

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
SAE-09004

Theileria annulata' NİN
TA15705 PROTEİNİNİN KARAKTERİZASYONU VE
AP-1 AKTİVASYONUNDAKİ ROLÜNÜN
BELİRLENMESİ

HAZIRLAYAN: Biyolog Ahmet Hakan ÜNLÜ

DANIŞMAN: Prof. Dr. Hasan EREN

AYDIN-2010

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

Parazitoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Biyolog Ahmet Hakan ÜNLÜ tarafından hazırlanan “*Theileria annulata*’ nın TA15705 proteininin karakterizasyonu ve AP-1 aktivasyonundaki rolünün belirlenmesi” başlıklı tez, 12/01/2010 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası:

Prof.Dr. Hasan EREN (Başkan)

ADÜ Veteriner Fakültesi

Doç.Dr. Tülin KARAGENÇ

ADÜ Veteriner Fakültesi

Prof.Dr. Sema ERTUĞ

ADÜ Tıp Fakültesi

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans Tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla .../.../..... tarihinde onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

Doç.Dr. Muharrem BALKAYA

ÖZET

Zorunlu hücre-içi protozoon olan *Theileria annulata* apicomplexa filumunda yer alır ve sığırlarda tropikal theileriosis'in (Tropical Theileriosis) etkenidir. *T. annulata*'nın vektörü *Hyalomma* soyuna ait kenelerdir. *Theileria* sporozoitleri sığırların lökosit hücrelerine girerek çok çekirdekli şizont formunu oluştururlar ve enfekte ettiği konak hücrenin metabolik aktivitesini değiştirirler. Enfekte lökositler apoptosize uğramazlar, kanser hücreleri gibi kontrolsüz olarak çoğalırlar.

AP-1 transkripsiyon faktörü farklılaşma, çoğalma ve apoptozis gibi birçok hücrel işlemleri kontrol eder. AP-1, *Theileria* ile enfekte lökositlerin transformasyonunda rol oynamaktadır.

T. annulata makroşizontu tarafından eksprese olan Ta9 olarak bilinen TA15705 proteini sitotoksik T hücreleri ve B hücreleri tarafından tanınmaktadır. Bu çalışma, Eylül 2008-Ekim 2009 tarihleri arasında TA15705 proteininin karakterize edilmesi ve aynı proteinin parazit tarafından indüklenen AP-1 aktivasyonundaki rolünün belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu çalışma ile TA15705 proteininin *Theileria* ile enfekte hücrelerin transformasyonunda rol oynayan AP-1 transkripsiyon faktörünün aktivasyonunu indüklediği belirlenmiştir. Ayrıca TA15705 proteininin enfekte B lenfosit ve makrofaj hücrelerinin sitozolünde ve daha yoğun olarak parazitin hücre içinde yerleştiği bölgelerde lokalizasyon gösterdiği saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: TA15705, AP-1, *Theileria annulata*, Apoptozis

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
KABUL ve ONAY	i
ÖZET	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
EKLER DİZİNİ	viii
1.GİRİŞ	1
1.1. <i>Theileria annulata</i>	1
1.2. <i>T. annulata</i> 'nın Morfolojisi	2
1.3. <i>T. annulata</i> 'nın Biyolojisi	4
1.4. Tropikal Theileriosis'de Tanı ve Tedavi	5
1.5. <i>Theileria</i> 'nın Meydana Getirdiği Transformasyon	6
1.6. AP-1	9
1.7. Enfekte Hücrelerdeki AP-1 Aktivasyonu	11
1.8. <i>Theileria annulata</i> 'nın Genomu	12
1.9. TA15705 (Ta9)	12
2. GEREÇ VE YÖNTEM	14
2.1. Plazmid Vektör pcDNA3	14
2.1.1. Mutajenik Oligonükleotid Primerler	14
2.1.2. Mutant İplik Sentez Reaksiyonu	15
2.1.3. Döngüsel Parametreler	16

2.1.4. Çoğaltılan Ürünlerin <i>Dpn</i> I Enzimi ile Kesimi	16
2.1.5. DH5 α Kompetend Hücrelerin Transformasyonu ve MiniPrep Protokolü	16
2.1.6. pLHC _{M3} -EGFP-TA15705 (1008, 303, 879bp) Plazmidinin Geliştirilmesi	17
2.2.1. TA15705 ve Alt Klonları İçin Primer Dizaynı	18
2.2.2. TA15705 Klonlarının Çoğaltılması	18
2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi ve Pürifikasyonu	20
2.2.4. Restriksiyon Kesimi	20
2.2.5. Bağlanma	21
2.2.6. DH5 α <i>E. coli</i> Kolonilerinin Analizi	21
2.3. Hücre Kültürleri	21
2.3.1. <i>T. annulata</i> İle Enfekte Olan ve Olmayan Sığır Lenfosit Hücre Kültürleri	21
2.3.2. <i>T. annulata</i> İle Enfekte Olan Makrofaj Hücre Kültürü	22
2.3.3. HEK293 T Hücre Kültürü	22
2.4. Kontrol Plazmidleri, Raportör Plazmidler ve Ekspresyon Vektörleri	23
2.4.1. pcDNA3 (Negatif Kontrol)	23
2.4.2. RSV-cJun (Pozitif Kontrol)	23
2.4.3. pGL2 Lusiferaz Promotör)	23
2.4.4. 3xTRE-Luc (AP-1 Lusiferaz Raportör)	23
2.4.5. pUHD16-1	24
2.4.6. Ekspresyon Vektörleri	24
2.5. Transfeksiyonda Kullanılan Bileşenler	24
2.6. Kalsiyum Fosfat Transfeksiyonu ve HEK293 T Hücrelerinin Lizizi	25
2.7. β -Galaktozidaz Aktivitesi Ölçümü	26

2.8. Lusiferaz Aktivitesi Ölçümü	26
2.9. TBL3 ve BL3 Hücrelerinin Lizisi	27
2.10. Western Blot	27
2.10.1. SDS-PAGE Analizi	27
2.10.2. Elektroforetik Transfer	28
2.10.3. İmmunoblotlama	28
2.11. Antikor Purifikasyonu ve İşaretlenmesi	29
2.12. Paraformaldehit Fiksasyonu	30
3. BULGULAR	32
3.1. TA15705 ve Alt Klonlarının PCR Sonuçları	32
3.2. TA15705-GFP İşaretli Klonlar	33
3.3. AP-1 Aktivitesi Transfeksiyon Sonuçları	34
3.4. Western Blot Sonuçları	35
3.5. Ta9'un Hücre İçindeki Lokalizasyonu	38
4. TARTIŞMA	39
5. SONUÇ	42
ÖZET	43
SUMMARY	44
EKLER	45
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	53
TEŞEKKÜR	54

ŞEKİL DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. <i>Theileria annulata</i> 'nın coğrafi dağılımı	2
Şekil 1.2. <i>Theileria annulata</i> 'nın lenfosit içerisindeki makroşizont formları	3
Şekil 1.3. <i>Theileria annulata</i> 'nın eritrosit içindeki piroplazmik formları	3
Şekil 1.4. <i>T. annulata</i> 'nın hayat döngüsü	4
Şekil 1.5. Proliferasyon, apoptozis ve metastaz	8
Şekil 1.6. AP-1 transkripsiyon faktörü, DNA'ya bağlanan dimer kısımlarının gösterilmesi	10
Şekil 1.7. TA15705 ile ilgili genel bilgiler	13
Şekil 2. TA15705 ve alt klonları.	17
Şekil 3.1. A. Ta9 1008bp, B. Ta9 879bp ve C. Ta9 303bp PCR sonuçları	32
Şekil 3.2. TA9-GFP ürünleri	33
Şekil 3.3. AP-1 aktivitesi transfeksiyon sonuçları	35
Şekil 3.4. <i>T. annulata</i> immün serum ve Ta9 GFP gen klonları ile yapılan Western blot	36
Şekil 3.5. Ta9 pürifiye antikorlar ve Ta9-GFP hücre ekstraktı ile yapılan Western blot	36
Şekil 3.6. Bw720c ile muamele edilmiş ve edilmemiş TBL3 hücrelerindeki Ta9 seviyeleri	37
Şekil 3.7. Ta9'un hücre içindeki lokalizasyonu	38

ÇİZELGE DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 1. <i>Theileria</i> tarafından indüklenen AP-1 ekspresyonu	11
Çizelge 2.1. Mutajenik primerler	15
Çizelge 2.2. Mutant iplik sentez reaksiyonu	15
Çizelge 2.3. Mutant sentez reaksiyonu sıcaklık ve zaman parametreleri	16
Çizelge 2.4. TA15705 ve alt klonları için primerler	18
Çizelge 2.5. TA15705 için PCR reaksiyonu bileşenleri	19
Çizelge 2.6. TA15705 303bp için PCR reaksiyonu	19
Çizelge 2.7. TA15705 1008bp ve 879bp için PCR reaksiyonu	20
Çizelge 3.1. Firefly lusiferaz/ β -galaktozidaz oranları	34

EKLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Ek A. TA15705'in sekans analizi	45
Ek B. Vektörler	46
Ek B.1. pLHC _{M3} plazmid	46
Ek B.2. pCDNA3	48

1. GİRİŞ

1.1. *Theileria annulata*

Bir protozoon olan *Theileria annulata* sığırlarda tropikal theileriosis'in etkenidir. Hastalık; sığırlarda verim kaybına, ölümlere ve buna bağlı olarak büyük ekonomik kayıplara neden olmakta ve kültür ırkı sığırlarda daha şiddetli seyretmektedir. *T. annulata*'nın sistematikteki yeri aşağıda gösterilmiştir (Eckert ve ark 1992).

Alem: Animale

Alem altı: Protozoa

Anaç: Apikomplexa

Sınıf: Sporozoea

Sınıf altı: Piroplassmia

Dizi: Piroplassmida

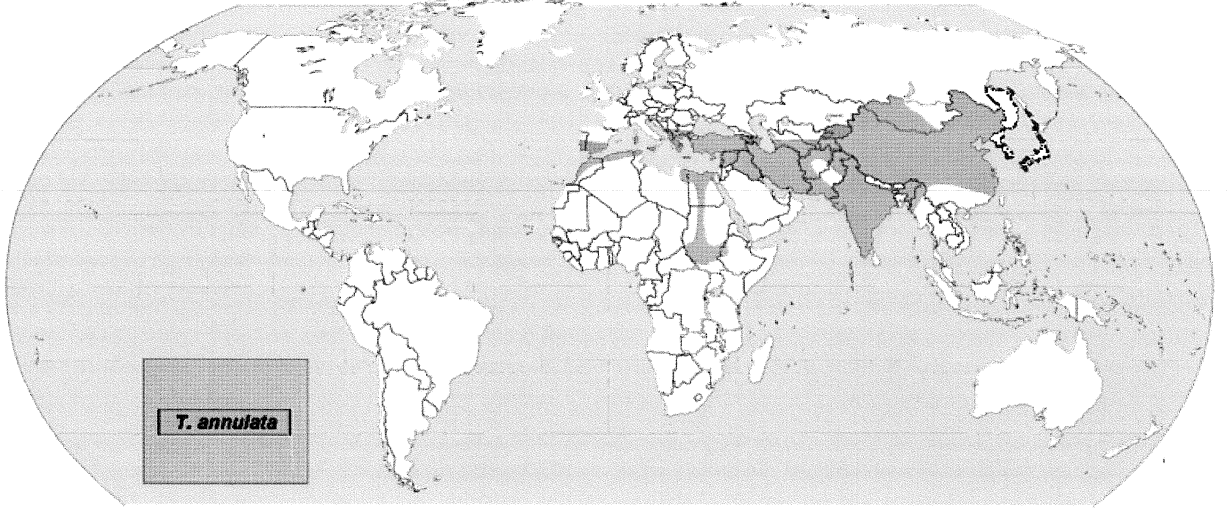
Aile: Theileriidae

Soy: *Theileria*

Tür: *T. annulata*

Theileria annulata Kuzey Afrika, Akdeniz ve Asya'da geniş bir yayılım göstermektedir (Şekil 1.1). Hastalığın bu kadar geniş bir coğrafya içinde görülmesinde çevre koşullarının *T. annulata*'nın vektörü olan *Hyalomma* soyuna bağlı Ixodid keneler için uygun olmasından

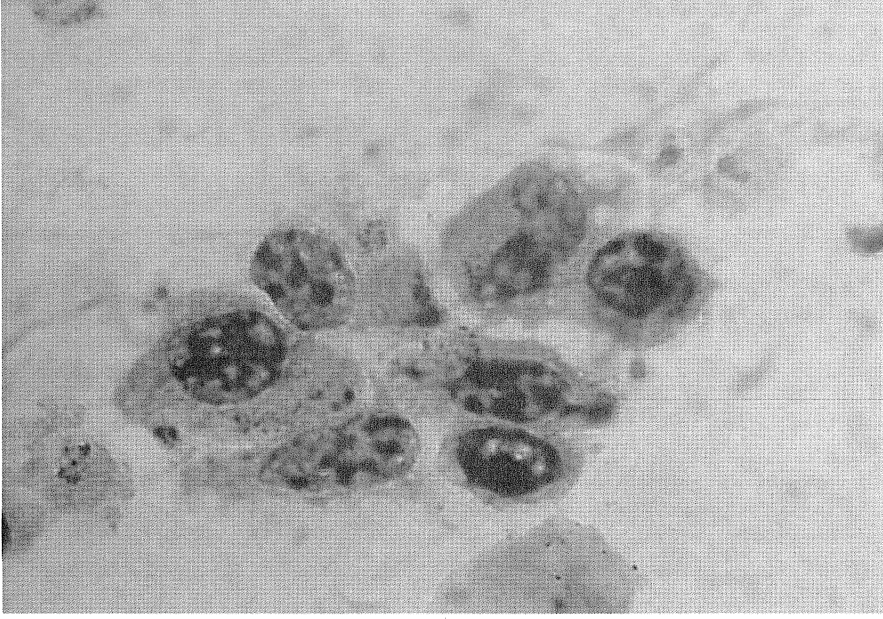
kaynaklanır (Purnell 1978). Keneler tarafından nakledilen hastalıklar tropikal ve ılıman bölgelerde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (de Castro 1997).



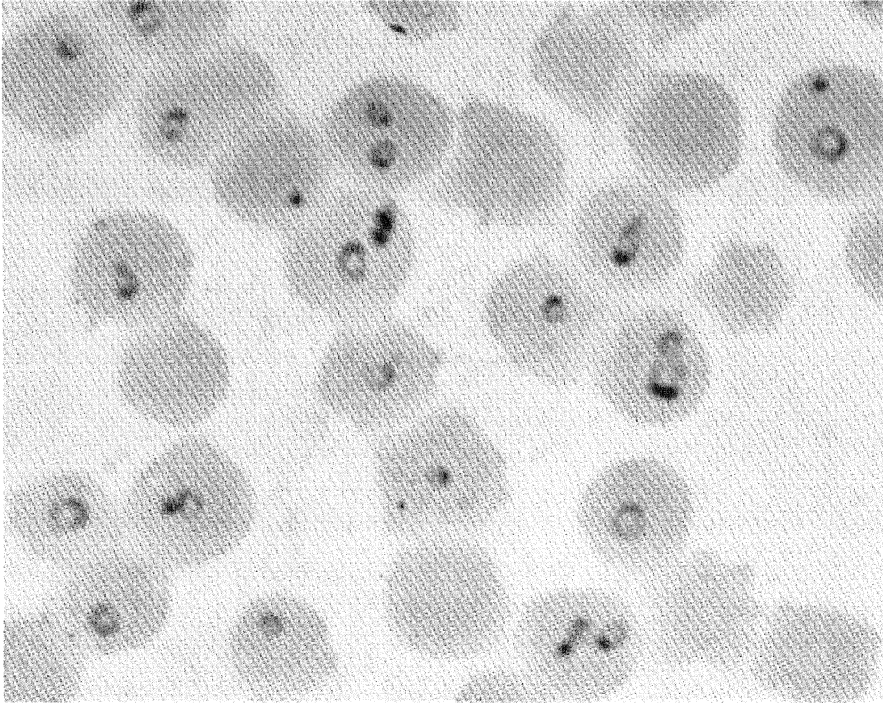
Şekil 1.1. *T. annulata* 'nın coğrafi dağılımı (<http://www.cfsph.iastate.edu>)

1.1. *T. annulata* 'nın Morfolojisi

Theileria annulata 'nın şizont (Şekil 1.2) ve piroplazma (Şekil 1.3) (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. Piroplazma formlarının çoğu (%70-80) oval, yuvarlak veya yüzük şeklindedir. Geri kalan etkenlerin çoğu toplu iğne veya virgül şeklindedir. Oval olanlar 2x0.6 μm boyutundadır. Bir eritrositte birden fazla etken görülebilmektedir.



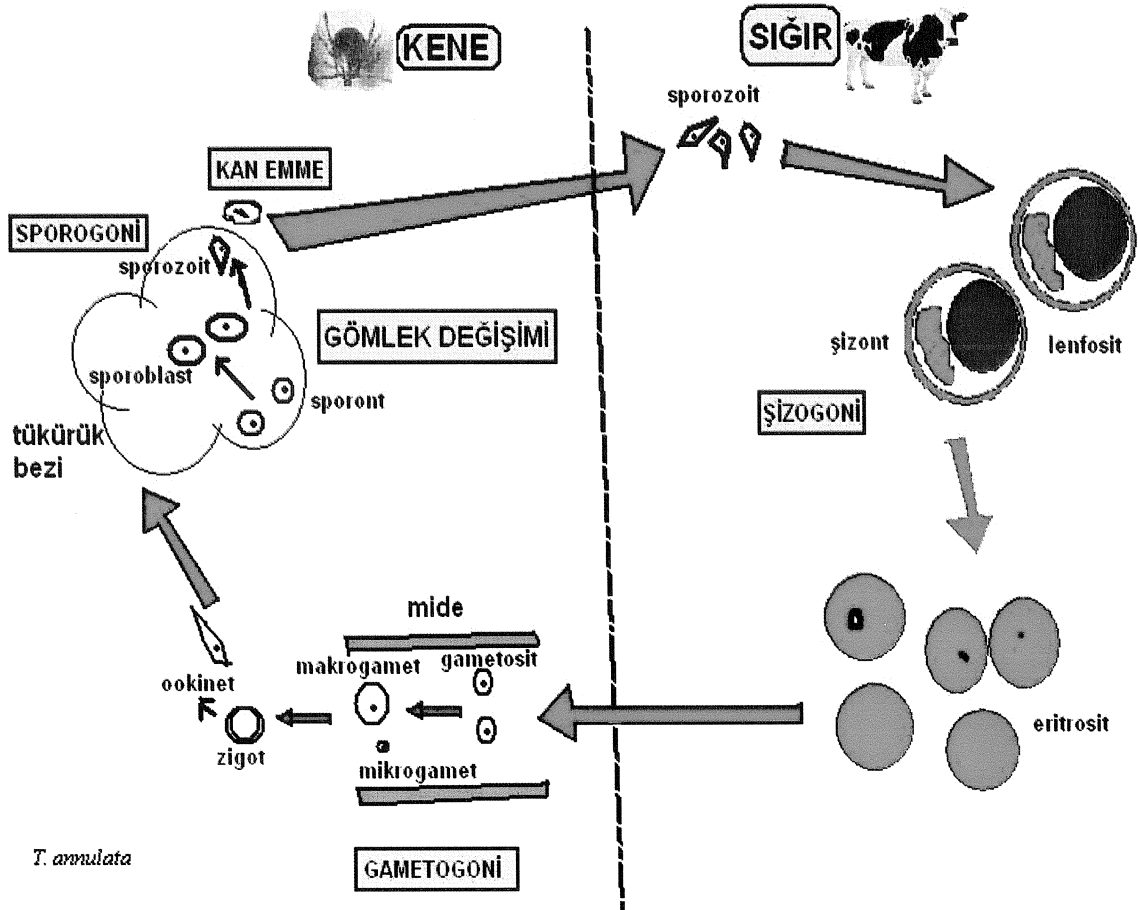
Şekil 1.2. *Theileria annulata*'nın lenfosit içerisindeki makroşizont formları (Orjinal).



Şekil 1.3. *Theileria annulata*'nın eritrosit içindeki piroplazmik formları (Kauffman, 1996).

1.3. *Theileria annulata*'nın Biyolojisi

Theileria'nın kene ve ruminantlarda birbirinden morfolojik olarak farklı gelişme basamaklarını içeren kompleks bir hayat döngüsü vardır (Şekil 1.4). Farklı *Theileria* türlerinin biyolojisindeki farklılıklar gelişme basamaklarının zamanlamasında ve replikasyon seviyesinde gerçekleşmektedir (Shaw 2002). *Theileria* cinsine ait türlerin vektörü Ixodidae (sert kene) keneleridir. Tropikal theileriosis'in yayılmasında 15 adet *Hyalomma* cinsine ait tür olduğu saptanmıştır (Robinson 1982).



Şekil 1.4. *Theileria annulata*'nın hayat döngüsü (Orijinal).

Theileria annulata'nın hayat döngüsü; omurgalı konakta şizogoni ve merogoni ve ara konak olan kenelerde gametogoni ve sporogoni dönemlerinden oluşmaktadır. Vektör kene, enfekte bir hayvandan kan emme esnasında eritrositlerle birlikte sporozoitleri de alır. Alınan eritrositler kene barsağında lize olur ve etkenler açığa çıkar. Burada gametositler oluşur. Mikrogamontların her birinden bölünmeyle 4 adet mikrogamet meydana gelir. Makrogamont ise bölünmeden gelişir ve makrogameti oluşturur. Kene barsağında mikrogamet makrogameti döller ve zigot oluşur. Zigot içerisinde birkaç günde kinet gelişir ve olgunlaşan kinet zigotu terk eder. Barsak zarını delen kinet hemolenf yoluyla tükürük bezi hücrelerine girerek sporont formunu alır ve sporonttan sporoblast oluşur (*T. 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 gereklidir. Bu sırada kene duyarlı bir konaktan kan emerse eşeysiz bölünme olan sporogoni ile binlerce sporozoit meydana gelir. Sporozoitler kenenin tükürük kanallarına gelir ve kan emdiği duyarlı konağa ikinci veya üçüncü günlerde verilir. Memeli konağa aktarılan sporozoitler lenfoid hücrelere giriş yaparak burada çok çekirdekli sinsitiyal şizont formunu alır. Bu aşama aynı zamanda hücre transformasyonu ve proliferasyonun indüklendiği safhadır (Shaw 2002). Şizontlar merozoitlere farklılaşarak eritrositlere yerleşir ve vektör kenenin memeli konaktan kan emmesi ile hayat döngüsü devam eder.

1.4. Tropikal Theileriosis'de Tanı ve Tedavi

Tropikal theileriosis'in inkübasyon periyodu yaklaşık 9-25 gündür. Hastalığın genel belirtileri yüksek ateş, lenf yumrularının şişmesi, anemi, mukozalarda peteşiyal kanamalar ve seröz burun akıntısıdır. *Theileria annulata*; B lenfosit hücrelerini ve monositleri enfekte etmektedir (Baldwin ve ark 1988). Transform 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 1999).

Hastalığın tanısında kan frotesinin giemsa ile boyanması ve lenf ya da karaciğer biyopsisinde şizontların veya kanda piroplazmik formlarının görülmesi ile mikroskopik bakıda tanıya gidilebilir (Pipano 1994, Sergent 1945). Ayrıca tanıda Immuno Floresan Antikor Testi (IFAT) testi kullanılmaktadır. IFA testinin mikroskopik olarak kan frotilerinde piroplazmların belirlenmesine oranla daha iyi bir yöntem olduğu gösterilmiştir (Darghouth ve ark 1996). Tanıda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Reverse Line Blotting (RLB) moleküler teşhis yöntemlerinden de yararlanılmaktadır.

Kene larvası antijeni enjekte edilen hayvanlarda parazit gelişiminin yavaşladığı belirlenmiştir (Wagner ve ark 1974). Hastalığın tedavisinde, theilerisidal ilaçların kullanımıyla; Buparvaquone (Bw720c) ve Parvaquone sırasıyla 90% ve 80% iyileştirme oranlarına sahip oldukları belirlenmiştir (Muraguri ve ark 1999).

1.5. *Theileria*'nın Meydana Getirdiği Transformasyon

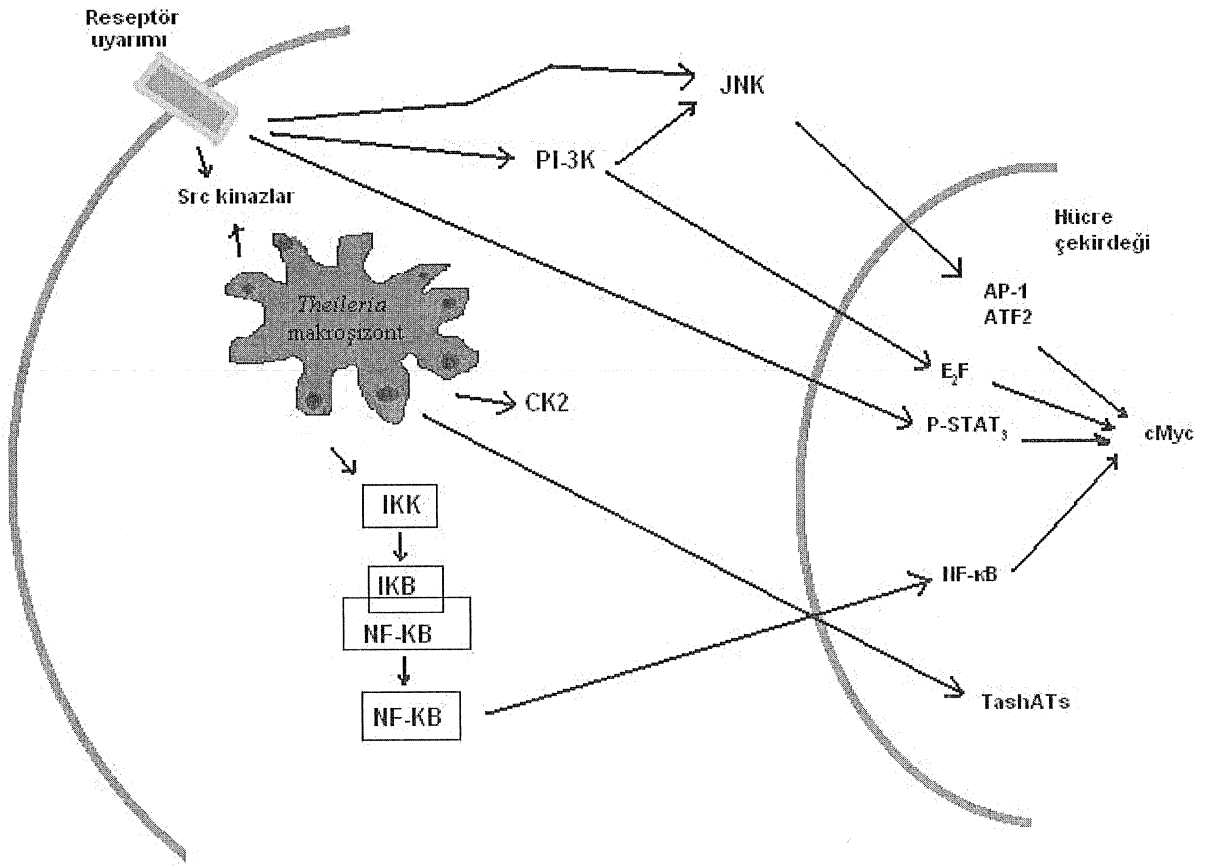
Hücre içerisine giren *Theileria* paraziti yaşamını sürdürebilmesi için konak hücre sinyal ara yollarını kontrol altına almalıdır. Bu sinyal moleküllerinin aktivasyonu yada ifade edilmesi hücrenin transformasyon işleminin gerçekleşmesine katkıda bulunmaktadır. Parazit enfekte olan hücrelerin tamamen transforme olmuş hale gelmesi için dört ana olay gerçekleşmelidir (Heussler 2002);

- Hücre dışından gelen büyüme uyarıcı sinyallere karşı bağımsız olmalıdır
- Tümör baskılayıcı protein aktivitesine karşı dirençli hale gelmelidir
- Programlı hücre ölümüne (apoptozis) karşı direnç geliştirmelidir
- Sınırsız çoğalma kapasitesi elde etmelidir

Parazit, spesifik konak hücre faktörlerini aktive ederek sınırsız hücre bölünmesine ve konak hücrenin ölümsüz bir fenotip özelliği kazanmasına neden olmaktadır. *Theileria annulata*'nın ve *Theileria parva*'nın şizont formlarının benzersiz bir özelliği, parazit DNA'sının konak hücre genomuna dahil olmadan transformasyona neden olmasıdır. Bu olay, parazit ve enfekte hücrenin sürekli proliferasyonuna neden olmaktadır (Spooner ve ark 1989). Paraziti öldürmeye yönelik olarak kullanılan buparvaquone ile transformasyon tamamen geri döndürülebilir özelliktedir (Rintelen ve ark 1990). *Theileria* diğer bir ökaryot hücreyi transforme etme özelliğine sahip olan tek ökaryottur (Shiels ve ark 2006).

Theileria tarafından indüklenen lökosit transformasyonuna neden olan birçok faktör bulunmaktadır. *Theileria annulata* ve *Theileria 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 lokalize olmuştur ve nasıl bir mekanizma ile etki ettiği tam olarak bilinmesede konak hücre proliferasyonuna, apoptozise ve değişmiş gen ifadesine öncülük ettiği düşünülmektedir.

Kinazlar ve fosfatazlar replikasyon ve hücre döngüsü kontrolü gibi hücresel aktivasyonlarda anahtar rolü üstlenen düzenleyici olarak görev almaktadırlar. Bunların aktiviteleri yeniden düzenlendiğinde kontrolsüz hücre bölünmesi ve tümör oluşumu meydana gelmektedir. *Theileria*'ya ait kinaz ve fosfatazlar, konak hücrenin sitoplazmasına dağılarak fosforilasyon olaylarını etkiler ve konak hücre transformasyonuna neden olurlar (Şekil 1.5) (Shiels ve ark 2006).



Şekil 1.5. Proliferasyon, apoptozis ve metastaz (Shiels ve ark 2006)

Kazein Kinaz 2 (CK2), *Theileria* tarafından indüklenen lökosit transformasyonunda önemli bir rol üstlenmektedir. CK2 aktivasyonu ile kaspaz enzimi ifadesi baskılanarak apoptozis engellenmektedir. Ayrıca Tümör Nekroz Faktör-alfa (TNF- α) ve büyüme faktörleri gibi sitokinlerin uyarımı CK2 aktivasyonu ile gerçekleşmektedir (Dessaige ve ark 2005). Fosfoinositid-3 Kinaz (PI3K)/ Protein kinaz B (PKB) arayolu hücre proliferasyonunu düzenleyen ve membran yüzey reseptörleriyle aktive olan bir uyarım yoludur. PI3K/PKB aktivasyonu *Theileria* ile enfekte lökosit proliferasyonunda rol oynamaktadır (Heussler 2002). *Theileria annulata* makroşizontu tarafından salgılanan *Theileria annulata* şizont AT hook (TashAT) polipeptidi konak hücrenin çekirdeğine yerleşir ve yerleştiği hücrenin proliferasyonunu düzenler (Shiels ve ark 2006). *Theileria* makroşizontu ile enfekte lenfosit hücrelerinde Çekirdek Faktör- kappaB (NF- κ B) ara yolu sürekli olarak aktif durumdadır. Hücre döngüsüne etki eden protein ifadesinin düzenlenmesinde ve bunun sonucu olarak hücre

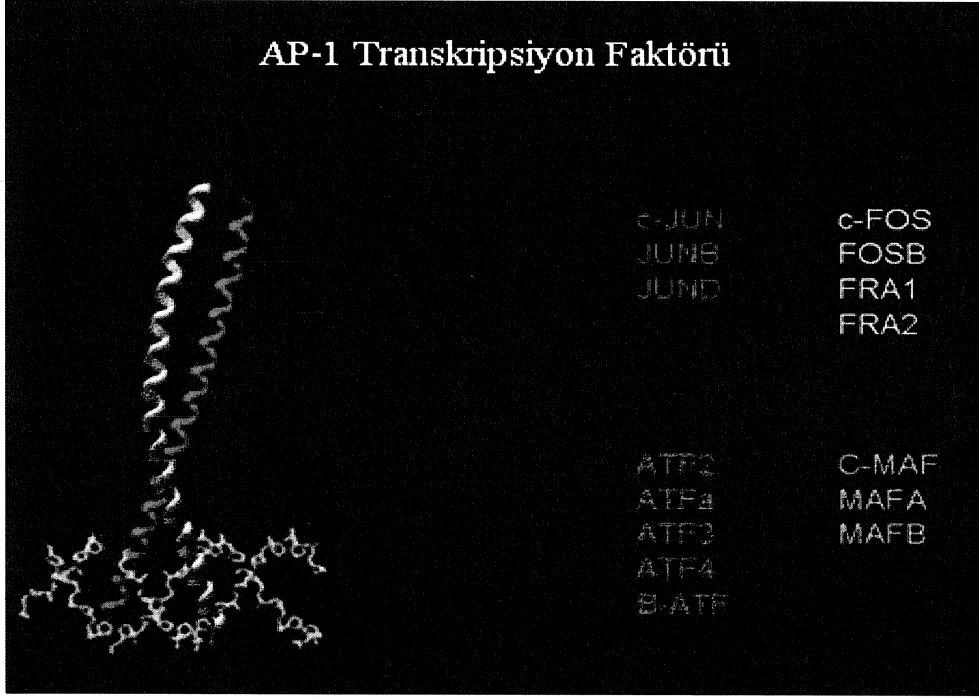
proliferasyonunda rol alır. Ayrıca, anti-apoptotik proteinlerin genlerinin transkripsiyonunu sağlayan önemli bir rol üstlenmektedir. NF- κ B hücre sitoplazmasında inhibitör proteinlerin bir ailesi olan NF- κ B inhibitörü (I κ B) adı verilen proteine bağlı olarak inaktif halde bulunmaktadır. Hücre içi patojen varlığı veya hücre stresi meydana geldiğinde I κ B kinaz (IKK) ile fosforillenen inhibitör protein I κ B yıkıma uğrar ve NF- κ B serbest hale gelerek lenfosit çekirdeğinin spesifik DNA bölgesine bağlanır. Bu şekilde ilgili gen bölgesini aktive ederek hücre döngüsünü düzenleyen proteinlerin ve anti-apoptotik proteinlerin transkripsiyonunu başlatır ve hücreye ölümsüz bir fenotip kazandırır (Heussler, 2002). Enfekte hücrelerin apoptozis ile ölümünde hücre miyelositomatozis onkogen (c-Myc) ve NF- κ B transkripsiyon faktörlerinin rol oynadıkları belirlenmiştir (Dessaige ve ark 2004, Heussler 2002). Aktivatör protein 1 (AP-1) ve aktive edici transkripsiyon faktör 2 (ATF 2) transkripsiyon faktörlerini düzenleyen arayolların *Theileria* ile transforme olmuş lenfositlerde aktive edildiği bulunmuştur (Lizundia ve ark 2005).

Transformasyon mekanizmasında rol oynayan faktörler kapsamlı olarak çalışılmaktadır. Burada bahsi geçen arayollar ve daha fazlası doğrudan ya da dolaylı olarak birbirleri ile etkileşim halindedir. Faktörler alınan uyarana göre ters olarakta işlev yapabilir. Örneğin; c-Jun N terminal kinaz (JNK) doğrudan E2F transkripsiyon faktörü ile etkileşime geçerek onu inaktive edebilir ve hücre proliferasyonu ile ilgili genlerin transkripsiyonunu engelleyebilir hem de AP-1 aktivasyonunu indükleyerek hücre proliferasyonunu arttırabilir (Kishore ve ark 2003).

1.6. AP-1

Aktivatör protein-1 (AP-1) heterodimer yapısına sahip c-Fos, c-Jun, ATF ve JDP protein ailelerine ait bir transkripsiyon faktörüdür (Şekil 1.6.). Bu transkripsiyon faktörü stres durumlarında, bakteriyel ve viral enfeksiyonlarda, büyüme faktörleri ve sitokinleride içeren birçok uyarana karşı cevap vermek için gen ifadesini düzenlemektedir. AP-1 farklılaşma, çoğalma, apoptozis ve transformasyon gibi birçok hücresel olayı içeren mekanizmaları kontrol

etmektedir. ATF ve MAF transkripsiyon faktörleri ile birlikte bazik lösin fermuar protein ailesinin bir kısmını oluştururlar ve birçok patolojik ve fizyolojik uyarana karşı cevap verirler (Hess ve ark 2004).



Şekil 1.6. AP-1 transkripsiyon faktörü, DNA'ya bağlanan dimer kısımlarının gösterilmesi (www.paterson.man.ac.uk/images/cell_regulation/cellreg5.jpg).

AP-1, TPA (tetra dekanil-forbol-13-asetat) DNA response elementi (TRE; 5'-TGAG/CTCA-3') (Angel ve Karin 1991) içeren genlerin transkripsiyonunu düzenler ve DNA sekansına lösin fermuar motifinde bağlanır (Glover ve ark 1995). AP-1 içerisinde promotor sekansı barındırır ve buna bağlı olarak birçok genin; metalloproteinaz genleri, *fra1*, *c-jun*, *Rab11*, *c-fos* ve *c-myc* (Hess ve ark 2004) transkripsiyonunu düzenler. Böylece, AP-1 aktivasyonu farklı protein ailesine ait üyelerin arasındaki kombinasyonel etkileşimlerinin sonucu olmaktadır.

1.7. Enfekte Hücrelerdeki AP-1 Aktivasyonu

Theileria kaynaklı lökosit hücrelerinde meydana gelen transformasyon JNK ve AP-1 transkripsiyon faktörünün yapıcı aktivasyonu ile ilgilidir. Western blot analizi ile *Theileria* ile enfekte hücrelerde AP-1 ekspresyon profiline bakıldığında; parazit tarafından transforme olmuş lökosit hücrelerindeki AP-1 aktivasyonunun kalıcı JNK aktivitesine ve Jun ve Fos ailesi proteinlerinin gen ifadesinin artmasına bağlı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 1) (Chaussepied ve ark 1998). Burada ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK) ya da p38 gibi mitojen aktive edici protein kinazların gen ifadesinde bir artış görülmemiştir (Chaussepied ve Langsley 1996).

Çizelge 1. *Theileria* tarafından indüklenen AP-1 ekspresyonu (Chaussepied ve ark 1998)

	TBL3	THEI	BL3	
c-Jun	+++	++++	+	TBL3= <i>T. annulata</i> ile enfekte B lenfosit
JunB	+++	+++	+	THEI= <i>T. annulata</i> ile enfekte makrofaj
JunD	+++	+++	-	
c-Fos	+++	++	-	
Fra-1	++	+	-	BL3 = Enfekte olmayan B lenfosit
Fra-2	+	++	-	

AP-1 aktivasyonu ile metalloproteaz-9 (MMP9) gen transkripsiyonu indüklenir. MMP sıklıkla yayılma özelliği gösteren kanser hücrelerinde bulunur ve *T. annulata* ile enfekte hücrelerin yayılmasında rol oynamaktadır (Heussler 2002). AP-1 aktivasyonunun B lenfosit hücresi proliferasyonuna önemli bir etkisi bulunmamıştır (Lizundia ve ark 2006).

1.8. *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 gen vardır ve bu genlerin sadece 38%'nin fonksiyonu olduğu varsayılmaktadır (Pain ve ark 2005). *Theileria annulata*'nın genleri 86% oranında *Theileria parva*'nın genleriyle ortologdur. Parazit genlerinin sekansı sonucunda konak hücre transformasyonundan sorumlu olan *T. annulata* ve *T. parva*'nın genomlarının büyük ölçüde benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Gardner ve ark 2005, Pain ve ark 2005).

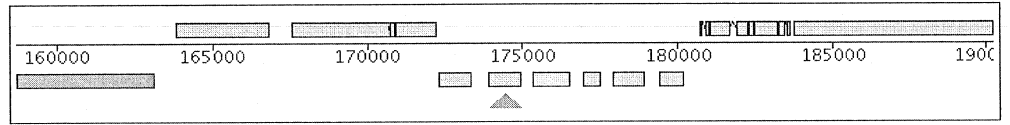
1.9. TA15705 (Ta9)

Theileria annulata'nın makroşizont formunda eksprese ettiği Ta9 olarak bilinen TA15705 proteininin koruyucu bağışık yanıtta rol oynayan sitotoksik T hücrelerinin (Ivan Morrison, yayınlanmamış veri) ve B hücrelerinin (William Weir, yayınlanmamış veri) hedefi olduğu gösterilmiştir. *Theileria annulata* genomu biyoinformatik teknikler kullanılarak incelendiğinde, ikinci kromozomun aynı lokusu üzerinde kümelenmiş genlerin ifade ettiği, TA15705'in de dahil olduğu beş adet paralog protein (TA15685, TA15690, TA15695, TA15710) bulunmuştur (Şekil 1.7) (www.genedb.org). TA15705 gibi paralog ailede yer alan diğer proteinlerinde sinyal peptide sahip olduğu tahmin edilmektedir ve bu yüzden *Theileria* tarafından indüklenen konak hücre transformasyonunda rol oynadıkları düşünülmektedir.

Genel Bilgiler

Sistematik İsmi	TA15705
Durumu	hypothetical protein
Tip	CDS
Lokasyon	
Kromozom	02
Klon sekansı	tann.chr02.genedb
Lokasyon	complement(173922..174929) uzunluk: 1008 bp
Ekzon	complement(173922..174929) (Spliced length: 1008 bp)

İçerik Haritası:



[TA15730](#) [TA15725](#) [TA15720](#) [TA15710](#) >[TA15705](#)< [TA15700](#) [TA15695](#) [TA15690](#) [TA15685](#) [TA15680](#) [TA15675](#)

Primary Annotation

chr2.cand.491 - signal peptide
secreted protein, putative

Signal peptide predicted for TA15705 by SignalP 2.0 HMM (Signal peptide probability 0.600, signal anchor probability 0.030) with cleavage site probability 0.264 between residues 18 and 19
expressed at macroschizont stage

Paralogue/Family

[TA15695](#) [TA15685](#) [TA15690](#) [TA15705](#) [TA15710](#)

Şekil 1.7. TA15705 ile ilgili genel bilgiler. (www.genedb.org)

Konak hücre apoptozisinin inhibe edilmesi ya da konak hücrenin kontrolsüz bölünmesinden sorumlu olan parazit kaynaklı faktörler hala tam olarak bilinmemektedir (Dobbelaere ve ark 2004, Heussler ve ark 2006, Plattner ve Soldati-Favre 2008). Bu çalışmada konak hücre transformasyonunda rol oynadığı düşünülen TA15705 proteininin karakterizasyonu ve AP-1 aktivasyonundaki rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır. Ek olarak, TA15705 proteininin *Theileria annulata* ile enfekte makrofaj ve B lenfosit hücrelerindeki lokalizasyonu belirlenmeye çalışılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

TA15705 proteininin karakterizasyonu ve AP-1 aktivasyonundaki rolünün belirlenmesi amacıyla; PCR, doku kültürü, gen klonlarının transfeksiyonu, AP-1 lusiferaz aktivitesi tayini, Western Blot analizi ve immunofloresan görüntüleme yapılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan vektörler, primerler, klonlar ve yapılan diğer tüm işlemler aşağıda ayrı başlıklar altında belirtilmiştir.

2. 1. Plazmid Vektör pcDNA3

pcDNA3, konak hücrenin diğer transkripsiyon olaylarına karışmadan uygun restriksiyon bölgesine klonlanan genlerin fazla miktarda ifade edilmesini sağlayan, güçlü bir promotörü (CMV) olan, 5.4 kb büyüklüğünde bir plazmid vektördür (Ek B.2). pcDNA3 gibi memelilere ait olan ekspresyon vektörleri genellikle yüksek seviyeli, kararlı ve geçici olan ekspresyonlarda kullanılmaktadır. pcDNA3 neomisin ve amfisilin seçici işaretçilerini taşımaktadır.

Orijinal pcDNA3-TA15705 plazmidi Madeleine Cochet (Grup Gordon Langsley, Institute Cochin, Paris, Fransa) tarafından yapılan cDNA kütüphanesinden alınarak sekans analizine gönderilmiştir. Sekans analizi sonuçları www.genedb.org adlı internet sitesindeki verilerle (Ek A) karşılaştırılarak iki adet nokta mutasyonu belirlenmiştir. Orijinal plazmidin anlamlı bölgesinde meydana gelen bu nokta mutasyonları QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Staratagene) kullanılarak düzeltilmiştir.

2.1.1. Mutajenik Oligonükleotid Primerler

Nokta mutasyonlarını düzeltmek amacıyla mutajenik primerler Eurogentec (Belçika) firmasından sipariş edilmiştir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Mutajenik primerler.

Gen Adı	Dizilim	Uzunluk
TA15705	5'-GGTTATCCAACAG <u>G</u> TGGTTATCCACCAC-3' FORWARD 5'-GTGGTGGATAACCACCTGTTGGATAACC-3' REVERSE	1008 bp
TA15705	5'-ATCACGCCTAAACATGGAC <u>A</u> TGGATTTA-3'. FORWARD 5'-TAAATCCATGTCCATGTTTAGGCGTGAT -3'. REVERSE	1008 bp

2.1.2. Mutant İplik Sentez Reaksiyonu

Reaksiyonlar (Çizelge 2.2) belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 2.2. Mutant iplik sentez reaksiyonu

Bileşenler	Miktar	Son Konsantrasyon
10X KOD HotStart DNA Polimeraz için tampon	5 µl	
25 mM MgSO ₄	3 µl	1,5 mM
dNTPs (her biri 10 mM)	1 µl	0,2 mM (her biri)
PCR için distile su	X µl	
Sense (5') Primer (10 µM)	1,35 µl	
Anti-sense (3') Primer (10 µM)	1,35 µl	
pcDNA3-TA15705	x µl (25-50 ng/µl)	
Kod Hot Start DNA Polimeraz(1U/µl)(Novagen)	1 µl	0,02 U/µl
Toplam reaksiyon miktarı	50 µl	

2.1.3. Döngüsel Parametreler

Nokta mutasyonunun gerçekleşebilmesi için gerekli olan sıcaklık değerleri ve süreler QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit kullanım kılavuzundaki parametrelerden yararlanarak aşağıda (Çizelge 2.3) gösterildiği şekilde uygulanmıştır.

Çizelge 2.3. Mutant sentez reaksiyonu sıcaklık ve zaman parametreleri

Döngü	Sıcaklık	Zaman
1	95°C	5 dakika
12	95°C	20 saniye
	60°C	10 saniye
	68°C	3 dakika 20saniye
1	68°C	3 dakika

2.1.4. Çoğaltılan Ürünlerin *Dpn* I Enzimi ile Kesimi

Mutasyona uğramayan (parental) DNA'yı ortamdan uzaklaştırmak amacıyla *Dpn* I restriksiyon enzimi kullanılmıştır. 1 µl *Dpn* I restriksiyon enzimi (10 U/µl), mutant sentez reaksiyonu ile çoğaltılan ürünlerin bulunduğu reaksiyon tüplerine eklenmiştir. Reaksiyon tüpleri hafifçe karıştırıldıktan sonra iki saat 37°C'de inkübe edilmiştir.

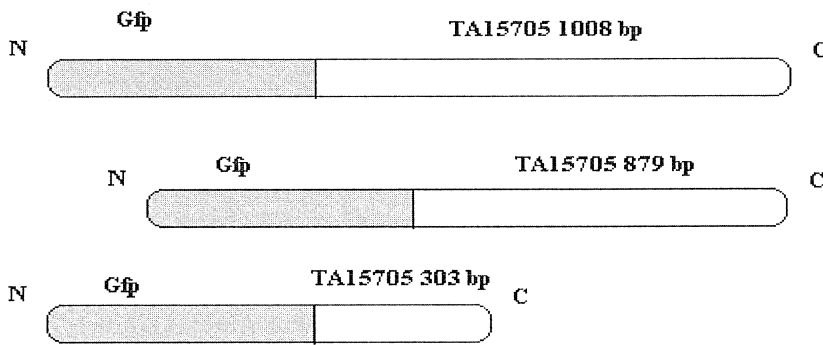
2.1.5. DH5α Kompetend Hücrelerin Transformasyonu ve MiniPrep Protokolü

İnkübasyon sonrası mutasyona uğramış olan DNA ürünü, DH5α kompetend hücrelerine transforme edilmiştir. DH5α, plazmid transformasyonunda en çok kullanılan *E. coli*

suşlarından biridir. DH5 α %10'luk gliserol solusyonu ile muamele edilerek -80°C'de saklanmıştır. Her bir transformasyon için 95 μ l DH5 α içersine 2 μ l plazmid DNA'sı karıştırılmıştır ve 30 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. 42°C su banyosunda 45 saniye ısı şoku uygulanmıştır. Isı şokundan sonra hücreler 2 dakika buz üzerinde bekletilmiştir ve 1ml LB (Lysogeny Broth) besi yerinde (Bacto-tryptone, Bacto-yeast extract, NaCl, pH 7.0) 37°C'de çalkalayıcı (180 devir/dakika) içinde 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler 4000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Plazmid DNA'sını içeren bakterileri seçebilmek amacıyla 100-200 μ l hücre peleti, içinde amfisilin (1:1000) bulunan agaroz petri üzerine yayılarak ekilmiştir. Gece boyu 37°C'de agaroz petri üzerinde üreyen bakteri kolonilerinden biri seçilerek içinde 2ml LB bulunan 10ml'lik tüplere pipet ucu yardımıyla konulmuştur. 37°C'de çalkalayıcı içersinde bir gece inkübe edilmiştir. Plazmid DNA'sı bakteri kolonilerinden pureyield plazmid miniprep sistem (Promega, Fransa) kullanılarak purifiye edilmiştir. Purifiye edilen DNA miktarı NanoDrop spektrofotometre cihazıyla 260 ve 280nm dalga boyunda okunan absorpsiyon değerlerinin oranına göre hesaplanmıştır.

2.2. pLHC_{M3}-EGFP-TA15705 (1008, 303, 879bp) Plazmidinin Geliştirilmesi.

TA15705 proteinini karakterize etmek için geliştirilen 303 ve 879bp'lik alt klonlar CD8+ T hücre epitopu bölgelerine göre dizayn edilmiştir (Şekil 2) (Niall MacHugh, yayınlanmamış veri).



Şekil 2. TA15705 ve alt klonları.

2.2.1. TA15705 ve Alt Klonları İçin Primer Dizaynı

Primerler, TA15705 ve alt klonları için ayrı ayrı dizayn edilmiştir. Restriksiyon kesim bölgeleri (*SmaI*, *Clal*) ve dur kodonları dizayn edilen primerlere eklenmiştir (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. TA15705 ve alt klonları için primerler

Gen Adı	Dizilim	Çoğaltılan Bölge Uzunluğu
TA15705	5'-CCTACATAGCCCGGGATGAATCTCC-3' Forward (<i>SmaI</i>) 5'-CTTCTCTAATCGATTTTCTAATCC-3' Reverse (<i>Clal</i>)	1008 bp
TA15705	5'-CCTACATAGCCCGGGATGAATCTCC-3' Forward (<i>SmaI</i>) 5'-GGACCTCCATCGATGCACCTCATGCCTCCTGATCG-3' Reverse (<i>Clal</i>)	303 bp
TA15705	5'-CAAAGGAGTCCCGGGATGTTTGAGG-3' Forward (<i>SmaI</i>) 5'-CTTCTCTAATCGATTTTCTAATCC-3' Reverse (<i>Clal</i>)	879 bp

2.2.2. TA15705 Klonlarının Çoğaltılması

TA15705 ve alt klonlarının çoğaltılması amacıyla yapılan PCR reaksiyonları çizelge 2.5-2.7'de gösterilen oran ve sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.5. TA15705 için PCR reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	Miktar	Son Konsantrasyon
10X Buffer for KOD Hot Start DNA Polimeraz	5 µl	
25 mM MgSO ₄	3 µl	1,5 mM
dNTPs (10 mM her biri)	1 µl	0,2 mM (her biri)
PCR distile su	X µl	
Sense (5') Primer (10 µM)	1,35 µl	
Anti-sense (3') Primer (10 µM)	1,35 µl	
pcDNA3-TA15705 (2 nokta mutasyonu düzeltilmiş)	X µl (25-50 ng/µl)	
Kod Hot Start DNA Polimeraz (1U/µl)	1 µl	0,02 U/µl
Toplam reaksiyon miktarı	50 µl	

Çizelge 2.6. TA15705 303bp için PCR reaksiyonu

Döngü	Sıcaklık	Zaman
1	95°C	5 dakika
5	95°C	20 saniye
	45°C	10 saniye
	68°C	10 saniye
15	95°C	20 saniye
	55°C	10 saniye
	68°C	10 saniye
1	68°C	3 dakika

Çizelge 2.7. TA15705 1008bp ve 879bp için PCR reaksiyonu

Döngü	Sıcaklık	Zaman
1	95°C	5 dakika
5	95°C	20 saniye
	40°C	10 saniye
	70°C	35 saniye
15	95°C	20 saniye
	45°C	10 saniye
	70°C	35 saniye
1	68°C	3 dakika

2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi ve Pürifikasyonu

Agaroz jel (%1) elektroforezi ile görüntülenen DNA ürünü bant, jelden izole edilmiştir. Jel içerisindeki DNA, ethidium bromid ile görünür hale getirilmiştir. DNA'nın moleküler ağırlığı jele yüklenen SmartLadder (Eurogentec) moleküler ağırlık belirleyicisi ile belirlenmiştir. PCR reaksiyonundan ve agaroz jelden elde edilen DNA'lar SV Gel ve PCR Clean-Up System (Promega) kullanılarak purifiye edilmiştir.

2.2.4. Restriksiyon Kesimi

pLHC_{M3}-EGFP plazmidi ve TA15705 PCR ürünleri *SmaI* (25°C'de 2 saat, BioLabs) ve *Clal* (37°C'de 2 saat, BioLabs) restriksiyon endonükleazları ile kesilmiştir ve %1'lik agaroz jelde koşturulmuştur. Plazmid ve PCR ürünleri jel üzerinden SV Gel ve PCR Clean-Up System (Promega) ile izole edilmiştir. Elde edilen DNA ürünlerinin konsantrasyonu NanoDrop spektrofotometre cihazı ile ölçülmüştür.

2.2.5. Bağlanma

Bağlanma reaksiyonu formül kullanılarak hesaplanmıştır; [(vektör ng X insertin kb büyüklüğü) / vektörün kb büyüklüğü] X (insert / vektörün molar oranı) = insert ng. İnsert ve vektörün bağlanma reaksiyonunda T4 ligaz (BioLabs) enzimi kullanılmıştır. Bağlanma aşaması 16°C'de gece boyu sürmüştür. Reaksiyon sonrası kesim tanıma bölgelerinden bağlanan ürünlerin DH5α *E. coli* bakterilerine transferi bölüm 2.1.5.'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

2.2.6. DH5α *E. coli* Kolonilerinin Analizi

Koloniler, içersinde insert bulunan ve insert bulunmayan (kontrol) olmak üzere bir kontrol grubuyla analiz edilmiştir. Üreye kolonilerden bazıları restriksiyon kesimi ve Miniprep (Bölüm 2.1.5.) için seçilmiştir ve sonrasında sekans analizine gönderilmiştir.

2.3. Hücre Kültürleri

2.3.1. *Theileria annulata* İle Enfekte Olan ve Olmayan Sığır Lenfosit Hücre Kültürleri

Theileria annulata ile enfekte olan (TBL3) ve enfekte olmayan B lenfosit (BL3) hücre kültürleri RPMI 1640 Glutamax (10mM Hepes, 50 µM mercaptoethanol, 100 u/ml penisilin ve streptomisin, 2mM L-Glutamin ve fetal buzağı serum 10% vol/vol) medyum kullanılarak kültüre edilmiştir. Hücreler 37°C'de, 5% CO2 içeren inkübatörde muhafaza edilmiştir ve hücre konsantrasyonu 2×10^5 hücre/ml ve 5×10^5 hücre/ml arasında olacak şekilde ayarlanmıştır.

TA15705 seviyesinin parazitle olan ilişkisini belirlemek amacıyla; TBL3 ve BL3 hücreleri (2×10^5 hücre/ml) antitheilerial ilaç olan buparvaquone (Bw720c) (ethanol içinde 50ng/ml) ile 48 saat muamele edilmiştir. Ayrıca kontrol grubu olarak aynı konsantrasyonda hazırlanan hücelere sadece saf ethanol eklenmiştir.

2.3.2. *Theileria annulata* İle Enfekte Olan Makrofaj Hücre Kültürü

T. annulata ile enfekte makrofaj hücreleri (Thei) TBL3 ve BL3 hücreleri gibi kültüre edilmişlerdir. Bulunduğu yüzeye tutunma özelliği gösteren Thei hücrelerinin dilüsyonları hazırlanırken, hücrelerin flask'tan ayrılması için 2 ml ılık PBS ile kısa süreli muamele edilmiştir.

2.3.3. HEK293 T Hücre Kültürü

HEK293 T hücreleri, DMEM (Invitrogen), (7,5% fötal buzağı serumu, 100 u/ml penisilin/streptomisin) kullanılarak 37°C'de, 5% CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmiştir. Her üç günde bir hücrelerin büyüme oranlarına göre medyum değiştirilmiştir. Hücreler 1:10 ya da 1:20 dilüsyon oranlarında doku kültürü flasklarında (100mm x 20mm) pasajlanmıştır. HEK293 T hücreleri buldukları yüzeylere tutundukları için medyumları değiştirilirken PBS ile yıkanmıştır ve 2 ml Trypsin/EDTA (Intvitrogen) ile muamele edilerek hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılması sağlanmıştır.

2.4. Kontrol Plazmidleri, Raportör Plazmidler ve Ekspresyon Vektörleri

2.4.1. pcDNA3 (Negatif Kontrol)

pcDNA3 vektörü negatif kontrol olarak kullanılmıştır. pcDNA3 ile birlikte kullanılan AP-1 lusiferaz raportörü AP-1 transkripsiyon aktivitesinin bazal seviyesini belirlemiştir.

2.4.2. RSV-cJun (Pozitif Kontrol)

RSV promotorü içeren RSV-cJun vektörü bir AP-1 aktivatörüdür. Bu vektör pozitif kontrol olarak seçilmiştir ve AP-1 lusiferaz raportörü + pcDNA3 ile birlikte hücrelere transfekte edilmiştir.

2.4.3. pGL2 Lusiferaz Promotor

SV40 viral promotor taşıyan pGL2 plazmidi firefly lusiferaz genini kodlayan bölgeleri içerir. SV40 viral promotorü; hücrelerdeki bazal transkripsiyon seviyesinin lusiferaz sinyali vasıtasıyla ölçülmesini sağlamıştır.

2.4.4. 3xTRE-Luc (AP-1 Lusiferaz Raportör)

3xTRE-Luc vektörü pGL2 lusiferaz vektörü kullanılarak geliştirilmiştir. TRE (TPA responsive element) promotor bölgesinin konsensus sekanslarının üç kopyası AP-1 transkripsiyon faktörü için bağlanma bölgeleri sağlamak amacıyla pGL2 lusiferaz vektörünün

uygun bir bölgesine klonlanmıştır. AP-1 transkripsiyon faktörünün, ilgili DNA bağlanma bölgesine bağlanması firefly lusiferaz sinyalini indüklemiştir

2.4.5. pUHD16-1

pUHD16-1 plazmidi (lacZ under CMV promoter) β -Galaktosidaz aktivitesini ölçmek için kontrol ve ekspresyon vektörleri ile birlikte transfekte edilmiştir. β -Galaktosidaz aktivitesi tayini transfekte edilen hücrelerin transfeksiyon verimliliğini ve seviyesini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

2.4.6. Ekspresyon Vektörleri

pcDNA3-TA15705, pLHC_{M3}-EGFP-TA15705 303bp, pLHC_{M3}-EGFP-TA15705 879bp ve pLHC_{M3}-EGFP-TA15705 1008bp vektörleri 3xTRE-Lusiferaz ve pUHD16-1 plasmidleri ile birlikte transfekte edilmiştir.

2.5. Transfeksiyonda Kullanılan Bileşenler

TA15705 tarafından indüklenen AP-1 aktivasyonunu belirlemek amacıyla hazırlanan transfeksiyon bileşimleri bir sonraki sayfada belirtilmiştir;

Transfeksiyon bileşimleri;

pcDNA3 + 3xTRE-Luc + pUHD16-1 (negatif kontrol)

pcDNA3 + 3xTRE-Luc + pUHD16-1 + RSV-cJun (pozitif kontrol)

pcDNA3-TA15705 + 3xTRE-Luc + pUHD16-1

pLHC_{M3}-EGFP-TA15705 (303 bp, 879 bp, 1008 bp) + 3xTRE-Luc + pUHD16-1

pLHC_{M3}-EGFP + 3xTRE-Luc + pUHD16-1

pGL2 luc + pcDNA3 + pUHD16-1

pGL2 luc + pcDNA3 + RSV-cJun + pUHD16-1

pGL2 luc + pLHC_{M3}-EGFP + pUHD16-1

2.6. Kalsiyum Fosfat Transfeksiyonu ve HEK293 T Hücrelerinin Lizizi

HEK293 T hücreleri işlemde birgün önce 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde 2 ml DMEM (%7,5 sığır serumu, 100 u/ml penisilin/streptomisin) içerisinde inkübe edilmiştir. Ertesi sabah hücrelerin üzerindeki medyum yavaşça taze medyumla değiştirilmiştir. Transfeksiyon bileşimi uygulamasından önce hücreler en az bir saat 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Her bir transfeksiyon bileşimi için; 0,5-1 µg kullanılmak istenen plazmid DNA'sı, 500ng pUHD16-1 plazmidi, 10 µl CaCl₂ (stok 2,5M) eklenmiştir ve distile su ile 100 µl son hacme tamamlanmıştır. Karışım 5 dakika oda sıcaklığında bekledikten sonra vorteks üzerinde damla damla 100 µl HBS 2x (HEPES-buffered saline) eklenmiştir ve iki dakika beklemeye alınmıştır. Elde edilen transfeksiyon karışımı, HEK293 T hücrelerine saat yönünde damla damla eklenmiştir. Hücreler sekiz saat 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Süre sonunda hücrelerin medyumunu değiştirilmiştir ve 48 saat 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyonu yapılmıştır. İnkübasyon sonrası hücreler 1ml PBS ile yıkanmıştır. Hücreler 100 µl 1x Passive Lysis Buffer (Promega) ile 10 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. Hücreler buz üzerindeyken, pipet ucunun arka tarafı kullanılarak buldukları yüzeyden ayrılması sağlanmıştır. Elde edilen hücre lizatları 10000 rpm'de, 4°C'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Lizatlar lusiferaz aktivitesi ölçümü için hemen kullanılmıştır ve western blot analizi için -20°C'de saklanmıştır.

2.7. β -Galaktozidaz Aktivitesi Ölçümü

10 μ l transfekte hücre lizati, içinde 1 ml LacZ tamponu (60mM Na₂CO₃, 100mM NaH₂PO₄, 10mM KCL, 1mM MgSO₄) bulunan ependorflara konulmuştur. 200 μ l ONPG (*ortho*-Nitrophenyl- β -galactoside) eklenmesiyle reaksiyon meydana gelmiştir ve sarı renk oluşumu gözlenmiştir. Birkaç saniye sonra reaksiyonu sonlandırmak için 500 μ l 1M Na₂CO₃ eklenmiştir. Optik yoğunluk (OD) değerleri 420nm'de spektrofotometre ile ölçülmüştür. Optik yoğunluk değeri, başarıyla ko-transfekte olan hücrelerin yüzdesini vermiştir. Bu sayede taban seviyede transkripsiyon seviyesi ölçülerek hücrelerin viyabilitesi, hücre liziz oranı ve manipulasyonlardan kaynaklanan hatalar en aza indirgenmiştir.

2.8. Lusiferaz Aktivitesi Ölçümü

Lusiferaz, ATP'yi kullanarak lusiferini parçalayan ve bunun sonucunda algılanabilir ışığı ortaya çıkaran bir enzimdir. Lusiferaz ölçüm solüsyonu (Promega) firefly lusiferaz sinyalini ölçmek için kullanılmıştır. Bu bileşen biyoluminesans reaksiyonu ve luminometre tarafından okunup kaydedilen ışığın üretilmesi için beetle lusiferin, ATP ve Mg²⁺ içermektedir. 10 μ l transfeksiyon lizati 96'lı ışık geçirmeyen plastik kuyucuklara transfer edilmiştir. Lusiferaz ölçüm solüsyonu (Promega) lizat eklenen kuyucuklara luminometre (Centro LB 960) vasıtasıyla eklenmiştir. Luminometre kendi programında kayıtlı olan protokolü izleyerek 50 μ l lusiferaz ölçüm solüsyonunu otomatik olarak enjekte etmiştir. AP-1 aktivitesindeki değişiklikler luminometre tarafından kaydedilmiştir.

2.9. TBL3 ve BL3 Hücrelerinin Lizizi

Liziz tampon solusyonu (20mM HEPES pH:8, 150mM NaCl, %1 No40, %0,5 Na Deoxycholate, %0,1 SDS, 2mM EDTA, 1X Complete proteaz inhibitörü Roche, 1X PhosSTOP inhibitörü Roche) TBL3 ve BL3 hücreleri lizizinde kullanılmıştır. TBL3 ve BL3 hücreleri 5ml medyum içinde 2×10^5 hücre/ml olacak şekilde 48 saat kültüre edilmiştir ve daha sonra 10ml soğuk PBS (phosphate buffered saline) ile yıkanmıştır. Yıkanan hücreler 2000 rpm'de, 4°C'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Hücre peleti 1 ml soğuk PBS içinde homojen hale getirilerek ependorf tüpüne aktarılmıştır ve 13.000 rpm'de, 4°C'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. 1x hacimdeki hücre peleti için 4x hacminde liziz tampon solusyonu ilavesi buz üzerinde yapılmıştır ve 10 saniye vorteks işlemi uygulanmıştır. Tampon-hücre peleti karışımı 30 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir ve bu süre boyunca geçen her 10 dakikada bir vorteks işlemi tekrarlanmıştır. Tampon-hücre karışımı 13.000 rpm'de, 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernatant -80°C'de daha sonra kullanılmak üzere saklanmıştır. Süpernatant içinde çözülmüş protein konsantrasyonu Bio-Rad Protein Assay kullanılarak hesaplanmıştır.

2.10. Western Blot

2.10.1. SDS-PAGE Analizi

SDS-PAGE analizinde kullanılacak protein miktarı β -Galaktozidaz aktivitesine göre hesaplanmıştır. 20 μ l hücre ekstraktı, içine %10 (vol/vol) mercaptoethanol eklenen 5 μ l Laemmli dye solüsyonu (BioRad) eklenmiştir ve 95°C su banyosunda 5 dakika kaynatılmıştır. Karışım %10-12 polyacrylamide jele yüklenmiştir ve SDS polyacrylamide elektroforez işlemi 100 volt'ta 2 saat uygulanmıştır. Moleküler ağırlık belirleyicisi olarak All Blue Standards (BioRad) kullanılmıştır.

2.10.2. Elektroforetik Transfer

Jel, nitroselüloz membran (6x9cm), whatman kağıtları (7x10cm) ve transfer süngerleri transfer tamponu (25mM Tris-HCl, 192 mM Glisin, %20 methanol, distile su) ile ıslatılmıştır. Sünger, iki adet whatman kağıdı, jel, nitroselüloz membran ve iki adet whatman kağıdı üst üste kapatılarak sandviç şeklinde kaset içine yerleştirilmiştir. Elektroforetik transfer 4°C'de 100 volt'ta 1 saat gerçekleştirilmiştir. Membran üzerindeki proteinlere ve transfer verimine ponceau boyama ile bakılmıştır.

2.10.3. İmmunoblotlama

Membran 2 kez 10 dakika PBS/Tween %0,1 içinde yıkanmıştır ve PBS/Tween %0,1, süt %5 ya da PBS/Tween %0,1, fish jelatin %1 ya da PBS/Tween %0,1, keçi serumu %5 kullanılarak bir saat oda sıcaklığında bloklanmıştır. Membran 2 kez 5 dakika PBS/Tween %0,1 içinde yıkanmıştır ve birincil antikolar eklenerek 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Kullanılan birincil antikolar tekrar kullanılmak üzere saklanmıştır. Membran 3 kez 15 dakika PBS/Tween %0,1 içinde yıkanmıştır ve ikincil antikolar eklendikten sonra bir saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Membrane 3 kez 15 dakika PBS/Tween %0,1 içinde yıkanmıştır ve SuperSignal West Pico Chemiluminescence (Thermo) kullanılarak görüntüleme işlemi yapılmıştır. GFP antikoru, TA15705 proteininin kontrolü olarak kullanılmıştır. Protein miktarlarının karşılaştırılmasında tübülün antikoru kullanılmıştır. Bu sayede polyacrylamide jele yüklenen proteinlerin miktarları arasında farklılık olmadığı gösterilmiştir.

Antikorlar;

Birincil antikor : α GFP mouse (Sigma), 1/1000 dilüsyon PBS/Tween %0,1, BSA %3, NaN₃ %0,05

Birincil antikor: Monoklonal anti- β -Tubulin (Sigma), 1/1000 dilüsyon PBS/Tween %0,1, BSA %3, NaN₃ %0,03

İkincil antikor: Anti-Mouse IgG, İşaretleme: Peroksidaz, Konak: Keçi, (Sigma) 1/10.000 dilüsyon PBS/Tween %0,1, süt %5.

Immun serum ve pürifiye TA15705 antikor;

Birincil antikor: *T. annulata* immun serum (42. gün, tekrar eden enfeksiyon sonrası) 1/6000 dilüsyon PBS/Tween %0,1, fisch jelatin %0,1, NaN₃ %0,05.

Birincil antikor: Purifiye edilmiş TA15705 antikor, 1/250 dilusyon PBS/Tween %0,1, fisch jelatin %0,1, NaN₃ %0,05.

İkincil antikor: Anti-Bovine IgG (H+L) Peroksidaz-konjuge AffiniPure Konak: Keçi (Jackson ImmunoResearch Lab.) 1/200.000 dilüsyon PBS/Tween %0,1, fisch gelatin %0,5. Sığır serum albumini (BSA) ve süt tozu IgG içerebilir. Sığıra, keçiye, ata ya da koyuna karşı geliştirilen ikincil antikorlar sığır IgG' si ile reaksiyona girebilir. Bu yüzden sığıra karşı geliştirilen ikincil antikorlardan dilüsyon hazırlarken ya da bloklama sırasında BSA ya da süt kullanımı istenmeyen durumlar oluşturabilir. Bu yüzden bloklama sırasında fisch jelatini ya da keçi serumu (%5 v/v) kullanılmıştır.

2.11. Antikor Purifikasyonu ve İşaretlenmesi

500 μ g TA15705-GFP transfekte edilmiş HEK293T hücre ekstraktları %10'luk polyacrylamide jelle yüklenmiştir ve SDS polyacrylamide jel elektroforezi 100 voltta 2 saat gerçekleştirilmiştir. Nitroselüloz membrana 4°C'de 100 voltta bir saat süresince elektroforetik transfer yapılmıştır. Proteinlere ponceau boyama yapılmıştır ve membran üzerindeki TA15705-GFP proteininin bulunduğu kısım kesilmiştir. Kesilen membran PBS/Tween %0,1,

süt %5 ile bloklanmıştır ve 2 ml *T. annulata* immun serum ile 5 saat inkübe edilerek 4 kez PBS/Tween %0,1 ile yıkanmıştır. Membran küçük parçalara kesilmiştir ve 0,5 ml 0,2M HCL glisin (pH 2,15) ile 15 dakika muamele edilmiştir. Nötralizasyon işlemi 0,2 ml 1M K₂HPO₄ (pH 7) muamelesi ile yapılmıştır. Slide-A-Lyser Dialysis Cassette (Thermo) kullanılarak 4°C'de 1x PBS içinde gece boyu tampon değişimi yapılmıştır. Pürifiye edilen TA15705-GFP antikorlarının konsantrasyonu NanoDrop spektrofotometre ile belirlenmiştir. Bu antikorlar moleküler görüntüleme, immunofloresan mikroskopi için Alexa Fluor 594 Microscale Protein Labelling Kit (A30008) (Invitrogen) ile işaretlenmiştir.

2.12. Paraformaldehit Fiksasyonu

Bulunduğu yüzeye yapışmayan hücreler için, yuvarlak cam lameller %0,01'lik poly-L-lizin ile 10 dakika kaplanmıştır. Süre sonunda 4 kez distile su ile yıkanarak sonrasında kuruması sağlanmıştır. TBL3 ve BL3 hücreleri 24 saat kültüre edildikten sonra 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Hücrelerin üzerindeki medyum alınmıştır. 100µl PBS (Ca ve Mg içeren) (Invitrogen) ile hücreler süspanse edilmiştir. Daha önceden kurutulan cam lameller üzerine hücreler kaplanmıştır ve bir saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bir saat sonunda cam lameller PBS (Ca ve Mg) ile bir kez yıkanmıştır. Cam lamel üzerinde kalan hücreler %3 paraformaldehit ve %2 sükröz ihtiva eden PBS ile 15 dakika fikse edilmiştir. Fiksasyon işlemi sonrası cam lameller 3 kez PBS ile yıkanmıştır.

Thei hücreleri yuvarlak cam lamel yüzeyine yapışarak üreyebildikleri için bu hücreler, içinde cam lamel bulunan medyumda 24 saat 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. Cam lamel üzerinde üreyen hücreler bir kez PBS (Ca ve Mg) ile yıkanmıştır ve %3 paraformaldehit ve %2 sükröz içeren PBS ile 15 dakika fikse edilmiştir. Fiksasyon işlemi sonrası cam lameller PBS ile 3 kez yıkanmıştır.

Fiksasyon işlemi yapılmış cam lameller 3 dakika PBS içinde inkübasyona bırakılmıştır. PBS aspire edilerek hücre geçirgenliğini arttırmak için 5 dakika PBST %0,2 (PBS+Triton X-100 %0,2) ile inkübe edilmiştir, bir kez PBS ile yıkanmıştır. Cam lameller 3 dakika PBS ile inkübe edilmiştir ve 15-20 dakika %0,2 PBST, %5 sığır serumu ile bloklanmıştır. Birincil antikorlar bloklama için kullanılan solusyon içinde dilüye edilmiştir. Her bir cam lamel için 50 µl birincil antikor alınarak oda sıcaklığında 2 saat inkübasyon işlemi yapılmıştır. Antikorla inkübasyon sonrası cam lameller 3 kez 5 dakika PBST %0,1 ile inkübe edilmiştir. İkincil antikor birincil antikordaki gibi dilüye edilip cam lamellerle inkübasyonu yapılmıştır. İkincil antikor için inkübasyon süresi oda sıcaklığında yarım saat olarak ayarlanmıştır. Cam lameller 2 kez PBST %0,1 ile yıkanmıştır ve 5 dakika 50µl Dapi 1/1000 PBS (Stok 1mg/ml, Sigma) ile inkübe edilmiştir. Cam lameller PBS (Ca ve Mg) ile yıkanmıştır ve lamel üzerinde hücre olup olmadığı mikroskop altında kontrol edilmiştir. Yuvarlak cam lameller 8 µl mowiol (Sigma) ile lam üzerine kapatılmıştır. Lameller lam üzerine yapıştıktan sonra 4°C'de karanlık ortamda saklanmıştır. Daha sonra immunofloresan mikroskop (Leica DMI6000) altında incelenmiştir. Bilgisayardaki metamorph programı vasıtasıyla resimler işlenmiştir. Floresan mikroskop ile görüntüleme kullanılan antikorlar;

Alexa Fluor 594 (Invitrogen) ile işaretlenmiş TA15705 antikor (1/200 dilüsyon)

Birincil antikor; IC12 (anti-parazit), mouse Ab (1/250 dilüsyon)

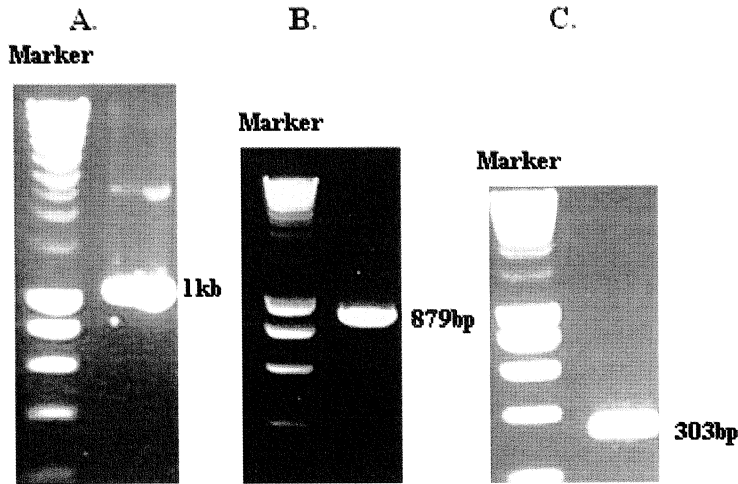
İkincil antikor; Anti-mouse IgG, Alexa Fluor 647 (Molecular Probes) (1/500 dilüsyon)

3. BULGULAR

TA15705 ve alt klonlarının PCR, AP-1 aktivitesi, Western Blot analizi ve immunofloresan görüntüleme sonuçları aşağıda ayrı başlıklar halinde belirtilmiştir.

3.1. TA15705 ve Alt Klonlarının PCR sonuçları

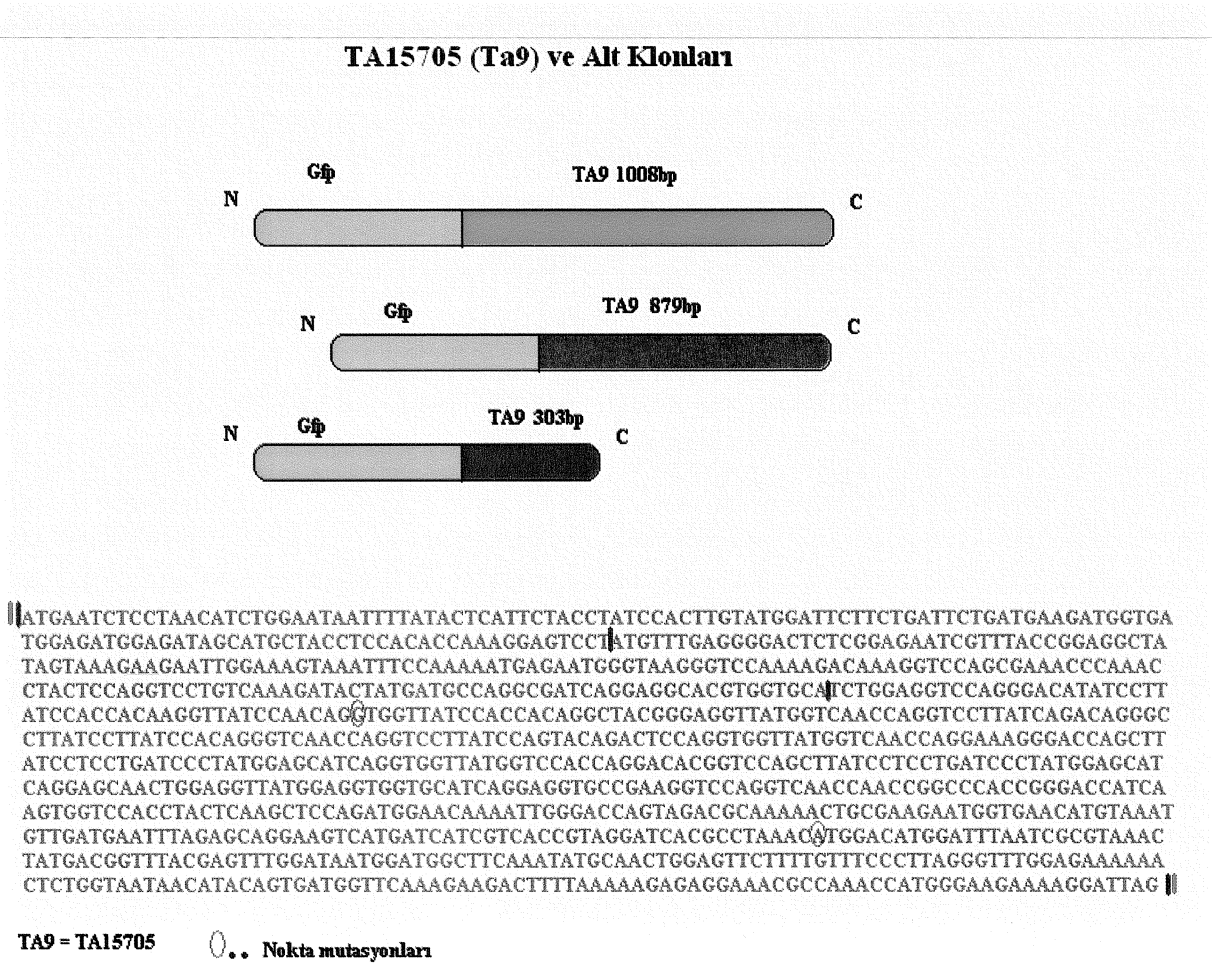
Çizelge 2.6-2.7.'de gösterilen ayarlar kullanılarak yapılan PCR sonuçları görüntülenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. A. Ta9 1008bp, B. Ta9 879bp ve C. Ta9 303bp PCR sonuçları

3.2. TA15705-GFP İşaretli Klonlar

Bölüm 2.2.1. (Çizelge 2.4.)’de verilen primerler kullanılarak geliştirilen iki adet nokta mutasyonu giderilmiş TA15705-GFP gen klonu ve alt klonları (Şekil 3.2.) pLHC_{M3} plazmidi (Ek B.1) içinde kodlanmıştır.



Şekil 3.2. TA9-GFP ürünleri

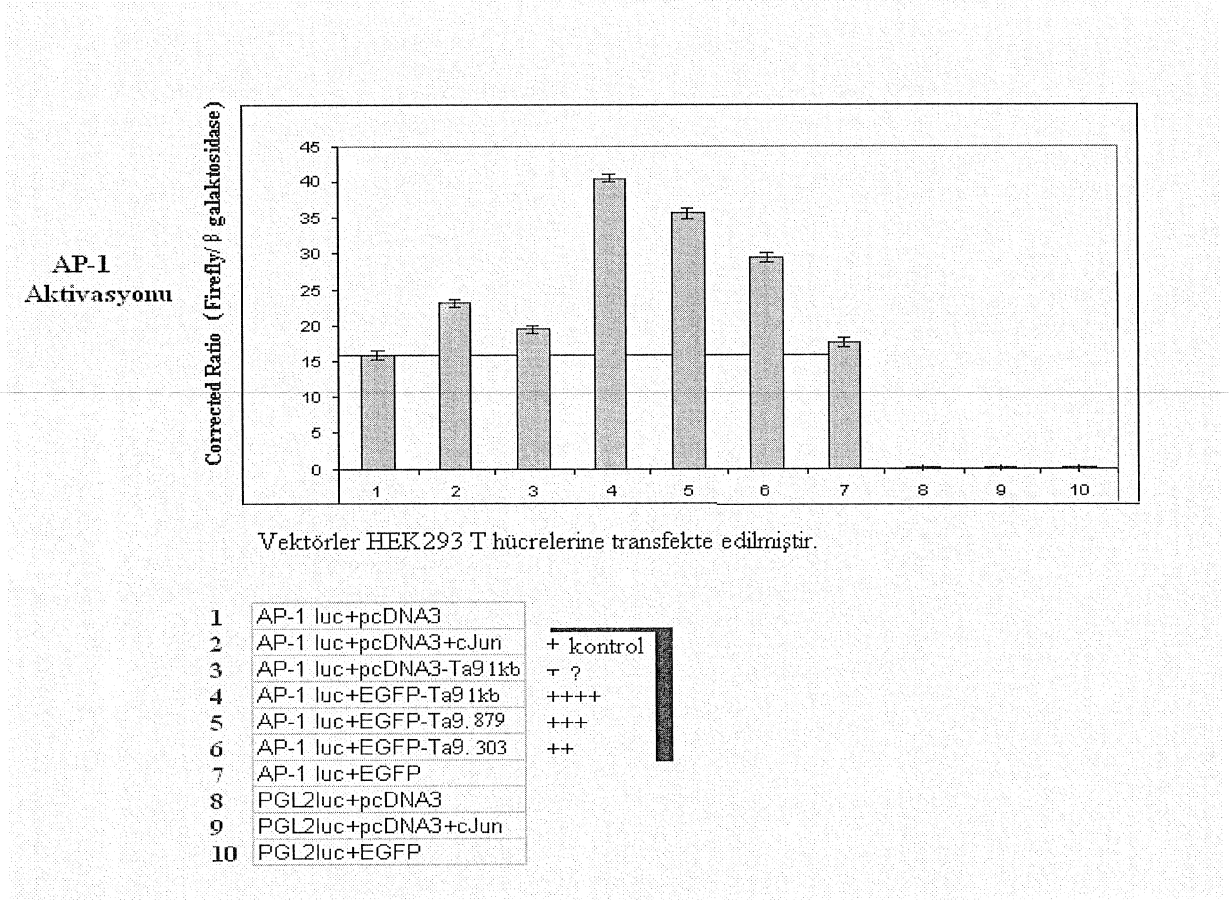
3.3. AP-1 Aktivitesi Transfeksiyon Sonuçları

Kontrol ve ekspresyon vektörlerinin indüklediği AP-1 aktivitesi seviyeleri luminometre ile belirlenmiştir. Firefly lusiferaz sonuçları ile β -galaktozidaz aktivitesi sonuçlarının bölünmesiyle elde edilen oran gerçek firefly lusiferaz değerinin belirlenmesini sağlamıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Firefly lusiferaz/ β -galaktozidaz oranları

Örnek	AP-1Luc pcDNA3	AP-1Luc pcDNA3 c-Jun	AP-1Luc pcDNA3- TA9-1kb	AP-1Luc EGFP- TA9-1kb	AP-1Luc EGFP- TA9-879	AP-1Luc EGFP- TA9-303	AP-1Luc EGFP	PGL2luc pcDNA3	PGL2luc pcDNA3 c-Jun	PGL2luc EGFP
Firefly luc	4911687	4887171	2923180	21858038	16212046	4043938	1853155	12319	10335	8554
	4125251	5338995	4610786	13351018	14474964	5389032	4456876	12768	11971	14455
β Galaktozidaz	0,324	0,213	0,147	0,532	0,441	0,132	0,100	0,234	0,204	0,170
	0,251	0,225	0,238	0,334	0,418	0,189	0,271	0,243	0,220	0,294
Oran F/ β	15159	22944	19885	41086	36761	30636	18531	53	51	50
	16435	23728	19373	39973	34629	28421	16446	52	54	49

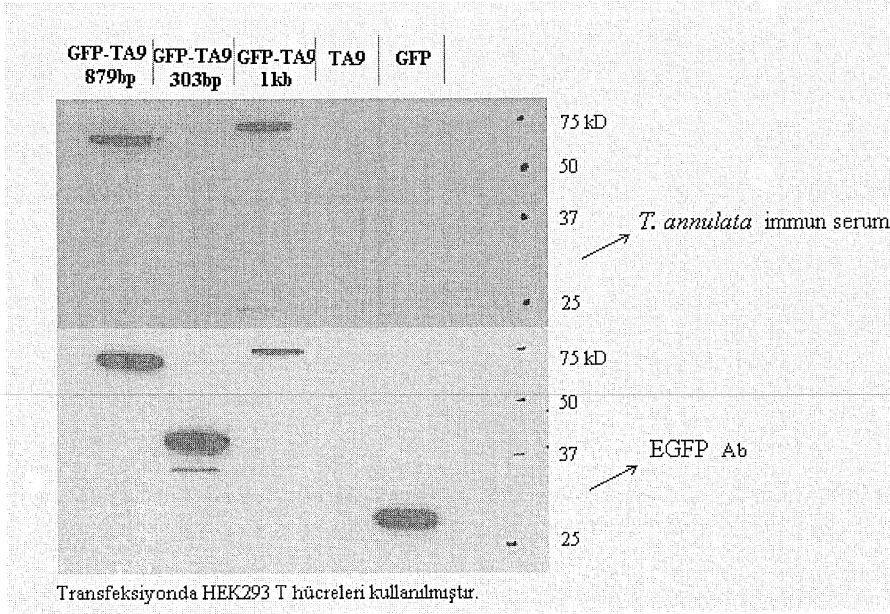
Ta9-GFP ve alt klonlarının AP-1 aktivasyonundaki rolleri test edilmiştir ve hepsi AP-1 aktivasyonu indükleyicisi olarak belirlenmiştir (Şekil 3.3). Lusiferaz raportörü, Ta9-GFP ve alt klonlarıyla transfekte edilen HEK293 T hücreleri, kontrol vektörü ile transfekte edilen HEK293 T hücrelerine göre daha yüksek seviyede AP-1 aktivasyonunu indüklemiştir. 1 numaralı örnek, hücrelerdeki bazal AP-1 aktivitesi seviyesini göstermektedir. 7 numaralı örnek yalnız GFP ile transfekte edilen bir kontrol vektörüdür. 8, 9 ve 10 numaralı örnekler transfekte edilen hücrelerdeki bazal lusiferaz aktivitesi seviyesini göstermektedir. 4 numaralı Ta9-GFP 1008bp (full) gen klonu, N-terminal kısmından 129bp eksik olan Ta9-GFP 879bp alt klonu ile karşılaştırıldığında en yüksek seviyede AP-1 aktivasyonunu indüklemiştir. C-terminalinden 705bp eksik olan Ta9-GFP 303bp gen klonu diğer Ta9-GFP klonlarına göre en düşük seviyedeki AP-1 indüklemesini gerçekleştirmiştir. cDNA kütüphanesinden izole edilen ve mutasyonları giderilen orijinal pcDNA3-Ta9 gen klonu, pozitif kontrol ve tüm Ta9-GFP gen klonları ile karşılaştırıldığında en düşük seviyede AP-1 aktivasyonunu indüklemiştir.



Şekil 3.3. AP-1 aktivitesi transfeksiyon sonuçları

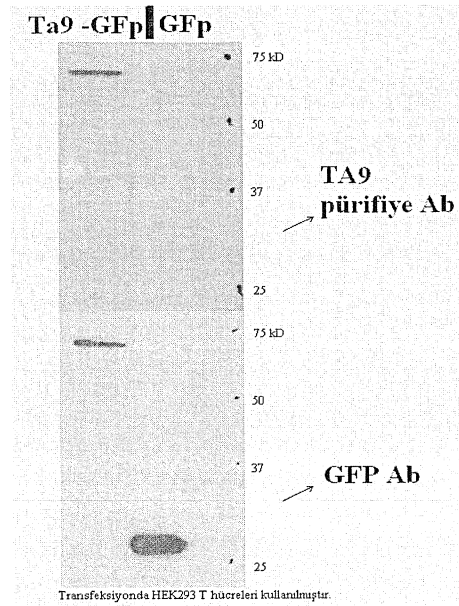
3.4. Western Blot Sonuçları

Orijinal Ta9 plazmiti, Ta9-GFP gen klonları ve GFP plazmiti HEK293 T hücrelerine transfekte edilmiştir. Hücreler lize edilerek *T. annulata* immün serum ve kontrol olarak GFP antikor kullanılarak Western blot yapılmıştır. Western blot analizi Ta9-GFP 1008bp ve Ta9-GFP 879bp gen klonlarının *T. annulata* immün serumu tarafından tanındığını göstermiştir. Orijinal Ta9 ve Ta9-GFP 303bp aynı immün serum tarafından tanınmamıştır (Şekil 3.4).



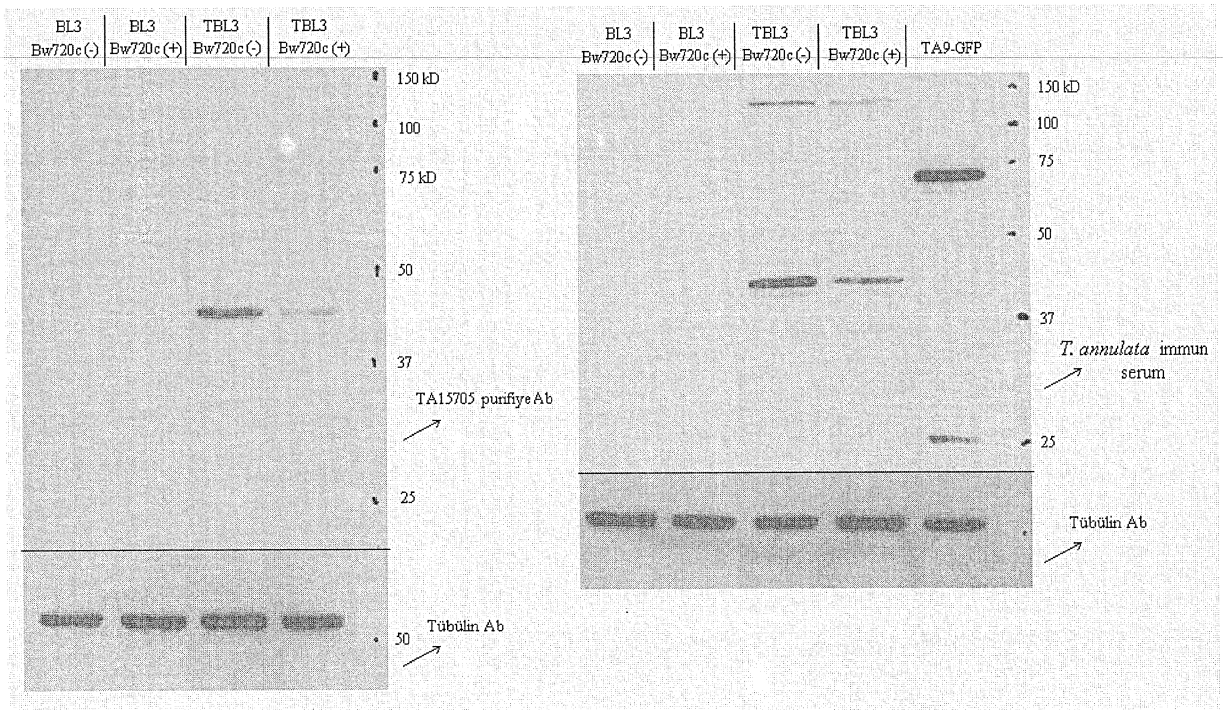
Şekil 3.4. *T. annulata* immun serum ve Ta9 GFP gen klonları ile yapılan Western blot.

Ta9-GFP 1008bp ve GFP plazmiti HEK293 T hücrelerine transfekte edilmiştir. Transfekte edilen hücrelere Ta9 pürifiye antikor ve kontrol olarak GFP antikor kullanılarak Western blot analizi yapılmıştır. Western blot analizi Ta9'a spesifik antikorun, *T. annulata* immun serumundan başarıyla pürifiye edildiğini göstermiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Ta9 pürifiye antikorlar ve Ta9-GFP hücre ekstraktı ile yapılan Western blot.

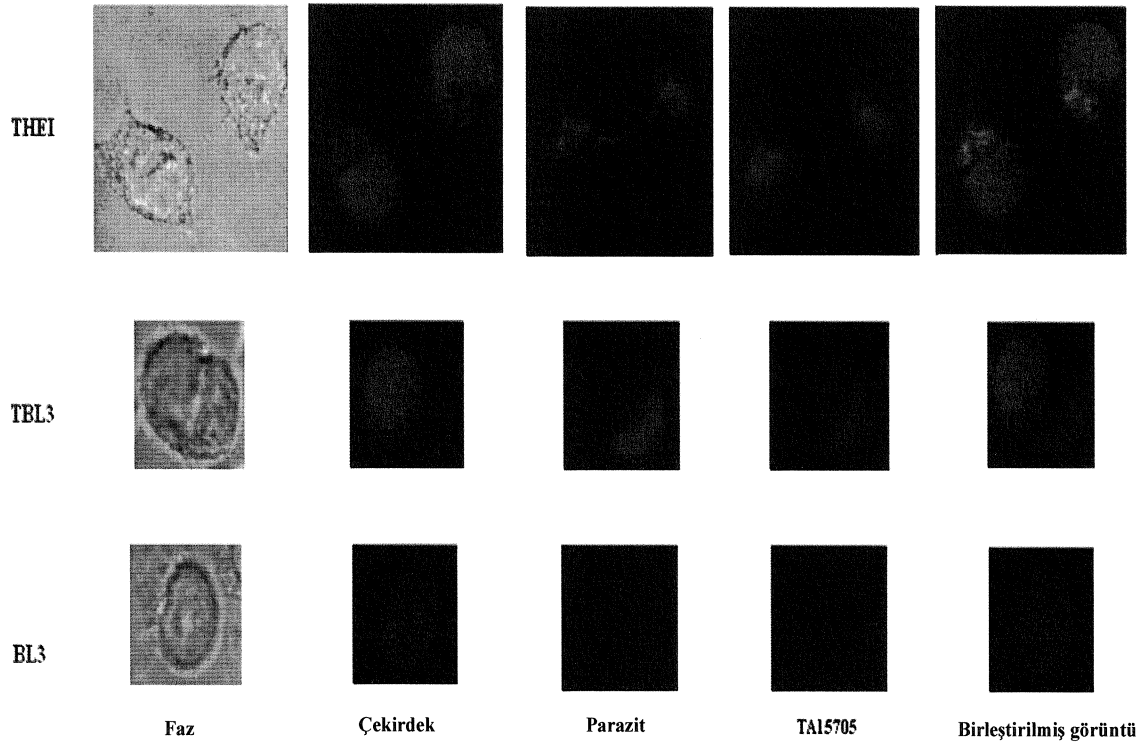
TBL3 hücrelerindeki Ta9 proteini seviyeleri pürifiye edilmiş Ta9 antikorunu kullanarak Western blot tekniği ile analiz edilmiştir ve aynı analiz *T. annulata* immun serumu kullanılarak yapılmıştır (Şekil 3.6). İlaçla muamele edilmeyen TBL3 hücreleri ile karşılaştırıldığında, Bw720c ile muamele edilen TBL3 hücrelerinde Ta9 seviyesi azalmıştır. Ta9 protein ekspresyon seviyeleri tübülün ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.6. Bw720c ile muamele edilmiş ve edilmemiş TBL3 hücrelerindeki Ta9 seviyeleri

3.5. Ta9'un Hücre İçindeki Lokalizasyonu

Thei ve TBL3 hücreleri, Ta9 proteininin hücre içindeki lokalizasyonunu belirlemek amacıyla immunofloresan mikroskop altında incelenmiştir. BL3 hücreleri negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Ta9 proteini hücre içinde parazit ile aynı bölgelerde lokalizasyon göstermiştir ve *T. annulata* ile enfekte B lenfosit ve makrofaj hücrelerinin sitozolünde salgılanmaktadır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Ta9'un hücre içindeki lokalizasyonu (Mavi; çekirdek, Yeşil; parazit, Kırmızı; Ta9)

4. TARTIŞMA

Patojenik *Theileria* türleri olan *Theileria annulata* ve *Theileria parva* sığır lenfositlerini ve eritrositlerini enfekte ederek sığırlarda verim kaybına ve ölümlere neden olmaktadır. Bu parazitlere olan ilginin nedenlerinden biri verdikleri ekonomik zararın yanı sıra enfekte ettikleri lökosit hücrelerini transforme etme özelliğini taşıyan tek örnek olmalarıdır. Parazit ile transforme olan hücreler kanser hücreleri gibi kontrolsüz olarak bölünürler ve apoptozis mekanizmasının dışında kalırlar. Kontrolsüz hücre bölünmesinin ve apoptozis mekanizmasının hangi yollarla gerçekleştiği tam olarak açıklanamamıştır. AP-1 transkripsiyon faktörünün hücre bölünmesi, farklılaşma, apoptozis ve transformasyonda rol oynadığı bilinmektedir. Genetiği değiştirilmiş hücrelerin geliştirilmesiyle ve farelerle yapılan çalışmalarda farklı AP-1 üyelerinin hücre içindeki ifadeleri arttırılıp azaltılarak ya da tamamen durdurularak bunların hücre proliferasyonuna, apoptozise ve transformasyona olan etkileri aydınlatılmıştır (Ameyar ve ark 2003, Eferl ve Wagner 2003, Jochum ve ark 2001, Shaulian ve Karin 2001, Shaulian ve Karin 2002). AP-1; siklin D1, siklin A ya da siklin E gibi hücre döngüsü düzenleyicilerinin fonksiyonunu ve ekspresyonunu düzenleyerek hücre proliferasyonunu kontrol etmektedir (Shaulian ve Karin 2001, Shaulian ve Karin 2002).

Bu çalışma TA15705 proteininin karakterizasyonu ve AP-1 aktivasyonundaki rolünün belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. TA15705 antijen proteini ile yapılan çalışmanın yeni olması, yapılan diğer çalışmaların hali hazırda yayınlanmamış olması verilerin karşılaştırılması ve kaynak açısından bazı sıkıntıları beraberinde getirmiştir.

Çalışmada GFP ile işaretli TA15705 ve kesilmiş alt klonları, TA15705'e spesifik antikorun immun serumdan pürifikasyonu ve pürifiye edilen antikorun işaretlenmesi başarıyla yapılmıştır. HEK293 T hücre kültürünün doku kültürü laboratuvarında bakımının kolay olması,

yüksek çoğalma potansiyeline sahip olması ve iyi transfeksiyon verimi göstermesi çalışmada kolaylık sağlamıştır. Ayrıca bu hücre kültürü *Theileria* yokluğunda TA15705 proteininden kaynaklanan AP-1 aktivasyonunu test etmemize izin vermiştir.

cDNA kütüphanesinden izole edilen TA15705 klonunda belirlenen iki nokta mutasyonu düzeltilmiştir. HEK293 T hücreleri tarafından eksprese edilen, GFP ile işaretli olmayan, pcDNA3 vektöründe kodlu olan TA15705, immun serumdaki antikorlar tarafından tanınmamıştır. Ayrıca GFP ile işaretli pLHC_{M3} vektöründe kodlu olan TA15705 ile karşılaştırıldığında sadece bazal seviyede AP-1 aktivasyonu göstermiştir (Şekil 3.3). Bunun nedeni HEK293 T hücrelerinde TA15705'in ekspresyon seviyesinin immun serum tarafından tanınması için yeterli seviyede olmaması ve AP-1'i aktive etmemesi olabileceği düşünülmektedir. Diğer bir açıklama ise işaretli olmayan TA15705'in HEK293 T hücrelerinde hızlı bir şekilde yıkılması ve GFP ile işaretli olanların bu hücre içindeki yıkımı dengeleyip azaltarak, immun serum tarafından tanınmasına olanak sağlaması olabilir. Yalnızca GFP ifadesi yapılan kontrol grubunda AP-1 transkripsiyon faktörü aktivasyonu bazal seviyede görülmüştür. Bu, AP-1 aktivasyonuna olanak veren seviyenin TA15705'e spesifik olduğunu göstermektedir.

Bu heterolog sistemde GFP ile işaretli TA15705 AP-1 aktivasyonunu indüklemiştir ve bu fonksiyonuyla birlikte TA15705 enfekte B lenfosit ve makrofaj hücrelerinin sitozolünde salgılanmaktadır (Şekil 3.7). TA15705 ve kesilmiş versiyonları AP-1 aktivasyonunu farklı seviyelerde indüklemiştir. TA15705 ve bunun 879 bp uzunluğundaki versiyonu immun serum tarafından tanınmıştır ve buna bağlı olarak B hücre epitoplarının burada sunulduğu düşünülmektedir. Bu kısımda bulunan aminoasitler fazla miktarda tekrar içeren kısımlardan oluşmuştur ve farklı *T. annulata* suşları arasında farklılıklar bulunmaktadır. Bu farklılık, proteinin merkezden C-terminale kadar olan kısmının çoklu değişken B hücre epitoplarını kodladığını göstermektedir. Sadece ilk 303 bp'lik kısmı kodlayan klonun immun serum tarafından tanınmamış olması, bu 101 aminoasitten oluşan bölgenin B hücre epitoplarından yoksun olduğunu göstermektedir. CD8⁺ T hücre epitoplarını kodlayan bu N-terminal bölgesi, ilgili MHC ve TA15705 cDNA klonlarıyla transfekte edilmiş COS hücreleriyle yapılan deneylerde sitotoksik T hücrelerinin hedefi olduğu gösterilmiştir (Niall MacHugh & Ivan

Morrison, yayınlanmamış veri). T hücre epitoplari hücre yüzeyinde sunulduğundan TA15705'in hücre yüzeyinde de yerleşim gösterdiği düşünölmektedir. Çalışmada ise TA15705'in yerleşiminin hücre sitozolünde ve parazitin yoğun olduğu bölgelerde olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.7).

TA15705 seviyesi buparvaquone (Bw720c) uygulanan TBL3 hücrelerinde ölçölmüştür. İlaç denemesi yapılmayan TBL3 hücreleriyle karşılaştırıldığında, ilaç uygulanan TBL3 hücrelerinde TA15705 seviyesinin düştüğü belirlenmiştir (Şekil 3.6). Bu TA15705 miktarının canlı parazite bağılı olduğunu göstermektedir. Başka bir çalışmada TBL3 hücreleri otofaji belirleyicisi olan LC3-cherry (hafif zincir mikrotüböl protein) ile transfekte edilmiştir ve bu hücreler 24, 48 ve 72 saat buparvaquone ile muamele edilmiştir. Makrootofagozomların ölen parazit ile aynı bölgede lokalizasyonu gözlenmiştir (Hakan Ünlü, yayınlanmamış veri). TBL3 hücrelerindeki TA15705 seviyesi otofagozom ve proteozom fonksiyonları inhibe edilerek ölçölmüştür. Bu organellerin inhibisyonu TA15705 seviyesinde bir artışa neden olmuştur (Hakan Ünlü, yayınlanmamış veri). Bu belirlenen artış TA15705 proteininin hızlı bir şekilde bu organeller tarafından yıkıldığını ve parazit canlı olduğunda TA15705'in hücre içinde hızlıca yenilendiğini göstermektedir. *T. annulata* tarafından üretilen TA15705 ve bunun otofagozomlar ve proteozomlar tarafından yıkımı arasındaki denge toplam TA15705 proteini seviyesini belirlemektedir.

TA15705 paralog ailesinin (TA15685, TA15690, 15695, 15710) karakterizasyonu ile ilgili yapılacak diğer çalışmaların, bu proteinlerin AP-1 aktivasyonundaki rollerinin anlaşılması ve enfekte hücrelerdeki lokalizasyonlarının belirlenmesi açısından faydalı olacağı düşünölmektedir. Parazit kaynaklı faktörlerin araştırılması, bunların yapısı ve fonksiyonlarının ortaya konması parazit-konak hücre etkileşimlerini ve theileriozis'deki rollerini anlamamıza yardımcı olmaktadır.

5. SONUÇ

Bu çalışma ile *Theileria annulata*'nın ikinci kromozomu üzerinde bulunan bir genin ifade ettiği TA15705 proteininin *Theileria* ile enfekte hücrelerin transformasyonunda rol oynayan AP-1 transkripsiyon faktörünün aktivasyonunu indüklediği belirlenmiştir. Moleküler biyoloji ve gen mühendisliğinde kullanılan bazı teknikler kullanılarak elde edilen TA15705'in 303bp ve 879 bp uzunluğundaki alt klonlarında AP-1 aktivasyonunu sağladığı belirlenmiştir. *T. annulata* bağışık serumu ve TA15705 alt klonları kullanılarak yapılan western blot analizleri, B hücre epitop ya da epitoplarının kodlandığı bölgeler hakkında fikir vermiştir. Ayrıca yapılan çalışma ile TA15705 proteininin *T. annulata* ile enfekte makrofaj ve B lenfosit hücrelerinin sitozolünde ve daha yoğun olarak parazitin hücre içinde yerleştiği bölgelerde lokalizasyon gösterdiği anlaşılmıştır.

ÖZET

Zorunlu hücre-içi protozoon olan *Theileria annulata* apikompleksa filumunda yer alır ve sığırlarda tropikal theileriosis'in (Tropical Theileriosis) etkenidir. *T. annulata*'nın vektörü *Hyalomma* soyuna ait kenelerdir. *Theileria* sporozoitleri sığırların lökosit hücrelerine girerek çok çekirdekli şizont formunu oluştururlar ve enfekte ettiği konak hücrenin metabolik aktivitesini değiştirirler. Enfekte lökositler apoptosize uğramazlar, kanser hücreleri gibi kontrolsüz olarak çoğalırlar.

AP-1 transkripsiyon faktörü farklılaşma, çoğalma ve apoptozis gibi birçok hücrel işlemleri kontrol eder. AP-1, *Theileria* ile enfekte lökositlerin transformasyonunda rol oynamaktadır.

T. annulata makroşizontu tarafından eksprese olan Ta9 olarak bilinen TA15705 proteini sitotoksik T hücreleri ve B hücreleri tarafından tanınmaktadır. Bu çalışma, Eylül 2008-Ekim 2009 tarihleri arasında TA15705 proteininin karakterize edilmesi ve aynı proteinin parazit tarafından indüklenen AP-1 aktivasyonundaki rolünün belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu çalışma ile TA15705 proteininin *Theileria* ile enfekte hücrelerin transformasyonunda rol oynayan AP-1 transkripsiyon faktörünün aktivasyonunu indüklediği belirlenmiştir. Ayrıca TA15705 proteininin enfekte B lenfosit ve makrofaj hücrelerinin sitozolünde ve daha yoğun olarak parazitin hücre içinde yerleştiği bölgelerde lokalizasyon gösterdiği saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: TA15705, AP-1, *Theileria annulata*, Apoptozis

SUMMARY

Theileria annulata is an obligate intracellular protozoa parasite of the phylum apicomplexa. *T. annulata* causes tropical theilariosis in cattle and is transmitted by the ticks of the genus *Hyalomma*. *Theileria* sporozoites invade bovine leukocytes, develop into a multinucleate syncytial schizont form and alter the metabolic activity of the infected host cell. Infected leukocytes do not undergo apoptosis and display uncontrolled proliferation like cancer cells.

AP-1 is a transcription factor that controls a number of cellular processes including differentiation, proliferation and apoptosis. AP-1 plays a role in cell transformation in *Theileria* infected leukocytes.

TA15705 protein also known as Ta9 expressed at *T. annulata* macroschizont is a target of cytotoxic T cells and B cells. The study was carried out between September 2008 and October 2009 to characterise the TA15705 protein and determine its role in parasite-induced AP-1 activation. In the present, it was shown that TA15705 was an inducer of AP-1 which plays a role in transformation event of infected cells. It was also demonstrated that TA15705 was co-localises with the parasite and secreted into the cytosol of infected B lymphocytes and macrophages.

Keywords: TA15705, AP-1, *Theileria annulata*, Apoptosis

EKLER:

A. TA15705'in sekans analizi

DNA

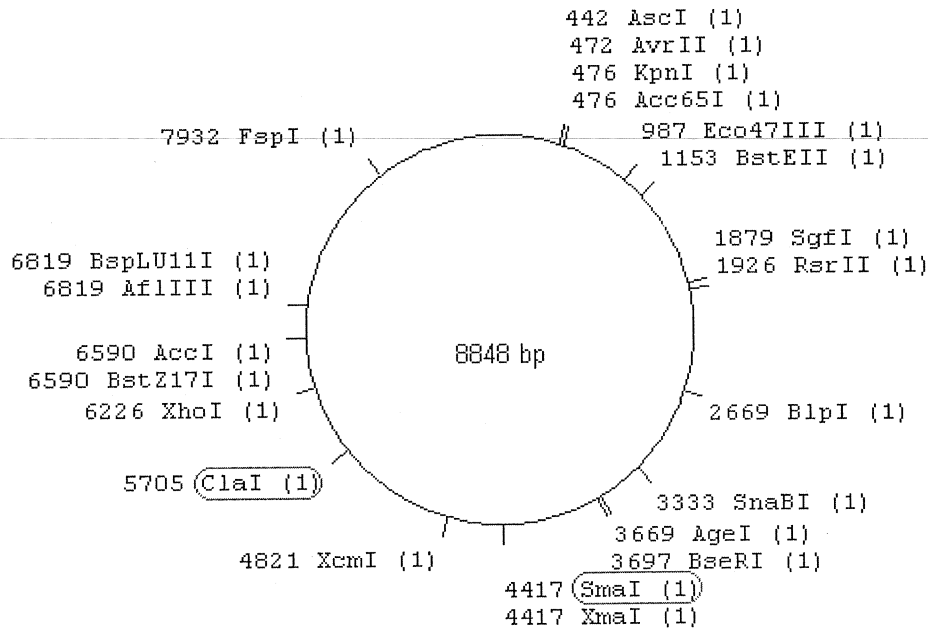
```
TA15705 |||hypothetical protein|Theileria annulata|chr 02||  
ATGAATCTCC TAACATCTGG AATAATTTTA TACTCATTCT ACCTATCCAC TTGTATGGAT  
TCTTCTGATT CTGATGAAGA TGGTGATGGA GATGGAGATA GCATGCTACC TCCACACCAA  
AGGAGTCCTA TGTTTGAGGG GACTCTCGGA GAATCGTTTA CCGGAGGCTA TAGTAAAGAA  
GAATTGGAAA GTAAATTTCC AAAAATGAGA ATGGGTAAGG GTCCAAAAGA CAAAGGTCCA  
GCGAAACCCA AACCTACTCC AGGTCCTGTC AAAGATACTA TGATGCCAGG CGATCAGGAG  
GCACGTGGTG CATCTGGAGG TCCAGGGACA TATCCTTATC CACCACAAGG TTATCCAACA  
GGTGGTTATC CACCACAGGC TACGGGAGGT TATGGTCAAC CAGGTCCTTA TCAGACAGGG  
CCTTATCCTT ATCCACAGGG TCAACCAGGT CCTTATCCAG TACAGACTCC AGGTGGTTAT  
GGTCAACCAG GAAAGGGACC AGCTTATCCT CCTGATCCCT ATGGAGCATC AGGTGGTTAT  
GGTCCACCAG GACACGGTCC AGCTTATCCT CCTGATCCCT ATGGAGCATC AGGAGCAACT  
GGAGGTTATG GAGGTGGTGC ATCAGGAGGT GCCGAAGGTC CAGGTCAACC AACCGGCCCA  
CCGGGACCAT CAAGTGGTCC ACCTACTCAA GCTCCAGATG GAACAAAATT GGGACCAGTA  
GACGCAAAAA CTGCGAAGAA TGGTGAACAT GTAAATGTTG ATGAATTTAG AGCAGGAAGT  
CATGATCATC GTCACCGTAG GATCACGCCT AAACATGGAC ATGGATTTAA TCGCGTAAAC  
TATGACGGTT TACGAGTTTG GATAATGGAT GGCTTCAAAT ATGCAACTGG AGTTCTTTTG  
TTTCCCTTAG GGTTTGGAGA AAAAACTCTG GTAATAACAT ACAGTGATGG TTCAAAGAAG  
ACTTTTAAAA AGAGAGGAAA CGCCAAACCA TGGGAAGAAA AGGATTAG
```

Protein

```
>TA15705 |||hypothetical protein|Theileria annulata|chr 02|||  
MNLSTSGIIL YSFYLSSTCMD SSSDSEDDGD DGDSMLPPHQ RSPMFEGTLG ESFTGGYSKE  
ELESKFPKMR MGKGPDKDGP AKPKTPGPV KDTMMPGDQE ARGASGGPGT YPYPPQGYPT  
GGYPPQATGG YGQPGPYQTG PYPYPQQQPG PYPVQTPGGY GQPGKGPAYP PDPYGASGGY  
GPPGHGPAYP PDPYGASGAT GYGGGASGG AEGPGQPTGP PGPSSGPPTQ APDGTKLGPV  
DAKTAKNGEH VNVDEFRAGS HDHRHRRITP KHGHGFNRVN YDGLRVWIMD GFKYATGVLL  
FPLGFGEKTL VITYSDGSKK TFKKRGNAP WEEKD
```

B. Vektörler

B.1 pLHC_{M3} plasmid



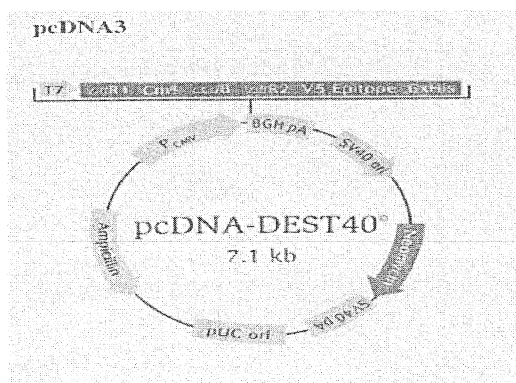
pLHC_{M3}-EGFP-Ta9

```
TTTGAAAGACCCCACCCGTTAGGTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCACTTTGCAAGGCATGGAAAAATACATAAC
TGAGAATAGAAAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAAAGAAACAGCTGAATACCAAACAGGATATCTGTGGTAAGC
GGTTCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGAGACAGCTGAGTGATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAG
CAGTTCCTGCCCGGCTCGGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGTGAA
TCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCAAGGACCTGAAAATGACCCTGTACCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCCG
CTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCCGCTCTCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGGCGCCA
GTCTTCCGATAGACTGCGTCGCTTAGGTACCCGATTTCCCAATAAAGCCTCTTGCTGTTTGCATCCGAATCGTGG
TCTCGCTGTTTCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCACGACGGGGTCTTTCATTTGGGGGCTCGT
CCGGGATTTGGAGACCCCTGCCCAGGGACCACCGACCCACCACCGGGAGGTAAGCTGGCCAGCAACTTATCTGTG
TCTGTCCGATTGTCTAGTGTCTATGTTTGATGTTATGCGCCTCGCTGTACTAGTTAGCTAACTAGCTCTGTAT
CTGGCCGACCCGTTGGTGGAACTGACGAGTTCTGAACACCCGCGCAACCCTGGGAGACGTCCCAGGGACTTTGG
GGCCCGTTTTTGTGGCCGACCTGAGGAAGGGAGTCGATGTGGAATCCGACCCCGTCAGGATATGTGGTTCTGGT
AGGAGACGAGAACCTAAACAGTTCCCGCCTCCGCTCTGAATTTTTGCTTTCGGTTTTGGAACCGAAGCCGCGCTC
TTGTCTGCTGCAGCGCTGCAGCATCGTTCTGTGTGTCTCTGTCTGACTGTGTTTCTGTATTTGTCTGAAAATTA
GGGCCAGACTGTTACCCTCCCTTAAGTTTGACCTTAGGTCACTGGAAAGATGTCGAGCGGATCGCTCACAAACA
GTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGTTACCTTCTGCTCTGCAGAATGGCCAACCTTTAACGTCGGATGGCC
GCGAGACGGCACCTTTAACCGAGACCTCATACCCAGGTTAAGATCAAGGTCTTTTACCTGGCCCGCATGGACA
CCCAGACCAGGTCCCCTACATCGTGACCTGGGAAGCCTTGCTTTTTGACCCCTCCCTGGGTCAAGCCCTTTGT
ACACCCTAAGCCTCCGCCTCCTCTTCCCTCCATCCGCCCCGCTCTCCCCCTTGAACCTCCTCGTTCGACCCCGCC
TCGATCCTCCCTTTATCCAGCCCTCACTCCTTCTCTAGGCGCCGGAATTCCGATCTGATCAGCTTGCCACAACCC
GTACCAAAGATGGATAGATCCGGAAGCCTGAACTCACCGCAGCTCTGTGCGAGAAGTTTCTGATCGAAAAGTTC
GACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAATCTCGTGCTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGT
GGATATGTCTCGGGTAAATAGCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTTCATCG
```

GCCGCGCTCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAATTCAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCCGT
GCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTCTGCAGCCGGTCGCGGAGGCCATG
GATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGTTCCGCCCATTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATAC
ACTACATGGCGTGATTTTCATATGCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTATCACTGGCAAACCTGTGATGGACGACACC
GTCAGTGGCTCCGTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCGAAGTCCGGCACCTC
GTGCACGCGGATTTCCGCTCCAACAATGTCCTGACGGACAATGGCCGCATAACAGCGGTCAATTGACTGGAGCGAG
GCGATGTTCCGGGATTTCCAATACGAGGTCGCCAACATCTTCTTCTGGAGGCCGTGGTTGGCTTGATGGAGCAG
CAGACGCGCTACTTCGAGCGGAGGCATCCGGAGCTTGACGGATCGCCGCGGCTCCGGGCGTATATGCTCCGCATT
GGTCTTGACCAACTCTATCAGAGCTTGGTTGACGGCAATTTTCGATGATGCAGCTTGGGCGCAGGGTTCGATGCGAC
GCAATCGTCCGATCCGGAGCCGGGACTGTCCGGCGTACACAAATCGCCCGCAGAAGCGCGGCCGCTCTGGACCGAT
GGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGAAACCGACGCCCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGAGTAGA
TGCCGACCGAACAAGAGCTGATTTTCGAGAACGCTCAGCCAGCAACTCGCGCGAGCCTAGCAAGGCAAATGCGAG
AGAACGGCCTTACGCTTGGTGGCACAGTTCTCGTCCACAGTTTCGCTAAGCTCGCTCGGCTGGGTCCGCGGGAGGGC
CGGTCCGAGTGATTCAGGCCCTTCTGGATTGTGTTGGTCCCCAGGGCACGATTTGTCATGCCACGCACTCGGGTG
ATCTGACTGATCCCGCAGATTGGAGATCGCCGCCCCGTGCCTGCCGATTGGGTGCAGATCTAGAGCTCGCTGATCC
GGCCATTAGCCATATTTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATC
CATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATTCACAACTATCCGCCATGTTGACATTTGATTATTGACTAGTT
ATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATGACCCATATATGGAGTTCGCGCTTACATAAATTACGGTAA
ATGGCCCGCTTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGC
CAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGT
ATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGA
CCTTATGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTGCGGTTTTGGC
AGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGA
GTTTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAATGGGCG
GTAGGCATGTACGGTGGGAGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATC
CACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCCAAGCTTGTGTACCGGTC
GCCACCATGGTGGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTCCGAGCTGGACGGCGACGTA
AACGGCCACAAGTTACGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATC
TGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGC
CGTACCCCGACACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGGCATGCCCGAAGGCTACGTCAGGACCGCACCC
ATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCCGCCGAGGTGAAGTTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGC
ATCGAGTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGC
CACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAGCGCATCAAGGTGAAGTTCAAGATCCGCCACAACATCGAG
GACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGCTGCTGCCCGAC
AACCCTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAG
TTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCCGGCCGGACTCAGATCCCCGGGAT
GAATCTCCTAACATCTGGAATAATTTTATACTCATTCTACCTATCCACTTGTATGGATTCTTCTGATTTCTGATGAA
GATGGTGTATGGAGATGGAGATAGCATGCTACCTCCACACCAAAGGAGTCCATGTTTGGAGGGACTCTCGGAGAAT
CGTTTACCAGGAGGCTATAGTAAAGAAGAATTTGAAAAGTAAATTTCCAAAATGAGAATGGGTAAAGGTTCCAAAAGA
CAAAGGTCCAGCGAAACCCAAACCTACTCCAGGTCTGTCAAAGATACTATGATGCCAGGCGATCAGGAGGCACGT
GGTGCATCTGGAGGTCCAGGGACATATCCTTATCCACCACAAGGTTATCCAACAGGTGGTTATCCACCACAGGCTA
CGGGAGGTTATGGTCAACCAGGTCTTATCAGACAGGGCTTATCCTTATCCACAGGGTCAACCAGGTCTTATCC
AGTACAGACTCCAGGTGGTTATGGTCAACCAGGAAAGGGACCAGCTTATCCTCCTGATCCCATGGAGCATCAGGT
GGTTATGGTCCACCAGGACACGGTCCAGCTTATCCTCCTGATCCCATGGAGCATCAGGAGCAACTGGAGGTTATG
GAGGTGGTGCATCAGGAGGTGCCGAAGGTCCAGGTCAACCAACCCGCCCCACCGGGACCATCAAGTGGTCCACCTAC
TCAAGCTCCAGATGGAACAAAATTTGGGACCAGTAGACGCAAAAACCTGCGAAGAATGGTGAACATGTAATGTTGAT
GAATTTAGAGCAGGAAGTCATGATCATCGTACCCTAGGATCACGCCTAAACATGGACATGGATTTAATCGCGTAA
ACTATGACGGTTTTACGAGTTTTGGATAATGGATGGCTTCAAATATGCAACTGGAGTCTTTTTGTTTTCCCTTAGGGTT
TGGAGAAAAAACTCTGGTAATAACATACAGTGATGGTTCAAAGAAGACTTTTTAAAAGAGAGGAAACGCCAAAACCA
TGGGAAGAAAAGGATTAGAAAATCGATAAAATAAAAGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAGGGGGGAATGAAAG
ACCCACCTGTAGGTTTTGGCAAGCTAGCTTAAAGTAAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAA
TAGAGAAGTTTCAAGTCAAGGTCCAGGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCA
GTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCA
GTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACC
ATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCAAGGACCTGAAATGACCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCCGCTT
CTCGCTTCTGTTCCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAAGAGCCCAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTC
CTCCGATTGACTGAGTGCCTCGAGTACCCGTGTATCCAATAAAACCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTC

GCTGTTCCCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGTCTTTCATTTGGGGGCTCGTCCG
GGATCGGGAGACCCCTGCCAGGGACCACCGACCCACCACCGGGAGGTAAGCTGGCTGCCTCGCGCGTTTTCCGGTG
ATGACGGTAAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCA
GACAAGCCCGTCAGGGCGGTGAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATA
GCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAAT
ACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTC
GGTCGTTCCGGTGGCGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAA
CGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGCCGCGTTGCTGGCGTTTTT
CCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAATAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGACAGGACT
ATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCGCGCTTACCGGATA
CCTGTCCGCTTTCTCCCTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTGTA
GGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTCCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTA
TCGTTTGTAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGC
GAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGG
TATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGC
TGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGAT
CTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAG
GATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAATATATATGAGTAAACTTGGTC
TGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTTCATCCATAGTTGCCCTG
ACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATAACCGCGAGA
CCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGC
AACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTT
GCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGG
TTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGAT
CGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCAT
GCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGTGACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACC
GAGTTGCTCTTGGCCGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTAAAAAGTGTCTCATCATTGG
AAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGC
ACCCAAGTATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGC
AAAAAAGGAATAAGGGCGACCGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATATTGAAGCATTTA
TCAGGGTTATTGCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCAC
ATTTCCCGGAAAAGTCCACCTGACGCTCAAGAAACATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGCGGTAT
CACAGGCCCTTTTCGTTTCAAGAATTCATACCAGATCACCAGAAACTGTCTCCAAATGTGTCCCCCTCACACT
CCCAAATTCGCGGGCTTCTGCCTCTTAGACCACTCTACCCTATTCCCACACTCACCGGAGCCAAAGCCGCGGCC
CTTCCGTTTTCTTTGCT

B.2 pcDNA3



KAYNAKLAR:

Ameyar M, Wisniewska M, Weitzman JB (2003) *A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against*, Biochimie 85, 747-752.

Angel P, Karin M (1991) *The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation*, Biochim, Biophys, Acta 1072:129-157

Anon *T. annulata* coğrafi dağılım. Erişim: [<http://www.cfsph.iastate.edu>]

Anon AP-1. Erişim: [http://www.paterson.man.ac.uk/images/cell_regulation/cellreg5.jpg]

Anon TA15705. Erişim: [<http://www.genedb.org>]

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

Brown CGD (1997) *Dynamics and impact of tick-borne disease of cattle*, Trop Anim Health Prod, 29:1S-3S.

Campbell JDM, Howie SEM, Odling KA, Glass EJ (1995) *Theileria annulata induces aberrant T cell activation in vitro and in vivo*, Clin. Exp. Immunol; 99:203-210.

Chaussepied M, Langsley G (1996) *Theileria transformation of bovine leukocytes: a parasite model for the study of lymphoproliferation*, Res Immunol, 147(3):127-38.

Chaussepied M, Lallemand D, Moreau MF, Adamson R, Hall R, Langsley G (1998) *Upregulation of Jun and Fos family members and permanent JNK activity lead to constitutive AP-1 activation in Theileria-transformed leukocytes*, Mol Biochem Parasitol, 94(2):215-26.

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

Dessaige F, Hilaly S, Baumgartner M, Blumen B, Werling D, Langsley G (2004) *c-Myc activation by Theileria parasites promotes survival of infected B-lymphocytes*, *Oncogene*, 24:1075–1083.

Dessaige F, Lizundia R, Langsley G (2005) *Constitutively activated CK2 potentially plays a pivotal role in Theileria induced lymphocyte transformation*, Cambridge University Press, United Kingdom, *Parasitology*, 130: 37-44.

de Castro JJ (1997) *Sustainable tick and tick-borne disease control in livestock improvement in developing countries*, *Vet Parasitol*, 71:77–97.

Dobbelaere DAE, Kuenzi P (2004) *The strategies of the Theileria parasite: a new twist in host-pathogen interactions*, *Curr. Opin. Immunol*, 16:524–530.

Eckert J, Kutzer E, Rammol M, Burger HJ, Körting W (1992) *Veterinarmedizinische Parazitologie 4 Auflage*, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 905p.

Eferl R, Wagner EF (2003) *Ap-1: a double-edged sword in tumorigenesis*, *Nat. Rev. Cancer* 3, 859-868.

Forsyth LMG, Jackson LA, Wilkie G, Sanderson A, Brown CGD, Preston PM (1997) *Bovine cells infected in vivo with Theileria annulata Express CD11b, the C3bi complement receptor*, *Vet Res Commun.*, 21: 249-263.

Forsyth LMG, Minns FC, Kirvar E, Adamson RE, Hall FR, McOrist S, Brown CGD, Preston PM (1999) *Tissue damage in cattle infected with Theileria annulata accompanied by metastasis of cytokine producing, schizont-infected mononuclear phagocytes*, *J. Comp. Pathol*, 120:39–57.

Gardner MJ, Bishop R, Shah T, de Villiers EP, Carlton JM, Hall N, Ren Q, Paulsen LT, Pain A, Berriman M, Wilson RJ, Sato S, Ralph SA, Mann DJ, Xiong Z, Shallom SJ, Weidman J, Jiang L, Lynn J, Weaver B, Shoaibi A, Domingo AR, Wasawo D, Crabtree J, Wortman JR, Haas B, Angiuoli SV, Creasy TH, Lu C, Suh B, Silva JC, Utterback TR, Feldblyum TV, Perteau M, Allen J, Nierman WC, Taracha ELN, Salzberg SL, White OR, Fitzhugh HA, Morzaria S, Venter JC, Fraser CM, Nene V (2005) *Genome sequence of Theileria parva, a bovine pathogen that transform lymphocytes*, *Science* 1;309(5731):134-7.

Glover JN, Harrison SC (1995) *Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA*, *Nature* 373(6511):257-61.

Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M (2004) *AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings*, *J Cell Sci.*, 117(Pt25):5965-73.

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

Heussler VT, Sturm A, Langsley G (2006) *Regulation of host cell survival by intracellular Plasmodium and Theileria parasites*, *Parasitology*, 132(Suppl):S49–S60.

Jochum W, Passegue E, Wagner EF (2001), *AP-1 in Mouse development and tumorigenesis*, *Oncogene* 20, 2401-2412.

Kauffman J (1996) *Parasitic Infections of Domestic Animals*. Deutsche Bibliothek Cataloging-in-Publication Data, Germain, p:70.

Kishore R, Luedemann C, Bord E, Goukassian D, Losordo DW (2003) *Tumor necrosis factor-mediated E2F1 suppression in endothelial cells: differential requirement of c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways*, *Circulation Research*, 93(10):932-40.

Lizundia R, Sengmanivong L, Guernon J, Muller T, Schnelle T, Langsley G, Shorte SL (2005) *Use of micro-rotation imaging to study JNK-mediated cell survival in Theileria parva infected B lymphocytes*, *Parasitology* 130, 629-635.

Lizundia R, Chaussepied M, Huerre M, Werling D, Santo JPD, Langsley G (2006) *c-Jun NH2-Terminal Kinase/c-Jun Signalling Promotes Survival and Metastasis of B Lymphocytes Transformed by Theileria*. *Cancer Res* 2006, 66:12.

Muraguri GR, Kiara HK, McHardy N (1999) *Treatment of east coast fever: a comparison of parvaquone and buparvaquone*, *Veterinary Parasitology*, Volume 87, Issue 1, Pages 25-37.

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 (2005) *Genome of the host-cell transforming parasite Theileria annulata compared with T. parva*, *Science* 1;309(5731):131-3.

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

Plattner F, Soldati-Favre D (2008) *Hijacking the host cellular functions by the Apicomplexa*, *Annu. Rev. Microbiol*, 62:471–48.

Purnell RE (1978) *Theileria annulata as a hazard to cattle in countries on the northern mediterranean littoral*, *Veterinary Science Communications* 2, Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing Company pp3-10.

Robinson PM (1982) *Theileria annulata and its transmission-a review*, *Trop. Anim. Health Prod.* 14, 3-12.

Rintelen M, Schein E, Ahmed JS (1990) *Buparwaquone but no cyclosporin a prevents Theileria annulata-infected bovine lymphoblastoid cells from stimulating uninfected lymphocytes*, *Trop Med Parasitol*, 41(2):203-7.

Sergent E, Donatien A, Parrot L, Lestoquard F (1945) *Etudes sur les piroplasmoses bovines*, Institut Pasteur d'Algeria, Alger-P.264.

Shaulian E, Karin M (2001) *AP-1 in cell proliferation and survival*, *Oncogene* 20, 2390-2400.

Shaulian E, Karin M (2002) *AP-1 as a regulator of cell life and death*, *Nat. Cell Biol.* 4, E131-E136.

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

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

Spooner RL, Innes EA, Glass EJ, Brown CGD (1989) *Theileria annulata and T. Parva infect and transform different bovine mononuclear cells*, *Immunology*; 66:284–288.

Wagner GG, Duffus WP, Burrige MJ (1974) *The specific immunoglobulin response in cattle immunized with isolated Theileria parva antigens*, *Parasitology*; 69(1)43-53.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Aydın'da doğdum. İlkokulu Gazipaşa İlkokulu'nda, Ortaokulu Gazipaşa Ortaokulu'nda ve Liseyi Adnan Menderes Anadolu Lisesi'nde okudum. 2003 yılında Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümüne kayıt oldum ve 2007 yılında mezun olduktan sonra, aynı yıl Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladım.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin hazırlanmasında ve sonrasında bana yol gösteren Danışman Hocam Prof. Dr. Hasan EREN'e, tez çalışması öncesinde ve sonrasında her türlü imkan, yardım ve desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Tülin KARAGENÇ'e teşekkür ederim. Ayrıca yüksek lisans tez çalışmamın yapılmasını mümkün kılan Dr. Marie CHAUSSEPIED ve Dr. Gordon LANGSLEY'e teknik destek, yardım ve sabırlarından ötürü teşekkür ederim.