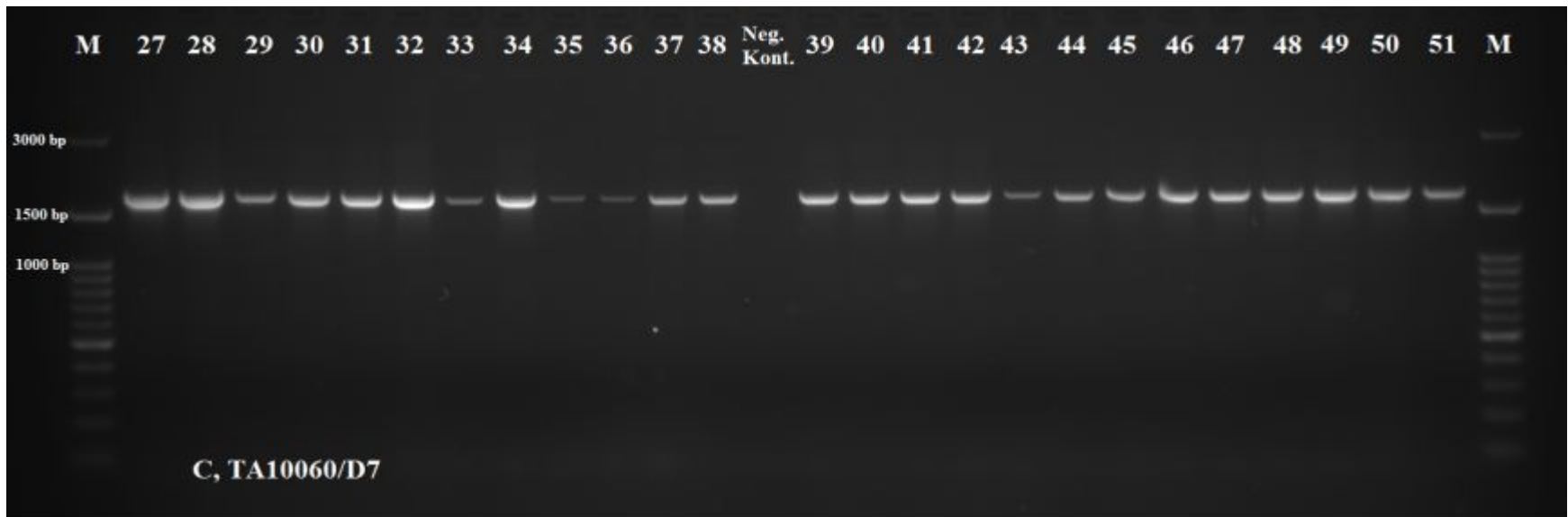
3.4. Antijenlerde Boyut Farklılıkları

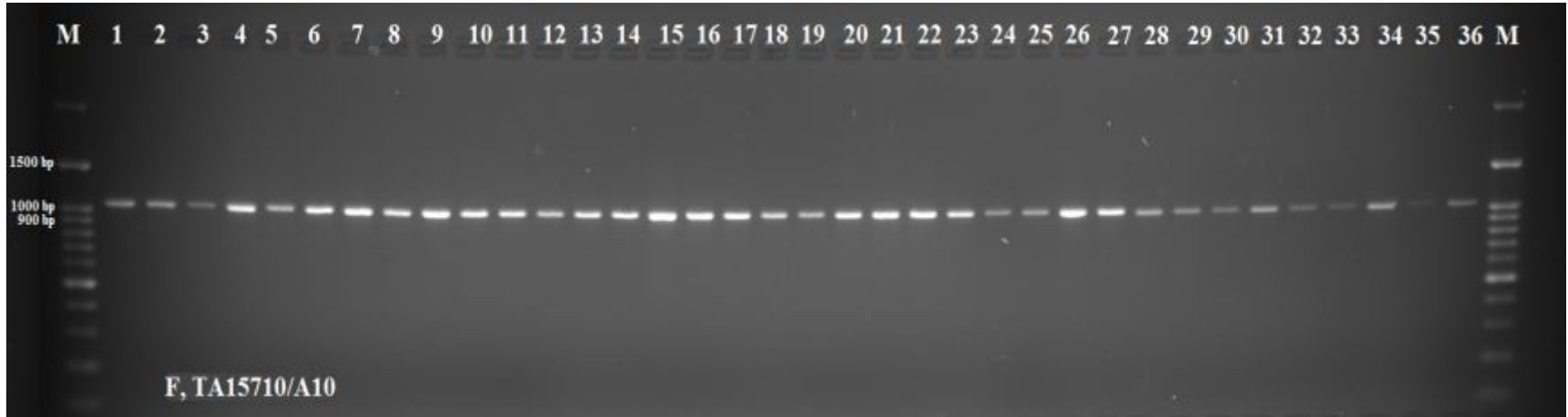
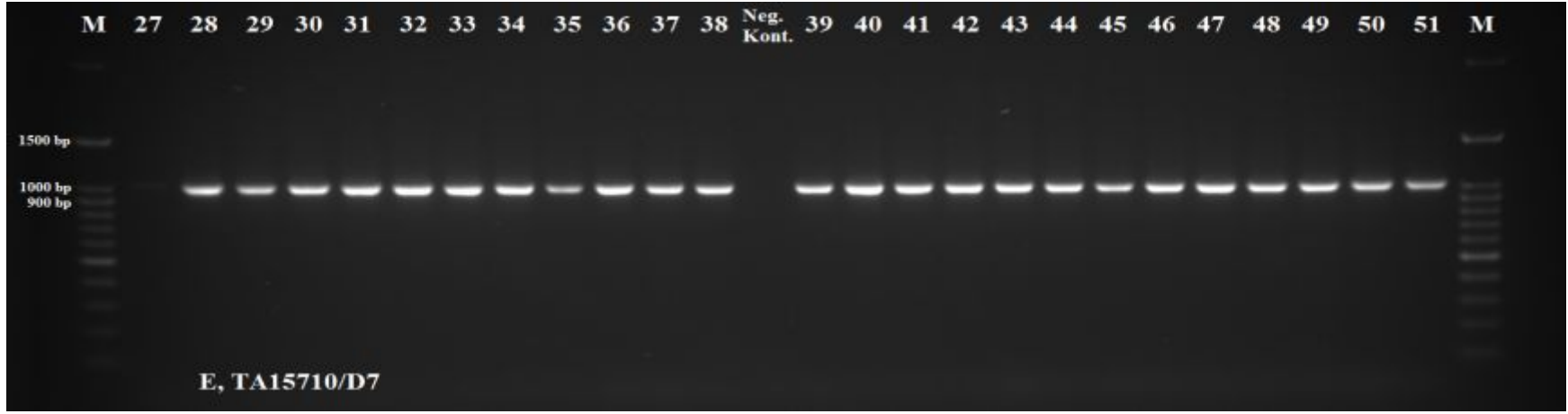
Theileria annulata/Ankara D7 sporozoit stabilatı ile *T.annulata*/Akçaova A10 saha izolatına ait sporozoit stabilatının in vitro ortamda enfekte edilen PBM hücrelerinden elde edilen klonlarıyla, rekombinasyon öncesindeki klonları kullanılarak boyut farklılıklarını belirlemek üzere PZR ile test edilmiş ve %2'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Resim 3.12.). TA15705 ve TA08425 için dizayn edilen primerlerle yapılan PZR sonucunda ilgili antijen bölgesi sekansı iki izolat içinde çoğaltılamamıştır. TA06115 ve TA03370 antijen bölgelerini analiz etmek için yapılan PZR'da ise sadece A10 izolatıyla ilgili bölgeler çoğaltılamamıştır. Elde edilen bulgular tablo şeklinde sunulmuştur (Çizelge 3.11).

Çizelge 3.11. T ve B hücre antijenlerinin çoğaltılan bölge uzunlukları

<i>T.annulata</i> antijenleri	Kodlanan Protein	Antijenite	Çoğaltılan bölge uzunluğu (bp) D7 klonları	Çoğaltılan bölge uzunluğu (bp) A10 klonları	Kaynak
TA06510	hipotetik protein	B hücre	800	800	(Bilgiç 2010)
TA15705	salgisal hipotetik protein	B ve T hücre	---	---	(Bilgiç 2010, Machugh ve ark 2008)
TA15710	salgisal hipotetik protein	B hücre	1020	1020	(Bilgiç 2010)
TA15685	salgisal hipotetik protein	B hücre	740	740	(Bilgiç 2010)
TA15690	salgisal hipotetik protein	B hücre	950	950	(Bilgiç 2010)
TA15695	salgisal hipotetik protein	B hücre	470	---	(Bilgiç 2010)
TA17315	yüzey protein precursor (TaSP)	B hücre	420	420	(Schnittger ve ark 2002)
TA17050	merozoite-piroplasm yüzey antijeni (Tams1)	B hücre	910	910	(Gubbels ve ark 2001)
TA03755	sporozoit yüzey antijeni (SPAG)	B hücre	1470	1470	(Williamson ve ark 1989)
TA08425	<i>T.parva</i> microneme-rhoptry antijeni (Tamr-1)	B hücre	---	---	(İlhan ve ark 1998)
TA13810	ts-chitose type piroplasm yüzey proteini benzeri (MeroI)	B hücre	710	710	(Weir 2006)
TA20980	proline-rich hypothetical protein (NC1)	B hücre	3150	3150	(İlhan 1999)
TA03155	Tash1-benzeri AT-hook proteini	B hücre	990	950	(Bilgiç 2010)
TA19865	öncü salgısal yüzey proteini (d proteini), <i>T.sp</i> China	T hücre	600	600	(Bu tez)
TA06115	hipotetik protein	T hücre	1000	---	(Bu tez)
TA03370	T-complex protein I subunit	T hücre	2650	---	(Bu tez)
TA19320	salgisal, prohibitin homoloğu	T hücre	1145	1145	(Bu tez)
TA12105	heat shock proteini (HSP90)	T hücre	2800	2800	(Bu tez)
TA11565	salgisal, cysteine proteinase	T hücre	1260	1260	(Bu tez)
TA10060	salgisal coronin	T hücre	1700	1700	(Bu tez)
TA14970	traslasyon inhibisyon faktörü eIF-1A	T hücre	840	840	(Machugh ve ark 2011)
TA17545	<i>Theileria</i> 'ya özgü sub-telomeric protein (SVSP)	T hücre	320	320	(Bu tez)







Resim 3.12. Antijen markerlarla %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüleri [*T. annulata*/Ankara D7 sporozoit stabilatı ile *T.annulata*/Akçaova A10 saha izolatına ait sporozoit stabilatının in vitro ortamda enfekte edilen PBM hücrelerinden elde edilen klonlarıyla, rekombinasyon öncesindeki klonları kullanılarak TA03155 (A;D7, B;A10), TA10060 (C;D7, D;A10) ve TA15710 (E;D7, F;A10) %2'lik agaroz jel elektroforezine ait görüntülerdir. A, C ve E' de gösterilen 27-37, 39-51 rekombinasyon sonrası klonları ve 38 numara D7 rekombinasyon öncesi klonudur. B, D ve F' de gösterilen 1-27 rekombinasyon öncesi klonları ve 28-36 rekombinasyon sonrası klonlarıdır. M; 100 bp Plus (abm, Kanada) moleküler boyut belirleyici marker

4. TARTIŞMA

Protozoal bir parazit olan *Theileria annulata* tarafından oluşturulan tropikal theileriosis, sığırlarda görülen ekonomik öneme sahip bir hastalıktır. Tropikal theileriosis, Kuzey Afrika, Güney Avrupa, Hindistan ve Türkiye'nin de içerisinde bulunduğu Orta Doğu ile Asya da ortalama olarak 200 milyon sığırdaki risk oluşturan ve bu bölgelerde yaygın olarak görülen bir hastalıktır (Purnell 1978). Hastalığın şiddeti endemik stabil ve stabil olmayan bölgeler arasında hafif klinik belirtilerden ölümlere kadar değişmektedir. Patogenez asıl olarak, enfekte lökositlerde oluşan proliferasyon ve anemiye bağlıdır. Tropikal theileriosis ile direkt ilişkili olarak hayvanlarda ve dolayısıyla işletmelerde oluşan kayıpları ölüm, verim düşüklüğü, abortlar, veteriner tanı ve tedavi giderleri ile kene mücadelesi için yapılan masraflar oluşturmaktadır (Gharbi ve ark 2006, İnci ve ark 2007, Jonsson ve ark 2008).

Theileria annulata, ixodidae ailesinde yer alan *Hyalomma* soyuna bağlı kene türleri tarafından nakledilen, zorunlu hücre içi parazittir. *T.annulata* hem vektör kenelerde hem de omurgalı konakta birbirinden morfolojik olarak farklılık gösteren gelişme dönemleri geçirir. Parazitin yaşam çemberi, omurgalı konaktaki şizogoni ve merogoni ile ara konak olan vektör kenelerdeki gametogoni ve sporogoni olmak üzere dört temel dönemden oluşur. *T.annulata* genomu sadece kenelerin barsağında geçen kısa bir diploid faz haricinde omurgalı konak olan sığırlarda ve yine kenelerin tükrük bezlerinde haploid yapıdadır. Genotiplendirme belli bir popülasyonu oluşturan bireyler arasındaki polimorfizmlerin ölçülmesi, popülasyonun taşıdığı genetik bilginin ayrımının yapılarak değerlendirilmesinde önem taşımaktadır (Weir 2006). Rekombinasyon; genetik materyalin iki homolog DNA sekansı arasında yer değiştirmesidir. Saha izolatlarından elde edilen örneklerde genetik çeşitliliğin çoğunlukla kenede meydana gelen rekombinasyon sonucunda ortaya çıktığı (Hensen ve ark 2012, Katzer ve ark 2006, Morzaria ve ark 1993, Weir ve ark 2007) ve genetik kayma (Weir ve ark 2010) ve mutasyonlarında (Bishop ve ark 1997) bu çeşitlilikte rolü olduğu belirlenmiştir. Genetik çeşitlilik, parazitlerde çoğunlukla antijenik varyasyonlar ile sonuçlanmaktadır (Deitsch ve ark 2009). Böylece protozoon parazitlerin sahip olduğu genetik çeşitlilik, konaklarının

immunolojik etkilerinden kurtulmalarına, konakları üzerinde canlılıklarını sürdürmelerine ve neden oldukları hastalıklara karşı geliştirilen kontrol mekanizmalarının zamanla çalışmamasına neden olmaktadır. Kısaca, *Theileria* popülasyonlarındaki genetik çeşitlilik bir anlamda bu patojenler tarafından kullanılan bir hayatta kalma stratejisidir. Seksüel çoğalma ile meydana gelen rekombinasyon *Theileria* türlerinde meydana gelen genetik çeşitlilikte büyük bir etkiye sahiptir. *T.annulata* ile enfekte hayvanlardaki piroplazmlar ile enfekte eritrositler keneler için enfektif dönemler olup kenenin kan emmesi esnasında kene barsağına geçerler. Burada lize olan eritrositlerden serbest hale geçen piroplazmlar farklılaşarak erkek ve dişi gametleri oluştururlar. Erkek gamet dişiyi döller ve kene barsağında zigot meydana gelir. Kenede morfolojik olarak tanımlanmış seksüel aşama sonucunda oluşan kinetler (Schein ve Freidhoff 1978) tükrük bezlerine göç ederek sığırlar için enfektif dönem olan sporozoitleri oluştururlar. *T.annulata* ve *T.parva*'nın farklı yaşam dönemlerindeki DNA yapılarının ölçümleri, piroplazmların farklılaşması ile oluşan erkek ve dişi gametlerin kene barsağında birleşmesi ve bunu takip eden iki basamaklı mayoz bölünme sonucunda oluşan haploid yapılı zigotun (Gauer ve ark 1995) farklılaşarak kinet ve sporozoitlere dönüştüğünü göstermiştir. Daha sonraki yıllarda yapılan çaprazlama (Morzaria ve ark 1993) ve sporozoit stabilatları ile oluşturulan deneysel çalışmalarda *T.parva*'da seksüel rekombinasyonun varlığı moleküler düzeyde kanıtlanmıştır (Katzner ve ark 2006). Tams1 geninde meydana gelen intragenik rekombinasyon (Gubbels ve ark 2000) *T.annulata* popülasyonlarındaki seksüel rekombinasyonu destekler niteliktedir. Bunun yanında, *T.annulata*'nın popülasyon genetiği çalışmaları sonucunda parazit popülasyonlarında rastgele birleşmenin olduğu gösterilmiş (Weir ve ark 2007), ancak bu deneysel olarak kanıtlanmamıştır.

Parazit popülasyonlarındaki genetik farklılıkların belirlenmesinde DNA dizileme, zincir sonlandırma, tek kopyalı genlerdeki RFLP analizleri, monoklonal antikorlar, yüzey antijen genlerinin dizilim analizleri ve çoklu kopyaya sahip gen ailelerindeki polimorfizm analizleri ile glikoz fosfat izomeraz (GPI) fenotip analizleri sıklıkla kullanılan teknikler arasında yer almaktadır. Bununla birlikte, izoenzim analizlerinde aynı enzimin varyasyonları olan izoenzimler aynı lokus üzerindeki farklı alleller tarafından kodlanmakta ve amino asitlerindeki yük farklarından dolayı gel elektroforezindeki boyutlarına göre ayrımları yapılabilmektedir. Popülasyon içerisindeki enzimlerin çoğu birbirine benzer yapıda olup, farklı olanlarda da çok az varyasyon gözlenebilmektedir. Bu durum izoenzim analizlerinin genetik farklılıkları

belirlemedeki yetersizliğini gösterse de, belli proteinlerdeki polimorfizimlerin belirlenmesinde ucuz ve kısa sürede sonuçlara ulaşılmasını sağlayabilmektedir. Antijenik özellikteki proteinleri kodlayan gen bölgelerinde oluşan polimorfizimlerin belirlenmesi, aşı çalışmalarında kullanılacak olan subunit aşılara karşı oluşacak bağışık yanıtı bağlı şekillenen pozitif seleksiyon sonucunda meydana gelen polimorfizimler hakkında bilgi sahibi olunmasını sağlamaktadır. Ancak, doğal ortamda konağın bağışık sisteminin etkisi altında parazit popülasyonlarında meydana gelen genomik düzeydeki çeşitlilik hakkında yeterli düzeyde veriye ulaşılmasına imkan sağlamamaktadır. RFLP metodu kullanılarak yapılan çalışmalarda ise elde edilen verilerin genetik açıdan yorumlanması oldukça güçtür. Restriksiyon işlemini takiben oluşan her bant, o bölgede tekrarlayan bölgenin varlığına ve özgün bir restriksiyon bölgesinin bulunmasına dayalıdır ve sonuç olarakta bireylerde gözlemlenen farklı bantlar arasındaki ilişki belirlenmemektedir. Genetik farklılıkların belirlenmesinde polimorfik mini ve mikrosatellit markerler kullanılarak yapılan genotiplendirmeler parazitlerin popülasyon genetiği çalışmalarında kullanılabilir uygun metodlar olarak göze çarpmaktadır. Mini ve mikrosatellit markerler kullanılarak yapılan genotiplendirmeler bireyler arasındaki polimorfizmin ölçülmesi, popülasyonun taşıdığı genetik bilginin ayrımının yapılarak değerlendirilebilmesinde önem taşımaktadır (Weir 2006). Minisatellitler, motiflerin kopya sayıları bakımından, yüksek oranda mutasyona maruz kalan, 7–24 bp'lık kısa sıralı tekrarklı DNA motiflerden oluşan nötral DNA bölgeleridir (Jeffreys ve ark. 1988). Minisatellitlere benzer şekilde, mikrosatellitler nötral polimorfik moleküler markerler olup 2–6 baz çiftinden oluşan daha kısa periyod uzunluğuna sahiptirler. Mikrosatellitlerin çeşitliliğinin nedeni, DNA'nın diğer nötr bölgelerine kıyasla daha yüksek bir mutasyon oranına sahip olmalarıdır. Bu yüksek mutasyon oranı, DNA replikasyonu sırasında bir DNA ipliğinin kayıp diğer iplikle yanlış baz eşleşmesi yapmasından kaynaklanmaktadır. Bu mutasyonların oranı baz yer değiştirmelerine göre önemli oranda yüksektir ve her generasyonda 10^{-2} ve 10^{-6} arasında değişmektedir (Schlotterer 2000). Mayoz bölünme sırasında rekombinasyon yoluyla da bu mutasyonlar meydana gelebilmektedir (Blouin ve ark. 1996). Bu yolla oluşan mutasyonlar genelde minisatellitlerde daha yüksek oranda farklılaşmaya neden olmaktadır. Mini ve mikrosatellit markerler ile genotiplendirmelerde ilgili organizmanın genomik diziliminin bilinmesi açısından önemlidir. Mini ve mikrosatellitler apikompleksa anacında yer alan *T.parva* (Oura ve ark 2003, Odongo ve ark 2006, Katzer ve ark 2011) ve *T.annulata* (Weir 2006, 2007, 2011) genomunda oldukça bol ve yaygındır. Bunun yanında, *T.annulata* genom

diziliminde (Pain ve ark 2005) yer alan kromozomların dizilimlerinin bütün olarak belirlenmesi ve annotate edilerek veri tabanlarına kaydedilmesi mini ve mikrosatellit markerlerin tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Mini ve mikrosatellit markerler, buldukları dizilimi çevreleyen korunmuş bölgelere özgü primerler tasarlanarak PZR yoluyla çoğaltılıp %2'lik agaroz jel, yüksek çözünürlükteki jeller ya da bir baz çiftine kadar ayrımı sağlayan kapillar tabanlı dizilim cihazları ile belirlenebilmektedir (Oura ve ark 2003, Odongo ve ark 2006, Katzer ve ark 2011, Weir 2006). Bu sistemler, birbirleriyle oldukça yakın genotiplere sahip heterojen yapıdaki izolatların ayrımı ve popülasyon yapılarının belirlenmesinde başarıyla kullanılmaktadır (Weir 2006). Genotiplendirmede kullanılacak markerlerin belirlenmesinde bir diğer önemli nokta da parazitin farklı izolatlarına ait DNA örneklerinin çoğaltılarak, bunlar arasındaki polimorfizmin belirlenebilmesi ve aynı zamanda belirlenen markerleri çoğaltacak primerlerin tasarlanmasına olanak veren bölgelerin bulunmasıdır (Weir 2006). Multilokus genotiplendirmede popülasyon içerisinde yer alan sekonder ve tersiyer allellerin PZR ile çoğaltılabilir olması da önemlidir. PZR'un optimizasyonu bize parazit popülasyonunda yer alan allellerin çoğaltılarak yüksek rezolüsyona sahip gel elektroforez yöntemiyle ayrımına olanak vermektedir. Bu tez kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar yüksek rezolüsyona sahip jellerin incelenen ilgili popülasyonun genotipik yapısı hakkında oldukça güvenli ve kolay anlaşılabilir sonuçlar vermiştir. Bunun yanında popülasyon içerisinde sadece primer allellerin değil aynı zamanda sekonder ve tersiyer allellerinde belirlenebilmesine olanak sağlamıştır.

Multilokus genotiplendirme (MLG) analizleri, son yıllarda farklı parazitlere ait genom dizilimlerinin sekanslanarak veri tabanlarında kayıt altına alınması ve bu veri tabanlarının biyoinformatik yollarla incelenerek polimorfik mini ve mikrosatellit markerlerin belirlenebilmesi ile hız kazanmıştır. Farklı organizmalara ait genom dizilimlerinin belirlenerek veri tabanlarına kaydedilmesi genom içerisinde yer alan tekrarlı bölgelerin hızlı ve ucuz şekilde belirlenebilmesine büyük katkı sağlamıştır. Genom dizilimlerinin varlığı tekrarlı bölgelerin çoğunun karşılaştırmalı olarak belirlenmesine olanak sağlayan farklı algoritmalar kullanan Tandem repeat finder, Sputnik, TROLL, Unipro UGENE gibi çok sayıda yazılım geliştirilmesini sağlamıştır (Merkel ve ark 2008). Bunların arasında satellite markerlerin belirlenmesinde sıkça kullanılan tandem repeat finder programı (Benson 1999) bilgisayarın masa üstünde işlem yapılmasına izin vermesine rağmen programa yüklenen gen bölgelerinde

belirlenen tekrarlı bölgelerin sonuçlarına internet ortamında ulaşılabilmekte, her bölgenin analizi tek tek yapılarak son derecede uzun sürmekte, her seferinde internet bağlantısına ihtiyaç duyulmakta ve verilerin tekrar tekrar incelenmesini gerektirmektedir. Son yıllarda biyoinformasyon alanında yaşanan ilerlemeler sayesinde bu alanda kullanılan programların yerine aynı işlemleri uygulayabildiğiniz, fakat daha gelişmiş ve tüm uygulamaların aynı anda görülebildiği, bilgisayarınızın masa üstünde rahatça kurulumu yapılarak kullanılabilen ve her seferinde internete bağlanma ihtiyacı duyulmayan daha etkin ve gelişmiş yeni programlar ortaya çıkmaktadır. Bu tezde, rekombinasyon sonrasında *T.annulata* popülasyonlarında oluşacak genetik çeşitlilik ile rekombinasyonun yoğun olduğu kromozomal bölgelerin belirlenmesi amacıyla daha önce yapılan çalışmalarda kullanılmış mini ve mikrosatellit markerlere (Weir ve ark 2007, 2010) ilave olarak geliştirilen 13 yeni polimorfik mini ve mikrosatellite markerlerin belirlenmesinde gerek kullanım rahatlığı gerekse de incelenecek genom dizilimi ile tekrarlı bölgelerin eş zamanlı olarak aynı programın farklı sayfalarında görülebilmeye ve verilerin daha kısa sürede, daha etkin olarak analizine olanak sağlayan Unipro UGENE ver.1.9.7 programı (Okenechnikov ve ark 2012) kullanılmıştır. Kullanılan biyoinformatik programların sağladığı kolaylıkların yanında dikkat edilmesi gereken bir diğer önemli noktada programda kullanılacak olan parametreler ile gen dizilimleri incelenirken gerçek bir tekrarlı bölgelerin (TR) bölgenin nasıl tanımlandığıdır. Az sayıda tekrarlı birimden oluşan bazı az sayıdaki tekrarlar biyolojik olarak uygun olmayabilir. Örnek olarak; 'GTACGTAC' gibi bir tekrar genom içerisinde sadece şans eseri çok sayıda tekrarlanmış olabilir, ancak bu onun uygun tekrarlı bir bölge olduğunu göstermemektedir. Aynı zamanda, tekrarlı bölgelerde görülen tek nükleotit (Ör; GTACGCAC gibi) değişimleri o bölgenin kusurlu ya da eksik olmasına neden olmakta ve TR'lerin belirlenmesini karmaşık hale getirmektedir. Bu sebeplerle bir dizilimin tekrarlı bir bölge olarak tanımlanması için gerekli minimum kriterleri taşımasını sağlayacak bir eşik değerin (cut-off) belirlenmesini gerekli kılmaktadır (Gemayel ve ark 2010). TR'lerin belirlenmesinde kullanılan eşik değerler içerisinde tekrarlı birim sayısı, tekrarlı birimin uzunluğu, farklı tekrarlı alanlardaki motiflerin benzerliği gibi tekrarların farklı karakteristik özellikleri yer almaktadır. Bununla birlikte, yapılan skorlamalar kullanılan farklı algoritmalara (dolayısıyla programlara) göre değişkenlik göstermektedir. Genomik DNA dizilimlerinde tekrarlı bölgelerin belirlenmesinde kullanılan en etkin yöntemlerden birisi aynı uzunluk ve kompozisyona sahip rastgele karıştırılmış dizilimlerin farklı parametreler kullanılarak algoritmalarının karşılaştırılmasıdır. Bu sayede

genom dizilimi tekrarlı bölgeler yönünden çok sayıda farklı eşik değeri kullanılarak taramaktadır. Daha sonra rastgele karıştırılmış dizilimlerde elde edilen sonuçlar gerçek DNA dizilimi kullanılarak elde edilenler ile karşılaştırılıp, gerçek DNA diziliminde 10 kat fazla TR belirleyen skor eşik değeri olarak kullanılabilir (Gemayel ve ark 2010). *T.annulata* genom diziliminde kullanılacak olan eşik değerlerde anlatılan bu yöntem kullanılarak belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar ile yöntemin güvenilirliği ve kullanım kolaylığı tasdik edilmiştir. Mini ve mikrosatellitler apikompleksa anacında yer alan *T.parva* (Oura ve ark 2003, Odongo ve ark 2006, Katzer ve ark 2011) ve *T.annulata* (Weir 2006, 2007, 2011) genomunda oldukça bol ve yaygındır. Unipro UGENE ver.1.9.7 programı kullanılarak yapılan tarama sonucunda 359 minisatellite (7-50 nt) ve 8973 mikrosatellite (1-6 nt) bölge belirlenmiştir. Yapılan analizlerde daha önceki çalışmalara (Weir 2006, 2007, 2011) benzer şekilde sayısal olarak beklenenden fazla miktarda tekrarlı bölge belirlenmiştir. *T.annulata* gibi gen bölgelerinin yoğun olduğu genomlarda protein kodlamayan bölgelerle ilişkilendirilen ve normalde sayılarının nispeten az olması beklenen satellite tekrarlı bölgeler (Pain ve ark 2005) ökaryotik genomlardaki yapıya benzer şekilde yaklaşık olarak her 900 bp'da bir tane tekrarlı bölge olacak şekilde sayılarının beklenenden fazla olduğu görülmüştür.

Unipro UGENE ver.1.9.7 programı ile elde edilen veriler incelendiğinde farklı uzunluklara sahip tekrarlı motifler (TR) içeren minisatellite bölgelerin büyük çoğunluğu (%87,5) protein kodlamayan bölgelerde yerleşim göstermiş ve bu gen bölgelerindeki GC miktarları ile motif uzunlukları birbirleri ile doğrusal orantılı olarak artmıştır. Bunun yanında belirlenen mikrosatellite bölgelerin bir kısmının (23 adet; 18 exon ve 5 intron) hipotetik protein kodlayan gen bölgeleri, geriye kalanlar ise membran, integral membran, serinden zengin, Sfi, protein kinaz, SVSP, DNA'ya bağlanan vb. özellikteki proteinleri kodlayan bölgelere ait exon ve intronlar üzerinde, az bir kısımda intergenik bölgede (IGR) yerleşim göstermektedir. Tandem tekrarlar protein kodlayan gen bölgelerinde ve transkripsiyon faktörleri gibi özel regülatör proteinlerin bağlandığı regülatör bölgelerde yer alabilmektedir (Legendre ve ark 2007, Li ve ark 2002). İnsan genomundaki genlerin yaklaşık %17'si protein kodlayan gen bölgeleri içerisinde yer almış DNA tekrarları içermektedir. Ayrıca, maya (*Saccharomyces cerevisiae*), bitki (*Arabidopsis thaliana*), solucan (*Caenorhabditis elegans*), sinek (*Drosophila melanogaster*) (Gemayel ve ark 2010) ve *Theileria annulata* (bu tez) gibi farklı organizmalar arasında da bu oran %12–21 arasında değişmektedir. Protein kodlayan gen

bölgelerinde yer alan tekrarlı bölgeler genelde tri ve hexonükleotit gibi üç ve katlarında sayılara sahip tekrarlı birimlerden oluşmaktadır. Muhtemelen bu durumun üç ve katlarında nükleotit içermeyen tekrarlı bölgelerde sıkça görülen çerçeve kayması mutasyonlarına (frameshift mutasyonu) karşı oluşan seleksiyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Legendre ve ark 2007). Tekrarlı bölgeler tüm kategorilerdeki genlerde tek düze halde görülmemektedir. Örnek olarak; insan genomunda biyolojik fonksiyonlardan sorumlu bir kısım genlerin TR'lerden zengin olduğu, mayalarda mikrosatellitlerin transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler üzerinde, minisatellitlerin de hücre duvarı ile ilintili genler üzerinde yer aldığı bilinmektedir (Legendre ve ark 2007, Gemayel ve ark 2010). *T.annulata* genomunda belirlenen minisatellite bölgelerden iki tanesinin exon üzerinde yerleşim gösterirken bunlardan birinin 12 nt (MSC22), diğerinin ise 21 nt (MSC25) içerdiği görülmüştür. Minisatellite bölgelerden MSC22 SVSP protein ailesinde yer alan Theileria-spesifik sub-telomerik protein, MSC25 ise hipotetik (kuramsal) protein bölgesi üzerinde yer almaktadır. Mikrosatellite bölgelerde belirlenen 27 tane tri- ve iki tanede hexonükleotit tekrarlı birimler exon üzerinde yerleşim göstermiştir. Üç nükleotit uzunluğundaki 25 mikrosatellite bölgeden 17 tanesi hipotetik protein kodlayan gen bölgeleri üzerinde, geriye kalan sekiz tekrarlı bölge ise membran, integral membran, serinden zengin, prolinden zengin, DNA'ya bağlanan Tash-1 benzeri protein, glutenin, protein kinaz ve protein fosfataz kodlayan genler üzerinde yer almıştır. Altı nt uzunluğundaki iki bölgeden birisi SVSP ve diğeride Sfi subtelomerik protein ailesine ait proteinleri kodlayan gen bölgelerinde yerleşmiştir.

Sığırlarda oluşturdukları enfeksiyon açısından *Theileria annulata* genotipleri arasında farklılıklar vardır (Ben Miled 1993). Klonal yapıdaki tek genotiplere nazaran miks enfeksiyonlar klinik olarak daha şiddetli seyretmekte, daha yüksek düzeyde parazitemi oluşmakta ve bu hayvanlarda beslenen kenelerin enfeksiyon oranı (ortalama enfekte asini sayısı) oldukça yüksek olmakta (Ben Miled 1993, Walker ve ark 2006) ve enfeksiyonun akut veya kronik döneminde beslenen kenelerdeki enfeksiyon profili farklılıklar göstermektedir (Gubbels ve ark 2001). Bununla birlikte, düşük parazitemili durumlar daha yoğun ve kalıcı enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Walker ve ark 2006). Bu tez çalışmasında klonal D7 hücre kültürü kullanılarak yapılan deneysel enfeksiyonda da buzağıda sadece klinik olarak enfeksiyon sonrasındaki 15.-18. günler arasında görülen beden ısısındaki artış haricinde

herhangi bir klinik belirti gözlenmemiş ve beklendiği şekilde parazitemi oranı düşük seyretmiştir.

Sığırlarda miks genotipler ile oluşan enfeksiyonlarda parazitin popülasyon dinamikleri oldukça kompleks yapıda olup, farklı parazit genotipleri arasındaki etkileşim ve biyolojik farklılıklar bulunmaktadır (Ben Miled 1993, Gubbels ve ark 2000, Walker ve ark 2006). Farklı parazit genotiplerinin kenelere aktarımları, enfektiviteleri ile virülensleri arasında farklılıklar vardır. *Theileria parva* sığır-kene arasındaki her bir pasajlanma sonrasında parazitin popülasyonlarının genetik ve antijenik yapısında belirgin değişimlere yol açmaktadır (Katzer ve ark 2010). Ancak, *T.annulata* popülasyonlarının sığır ve keneler arasındaki pasajlamalarını takiben oluşacak allelik çeşitlenmeler ve genotipik değişimler hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. *T.annulata* kenelerde transtadial olarak nakledildiğinden sporozoitler ancak kenenin nimf ya da olgun dönemlerinde sığırlara aktarılabilmektedir. Kenelerin larva ya da nimf dönemlerinde emdikleri kan miktarının olgun dönemlerine göre oldukça az olması nedeniyle enfeksiyon görülen hayvandan paraziteminin seviyesine göre alınacak ve bir sonraki dönemde nakledilecek genotip sayısı ile çeşitliliğinin değişeceğini ve parazit popülasyonundaki değişimlerin belli aralıklarla tekrar değerlendirmelerinin gerekebileceğini göstermektedir. Ancak, klonal hücreler kullanılarak oluşturulan enfeksiyonlarda keneler ne miktarda kan emerse emsin tek bir parazite ait genotipi alacağından parazitemi seviyesi kene tarafından alınacak genotip üzerine etki etmeyecektir. Yapılan çalışmalar, dişi *Rhipicephalus appendiculatus* nimflerinin beslenmesi esnasında ortalama 80 µl kan emdiğini ve bunun % 80'lik kısmında doymaya yakın dönemde olduğu belirtilmiştir (Katzer ve ark 2006). Kan emme miktarı *Hyalomma excavatum* türü kenelerin nimfleri için çok az farklılık gösterebilir laboratuvar çalışmalarında elde ettiğimiz veriler bize bu kene türünün nimflerinin beslenmeleri esnasında en az 80 µl kan emdiklerini ve aynı şekilde bunun %80'lik kısmının doymaya yakın dönemde olduğunu göstermiştir (yayınlanmamış veri). Hastalığın akut döneminde sığır kanının mikrolitresinde bulunan 10^7 eritrositin (Bhannasir ve ark 1961) % 5'inin piroplazmlar ile enfekte olduğu düşünüldüğünde nimfler akut dönemde beslenmeleri esnasında 4×10^7 piroplazm alacaklardır. Ancak, yoğun kene enfeksiyonlarında dahi genelde tükürük bezlerindeki enfeksiyon oranının 10^2 sporoblast düzeyinde olduğu (Norval ve ark 1992) ve geriye kalan piroplazmların *R.appendiculatus*'un gömlek değiştirmesi ve parazitlerin farklılaşması esnasında kaybolduğu ve bu durumun parazit popülasyonları üzerinde oldukça

katı selektif baskı oluşturduğu belirtilmiştir (Katzner ve ark 2006). Ancak, daha önceki dönemlerde anabilim dalımız tarafından yapılan çalışmalarda miks popülasyona sahip saha izolatu ile bir buzağıda oluşturulan deneysel enfeksiyonda ortalama % 4 parazitemide beslenen *Hyalomma excavatum* nimflerinin gömlek değiştirmelerini takiben tükruk bezlerinin diseke edilerek metilen green piyronin ile boyanmasıyla oluşturulan preparatlarda yapılan sayımlarda tükruk bezi asini hücrelerinin neredeyse tamamına yakınının sporoblastlar ile enfekte olduğu ve gömlek değiştiren kenelerin % 97'sinin enfeksiyonu taşıdığı belirlenmiştir (yayınlanmamış veri). Bu kenelerden hazırlanan sporozoit stabilatlarının PBM hücrelerinin enfeksiyonlarında muhtemelen içerdiği yoğun sporozoit sayısına bağlı olarak oldukça etkili olmuştur. Bu sonuçlar bize enfeksiyonun kenelere aktarılmasında farklı kene türleri ve kullanılan parazit türünün etkili olduğunu göstermiştir. Anabilim dalımız bünyesinde yapılan bir diğer çalışmada yukarıda bahsedilen aynı saha izolatu ile farklı bir buzağıda oluşturulan ve % 0,1-0,2 parazitemide beslenen *Hyalomma excavatum* nimflerinde gömlek değiştirdikten sonraki enfekte asini hücreleri sayısının ≥ 100 ($\approx 10^2$ sporoblast) olduğu ve gömlek değiştiren kenelerinde % 90'ının enfeksiyonu taşıdığı belirlenmiştir. Kompleks yapılu, farklı genotiplerdeki parazitin popülasyonları arasındaki etkileşim ile biyolojik farklılıklara (Ben Miled 1993, Gubbels ve ark 2000, Walker ve ark 2006) bağlı olarak her klonal parazit popülasyonunun benzer şekilde davranmayıp, bunların kenelere aktarımları, enfektiviteleri ve virülensleri arasında farklılıklar görölmektedir (Gubbels ve ark 2001). Yukarıda anlatıldığı şekilde daha önceki çalışmalarda elde ettiğimiz sonuçlar aynı popülasyona sahip saha izolatlarının farklı hayvanlarda farklı düzeylerde parazitemi oluşturduğunu, bu hayvanlarda beslenen kenelerdeki enfeksiyon oranının ve enfekte asini sayılarında değiştiğini göstermiştir. Bu tez çalışmasında klonal D7 hücre kültürü kullanılarak oluşturulan deneysel enfeksiyonda oluşan parazitemi miktarı bize kenelerdeki enfeksiyon oranının ve enfekte asini sayısı ile asini hücrelerindeki ortalama enfeksiyon oranının (%85) yeterli düzeyde olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada 23 adet polimorfik mini ve mikrosatellit markerler ile klonal olan ve olmayan iki farklı *Theileria annulata* izolatu (Ankara ve Akçaova) kullanılarak rekombinasyon sonrası meydana gelen yeni parazit popülasyonlarındaki allel frekansları, rekombinasyonun yoğun olduğu kromozomal bölgeler ve rekombinasyonun genom üzerinde belirlenen 21 adet antijen bölgesindeki antijenik etkileri belirlenmiştir. *Theileria annulata*/Akçaova A10 saha

izolatına ait sporozoit stabilatı kullanılarak polimorfik markerler (TS5, TS6, TS8, TS9, TS12, TS15, TS16, TS20, TS25 ve TS31) ile yapılan incelemede 39 klonun %95'inin tek bir allel ihtiva ettiği ve tam anlamıyla klonal özellik göstermediği belirlenmiştir. D7 izolatının rekombinasyon öncesi analizi bir allel içeren tek bir klondan yapılırken, klonlarının sadece %5'i birden fazla allele sahip olan A10 izolatının seksüel rekombinasyon sonrası elde edilen sonuçlarında; mini ve mikrosatellit markerlerin kapsadığı bölgelerde daha fazla allel görüldüğü ve genetik çeşitliliğin daha çok olduğu belirlenmiştir. Her iki izolat için kromozomlardaki rekombinasyon yoğunluğu grafiği (Şekil 3.4.) incelendiğinde klonal olan ve olmayan iki izolat arasındaki genetik çeşitlilik farkı daha iyi ortaya çıkmaktadır. TS8 ve TS9 markerleri ile rekombinasyon sonrası yapılan analizde D7 klonlarında herhangi bir allel belirlenemezken A10 klonlarında çok sayıda allel belirlenmiştir. Kromozom 3'te yer alan bu polimorfik markerlerin temsil ettiği bölgelerin iki farklı suşta bu kadar farklılık göstermesi, rekombinasyonun yoğun olarak görüldüğü 4 farklı kromozomun sıralamasını her iki suş içinde değiştirmiştir. D7 klonları için en fazla rekombinasyon yoğunluğu 4. kromozomda, A10 klonları için 3. kromozomda belirlenmiştir. Her iki suşta da rekombinasyon sonrası 4. kromozomda görülen rekombinasyon yoğunluğu 2. kromozomdan ve 2. kromozomda görülen rekombinasyon yoğunluğu da 1. kromozomdan daha yüksek çıkmıştır. Klonal olan D7 ve klonal olmayan A10 izolatlarının polimorfik mini ve mikrosatellit markerlerle yapılan analizleri sonucunda rekombinasyon öncesi ile rekombinasyon sonrası genotipik düzeyde en iyi ayırt eden TS5, TS20, TS25, TMSC75 ve TMSC77 markerleri olduğu belirlenmiştir.

Polimorfik mini ve mikrosatellit markerler kullanılarak *Theileria parva* (Katzner ve ark 2006, 2011), *Leishmania tropica*, *Trypanosoma cruzi* (Oliveira ve ark 1998), *Trypanosoma brucei gambiense* (Cooper ve ark 2008), *Plasmodium spp* (Anderson ve ark 2000, Razakandrainibe 2005, Imwong ve ark 2006, 2007), *Toxoplasma gondii* (Ajzenberg ve ark 2002, Simo ve ark 2010) ve *Cryptosporidium parvum* (Mallon ve ark 2003) gibi birçok protozoon parazitin popülasyon yapısı ve genetik çeşitliliği karakterize edilmiştir. *Theileria parva*'nın saha izolatlarının karakterizasyonu için geliştirilen polimorfik mini ve mikrosatellit markerlar (Oura ve ark 2003) ile bunlara ilave olarak geliştirilen yeni polimorfik markerlar kullanılarak *Theileria parva*'nın rekombine iki yeni popülasyonunun genetik çeşitliliği üzerine bir çalışma yapılmıştır (Katzner ve ark 2006). Bu çalışmada *T. parva* saha izolatı olarak Marikebuni parazit stoğu ile çalışılarak IL3014 stabilatı elde edilmiştir. Bu

stabilat ile enfekte buzağılar üzerinde beslenen *Rhipicephalus appendiculatus* keneleri kullanılarak stabilat 70 (St70) elde edilmiştir. St70 elde edebilmek için hayvan deneyinde 1,5-2 t.e. dozunda kene stabilatı ve siyah alaca buzağı kullanılmıştır. Daha sonrasında başka bir buzağı ve keneler kullanılarak stabilat 96 (St96) hazırlanmıştır. In vitro enfeksiyon ve klonlamayı takiben PZR ve polimorfik markerlar ile analize başlanmıştır. İki ayrı parazit stabilatının analizlerini yapmak amacıyla polimorfik mini ve mikrosatellit marker primerleri kromozom 1, 2, 3 ve 4 üzerinde sırasıyla 16, 10, 23 ve 17 bölgeyi kapsayacak şekilde tasarlanmıştır. Kullanılan markerların genelinde aynı bu tez çalışmasında da olduğu gibi çoğunlukla iki ya da üç allel tespit edilmiş, bazı markerlarda yapılan analizlerde ise çok sayılara varan alleller tespit edilmiştir. Tüm markerler arasından 8 adet allele sahip olan Ms14 markerinin en çok allele sahip olan marker olduğu saptanmıştır (Katzner ve ark 2006). Bu tez çalışmasında da A10 izolatında rekombinasyon öncesinde Tmsc45 markeri ile yapılan analizde 5 allel tespit edilirken, rekombinasyon sonrasında aynı markerde 8 adet allel tespit edilerek bu markerin en çok allele sahip marker olduğu belirlenmiştir.

Theileria parva'nın kromozomlarında rekombinasyonun yoğun olduğu bölgeleri belirlemek ve genetik haritalandırma yapmak için iki parental *T. parva* izolatı seçilmiş ve bu iki izolat aynı anda kullanılarak bir buzağı enfekte edilmiştir (Katzner ve ark 2011). Enfeksiyon oranı düşük olmasına rağmen bu tez çalışmasında da olduğu gibi elde edilen enfeksiyon oranı yeterli gelmiştir. Enfekte buzağı üzerinde beslenen *Rhipicephalus appendiculatus* kenelerinden elde edilen sporozoitlerin PBM hücrelerine in vitro enfeksiyonu ve klonlanması sağlanmıştır. Başlangıçta 35 adet rekombinant klon kullanılarak çaprazlama sonrasında 560 adet klon elde edilmiştir. Genetik bağlantı haritasının oluşturulması ve rekombinasyonun yoğun olduğu bölgeleri belirlemek amacıyla ilk olarak 35 adet klon 24 polimorfik marker kullanılarak analiz edilmiş (kromozom başına 6 marker) ve sonrasında tüm klonlar 79 adet polimorfik marker ile analiz edilerek genotiplendirmeleri yapılmıştır. Rekombinasyon tüm kromozomlarda yoğun olarak görülürken, rekombinasyon oranı en yüksek olarak kromozom 1 de belirlenmiştir (Katzner ve ark 2011). Genotiplendirme için kullanılan polimorfik markerlerin sayısının yeterli olması, kromozomlar üzerinde eşit dağılmış olarak seçilmesi önem taşımaktadır. Bu tez çalışmasında kullanılan polimorfik mini ve mikrosatellitlerin temsil ettiği bölgelerde saptanan en yüksek rekombinasyon oranı klonal olan D7'da kromozom 4'te ve klonal olmayan A10'da kromozom 3'te saptanmıştır.

Birçok bakteriyel, viral ve paraziter patojenler konak immün savunma sisteminden kurtulabilmek için antijenik varyasyonlar geçirmektedir. Malarya parazitlerinden insanlar için ölümcül olan *Plasmodium falciparum* türü var geni ekspresyonunu etkileyerek enfekte eritrosit üzerindeki *P. falciparum*-eritrosit membran protein 1 sınıfındaki adhezyon proteinlerinin ekspresyonunu değiştirmektedir (Su X ve ark 1995). Rekombinasyonun deneysel ve biyoinformatik olarak tanımlanmasıyla ve genom boyunca var genindeki rekombinasyonun etkin noktalarının belirlenmesiyle parazitin seksüel aşamasında *P. falciparum*-eritrosit membran protein 1'i kodlayan bölgelerinde rekombinasyonun yoğun olarak meydana geldiği belirlenmiştir (Sander ve ark 2014). Genetik çaprazlama verileri, DNA ikincil yapısının (DSS; DNA secondary structure) *P. falciparum*'un seksüel aşamasındaki DNA replikasyonu süresince rekombinasyonu indükleyici olarak görev yaptığını göstermektedir (Sander ve ark 2014).

Toxoplasma gondii insanlarda gelişmekte olan fötüsde ve bağışıklığı zayıf bireylerde ciddi, hatta ölümcül hastalıklara yol açabilen bir patojendir. *Toxoplasma*, seksüel olarak çoğalmasına, geniş coğrafik dağılım ve konak çeşitliliği göstermesine rağmen genel olarak 3 soydan köken alan klonal bir popülasyon yapısına sahiptir (Grigg ve ark 2001). Grigg ve arkadaşları (2001) tarafından yapılan bir çalışmada 15 polimorfik marker kullanılarak 10 farklı izolat ile analiz yapılmış ve allellerin büyük çoğunluğunun iki soydan geldiği belirlenmiştir. Bu bulgu baskın genotipin iki farklı soyun genetik karışımından köken alarak yayıldığını göstermektedir. Böylesine bir rekombinasyonun başka suşlarda yüksek bir virulansa neden olup olmayacağını belirlemek amacıyla farelerde çok virülant olmayan tip 2 ve tip 3 suşları seçilerek bir F1 soyu elde edilmiştir. Bu F1 soyu içindeki rekombinantlardan en az 3 tanesinin parental kuşağa göre daha virülant olduğu belirlenmiştir. Böylece; seksüel rekombinasyonun, polimorfizmlerle birlikte iki farklı, rekabet halinde olan klonal suşların çeşitliliğinde etkisi olduğu görülmüştür (Grigg ve ark 2001).

Trypanosoma brucei Sahraaltı Afrika'da insanlarda uyku hastalığına ve hayvanlarda trypanosomiasis'e neden olmaktadır. *Trypanosoma brucei*'nin TREU 927 adı verilen suşu için Tandem Repeat Finder programı (Benson 1999) kullanılarak belirlenmiş mikrosatellit markerlar ile *Trypanosoma brucei*'nin alt türleri içinde bazı heterozigot suşlar belirlenmiştir. Parental olarak kabul edilerek kullanılan bu suşlar ile kromozomal segregasyonu yapılmış,

rekombinasyon varlığı gösterilmiş ve genetik bağlantı haritaları çıkarılmıştır (Cooper ve ark 2008).

Protozoon bir parazit olan *Sarcocystis spp.* ile yapılan bir çalışmada, *Sarcocystis* yüzey antijenlerinin çok sayıda allelik kombinasyonla değişkenlik gösterdiği ve seksüel rekombinasyonun bu çeşitlilikte rolü olduğu ile ilgili bulgular elde edilmiştir (Monteiro ve ark 2013). Brezilya’da yaşayan keseli sığınanlardan elde edilen izolatların, yüzey antijeni (SAG) kodlayan gen bölgeleri sekanslanarak analiz edilmiştir. Yapılan analizde iki farklı grup tanımlanarak bunlardan birinin *S. falcatula* ve diğerinin *S. neurona* olduğu belirlenmiştir. Güney Amerika izolatları ile Kuzey Amerika izolatlarının gen sekansları karşılaştırıldığında aralarında birçok insersiyon ve delesyonların olduğu görülmüştür. İnsersiyonlar, mikrosatellit lokuslarına benzeyen AT dinükleotid tekrarlarından oluşmakta ve polimorfizmler yoluyla meydana gelen çeşitliliğin farklı allelerin seksüel rekombinasyon yoluyla değişimi ile olduğu düşünülmektedir (Monteiro ve ark 2013). *Trichomonas vaginalis* kadın ve erkeklerde ürogenital sistemi enfekte ederek trichomoniasis hastalığına yol açan protozoon bir parazittir. Her yıl tüm dünyada, viral olmayan seksüel yolla bulaşan en genel hastalık olarak yaklaşık 153 milyon yeni vaka bildirilmektedir (Schmid ve ark 2011). Popülasyon genetiği ve filogenetik analizler *T. vaginalis*’in popülasyon yapısının rekombinasyondan ve klonal olan veya olmayan iki ayrı popülasyonun birleşiminden çokca etkilendiğini belirlemiştir (Corneliusa ve ark 2012).

Parazit popülasyonlarında antijenik özellik gösteren proteinleri kodlayan gen bölgelerinin PZR ile çoğaltılarak tek bir lokustaki polimorfizmlerin gösterilmesine yönelik çok sayıda araştırma yapılmıştır (Gubbels ve ark 2000, Katzer ve ark 1998, Shiels ve ark 1995, Schnittger ve ark 2002, Awadia ve ark 2008, Weir 2006, Bilgiç 2010, Katzer ve ark 1994). Bunun yanında RFLP analizleri (Ben Miled ve ark 1994), yüzey antijen genlerinin dizilim analizleri (Gubbels ve ark 2001) ve SVSP genleri (Weir ve ark 2010) üzerine yapılan bir seri çalışmada da *Theileria annulata* izolatlarının antijenik bölgelerinde önemli ölçüde polimorfizmler olduğu belirlenmiştir. Yine RFLP analizi ile *Babesia bovis* suşlarının yüzey antijen genlerinde polimorfizmler tespit edilerek bu yöntemle bazı suşların ayrımı yapılmıştır (Wilkowsky 2008).

Seksüel rekombinasyon *Theileria annulata* popülasyonlarında meydana gelen çeşitlilikte büyük rol oynamaktadır. Ayrıca seksüel rekombinasyonun, bu tez çalışmasında kullanılan polimorfik mini ve mikrosatellit markerların temsil ettiği bölgelerde polimorfizmi tetiklediği görülmektedir. Ayrıca, *Theileria parva* popülasyonlarında konak sitotoksik T-hücreleri (CTL) tarafından belirlenen antijenleri kodlayan bölgelerin analizleri çok sayıda farklı allelik kombinasyonlar sonucunda kromozomlar arasında ve aynı kromozom içerisinde tekrar çeşitlendiğini göstermiştir (Katzer ve ark 2006). Bu da CTL antijenlerini kodlayan bölgelerin mayoz bölünme esnasında tekrar çeşitlendiğini doğrulayarak yeni oluşan parazit popülasyonlarında CTL antijenleri arasındaki allelik polimorfizmin bağışıklık sisteminden kaçışında potansiyel rol oynayabileceğini göstermiştir (Katzer ve ark 2006). Meydana gelen polimorfizmlerin antijen gen bölgelerinde de etkisinin olduğu düşünülmesine (Deitsch ve ark 2009, Katzer ve ark 2010, Sivakumar ve ark 2014) rağmen bu tez çalışmasında temsil edilen antijen genlerinde herhangi bir polimorfizm belirlenememiştir. Meydana gelen tek farklılık iki farklı izolatta; TA03155 (*T. annulata* şizont 1-benzeri AT-hook proteini) B hücre antijeni bölgesi D7 klonlarında 990 bp olarak belirlenirken, A10 klonlarında 950 bp olarak belirlenmiştir. Antijenik özellik gösteren bölgelerdeki polimorfizmlerin tespitinde yaşanan zorluk; antijenik bölgeleri temsil eden anlamlı bölgeleri çoğaltmaya uygun oligonükleotid bölgelerin bulunamamasından ve çoğaltılan bölge uzunluklarının fazla olmasından kaynaklanabilmektedir. Bu tez çalışmasında tasarlanan primer çiftlerinin uzunlukları 3 tanesi haricinde tümünün 600 bp ile 3000 bp arasında değişmektedir. Böylece, bu bölgeleri çoğaltan primerler kullanılarak yapılan PZR sonucunda elde edilen ürünlerin yüksek çözünürlüklü jellerde analizi mümkün olmamakta ve agaroz ya da poliakrilamid jelde yapılan analizde meydana gelen ufak polimorfizmlerin tespit edilmesinin zorluğu ile karşılaşılmaktadır. Eğer polimorfizm varsa bile bunun tespitini zorlaştırmaktadır. Mevcut polimorfizmlerin belirlenmesini etkileyen diğer bir faktörde PZR optimizasyonudur, ancak bu tezde belirlenen antijenik bölgeleri çoğaltmada kullanılan primerler ile PZR optimizasyonları tekrarlı olarak kontrol edilmiş ve ilgili gen bölgelerinde herhangi bir polimorfizm tespit edilememiştir. Sadece, *T. annulata*/Ankara D7 ve *T. annulata*/Aova A10 izolatları arasında *T. annulata* şizont 1-benzeri AT-hook proteini kodlayan B hücre antijen bölgesindeki belirlenen polimorfizm dışında incelenen diğer antijenik bölgelerde polimorfizmin tespit edilememiş olması antijenik özellikteki bu bölgelerin farklı izolatlar arasında da polimorfizm göstermediği anlamına gelmemektedir. Yapılan çalışmalarda Tar ve SVSP genleri (Weir ve ark 2010), Tams (Gubbels

ve ark 2000, Katzer ve ark 1998, Shiels ve ark 1995), TaSP (Schnittger ve ark 2002, Awadia ve ark 2008), MeroI (Weir 2006), Ta9 (Weir 2006, Bilgiç 2010), SPAG (Katzer ve ark 1994) gibi proteinleri kodlayan gen bölgeleri gerek nükleotit gereksede protein düzeylerinde farklı izolatlar arasında polimorfizm göstermektedir. Antijenik özellikteki proteinleri kodlayan gen bölgelerinde oluşan polimorfizmlerin belirlenmesi, aşı çalışmalarında kullanılacak olan subunit aşılar karşı oluşacak bağışık yanıtı bağlı şekillenen pozitif seleksiyon sonucunda meydana gelen polimorfizmler hakkında bilgi sahibi olunmasını sağlamakta, ancak doğal ortamda konağın (omurgalı yada omurgasız) bağışık sisteminin etkisi altında parazit popülasyonlarında genomik düzeyde meydana gelen çeşitlilik hakkında yeterli düzeyde veriye ulaşılmasına ve oluşan bu polimorfizmin altında yatan nedenin tam olarak ortaya konulabilmesine imkan vermemektedir. Rekombinasyon sonrasında klonal (D7) ve klonal olmayan suşlarda (A10) antijenik özellik gösteren proteinleri kodlayan gen bölgelerinde polimorfik markerler kullanılarak yapılan analizler sonucunda herhangi bir farklılık belirlenememiş olması parazite ait farklı izolatlar arasında görülen farklılıkların nedeninin parazit popülasyonlarında konakta gelişen bağışık yanıtı bağlı şekillenen pozitif seleksiyon sonucunda oluşması ihtimalini kuvvetlendirmektedir.

Konak sitotoksik T-hücreleri tarafından hedeflenen TA15705 ve B-hücreleri tarafından gelişen humoral yanıtı sorumlu olduğu bilinen TA08425 antijen bölgeleri temsil eden sekans dizileri her iki izolat içinde çoğaltılamamıştır. Bunun yanında, konak sitotoksik T-hücreleri tarafından hedeflenen TA06115 ve TA03370 antijenlerini çoğaltmada kullanılan primer çiftlerinin bağlanma bölgelerindeki mutasyonlar ve/veya muhtemel polimorfizme bağlı olarak A10 izolatında bu antijenler çoğaltılamamıştır. Olması muhtemel bu polimorfizmin ilgili antijenik bölgelerin uzunluklarına pozitif yada negatif yönlü olarak ne yönde bir etkisini olduğu belirlenememekle beraber bu durum MHC-sınıf I aracılı sitotoksik T lenfosit yanıtın parazitin farklı suşlarına özgü olmasından kaynaklanmaktadır (Seitzer ve Ahmed 2008, MacHugh ve ark 2008, MacHugh ve ark 2011). *Theileria annulata*'ya karşı oluşan hücresel bağışık yanıt yüksek oranda özgün olup parazitin farklı izolatlarına karşı koruyuculuk sağlayamamakta ve aşılı hayvanlarda heterolog suşlar ile oluşan re-enfeksiyonlar kimi durumlarda ölümcül olabilmektedir. Bunun yanında, kene barsağında şekillenen seksüel rekombinasyon doğal ortamda *Theileria parva* ve *Theileria annulata* popülasyonlarındaki MHC-sınıf I aracılı sitotoksik T hücre antijenlerinin kodlandığı ve seleksiyon altındaki nötral

olmayan gen bölgelerinde oluşan polimorfizimler de önemli rol oynamaktadır. *T.parva* ve *T.annulata* genomları arasında birbirleri ile ortolog gen bölgelerinin yanında türlere özgü ve farklı RNA ekspresyon profiline sahip gen bölgeleride yer almaktadır (Pain ve ark 2005, Weir ve ark 2009). Bunlar arasında yer alan Tar ve SVSP gen aileleri oldukça polimorfik yapıda olup *T.annulata* genomunda yer alan en büyük gen ailesini oluşturmaktadır (Weir ve ark 2009, Bilgic ve ark 2010). Her iki parazit türünün genetik düzeyde aynı kökenden gelerek daha sonra farklılaşması, türe özgü gen ailelerine ve aynı zamanda farklı RNA profillerine sahip olmaları genetik rekombinasyonun ve buna bağlı oluşan allelik çeşitlenmenin bu iki tür arasında farklılık düzeylerinde olacağını göstermektedir.

Doğal şartlarda parazitlerde oluşan seksüel rekombinasyon popülasyonun genetik çeşitliliğinin oluşmasında önemli yer tutmaktadır. Bunun yanında, hastalıkta tedavi amaçlı ilaç uygulamaları ve koruyucu amaçlı aşılama *T.annulata* popülasyonları üzerine seçici etki yaparak popülasyonun yapısını değiştirmekte, bunların kenelere aktarımına ve dolayısıyla oluşacak yeni popülasyonda genetik farklılıkların oluşmasına sebep olmaktadır. Bu durumda, gelecekte parazitin farklı popülasyonlarından kaynaklanan ilaç direnci, aşılama koruyucu etkinliğinin azalması, yüksek patojeniteye sahip dirençli suşların oluşması gibi yeni risklerin ortaya çıkmasına yol açmaktadır. *T.annulata* popülasyonlarında görülen çeşitliliğe sadece farklı coğrafik bölgelerde değil aynı zamanda tek bir konaktada rastlanılabilmekte ve bu polimorfizmin parazit popülasyonlarında genetik değişimin sıklıkla meydana gelmesinden kaynaklandığını düşündürmektedir. Mayoz bölünmedeki çaprazlamaları akla getiren, farklı lokuslar arası yüksek düzeydeki rekombinasyon, parazitin yaşam çemberindeki seksüel dönemin varlığına dair güçlü kanıtlar sağlamaktadır. Polimorfik markerler kullanılarak *T.annulata*'nın popülasyon genetiği üzerindeki çalışmalarda parazitin doğal koşullardaki popülasyon çeşitliliğinde genetik değişimin önemli rol oynadığı belirtilmiştir. Ancak, *T.annulata* popülasyonlarının kenelere aktarılmasından sonra oluşan yeni parazit popülasyonlarındaki genetik çeşitlilik ve rekombinasyonun bu çeşitlilikteki rolü hakkında polimorfik moleküler markerler kullanılarak yapılmış kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır.

Rekombinant popülasyonlarda genotipik ve antijenik düzeydeki farklılaşmaların belirlenmesi o bölgedeki muhtemel risk faktörlerine (ilaç direnci, aşılama koruyucu etkinliğinin azalması veya tamamen kaybolması, yüksek patojeniteye sahip suşların

belirlenmesi gibi) karşı önlem alınması açısından önem taşımaktadır. Ayrıca parazitlerin aynı bölgede ya da farklı bölgeler arasındaki etkileşimleri sonucunda oluşturacak muhtemel farklılıkları belirlemek, parazit biyolojisi hakkında bilgi sahibi olunmasını sağlayacaktır. Bu tez kapsamında elde edilen veriler, bize parazit popülasyonunun genetik ve antijenik düzeydeki çeşitliliği hakkında önemli bilgiler sağlamıştır. *Theileria annulata*'nın kimi popülasyonlarında görülen ilaç direnci (Mhadhbi ve ark 2010, Hacılarlıoğlu 2013), aşılama sonrasında hayvanlarda bazı heterolog suşlara karşı koruyuculuğun tam olmayışı (Pipano 1981), iklim değişikliklerine bağlı kene habitatlarındaki değişimler (Estrada-Pena 2003), doğal koşullarda hayvanlarda meydana gelen tekrarlı enfekte kene enfestasyonları sonucunda hayvanların farklı parazit popülasyonları ile dereceli olarak enfekte olması (Weir ve ark 2011), bölgede hastalığa vektörlük yapan kene türü, aşırı ve düzensiz akarazit kullanımına bağlı kenelerde ilaç uygulamaları sonrası görülen etkisizlikler gibi faktörler parazitin epidemiyolojisi üzerinde önemli etkiler oluşturmaktadır. Bununla birlikte, bu gibi epidemiyolojik verilerin belirlenmesinden önce, parazitin temel popülasyon yapısının bilinmesi önem arz etmektedir (Weir 2006). *T. annulata*'nın oluşturduğu tropikal theileriosis önemli bir hastalık olmasına rağmen bu konuda yapılan moleküler genetik ve popülasyon genetiği çalışmaları oldukça sınırlı kalmaktadır. Bunun sebebi; genetik çalışmalarda kullanılan ekipmanların ve sarf malzemelerinin pahalı olması, genotiplendirme için yapılan çalışmaların zahmetli ve zaman alıcı olması, hayvan deneylerinde kullanılan buzağuların bakımının büyük iş gücü gerektirmesinden kaynaklanmaktadır. Daha önce *Theileria parva* ile ilgili rekombinasyon üzerine detaylı çalışmalar (Katzner ve ark 2006, Katzner ve ark 2010) yapılmıştır. Ancak, *Theileria annulata* popülasyonlarının keneler ve sığırlar arasındaki pasajlamalarını takiben oluşacak allelik çeşitlenmeler ve genotipik değişimler hakkında kapsamlı bir çalışma yapılmamıştır. Bu tez çalışması *T. annulata* açısından bu konuda bir ilk olma özelliği taşımaktadır.

5. SONUÇ

Theileria annulata/Ankara D7 sporozoit stabilatı ile in vitro ortamda enfekte edilen PBM hücrelerinden elde edilen 76 adet klonun ve rekombinasyon öncesi D7 hücre kültürünün genotipik yapıları, birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü kromozomların intron, ekson, intergenik bölge ve kodlanmayan bölgelerine dağılmış halde bulunan 23 adet polimorfik markerlarla yapılan inceleme sonucunda elde edilen bulgular göz önüne alınarak tüm kromozomlar üzerinde rekombinasyonun varlığı test edilmiştir. Bazı polimorfik bölgelerde rekombinasyon sonrasında yeni allelerin oluştuğu, bazılarında ise rekombinasyon öncesinde belirlenen allellerin rekombinasyondan sonra kaybolduğu ya da farklı kombinasyonlarla değişimler gösterdiği belirlenmiştir. Rekombinasyonun varlığı dört kromozom üzerinde de yoğun bir şekilde görülürken, yapılan analiz sonucunda dördüncü kromozom üzerinde yer alan TS5 polimorfik markeri ile tüm klonlarda ve ikinci kromozom üzerinde yer alan Tmsc33'ün bir klonu haricinde tüm klonlarda herhangi bir rekombinasyon belirlenmemiştir. Genel olarak bakıldığında; dört kromozom üzerinde yer alan tüm polimorfik markerlarda görülen allel kaybı, yeni allelerin eklenmesi ya da hiç allel görülmemesi gibi değişiklikler puanlanarak ilgili kromozom üzerinde bulunan polimorfik marker sayısına oranlanıp bir sıralama yapıldığında, sıralamanın birbirine oldukça yakın olduğu ve rekombinasyon oranının çoktan aza doğru kromozom 4> kromozom 2> kromozom 1> kromozom 3 şeklinde olduğu tespit edilmiştir.

Theileria annulata/Akçaova A10 sporozoit stabilatı ile in vitro ortamda enfekte edilen PBM hücrelerinden elde edilen 40 adet klonun ve rekombinasyon öncesi A10 hücre kültüründen elde edilen 27 adet klonun genotipik yapıları, birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü kromozomların intron, ekson, intergenik bölge ve kodlanmayan bölgelerine dağılmış halde bulunan 23 adet polimorfik markerlarla yapılan inceleme sonucunda elde edilen bulgular değerlendirilerek tüm kromozomlar üzerinde rekombinasyonun varlığı test edilmiştir. Bazı polimorfik bölgelerde rekombinasyon sonrasında yeni allelerin oluştuğu, bazılarında ise rekombinasyon öncesinde belirlenen allellerin rekombinasyondan sonra kaybolduğu ya da farklı kombinasyonlarla değişimler gösterdiği belirlenmiştir. Rekombinasyonun varlığı dört kromozom üzerinde de yoğun bir şekilde görülürken, yapılan analiz sonucunda birinci

kromozom üzerinde yer alan Tmsc1 polimorfik markeri ile tüm klonlarda ve ikinci kromozom üzerinde yer alan Tmsc33'ün birkaç klonu haricinde tüm klonlarda herhangi bir rekombinasyon belirlenmemiştir. Klonal olmayan A10 izolatının rekombinasyon seviyesi için; dört kromozom üzerinde yer alan tüm polimorfik markerlarda görülen allel kaybı, yeni allelerin eklenmesi ya da hiç allel görülmemesi gibi değişiklikler göz önüne alınarak bir sıralama yapıldığında; genetik çeşitliliğin klonal olan D7 izolatında belirlenen çeşitlilikten daha fazla olduğu, sıralamanın D7'deki kadar birbirine yakın olmadığı ve rekombinasyon oranının çoktan aza doğru kromozom 3> kromozom 4> kromozom 2> kromozom 1 şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Her iki izolatta da rekombinasyon yoğunluğunun; kromozom 4> kromozom 2> kromozom 1 olacak şekilde sıralandığı belirlenmiştir.

D7 sporozoit stabilatı ile in vitro ortamda enfekte edilen PBM hücrelerinin klonlarına (76 klon) ait DNA örnekleri, A10 sporozoit stabilatı ile enfekte PBM hücrelerinden elde edilen klonlara (40 klon) ait DNA örnekleri ve bunların rekombinasyon öncesine ait DNA örnekleri antiijenik çeşitlilik yönünden hücreSEL ve humoral yanıtta sorumlu olduğu düşünülen 22 ayrı gen bölgesi için tasarlanan primerler kullanılarak yapılan PZR ile değerlendirilmeye alınmıştır. Rekombinasyon sonrasında konak sitotoksik T-lenfosit hücreleri tarafından hedeflenen antijenler ile humoral yanıtta sorumlu olduğu düşünülen antijenleri kodlayan gen bölgelerinde yeniden çeşitlenmeye bağlı herhangi bir boyut farklılığı ya da değişiklik saptanamamıştır.

ÖZET

Hyalomma soyuna bağlı ixodid keneler tarafından nakledilen *Theileria annulata*'nın oluşturduğu tropikal theileriosis gelişmekte olan ülkelerde, sığırların ekonomik açıdan önemli bir hastalığıdır. Doğal şartlarda parazitlerde oluşan seksüel rekombinasyon popülasyonun genetik çeşitliliğinin oluşmasında önemli yer tutmaktadır. Bunun yanında, hastalıkta tedavi amaçlı ilaç uygulamaları ve koruyucu amaçlı aşılamlar *T.annulata* popülasyonları üzerine seçici etki yaparak popülasyonun yapısını değiştirmekte, bunların kenelere aktarımına ve dolayısıyla da oluşacak yeni popülasyonda genetik farklılıkların oluşmasına sebep olmaktadır.

Theileria annulata'nın bilinen tüm gen sekansı, popülasyon genetiği çalışmaları ve yeni antijenlerin tanımlanması için genetik marker geliştirilmesine olanak sağlamıştır. *T.annulata* popülasyonlarının kenelere aktarılmasından sonra oluşan yeni parazit popülasyonlarındaki genetik çeşitlilik ve rekombinasyonun bu çeşitlilikteki rolü hakkında polimorfik moleküler markerler kullanılarak yapılmış kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Klonal olan ve olmayan iki farklı *T. annulata* izolatının (Ankara D7 ve Akçaova A10) rekombinasyon sonrası analizi için yapılan popülasyon genetiği çalışmasında kullanılmak üzere 23 adet mini ve mikrosatelit marker belirlenmiştir. Ayrıca, yeni parazit popülasyonlarında rekombinasyonun yoğun olduğu kromozomal bölgeler ve bunların çaprazlama sonrası meydana gelen antijenik etkisi belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında polimorfik markerler kullanılarak, klonal olan ve olmayan *Theileria annulata* izolatlarının kenelere aktarımını takiben rekombinasyon sonrası oluşan yeni popülasyonlarında çok sayıda farklı alleller belirlenerek genetik düzeyde farklılaşmalar olduğu belirlenmiştir. Rekombinasyonun yoğun olduğu kromozomal bölgeler; D7 için kromozom 4>2>1>3 ve rekombinasyonun en yoğun olduğu A10 için kromozom 3>4>2>1 şeklinde sıralanmıştır. Rekombinasyonun 21 farklı antijenik bölge üzerindeki etkisi için yapılan analizinde bu parazit izolatları için antijenik düzeyde bir farklılaşma görülmediği belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Theileria annulata*, rekombinasyon, popülasyon genetiği.

SUMMARY

Tropical theileriosis caused by the tick transmitted protozoa parasite *Theileria annulata* is a major and economically important disease of cattle in many developing countries. Sexual recombination that occurs in parasite has an effective role for genetic diversity in nature. Drug treatments and protective vaccines make selective effect on *T. annulata* populations and in the tick gut, it is therefore important sexual recombination causing genetic and antigenic diversity in parasite populations is investigated.

The completed genome sequence of *Theileria annulata* provided an opportunity to develop genetic markers for population genetic studies and also enabled the identification of new antigens. Sexual recombination that has been occurred in the tick gut, has not been demonstrated in parasite populations either experimentally or using mini and micro satellite markers which provides a reliable method for genotyping. A panel of 23 micro and minisatellite markers selected for population genetic studies in order to identify, characterise and analyse two different clonal and nonclonal *T. annulata* isolates (*T.annulata* Ankara and Akçaova) after recombination. Besides, chromosomal regions where recombinations are intense in new parasite populations and antigenic effect of these determined after genetic crossover.

The analysis using polymorphic mini and mikrosatellit markers showed that new population of two different clonal and nonclonal *Theileria annulata* isolates had many different alleles, genetic variations following recombination resulting from transmission to tick guts. Chromosomal regions where recombinations are intense ranging chromozom 4>2>1>3 for D7 and chromozom 3>4>2>1 for A10 which is more intense. Analysis is done to determine antigenic effect of recombination showed no effect on 21 different antigenic regions of these parasite isolates.

Keywords: *Theileria annulata*, recombination, population genetics.

KAYNAKLAR:

Ajzenberg D, Banuls AL, Tibayrenc M, Darde ML. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *International Journal of Parasitology* 2002;32: 27–38.

Allsopp BA, Baylis HA, Allsopp M, Cavaliersmith T, Bishop RP, Carrington DM, Sohanpal B, Spooner P. Discrimination between 6 species of *Theileria* using oligonucleotide probes which detect small-subunit ribosomal-RNA sequences. *Parasitology* 1993;107: 157-165.

Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, Bockarie M, Mokili J, Mharakurwa S, French N, Whitworth J, Velez ID, Brockman AH, Nosten F, Ferreira MU, Day KP. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular Biology of Evolution* 2000;17: 1467-1482.

Awadia MA, Salih D, Bakheit M, Hussein AR, Hassan SM, Mukhtar MM, Ahmed JS, and Seitzer U. Molecular Structure of TaSP Gene of *Theileria annulata*. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Annuals of New York Academy of Science* 2008;1149: 218–220.

Baldwin CL, Black SJ, Brown WC. Bovine T cells, B cells and null cells are transformed by the protozoan parasite *Theileria parva*. *Infection and Immunity* 1988;56:462.

Barnett SF. *Theileria* In *Parasitic Protozoa*. Kreier JP (ed) Academic Press: New York. 1977. p. 77-113.

Ben Miled L. Population diversity in *Theileria annulata* in Tunisia. Doktora tezi. University of Edinburgh. 1993.

Ben Miled L, Dellagi K, Bernardi G, Melrose TR, Darghouth M, Bouattour A, Kinnaird, Shiels B, Tait A, Brown CG. Genomic and phenotypic diversity of Tunisian *Theileria annulata* isolates. *Parasitology* 1994 198:51-60.

Beniwal RK, Nichani AK, Sharma RD, Rakha NK, Suri D, Sarup S. Responses in animals vaccinated with the *Theileria annulata* (Hisar) cell culture vaccine. *Tropical Animal Health Production* 1997;29: 109-113.

Benson G. Tandem repeats finder:a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 1999;27: 573-580.

Bettencourt A, Franca C and Borges J. Un cas de piroplasmose bacilliforme chez le daim. *Institut Royal de Bacteriologie Camara Pestana* 1907;1 341-363.

Bhannasiri T, Bogart R and Krueger H. Hemoglobin and Blood Cells of Growing Beef Cattle. This study was conducted in cooperation with the Agricultural Research Service, Oregon Agricultural Experiment Station 1961; Technical Paper 1320.

Bilgiç HB. *Theileria annulata*'nın epidemiyolojik araştırmalarında kullanılmak üzere rekombinant elisa ve çeşitli PZR testlerinin geliştirilmesi. Doktora Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye. 2010.

Bilgiç HB, Karagenc T, Shields B, Tait A, Eren H, Weir W. Evaluation of cytochrome b as a sensitive target for PCR based detection of *Theileria annulata* carrier animals. *Veterinary Parasitology* 2010;174:341–347.

Bishop R, Musoke A, Morzaria S, Sohanpal B, Gobright E. Concerted evolution at a multicopy locus in the protozoan parasite *Theileria parva*: extreme divergence of potential protein-coding sequences. *Molecular Cell Biology* 1997;17,pp. 1666–1673.

Blouin MS, Parsons M, Lacaille V, Lotz S. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology* 1996;5:393-401.

Bozcuk AN. *Genetik*. Palme Yayıncılık 2005;12:247-262.

Brown CG. Application of in vitro techniques to vaccination against theileriosis, in *Advances in the control of theileriosis*. Ed. Irvin AD, Cunningham MP, and Young AS, Martinus Nijhoff, The Hague 1981;104-119

Burridge MJ, Young AS, Stagg DA, Kanhai GK, Kimber CD. *Theileria lawrencei* infection of cattle and African buffalo: evaluation of a buffalo cell culture schizont antigen for the indirect fluorescent antibody test. *Veterinary Science* 1974;17:285-9.

Campbell JDM, Howie SEM, Odling KA, Glass EJ. *Theileria annulata* induces aberrant T cell activation in vitro and in vivo. *Clinical and Experimental Immunology* 1995;99:203–210.

Corneliusa DC, Robinson DA, Muznyb CA, Menab LA, Aanensend DM, Lushbaugh WB, Meadea JC. Genetic Characterization of *Trichomonas vaginalis* Isolates by Use of Multilocus Sequence Typing. *Journal of Clinical Microbiology* 2012;10: 3293-3300.

Cooper A, Tait A, Sweeney L, Tweedie A, Morrison L, Turner CM, MacLeod A. Genetic analysis of the human infective trypanosome *Trypanosoma brucei gambiense*: chromosomal segregation, crossing over, and the construction of a genetic map. *Genome Biology* 2008;9: R103.

Crow JF, Kimura M. *An introduction to population genetics theory*. Harper and Row 1970.

Darghouth ME, Bouattour A, Ben Miled L, Sassi L. Diagnosis of *Theileria annulata* infection of cattle in Tunisia: comparison of serology and blood smears. *Veterinary Research* 1996;27(6):613-21.

de Castro JJ. Sustainable tick and tick-borne disease control in livestock improvement in developing countries. *Veterinary Parasitology*, 1997;71:77–97.

de Kok JB, d'Oliveira C, Jongejan F. Detection of the protozoan parasite *Theileria annulata* in Hyalomma ticks by the polymerase chain reaction. *Experimental and Applied Acarology* 1993;17: 839-846.

Deitsch KW, Lukehart SA, Stringer JR. Common strategies for antigenic variation by bacterial, fungal and protozoan pathogens *National Review Microbiology* 2009;7, pp. 493–503.

Dschunkowsky E and Luhs J. Die piroplasmen der rinder, zentralblatt für bacteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung I originale 1904;35, 486-492.

Estrada-Pena A. Climate change decreases habitat suitability for some tick species (Acari: Ixodidae) in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 2003;70, 79-93.

Forsyth LMG, Jackson LA, Wilkie G, Sanderson A, Brown CGD, Preston PM. Bovine cells infected in vivo with *Theileria annulata* Express CD11b, the C3bi complement receptor. *Veterinary Research Communications* 1997;21: 249-263.

Gauer M, Mackenstedt U, Melhorn H, Schein E, Zapf F, Njenga E, Young A, Morzaria S. DNA measurements and ploidy determination of developmental stages in the life cycle of *T.annulata* and *T.parva*. *Parasitology Research* 1995;81: 565-574.

Gemayel R, Vences MD, Legendre M, Verstrepen KJ. Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. *Annual Review Genetics* 2010;44: 445-77.

Gharbi M, Sassi L, Dorchie P, Darghouth MA. Infection of calves with *Theileria annulata* in Tunisia: Economic analysis and evaluation of the potential benefit of vaccination. *Veterinary Parasitology* 2006;30;137(3–4):231–41.

Grigg ME, Bonnefoy S, Hehl AB, Suzuki Y, Boothroyd JC. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science* 2001;5: 294(5540): 161-5.

Gubbels MJ, Katzer F, Hide G, Jongejan F, Shiels BR. Generation of a mosaic pattern of diversity in the major merozoite-piroplasm surface antigen of *Theileria annulata*. *Molecular Biochemistry of Parasitology* 2000;110, 23-32.

Gubbels MJ, Katzer, F, Shiels BR, Jongejan F. Study of *Theileria annulata* population structure during bovine infection and following transmission to ticks. *Parasitology* 2001;123, 553-561.

Hacılarlıoğlu S. *Theileria annulata* sitokrom b geninde mutasyonların belirlenerek buparvaquone direnciyle ilişkisinin araştırılması ve Aydın çevresindeki enfekte sığırlarda direncin yaygınlığının saptanması. Doktora Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye. 2013.

Henson S, Bishop RP, Morzaria S, Spooner PR, Pelle R, Poveda L, Ebeling M, Küng E, Certa U, Daubenberg CA, Qi W. High-resolution genotyping and mapping of recombination and gene conversion in the protozoan *Theileria parva* using whole genome sequencing. *Biomed Central Genomics* 2012;(13), p. 503.

Heussler VT. *Theileria* Survival Strategies and Host Cell Transformation, Academic Publishers, United States of America 2002. p. 71-77.

Imwong M, Sudimack D, Pukrittayakamee S, Osorio L, Carlton JM, Day NP, White NJ, Anderson TJ. Microsatellite variation, repeat array length, and population history of *Plasmodium vivax*. *Molecular Biology and Evolution* 2006;23: 1016–1018.

Imwong M, Nair S, Pukrittayakamee S, Sudimack D, Williams JT, Mayxay M, Newton PN, Kim JR, Nandy A, Osorio L, Carlton JM, White NJ, Day NP, Anderson TJ. Contrasting genetic structure in *Plasmodium vivax* populations from Asia and South America. *International Journal of Parasitology* 2007;37: 1013–1022.

İlhan T, Williamson S, Kirvar E, Shiels B, Brown CG. *Theileria annulata*: carrier state and immunity. *Annals of New York Academy of Science* 1998;849: 109-125.

İlhan T. Diagnostic methods for epidemiological studies of theileriosis (*Theileria annulata* infections of cattle). Doktora tezi, University of Edinburgh, Birleşik Krallık. 1999.

İnci A, Ica A, Yıldırım A, Vatansever Z, Çakmak A, Albasan H, Cam Y, Atasever A, Sariozkan S, Duzlu O. Economical impact of tropical theileriosis in the Cappadocia region of Turkey. *Parasitology Reseach* 2007;101 (Suppl 2):S171–S174.

Jeffreys AJ, Royle NJ, Wilson V, Wong Z. Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem repetitive hypervariable loci in human DNA. *Nature* 1988;332:278-281.

Jonsson NN, Bock RE, Jorgensen WK. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Veterinary Parasitology* 2008;155: 1–9.

Katzer F, McKellar S, Ben Miled L, d'Oliveira C, Shiels B. Selection for antigenic diversity of Tams1, the major merozoite antigen of *Theileria annulata*. *Annals of New York Academy of Science* 1998;849: 96-108.

Katzer F, Carrington M, Knight P, Williamson S, Tait A, Morrison IW, Hall R. Polymorphism of SPAG-1, a candidate antigen for inclusion in a sub-unit vaccine against *Theileria annulata*, *Molecular Biochemistry of Parasitology* 1994;67: 1-10.

Katzer F, Ngugi D, Oura C, Bishop RP, Taracha EL, Walker AR, McKeever DJ. Extensive genotypic diversity in a recombining population of the apicomplexan parasite *Theileria parva*. *Infection Immunology* 2006;74: 5456-5464.

Katzer F, Ngugi D, Walker AR, McKeever DJ. Genotypic diversity, a survival strategy for the apicomplexan parasite *Theileria parva*. *Veterinary of Parasitology* 2010;10: 236-243.

Katzer F, Lizundia R, Ngugi D, Blake D, McKeever D. Construction of a genetic map for *Theileria parva*: Identification of hotspots of recombination. *International Journal of Parasitology* 2011;41: 669–675.

Kemeny DM and Chantler S. An introduction to ELISA. In *ELISA and other solid Phase Immunoassays. Theoretical and Practical Aspects*, D. M. Kemeny and Challacombe, John Wiley and Son Ltd: Chichester 1988 p. 1-30.

Kiltz HH, Uilenberg G, Franssen FF, Perie NM. *Theileria orientalis* occurs in Central Africa. *Research in Veterinary Science* 1986;40: 197-200.

Kocan KM, Edmou F Bloum EF and Barbet AF. Anaplasmosis Control Past, Present, and Future. *Annals of New York Academy Of Sciences* 2000;916:501-9.

Legendre M, Pochet N, Pak T, Verstrepen KJ. Sequence based estimation of minisatellite range of organisms and microsatellite repeat variability. *Genome Research* 2007;17: 1787-96.

Levine NO. The protozoan phylum Apicomplexa. Vol. I and II. CRC press: Boca Raton, Florida, USA 1988.

Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 2002;11: 2453-65.

Liu BH. *Statistical genomics: Linkage, mapping, and QTL analysis*. CRC Press LLC, Boca Raton New York. 1998.

Machugh ND, Burrells AC, Morrison WI. Demonstration of strain-specific CD8 T cell responses to *Theileria annulata*. *Parasite Immunology* 2008;30: 385–393.

Machugh ND, Weir W, Burrells A, Lizundia R, Graham SP, Taracha EL, Shiels BR, Langsley G, Morrison WI. Extensive Polymorphism and Evidence of Immune Selection in a Highly Dominant Antigen Recognized by Bovine CD8 T Cells Specific for *Theileria annulata*. *Infection and immunity* 2011;79: (5), 2059–2069.

Mallon M, MacLeod A, Wastling J, Smith H, Reilly B, Tait A. Population Structures and the Role of Genetic Exchange in the Zoonotic Pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Molecular Evolution* 2003;56: 407-417.

Maynard SJ. *Evolutionary genetics*. Oxford University press 2002.

Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A* 1977;74(2):560–4.

McHardy N, Wekesa LS, Hudson AT, Randall AW. Antitheilerial activity of BW720C (buparvaquone): a comparison with parvaquone. *Research in Veterinary Science* 1985;39: 29-33.

Merkel A, Gemmell N. Detecting short tandem repeats from genome data: opening the software black box. *Brief Bioinform* 2008;9:355–66.

Mhadhbi M, Naouach A, Boumiza A, Chaabani MF, BenAbderazzak S, Darghouth MZ. In vivo evidence for the resistance of *Theileria annulata* to buparvaquone. *Veterinary Parasitology* 2010;169: 241–247.

Mimoğlu M, Göksu K, Sayın F. Veteriner ve Tıbbi Protozooloji. Ankara Üniversitesi Basımevi 1969. s. 980-981.

Minami T, Spooner PR, Irvin AD, Ocama JGR, Dobbelaere DAE and Fujinaga T. Characterization of stocks of *Theileria parva* by monoclonal antibody profiles. *Research in Veterinary Science* 1983;35: 334-340.

Monteiro RM, Keid LB, Richtzenhain LJ, Valadas SY, Müller G, Soares RM. Extensively variable surface antigens of *Sarcocystis spp.* infecting Brazilian marsupials in the genus *Didelphis* occur in myriad allelic combinations, suggesting sexual recombination has aided their diversification. *Veterinary Parasitology* 2013;196(1-2): 64-70.

Morzaria SP, Young JR, Spooner PR, Dolan TT, Bishop RP. *Theileria parva*: a restriction map and genetic recombination. *Genome Analysis of Protozoan Parasites*, ILRAD, Nairobi 1993; pp. 67–73.

Morzaria SP, Dolan TT, Norval RA, Bishop RP, Spooner PR. Generation and characterization of cloned *Theileria parva* parasites. *Parasitology* 1995;111: (Pt 1), 39-49.

Muraguri GR, Kiara HK, McHardy N. Treatment of east coast fever: a comparison of parvaquone and buparvaquone. *Veterinary Parasitology* 1999. p. 25-37.

Neitzel. H, 1989. Humangenetik: Aktuelle Möglichkeiten- Zukünftige Perspektiven. *Biologie Heute* Nov./ Dez. 1989 No: 370

Norval RA, Perry BD, Young AS. *The Epidemiology of Theileriosis in Africa*. Academic Press London 1992.

Odongo DO, Oura CA, Spooner PR, Kiara H, Mburu D, Hanotte OH, Bishop RP. Linkage disequilibrium between alleles at highly polymorphic miniand micro-satellite loci of *Theileria parva* isolated from cattle in three regions of Kenya. *International Journal of Parasitology* 2006;36:937-946.

Okonechkinov K, Golosova O, Fursov M, Varlamov A, Vaskin Y, Efremov I, Grehov G, Kandrov D, Rasputin K, Syabro M, Tleukenov T. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 2012;15;28(8):1166-7.

Oliveira RP, Broude NE, Macedo AM, Cantor CR, Smith CL, Pena SD. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A. 1998;95: 3776–3780.

Oura CA, Odongo DO, Lubega GW, Spooner PR, Tait A, Bishop RP. A panel of microsatellite and minisatellite markers for the characterisation of field isolates of *Theileria parva*. International Journal of Parasitology 2003;33:1641-1653.

Oura CA, Asiimwe BB, Weir W, Lubega GW, Tait A. Population genetic analysis and sub-structuring of *Theileria parva* in Uganda. Molecular Biochemistry of Parasitology 2005;140:229-239.

Oura CA, Tait A, Asiimwe B, Lubega GW, Weir W. *Theileria parva* genetic diversity and haemoparasite prevalence in cattle and wildlife in and around Lake Mburo National Park in Uganda. Parasitology Research 2011;108(6):1365-74.

Pain A, Renauld H, Berriman M, Murphy L, Yeats CA, Weir W, Kerhornou A, Aslett M, Bishop R, Bouchier C, Cochet M, Coulson RMR, Cronin A, de Villiers EP, Fraser A, Fosker N, Gardner M, Goble A, Jones SG, Haris DE, Katzer F, Larke N, Lord A, Maser P, Mckellar S, Mooney P, Morton F, Nene V, O'Neil S, Price C, Quail MA, Rabbinowitsch E, Rawlings ND, Rutter S, Saunders D, Seeger K, Shah T, Squares R, Squares S, Tivey A, Walker AR, Woodward J, Dobbelaere DAE, Langsley G, Rajandream MA, McKeever D, Shiels B, Tait A, Barrell B, Hall N. Genome of the host-cell transforming parasite *Theileria annulata* compared with *T. parva*. Science 2005;309(5731):131-3.

Pettersson E, Lundeberg J, Ahmadian A. Generations of sequencing technologies. Genomics 2009; 93(2):105–11.

Pipano E, Weishman Y, Benado A. The virulence of four local strains of *Theileria annulata*. Refuah Veterinarith 1974;23: 186-194.

Pipano E. Schizonts and tick stage in immunization against *Theileria annulata* infection. In: Irvin, A.D., Cunningham, M.P., Young, A.S. (Eds.), Advances in the control of theileriosis. Martinus Nijhoff Publishers The Hague 1981; pp. 242-252.

Pipano E. *Theileria annulata* theileriosis in infectious diseases of livestock with special reference to southern Africa. Volume Section Two, Chapter 34, Oxford University, Cape Town 1994.

Pipano E, Shkap V. *Theileria annulata* infection, in Infectious Diseases of Livestock, ed. Coetzer JAW and Tustin RC. Oxford University Press 2006. p. 486-497.

Prasanth, C.S., Jagannath, M.S., Rajasekhar, M. and Rahman, S.A. Transfer and persistence of maternal antibodies against *Theileria annulata* in calves. Indian Journal of Animal Sciences 1995;65: 492-496.

Pumpaiboll T, Arnathau C, Durand P, Kanchanakhan N, Siripoon N, Suegorn A, Sittiamorn C, Renaud F, Harnyuttanakorn P. Genetic diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* in Thailand, a low transmission country. *Malaria Journal* 2009; 8:155.

Purnell RE. *Theileria annulata* as a hazard to cattle in countries on the northern mediterranean littoral. *Veterinary Science Communications* 2, Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing Company 1978. p. 3-10.

Rafiyi A, Maghami G, Houshmand P. On the virulence of *Theileria annulata* (Dschunkowsky and Luhs 1904) and the premunition against bovine theileriosis in Iran, *Bulletin Of International Epizootiology* 1965;64: 431-446.

Razakandrainibe FG, Durand P, Koella JC, de Meeus T, Rousset F, Ayala FJ, Renaud F. 'Clonal' population structure of the malaria agent *Plasmodium falciparum* in high-infection regions. *Proc Natl Academy Science USA* 2005;102: 17388-17393.

Robinson PM. *Theileria annulata* and its transmission-a review. *Tropical Animal Health Production* 1982;14, 3-12.

Sander AF, Lavstsen T, Rask TS, Lisby M, Salanti A, Fordyce SL, Jespersen JS, Carter R, Deitsch KW, Theander TG, Pedersen AG, Arnot DE. DNA secondary structures are associated with recombination in major *Plasmodium falciparum* variable surface antigen gene families. *Nucleic Acids Research* 2014;42: 2270-81.

Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* 1975;94(3):441-8.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230(4732): 1350-1354.

Schein E, Buscher G, Friedhoff KT. Light microscopic studies on the development of *Theileria annulata* (Dschunkowsky and Luhs, 1904) in *Hyalomma anatolicum excavatum* (Koch, 1844). I. The development in the gut of engorged nymphs (author's transl). *Zeitschrift für Parasitenkunde (Berlin,Almanya)* 1978;48: 123-136.

Schmid G, Samuelson J, Rowley JT. Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections. *Dünya Sağlık Organizasyonu Geneva, Switzerland* 2011.

Schnittger L, Katzer F, Biermann R, Shayan P, Boguslawski K, McKellar S, Beyer D, Shiels BR, Ahmed JS. Characterisation of a polymorphic *Theileria annulata* surface protein (TaSP) closely related to PIM of *Theileria parva*: implications for use in diagnostic tests and subunit vaccines. *Molecular Biochemistry of Parasitology* 2002;120:247-256.

Schlotterer C. Evolutionary Dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 2000;109:365-371.

Schneider I, Haller D, Kullmann B, Beyer D, Ahmed JS, Seitzer U. Identification, molecular characterization and subcellular localization of a *Theileria annulata* parasite protein secreted into the host cell cytoplasm. *Parasitology Research* 2007;101: 1471-1482.

Seitzer U, Ahmed J. Tropical theileriosis: cytotoxic T lymphocyte response to vaccination. *Vaccine* 2008;26; (Supp.6.) G24-G28.

Sergent E, Donatien AL, Parrot LM and Lestoquard F. Transmission de la piroplasmose bovine a *Theileria* dispar, de l'Afrique du Nord, par la tique *Hyalomma mauritanicum*. *Compte Rendue de l'Academie des Sciences* 1928;187: 259-260

Sergent E, Donatien A, Parrot L, Lestoquard F. Etudes sur les piroplasmoses bovines. Institut Pasteur d'Algeria 1945. p. 264.

Shaw M K. *Theileria*. Kluwer Academic Publishers, United States of America 2002. p. 1-2, 7-11.

Shiels B, McDougall C, Tait A, Brown CG. Antigenic diversity of *Theileria annulata* macroschizonts. *Veterinary Parasitology* 1986;21:1-10.

Shiels BR, d'Oliveira C, McKellar S, Ben Miled L, Kawazu S, Hide G. Selection of diversity at putative glycosylation sites in the immunodominant merozoite/piroplasm surface antigen of *Theileria* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1995;72: 149-162.

Shiels B, Langsley G, Weir W, Pain A, McKellar S, Dobbelaere D. Alteration of host cell phenotype by *Theileria annulata* and *Theileria parva*: mining for manipulators in the parasite genomes. *International Journal for Parasitology* 2006;36: 9-21.

Simo G, Njiokou F, Tume C, Lueong S, De Meeûs T, Cuny G, Asonganyi T. Population genetic structure of Central African *Trypanosoma brucei gambiense* isolates using microsatellite DNA markers. *Infection Genetics and Evolution* 2010;10: 68 –76.

Singh DK, Thakur M, Raghav PR, Varshney BC. Chemotherapeutic trials with four drugs in crossbred calves experimentally infected with *Theileria annulata*. *Research in Veterinary Science* 1993;54: 68-71.

Sivakumar T, Hayashida K, Sugimoto C, Yokoyama N. Evolution and genetic diversity of *Theileria*. *Infection Genetic Evolution* 2014;4: 250-263.

Su X, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, Peterson DS, Ravetch JA, Wellems TE. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* 1995;82: 89-100.

Uilenberg G. Theilerial species of domestic livestock, in *Advances in the Control of Theileriosis*. ed. Irvin AD, Cunningham MP, and Young AS, Martinus Nijhoff, The Hague 1981; p. 4-37.

Walker AR, McKellar SB, Bell LJ, Brown CG. Rapid quantitative assesment of *Theileria* infection in ticks. *Tropical Animal Health Prod* 1979;11: 21-26.

Walker AR ve McKellar SB. The maturation of *Theileria annulata* in *Hyalomma anatolicum anatolicum* stimulated by incubation or feding to produce sporozoites. *Veterinary Parasitology* 1983;13: 13-21.

Walker AR, Katzer F, Ngugi D, McKeever D. Cloned *T.parva* produces lesser infection in ticks compared to uncloned *T.parva* despite similar infections in cattle. *Onderstepoort Journal of Veterinaire Research* 2006;73 (2): 157-162.

Weir W. Genomic and population genetic studies on *Theileria annulata*. PhD thesis, University of Glasgow 2006.

Weir W, Ben Miled L, Karagenc T, Katzer F, Darghouth M, Shiels B, Tait A. Genetic exchange and sub-structuring in *Theileria annulata* populations, *Molecular Biochemistry Parasitology* 2007;154,170-180.

Weir W, Karagenc T, Baird M, Tait A, Shiels BR. Evolution and diversity of secretome genes in the apicomplexan parasite *Theileria annulata*. *BMC Genomics* 2010;11,42.

Weir W, Karagenc T, Gharbi M, Simuunza M, Aypak S, Aysul N, Darghouth MA, Shiels B, Tait A. Population diversity and multiplicity of infection in *Theileria annulata*. *International Journal for Parasitology* 2011;41:193-203.

Wilkowsky S, Farber M, Gil G, Echaide I, Mosqueda J, Alcaraz E, Suarez CE, Florin M. Molecular characterisation of *Babesia bovis* strains using PCR restriction fragment polymorphism analysis of the msa2-a/b genes. *Newyork Academy Science* 2008;1149,141-144.

Williamson S, Tait A, Brown D, Walker A, Beck P, Shiels B, Fletcher J, Hall R. *Theileria annulata* sporozoite surface antigen expressed in *Escherichia coli* elicits neutralizing antibody. *Academic Science USA* 1986;86:4639-4643.

Young AS, Mutugi JJ, Kariuki DP, Lampard D, Maritim AC, Ngumi PN, Linyonyi A, Leitch BL, Ndungu SG, Lesan AC. Immunisation of cattle against theileriosis in Nakuru District of Kenya by infection and treatment and the introduction of unconventional tick control. *Veterinary Parasitology* 1992;42: 225-240.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Aydın'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimini Aydın'da tamamladım. 2003 yılında Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümüne kayıt oldum. 2007 yılında lisans düzeyinde mezun olduktan sonra, aynı yıl Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji (Veteriner) Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladım. Yüksek Lisans eğitimim ardından yine aynı Anabilim Dalı'nda doktora programına başladım. Askerlik görevimi yedek subay olarak Ardahan'da yaptım. Evliyim.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmasında kullandığım malzeme, cihaz ve araştırma bursunu sağlayan TUBİTAK 1110718 numaralı projeye ve bu projede emeği geçen çok değerli hocalarıma ve yardımcı olan herkese teşekkür ederim.

Saygılarımla,
Ahmet Hakan ÜNLÜ