

Rekombinasyon Sonrası *Theileria annulata* Popülasyonlarında Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesinde Kullanılacak Markerlerin Seçimi

Selection of Genetic Markers to Determine Diversity in *Theileria annulata* Populations after Recombination

Hüseyin Bilgin Bilgiç¹, Ahmet Hakan Ünlü², Ayça Aksulu¹, Serkan Bakırcı¹, Selin Haçılarcıoğlu¹, Hasan Eren¹, William Weir³, Tülin Karagenç¹

¹Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

²Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Gevaş Meslek Yüksek Okulu, Veterinerlik Bölümü, Van, Türkiye

³Glasgow Üniversitesi Tıp Fakültesi, Veteriner ve Doğa Bilimleri, Biyoçeşitlilik, Hayvan Sağlığı ve Karşılaştırmalı Tıp Enstitüsü, Glasgow, İngiltere

Öz

Amaç: *Theileria annulata* popülasyonlarında rekombinasyon sonrası oluşacak genetik çeşitliliğin ve rekombinasyonun yoğun olduğu kromozomal bölgelerin tespit edilmesi amacıyla kullanılacak polimorfik mini ve mikrosatellite markerlerin belirlenmesidir.

Yöntemler: Markerlerin belirlenmesi amacıyla Unipro UGENE programı kullanılmıştır. *T. annulata*'nın rastgele karıştırılmış genomik dizilimlere göre gerçek DNA diziliminde 10 kat fazla tandem tekrar (TR) belirleyen skor, eşik değer olarak belirlenmiştir. Tekrarlı motif benzerliği %96-100 arasında bulunan, minimum tekrar sayısı en az üç ve minimum tandem boyutu minisatellite bölgeler için en az üç nükleotid ve mikrosatellite bölgeler için en az altı nükleotid olan TR'ler suffix array algoritması kullanılarak tüm genom boyunca taranmıştır.

Bulgular: Tarama sonrası 359 minisatellite ve 8973 mikrosatellite bölge belirlenmiştir. TR'ler tüm genom boyunca tek tek taranarak; *T. annulata*'nın kromozomları üzerindeki yerleşim yerlerine, motiflerin benzerliğine (>%96), tekrar sayıları ile tek bölgeyi temsil etmesine, bölgelerin uzunluklarına (<1500 bp) ve primer tasarlanmaya uygun korunmuş bölgeler içermesine bakılarak mini ve mikrosatellite bölgeler belirlenmiştir. Belirlenen bölgeleri çoğaltmada kullanılacak primerler, korunmuş bölgelerden tasarlanmış ve her bir primer, *T. annulata*'nın farklı izolatları kullanılarak değerlendirilmiştir.

Sonuç: Bu çalışmada, *T. annulata* popülasyonlarındaki çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla daha önce belirlenen markerlere ilave olarak kullanılabilen, farklı kromozomlar üzerinde bulunan toplam 13 mini ve mikrosatellite marker seçilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Theileria annulata*, rekombinasyon, satellit marker

Geliş Tarihi: 17.06.2016

Kabul Tarihi: 21.12.2016

ABSTRACT

Objective: Selecting polymorphic mini- and microsatellite markers to determine genetic diversity and chromosomal regions exhibiting elevated rates of recombination in *Theileria annulata* populations after recombination.

Methods: The Unipro UGENE software was used to select markers. A score at which 10 times more tandem repeats (TRs) were identified in the real DNA sequence than those in the scrambled sequences of *T. annulata* was used as the cutoff. TRs containing minimum three nucleotides in length for microsatellite and six nucleotides for minisatellite regions and having a repeat motif identity between 96%-100% with the unit size repeated minimum three times were screened through the whole genome using the suffix array algorithm.

Results: A total of 359 minisatellites and 8973 microsatellites were identified. TRs were screened one by one through the whole genome; mini- and microsatellites representing a single region and having suitable regions for primer design were selected based on their localization on *T. annulata* chromosomes, their repeat motif identity (>96%), and their repeat length (<1500 bp). The primers used to amplify selected candidates were designed, and each primer was used to check 27 different isolates of *T. annulata*.

Conclusion: In the present study, a total of 13 polymorphic mini- and microsatellite markers located on the different chromosomes were selected to determine the population diversity of *T. annulata*.

Keywords: *Theileria annulata*, recombination, satellite marker

Received: 17.06.2016

Accepted: 21.12.2016

Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Hüseyin Bilgin Bilgiç E.posta: hbilgic@adu.edu.tr

DOI: 10.5152/tpd.2017.4970

©Telif hakkı 2017 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.tparazitolog.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2017 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.tparazitolog.org

GİRİŞ

Hyalomma soyuna bağlı ixodid keneler tarafından nakledilen protozoal bir etken olan *Theileria annulata*'nın neden olduğu tropikal theileriosis, Türkiye'nin de içinde yer aldığı 15°-60° Kuzey enlemi ile 30° Batı-150° Doğu boylamları arasındaki bölgelerde yaşayan sığırlarda ekonomik açıdan önem arz eden protozoal bir hastalıktır (1). Hastalığın şiddeti endemik stabil bölgelerde oldukça sınırlı olmasına karşın, endemik stabil olmayan bölgelerde ciddi ekonomik kayıplara neden olabilmektedir (2, 3).

Hastalığın patogenezi ile parazitin popülasyon yapısı ve epidemiyolojik faktörler arasında yakın bir ilişki vardır. Vektörler arasında soy düzeyinde ve buldukları coğrafik bölgelere adaptasyonları bakımından gözlenen farklılıklar ile etkenlerin vektörlere aktarım yoğunluğu ve vektörlerdeki enfeksiyon düzeyindeki farklılıklar, bölgeler arasında genetik çeşitliliklere neden olabilmektedirler (4, 5). *Plasmodium falciparum* ile ilgili yapılan çalışmalarda, vektöre aktarılma oranlarının düşük ya da yüksek olmasının, farklı bölgelerdeki popülasyon yapısında değişimlere yol açtığı belirlenmiştir (6-8). *T. annulata* hem vektör kenelerde hem de omurgalı konaklarında birbirinden morfolojik olarak farklılık gösteren gelişme dönemleri geçirmektedir. *T. annulata* genomu sadece kenelerin bağırsağında geçen kısa bir diploid faz haricinde, omurgalı konak olan sığırlarda ve yine kenelerin tükürük bezlerinde haploid yapıdadır. Kenede morfolojik olarak tanımlanmış seksüel aşama sonucunda oluşan kinetler tükürük bezlerine göç ederek sığırlar için enfektif dönem olan sporozoitleri oluştururlar (9). Kene barsağındaki rekombinasyon sonucu meydana gelen bu sporozoitler, sadece enfeksiyonun devamlılığını sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda doğal şartlarda parazit popülasyonlarında genetik çeşitliliğin oluşmasında önemli yer tutmaktadır.

Parazitin epidemiyolojisi üzerinde selektif etki oluşturan ilaç uygulamaları, koruyucu amaçla uygulanan aşılamalar, doğal koşullarda oluşan tekrarlı enfeksiyonlar, aşırı ve düzensiz akarisit kullanımı, kene habitatlarındaki değişimler ve kontrolsüz hayvan hareketleri gibi faktörler parazitin popülasyon yapısında genetik düzeyde farklılaşmaların oluşmasına neden olmaktadır (10-13). Bu durum hastalığın epidemiyolojisi üzerine etki yaparak gelecekte parazitin farklı popülasyonlarından kaynaklanan yeni risklerin ortaya çıkmasına yol açabilmektedir. Popülasyonların genetik farklılıkların belirlenmesinde kullanılan teknikler arasında yer alan mini ve mikrosatellite markerler kullanılarak yapılan tandem tekrarlı bölge (satellit DNA) analizleri; genom diziliminin önemli kısmını oluşturan ve genomun diğer bölgelerine göre mutasyon oranlarının 10-10⁴ kez daha fazla görüldüğü bölgelerinde, rekombinasyon sırasında meydana gelen eşit olmayan çaprazlamalar (crossing-over) ve gen dönüştürme (gene conversion) gibi olaylar nedeniyle tandem tekrarlı (TR) dizilimlerde oluşan kısaltmaların veya uzamaların belirlenmesi esasına dayanmaktadır (14).

Theileria parva (15-17) ve *T. annulata* (18)'nin popülasyon yapıları ile ilgili polimorfik mini ve mikrosatellit marker kullanılarak yapılan çalışmalarda, bu parazitlerin popülasyonlarında genetik değişimin sıklıkla meydana geldiği belirlenmiştir. Deneysel olarak, *T. parva*'da seksüel rekombinasyonun varlığı moleküler düzeyde kanıtlanmıştır (5). *T. annulata* popülasyonlarında ise seksüel rekombinasyonu destekler nitelikte veriler elde edilse de bu veriler deneysel olarak kanıtlanmamıştır (18, 19). *T. annulata*'da seksüel

rekombinasyonun varlığının deneysel olarak gösterilememesinin altında yatan önemli nedenlerden biri rekombinasyon sonrası meydana gelen genetik çeşitlilik ile rekombinasyonun yoğun olduğu kromozomal bölgelerin tespitinde deneysel çalışmalarda kullanılacak bütün kromozomları kapsayacak sayıda polimorfik markerin bulunmamasıdır.

Bu çalışmada, mini ve mikrosatellit markerlerin sayılarını arttırarak kromozomlar üzerindeki kapsama alanlarını geliştirmek için ilave yeni polimorfik mini ve mikrosatellite markerlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Genotiplendirmede kullanılacak polimorfik markerlerin belirlenmesi

Theileria annulata popülasyonlarında oluşacak genetik çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılacak polimorfik mini ve mikrosatellite markerler, Unipro UGENE ver.1.9.7 (<http://ugene.unipro.ru/>) programı kullanılarak belirlenmiştir (20). Bu amaçla ilk olarak; Unipro UGENE ver.1.9.7 programına yüklenecek olan *T. annulata* genomunda yer alan linear DNA'lara ait nükleotid dizilimleri fasta formatında kaydedilmiştir. Daha sonra genom diziliminde yer alan tekrarlı bölgelerin belirlenmesinde kullanılacak ilgili nükleotid dizilimleri aynı uzunluk ve kompozisyona sahip olmak kaydıyla kromozomlar (chr1-4) birbirleri arasında karıştırılarak toplam 8.352 ve 520 bp uzunluğunda farklı kombinasyonlar elde edilmiştir. Her bir kombinasyon farklı parametreler kullanılarak algoritmaları yönünden karşılaştırılmış ve genom dizilimi tekrarlı bölgeler ilgili yazılıma yüklenmiş ve çok sayıda farklı eşik değeri kullanılarak mini ve mikrosatellite bölgeler yönünden taranmıştır. En son aşamada rastgele karıştırılmış dizilimlere göre gerçek DNA diziliminde 10 kat fazla TR belirleyen skor, eşik değeri olarak belirlenmiştir. Belirlenen bu eşik değeri, mini ve mikrosatellite bölgelerde tekrarlı motiflerin benzerliği %96-100 arasında olan, en az üç tekrarı olan ve minimum tandem boyutu minisatellite bölgeler için en az üç, mikrosatellite bölgeler için en az altı nükleotid (nt) olacak şekilde suffix array algoritması kullanılarak ayrı ayrı tüm genom boyunca taranmıştır.

Belirlenen polimorfik bölgeleri çoğaltacak primerlerin tasarlanması ve değerlendirilmesi

Belirlenen polimorfik bölgeleri çoğaltmada kullanılacak primerler sıralı tekrarlı dizilimleri içine alacak şekilde korunmuş bölgelerden tasarlanmıştır. Belirlenen mini ve mikrosatellite bölgeleri çoğaltmada kullanılacak primerler, *T. annulata* GeneDB (<http://old.genedb.org/genedb/annulata/>) veri tabanında anote edilmiş *T. annulata* genomu üzerinde gözle tasarlanmıştır. Primerlerin tasarlanmasında; uzun adenin/timin (A/T) tekrarlı bölgelerin (>4-5 nt) olmamasına, guanin-sitozin (GC) içeriğinin %30-60 arasında ve T_m 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 *Theileria*-spesifik sub-telomerik (SVSP) veya subtelomerik sfi-fragment-related (Sfi) gibi protein ailelerini kodlayan sub-telomerik genlere ait alanların dışında olmasına, protein kodlayan diğer bölgelerde ise mümkün olduğunca korunmuş bölgelerin bulunmasına dikkat edilmiştir. Ayrıca belirlenen primerler, kendi ile veya diğer primerler ile primer-dimer, ikincil yapılar ve hairpin oluşturmaması yönünden de incelenmiştir.

Tasarlanan her primer çiftinin hem *T. annulata*'ya özgü olduğunun, tek bir bölgeyi temsil ettiğinin ve belirlenen uzunluklarda ürün elde edilip edilmediğinin belirlenmesi hem de tasarlanan her primer çiftine ait en uygun bağlanma ısılarının tespiti için gradient (ısı derecelendirmeli) polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) (Techne TC-512) yapılmıştır. Bu doğrultuda 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 start Taq DNA polimeraz (Solis BioDyne), 10 µM ileri ve geri yönlü primer çifti ile 1 µl *T. annulata* / Ankara C9 ve D7 klonlarından elde edilen DNA örnekleri kullanılmıştır. Reaksiyonlar, 94°C'de 12 dakikalık ön denaturasyonu takiben, her siklus için denaturasyon (95°C'de 50 saniye), bağlanma (55°C'de 10°C'lik derecelendirme [50,8-59,2°C ısı aralığında]) yapılmak kaydıyla, 50 saniye ve uzama (72°C'de 1 dakika) aşamalarından oluşmak üzere 30 siklus ve 72°C'de 10 dakikalık son uzama ola-

cak şekilde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra her PZR ürününden 10 µl olmak koşuluyla mililitresinde 5 µl Safe View™ bulunan %2'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuş ve ultraviole ışık altında UVP EC3 Bio-Imaging sisteminde görüntülenerek en uygun bağlanma ısıları belirlenmiştir.

Daha sonra *T. annulata*'ya özgü tek bir bölgeyi temsil eden ve öngörülen uzunluklarda ürün elde edilen polimorfik markerlar, 27 farklı *T. annulata* izolatu (Tablo 1) kullanılarak PZR ile test edilmiş ve en uygun markerler belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan 13 izolata ait DNA örnekleri Glasgow Üniversitesinden, geriye kalan izolatlara ait DNA örnekleri ise Anabilim dalımızca daha önceki yıllarda yürütülen çalışmalar kapsamında toplanan izolatlardan elde edilmiştir (Tablo 1).

Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 26.08.2011 tarih ve B.30.2.

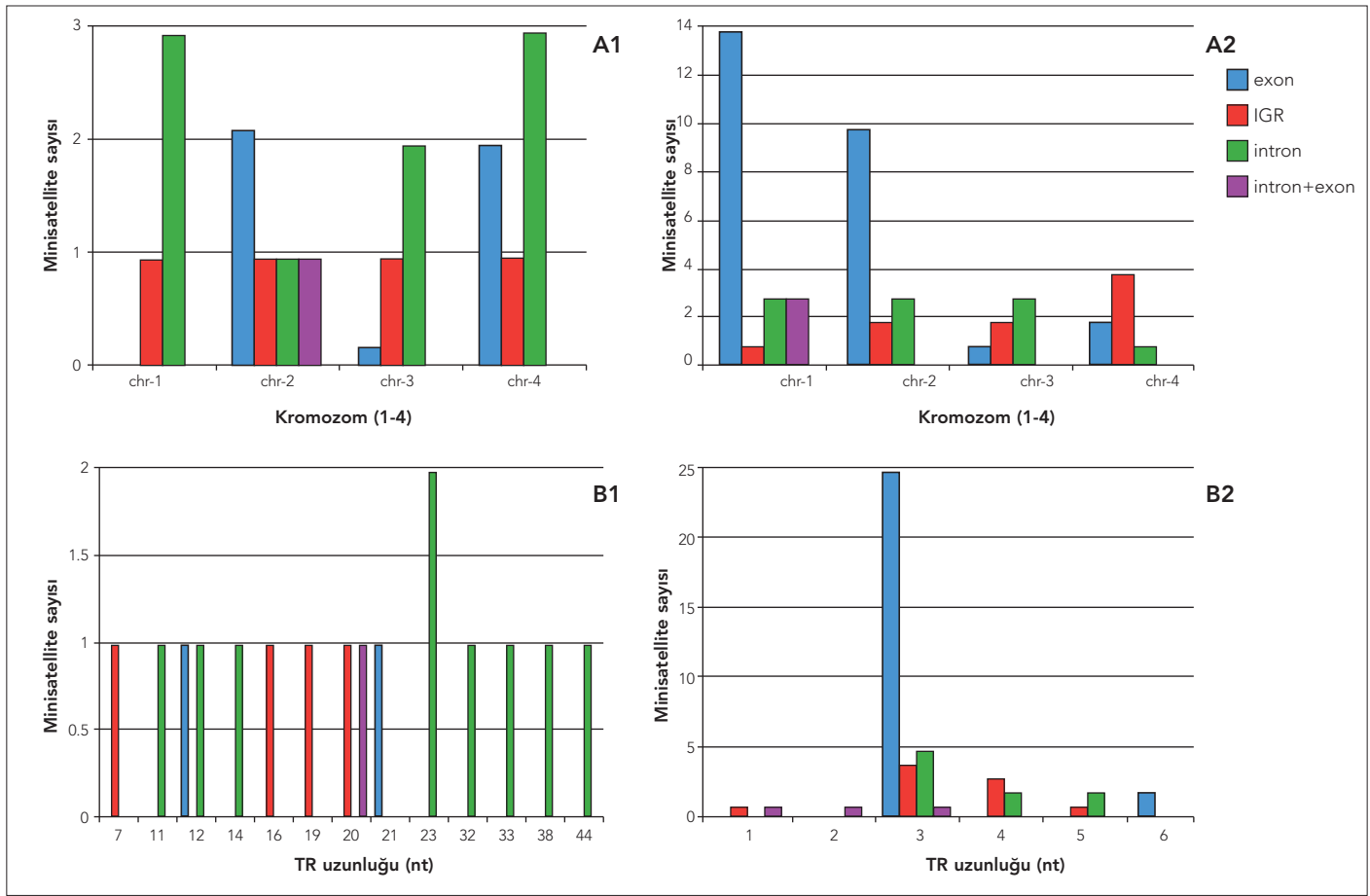
Tablo 1. Polimorfik mini ve mikrosatellitlerin test edilmesinde kullanılan parazit izolatları

Kodu	İzolat Türü	Parazit Dönemi	Tipi	Orijini
1	<i>T.annulata</i> Tunus 7	piroplasm	saha izolatu	Tunus ^b
2	<i>T.annulata</i> Soba 2A5	Şizont	hücre kültürü	Sudan ^b
3	<i>T.annulata</i> Razi J3	Şizont	hücre kültürü	İran ^b
4	<i>T.annulata</i> Umbanein	Şizont	hücre kültürü	Sudan ^b
5	<i>T.annulata</i> Tova p15	Şizont	hücre kültürü	İsrail ^b
6	<i>T.annulata</i> Gharb43	Şizont	hücre kültürü	Fas ^b
7	<i>T.annulata</i> Ode p58	Şizont	hücre kültürü	Fas ^b
8	<i>T.annulata</i> JED4 p200	Şizont	hücre kültürü	Tunus ^b
9	<i>T.annulata</i> Aova	Şizont	hücre kültürü	Türkiye
10	<i>T.annulata</i> Dalama	Şizont	hücre kültürü	Türkiye
11	<i>T.annulata</i> Pendik p313	Şizont	hücre kültürü	Türkiye ^b
12	<i>T.annulata</i> Aydın p15	Şizont	hücre kültürü	Türkiye
13	<i>T.annulata</i> D.bakır p107	Şizont	hücre kültürü	Türkiye ^b
14	<i>T.annulata</i> Ank A2	Şizont	hücre kültürü	Türkiye ^b
15	<i>T.annulata</i> Aova1	Piroplasm	saha izolatu	Türkiye
16	<i>T.annulata</i> Aova2	Piroplasm	saha izolatu	Türkiye
17	<i>T.annulata</i> Aova3	Piroplasm	saha izolatu	Türkiye
18	<i>T.annulata</i> Aova4	Şizont	klon*	Türkiye
19	<i>T.annulata</i> Aova5	Şizont	klon*	Türkiye
20	<i>T.annulata</i> Aova6	Şizont	klon	Türkiye
21	<i>T.annulata</i> Aova7	Şizont	klon	Türkiye
22	<i>T.annulata</i> Aova8	Şizont	klon*	Türkiye
23	<i>T.annulata</i> Aova9	Şizont	klon*	Türkiye
24	<i>T.annulata</i> Aova10	Şizont	klon	Türkiye
25	<i>T.annulata</i> Aova11	Şizont	klon	Türkiye
26	<i>T.annulata</i> Aova12	Şizont	klon	Türkiye
27	<i>T.annulata</i> Ankara D7	Şizont	klon	Türkiye ^b
a	<i>T.annulata</i> Ankara C9	şizont	klon	Türkiye ^b

*birden fazla genotip ihtiva ettiği belirlenmiş klonal hücrelerdir

^asadece primerlerin gradient PZR yöntemi ile en uygun bağlanma ısılarının belirlenmesinde kullanılmıştır

^bGlasgow Üniversitesinden temin edilen DNA örneklerini belirtmektedir



Şekil 1. (A1-A2) mini (A1) ve mikrosatellit (A2) bölgelerin *T. annulata* genomundaki kromozomlar üzerindeki protein kodlayan ve kodlamayan (exon, intron, IGR; intergenik bölge, intron+exon) bölgelere göre dağılımları, (B1-B2), mini (B1) ve mikrosatellit (B2) bölgelerdeki tekrarlı motiflerin (TR) uzunluklarına göre protein kodlayan ve kodlamayan (exon, intron, IGR; intergenik bölge) bölgelere göre dağılımları

ADÜ.0.00.00.00/050.4/2011/058 numaralı etik komite onayı ile yürütülmüştür. Bu çalışmada, hiçbir canlı hayvan kullanılmamıştır.

BULGULAR

Genotiplendirmede kullanılacak polimorfik markerlerin belirlenmesi

Unipro UGENE ver.1.9.7 programı kullanılarak yapılan tarama sonucunda 359 minisatellit (7-50 nt) ve 8973 mikrosatellit (1-6 nt) bölge belirlenmiştir. Daha sonra belirlenen mini ve mikrosatellit 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 ve yukarıdaki kriterlere bakılarak mini ve mikrosatellit bölgeler ayrı ayrı belirlenmiş ve Excel programında kromozomlar üzerindeki yerleşim yerlerine göre sıralanmıştır.

Uzunlukları 7-50 nükleotid arasında değişen 359 minisatellit bölge arasından Excel programında yapılan incelemeler sonucunda 27 adet (MSC1-27) tekrarlı bölge seçilmiştir. Bu minisatellit bölgelerden ikisinin mikrosatellit bölgelerle birinin de daha önceki çalışmalarda belirlenen TS8 kodlu marker (18) ile aynı bölgede olduğu görülmüştür. Geriye kalan 24 minisatellit bölgenin sekizi ise kromozomların (chr1-4) başında veya sonunda yerleşim

göstermeleri nedeniyle bu bölgeleri çoğaltmada kullanılacak primerlerin sıralı tekrarlı dizilimleri içine alacak şekilde korunmuş bölgelerden tasarlanması mümkün olmamıştır.

Uzunlukları 1-6 nükleotid arasında değişen 8973 mikrosatellit bölge arasından 90 adet (Tmcs1-90) tekrarlı bölge belirlenmiştir. Bu bölgelerden beşinin daha önceki çalışmalarda belirlenen TS5, 9, 12, 16, 25 kodlu markerler (18) ile aynı bölgede olduğu tespit edilmiştir. Toplamda 37 adet mikrosatellit bölge için primerlerin tasarlanması mümkün olmamıştır.

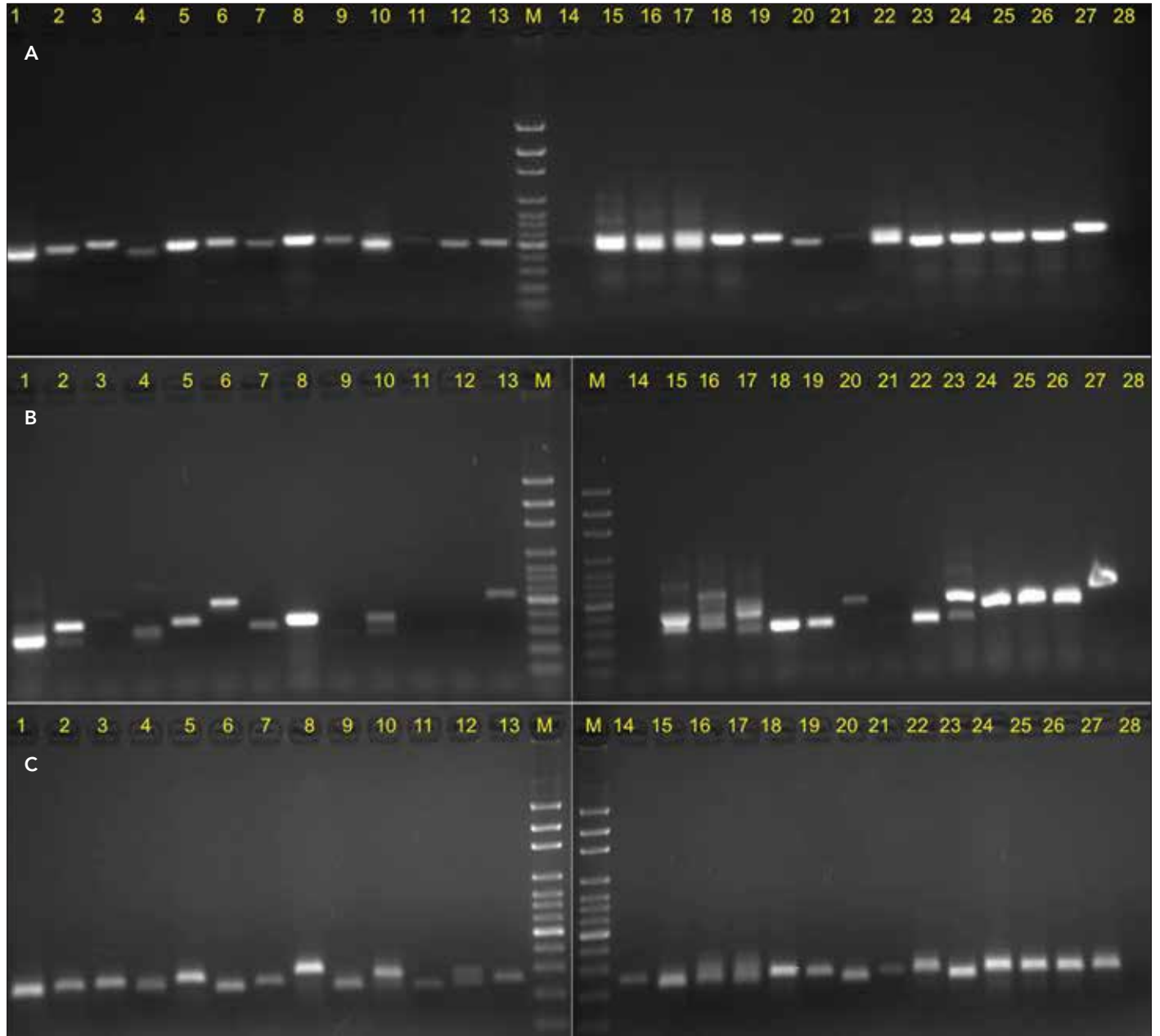
Mini ve mikrosatellit tekrarlı bölgelerin *T. annulata* genomundaki kromozomlar üzerindeki protein kodlayan ve kodlamayan [exon, intron, intergenik bölge (IGR), intron+exon] bölgelere göre dağılımları Şekil 1a ve b'de verilmiştir. TR'ler içeren mini ve mikrosatellit bölgelerin sırası ile %87,5 ve %43,75'i protein kodlamayan bölgelerde yerleşim göstermiştir. Mini ve mikrosatellit bölgelerin TR uzunluklarına göre protein kodlayan ve kodlamayan bölgelere göre dağılımları Şekil 1b'de verilmiştir.

Belirlenen polimorfik bölgeleri çoğaltmak amacıyla tasarlanan primerler

Belirlenen polimorfik mini- ve mikrosatellit bölgeleri çoğaltmada kullanılmak üzere tasarlanan 64 primer çifti tek tek PZR ile değerlendirilmiştir. Tasarlanan 64 primer çiftinden, üçü ile gradient

PZR'da hiç bir ürün elde edilememiş, 10 primer çifti ile yapılan PZR sonucunda elde edilen ürünlerde ise çok sayıda non-spesifik bant oluşmuştur. Ayrıca beş marker ile sadece *T. annulata*/Ankara izolatının C9 ve D7 klonları kullanılarak yapılan gradient PZR'de istenilen boyutta ürün elde edilmiş, *T. annulata*'nın farklı izolatları ile yapılan PZR'da hiçbir bant çoğaltılamamıştır. Kalan 46 primer çiftinden 20'si ile minimum 11, maksimum 23 *T. annulata* izolatını çoğaltılamamıştır. Geriye kalan 26 primer çiftinden yedisi tüm izolatları çoğaltabilmiştir. Bazı markerlere (MSC8, MSC19, Tmsc31)

ait jel görüntüsü Resim 1'de verilmiştir. Bu markerler ile çoğaltılan izolatlarda minimum 10 - maksimum 29 farklı allel tespit edilmiştir (Tablo 2). Sonuç olarak, *T. annulata* popülasyonlarında rekombinasyon sonrası oluşan popülasyonlarda genetik çeşitliliğin belirlenmesi ve genetik haritalandırmanın yapılabilmesi amacıyla üç mini (MSC-8, MSC-14 ve MSC-19) ile 10 mikrosatellite (Tmsc-1, -31, -33, -37, -45, -48, -68, -75, -77 ve -86) bölgeden oluşan toplam 13 marker seçilmiştir. Seçilen markerler ile ilgili ayrıntılı bilgiler Tablo 3'de ve seçilen polimorfik mini ve mikrosatellite bölgelerin



Resim 1. *T. annulata*'nın farklı stok ve izolatlarına ait DNA örneklerinin tasarlanan MSC8 (a), MSC19 (b) ve Tmsc31 (c) primer çiftleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektorforezine ait görüntüsü. (M): 100 bp'lik referans moleküler boyut belirleyici; 1: *T. annulata*/Tunus 7; 2: *T. annulata*/Sudan Soba 2A5; 3: *T. annulata*/İran Razi J3; 4: *T. annulata*/Sudan Umbanein; 5: *T. annulata*/İsrail Tova; 6: *T. annulata*/Fas Gharb43; 9: *T. annulata*/Fas Ode; 8: *T. annulata*/Tunus JED4; 9: *T. annulata*/Türkiye Aova; 10: *T. annulata*/Türkiye Dalama; 11: *T. annulata*/Türkiye Pendik; 12: *T. annulata*/Türkiye Aydın; 13: *T. annulata*/Türkiye D.bakır; 14: *T. annulata*/Türkiye Ank A2; 15-26: *T. annulata*/Türkiye Aova saha izolatları ve klonları ; 27: *T. annulata*/Türkiye Ankara D7; 30: dH2O negatif kontrol

T. annulata genomundaki kromozomlar (chr1-4) üzerindeki yerleşim yerleri Şekil 2'de verilmiştir.

TARTIŞMA

Doğada, parazitlerde oluşan seksüel rekombinasyon ile vektörler arasındaki cins düzeyinde ve buldukları coğrafik bölgelere adaptasyonları bakımından gözlenen farklılıklar popülasyonun genetik çeşitliliğinin oluşmasında önemli bir yer tutmaktadır (4, 5). Parazitin epidemiyolojisi üzerine etki eden faktörler gelecekte farklı genotipik yapıya sahip popülasyonlarından kaynaklanan yeni risklerin ortaya çıkmasına yol açabilmektedir. Parazitin temel popülasyon yapısının bilinmesi ortaya çıkabilecek risklerin öngörülmesine yardımcı olacaktır.

Theileria annulata izolatlarında aynı lokus üzerindeki farklı alleller tarafından kodlanan glikoz fosfat izomeraz fenotipleri, tek kopyalı genlerin RFLP analizleri, monoklonal antikolar, yüzey antijen genlerinin dizilim analizleri ve SVSP genleri üzerine yapılan bir

seri çalışmada *T. annulata* popülasyonları arasında önemli ölçüde polimorfizmin olduğu belirlenmiştir (19, 21-26). Ancak, bu teknikler gerek popülasyon içerisindeki genetik farklılıkları belirlemede gerekse popülasyonun genomik düzeydeki çeşitliliği hakkında yeterli düzeyde veriye ulaşılmamasına imkan sağlamamaktadır. Bununla beraber, mini ve mikrosatellit markerler kullanılarak yapılan genotiplendirmeler parazitlerin popülasyon genetiği çalışmalarında kullanılabilecek uygun metotlar olarak göze çarpmaktadır.

Mini ve mikrosatellitler sırası ile 7-24 ve 2-6 bp'lık kısa tekrarlı DNA motiflerden oluşan ve yüksek mutasyon oranına sahip nötr DNA bölgeleridir (27). Bu çeşitliliğinin nedeni, DNA'nın diğer nötr bölgelerine kıyasla mini ve mikrosatellitlerin DNA replikasyonu sırasında bir DNA ipliğinin kayıp diğer iplikle yanlış baz eşleşmesi yapmasından kaynaklanmaktadır. Mayoz bölünme sırasında rekombinasyon yoluyla meydana gelen bu mutasyonların oranı, baz yer değiştirmelerinde her jenerasyonda 10^{-2} ve 10^{-6} kez daha fazladır (28, 29). Son yıllarda veri tabanlarına kayıtlı

Tablo 2. Belirlenen polimorfik mini ve mikrosatellit markerlerin analiz sonuçları

Kod	Çoğaltılan farklı izolatlardaki toplam allel sayısı	Çoğaltılmayan <i>T.annulata</i> izolat sayısı	TR uzunluk (nt)	TR kopya sayısı	TB* uzunluk (bp)	Primer bağlanma ısıları (°C)	Çoğaltılan ürün aralığı (bp)	PZR ürünü belirlenen boyutu (bp)
MSC8	29	-	20	8	160	57	200-800	508
MSC9	2	8	14	8	112	57	850-900	883
MSC19	10	-	7	11	77	51	400-700	578
MSC13	32	3	23	8	184	57	300-950	766
MSC14	15	1	20	6	120	53-56	350-700	496
Tmsc1	5	1	3	9	52	55	700-800	737
Tmsc11	15	4	3	36	192	51	280-500	356
Tmsc13	15	4	3	58	666	53	500-1000	857
Tmsc14	1	9	3	12	78	54	237	237
Tmsc20	11	3	3	46	628	59	700-900	766
Tmsc75	14	-	2	18	48	58	100-300	220
Tmsc77	18	-	5	16	58	55	100-300	212
Tmsc86	16	1	3	18	129	55	300-450	330
Tmsc22	1	9	1	67	78	55	218	218
Tmsc23	2	7	3	25	211	56	150-400	370
*Tmsc29	11	3	3	13	376	55-57	650-850	813**
Tmsc31	19	-	3	11	39	55	200-350	280
Tmsc33	15	-	3	9	40	55	100-250	194
Tmsc34	17	5	3	12	57	59	250-400	296
Tmsc37	14	-	3	13	75	55	200-300	248
Tmsc38	12	3	3	45	336	57	400-600	455
Tmsc45	14	1	3	14	68	58	150-300	216
Tmsc48	21	2	4	9	57	59	150-550	304
Tmsc53	3	7	4	15	72	57	250-500	380
Tmsc67	2	10	4	20	57	54	400-450	431
Tmsc68	11	2	5	9	25	59	450-750	554

MSC: minisatellit bölge; Tmsc: mikrosatellit bölge; chr: bulunduğu kromozom; TR: tekrarlı motif; TB: tekrarlı bölge

*Tmsc29 marker bölgesi için yeni tasarlanan primerleri belirtmektedir.

11-23 arasında *T.annulata* izolatını çoğaltamayan toplam 20 marker için tasarlanan primer çiftleri tablodan çıkartılmıştır.

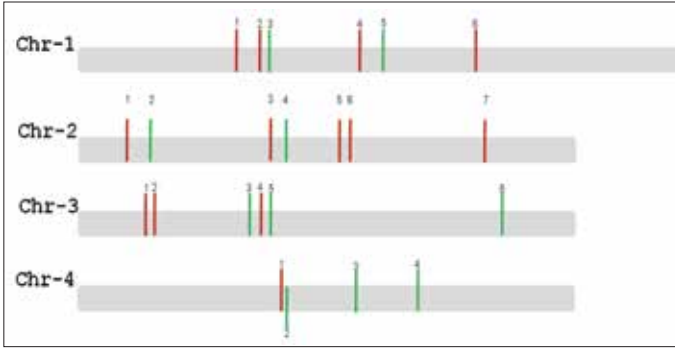
Tablo 3. *T.annulata*'nın popülasyon genetiğinin araştırılması amacıyla yapılan çalışmalarda kullanılacak polimorfik markerlerin özellikleri

Kod	chr*	En yakın CDS*	TBYY*	TR* dizilimi (5'-3')	TR kopya sayısı	<i>T.annulata</i> ürün aralığı (bp)	PZR ürün uzunluğu (bp)	Primer dizilimi (5'-3')	Bağlanma ısı (°C)
MSC8 ^a	2	TA13080	intron *+ exon	AGAGGTACATAGTAATATAT	8	200-800	508	F;tactagtactaccaatcccttaaagccc / R;aatttattgactcacaacagattcatcc	57
MSC19 ^a	2	TA15640	intron	AAATTAG	11	400-700	578	F; ttgtatttaggaattaattgggg / R;cataattattacctctattacac	51
MSC14 ^a	3	TA03890	intron	TTAGGTATATAAGAGCTATT	6	350-700	496	F;gtaggtatggaatatgaataaattg R;cattattctttctcaatcttcc	56
Tmsc1 ^a	1	TA21235	exon	AAT	9	700-800	737	F; agactcatagaatggaaccgaacgtg / R; catatattggaagcaaatctccaag	55
Tmsc75 ^a	1	TA20880	exon5+ IGR	TA	18	100-300	220	F; gatagtctcatggatgacggtc / R; ttacataacatgctgaatcgacatgc	58
Tmsc77 ^a	1	TA20250	intron	AAATT	16	100-300	212	F; agaatctaataatagtagaaattcac R;caagatccaaaaactaaattatgtgc	55
Tmsc86 ^a	1	TA16655	exon	ATT	18	300-450	330	F; cagataacattagatgactaatgc / R; aactcaaaactcaataaaaactggtc	55
Tmsc31 ^a	2	TA13875	intron	ATT	11	200-350	280	F; tttagcatttgataacaacattgtg / R; tgattattcaaaaaggaccttacg	55
Tmsc33 ^a	2	TA13660	IGR*	AAT	9	100-250	194	F; ccattaactcattatattattatgc / R; tacctactggaatcacaacatgag	55
Tmsc37 ^a	2	TA11770	exon	ATT	13	200-300	248	F; tcggtcaattgtacgctctccg / R; tctacagccgggaatcgaattccagc	55
Tmsc45 ^a	3	TA04315	exon	TAC	14	150-300	216	F; ctgatgatgatgtacacaggatc / R; aagcgttaagattctgattgtc	58
Tmsc48 ^a	3	TA05285	IGR	AATT	9	150-550	304	F; acccattcaactgcaacgaagcg / R; tcctaacaccctacaattattatcc	59
Tmsc68 ^a	4	TA08255	intron	TAGTA	9	450-750	554	F; ctcaatgtactccaatctcacc / R; cttgaagatgctgagagtagagaag	59
TS5 ^b	4	TA10045	exon	GGTTCA	14	248-318	282	F ctggaacatgaattactgttctcc / R ggacaccaatgagtgacgtgacag	60
TS6 ^b	4	TA11040	intron	TAATTATAGG	14	301-466	389	F catccttgacactgattgtac / R cggtagtaccagttactgtc	60
TS8 ^b	3	TA03940	exon	TATTATTAATG	11	195-356	306	F taaacgattaaatcaagtg / R attggaatggtgaataatgag	55
TS9 ^b	3	TA03885	IGR	ATT	27	338-386	366	F aatgtgtggtacaacatcac / R gatatggaatcactagaagttg	58
TS12 ^b	3	TA18345	exon	AATACT	10	237-376	267	F gatgatagaggaattgatgatgc / R ggaatatcacaattaagattc	55
TS15 ^b	1	TA20375	exon	AAGATACTAATGGAAGATTAAGTA	7	164-404	286	F gtacgtaacttggaatggtag / R gatacaacgttacggagtcagttgg	60
TS16 ^b	1	TA20830	IGR	TAA	35	345-439	354	F ccaatgtcaacagatgatg / R gagtaagaagtaccactactg	56
TS20 ^b	2	TA13850	intron	ATTACTACTA	12	187-310	273	F cctcatgatctacatctgatgc / R ggctgaatgggtacctgttc	60
TS25 ^b	4	TA08330	intron	ATTACTACTACTATT	7	209-296	279	F cgccatcagtagctatctcag / R gacgaccataactgggaagcaac	60
TS31 ^b	2	bilinmiyor	NCR	AATTTATCCTGAATTATAGA	10	203-385	387	F gttatctctgtctattatagc / R gtattaaaatcataagattc	50

MSC: minisatellit bölge; Tmsc: mikrosatellit bölge; chr: bulunduğu kromozom; CDS: protein kodlayan bölge; IGR: intergenik bölge; TR: tekrarlı motif; TB: tekrarlı bölge

^abu çalışmada belirlenen markerler

^bWeir, 2006 tarafından belirlenen markerler



Şekil 2. Genetik çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen polimorfik mini ve mikrosatellit bölgelerin *T.annulata* genomundaki kromozomlar (chr1-4) üzerindeki yerleşim yerleri. MSC ve Tmsc kodlu markerler sırasıyla mini ve mikrosatellit bölgeleri göstermektedir. Birinci kromozom (chr-1) üzerindeki yerleşim yerlerine göre 1-6 çizgi sırasıyla Tmsc 1, 75, TS16, TS15, Tmsc77, Tmsc86 kodlu toplam 2 mikrosatellit bölgeyi, ikinci kromozom (chr-2) üzerindeki yerleşim yerlerine göre 1-7 çizgi sırasıyla MSC19, TS31, Tmsc31, TS20, Tmsc33, MSC8, Tmsc37 kodlu toplam 2 minisatellit ve 5 mikrosatellit, üçüncü kromozom (chr-3) üzerindeki yerleşim yerlerine göre 1-6 çizgi sırasıyla Tmsc45, Tmsc48, TS9, MSC14, TS8, TS12 kodlu toplam 1 minisatellit ve 5 mikrosatellit, 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 projede de kullanılacak olan 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

farklı organizmalara ait genom dizimleri tekrarlı bölgelerin hızlı ve ucuz şekilde belirlenebilmesine büyük katkı sağlamıştır. Mini ve mikrosatellitler, apikompleksa anaç altında yer alan, *P. falciparum*, *T. parva*, *T. annulata*, *Cryptosporidium parvum* ve *Eimeria tenella* gibi parazitlerin genomunda oldukça yaygın olarak belirlenmiş ve bu parazitlerin popülasyon yapılarının belirlenmesinde kullanılmıştır (15-18, 30-34).

Gen dizimleri incelenirken TR'lerin belirlenmesinde karşılaşılan en önemli sorunlardan biri, gerçek bir tekrarlı bölgenin nasıl tanımlandığıdır. Bazı az sayıdaki tekrarlar genom içerisinde sadece şans eseri çok sayıda tekrarlanmış olabilmekte, aynı zamanda tekrarlı bölgelerde görülen tek nükleotid değişimleri TR'lerin belirlenmesini karmaşık hale getirmektedir. Bu sebeplerle bir dizimin tekrarlı bir bölge olarak tanımlanması için gerekli minimum kriterleri taşımasını sağlayacak bir eşik değerin (cut-off) belirlenmesi gerekmektedir (14). TR'lerin belirlenmesinde kullanılan eşik değerler içerisinde tekrarlı birim sayısı, tekrarlı birimin uzunluğu, farklı tekrarlı alanlardaki motiflerin benzerliği gibi tekrarların farklı karakteristik özellikleri yer almakta ve yapılan skorlamalar kullanılan algoritmalarla göre değişkenlik göstermektedir.

Genomik DNA dizimlerinde tekrarlı bölgelerin belirlenmesinde kullanılan en etkin yöntemlerden biri, aynı uzunluk ve kompozisyona sahip rastgele karıştırılmış dizimlerin farklı parametreler kullanılarak algoritmalarının karşılaştırılmasıdır. Bu sayede genom dizimi tekrarlı bölgeler yönünden çok sayıda farklı eşik değeri kullanılarak taranmakta ve rastgele karıştırılmış dizimlerde elde edilen sonuçlar gerçek DNA dizimi kullanılarak elde edilenler

ile karşılaştırılıp, gerçek DNA diziliminde 10 kat fazla TR belirleyen skor eşik değeri olarak kullanılabilir (14). Nitekim çalışmamızda da Unipro UGENE ver.1.9.7 (<http://ugene.unipro.ru/>) programında gerçek DNA diziliminde 10 kat fazla TR belirleyen skor eşik değeri olarak kullanılarak yeni polimorfik mini ve mikrosatellite markerler belirlenmiştir (20).

Genom dizimlerinin varlığı tekrarlı bölgelerin çoğunun karşılaştırılmalı olarak belirlenmesine olanak sağlayan farklı algoritmalar kullanan Tandem repeat finder, Sputnik, TROLL, Unipro UGENE gibi çok sayıda yazılım geliştirilmesini sağlamıştır (35). Bu çalışmada da kullanılan Unipro UGENE, diğer programlara kıyasla gerek kullanım rahatlığı gerekse de incelenecek genom dizimi ile tekrarlı bölgelerin eş zamanlı olarak aynı programın farklı sayfalarında görülebilmesine ve verilerin daha kısa sürede, daha etkin olarak analizine olanak sağlamaktadır. Aynı zamanda, farklı algoritmaların bir arada kullanılarak çok sayıda farklı eşik değeri rahatça denenebilmesine ve dolayısı ile de analizlerde kullanılacak olan en uygun skor eşik değerinin karşılaştırılmalı olarak belirlenmesine olanak veren bir yazılımdır.

Theileria annulata popülasyonlarındaki genetik çeşitliliğin belirlenmesinde mini ve mikrosatellite markerler daha önce yapılan çalışmalarda kullanılmış, ancak *T. parva* popülasyonlarındaki genetik çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılan polimorfik markerler ile karşılaştırıldığında gerek sayı gerekse de kromozomlar üzerindeki kapsama alanı bakımından geliştirilmesinin gerekliliği ortaya çıkmıştır (18, 26, 31). Bu çalışma kapsamında yapılan analizlerde daha önceki çalışmalara (1, 15) benzer şekilde sayısal olarak beklenenden fazla miktarda tekrarlı bölge belirlenmiştir. *T.annulata* gibi gen bölgelerinin yoğun olduğu (≈ 3.500 gen bölgesi) genomlarda protein kodlamayan bölgelerle ilişkilendirilen satelit tekrarlı bölgelerin sayılarının nispeten az olduğu belirtilmekle beraber, bu çalışmada yapılan analizlerde, ökaryotik genomlardaki yapıya benzer şekilde yaklaşık her 900 bp'da bir tekrarlı bölge olacak şekilde satelit tekrarlı bölgelerin sayılarının beklenenden fazla olduğu görülmüştür (32).

Tandem tekrarlar, hem protein kodlayan gen bölgelerinde hem de transkripsiyon faktörleri gibi özel regülatör proteinlerin bulunduğu bölgelerde yer alabilmektedir (36, 37). 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*) ve *T. annulata* gibi farklı organizmalar arasında da bu oran %12-21 arasında değişmektedir (14). Bu çalışmada elde edilen veriler incelendiğinde farklı uzunluklara sahip tekrarlı motifler içeren mini ve mikrosatellitler sırası ile %87,5 ve %43,75'i protein kodlamayan bölgelerde yerleşim gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, bu gen bölgelerindeki GC miktarları ile motif uzunluklarının birbirleri ile doğru orantılı olarak arttığı tespit edilmiştir.

Protein kodlayan gen bölgelerinde yer alan tekrarlı bölgeler genelde tri ve hexonükleotid gibi üç ve katlarında sayılara sahip tekrarlı birimlerden oluşmaktadır ve bu durumun muhtemelen üç ve katlarında nükleotid içermeyen tekrarlı bölgelerde sıkça görülen çerçeve kayması mutasyonlarına (frameshift mutasyonu) karşı oluşan seleksiyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir (36). Bu çalışmada, mikrosatellite bölgelerin tekrarlı motif uzunluklarına

bakıldığında 1-5 nt (nükleotid) uzunluğundaki 21 bölge intron, intergenik bölge (IGR) ve IGR+exon üzerinde yerleşim gösterirken, uzunluğu üç nt olan 25 ve altı nt olan iki olmak üzere toplam 27 tekrarlı bölge exon üzerinde yer almıştır (Şekil 1b2). Bunun yanında, TR uzunlukları 12 ve 21 nt olan sadece iki minisatellite bölge exon üzerinde yerleşim göstermiştir (Şekil 1b1). 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 (14, 36). *T. annulata* genomunda kromozomlar üzerine dağılmış halde, SVSP protein ailesinde yer alan 51 adet *Theileria*-spesifik sub-telomerik gen bölgesi ve bunun yanında sayıları oldukça fazla olan hipotetik protein kodlayan gen bölgeleri bulunmaktadır. Konak bağışıklık sisteminden kurtulmada rol oynadığı düşünülen SVSP gen ailesi oldukça yaygın allelik çeşitliliğe sahiptir ve kromozomların sub-telomerik bölgelerinde yerleşim göstermektedir (26). Bu çalışmada belirlenen altı ve 12 nt uzunluğundaki TR'ler SVSP protein ailesindeki *Theileria*-spesifik sub-telomerik proteine ait exonlar üzerinde yerleşim göstermiştir. 21 nt uzunluğundaki bir minisatellit bölge ile üç nt uzunluğundaki 17 mikrosatellite bölge ise hipotetik protein kodlayan gen bölgeleri üzerinde yer aldığı belirlenmiştir. Bunun yanında üç nt uzunluğundaki sekiz tekrarlı bölge ise membran, integral membran, serinden zengin, prolinden zengin, DNA'ya bağlanan Tash-1 benzeri protein, glutenin, protein kinaz, protein fosfataz kodlayan genler üzerinde yer aldığı tespit edilmiştir. Altı nt uzunluğundaki bir mikrosatellit bölge ise Sfi subtelomerik protein ailesine ait proteinleri kodlayan gen bölgelerinde yerleşmiştir.

Bu çalışmada belirlenen 117 adet (27 mini ve 90 mikrostellit) tekrarlı bölgeden sadece 64'ü (16 mini ve 48 mikrosatellit) çoğaltmada kullanılacak primerlerin sıralı tekrarlı dizilimleri içine alacak şekilde korunmuş bölgelerden tasarlanabilmiştir. Protein dizilimlerinde yer alan ve amino asit içeriklerinde çok az ya da hiçbir farklılık göstermeyen düşük karmaşıklığa sahip bölgeler (low-complexity regions (LCR)) ökaryot genomlarında oldukça yaygındır (38, 39). LCR'lerde yer alan farklılıklar sadece tek bir amino asit ya da birkaç amino asit düzeyinde olabilmektedir (40). *T. annulata* genomunda da LCR'ler oldukça yaygın olarak görülmektedir. Bu çalışmada da, primer tasarlanamayan toplam 37 adet mikrosatellit bölgenin LCR'lerden yoğun tekrarlı bölgelerde olduğu saptanmıştır. Bunun yanında sekiz adet minisatellit bölge, kromozomların başında veya sonunda yerleşim gösterdiği için bölgeleri çoğaltmada kullanılacak uygun primerlerin tasarlanmasına imkan vermemiştir.

Genotiplendirmede kullanılacak markerlerin belirlenmesinde bir diğer önemli nokta ise parazitin farklı izolatlarına ait DNA örneklerinin çoğaltılarak, bunlar arasındaki polimorfizmin belirlenebilmesi ve aynı zamanda belirlenen markerleri çoğaltacak primerlerin tasarlanmasına olanak veren bölgelerin bulunmasıdır (1). Ayrıca multilokus genotiplendirmede popülasyon içerisinde yer alan sekonder ve tersiyer allellerin PZR ile çoğaltılabilir olması da markerlerin belirlenmesinde önemli olmuştur. Yapılan analizler sonucunda, bu çalışmada belirlenen markerlerin özellikle birinci ve ikinci kromozomlar üzerinde daha fazla kapsama alanına sahip olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, üçüncü ve özellikle dör-

düncü kromozomlar üzerinde belirlenen polimorfik bölgeler için tasarlanan primerler ile yapılan analizler sonucunda bunların bir kısmının *T. annulata*'ya özgün olmadığı, bir kısmının sadece belli *T. annulata* izolatlarını çoğaltabildiği gözlenirken, bazı polimorfik bölgeler ise uygun bir primer çifti tasarlanmasına olanak vermemiştir.

SONUÇ

Sonuç olarak, bu çalışmada belirlenen ilave 13 yeni polimorfik mini ve mikrosatellite markerler ile birlikte kromozomlar üzerinde daha fazla kapsama alanına sahip toplam 23 polimorfik marker (Şekil 2), hem *T. annulata* popülasyonlarında genetik çeşitliliğin oluşmasında önemli yer tutan seksüel rekombinasyon hakkında bilgi edinilebilmesine hem de gelecekte parazitin rekombinant popülasyonlarından kaynaklanabilecek ilaç direnci, aşılama koruyucu etkinliğinin azalması, yüksek patojeniteye sahip yeni suşların oluşması gibi muhtemel yeni risklerin ortaya çıkmadan öngörülebilmesinde kullanılacak modellerin oluşturulabilmesine olanak sağlayacaktır.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Karar Tarihi: 26.08.2011, Karar No: B.30.2.ADÜ.0.00.00/050.4/2011/058).

Hasta Onamı: Çalışmada, belirli bir hasta grubu kullanılmadığından dolayı, hasta onam formu doldurulmamış ve hasta onamı alınmasına gerek duyulmamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - H.B.B., T.K.; Tasarım - H.B.B., A.H.Ü., W.W.; Denetleme - H.B.B., T.K., W.W., H.E.; Kaynaklar - H.B.B., A.H.Ü., T.K.; Malzemeler - H.B.B., T.K., A.A., S.H.; Veri Toplanması ve/veya işleme - H.B.B., S.B., A.H.Ü.; Analiz ve/veya Yorum - H.B.B., T.K., S.B., W.W.; Literatür taraması - H.B.B., T.K., A.H.Ü.; Yazıyı Yazan - H.B.B.; Eleştirel İnceleme - T.K., S.B.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma TÜBİTAK-111O718 numaralı projesi kapsamında desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for his study from Adnan Menderes University Animal Experiment Ethics Committee (Decision Date: 28/08/2012, Decision No: B.30.2.A-DÜ.0.00.00/050.04/2012/047).

Informed Consent: Informed consent was not obtained due to not having a specific group of patients for this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author contributions: Concept - H.B.B., T.K.; Design - H.B.B., A.H.Ü., W.W.; Supervision - H.B.B., T.K., W.W., H.E.; Resource - H.B.B., A.H.Ü., T.K.; Materials - H.B.B., T.K., S.B., A.A., S.H.; Data Collection and/or Processing - H.B.B., S.B., A.H.Ü.; Analysis and/or Interpretation - H.B.B., T.K., S.B., W.W.; Literature Search - H.B.B., T.K., A.H.Ü.; Writing - H.B.B.; Critical Reviews - T.K., S.B., A.H.Ü.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: Financial support for this study was provided by a Grant from TÜBİTAK (TÜBİTAK-111O718).

KAYNAKLAR

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

2. Gharbi M, Sassi L, Dorchies P, Darghouth MA. Infection of calves with *Theileria annulata* in Tunisia: Economic analysis and evaluation of the potential benefit of vaccination. *Vet Parasitol* 2006; 137: 231-41. [\[CrossRef\]](#)
3. Inci A, Ica A, Yildirim A, Vatanserver Z, Cakmak A, Albasan H, et al. Economical impact of tropical theileriosis in the Cappadocia region of Turkey. *Parasitol Res* 2007; 101 Suppl 2: S171-74. [\[CrossRef\]](#)
4. Pumpaibool T, Arnathau C, Durand P, Kanchanakhan N, Siripoon N, Suegorn A, et al. Genetic diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* in Thailand, a low transmission country. *Malar J* 2009; 8: 155. [\[CrossRef\]](#)
5. Katzer F, Ngugi D, Oura C, Bishop RP, Taracha ELN, Walker AR, et al. Extensive genotypic diversity in a recombining population of the apicomplexan parasite *Theileria parva*. *Infect Immun* 2006; 74: 5456-64. [\[CrossRef\]](#)
6. Razakandrainibe FG, Durand P, Koella JC, De Meeüs T, Rousset F, Ayala FJ, et al. "Clonal" population structure of the malaria agent *Plasmodium falciparum* in high-infection regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 17388-93. [\[CrossRef\]](#)
7. Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, et al. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol* 2000; 17: 1467-82. [\[CrossRef\]](#)
8. Paul RE, Packer MJ, Walmsley M, Lagog M, Ranford-Cartwright LC, Paru R, et al. Mating patterns in malaria parasite populations of Papua New Guinea. *Science* 1995; 269: 1709-11. [\[CrossRef\]](#)
9. Schein E, Friedhoff KT. Light microscopic studies on the development of *Theileria annulata* (Dschunkowsky and Luhs, 1904) in *Hyalomma anatolicum excavatum* (Koch, 1844). II. The development in haemolymph and salivary glands. *Z Parasitenkd* 1978; 56: 287-303. [\[CrossRef\]](#)
10. Pipano E, Samish M, Krieger Y, Yeruham I. Immunization of friesian cattle against *Theileria annulata* by the infection-treatment method. *Br Vet J* 1981; 137: 416-20.
11. Estrada-Peña A. Climate change decreases habitat suitability for some tick species (Acari: Ixodidae) in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 2003; 70: 79-93.
12. Mhadhbi M, Naouach A, Boumiza A, Chaabani MF, BenAbderazzak S, Darghouth MA. In vivo evidence for the resistance of *Theileria annulata* to buparvaquone. *Vet Parasitol* 2010; 169: 241-7. [\[CrossRef\]](#)
13. Weir W, Karagenc T, Gharbi M, Simuunza M, Aypak S, Aysul N, et al. Population diversity and multiplicity of infection in *Theileria annulata*. *Int J Parasitol* 2011; 41: 193-203. [\[CrossRef\]](#)
14. Gemayel R, Vences MD, Legendre M, Verstrepen KJ. Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. *Annu Rev Genet* 2010; 44: 445-77. [\[CrossRef\]](#)
15. 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*. *Int J Parasitol* 2003; 33: 1641-53. [\[CrossRef\]](#)
16. Odongo DO, Oura CA, Spooner PR, Kiara H, Mburu D, Hanotte OH, et al. Linkage disequilibrium between alleles at highly polymorphic mini- and micro-satellite loci of *Theileria parva* isolated from cattle in three regions of Kenya. *Int J Parasitol* 2006; 36: 937-46. [\[CrossRef\]](#)
17. Muleya W, Namangala B, Simuunza M, Nakao R, Inoue N, Kimura T, et al. Population genetic analysis and sub-structuring of *Theileria parva* in the northern and eastern parts of Zambia. *Parasit Vectors* 2012; 5: 255. [\[CrossRef\]](#)
18. Weir W, Ben-Miled L, Karagenc T, Katzer F, Darghouth M, Shiels B, et al. Genetic exchange and sub-structuring in *Theileria annulata* populations. *Mol Biochem Parasitol* 2007; 154: 170-80. [\[CrossRef\]](#)
19. Gubbels MJ, d'Oliveira C, Jongejan F. Development of an indirect Tams1 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Theileria annulata* infection in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7: 404-11. [\[CrossRef\]](#)
20. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 2012; 28: 1166-67. [\[CrossRef\]](#)
21. Ben Miled L. Phenotypic and molecular analysis of isolates of *Theileria annulata*. *Arch Inst Pasteur Tunis* 1994; 71: 463-4.
22. Altay K, Aktaş M, Dumanli N. PCR-RFLP analysis of the Tams1 gene of *Theileria annulata*. *Türkiye Parazit Derg* 2007; 31: 173-5.
23. Shiels B, McDougall C, Tait A, Brown CG. Antigenic diversity of *Theileria annulata* macro-schizonts. *Vet Parasitol* 1986; 21: 1-10. [\[CrossRef\]](#)
24. Katzer F, Carrington M, Knight P, Williamson S, Tait A, Morrison IW, et al. Polymorphism of Spag-1, a candidate antigen for inclusion in a subunit vaccine against *Theileria annulata*. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 67: 1-10. [\[CrossRef\]](#)
25. Schnittger L, Katzer F, Biermann R, Shayan P, Boguslawski K, McKellar S, et al. Characterization of a polymorphic *Theileria annulata* surface protein (TaSP) closely related to PIM of *Theileria parva*: implications for use in diagnostic tests and subunit vaccines. *Mol Biochem Parasitol* 2002; 120: 247-56. [\[CrossRef\]](#)
26. 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. [\[CrossRef\]](#)
27. 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: 278-81. [\[CrossRef\]](#)
28. Blouin MS, Parsons M, Lacaille V, Lotz S. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Mol Ecol* 1996; 5: 393-401. [\[CrossRef\]](#)
29. Schlötterer C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 2000; 109: 365-71. [\[CrossRef\]](#)
30. Oyebola MK, Idowu ET, Nyang H, Olukosi YA, Otubanjo OA, Nwakanma DC, et al. Microsatellite markers reveal low levels of population sub-structuring of *Plasmodium falciparum* in southwestern Nigeria. *Malar J* 2014; 13: 493. [\[CrossRef\]](#)
31. Katzer F, Lizundia R, Ngugi D, Blake D, McKeever D. Construction of a genetic map for *Theileria parva*: Identification of hotspots of recombination. *Int J Parasitol* 2011; 41: 669-75. [\[CrossRef\]](#)
32. Pain A, Renaud H, Berriman M, Murphy L, Yeats CA, Weir W, et al. Genome of the host-cell transforming parasite *Theileria annulata* compared with *T. parva*. *Science* 2005; 309: 131-3. [\[CrossRef\]](#)
33. 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*. *J Mol Evol* 2003; 56: 407-17. [\[CrossRef\]](#)
34. Shirley MW. The genome of *Eimeria* spp., with special reference to *Eimeria tenella*-a coccidium from the chicken. *Int J Parasitol* 2000; 30: 485-93. [\[CrossRef\]](#)
35. Merkel A, Gemmell N. Detecting short tandem repeats from genome data: opening the software black box. *Brief Bioinform* 2008; 9: 355-66. [\[CrossRef\]](#)
36. Legendre M, Pochet N, Pak T, Verstrepen KJ. Sequence-based estimation of minisatellite and microsatellite repeat variability. *Genome Res* 2007; 17: 1787-96. [\[CrossRef\]](#)
37. Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol* 2002; 11: 2453-65. [\[CrossRef\]](#)
38. Toll-Riera M, Radó-Trilla N, Martys F, Albà MM. Role of low-complexity sequences in the formation of novel protein coding sequences. *Mol Biol Evol* 2012; 29: 883-6. [\[CrossRef\]](#)
39. Coletta A, Pinney JW, Solis DY, Marsh J, Pettifer SR, Attwood TK. Low-complexity regions within protein sequences have position-dependent roles. *BMC Syst Biol* 2010; 4: 43. [\[CrossRef\]](#)
40. DePristo MA, Zilvermit MM, Hartl DL. On the abundance, amino acid composition, and evolutionary dynamics of low-complexity regions in proteins. *Gene* 2006; 378: 19-30. [\[CrossRef\]](#)