

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI**

**KOYUNLARDA BAĞIŞIKLIK MEKANİZMASI İLE İLİŞKİLİ
BAZI GENLERİN PERİFERAL TEK ÇEKİRDEKLİ KAN
HÜCRELERİNDE (PBMC) REAL-TİME EKSPRESYON ANALİZİ
YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ**

**Hazırlayan
Esmâ Gamze AKSEL**

**Danışman
Prof. Dr. Bilal AKYÜZ**

Doktora Tezi

**Temmuz 2019
KAYSERİ**

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

**KOYUNLARDA BAĞIŞIKLIK MEKANİZMASI İLE
İLİŞKİLİ BAZI GENLERİN PERİFERAL TEK
ÇEKİRDEKLİ KAN HÜCRELERİNDE (PBMC) REAL-
TIME EKSPRESYON ANALİZİ YÖNTEMİ İLE
İNCELENMESİ**

Hazırlayan
Esmâ Gamze AKSEL

Danışman
Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Doktora Tezi

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Birimi tarafından TDK-2017-7343kodlu proje ile
desteklenmiştir.**

Temmuz 2019
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Esmâ Gamze AKSEL

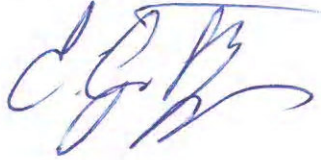
İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

“Koyunlarda Bağışıklık Mekanizması ile İlişkili Bazı Genlerin Periferal Tek Çekirdekli Kan Hücrelerinde (PBMC) Real-Time Ekspresyon Analizi Yöntemi ile İncelenmesi” adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

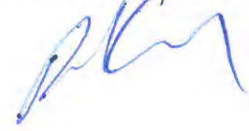
Tezi Hazırlayan

Esma Gamze AKSEL



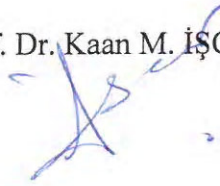
Danışman

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ



Veteriner Zootekni ABD Başkanı

Prof. Dr. Kaan M. İŞCAN



Prof. Dr. Bilal AKYÜZ'ün danışmanlığında **Esmâ Gamze AKSEL** tarafından hazırlanan “**Koyunlarda Bağışıklık Mekanizması ile İlişkili Bazı Genlerin Periferik Tek Çekirdekli Kan Hücrelerinde (PBMC) Real-Time Ekspresyon Analizi Yöntemi ile İncelenmesi** ” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü **Veteriner Zootekni** Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

09/07/2019

JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. Bilal AKYÜZ
(ERÜ Vet. Fak. Genetik ABD)

Üye : Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM
(ERÜ Vet. Fak. Parazitoloji ABD)

Üye : Doç. Dr. Korhan ARSLAN
(ERÜ Vet. Fak. Genetik ABD)

Üye : Doç. Dr. Bengi ÇINAR KUL
(ANK Üniv. Vet. Fak. Genetik ABD)

Üye : Doç. Dr. Hamit Kaan MÜŞTAK
(ANK Üniv. Vet. Fak. Mikrobiyoloji ABD)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve
..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... / /

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Hayatım boyunca maddi manevi her türlü desteğini esirgemeyen sevgili babam Yücel İLGAR'a ve annem AYSEL İLGAR ile kardeşlerim Esra, Töre ve ailelerine varlıklarından ötürü teşekkür ederim. İlkokul öğretmenim Ertuğrul GELEN'e, ortaokul ve lise eğitimim boyunca üzerimde emeği olan tüm öğretmenlerime, lisans eğitimimi tamamladığım Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim Üyelerine teşekkürü borç bilirim. Moleküler Genetik alanında alt yapımı sağlayan Prof. Dr. Mehmet NİZAMLIOĞLU'na, Prof. Dr. Ercan KURAR'a, Prof. Dr. Zafer BULUT'a ve Dr. Müge DOĞAN BÜLBÜL'e teşekkürlerimi sunarım.

Göreve atandığım ilk günden bugüne yaşadığım her türlü mutluluk ve acılarıma ortak olan Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim Üyeleri ve mesai arkadaşlarımdan Zootečni Anabilim Dalı Başkanı Prof Dr. Kaan M. İŞCAN'a, Doç. Dr. Davut BAYRAM'a Doç. Dr. Aytaç AKÇAY'a, Doç. Dr. Akın YAKAN'a, tez çalışmamda desteklerinden dolayı Doç. Dr. Mehmet Ulaş ÇINAR'a, Dr. Mahmodul Hasan SOHEL'e ve Ahmet NACI'ye teşekkürlerimi sunarım. Saha ve laboratuvar çalışmalarında her zaman yardımcı olduğu için Araş. Gör. Fadime ÖZDEMİR'e, saha çalışmalarında yardımcı olan Burak Rahmi YALÇIN'a, Betül AKPUNAR'a ve istatistiki analizlerimde yardımcı olan Elif ÇELİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca acı, tatlı, her anımda desteklerini esirgemeyen Danışmanım Prof. Dr. Bilal AKYÜZ'e ve Anabilim Dalımız Öğretim Üyesi Doç. Dr. Korhan ARSLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayat arkadaşım Okan Umut AKSEL ve ailesine varlığından, her türlü desteğinden ötürü teşekkürlerimi sunarım. Yavrularımız Umut Doğan AKSEL ve Elâ Doğa AKSEL'e...

Esma Gamze AKSEL

Kayseri, Temmuz 2019

KOYUNLARDA BAĞIŞIKLIK MEKANİZMASI İLE İLİŞKİLİ BAZI GENLERİN PERİFERAL TEK ÇEKİRDEKLİ KAN HÜCRELERİNDE (PBMC) REAL-TİME EKSPRESYON ANALİZİ YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

Esmâ Gamze AKSEL

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Zootekni Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Temmuz 2019

Danışman: Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

ÖZET

Gelecekte doğal kaynaklarda azalma ve küresel ısınma sebebiyle entansif hayvan yetiştiriciliğinden ekstansif hayvan yetiştiriciliğine doğru yönelim olacağı düşünülmektedir. Dolayısıyla ekstansif hayvancılığın sürdürülmesi için yaşadığı bölgelere adapte, olumsuz çevre koşullarına dayanıklı ve hastalıklara dirençli yerli hayvan ırklarının önemi giderek artacaktır. Bu çalışmada Akkaraman ırkı kuzulara bağışıklık sistemini uyaran Lipoteikoik asit (LTA, 50 µg/kg), Lipopolisakkarit (LPS, 20 µg/kg) ile LTA-LPS karışımı (50 µg/kg + 20 µg/kg) ve PBS (kontrol, 250 µl) intranazal yolla uygulanmıştır. Aynı bakım ve besleme şartlarında bulunan toplam 28 baş Akkaraman ırkı (üç aylık) kuzu LTA (n=7), LPS (n=7), LTA+LPS (n=7) ve kontrol grubu (n=7) olacak şekilde dört gruba ayrılmıştır. Uygulama sonrası 24. saat ve 7. günde izole edilen periferik tek çekirdekli kan hücrelerinde (Peripheral blood mononuclear cells, PBMC) immün yanıtın oluşumunda görev alan *TLR2*, *TLR4*, *MyD88*, *TRAF6*, *TNF-α*, *IL-1β*, *IL-6*, *IL-10*, *NF-κβ*, *IFNγ* genlerinin ve house-keeping genlerden *GAPDH* ve *β-actin*'e göre ekspresyon farklılıklarının incelenmesi hedeflenmiştir. Yapılan qRT-PCR analizi sonucunda; 24. saatte izole edilen PBMC hücrelerine ait mRNA ekspresyon analizinde tüm gruplarda *TLR2* [LPS (P<0.05) ve LTA+LPS (P<0.01)] *TLR4* [LTA+LPS (P<0.05)], *TNF-α*, *IL-10* [LTA+LPS (P<0.05)] ve *IFNγ* genlerine ait ekspresyon verilerinde artış belirlenirken bu genlerin 7. gün ekspresyon seviyelerinde azalış gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Akkaraman ırkı kuzularda intranazal yolla uygulanan LTA ve LPS dozlarının ayrı ayrı ve bir arada uygulanmasının özellikle *TLR2* ve *TLR4* gen ekspresyonunda 24. saatte artış sağladığı dolayısıyla planlanan *in vivo* deneysel uygulamanın koyun PBMC'lerini başarılı bir şekilde etkinleştirdiği belirlenmiştir. Koyun ırkları arasında hastalıklara dirençliliğin belirlenmesi için farklı ırkların çalışıldığı daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan deneysel uygulama dozları farmakoloji ve mikrobiyoloji alanlarında planlanacak *in vivo* ve *in vitro* ilaç ve aşı geliştirilmesi çalışmalarına yardımcı olabilecektir. Ayrıca elde edilen sonuçlara göre hem çiftlik hayvanlarında görülen solunum sistemi enfeksiyöz hastalıkları yönünden hem de koyunun biyomodel hayvan olması bakımından insan ile ilgili planlanacak çalışmalara da katkı sağlayabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Akkaraman kuzu; lipopolisakkarit; lipoteikoik asit; bağışıklık, periferik tek çekirdekli kan hücresi.

INVESTIGATION OF SOME GENES RELATED WITH IMMUNE MECHANISM BY REAL-TIME EXPRESSION ANALYSIS METHOD IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS (PBMC)

Esma Gamze AKSEL

Erciyes University, Faculty of Veterinary

Department of Animal Breeding and Husbandary

PhD Thesis, July, 2019

Supervisor: Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

ABSTRACT

It is expected that there will be a shift from intensive animal husbandry to extensive animal husbandry due to the decrease in natural resources and global warming in the future. Therefore, in order to maintenance of extensive animal husbandry will be achieved with indigenous breeds that are resistant to disease, adapted to their region and adapted adverse conditions. In this study, a mixture of Lipoteichoic acid (LTA, 50 µg/kg), Lipopolysaccharide (LPS, 20 µg/kg), LTA+LPS mix (50 µg/kg 20 µg/kg) and PBS (control, 250 µl) was intranasally administered to Akkaraman breed lambs. A total of 28 domestic Akkaraman breed lambs (three month years) with the same feeding and raising conditions were divided into four groups as LTA (n=7), LPS (n=7), LTA+LPS (n=7) and control group (n=7). The aim of this study was to investigate the expression levels of *TLR2*, *TLR4*, *MyD88*, *TRAF6*, *TNF-α*, *IL-1β*, *IL-6*, *IL-10*, *NF-κβ*, *IFNγ* genes, which were detected on the immune mechanism pathway in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolated at 24th hour and 7th day after the administration of the mixture, compared to *GAPDH* and *β-Actin* house-keeping genes. As a result of qRT-PCR analysis, in mRNA expression analysis of PBMC cells isolated at 24th hour, there was an increase in *TLR2* (LPS (p<0.05) ve LTA+LPS (p<0.01), *TLR4* (LTA+LPS (p<0.05), *TNF-α*, *IL-10* (LTA+LPS (p<0.05) and *IFNγ* genes in all groups. Also expression values decreased 7th day in this genes. According to the results, intranasal administration of LTA and LPS in Akkaraman lambs were effective especially in *TLR2* and *TLR4* genes and therefore it was determined that *in vivo* experimental study activated sheep immune system. More studies with different breeds are needed to determine disease resistance among sheep breeds. Experimental application doses may help in the development of *in vivo* and *in vitro* drug and vaccine studies in the fields of pharmacology and microbiology. In addition, according to the results obtained, it was concluded that both the respiratory system diseases seen in farm animals and the sheep being a biomodel animal could contribute to planned human studies.

Keywords: Akkaraman lambs; lipopolysaccaride; lipoteichoic acid; immunity; peripheral mononuclear blood cells.

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	ii
ONAY :.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	x
TABLolar LİSTESİ.....	xvi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Koyuncululuğun Önemi.....	4
2.2. Bağışıklık Sistemi.....	8
2.2.1.Doğal ve Kazanılmış Bağışıklık Sistemi Savunma Mekanizmaları	12
2.2.1.1. Toll-Like Reseptörler	17
2.3. mRNA Ekspresyon Çalışmasında Araştırılacak Genler	22
2.3.1. Toll Benzeri Reseptör 2 (Toll-like receptor 2, <i>TLR2</i>)	22
2.3.2. Toll Benzeri Reseptör 4 (Toll-like receptor 4, <i>TLR4</i>)	22
2.3.3. Myeloid Farklılaşma Faktörü 88 (Myeloid differentiation primary response 88, <i>MyD88</i>).....	23
2.3.4. Tümör Nekroz Faktörü (TNF) Reseptör İlişkili Faktör-6 (TNF receptor associated factor 6, <i>TRAF6</i>)	23
2.3.5. Nükleer Faktör Kappa ve Beta (Nuclear Factor-(κ) β , <i>NF-$\kappa$$\beta$</i>).....	24
2.3.6. Tümör Nekrozis Faktör- α (Tumor necrosis factor- α , <i>TNFα</i>).....	24

2.3.7. Interleukin 1- β (<i>IL-1β</i>).....	25
2.3.8. Interleukin 6 (<i>IL-6</i>).....	25
2.3.9. Interleukin 10 (<i>IL-10</i>)	26
2.3.10. İnterferon Gamma (Interferon Gamma, <i>IFN-γ</i>).....	26
2.4. LPS ve LTA ile yapılan <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> çalışmalar.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Hayvan Materyali	29
3.2. Çalışmada Kullanılan Cihaz Listesi.....	29
3.3. Hayvanlara Ait Verilerin Kaydı, Deneysel Uygulama ve Örneklerin Toplanması.....	30
3.3.1. Hayvanların gruplandırılması ve canlı ağırlık ölçümü	30
3.3.2. Deneysel uygulama	30
3.3.2.1. LTA ve LPS solüsyonlarının hazırlanması.....	30
3.3.3. Kan örneklerinin alınması.....	31
3.4. PBMC İzolasyonu.....	31
3.5. RNA İzolasyonu	32
3.6. DNase Uygulaması	33
3.7. cDNA Sentezi.....	33
3.8. Primer Dizaynı.....	33
3.9. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR)	35
3.10. Jel-Elektroforez İşlemi	36
3.11. İstatistiksel Analiz.....	36
4. BULGULAR	37
4.1. Hayvanların Canlı Ağırlık, 24. saat ve 7. gün Vücut Sıcaklığı ve Nabız Ölçümleri	37
4.2. İzole edilen RNA'lar ve DNase Uygulaması Sonrası Bulgular	37
4.3. qRT-PCR Sonrası mRNA Ekspresyon Verileri	39

4.4. mRNA Ekspresyon Verilerine Ait İstatistiksel Bulgular	44
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	54
KAYNAKLAR	65
EKLER	
ÖZ GEÇMİŞ	



KISALTMALAR ve SİMGELER

AKT3	: AKT serine/threonine kinase 3, AKT serin/treonin kinaz 3
Bç	: Baz çifti
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
BRD	: Bovine Respiratory Disease-Sığır Solunum Yolu Hastalığı
CASP8	: Caspase 8, kaspaz 8
cDNA	: complementary Deoksiribonükleic Acid, Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
CD4	: Cluster of Differentiation 4, Farklılaşma kümesi 4
CD8	: Cluster of Differentiation 8, Farklılaşma kümesi 8
CD14	: Cluster of Differentiation 14, Farklılaşma kümesi 14
Ct	: Threshold Cycle
dH ₂ O	: Distile su
ddH ₂ O	: Bidistile su
DNA	: Deoxyribonucleic Acid, Deoksiribonükleik asit
dsRNA	: Double-stranded RNA, çift zincir RNA
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Etilendiamidin Tetraasetik Asit
ERUTAM	: Erciyes Üniversitesi Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi
EÜHADYEK	: Erciyes Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
FAO	: Food and Agriculture Organization, Dünya Gıda ve Tarım Örgütü
FADD	: Fas-associated Protein with Death Domain, Fas ilişkili Protein ile Ölüm bölgesi alanı

FcRs	: Fragment Crystallizable Receptors, Kristalize fragman reseptörü
GAPDH	: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, Gliseraldehit-3 fosfat dehidrogenaz
HLA	: Human Leucocyte Associated antigens, insan lökositleriyle bağlantılı antijenler
IFN- α	: Interferon- α
IFN- β	: Interferon- β
IFN- γ	: İnterferon- γ
Ig	: İmmunglobulin
IgA	: İmmunglobulin A
IgD	: İmmunglobulin D
IgE	: İmmunglobulin E
IgG	: İmmunglobulin G
IgM	: İmmunglobulin M
I κ B	: I κ B kinase, I κ B kinaz
IKK	: The I kappa B kinase complex, I kappa B kinaz kompleksi
IL-1	: Interleukin-1, İnterlöykin-1
IL-1 α/β	: Interleukin-1 α/β , İnterlöykin-1 α/β
IL-1 β	: Interleukin-1 β , İnterlöykin-1 β
IL-2	: Interleukin-2, İnterlöykin-2
IL-3	: Interleukin-3, İnterlöykin-3
IL-4	: Interleukin-4, İnterlöykin-4

IL-5	: Interleukin-5, İnterlöykin-5
IL-6	: Interleukin-6, İnterlöykin-6
IL-7	: Interleukin-7, İnterlöykin-7
IL-8	: Interleukin-8, İnterlöykin-8
IL-9	: Interleukin-9, İnterlöykin-9
IL-10	: Interleukin-10, İnterlöykin- 10
IL-11	: Interleukin-11, İnterlöykin-11
IL-12	: Interleukin-12, İnterlöykin-12
IL-13	: Interleukin-13, İnterlöykin-13
IL-14	: Interleukin-14, İnterlöykin-14
IL-15	: Interleukin-15, İnterlöykin-15
IL-16	: Interleukin-16, İnterlöykin-16
IL-17	: Interleukin-17, İnterlöykin-17
IL-18	: Interleukin-18, İnterlöykin-18
IL-32	: Interleukin-32, İnterlöykin-32
IRAK	: Interleukin-1 Receptor-Associated Kinases, İnterlöykin-1 reseptör bağlantılı kinaz

IRAK1-IRAK4: Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 1-Interleukin 1 Receptor

Associated Kinase 4, interlöykin 1 reseptör bağlantılı kinaz 1- interlöykin
1 reseptör bağlantılı kinaz 4

KARs : Killer Activated Receptors, Öldürücü aktivasyon reseptör

KIRs : Killer Inhibitory Receptors, Öldürücü İnhibisyon reseptörü

KDO : Ketodeoksioktülonat

LAM	: Lipoarabnomannan
LD	: Linkage Disequilibrium, Bağlantı eşitsizliği
LRR	: Leucine-rich repeats, Löysinden zengin tekrarlar
LTA	: Lipoteicoic acid, Lipoteikoik asit
LPS	: Lipopolysaccharide, Lipopolisakkarit
MAPK	: Mitogen-activated protein kinases, Mitojen aktifleştirici protein kinazlar
MAP3K7	: TGF-Beta Activated Kinase 1, TAK1 bağlanma proteini 1
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MHC	: Major Histocompatibility Complex, Büyük doku uyuşum kompleksi
MiRNA	: Micro RNA, MikroRNA
MyD88	: Myeloid Differentiation primary response 88, Myeloid farklılaşma faktör 88
NF- κ B	: Nuclear Factor- κ B, Nükleer faktör- κ B
NK	: Natural Killer, Doğal katil hücresi
PAMP	: Pathogen Associated Molecular Patterns, Patojen ilişkili moleküler örgüler
PBMC	: Peripheral Blood Mononuclear Cells, Periferel kan tek çekirdekli hücresi
PBS	: Phosphate Buffered Saline, Fosfat tamponlu tuzlu su
PGN	: Peptidoglikan
PI3K	: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, Fosfotidilinozitol-4, 5-bifosfat 3- kinaz katalitik subunit alfa

PMN	: Polymorphonuclear Leukocyte, Polimorfonükleer lökosit
PRR	: Pathern Recognition Receptor, Örgü Tanıyıcı Reseptör
PPRS	: Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, Domuz Üreme ve Solunum Sendromu Virusu
RIP1	: Receptor-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase, Serin/treonin kinaz bağlantılı reseptör 1
RNA	: Ribonucleic Acid, Ribonükleik asit
SNP	: Single Nucleotid Polymorphism, Tek nükleotid polimorfizmi
TAB1	: TGF-Beta Activated Kinase 1 (MAP3K7) Binding Protein 1, TAK1 bağlanma proteini 1
TAB2	: TAK1-Binding Protein 2, TAK1 bağlanma proteini 2
TAK1	: Transforming growth factor beta-activated kinase 1, TGF beta aktive kinaz 1
TBE	: Tris Borik Asit-EDTA
TGF- β	: Transformign Growth Factor- β , Dönüştürücü büyüme faktörü- β
Th1	: T helper cell 1, Yardımcı T 1 hücresi
Th2	: T hepler cell 2, Yardımcı T 2 hücresi
TIRAM	: Toll like receptor adaptor molecule 2, Toll like reseptör adaptor molekülü 2
TIRAP	: Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein, Toll/interlöykin-1 reseptör bölgesi içeren adaptör protein
TLR	: Toll-like receptor, Toll benzeri reseptör

TLR1	: Toll-like Receptor 2, Toll benzeri reseptör 1
TLR2	: Toll-like Receptor 2, Toll benzeri reseptör 2
TLR3	: Toll-like Receptor 3, Toll benzeri reseptör 3
TLR4	: Toll-like Receptor 4, Toll benzeri reseptör 4
TLR5	: Toll-like Receptor 5, Toll benzeri reseptör 5
TLR6	: Toll-like Receptor 6, Toll benzeri reseptör 6
TLR7	: Toll-like Receptor 7, Toll benzeri reseptör 7
TLR8	: Toll-like Receptor 8, Toll benzeri reseptör 8
TLR9	: Toll-like Receptor 9, Toll benzeri reseptör 9
TLR10	: Toll-like Receptor 10, Toll benzeri reseptör 10
TLR11	: Toll-like Receptor 11, Toll benzeri reseptör 11
TLR12	: Toll-like Receptor 12, Toll benzeri reseptör 12
TLR13	: Toll-like Receptor 13, Toll benzeri reseptör 13
TM	: Melting Temperature, Erime sıcaklığı
TNF- α	: Tumor Necrosis Factor- α , Tumor nekroz faktörü- α
TNF- β	: Tumor Necrosis Factor- β , Tumor nekroz faktör- β
TRAF6	: TNF Receptor Associated Factor 6, TNF reseptör bağlantılı faktör 6
TRIF	: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β , TIR bölgesi içeren interferon β içerikli adaptör
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
qRT-PCR	: Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction, Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
QTL	: Quantitative Trait Locus, Kantitatif karakter lokusu

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1.	Dünya Gıda ve Tarım Örgütü'ne ait 2006-2016 yılları arası Türkiye'de canlı koyun varlığı ve koyundan elde edilen ürünlerin Dünya'daki üretim sıralaması	6
Tablo 2.2.	Vücutta inflamasyon oluşturan mikrobiyal bileşenler.....	10
Tablo 2.3.	Bağışıklık sistemi hücrelerinden salgılanan sitokinler, fonksiyonları ve bağlı bulundukları reseptörler	14
Tablo 2.4.	Memeli TLR reseptörleri tarafından tanınan doğal bağışıklık hücreleri ve ligandları.....	19
Tablo 3.1.	Kullanılan cihazlar ve markaları	29
Tablo 3.2.	Ekspresyon seviyesi belirlenmesi istenen genlere ait primerler, PCR uzunlukları, erime ısıları, Ensemble ID'leri	35
Tablo 4.1.	Canlı ağırlık, 24. saat ve 7. gün vücut sıcaklığı ve nabız ölçüm verileri.....	37
Tablo 4.2.	DNase uygulaması sonrası RNA konsantrasyonlarına ait ortalama ve standart sapma verileri.....	38

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	İlk evcilleştirmenin yapıldığı “Bereketli Hilal” (Fertile Crescent) haritası.....	4
Şekil 2.2.	Türkiye’de 1961-2016 yılları arasında yetiştirildiği bildirilen koyun varlığı.....	6
Şekil 2.3.	Akkaraman koyunu.....	7
Şekil 2.4.	<i>Escherichia coli</i> ’nin hücre duvarına ait iç ve dış membran görüntüsü. Dış membran üzerinde Lipopolisakkarit, ketodeoksioktülonat (KDO), Lipid A, O-Antigen ve Heptoz bulunmaktadır. Periplazma kısmında peptidoglikan tabaka ve membran kaynaklı oligosakkaritler (Membrane-derived oligosaccharides, MDO) bulunmaktadır. İç membran yapısında ise fosfolipidler, integral proteinler ve diğer proteinler yer alır. Toksik etkilerden sorumlu olan LPS ve lipid A adı verilen bir fosfolipid, lipid A’ya, KDO üzerinden bağlanan beş şekerli bir öz polisakkarid ve 3-5 şekerlik birimlerin 25 kez yinelenmesinden oluşan bir dış polisakkaridin bulunduğu üç ayrı birimden oluşur	11
Şekil 2.5.	Lipoteikoik asit Gram-pozitif bakterilerdeki sitoplazmik zarın dış yüzüne bağlanmış (suda çözünen (kutuplu) ve çözünmeyen (kutupsuz) fonksiyonel grupları birlikte içeren organik molekül) moleküllerin bir sınıfını temsil etmektedir	12
Şekil 2.6.	Bağışıklık sisteminde bulunan TLR yolağına ait KEGG (Kyoto Encyclopedia of genes and genomes) metabolik yolağı.	20
Şekil 4.1.	İzole edilen RNA’lara ait 18S ve 28S banlarının %1’lik jel elektroforez işlemi sonrası görüntüsü. M: 100 bç marker; 1-16: RNA örnekleri.	37
Şekil 4.2.	İzole edilen RNA’ların DNase uygulaması sonrası %1’lik jel elektroforez görüntüsü. : 100 bç marker; 1-16: Dnase uygulanmış RNA örnekleri.	38
Şekil 4.3.	<i>TLR2</i> genine ait erime sıcaklığının belirlendiği pik grafiği ve jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bç’lik marker. 1-7: 111 bç; N: Negatif kontrol).....	39
Şeki 4.4.	<i>TLR4</i> genine ait erime sıcaklığının belirlendiği pik grafiği ve jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bç’lik marker; 1-7: 123 bç; N: Negatif kontrol).....	39

Şekil 4.5.	<i>MyD88</i> genine ait erime sıcaklığının 83°C belirlendiği pik grafiği ve jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bç'lik marker; 1-7: 145 bç; N: Negatif kontrol).	40
Şekil 4.6.	<i>TRAF6</i> genine ait erime sıcaklığının 85,1°C belirlendiği pik grafiği ve jel elektroforez görüntüsü (M:100 bç'lik marker; 1-7: 127 bç; N: Negatif kontrol).	40
Şekil 4.7.	<i>NF-κB</i> genine ait erime sıcaklığının 84,2 °C belirlendiği pik grafiği ve jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bç'lik marker; 1-7: 159 bç; N: Negatif kontrol).	41
Şekil 4.8.	<i>TNFA</i> genine ait erime sıcaklığının 81°C belirlendiği pik grafiği ve jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bç'lik marker; 1-7: 77bç; N: Negatif kontrol).....	41
Şekil 4.9.	<i>IL-1β</i> genine ait erime sıcaklığının 82,9°C belirlendiği pik grafiği ve jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bç'lik marker; 1-7: 102 bç; N: Negatif kontrol).	42
Şekil 4.10.	<i>IL-10</i> genine ait erime sıcaklığının 82°C belirlendiği pik grafiği ve jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bç'lik marker; 1-7: 107 bç; N: Negatif kontrol).....	42
Şekil 4.11.	<i>IFN-γ</i> genine ait erime sıcaklığının 81°C belirlendiği pik grafiği ve jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bç'lik marker; 1-7: 110 bç; N: Negatif kontrol).....	43
Şekil 4.12.	<i>GAPDH</i> genine ait erime sıcaklığının belirlendiği pik grafiği ve jel elektroforez görüntüsü (M:100 bç; 1-7: 114 bç; N: Negatif kontrol).....	43
Şekil 4.13.	β - <i>actin</i> genine ait erime sıcaklığının belirlendiği pik grafiği ve jel elektroforez görüntüsü (M:100 bç marker; 1-7: 179 bç; N: Negatif kontrol).....	44
Şekil 4.14.	<i>TLR2</i> genine ait 24. saat ve 7. gün ekspresyon seviyesi (mRNA ekspresyon seviyesi) *: P<0.05; **: P<0.01.	44
Şekil 4.15.	Tüm gruplarda <i>TLR2</i> genine ait 24. saat ve 7. gün Δ Ct Ort $\pm$ S.Hata kutu grafikleri.	45
Şekil 4.16.	<i>TLR4</i> genine ait 24. saat ve 7. gün ekspresyon seviyesi (mRNA ekspresyon seviyesi) *: P<0.05.	45
Şekil 4.17.	Tüm gruplarda <i>TLR4</i> genine ait 24. saat ve 7. gün Δ Ct Ort $\pm$ S.Hata kutu grafikleri.	46

Şekil 4.18.	<i>MyD88</i> genine ait 24. saat ve 7. gün ekspresyon seviyesi (mRNA ekspresyon seviyesi) *: $P < 0.05$	46
Şekil 4.19.	Tüm gruplarda <i>MyD88</i> genine ait 24. saat ve 7. gün ΔCt Ort $\pm$ S.Hata kutu grafikleri.	47
Şekil 4.20.	<i>TRAF6</i> genine ait 24. saat ve 7. gün ekspresyon seviyesi (mRNA ekspresyon seviyesi)	47
Şekil 4.21.	Tüm gruplarda <i>TRAF6</i> genine ait 24. saat ve 7. gün ΔCt Ort $\pm$ S.Hata kutu grafikleri.	48
Şekil 4.22.	<i>NF-κB</i> genine ait 24. saat ve 7. gün ekspresyon seviyesi (mRNA ekspresyon seviyesi)	48
Şekil 4.23.	Tüm gruplarda <i>NF-κB</i> genine ait 24. saat ve 7. gün ΔCt Ort $\pm$ S.Hata kutu grafikleri.	49
Şekil 4.24.	<i>TNFα</i> genine ait 24. saat ve 7. gün ekspresyon seviyesi (mRNA ekspresyon seviyesi)	49
Şekil 4.25.	Tüm gruplarda <i>TNFα</i> genine ait 24. saat ve 7. gün ΔCt Ort $\pm$ S.Hata kutu grafikleri.	50
Şekil 4.26.	<i>IL-1β</i> genine ait 24. saat ve 7. gün ekspresyon seviyesi (mRNA ekspresyon seviyesi) *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$	50
Şekil.4.27.	Tüm gruplarda <i>IL-1β</i> genine ait 24. saat ve 7. gün ΔCt Ort $\pm$ S.Hata kutu grafikleri.	51
Şekil 4.28.	<i>IL-10</i> genine ait 24. saat ve 7. gün ekspresyon seviyesi (mRNA ekspresyon seviyesi) *: $P < 0.05$	51
Şekil 4.29.	Tüm gruplarda <i>IL-10</i> genine ait 24. saat ve 7. gün ΔCt Ort $\pm$ S.Hata kutu grafikleri.	52
Şekil 4.30.	<i>IFN-γ</i> genine ait 24. saat ve 7. gün ekspresyon seviyesi (mRNA ekspresyon seviyesi)	52
Şekil 4.31.	Tüm gruplarda <i>IFN-γ</i> genine ait 24. saat ve 7. gün ΔCt Ort $\pm$ S.Hata kutu grafikleri.	53
Şekil 4.32.	Tüm gruplarda incelenen tüm genlere ait 24. saat ekspresyon seviyeleri (mRNA ekspresyon seviyesi).	53
Şekil 4.33.	Tüm gruplarda incelenen tüm genlere ait 7. gün ekspresyon seviyeleri (mRNA ekspresyon seviyesi).	53

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Küreselleşme ve iklim değışiklikleri, insan, hayvan ve hayvansal ürünlerin yer değıştirmesine, yeni hastalık tehditlerinin ortaya çıkmasına dolayısıyla gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde yetiştiricilerin ciddi ekonomik kayıplarla karşı karşıya kalmalarına yol açmaktadır. Özellikle enfeksiyöz ve zoonotik hastalıklar yönünden hayvan refahının sağlanması ve hayvansal ürünler için güvenlik (özellikle gıda güvenliği) tedbirlerinin etkili bir şekilde uygulanması gerekmektedir (Davies ve ark., 2009).

Enfeksiyon, konağın farklı enfeksiyöz etkenleri (virüs, bakteri, parazit, mantar vs.) tarafından istila edilmesi ve bu etkenlere karşı konak bağışıklık sisteminin yanıt vermesidir (Signore ve ark., 2013). Enfeksiyöz hastalıkların kontrol stratejilerinin başında korunma ve tedavi gelir. Tedavi, hasta hayvanların ilaçla tedavisi ve karantina tedbirlerinin alınmasını kapsarken korunma, biyogüvenlik ve sanitasyon kurallarının uygulanması, aşılama ve son yıllarda yetiştiricilikte önemi giderek artmakta olan genetik olarak dirençli hayvanların seçimini içermektedir (Erganiş, 2001). Belirli bulaşıcı hastalıklara karşı dirençli hayvanların yetiştiricilikte kullanılmasının hayvan refahı ve hayvan başına elde edilecek verimin artırılmasına katkı sağlayacağı belirtilmektedir (Bishop ve ark., 2007).

Çiftlik hayvanlarında hastalıklara karşı bağışıklık sistemi mekanizmasının aydınlatılması ve hastalıkların erken safhada teşhisi, hayvan refahı ve ekonomik kayıpların azaltılmasında önem arz etmektedir (Bishop ve ark., 2007). Ancak bağışıklık sisteminde rol oynayan genler yönünden konağın genetik yapısının bilinmemesi, genetik olarak hastalıklara direncin artırılması çalışmalarının başarısını negatif yönde etkileyebilmektedir (Davies ve ark., 2009). Geliştirilen yüksek-çıkıtlı genomik araçlar ile tek nokta polimorfizmlerinin (Single Nucleotid Polymorphism, SNP) konakta

bulunan genetik varyasyonu belirlediği, dolayısıyla konak-patojen etkileşiminin genetik mekanizmalarının açıklanmasına fayda sağladığı bildirilmiştir (Bishop ve ark., 2010). Bağışıklık sistemi mekanizmasında görevli genlerin çalışma mekanizmalarının aydınlatılmasında, bağlantı dengesizliği harita analizinden (Linkage Disequilibrium, LD), haplotip tayini için SNP tabanlı tüm genom taramaları ve hastalık direnciyle ilişkili nicel özellik lokuslarının (Quantitative trait locus, QTL) tanımlanmasından, enfeksiyon öncesi ve sonrası farklı doku ve hücrelerine ait gen ekspresyon profillerinin qRT-PCR, mikroyarray, RNA-seq ve transkriptom analizlerinden faydalanılmaktadır. (Diez-Tascon ve ark., 2005; Roitt ve ark., 2008; Davies ve ark., 2009; Gao ve ark., 2010; Singh ve ark., 2017). Bu teknolojiler, uygulanan tedavi protokollerine verilen bireysel tepkilerin genetik mekanizmasının açıklanmasında ve ilerleyen süreçte hastalığın kontrolü ve tedavisinde gereken önlemlerin erken safhada alınmasında araştırmacılara katkı sağlayabilmektedir (Davies ve ark., 2009).

Türkiye iklim şartları ve konumu itibarıyla dünyada biyoçeşitlilik ve gen kaynakları bakımından oldukça zengindir. Ancak nüfusun hızla artışı, ekonomik kısıtlamalar ile uygulanan tarımsal politikalarının sürekli değişimi yerli ırkların tür içi biyoçeşitliliğinin azalmasına zemin hazırlamaktadır (Arat ve ark., 2004). Günümüzde çiftlik hayvanları istenilen verim özelliği bakımından seleksiyon tabanlı birörnek üretime yönlendirilmekte böylece varolan genetik varyasyon zamanla önemli ölçüde azalmaktadır. Kültür ırkları olarak nitelendirilen bu hayvanlar istenilen verim özelliği geliştirilmiş hayvanlardır ancak bu ırkların çevre şartlarına dayanıklılık ve hastalıklara dirençliliği gözardı edilmiştir (Ertuğrul ve ark., 2015). Gelecekte doğal kaynaklarımızda oluşabilecek azalmalar ve küresel ısınmanın olumsuz etkilerine bağlı olarak yem ve gıda amaçlı üretilen bitkisel ürünlerde düşüşlerin beklendiği, dolayısıyla entansif hayvan yetiştiriciliğinin kısıtlanarak ekstansif hayvan yetiştiriciliğine doğru bir yönelim olabileceği, bu sebeple hayvancılığın sürdürülebilirliğinin ancak ya da büyük ölçüde yerli hayvan gen kaynaklarıyla mümkün olabileceği bildirilmiştir (Leng, 2008).

Yerli hayvan ırklarımızın evcilleşme merkezlerine yakın olmasından dolayı genetik potansiyellerinin yüksek olduğu ve dünyada birçok ırkın atası olabileceği belirtilmektedir (Togan ve ark., 2005). Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar yerli ırklarımızın genetik açıdan ciddi sayılabilecek varyasyona sahip olduklarını göstermektedir (Kaymakçı ve ark., 2008). Ülkemizde yetiştirilen yerli sığır ırklarında

özellikle bağışıklık sisteminde görevli Toll-benzeri reseptörler (Toll-like receptors, TLR) üzerinde çeşitli haplotiplerin varlığı tespit edilmiştir (Bilgen ve ark., 2016). Bu noktada farklı türlerde yerli ırklar üzerinde hastalıklara direnç ve bağışıklık sistemine yönelik planlanacak çalışmalar büyük önem arz etmektedir.

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2018 yılı verilerine göre ülkemizde 32,5 milyon baş yerli koyun yetiştirildiği bildirilmiştir ((<http://www.tuik.gov.tr>, Erişim Tarihi: 20.05.2019). Yerli ırklar içerisinde Akkaraman koyun ırkının % 45’lik bir orana sahip olduğu bildirilmiştir (Mundan ve ark., 2004).

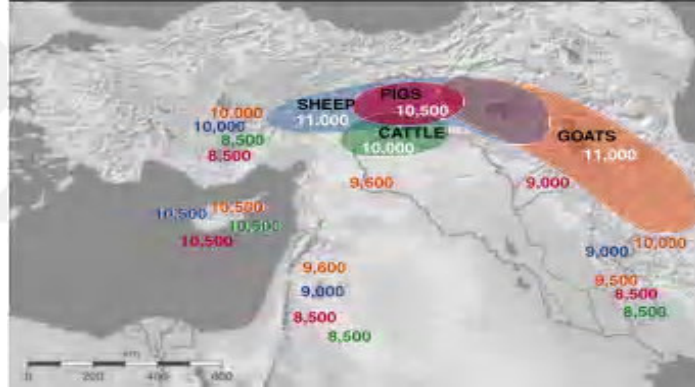
Koyunlarda görülen enfeksiyöz hastalıklar yetiştiricilik açısından önem arz etmektedir. Solunum sistemi hastalıklarının ise koyunlarda belirlenen tüm hastalıkların %5-6’sını kapsadığı bildirilmiştir (Bell, 2008). Memelilerde TLR’lerin keşfedilmesi ile doğal bağışıklığın moleküler mekanizmalarının anlaşılması konusunda hızlı ilerleme kaydedilmiştir (Kawai ve Akira, 2010). Bağışıklık sisteminde görevli TLR’lerin çalışma mekanizmasının anlaşılması için Lipoteikoik asit (LTA) ve Lipopolisakkarit (LPS) gibi moleküllere verdiği tepkilerin ölçülmesi amacıyla birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışma yapılmıştır (Poltorak ve ark., 1998; Hoshino ve ark., 1999; Shwandner ve ark., 1999; Shröder ve ark., 2003; Deng ve ark., 2012; Uddin ve ark., 2012; Gao ve ark., 2010; Carroll ve ark., 2012; İslam ve ark., 2012; Xu ve ark., 2017; Nefefe ve ark., 2017; Passmore ve ark., 2018).

Bu tez çalışmasında Akkaraman ırkı kuzulara solunum yolu ile LTA, LPS ve LTA+LPS karışımlarının uygulanması sonucu periferik kanda bulunan tek çekirdekli hücrelerdeki (Peripheral blood mononuclear cells, PBMC) TLR yolağında görev alan genlerden *TLR2*, *TLR4*, *MyD88*, *TRAF6*, *NF- κ B*, ve sitokinlerden *TNF α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10* ve *IFN- γ* genlerine ait ekspresyon seviyelerinin qRT-PCR yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen veriler ile Akkaraman ırkı kuzulara *in vivo* olarak uygulanan LTA, LPS ve LTA+LPS karışım dozlarının 24. saat ve 7. günlerde PBMC hücrelerinde TLR ve sitokin genleri üzerindeki ekspresyon seviyeleri zamansal olarak incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Koyunculuğun Önemi

Neolitik çağdan bu yana besin, yün ve deri kaynağı olarak kullanılan koyun birçok toplumda önemli bir çiftlik hayvanı olmuştur (Ryder ve ark., 1984; Meadows ve ark., 2011).



Şekil 2.1. İlk evcilleştirmenin yapıldığı “Bereketli Hilal” (Fertile Crescent) haritası (Zeder ve ark., 2008).

Arkeolojik kazılardan elde edilen sonuçlara göre; koyunun günümüzden yaklaşık 11000 yıl önce, Batı’da Filistin’deki Lübnan Dağından, kuzeyde Amanos dağları ve Güneydoğu Anadolu’ya kadar uzanan, Doğu Torosların Güney eteğini izleyerek Zagros Dağlarıyla Güneye kıvrılan “Bereketli Hilal (Fertile Crescent)” olarak adlandırılan bölgede (muhtemelen birbirinden bağımsız olarak birkaç farklı yerde) evcilleştirildiği bildirilmiştir (Zeder ve ark., 2008).

Günümüzde yetiştirilen evcil koyun ırkları; *Ovis musimon* (Muflon), *Ovis arkal* (Arkal), *Ovis argali* (Argali) yabani koyunlarından köken almıştır (Küçük ve ark., 1999). Muflon koyunu, Akdeniz’deki Sardunya ve Korsika adalarında, Anadolu’da ve Kafkasya’da; Arkal koyunu kuzeybatı Asya’da İran ve civarı ile Hazar ve Aral gölleri

arasında; Argali koyunu ise Asya'nın merkezinde Himalaya, Tibet ve Altay dağlarında yaşamaktadır (Küçük ve ark., 1999).

Koyun, genelde kısa boylu, verimi olmayan meralar ile anız, nadas ve bitkisel üretim yapılmayan arazileri değerlendirerek süt, et, deri ve yapağı gibi ekonomik yönden değerli ürünlere dönüştürebilmektedir. Olumsuz çevre koşullarına ve hastalıklara dayanıklı, kolay idare edilebilen, az masraflı ve sığırların yararlanamadığı bitki örtüsünü de değerlendirebilen önemli bir çiftlik hayvanıdır (Akçapınar ve ark., 2000).

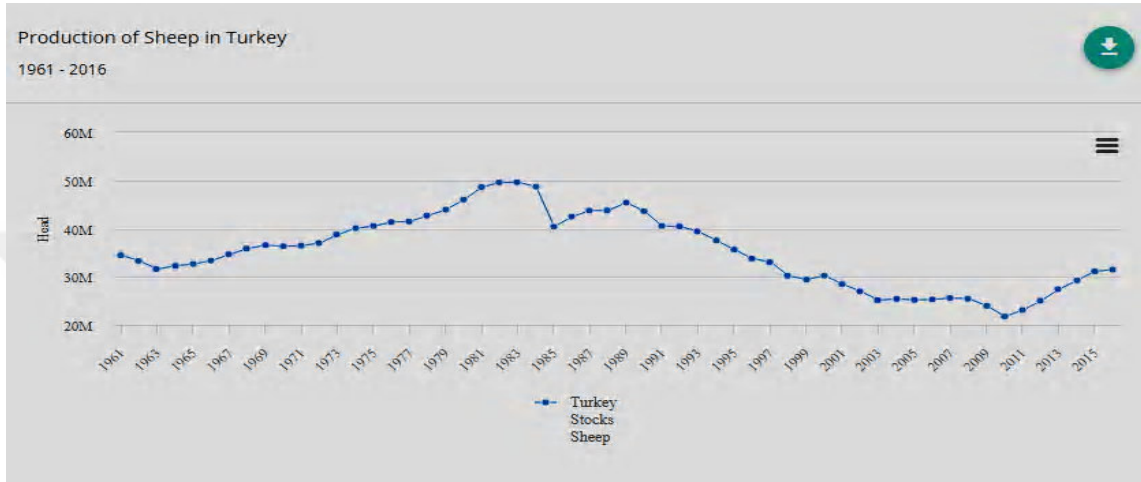
Türkiye coğrafik konumu, iklim koşulları ve tarımsal üretim yapısı nedeniyle çoğunlukla küçükbaş hayvanların yetiştirilebileceği geniş arazilere sahiptir. Yerli koyun ırklarının da ulusal düzeyde yapılan çalışmalar ile önemli seviyede genetik varyasyona sahip oldukları belirlenmiştir (Kaymakçı ve ark., 2009). Türkiye'de T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından ırk olarak tescil edilen 20 farklı (Akkaraman, Kangal Akkaraman, Morkaraman, İvesi, Dağlıç, Çine Çaparı, Güney Karaman, Karagül, Norduz, Tuj, Sakız, Herik, Hemşin, Malya, Acıpayam, Kıvırcık, Karayaka, Karagül, Pırlak ve Gökçeada) yerli koyun ırkı bulunmaktadır. Koyunlar verim yönünden et tipi, süt tipi, yapağı tipi, et-yapağı tipi, süt-döl tipi olarak sınıflandırılmaktadır. (<https://www.tarimorman.gov.tr>, Erişim Tarihi: 20.05.2019).

Ülkemiz yerli koyun ırkları bir verim yönü bakımından gelişmediği için kuyruk yapılarına göre sınıflandırılmaktadır (<https://www.tarimorman.gov.tr>, Erişim Tarihi: 20.05.2019). Bunlardan, Akkaraman, Morkaraman, İvesi, Dağlıç, Karagül, Norduz, Çine Çaparı, Güney Karaman, Karagül, Hemşin yağlı kuyruklu ırk olarak; Tuj koyunu uyluğu yağlı koyun ırkı olarak; Kıvırcık, Karayaka, Sakız, Gökçeada, Ramlıç yağsız ince kuyruklu ırk olarak; Malya, Acıpayam, Pırlak ve Herik ise yarım yağlı kuyruk ırk olarak sınıflandırılmıştır (<https://www.tarimorman.gov.tr>, Erişim Tarihi: 20.05.2019). Verim yönlerine göre Akkaraman, Dağlıç, Gökçeada Güney Karaman, Hemşin, Acıpayam, Pırlak'ın et ve süt verimi yönünden; Morkaraman, Norduz et verimi öncelikli; İvesi süt verimi öncelikli; Tuj, Çine Çaparı, Hemşin, Kıvırcık, Karayaka, Herik'in et, süt ve yapağı verini yönünden; Karagül et, süt ve post yönünden; Sakız süt ve döl verimi yönünden; Ramlıç ve Malya ise et ve yapağı verimi yönünden yetiştirilmektedirler (<https://www.tarimorman.gov.tr>, Erişim Tarihi: 20.05.2019).

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre; Türkiye'de yetişen, yerli koyun varlığı 2018 yılı itibarıyla 32,5 milyon baştır (<http://www.tuik.gov.tr>, Erişim Tarihi:

20.05.2019).

Dünya Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization-FAO) 2018 verilerine göre 1961-2016 yılları arasında Türkiye’de canlı koyun varlığı (Şekil 2.2) ve 2006-2016 yılları arasında koyundan elde edilen ürünlerin dünya sıralamasına göre kaçınıcı sırada olduğu Tablo 2.1’de belirtilmiştir (<http://www.fao.org>, Erişim Tarihi: 20.05.2019).



Şekil 2.2. Türkiye’de 1961-2016 yılları arasında yetiştirildiği bildirilen koyun varlığı (<http://www.fao.org>, Erişim Tarihi: 20.05.2019).

Tablo 2.1. Dünya Gıda ve Tarım Örgütü’ne ait 2006-2016 yılları arası Türkiye’de canlı koyun varlığı ve koyundan elde edilen ürünlerin Dünya’daki üretim sıralaması (<http://www.fao.org>, Erişim Tarihi: 20.05.2019.)

Koyuna ait ürünler	2006-2016
Canlı Koyun Varlığı	İlk 10’da değil
Yerli Koyun Et üretimi	6. sırada
Süt Üretimi	2. sırada
Peynir Üretimi	7. sırada
Tereyağı Üretimi	1. sırada
Deri Üretimi	9. sırada
Yün Üretimi	İlk 10’da değil

Ülkemizdeki yerli koyun varlığının %90 olduğu ve Akkaraman ırkının da yerli ırklar arasında %45’lik bir orana sahip olduğu bildirilmiştir (Mundan ve ark., 2004). Yağlı kuyruklu koyun ırklarından biri olan Akkaraman ırkı koyunlar (Şekil 2.3) özellikle Orta İç Anadolu’yu yoğunlukla kapsamak üzere komşu Akdeniz, Karadeniz, Doğu Anadolu ve Batı ve Güney Anadolu’da da yaşamaktadır (Akçapınar, 2000; Yalçın ve ark., 1990). Enfeksiyöz hastalıklara, zorlu çevre koşullarına, yetersiz bakım ve besleme, farklı iklim koşullarına dayanıklı olan bu ırk, et ve süt verimi yönünden kombine verimli, iri cüsseli ve sağlam yapılı bir koyun ırkıdır (Akçapınar, 1994; Özcan, 1990; Kaymakçı ve ark., 1996).



Şekil 2.3. Akkaraman koyunu. (<https://www.tarimorman.gov.tr>, Erişim Tarihi: 20.05.2019).

Akkaraman ırkı koyunların doğum oranı %87,9, sürüye uyum ve annelik içgüdüsü iyidir. Uzun mesafede yolculuk yapabilir, kötü ve zayıf meralardan en iyi şekilde yararlanılır. Yerli ırklar arasında en uyumlu ve yönetimi kolay ırktır. Cidago yüksekliği; erkeklerde 72 cm, dişilerde 65 cm, ağırlık erkeklerde 62 kg, dişilerde 50 kg olarak ölçülmüştür. Vücut dar ve uzun, sırt çizgisi genellikle düz ama bazen hafif bir göçük görülebilir. Kafa dar ve uzun, yüzünde hiç uzun tüy yoktur. Boyun uzun, bazen alnında çeşitli boyutlarda saçaklanmalar vardır. Boynuzlar hafifçe dış bükey bulunmaktadır. Uzun sarkık kulakları vardır. Bacaklar uzun, güçlü, tırnaklar sert ve dayanıklıdır. Baş ve boyun altında yün yoktur. Yapağı kaba ve karışıktır. Ucunda S kıvrımı yapan yağlı bir kuyruk yapısına sahiptirler. Arkadan kuyruğa bakıldığında 3 parça halinde görülebilir. Kalp şeklinde ve en ucunda uzun ince bir parça kuyruk ile sonlanır. Renk genellikle beyazdır. Baş, burun ve topuklarda siyah lekeler vardır (Şekil 2.3). Koyunlar boynuzsuzdur. Koçlarda boynuz küçük ya da gelişmemiş olabilir. Günlük canlı ağırlık artışı 237 gram, ortalama karkas ağırlığı 19,5 kg, ortalama yaşama süresi 7 yıldır

(Yalçın ve ark., 1990; Akçapınar, 2000; <http://www.fao.org/dad-is>, Erişim tarihi: 16.06.2019).

Koyunlarda görülen enfeksiyöz hastalıklar yetiştiricilikte ekonomik kayıplar yönünden önem arz etmektedir. Solunum sistemi hastalıklarının ise koyunlarda belirlenen tüm hastalıkların %5-6'sını kapsadığı bildirilmiştir (Bell, 2008). Koyunlarda solunum sistemi hastalıkları; alt solunum yolu hastalıkları [akut bakteriyel hastalıklardan pasteurella, mycoplasma, viral hastalıklardan parainfluenza ve ayrıca pnömoniler, akciğer apseleri (Tüberküloz, kazeöz lenfadenitis) ile kronik viral hastalıklardan maedi-visna, jaagsiekte ve paraziter pnömoni] ve üst solunum yolu hastalıkları (Laringeal kondritis, rhinitis, nazal miyasis, nazal tümörler ve nazal yabancı cisimlerden oluşan hastalıklar) olarak ikiye ayrılır. (Bell, 2008). Hastalıkların bağışıklık sisteminde oluşturduğu immun yanıtın genetik mekanizmanın anlaşılması hastalığın tedavi safhasında kontrolünün sağlanması açısından çok önemlidir (Davies ve ark., 2009)

2.2. Bağışıklık Sistemi

Doğada patojen olarak nitelendirilen çok sayıda mikroorganizma bulunmaktadır. Canlılar bu patojenlere çoğunlukla deri, solunum (inhalasyon) ve sindirim yoluyla maruz kalmaktadır (Hancock ve ark., 2000). Bağışıklık sistemi, organizmada bu tip saldırganlara karşı bariyerler, doğal ve kazanılmış bağışıklık hücreleri ile yanıt verir. Doğal bağışıklık sistemi içerisinde yer alan bariyerler fiziksel (deride epidermis ve keratonositler; solunum, solunum yolundaki silialar; gastrointestinal ve ürogenital yollardaki mukozanın epitelyum tabakası), kimyasal (deri, mide ve ürogenital boşlukların pH seviyesi; deri, solunum ve gastrointestinal sistem ile gözden salınan mikrosidal moleküller) ve biyolojik (deri ve gastrointestinal sistem doğal florasında bulunan bakteriler) bariyerler olarak sınıflandırılmıştır. Doğal ve kazanılmış bağışıklık sisteminin oluşturduğu savunma sistemleri, patojenlerce bariyerler aşıldığında devreye girer (Male ve ark., 2008).

Bağışıklık sistemi hücreleri, kemik iliğinde üretilip kan ve lenf sisteminde dolaşarak vücuda yayılan lökositlerden oluşmaktadır. Bütün kan kaynaklı bağışıklık sistemi hücreleri kemik iliğinde yerleşim gösteren pluripotent hematopoetik kök hücrelerden (miyeloid ve lenfoid seri öncül hücreleri olarak ikiye sınıflanan) köken alır. Myeloid seri öncülleri; trombositik (trombositler), eritroid (eritrositler), granülositik (eozinofil, bazofil, nötrofiller), monositik (monosit/makrofaj ve dentritik hücreler) hücreler olarak

dört sınıfa ayrılır. Lenfoid seri hücreleri ise B ve T lenfositler, doğal öldürücü hücreleri (Natural Killer–NK hücreleri) ile bazı dentritik hücrelerden oluşmaktadır. Lenfoid kökenden (lenfositler ve plazma hücreleri) türemiş hücrelerin çoğu kazanılmış bağışıklık yanıtlarından sorumlu iken NK hücreleri doğal ve kazanılmış bağışıklık arasında köprü görevi görmektedirler (Kindt ve ark., 2007).

Doğal bağışıklık sistemi mikroorganizmalara maruz kalındıktan sonraki ilk saatlerde enfeksiyonu sınırlandırmaya yarayan konak savunma sisteminin ilk basamağıdır (Zasloff, 2002; Hoffman ve ark., 2014). Doğal bağışıklık sistemi patojenin hızlıca tahrip edilmesini, fagositik hücrelerin aktive edilmesi ve inflamasyon olarak bilinen bölgesel (lokalize) koruyucu cevabı 0 ile 4 saat kadar kısa sürede etkin bir şekilde verir. Ayrıca savunmanın ilk basamağındaki rolüne ilaveten memelilerde kazanılmış bağışıklığın sonraki klonal tepkisinin uyarılmasında da önemli rol oynamaktadır (Alberts ve ark., 2002). Doğal bağışıklık yanıtı büyük oranda nötrofil ve monosit/makrofajlar tarafından oluşturulmakla birlikte dentritik hücreler de fagositoz yoluyla patojenleri yok eder. Ayrıca bu hücrelerin sentezlediği inflamatuvar mediyatörler ve sitokinler ile de patojenlere karşı konak tepkilerinin de kontrolü sağlanır (Aderem ve ark., 1999).

Konak hücrelerinde bulunan örgü tanıyıcı reseptörlerin (Pattern recognition receptor, PRR) doğal bağışıklık sisteminin bir parçası olduğu belirtilmiştir (Janeway, 1989). Bağışıklık sistemi hücrelerinde bulunan PRR'lerin, monositler, makrofajlar, dendritik hücreler ve B hücreleri olmak üzere çeşitli antijen sunan hücreler üzerinde eksprese edildiği bildirilmiştir (Hornung ve ark., 2002). Bağışıklık sistemi hücrelerinde PRR'leri kodlayan genlerin, kazanılmış bağışıklıkta B ve T lenfositlerin ürettiği reseptörlerin (epitopa özgü yeniden yapılandırılan) aksine ilave değişikliğe ihtiyaç duymadıkları bildirilmiştir (Murphy, 2011).

Doğal bağışıklık sisteminde bulunan fagositik hücrelerdeki PRR'ler, yalnızca patojene özgü olan ve konakta üretilmeyen patojen ilişkili moleküler örgülere (Pathogen associated molecular patterns, PAMP) bağlanırlar (Janeway, 1989; Medzhitov ve Janeway, 1997). Korunmuş PAMP'lar, patojene özgü proteinler, karbonhidratlar, lipidler ve nükleik asitlerden oluşur. Bağışıklık hücrelerinde bulunan PRR'lerin, PAMP'lara bağlanması ilw patojen yada molekül fagosite edilir ve enzimatik yıkılım gerçekleşir (Delves ve ark., 2008). Diğer taraftan bağlanmış olan PRR'lar konak hücrenin aktifleşmesine ve antimikrobiyal ürünlerini salgılamasına da sebep olurlar

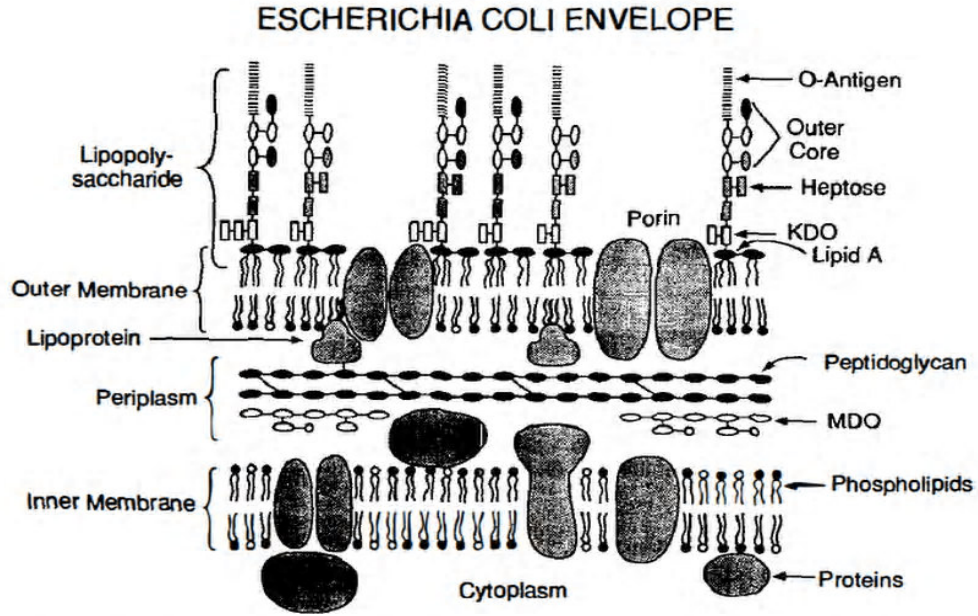
(Doan ve ark., 2013). Bağışıklık sistemini aktifleştirici çok sayıda mikrobiyal bileşen tespit edilmiştir. Bu yapılar izole edilip kimyasal ve moleküler yapıları çözülmeye çalışılarak mikroorganizmaların hücre duvarlarının hangi yapılardan oluştuğu belirlenmiştir (Galanos ve ark., 1971). En iyi bilinen PAMP örnekleri; bakteriyel LPS, LTA, peptidoglikan (PGN), mannanlar, bakteriyel DNA, çift iplikli RNA ve glukanolardır (Beutler ve ark., 2003). Gram-negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan LPS, Gram-pozitif bakterilerdeki eksotoksinler ve mikobakterilerdeki lipoarabinomannan (LAM), teikoik asit ve LTA yangı tepkimesini uyaran bakterilerin en önemli virülans faktörleridir. Bunların dışında da çok sayıda diğer bakteri ürünlerinin de konak aktivasyonunu ve sitokin sentezini uyardığı bildirilmiştir (Tablo 2.2) (Heumann ve ark., 1998).

Tablo 2.2. Vücutta inflamasyon oluşturan mikrobiyal bileşenler

Mikroorganizma	Yangı oluşturan bileşen	Referans
Gram-negatif bakteri	Lipopolisakkarit	(Heumann ve ark., 1998; Pugin ve ark., 1994)
	Peptidoglikan	
	Lipoprotein, lipopeptidler	(Galdiero ve ark., 1993; Tufano ve ark., 1994)
	Lipid A bağlantılı proteinler	(Ma & Weis, 1993; Tai ve ark., 1994; Reddi ve ark., 1995; Mangan ve ark., 1992)
Gram-pozitif bakteri	Ekzotoksinler	(Hegg ve ark., 1995)
	Peptidoglikanlar	(Pugin ve ark., 1994; Mattson ve ark., 1994)
	Lipoteikoik asit ve teikoik asit	(Bhakdi ve ark., 1991; Stabelford ve ark., 1994)

Gram-negatif bakterilerin dış zarında bulunan LPS, akut hastalıkların patogenezinde önemli rol oynayan (Bendixen ve ark., 1981; Fenwick & Osburn 1986) ve doğal bağışıklık sistemini uyaran en önemli (Şekil 2.4) endotoksindir (Galanos ve ark., 1971; Rask-Andersen ve ark., 1989; Raetz 1990; Medzhitov ve ark., 2002). *Escherichia coli*'ye ait farklı serotiplerden (*E. coli* O111:B4, O127:B8, O127:B8, vs.), *Salmonella*

typhimurium, *Salmonella minnesota Re 595 (Re mutant)* gibi Gram-negatif bakterilerden ticari LPS farklı yöntemlerle elde edilebilmektedir (<https://www.sigmaaldrich.com>, Erişim tarihi: 16.06.2019).

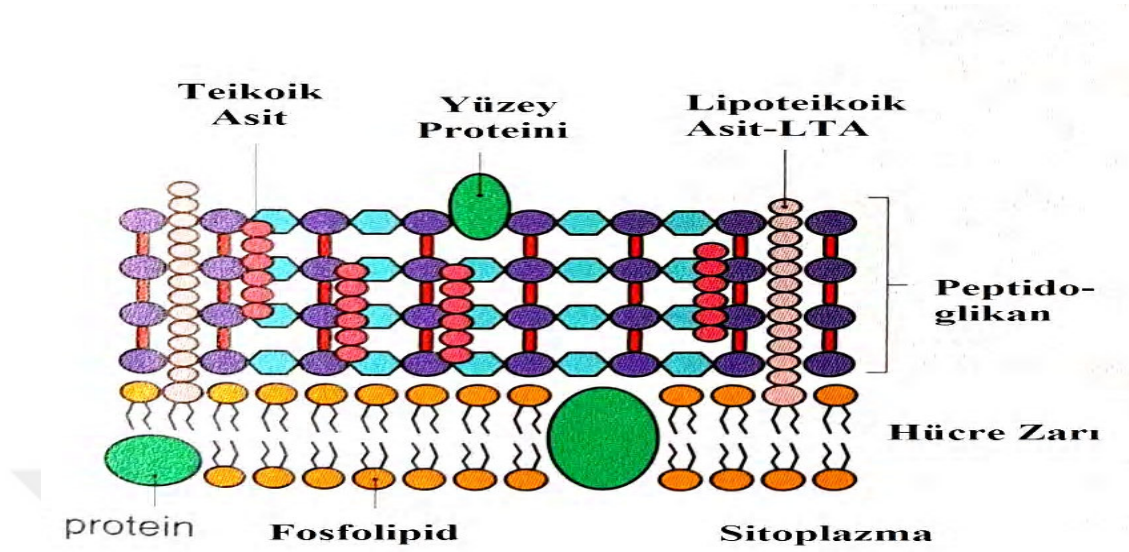


Şekil 2.4. *Escherichia coli*'nin hücre duvarına ait iç ve dış membran görüntüsü. Dış membran üzerinde Lipopolisakkarit, Ketodeoksioktülönat (KDO), Lipid A, O-Antigen ve Heptoz bulunmaktadır. Periplazma kısmında peptidoglikan tabaka ve membran kaynaklı oligosakkaritler (Membrane-derived oligosaccharides, MDO) bulunmaktadır. İç membran yapısında ise fosfolipidler, integral proteinler ve diğer proteinler yer alır. Toksik etkilerden sorumlu olan LPS ve lipid A adı verilen bir fosfolipid, lipid A'ya, KDO üzerinden bağlanan beş şekerli bir öz polisakkarid ve 3-5 şekerlik birimlerin 25 kez yinelenmesinden oluşan bir dış polisakkaridin bulunduğu üç ayrı birimden oluşur (Raetz, 1990).

Deneysel olarak uygulanan LPS'nin periferel kandaki mononükleer hücreler ve doku makrofajlarından kısmen inflamatuvar sitokinleri, interleukin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktör- α (TNF α) salınımını tetiklediği bildirilmiştir (Myhre ve ark., 2004). Son derece güçlü bir toksin olan LPS, makrofajları 1 pg/mL gibi düşük konsantrasyonlarda bile aktive edebilmektedir (Rietschel ve Brade, 1992; Fenton ve Golenbock 1998).

Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarında bulunan LTA inflamatuvar cevap üretilebilen ve bir glikolipide bağlanmış poligliserofosfat omurgasını içeren yapıdır (Şekil 2.5), Gram-negatif bakterilerde bulunan LPS'ye eşdeğerdir (Fischer ve ark., 1988;

Wakabayashi ve ark., 1991).



Şekil 2.5. Lipoteikoik asit Gram-pozitif bakterilerdeki sitoplazmik zarın dış yüzüne bağlanmış [suda çözünen (kutuplu) ve çözünmeyen (kutupsuz) fonksiyonel grupları birlikte içeren organik molekül] moleküllerin bir sınıfını temsil etmektedir (Murphy, 2011).

Canlılara LTA uygulamasının doğal bağışıklıkta görev alan mononükleer fagositlerden sitokinlerin salınımını aktive ettiği bildirilmiştir (Bhakdi ve ark., 1991). Farklı Gram-pozitif bakterilerden elde edilen LTA'ların makrofaj artışının uyarılmasında ve TNF α salınımının artışından da sorumlu olduğu bildirilmiştir (Keller ve ark., 1992). *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus pyogenes* gibi Gram-pozitif bakterilerden ticari LTA izole edilebilmektedir (<https://www.sigmaaldrich.com>, Erişim Tarihi: 16.06.2019).

2.2.1. Doğal ve Kazanılmış Bağışıklık Sistemi Savunma Mekanizmaları

Doğal bağışıklık sistemi savunma mekanizmalarında reseptörler, hücrel savunma mekanizmaları ve çözünür savunma mekanizmaları yer almaktadır. Bağışıklık sisteminde görev alan hücre ve moleküller, görevlerini sistem hücrelerinde bulunan reseptörlere bağlı olarak yerine getirir. Bu reseptörler önceden oluşturulmuş (doğal) ve kazanılmış olarak oluşturulan reseptörler olarak ikiye ayrılır (Alberst ve ark., 2002). Önceden oluşturulan reseptörler; hücre yüzey reseptörlerinden olan örgü tanıyıcı reseptörler olarak nitelendirilen Toll-benzeri reseptörleri (Toll-Like Receptors, TLRs), öldürücü aktivasyon reseptörleri (Killer Activated Receptors, KARs), öldürücü

inhibisyon reseptörleri (Killer Inhibitory Receptors, KIRs), çözünür moleküler reseptörlerden olan kompleman proteinleri-kompleman sistem reseptörleri ve kazanılmış bağışıklıkta görev alan lenfositlerin ürettiği antikora ait Fc kuyruklarına bağlanan fagositik hücre yüzeyinde eksprese olan Fc reseptörlerinden (Fragment cristallizable Receptors, FcRs) oluşmaktadırlar (Kindt ve ark., 2007).

Bağışıklık sisteminde hücresel savunma mekanizmalarından fagositoz ve doğal öldürücü (NK) hücre yanıtları doğal immun sistemin diğer hücrelerini aktifleştirip enfeksiyon bölgesine yönlendirmek için sitokin ve kemokinler salgılayarak, fagositlerce mikropların yutulmasını ve parçalanmasını sağlamaktadır (Levinson, 2008).

Doğal bağışıklık sisteminde görev alan çözünür savunma mekanizmaları ise tip I interferonları, defensin, kompleman ve sitokinleri içerir. Kompleman sistemi özellikle hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık sistemlerinde rol alarak, organizmayı hücresel temastan kaçan patojenlere karşı koruyan bir enzim ve protein saldırı kaskadıdır. Kompleman sistem tarafından yönlendirilen C5a nötrofiller için önemli bir kemotaktik ajan olduğu gibi C3a ile birlikte mast hücrelerini etkileyerek histamin, lökotrien B₄ ve TNF gibi inflamatuvar mediatörlerin salgılanmasını sağlar. Ayrıca damar geçirgenliği ve fagositlerin göçü üzerine etkileri vardır (Murphy, 2011).

Sitokinler, doğal ve kazanılmış bağışıklık yanıtının enflamasyon ve onarım, hücresel büyüme ve farklılaşma gibi tüm yönlerinde görev alan düşük moleküler ağırlığa sahip çözünür protein habercileridir (Tablo 2.3). Sitokinler antijene spesifik olmayan şekilde etki ederek kemotaksisi (kimyasal olarak tetiklenen göç) sağlar ve spesifik hücrelerin aktifleştirilmesinden geniş fizyolojik değişimlerin tetiklenmesine kadar birçok biyolojik etkinlikte rol oynar (Delves ve ark., 2008). Sitokinlerden IL-1 ve IL-6 gibi kimyasal haberciler vücut sıcaklığının artışına sebep olan proteinlerin üretimini başlatır. TNF α gibi diğer sitokinlerin lokal damar epiteli geçirgenliğini artırarak hücreler ve çözünür moleküllerin damardan dokulara geçişinin artırılmasını sağlamaktadır (Janeway ve ark., 2001).

Tablo 2.3. Başışıklık sistemi hücrelerinden salgılanan sitokinler, fonksiyonları ve bağılı bulundukları reseptörler

Sitokin	Hücresel Kaynak	Hedefler	Fonksiyon	Reseptör
IL-1 β	M, B	T, B, M, End, diğeri	Lökosit aktivasyonu, artan endotelyal yapışma	CD121a veya CD121b
IL-2	T	T, B, NK, M, oligo	T hücre çoğalması, regülasyonu	CD122/CD25
IL-3	T ^b , Mas, Eoz, NK, End	Erit, G	Hematopoetik öncüllerin çoğalması ve farklılaşması	CD123/CDw131
IL-4	Mas, T, M	B, T, End	Th2 ve B hücrelerinin farklılaşması	CD124/CD132
IL-5	Mas, T, Eoz	Eoz, B	B hücreleri ve eozinofillerin büyüme farklılaşması	CD125/CDw131
IL-6	T, B, M, Astrositler, End	T, B diğeri	Hematopoez, farklılaşma, enflamasyon	CD126/CD130
IL-7	Kemik iliğı stroması	pB, pT	Pre/Pro-B hücrelerinin proliferasyonu, T hücreleri, proinflamatuvar sitokinlerin artması	CD127/CD132
IL-8	M, L, diğeri	PMN, Baz, L	Kemoatraktan	CD128
IL-9	Th2 ^b	T, B	IgG IgM, IgE üretiminin etkili hale gelmesi	
IL-10	CD8 ^b , T, Th2, (B), M	T, B, Mas, M	Th1 hücreleri ile IFN- γ , TNF β , IL-2 inhibisyonu, Th2'yi stimüle eder	CD210
IL-11		Kemik iliğı stroması	Osteoklast oluşumu	

Sitokin	Hücresel Kaynak	Hedefler	Fonksiyon	Reseptör
IL-13	Th2 ^b , Mas, NK	Th2, B, M	Th2 modülatörü, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 baskılanması	
IL-14	T	B ^b	Proliferasyonu stimüle eder, Ig salgılamasını inhibe eder	
IL-15	M, Epi	T, B ^b	Proliferasyon	
IL-16	Eoz, CD8 ^b T	CD4 ^b T	CD4 ^b kemoatraktan	
IL-17	(T)	Epi, End, diğerleri	Osteoklastogenez ve anjiogenez	
IL-18	M	Th1, NK	IFN- γ üretimini uyarır, NK aktivitesini artırır	
IL-32	T, NK, Epi	Geniş çeşitlilik	Proinflamatuvar	
TNF α	M ^b , PMN, T, B, NK	M, PMN, T, End, diğerleri	Enflamatuvar reaksiyonların medyatörü	CD120a ve CD120b
TNF β	L	Geniş çeşitlilik	Enflamatuvar reaksiyon medyatörü	CD120a ve CD120b
IFN- α	L, Epi, fibroblast	Geniş çeşitlilik	MHC sınıf I' i upregüle eder, viral proliferasyonu durdurur	
IFN- β	Epi, fibroblast	Geniş çeşitlilik	MHC sınıf I' i upregüle eder, viral proliferasyonu durdurur	
IFN- γ	CD8 ^{+b} , (CD4 ^{+b}), NK	T, B, M, NK, End	Antiviral, anti-parazitik, proliferasyonu inhibe eder, MHC sınıf I ve sınıf II ekspresyonunu artırır	CD119

(^b) - Aktive edilmiş hücreler, (B) - B hücreleri, (Baz) – bazofiller, (DH) - dentritik hücreler, (End) - endotelyum, (Eoz) - eozinofil, (epi) - epitelyum, (Erit) - eritrosit, (G) - granüositler, (L) - lenfositler, (M) - makrofaj, (Mas) - mast hücreleri, (NK) - doğal öldürücü hücreler, (PMN) - nötrofiller, (oligo) oligodentrositler, (Hücresel alt küme) - parantez ve (T) - T hücreleri (Doan ve ark., 2013).

Kazanılmış bağışıklık sistemi, doğal bağışıklık sisteminde görevli çoğu hücreyi kullanır, patojenle temastan sonra aktifleşir ve tekrarlayan temaslarla güçlenir. Kazanılmış bağışıklık hücreleri de pluripotent kök hücrelerinden köken alır ve primer lenfoid organlar (merkezi lenfoid organlar) olarak bilinen timus ve kemik iliğinde gelişimini sürdürür. T hücreleri timusta gelişir ve ismini bu organdan alır. B hücreleri ise kemik iliğinden (Bone) alır. Bu hücreler fetüste ise karaciğerde gelişir (Levinson, 2008). Lenfositlerin çoğu gelişim gösterdikten belli bir süre sonra henüz işlevsel hale gelmeden primer lenfoid organlarda ölür, kalanlar ise olgunlaşarak kan yolu ile lenf düğümleri, sindirim sistemi, solunum yolları, dalak ve derideki epitelyum ile bağlantılı çevresel lenfoid (ikincil) organlara doğru göç ederler. Bu çevresel organlarda B ve T hücreleri karşılaştıkları yabancı antijenlere cevap verir (Janeway ve ark., 2001).

Kazanılmış bağışıklık sistemi, doğal bağışıklık sistemine göre çok daha etkindir. Kazanılmış bağışıklık sisteminde görevli lenfositler antikor aracılı bağışıklık yanıt (B lenfositler aktif) ve hücre aracılı bağışıklık yanıt mekanizması (T hücreleri aktif) görev almaktadır. B hücrelerinden üretilen antikorların her biri ayrı aminoasit dizisi ve antijen bağlanma yerine sahip milyarlarca farklı biçimde bulunabilir. İmmünglobulinler (Ig) olarak adlandırılan bu proteinler memelilerde α , δ , ϵ , γ , μ ağır zincirlerine karşılık gelen sırayla IgA, IgD, IgE, IgG ve IgM'dir (Alberts ve ark., 2002).

Hücre aracılı bağışıklık yanıt, kazanılmış bağışıklık yanıtta etkinleştirilmiş T hücreleri ile konak hücre yüzeyinde sunulmuş olan yabancı antijene karşı doğrudan harekete geçerek onları yok edebilir ya da makrofajları uyarmak için sinyal moleküllerini salgılayabilir (Delves ve ark., 2008). Hem doğal hem de kazanılmış bağışıklıkta görev alan dentritik hücreler mikrobik antijene yanıt oluşturmak üzere T hücrelerini doğrudan uyaran antijen sunan hücreler olarak görev yaparlar (Doan ve ark., 2013). T hücreleri sitotoksik ve yardımcı T hücreleri olarak iki ayrı gruba ayrılır; sitotoksik T hücreleri enfekte olmuş hücreleri imha ederken, yardımcı T hücreleri makrofaj, B hücreleri ve sitotoksik T hücrelerinin etkinleştirilmesine yardımcı olur. B hücreleri kan yolu ile dolaşıma salgıladıkları antikorlar ile uzak mesafede etkin olurken, T hücreleri uzak bölgelere göç eder ancak etkinlikleri yalnızca komşu hücreler üzerinde görülür (Levinson, 2008).

Doğal bağışıklık sal yanıt, yardımcı T hücrelerinin dönüşeceği etken hücre tipini ve sonrasında ortaya konulacak kazanılmış bağışıklık sal yanıtın geleceğini belirler. Doğal bağışıklık sal yanıtarda antijen sunan hücreler ile yardımcı T hücrelerinin Th1 ve Th2 etken hücrelere farklılaşmalar sağlanır. Salgıladıkları sitokinler sayesinde etken yardımcı T hücrelerine ait bu iki alt sınıf birbirinden ayırt edilir. Eğer hücreler Th1 hücrelerine dönüşmüşse fagozomlarca yakalanmış mikropları öldürmek için makrofajları aktifleştiren TNF α ve IFN- γ sitokinleri salgılanır. Ayrıca sitotoksik T hücrelerini uyarak enfekte olmuş hücrelerin öldürülmesi için sinyal gönderir (Kindt ve ark., 2007). Bağışıklık sal yanıtta etkin hale gelen birçok T ve B hücreleri görevlerini tamamladıktan sonra yok edilir. Antijen seviyesi ve sitokin uyarımı azaldıkça çoğu etken hücrenin yaşaması için gereken ortam sağlanamadığı için apoptoz yoluyla ölüm olayı gerçekleşir. Sadece bellek hücreleri ile bazı uzun ömürlü etken hücreleri vücutta kalır (Male ve ark., 2008).

2.2.1.1. Toll-Like Reseptörler

Bağışıklık hücrelerinde PRR'lerin büyük bir kısmını oluşturan TLR'ler, bağışıklık sistemi hücre yüzeyinde (makrofajlar, dentritik hücreler, mast hücreleri, eozinofiller, nötrofiller ve B lenfositler) ve epitelyum hücreleri, endotel hücreleri, kardiyomyositler ve adipositlerde bulunurlar (Majewska ve Szczepanik, 2006). Bu reseptörler patojenler karşısında kanda çözünmüş halde bulunan kompleman sistemin üyelerini ve sitokinleri uyaran reseptörler olarak da adlandırılmaktadırlar (Janeway ve Medzhitov, 2002). İlk olarak *Drosophilalarda*, embriyogenezde görev aldığı bildirilen bu reseptörlerin (Anderson ve ark., 1985; Lemaitre ve ark., 1996) daha sonra hem memelilerin hem de omurgasızların bağışıklık sisteminde önemli görevler aldıkları ortaya konmuştur (Medzhitov ve ark., 1997). *Drosophila* ve memelilere ait Toll benzeri reseptörlerin özellikle ekstraselüler (hücre dışı) alanda lösin açısından zengin tekrarlardan (Leucine-rich repeats, LRR) oluşmaktadır (Lemaitre ve ark., 1996). Toll proteinlerinin ektodomainlerinin ayrıca başka LRR içeren proteinlerde bulunan küçük sistein bakımından zengin bölgeler içermektedir. Bu sistein açısından zengin alanların sayısı ve düzenlenme görevi, Toll ailesinin farklı üyeleri arasında değişmektedir (Kopp ve Medzhitov, 1999). Yapılan çalışmalarda hem omurgalı hem de omurgasızların bağışıklık sisteminde bu bölgelerin moleküler mekanizmalar yoluyla yüksek düzeyde korunduğu ortaya konulmuş ve bunun da doğal bağışıklık sisteminin daha iyi

anlaşılmasına katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Kimbrell ve Beutler 2001). Bağışıklık sistemindeki görevli TLR'lerin araştırıldığı çalışmalarda bu reseptörler patojenlerin tanınması, yangı reaksiyonu ve immun yanıtların başlatılmasında önemli bir rol oynamaktadır (Medzhitov ve ark., 1998; Janeway ve Medzhitov, 2002). Mikrobiyal ajanlar tarafından TLR'lerin uyarılması, bağışıklık sistemi hücreleri ve inflamatuvar sitokinlerin aktifleşmesi ile sonuçlanan sinyal yollarının aktivasyonunu tetikleyerek enfeksiyon bölgesine makrofaj, nötrofil, NK hücreleri ve dentritik hücrelerin toplanmasını sağlar (Doan ve ark., 2013). Hücrelerde bulunan TLR'lere bağlanan ligandların, dendritik hücre olgunlaşmasını sağladığı ve antijenin T hücrelerine sunulması ile sonuçlanarak doğal ve kazanılmış bağışıklık sistemleri arasında bir köprü görevi gördüğü bildirilmiştir (Kopp ve Medzhitov, 1999; Janeway ve Medzhitov, 2002).

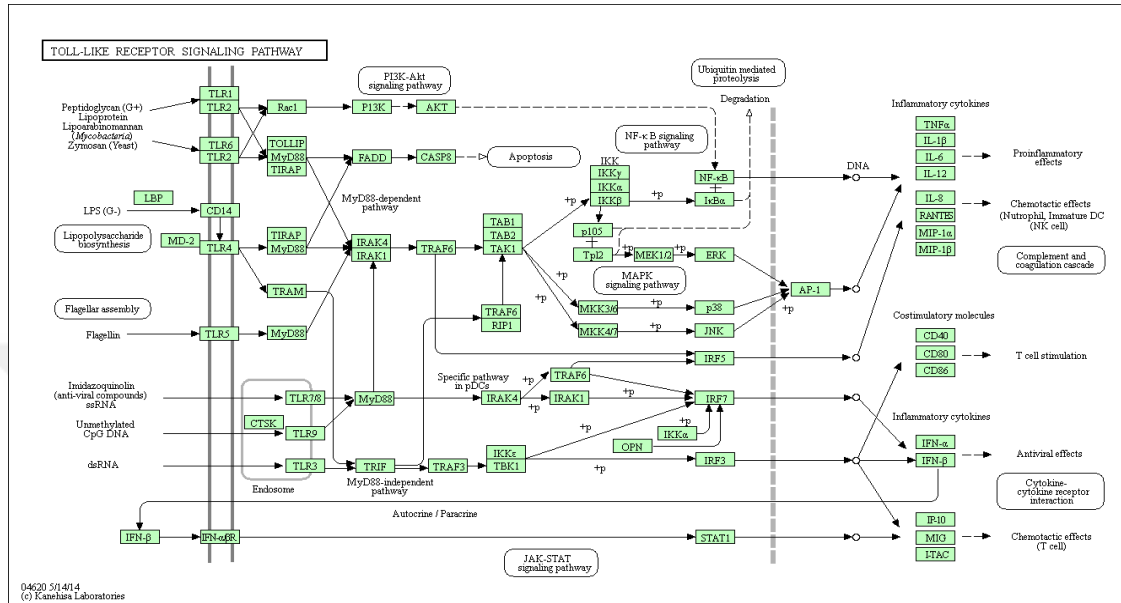
Günümüzde TLR ailesine ait 13 üye belirlenmiş (Tablo 2.4) ve bunlarında ilk onunun koyun, sığır, domuz, insan ve farede bulunduğu bildirilmiştir. (Dunne ve O'Neill, 2003; Akira ve Takeda, 2004; Chang ve ark., 2006; McGuire ve ark., 2006; Werling ve Coffey, 2007). Koyunda TLR1 ve 10 arasındaki tüm TLR'in bulunduğu ve bunları kodlayan genlerin nükleotid sekanslarının fare, insan, domuz ve sığır ile benzerlikleri ortaya konulmuştur (Chang ve ark., 2009). Hücre yüzeyinde TLR1, 2, 4, 5, 6 ve 10 bulunurken TLR3, 7, 8 ve 9 ise hücre içi reseptörleri ve organellerin (endoplazmik retikulum, endozom, lizosom, endolizozom) membranlarında (Şekil 2.7) bulunduğu belirlenmiştir (Ohnishi ve ark., 2003; Kawasaki ve Kawai, 2014)

Tablo 2.4. Memeli TLR reseptörleri tarafından tanınan doğal bağışıklık hücreleri ve ligandları (Murphy, 2011).

TLR'ler	Ligand	Hücresel Dağılım
TLR-1:TLR-2 heterodimer	Lipomannan (mikobakteri)	Monosit, Dentritik hücre, Mast hücresi, Eosinofil, Bazofiller
TLR-2:TLR-6 heterodimer	Lipoprotein (Diasil lipopeptidler; triasil lipopeptid)	
	Lipoteikoik Asitler (Gram- pozitif bakteri)	
	Zimosan (Mantar)	
TLR-3	Çift zincir RNA (viruslar)	Doğal Katil - NK hücreleri
TLR-4 (+ MD-2, CD14)	LPS (Gram-negatif bakteri)	Makrofajlar, Dentritik hücreler, Mast hücreleri, Eosinofiller
	Lipoteikoik asit (Gram-pozitif bakteri)	
TLR-5	Flagellin (bakteri)	Barsak Epiteli
TLR-7	Tek-zincir RNA (virüsleri)	Plazmositoid dentritik hücreler, NK hücreleri, Eosinofiller, B hücreleri
TLR-8	Tek-zincir RNA (virüsleri)	NK hücreleri
TLR-9	Metilsiz cpG'li DNA (bakteri ve herpesvirüsler)	Plazmositoid dentritik hücre, Eosinofiller, B hücreleri, basofiller
TLR-10	Bilinmiyor	Plazmositoid dentritik hücre, Eosinofiller, B hücreleri, basofiller
TLR-11 (yalnız fare)	Profilin ve profilin benzeri proteinler (toxoplasma gondii, uropatojenik bakteri)	Makrofajlar, dentritik hücreler, karaciğer, böbrek, ve mesane epitelyum hücreleri

Her bir TLR genellikle patojen yüzeyindeki moleküller ile doğrudan etkileşim yoluyla bir veya daha fazla mikrobiyal moleküler örgüyü tanır ve her birinin hücresel dağılımları farklıdır. Her bir TLR, bir monomer veya bir homodimer olarak, kendi ligand dizisine sahiptir. Ayrıca TLR tanıma repertuarında TLR2-TLR6 veya TLR1-

TLR2 eşleşmesi heterodimerler olarak işlev görürken diğer TLR'ler monomer olarak işlev görür (Takeda ve ark., 2003; Underhill, 2003; Murpyh, 2011; Doan ve ark., 2013).



Şekil 2.6. Bağışıklık sisteminde bulunan TLR yolağına ait KEGG (Kyoto Encyclopedia of genes and genomes) metabolik yolağı.

Bağışıklık sistemi hücrelerinde bulunan TLR yolağı incelendiğinde; TLR sinyal yolları iki gruba ayrılır. Birincisi; Myeloid farklılaşma faktörü 88'e (Myeloid differentiation primary response 88- MyD88) bağlı, Nükleer faktör kappa beta (NF- κ B) ve Mitojen-aktive edilmiş protein kinaz'ın (Mitogen-activated protein kinases, MAPK) hızlı aktivasyonu ile proinfalatuvar sitokinlerin üretilmesine neden olan bir yoldur. MyD88 hücre dışında TLR gibi reseptörler aracılığı ile oluşturulan sinyalleri hücre içerisine ileten adaptör bir proteindir (Takeda ve ark., 2004). İkinci TLR sinyal yolağı ise MyD88'e bağlı olmayan ve İnterferon- β (IFN- β) indüksiyonu ile IFN uyarıcı genlerin ve dentrik hücrelerin olgunlaşması ile NF- κ B ile MAPK'nın yavaş aktivasyonunu oluşturan yoldur. Toll benzeri reseptör yolağı uyarım yapan patojenin yüzeyinde bulunan moleküllere göre sinyalizasyonda farklı yollar izler (Hoshino ve ark., 2002). Buna göre; TLR1 ve TLR2 kompleksinin Gram-pozitif bakterilerin yüzeyinde bulunan peptidoglikan gibi membran proteinleri ile uyarılması sonucu fosfotidilinozitol-4, 5-bifosfat 3-kinaz katalitik subunit alfa (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, PI3K) ve AKT serin/treonin kinaz 3 (AKT serine/threonine

kinase 3, AKT3) yolağı aktive olur. Bu aktivasyon sonucu NF- κ B aktivasyonu gerçekleşir ve akabinde inflamatuvar sitokinler [TNF α , İnterleukin-1 β (IL-1 β), İnterleukin-6 (IL-6), İnterleukin-12 (IL-12)] aktive olur. Heterodimer olan TLR2 ve TLR6 kompleksinin, Gram-pozitif bakterilerin yüzeyinde bulunan membran proteinleri ile uyarılması sonucu MYD88-TIRAP-TOLLIP (Myeloid differentiation primary response 88-Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein-The Toll-interacting protein) kompleksini aktifleştirir. Bu aktivasyon iki yolağı aktifleştirir, birincisi; interleukin 1 reseptör bağlantılı kinaz 1-interleukin 1 reseptör bağlantılı kinaz 4 (Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 1-Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 4, IRAK1-IRAK4) kompleksini uyararak inflamatuvar sitokinlerin uyarılması yolağını aktive eder ya da ölüm bölgesi ile ilişkili Fas (Fas-associated protein with death domain, FADD) molekülünü uyararak apoptozise sebep olan kaspaz 8'in (caspase 8, CASP8) aktivasyonu ile sonuçlanır (Takeda ve ark., 2004; Kindt ve ark., 2007; Murphy 2011; <https://www.genome.jp/kegg>, Erişim Tarihi: 20.05.2019).

Hücre membranında bulunan farklılaşma kümesi 14 (Cluster of differentiation 14, CD14) molekülü LPS'yi tanır ve myeloid farklılaşma faktörü olan MD-2 ile TLR4'ün kompleks oluşturması sonucu hücresel sinyal iletimini başlatır. Hücresel TLR4'ün aktifleşmesi için CD14 ve MD-2 gereklidir. MYD88, Toll/interleukin-1 reseptör bölgesi içeren adaptör protein (Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein, TIRAP) ile TLR4'e bağlanarak komplekse İnterleukin-1 reseptör bağlantılı kinaz (Interleukin-1 receptor-associated kinases, IRAK) moleküllerini dahil eder. IRAK kompleksten ayrılarak TNF reseptör bağlantılı faktör 6 (TNF receptor associated factor 6, TRAF6) adaptör proteinine bağlanır. TRAF6, TGF beta aktive kinaz 1'i (Transforming growth factor beta-activated kinase 1, TAK1) aktifleştirir. TAK1 ise TAK1 bağlanma proteini 1 (TGF-Beta Activated Kinase 1 (MAP3K7) Binding Protein 1, TAB1) ve TAK1 bağlanma proteini 2 (TAK1-binding protein 2, TAB2) ile bir uyarım kompleksi oluşturur ve NF κ B, inhibitör protein (I κ B) kinaz (IKK) kompleksini aktive eder. IKK kompleksi NF κ B'yı aktive eder. Bu aktivasyon sonucu TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12 gibi inflamatuvar düzenleyici genlerin ekspresyonu başlatılır. Ayrıca MD-2 molekülü ile kompleks olan TLR4'ün uyarılması sonucu Toll-like reseptör adaptor molekülü 2 (Toll like receptor adaptor molecule 2, TIRAM) molekülü aktifleşir. Bu sinyal iletiminin ardına Toll-benzeri reseptör adaptör molekül 1 (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β , TRIF) aktive olur bu aktivasyon sonucu

TRAF6 molek    serin/treonin kinaz baēlantılı reseptör 1 (Receptor-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase 1, RIP1) ile kompleks oluşturur ve Aktivatör protein 1'i (Activator protein1 - AP1) uyarır. Bu da *TNF  *, *IL-1  *, *IL-6*, *IL-12* gibi inflamatuvar düzenleyici genlerin ekspresyonuna dolayısıyla baēı ıklık sistemi hücrelerinin uyarılması ve transkripsiyonuna sebep olur (  ekil 2.6) (Takeda ve ark., 2004; Kindt ve ark., 2007; Murphy 2011; <https://www.genome.jp/kegg>, Erişim Tarihi: 20.05.2019).

2.3. mRNA Ekspresyon   alışmasında Araştırılacak Genler

2.3.1. Toll benzeri reseptör 2 (Toll-like receptor 2, *TLR2*)

Koyunda 17. kromozomda bulunan *TLR2* (Gene ID: 554262, ENSOARG00000015044) 2.3 kb uzunluēunda tek ekzona sahiptir (<https://www.ensembl.org>, Erişim Tarihi: 20.05.2019). Dentritik hücre, monosit/makrofaj, mast hücre, eosinofil, bazofiller, nötrofiller, ve T lenfositlerinin hücre duvarının dış yüzeyinde bulunur (Hans ve Hans, 2011). *TLR2*'nin, LPS molek   n  n tanınmasında hücresel reseptörün sinyal bileşeni olabileceēi bildirilmiştir (Kirschning ve ark., 1998). Bu genin susturulmuş (knock-out) olduēu farelerin Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarında bulunan LTA'ya karşı immun yanıt olu turamadıēı, dolayısıyla bu reseptörün LTA, peptidoglokan gibi mikrobiyal ajanlara duyarlı olduēu belirtilmiştir (Takeuchi ve ark., 1999; Echchannaoui ve ark., 2002). *TLR2*'nin *TLR1* ve *TLR6* heterodimer yapısı ile bereber birçok bakteri, mantar, protozoa, helmint, ve viruslere ait ligandlara baēlandıēı bildirilmiştir (Nascimento-Oliveira ve ark., 2012).

2.3.2. Toll benzeri reseptör 4 (Toll-like receptor 4, *TLR4*)

Koyunda 2. kromozomda bulunan *TLR4* (Gene ID: 554263, ENSOARG00000005792) 10.04 kb uzunluēunda 3 ekzona sahiptir (<https://www.ensembl.org>, Erişim Tarihi: 20.05.2019). Baēı ıklık sistemi hücrelerinde nötrofiller, makrofajlar, dentritik hücreler, mast hücreleri ve eozinofillerin hücre duvarının dış yüzeyinde bulunmaktadır (Murphy 2011; Hans ve Hans, 2011). Bu gen üzerindeki yıkıcı mutasyonların memelilerde Gram-negatif bakterilerin olu turduēu sepsisin gelişmesine yatkınlık g  sterdiēi tespit edilmiştir (Poltorak ve ark., 1998). Farelerde *TLR4* geninin susturulması (knock-out) sonucu LPS'ye duyarlı olduēu ve bu ajana karşı immun yanıt ger ekle tirmediēi için   l  m ger ekle tiēi bildirilmiştir (Takeuchi ve ark., 1999). Memeli *TLR*'lerine ligandlarının tamamının doērudan baēlanmadıēı, *TLR4*'  n kısmen doērudan ve kısmen dolaylı bir mekanizma ile LPS'yi tanıdıēı bildirilmiştir (Beutler ve Rietschel, 2003).

Temel olarak bağışıklık hücrelerinde bulunan TLR4, karaciğer ve iskelet kası gibi diğer hücre tiplerinde bulunabilir (Frost, 2002; Takeda, 2004). Bu reseptörün TNF α 'yı tetiklediği ve inflamatuvar kaskad reaksiyonuna neden olan proinflamatuvar sitokinlerin aktivasyonu ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca NF- κ B ilişkili sinyal yolağı aracılığıyla MyD88 ve TRIF-bağımlı yolları aktive ettiği bildirilmiştir (Akira ve ark., 2006; Song ve ark., 2007). Bunun yanında NF- κ B'nin aktivasyonu ile *IL-6* ve *IL-8*'in de ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (Medzhitov ve ark., 1997).

2.3.3. Myeloid farklılaşma faktörü 88 (Myeloid differentiation primary response 88, *MyD88*)

Koyunda 19. kromozomda bulunan *MyD88* geninin (<https://www.ensembl.org>, Erişim Tarihi: 20.05.2019) üç fonksiyonel alan içeren 35 kDa'lık bir protein olduğu, bir amino terminal ölüm alanı, bir ara bölge ve bir karboksi terminali Toll ve interleukin reseptör (TIR) alanı olduğu bildirilmiştir (Lord ve ark., 1990; Hultmark 1994). Adaptör görevi gören bu proteinin TLR'lerin tamamı için bir TIR alanı olduğu ve sitoplazmik proteinin bağlanması gibi önemli bir olayda görev aldığı bildirilmiştir. Bu genin susturulduğu farelerde birçok (fakat hepsi değil) TLR sinyalleri ortadan kalkmaktadır (Kawai ve ark., 1999). Ayrıca bu genin susturulduğu farelerde LPS uyarımı sonrası TLR4 bağlantısının gerçekleşmediği dolayısıyla makrofajlardan inflamatuvar mediatörlerin salınımının ve B hücre çoğalımının gerçekleşmediği bildirilmiştir (Kawai ve ark., 1999). Bu genin susturulduğu farelerde TLR2 ligandının bakteriyel peptidoglikan ve lipoproteinlere karşı hücre tepkileride ortadan kalkmıştır (Kirschning ve ark., 1998). İnsanda bu gendeki nadir mutasyonların belirlenmesi ile hem TIR hem de ölüm alanının bu genin fonksiyonu için çok önemli olduğu belirlenmiştir (Murphy, 2011). Her iki alanda bulunan bazı mutasyonlar ile tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlarla karakterize olan immün yetmezlik arasında ilişkili olduğu bildirilmiştir (Suzuki ve ark., 2002). Ayrıca alternatif splicing ile düzenlenmiş *MyD88*'in LPS uyarımı sonrası IRAK ve NF- κ B aktivasyonunu inhibe ettiği ve böylece LPS tarafından tetiklenen inflamatuvar tepkileri negatif yönden düzenlediği tespit edilmiştir (Burns ve ark., 2003).

2.3.4. Tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör ilişkili faktör-6 (TNF receptor associated factor 6, *TRAF6*)

Koyunda 15. kromozomda bulunan TNF reseptör ilişkili *TRAF6* (ENSOARG00000019079) geni 17.61 kb uzunluğunda ve 6 ekzona sahiptir

(<https://www.ensembl.org>, Erişim Tarihi: 20.05.2019). İlk olarak TNF reseptöründen gelen sinyallemeye katılmak için tanımlanan bir adaptör ailesine ait bir proteini kodlar (Rothe ve ark., 1994; Cao ve ark., 1996). Bu proteinler, TRAF alanı olarak bilinen bir karboksi terminal bölgesi homolojisini paylaşırlar. Bu alan, TRAF protein oligomerizasyonunu ve diğer sinyal proteinleri ile etkileşimi artırır. Reseptörlerden IL-1R, TLR ve TNF α aile üyesinden, CD40'dan, NF κ B ve AP-1 transkripsiyon faktörlerine sinyal göndererek immun sistemle ilgili hücrelerin transkripsiyonunun hızlandırılmasında rol oynamaktadır (Ishida ve ark., 1996; Medzhitov ve ark., 1998; Muzio ve ark., 1998). Bu genin susturulduğu farelerin incelenmesi ile bu genin immün ve inflamatuvar sistemlerinin ve normal kemik oluşumu için gerekli olduğu ortaya konulmuştur (Naito ve ark., 2002).

2.3.5. Nükleer faktör kappa ve beta (Nuclear Factor-(κ)B, NF- κ B)

Koyunda 22. kromozomda bulunan Nükleer Faktör- κ B (NF- κ B) subunit 2 geni (ENSOARG00000000483) 5.93 kb uzunluğunda 21 ekzona sahiptir (<https://www.ensembl.org>, Erişim Tarihi: 20.05.2019). Nükleer faktör- κ B 1 ve 2 diye adlandırılan iki alt üniteden oluşmaktadır. Bu alt üniteleri kodlayan genlerin susturulduğu farelerin B hücrelerinin aktive olmadığı, makrofaj ve dentritik hücrelerinde gelişemediği gözlenmiştir (Gerondakis ve ark., 1999). Bu genin uyarımı TLR gibi bazı hücre yüzey resptörlerinin bağlanması ile olabilmektedir. Ayrıca MyD88'in yanı sıra diğer bazı adaptör moleküller TLR'lerden sinyaller ileterek NF- κ B uyarımına yol açarlar. Hücre içindeki bir sinyal iletim kaskadı kappa b kinaz baskılayıcısının (IKK) uyarımına yol açar. Normalde NF- κ B, sitozolde bir baskılayıcıya (I- κ B) bağlı olarak bulunmaktadır. I- κ B'nin IKK tarafından fosforile edilmesi, NF- κ B'nin baskılayıcıdan ayrılmasına neden olur ve NF- κ B nükleusa geçerek kopyalama faktörü fonksiyonunu yapar. Böylece enflamatuvar reaksiyonlarda işe karışan bazı genleri uyarır (Takeda ve Akira, 2004).

2.3.6. Tümör nekrozis faktör- α (Tumor necrosis factor- α , TNF α)

Koyunda 20. kromozomda bulunan Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF α) geni (ENSOARG000000008333) bazları arasında 1.77 kb uzunluğunda 4 ekzona sahiptir (<https://www.ensembl.org>, Erişim Tarihi: 20.05.2019). Damarlarda endotel geçirgenliğini artırarak bağışıklık sistemi hücrelerinin ilgili bölgelere göç etmesine yardımcı olan önemli sitokinlerden biridir. Enflamasyonun gelişiminde ve başka

sitokinlerin aktive edilmesi bir çok fonksiyona sahiptir (Janeway ve ark., 2001). Başlıca tek çekirdekli fagositler ve makrofajlar tarafından üretilen bu sitokin özellikle endotel hücrelerinde bulunan adezyon molekülleri ile kemokinlerin ekspresyonunda ve fagosit hücrelerin uyarımında rol alır. Ayrıca dayanıksız hücreleri apoptoza yönlendirir ve hücreler üzerinde reseptörlere bağlanarak transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'nin aktive edilmesinde anahtar rol oynar (Kindt ve ark., 2007).

2.3.7. Interleukin 1- β (*IL-1 β*)

Bu gen (ENSOARG00000020866) koyunda 3. kromozomda bulunan 10.98 kb uzunluğunda, 6 ekzona sahiptir (<https://www.ensembl.org>, Erişim Tarihi: 20.05.2019).

İnterleukin 1 gen ailesinde bulunmaktadır. Makrofajlar, B hücreleri ve Dentritik hücrelerden üretilir ve yine hedefinde B, T ve NK hücreleri vardır. Proinflatamatuvar sitokindir ve kemik iliği hücre farklılaşmasını, proliferasyonu tetikler (Turner ve ark., 2014). Hastalıklarla mücadele etmek için vücudu hazırlayan birçok farklı hücre tarafından üretilir ve TNF α ile benzer fonksiyonları paylaşabilir. En önemli fonksiyonu vücut sıcaklığını artırarak patojene özgül lenfosit klonların çoğalmasını ve dolayısıyla kazanılmış bağışıklık sisteminin çok daha çabuk harekete geçmesini sağlar (Goldsby ve ark., 2000). Bu genin susturulduğu farelere uygulanan LPS'ye karşı akut faz reaksiyonlarının gerçekleşmediği bildirilmiştir (Fantuzzi ve Dinarello, 1996).

2.3.8. Interleukin 6 (*IL-6*)

Doğal ve kazanılmış bağışıklık hücreleri tarafından salınan sitokinlerden olan IL-6'yı kodlayan gen koyunlarda 4. kromozom üzerinde bulunur, *IL-6* geni (ENSOARG00000012021), 3.97 kb uzunluğunda ve 5 ekzona sahiptir (<https://www.ensembl.org>, Erişim Tarihi: 20.05.2019). Etki ettiği yer karaciğer, etkileri ise akut-faz proteinlerinin (örn: C reaktif protein) üretimi ve vücut sıcaklığının artmasıdır. Akut faz yanıtını IL1, TNF ile beraber IL-6'da aynı zamanda başlatır. Bu yanıtta kompleman kısımlarının üretimlerinin yanı sıra doku harabiyetiyle ortama salınan maddelerin temizlenmesiyle ilişkili diğer proteinlerin üretimlerini de artırır (Delves ve ark., 2008). IL-6 enfeksiyona karşı hem lokal hem de sistemik doğal bağışıklık savunmasını harekete geçirir ve doğal bağışıklığı güçlendirir (Gabay ve ark., 2006).

2.3.9. Interleukin 10 (*IL-10*)

Koyunlarda 3.73 kb uzunluğunda ve 5 ekzona sahip olan *IL-10*'u kodlayan gen (ENSOARG00000006292) 12. kromozomda bulur (<https://www.ensembl.org>, Erişim Tarihi: 20.05.2019). Hücresel kaynağı CD8, T, Th2, B lenfositlere bağlı makrofaj hücreleridir. Bu gen makrofajlar üzerindeki Th1 sitokinlerinin, MHC sınıf II antijenleri ve yardımcı uyarıcı moleküllerin ekspresyonunu azaltır. Ayrıca B hücresi sağ kalımı, proliferasyonunu ve antikor üretimini arttırır. *IL-10*, NF- κ B aktivitesini bloke edebilir ve JAK-STAT sinyal yolunun düzenlenmesinde rol oynar (Carey ve ark., 2012). *IL-10*'un başlangıçta sitokin sekresyonunu, antijen sunumunu ve CD4 + T hücresi aktivasyonunu baskıladığı bildirilmiştir (de Waal Malefayt ve ark., 1991; Joss ve ark., 2000). Ancak daha sonra, *IL-10*'un, pro-inflamatuar sitokinlerden TNF α , IL-1 β , (Opp ve ark., 1995), IL-12, (Aste-Amezaga ve ark., 1998) ve IFN- γ (Varma ve Toliver-Kinsky, 2001) sekresyonlarının lipopolisakkariti (LPS) ve bakteriyel ürüne aracılık ettiği indüksiyonu inhibe ettiği belirlenmiştir (Opp ve ark., 1995; Aste-Amezaga ve ark., 1998; Varma ve Toliver-Kinsky, 2001).

2.3.10. İnterferon Gamma (Interferon Gamma, *IFN- γ*)

Koyunlarda *IFN- γ* 'ı kodlayan gen (ENSOARG00000001958) 3. kromozomda bulunur 8.02 kb uzunluğunda ve 4 ekzona sahiptir (<https://www.ensembl.org>, Erişim Tarihi: 20.05.2019). *IFN- γ* geni IFN düzenleyici faktör-3 (IRF-3) aktivasyonuna bağlı diğer genlerinin aktivasyonu Janus kinazları aktive ederler. Aktive olan Janus kinazlar transdüser ve transkripsiyon (STAT) sinyal proteinlerinin aktifleşmesini sağlayarak etkili antiviral savunma için gerekli olanlar dahil olmak üzere diğer genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu sağlar (Horvath, 2004). *IFN- γ* aslında minimal antiviral aktiviteye sahip ve Th1 sitokin yolunun başlıca immün düzenleme ürünü ve tetikleyicisidir (Oppenheim, 2013).

2.4. LPS ve LTA ile yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar

Bağıışıklık sisteminin uyarılması amacıyla *in vitro* çalışmalarda LPS ve LTA için uygulanan doz, uygulama yöntemi ve uygulanan türe göre çeşitlilik göstermektedir. Uygulama dozlarına göre incelenen *in vitro* çalışmalarda; beş farklı domuz ırkının farklı dokularından (akciğer, kan, kemik iliği) elde edilen makrofajlar kültüre edilerek 100 ng/mL LPS (*S. enterica*) ile uyarılmış ve makrofajların bu doza tepki verdiği bildirilmiştir (Kapetanovic ve ark., 2013). Bir başka çalışmada 24 saat kültüre edilen domuz PBMC hücrelerine (5×10^6) 1 µg/mL LPS (*E. coli* O111:B4, Sigma-Aldrich, Germany) uygulanması sonrası immun yanıt oluştuğu bildirilmiştir (Gao ve ark., 2010). Domuzlarda alveolar makrofajların kültüre edilmesi sonucu 2×10^6 hücre kültür ortamına 10 µg LPS (*E. coli* 055:B5, Sigma-Aldrich, Germany) ve 10 µg LTA (*S. aureus*, Sigma-Aldrich, Germany) uygulanmasında araştırılan genler açısından immun yanıt oluşturduğu bildirilmiştir (Çınar ve ark., 2012). Evcil (*Ovis aries*) ve yabani (*Ovis canadensis*) koyunlarda *M. haemolytica* enfeksiyonuna karşı polimorfonükleer lökositlerdeki (Polymorphonuclear leucocyte- PMN) IL-8 gen ekspresyon seviyesinin araştırıldığı bir çalışmada, elde edilen PMN hücrelerinden hazırlanan hücre kültürlerine *M. haemolytica*'den elde edilen LPS 1 µg/mL olarak uygulanmış ve doz etkin bulunmuştur (Herndon ve ark., 2010). Tavşanlarda solunum yolu epitel dokusuna *P. multocida*'nın etkisinin incelendiği bir çalışmada 1×10^8 hücre için 10 µg/mL LPS uygulanmış ve immun yanıt alındığı bildirilmiştir (Gallego ve ark., 2017). Düşük pH stresinin rat alveolar makrofajlarındaki proinflamatuar sitokin üretimi üzerine etkisinin incelendiği bir araştırmada 1,5 µg/mL LPS ve 30 µg/mL LTA uygulaması ile immun yanıt alındığı bildirilmiştir (Fernandez ve ark., 2013). Akciğer endotelyal hücrelerinin incelendiği bir araştırmada kültüre edilen hücrelere 10-30 µg/mL LTA uygulaması sonrası immun yanıt alındığı bildirilmiştir (Pai ve ark., 2012).

Yapılan *in vivo* çalışmalarda da uygulanan LPS ve LTA dozları ve uygulama yöntemleri farklılık göstermektedir. Koyunda endotokseminin etkilerini görmek için yapılan bir *in vivo* çalışmada LPS dozu saatte 4 µg/kg olarak belirlemiştir (Passmore ve ark., 2018). Domuzda akut respiratuar distres sendromu modeli oluşturmak için yapılan bir çalışmada ise LPS 50 µg/kg (*E. coli*, O55:B5, Sigma-Aldrich, Germany) olacak şekilde intravenöz olarak uygulanmış ve immun yanıt alındığı bildirilmiştir (Xu ve ark., 2017). Domuzlarda çevre ısı ve bağışıklık sistemi arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir

çalışmada LPS (*E. coli*, O111:B4, Sigma-Aldrich, Germany) ile bağışıklığın etkinleştirilmesi için her bir domuza intraperitoneal olarak 150 µg/kg LPS uygulanmıştır (Carroll ve ark., 2012). Farelerde akciğer dokusundaki TLR1, 2, 4, 6 ve 9'dan bazılarının RNase protection assay yöntemi ile mRNA ve tagman prob ile gen ekspresyon seviyelerinin incelendiği bir çalışmada LPS dozu 20 mg/kg, LTA dozu ise 15 mg/kg intraperitoneal olarak uygulanmıştır (Ehrentraut ve ark., 2011). Yine farelerde miRNA array analizi yapıldığı bir çalışmada, her bir fare grubuna 10, 100, 1000 µl LTA (*B. subtilis* (katolog no: L3265), *S. faecalis* (L4015), ve *S. aureus* (L2515)) ve 100 µl PBS ile sulandırılarak intraperitoneal olarak uygulanmıştır (Hsieh ve ark., 2013). Aynı şekilde 10, 100, 1000 µl LPS (*E. coli* 026:B6 (L3755), *K. pneumonia* (L1519), *S. enterica enteritidis* (L6761), *S. marcescens* (L6136), ve *P. aeruginosa* (L9143)) intraperitoneal şekilde uygulandığı belirtilmiştir (Hsieh ve ark., 2013). Domuzlarda üreme ve solunum sendromu virusu (reproductive and respiratory syndrome virus, PRRS) ile endotoksin olan LPS'nin multifaktöriyel solunum hastalıklarında model oluşturulması çalışmasında LPS (*E. coli* O111:B4) dozu 20 µg/kg olarak belirlenmiş ve intratrakeal olarak uygulanmıştır (Van Gucht ve ark., 2004). Domuzlarda büyümenin immun sistemin uyarılması ile ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada LPS dozu 60 µg/kg intramuskuler olarak uygulandığı bildirilmiştir (Rakhshandeh ve de Lange, 2012).

İmmunolojik araştırma ve toksikoloji uygulamalarında yaygın olarak kullanılan PBMC'ler monosit/makrofaj, dentritik hücreler, B ve T lenfositleri ve NK hücrelerinden oluşmaktadır (Janeways ve ark., 2001). PBMC hücrelerinin memeli bağışıklık sisteminde ana hücreler olması sebebiyle çevresel kanın kimyasallara en çok maruz kaldığı ve bu etkenlere verilen tepkilerin en hızlı ölçülebileceği materyal olduğu için bağışıklık ile ilgili çalışmalarda tercih edilir (Pourahmad ve Salimi, 2015). Bu hücreler EDTA'lı tüpe alınan taze kandan ficoll–histopaque gibi kimyasallar ile hücrelerin yoğunluklarına göre ayrıldığı santrifüj yöntemi ile izole edilmektedir (Pourahmad & Salimi, 2015).

In vivo olarak planlanan bu tez çalışmasında 3 aylık Akkaraman ırkı erkek kuzulara solunum yolu ile uygulanan LTA, LPS ve LTA+LPS karışım dozlarının PBMC'lerde bulunan ve doğal bağışıklık sisteminde görev alan *TLR2*, *TLR4*, *MYD88*, *TRAF6*, *NF-κβ*, *TNFα*, *IL-1β*, *IL-6*, *IL-10*, *IFN-γ* genlerine ait ekspresyon seviyelerinde 24. saat ve 7. gün zaman dilimlerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvan Materyali

Bu tez çalışması, Erciyes Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (EÜHADYEK) 15.02.2017 tarih ve 17/009 karar nolu izini ile yapılmıştır. Çalışmanın hayvan materyalini Erciyes Üniversitesi, Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden (ERÜTAM) alınan ve merkeze ait çiftlikte aynı bakım ve besleme şartlarında yetiştirilen, sütten kesilmiş üç aylık toplam 28 baş Akkaraman ırkı erkek kuzu oluşturmuştur. Kuzulara doğum sonrası ticari olarak satılan Ultrachoice 8 marka aşısı uygulanmıştır.

3.2. Çalışmada Kullanılan Cihaz Listesi

Tablo 3.1. Kullanılan cihazlar ve markaları

Demirbaş Cihazlar	Markası
Termometre	Microlife
Soğutmalı Santrifüj	Hettich 320, Gyrozen 1730R
Thermal Cycler	Sansequence, Bio-Rad T-100
qRT-PCR Cihazı	Roche Light Cycler Nano 1.0.
Vorteks	Lab Companion
Mini-santrifüj	Biosan
Otomatik Mikropipet (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Gilson
Jel Elektoroforez Sistemi	Thermo
Jel Görüntüleme Sistemi	Gel-logic 200 Imaging System
Derin Dondurucu (-20°C)	Vestel 210 lt
Buz Dolabı (+4°C)	Vestel
-80°C Soğutucu	New Brunswick, U570 Premium
Mikrodalga Fırın	Premier
Distile Su Cihazı	GFL 2004
Doğru akım Güç Kaynağı	Consort EV215
Hassas Terazî	Ohaus
pH Metre	Metler Toledo
Isıtıcı Blok	Bioer
Spektrofotometre	BioSpec-nano

3.3. Hayvanlara Ait Verilerin Kaydı, Deneysel Uygulama ve Örneklerin Toplanması

3.3.1. Hayvanların gruplandırılması ve canlı ağırlık ölçümü

Deneysel uygulama için seçilen Akkaraman ırkı kuzular canlı ağırlıkları ölçülerek her gruba 7'şer hayvan düşecek şekilde dört gruba ayrılmış ve her grup farklı padoklara yerleştirilmiştir. Kullanılan hayvan sayısı istatistiki olarak Power Test analizine göre belirlendi. Hayvanların canlı ağırlıkları çiftliğe ait küçükbaş canlı hayvan tartım cihazı ile ölçüldü. Gruplar lipoteikoik asit (LTA) uygulaması için LTA grubu (n=7), lipopolisakkarit (LPS) uygulaması için LPS grubu (n=7), LTA + LPS karışım grubu (n=7) ve en son kontrol grubu (n=7) olarak isimlendirildi. Her gruptaki hayvanın birbirleriyle karışmamaları için farklı renk spreylere boyalar ile numaralandırıldı.

3.3.2. Deneysel uygulama

LTA, LPS, LTA+LPS ve sulandırıcı uygulamaları 0. gün yapıldı. Deneysel uygulama için 0. gün tüm hayvanların canlı ağırlıkları ölçülerek, canlı ağırlıklarına göre LTA ve LPS dozajları belirlendi. Liyofilize halde bulunan LTA ve LPS kimyasalları fosfat tamponlu tuz solüsyonu (Phosphate buffered saline, PBS, Sigma-Aldrich, Germany) ile sulandırıldı.

3.3.2.1. LTA ve LPS solüsyonlarının hazırlanması

Deneysel uygulama için; LTA (L2515-25mg-*S.aureus*- Sigma-Aldrich, Germany) 5 ml fosfat bazlı tuz çözeltisi (Phosphate-Buffered Saline, PBS) ile sulandırıldı. LTA'nın çalkalanarak çözünmesi sağlandı. Böylece 1ml'de 5000 µg olacak şekilde çözündürülen LTA her bir kuzu için 1 kg'a 50 µg olacak şekilde uygulandı.

LPS uygulamasında ise LPS (L2880-100 mg-*E. coli* 055-B5, Sigma-Aldrich, Germany) önce 5 ml PBS ile sulandırıldı. Daha sonra stok solüsyondan 1 ml alınıp 3 ml PBS daha eklenerek 1 ml'de 5000 µg olacak şekilde seyreltik çözelti hazırlandı. Elde edilen solüsyondan yine her bir kuzu için 1 kg canlı ağırlığa 20 µg LPS olacak şekilde uygulandı.

LTA+LPS karışım uygulamasında 1 kg canlı ağırlığa 50 µg LTA, 1 kg canlı ağırlığına 20 µg LPS olacak şekilde hesaplanarak bir arada uygulandı. Tüm gruplara ait kimyasallar, hayvanlara intranazal yoldan hesaplanan miktarlarda 1000 µl'lik mikropipet yardımı ile uygulandı. Uygulama sonrasında uygulamanın başarısından emin

olmak için kuzular kontrol altında tutuldu. Kontrol grubuna ise 250 µl PBS intranazal yolla uygulandı. Dozaj belirlemede koyunda benzer *in vivo* çalışma bulunamaması nedeniyle LPS için Van Gucht ve ark. (2004) ile Wyns ve ark. (2015)'nin domuzlarda *in vivo* olarak yapmış olduğu deneysel çalışmalar doğrultusunda koyuna göre hesaplanarak uygulanmıştır. LTA dozaj hesaplaması da Atanasova ve ark. (2012)'nin domuzlarda intratrakeal LTA dozaj uygulama aralığı esas alınarak belirlenmiştir.

Uygulama sonrası hayvanlardan 24. saat ve 7. günde vücut sıcaklığı ve nabız ölçümleri alındı. Vücut sıcaklığı ölçümü rektumdan elektronik termometre (Microlife, Taiwan) ile yapıldı. Kalp atım sayısı küçükbaş hayvanlar için kullanılan stetoskop ile tespit edilerek kaydedildi.

3.3.3. Kan örneklerinin alınması

Çalışmada kullanılan kuzulara intranazal LTA, LPS ve LTA+LPS karışımının uygulanması sonrasında 24. saatte ve 7. günde *Vena jugularis*'ten 10 ml'lik K₃EDTA'lı tüplere kanlar alındı. Alınan kanlar aynı gün soğuk zincir koşullarında Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarına ulaştırılarak örneklerden PBMC izolasyonları yapıldı.

3.4. PBMC İzolasyonu

1. PBS çözeltisi: 100 ml PBS'e 2mM EDTA eklenip çözündürülerek, pH 7,2'ye ayarlanarak ve +4 °C'de saklandı.
2. 2,5 ml total kan alınarak 15 ml'lik falkon tüplerine kondu ve her bir örneğin üzerine 5 ml PBS eklendi.
3. 15 ml'lik falkon tüplerine 4 ml histopak eklendi.
4. 4 ml histopak üzerine 2,5 ml kan+5 ml PBS karışımı eklendi.
5. Karışım 25 °C derecede 400 g'de 30 dakika (Hettich 320, Germany) no-brake ayarlanarak santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası her bir örnekte süpernatant mikropipetle uzaklaştırıldı.
7. Örnekler için beyaz renkli PBMC hücreleri dikkatlice alınarak daha önce etiketlenmiş 15 ml'lik falkon tüplere aktarıldı.
8. Temiz falkon tüplere alınan her bir örnek üzerine 12 ml PBS eklenip, yavaşça alt üst edilerek yıkanması sağlandı.
9. Hazırlanan karışım 300 g'de 25 °C derecede 10 dakika santrifüj edildi.

10. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılıp, pellet PBS'ten arındırıldı (www.miltenybiotec.com).
11. İzole edilen PBMC pelleti üzerine 1 ml trizol eklenip alt üst edilip hızlıca -80 °C derecelik soğutucuda RNA izolasyonuna kadar muhafaza edildi.

3.5. RNA İzolasyonu

Trizolde bekletilen örnekler oda sıcaklığına alınarak çözünmesi sağlandı. Çözünme işleminden sonra RNA izolasyonu için aşağıdaki basamaklar uygulandı.

1. Çözündürülen PBMC örneklerinin üzerine 0,2 ml kloroform eklenerek, 2,5 ml'lik enjektör ile hücreler alt üst edildi.
2. Parçalanmış hücreler 30 dakika 4°C'de 12 000 g'de santrifüj (Gyrozen 1730R, Korea) edildi.
3. Santrifüj sonrası üst faz mikropipetle alınarak 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı.
4. Üzerine 0,5 ml isopropanol eklenerek alt üst edildi.
5. Karışım +4°C'de 30 dakika 14 000 g'de santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı.
7. Peletin üzerine 1 ml %70'lik etanol eklenerek 14 000 g'de 5 dakika +4°C'de santrifüj edildi.
8. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı.
9. Peletin üzerine 1 ml %99'luk etanol eklenerek altüst edildi.
10. Tüpler 14 000 g'de 30 dakika +4°C'de santrifüj edildikten sonra süpernatant dökülerek tüpün ters çevrilerek kuruması sağlandı.
11. Pelet kuruduktan sonra 1,5 ml'lik ependorf tüplere %70'lik etanol eklendi.
12. 14 000 g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra sıvı kısım uzaklaştırılarak etanolün kuruması beklendi.
13. Tüpler kurutulduktan sonra 30 µl nükleazdan arındırılmış su eklenerek peletlerin çözünmesi sağlandı (Farrell, 2010).
14. İzole edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflıkları BioSpec-nano (Shimadzu Ltd, Japan) spektrofotometre ile ölçüldü.
15. RNA'lar %1'lik agaroz jel elektroforezde yürütüldü. Kuyucuklarda gözlenen DNA kalıntılarını yok etmek için DNase uygulandı.

3.6. DNase Uygulaması

1. DNase uygulaması için; 8 µl RNA üzerine, 1 µl 10X reaksiyon buffer ve 1 µl DNase eklenerek (DNase I recombinant - Sigma-Aldrich , Germany) oda ısısında 15 dakika inkübe edildi. Uygulama DNase I recombinant - Sigma-Aldrich kit protokolüne göre yapılmıştır.
2. İnkübasyon sonrası tüplere 1 µl DNase stop solüsyonu eklenerek PCR (Bio-Rad, ABD) cihazında 70 °C’de 10 dakika inkübe edildi.
3. DNase uygulaması sonrasında RNA örnekleri %1’lik agaroz jelde 70 V– 300 mA’de 40 dakika yürütüldü.
4. RNA’lara ait 18S ve 28S ribozomal RNA bantları düzgün bir şekilde görüntüledi.
5. Elde edilen RNA’lar -80 °C derecelik soğutucuda cDNA sentez safhasına kadar muhafaza edildi.

3.7. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için Roche Transcriptor High Fidelity cDNA sentez kiti (Sigma-Aldrich, Germany) önerilen protokol doğrultusunda kullanıldı. Protokole göre; 1 µl Anchored-oligo (dT), 2 µl Random hexamer, 2000 ng RNA ve toplamda 11,4 µl reaksiyon solüsyonu olacak şekilde nükleazdan arındırılmış su eklenerek 10 dakika 65°C’de inkübe edildi. İnkübasyon aşaması esnasında bir sonraki aşamada kullanılacak olan miks II hazırlandı. Bunun için tampon solüsyon’dan (Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase 5× Reaksiyon Buffer) 4 µl, Protektör İnhibitör (40U/mL) 0,5 µl, Deoksiniükleotid Miks (her biri 10 mM) 2 µl, DTT 1 µl, Transcriptor High Fidelity Reverse Transkriptaz enzimi 1,1 µl eklendi. İnkübasyonun sona ermesini takiben her bir örneğe toplam 8,6 µl’lik miks II, eklendi. Pipetleme işlemi sonrasında 30 dakika 50°C’de, 5 dakika 85°C’de inkübasyon aşamaları gerçekleştirildi. İnkübasyon işlemi tamamlanmasından sonra toplam 20 µl son hacimde sentezlenen her bir stok cDNA üzerine 80 µl nükleazdan arındırılmış su eklenerek vortekslenen örnekler çalışmada kullanılmak üzere -20 °C derece soğutucuda muhafaza edildi.

3.8. Primer Dizaynı

Gen ekspresyonu seviyelerini qRT-PCR reaksiyonu ile belirlemek amacı ile *TLR2*, *TLR4*, *MyD88*, *TRAF6*, *NF-κβ*, *TNFα*, *IL-1β*, *IL-6*, *IL-10*, *IFN-γ* ve House-keeping

genler olarak belirlenen *GAPDH* ve *β -actin* genlerine ait primerler (Tablo 3.2), Primer-3, ENSEMBL ve BLAST web programları kullanılarak dizayn edildi.



Tablo 3.2. Ekspresyon seviyesi belirlenmesi istenen genlere ait primerler, PCR uzunlukları, erime ısıları, Ensemble ID'leri

Genler	Primer Sekansı	Amplikon Büyüküğü	TM	Ensemble ID
<i>TLR2</i>	F: TCTCCCACTTCCGTCTCTTT R: TGATCTTCCGCAGCTTACAG	111 bç	60°C	ENSOART0000 0016373.1
<i>TLR4</i>	F: AACTTCTCCAGGTTCCCAGA R: AGGGTTTCCCGTCAGTATCA	123 bç	58°C	ENSOARG000 00005792
<i>MyD88</i>	F: ATGGTGGTGGTTGTCTCTGA R: TGCTGGGGAAGTCTTTCTTC	145 bç	58°C	ENSOARG000 00001031
<i>TRAF6</i>	F: TGGAAAGCAAGTACGAGTGC R: GGACATTTGTGACCTGCATC	127 bç	63°C	ENSOARG000 00019079
<i>NF-κβ</i>	F: ATCTGAGCATTGTGCGACTG R: AGCCAGCTGTCTTGTCATT	159 bç	58°C	ENSOARG000 00000483
<i>TNFα</i>	F: TGGTTCAGACACTCAGGTCATC R: AGCGCTGATGTTGGCTACAA	77 bç	60°C	ENSOARG000 00008333
<i>IL-1β</i>	F: AGAGCAAAAATCCCTGGTG R: ACGAAGCTCATGCAGAACA	102 bç	60°C	ENSOARG000 00020866
<i>IL-6</i>	F: AGCACATCGTCGACAAAATC R: ATTGAACCCAGATTGGAAGC	149 bç	60°C	ENSOARG000 00012021
<i>IL-10</i>	F: GAAGGACCAACTGAACAGCA R: CCTCCAGGTAAACTGGATCA	107 bç	60°C	ENSOARG000 00006292
<i>IFN-γ</i>	F: GGAGGACTTCAAAAGGCTGA R: GGTTAGATTTTGGCGACAGG	110 bç	60°C	ENSOARG000 00001958
<i>GAPDH</i>	F: ACCCCTTCATTGACCTTCAC R: TTCCATTGATGACGAGCTTC	114 bç	60°C	ENSOART0000 0006848
<i>β-actin</i>	F: TCCCTGGAGAAGAGCTACGA R: TAGAGGTCCTTGCGGATGTC	179 bç	62°C	ENSOART0000 0003275

TM: Erime ısıtı

3.9. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR)

Roche Light Cycler Nano 1.0. cihazı için kullanılan Roche Fast Start Green Master PCR kit (Sigma-Aldrich, Germany) protokolü uygulandı. Ekspresyon seviyesi belirlenecek her bir gene ait 10 µM forward ve reverse primer, 2000 ng cDNA ve nükleazdan arındırılmış su ile 10 µl'ye tamamlanan miks steril striplere konuldu. Miks üzerine 10 µl

Fast Start Green Master eklenerek cihaza yüklendi. Her gen için tüm örneklerle iki tekrar ekspresyon analizi uygulandı.

Hazırlanan miks cihaza yüklenerek, qRT-PCR protokolü 95°C’de 10 dak (5 °C/sn ramp), 95°C ‘de (58-63) °C’den 72 °C’ye touchdown ve 95°C’de 30 sn 45 döngü olacak şekilde düzenlendi. Erime ısı 65°C’den 95°C’ye 0.1°C/sn olacak şekilde ayarlandı.

3.10. Jel-Elektroforez İşlemi

Jel-elektroforez işlemi için tampon solüsyon olarak Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) solüsyonu hazırlandı. TBE solüsyonu için; 54 gr Tris, 27,5 gr Borik Asit, 20 ml 0,5 M EDTA (pH:8) hazırlanarak 1000 ml dH₂O’da çözündürüldü. Konsantrasyonu 5 X olarak hazırlanan solüsyon dH₂O ile 1 X’e seyreltilerek kullanıldı. Elde edilen qRT-PCR ürünleri %1’lik agaroz jel elektroforezi ile görüntüledi. Jel için 1 gr agaroz (Prona BASICA LE, İspanya) 100 ml 1X TBE solüsyonunda mikrodalgada çözündürülerek (içerisine 0.5 µl Ethidium Bromür eklenerek) uygun jel tanklarında donmaya bırakıldı. Donmuş olan jel, elektroforez tampon solüsyonuna alınarak, örnekler 0,5 µl yükleme boyası (Loading Dye) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. İlk kuyucuğa 100 bp aralıklı marker ve son kuyucuğa ise negatif kontroller yüklendi. Baz uzunluğuna göre voltaj ve süre ayarlaması yapılarak yürütme işlemi tamamlandı. Bu yürütme işleminde cihaz 70 V’a ayarlanmıştır. Yürütme sonrası jel, görüntüleme sisteminde görüntüledi.

3.11. İstatistiksel Analiz

Bu tez çalışmasının verilerinin değerlendirilmesinde kullanılan istatistik analizleri TURCOSA beta istatistik (Kayseri, Türkiye) yazılım programı ile hesaplandı. Ekspresyon verilerindeki kat değişim (mRNA ekspresyon seviyesi) değerleri hem manuel olarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak ve Schmittgen, 2001) metoduna göre hem de gen ekspresyonu istatistik hesaplamalarında kullanılan REST.2009 (Pfaffl ve ark., 2002) istatistik programı ile hesaplandı. Gen ekspresyon analizleri için normalizasyon *GAPDH* ve *β-actin* referans genlerinin geometrik ortalaması (Vandesompele ve ark., 2002) alınarak yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Hayvanların Canlı Ağırlık, 24. saat ve 7. gün Vücut Sıcaklığı ve Nabız Ölçümleri

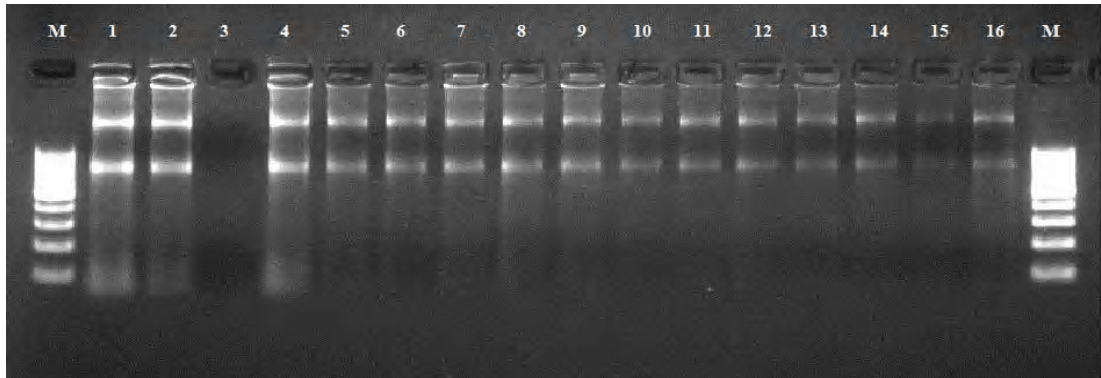
Uygulama yapılan hayvanlara ait canlı ağırlık ölçüm değerleri, 24. saat ile 7. güne ait vücut sıcaklığı ve nabız sayısı bulguları Tablo 4.1.'de belirtilmiştir.

Tablo 4.1. Canlı ağırlık, 24. saat ve 7. gün vücut sıcaklığı ve nabız ölçüm verileri

Gruplar	CA (kg)	VS 24. Sa (°C)	VS 7.G (°C)	NS 24. Sa	NS 7. G
LTA (n=7)	30.94±4.8	39.77±0.3	39.83±0.2	136±13	120±22
LPS (n=7)	46.94±1.5	39.71±0.2	40.37±0.3	115±08	147±24
LTA+LPS (n=7)	24.44±4.3	40.00±0.2	39.89±0.3	120±21	111±21
Kontrol (n=7)	23.79±2.7	39.76±0.4	40.04±0.5	101±16	94.0±09

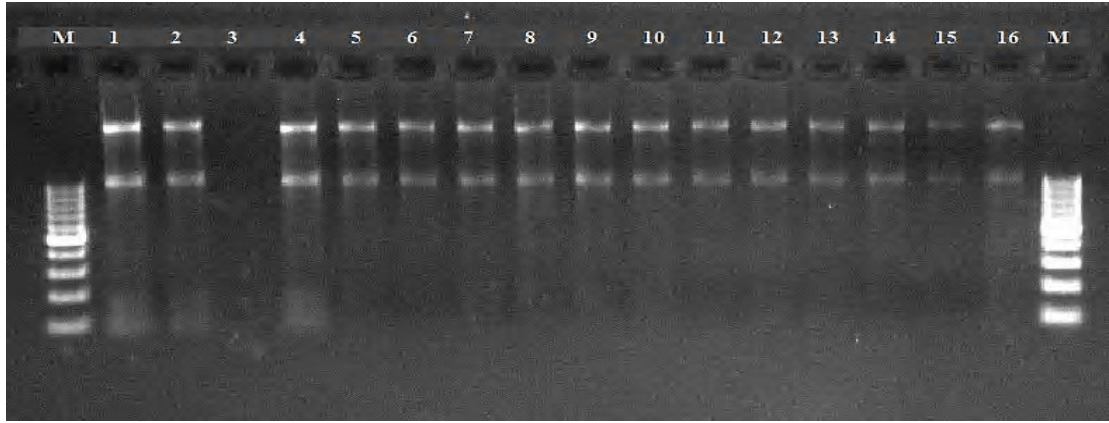
CA: Canlı ağırlık, VS: Vücut sıcaklığı, NS: Nabız sayısı

4.2. İzole edilen RNA'lar ve DNase uygulaması sonrası bulgular



Şekil 4.1. İzole edilen RNA'lara ait 18S ve 28S banlarının %1'lik jel elektroforez işlemi sonrası görüntüsü. M: 100 bç marker; 1-16: RNA örnekleri.

DNase uygulaması sonrasında RNA örnekleri %1'lik agaroz jel elektroforezde yürütüldü. 18S ve 28S bantlarının bir bütün halinde olduğu gözlemlendi. DNA kalıntılarının ise yok olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. İzole edilen RNA'ların DNase uygulaması sonrası %1'lik jel elektroforez görüntüsü. : 100 bç marker; 1-16: Dnase uygulanmış RNA örnekleri.

DNase uygulaması sonrası RNA'ların konsantrasyon ve saflık oranı ortalama ve standart sapma bulguları Tablo 4.2'de belirtilmiştir.

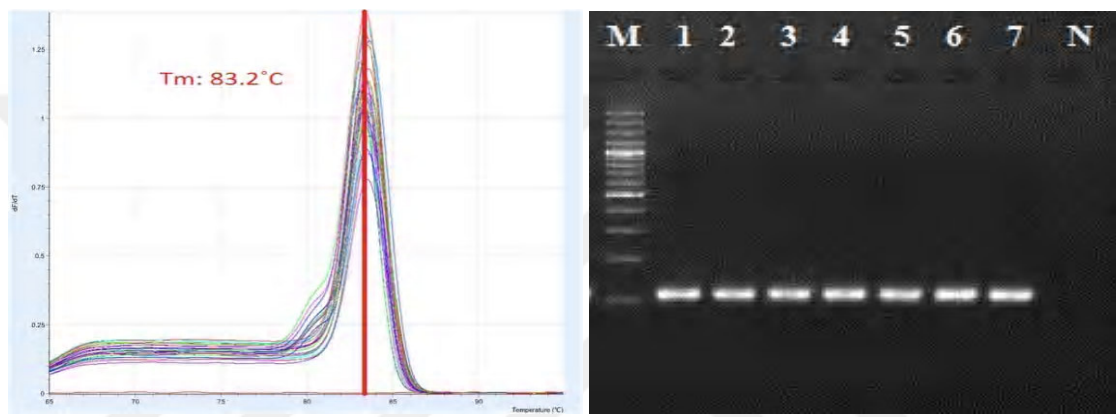
Tablo 4.2. DNase uygulaması sonrası RNA konsantrasyonlarına ait ortalama ve standart sapma verileri

Özellik	RNA Konsantrasyon (ng/μL)	RNA Saflık Oranı (A260/280)
LTA (24. saat)	36.711±22.856	1.98±0.19
LPS (24. saat)	24.195±5.732	1.99±0.04
LTA+LPS (24. saat)	42.314±23.92	2.02±0.09
Kontrol (24. saat)	58.506±35.308	1.99±0.11
LTA (7. gün)	55.996±8.683	1.93±0.12
LPS (7. gün)	39.726±21.507	1.96±0.15
LTA+LPS (7. gün)	37.239±24.746	1.90±0.18
Kontrol (7. gün)	46.073±23.274	1.99±0.16

4.3. qRT-PCR Sonrası mRNA ekspresyon verileri

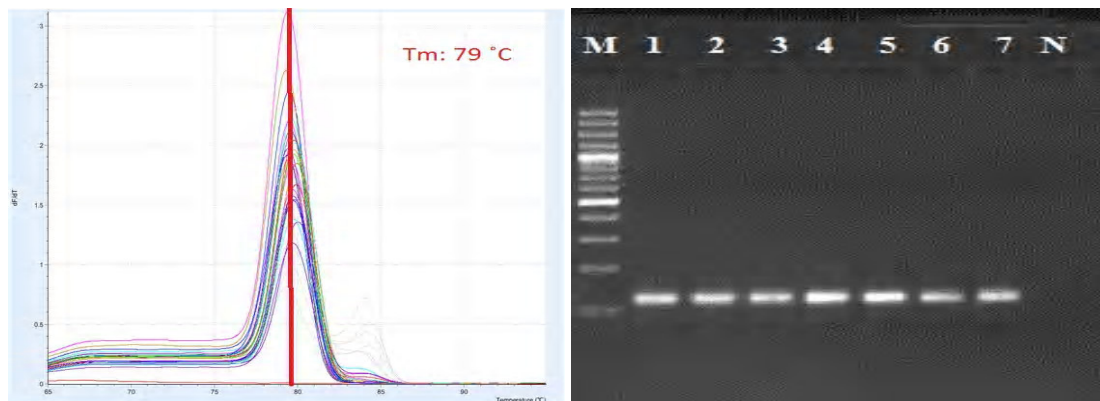
qRT-PCR işlemi sonrası *GAPDH*, *β -actin*, *TLR2*, *TLR4*, *MyD88*, *TRAF6*, *TNF α* , *NF- κ B*, *IFN- γ* , *IL-1 β* , *IL-10* genlerine ait erime sıcaklığının belirlendiği pik (melting T_m) ve %2'lik jel elektroforez görüntüleri elde edildi. *IL-6* geninde cDNA yetersizliği sebebiyle tüm örneklerle ait bir tekrar çalışıldığı için ekspresyon verileri analize dahil edilemedi.

TLR2 genine ait erime sıcaklığının 83,2°C olarak belirlenmiştir ve bu gene ait 111 bç'nin görüntülediği %2'lik jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.3'de belirtilmiştir.



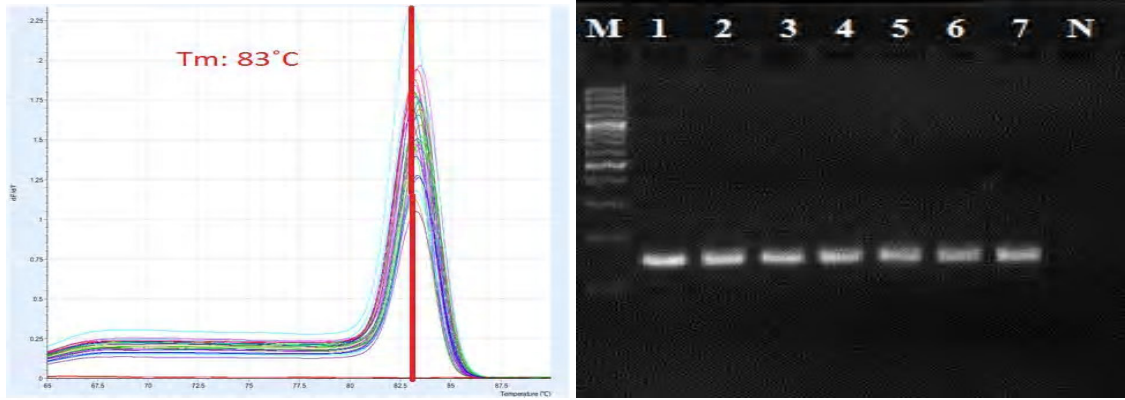
Şekil 4.3. *TLR2* genine ait erime sıcaklığının belirlendiği pik grafiği ve jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bç'lik marker. 1-7: 111 bç; N: Negatif kontrol).

TLR4 genine ait erime sıcaklığının 79°C olarak belirlenmiştir ve bu gene ait 123 bç'nin görüntülediği %2'lik jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.4'te belirtilmiştir.



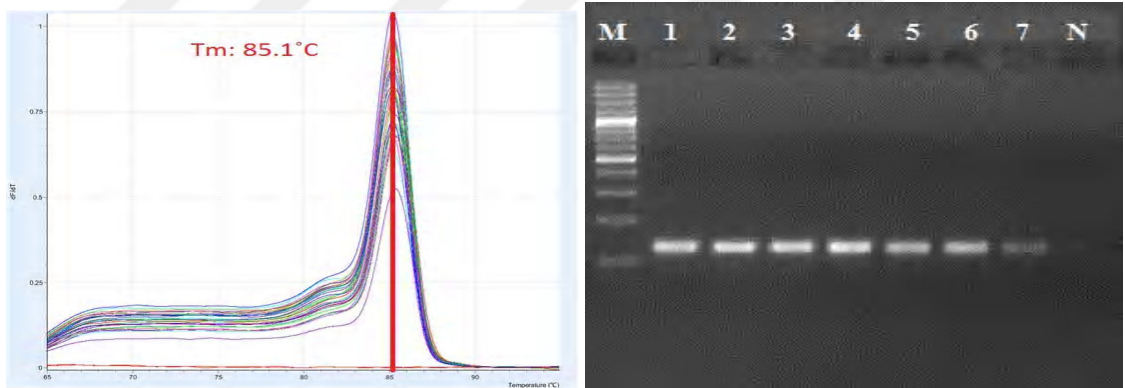
Şeki 4.4. *TLR4* genine ait erime sıcaklığının belirlendiği pik grafiği ve jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bç'lik marker; 1-7: 123 bç; N: Negatif kontrol).

MyD88 genine ait erime sıcaklığının 83°C olarak belirlenmiştir ve bu gene ait 145 bp'nin görüntülediği %2'lik jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.5'de belirtilmiştir.



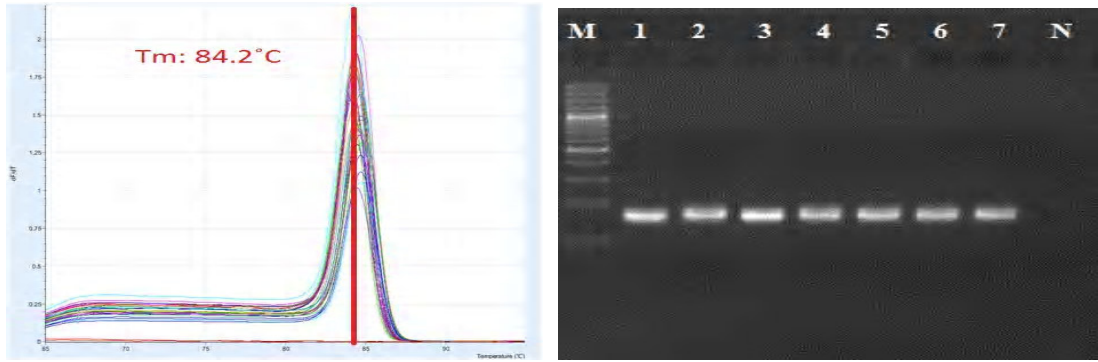
Şekil 4.5. *MyD88* genine ait erime sıcaklığının 83°C belirlendiği pik grafiği ve jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bp'lik marker; 1-7: 145 bp; N: Negatif kontrol).

TRAF6 genine ait elde erime sıcaklığının 85,1°C olarak belirlenmiştir ve bu gene ait 127 bp'nin görüntülediği %2'lik jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.6'da belirtilmiştir.



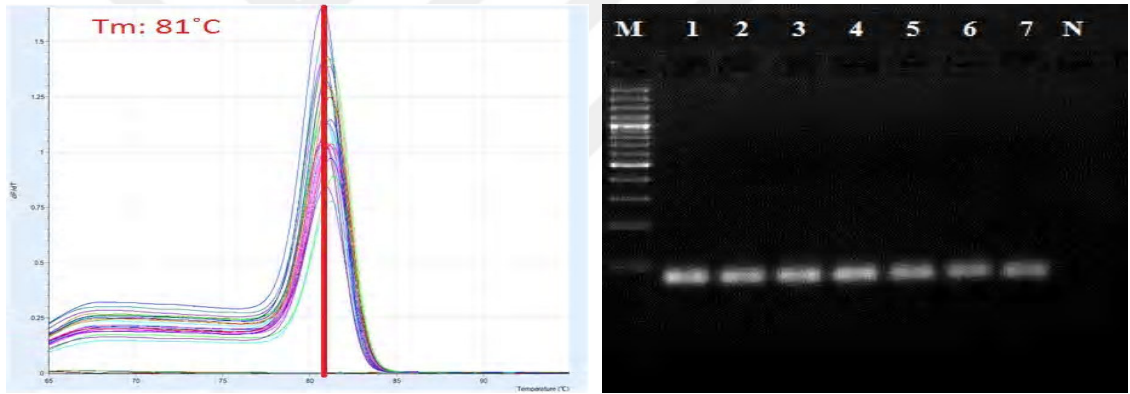
Şekil 4.6. *TRAF6* genine ait erime sıcaklığının 85,1°C belirlendiği pik grafiği ve jel elektroforez görüntüsü (M:100 bp'lik marker; 1-7: 127 bp; N: Negatif kontrol).

NF- κ B genine ait erime sıcaklığının 84,2°C olarak belirlenmiştir ve bu gene ait 159 bp'nin görüntülediği %2'lik jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.7'de belirtilmiştir.



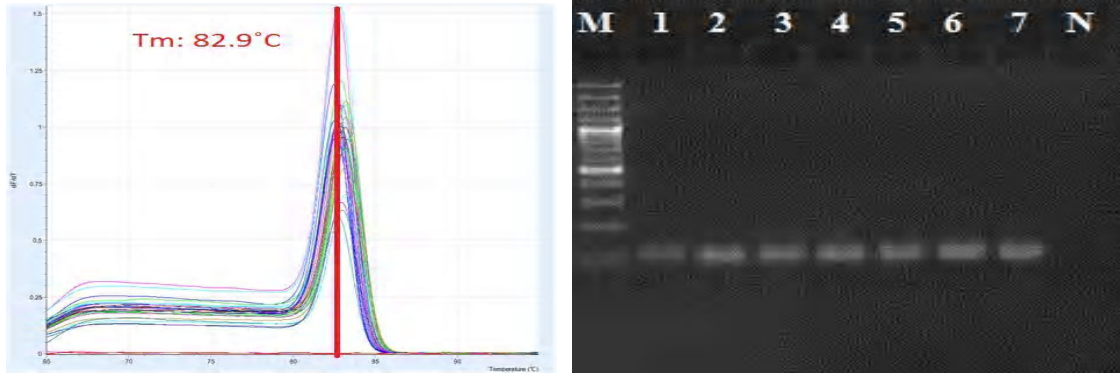
Şekil 4.7. *NF-κβ* genine ait erime sıcaklığının 84,2°C belirlendiği pik grafiği ve jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bç'lik marker; 1-7: 159 bç; N: Negatif kontrol).

TNFα genine ait erime sıcaklığının 81°C olarak belirlenmiştir ve bu gene ait 77 bç'nin görüntülediği %2'lik jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.8'de belirtilmiştir.



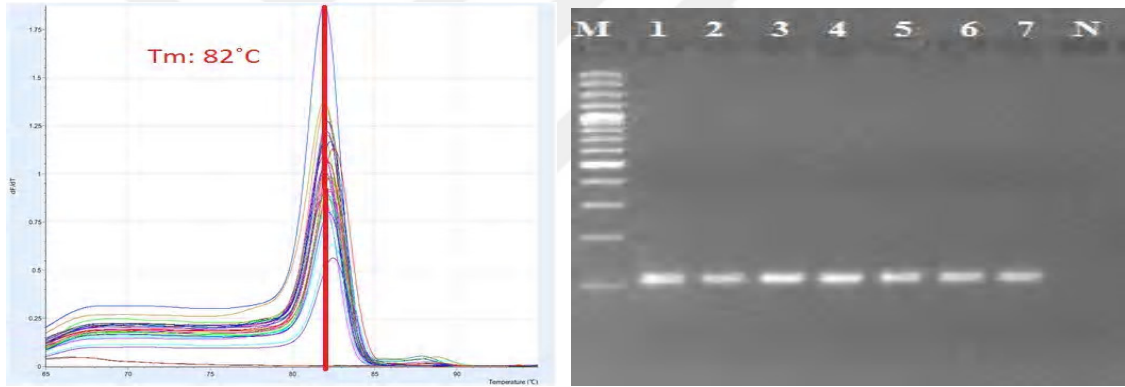
Şekil 4.8. *TNFα* genine ait erime sıcaklığının 81°C belirlendiği pik grafiği ve jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bç'lik marker; 1-7: 77 bç; N: Negatif kontrol).

IL-1β genine ait erime sıcaklığının 82,9°C olarak belirlenmiştir ve bu gene ait 102 bç'nin görüntülediği %2'lik jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.9'da belirtilmiştir.



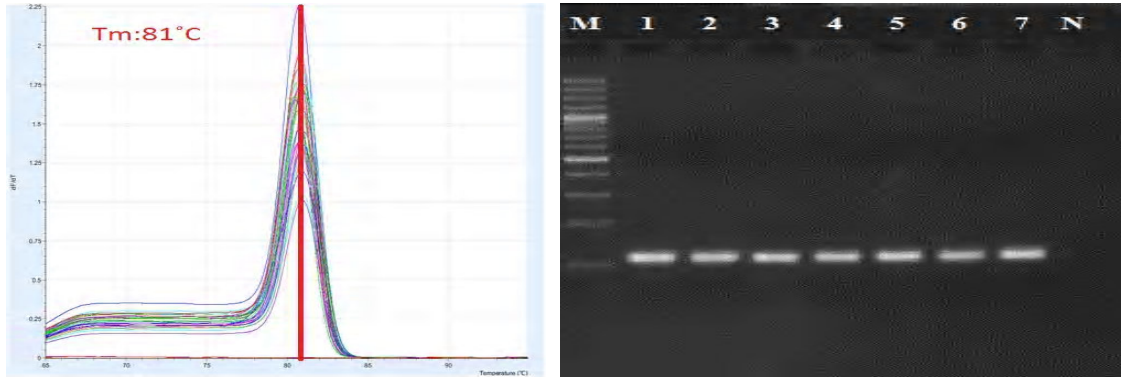
Şekil 4.9. *IL-1 β* genine ait erime sıcaklığının 82,9°C belirlendiği pik grafiği ve jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bç'lik marker; 1-7: 102 bç; N: Negatif kontrol).

IL-10 genine ait elde erime sıcaklığının 82°C olarak belirlenmiştir ve bu gene ait 107 bç'nin görüntülediği %2'lik jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.10'da belirtilmiştir



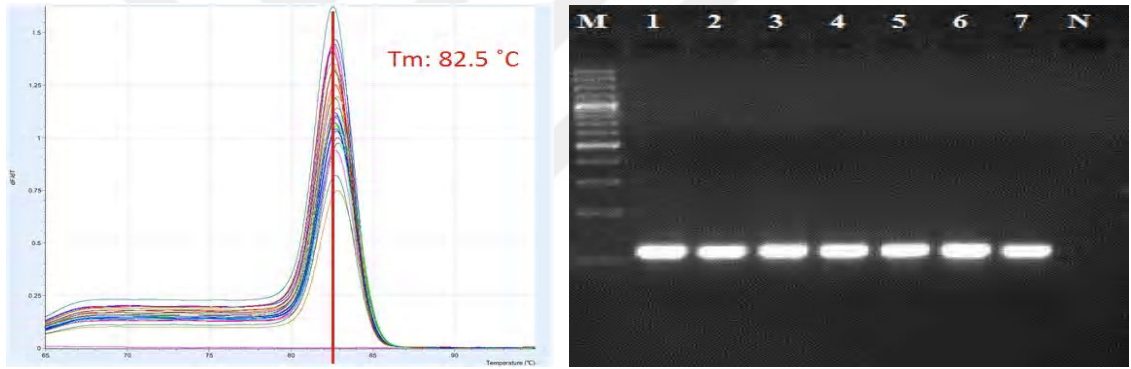
Şekil 4.10. *IL-10* genine ait erime sıcaklığının 82°C belirlendiği pik grafiği ve jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bç'lik marker; 1-7: 107 bç; N: Negatif kontrol).

IFN- γ genine ait erime sıcaklığının 81°C olarak belirlenmiştir ve bu gene ait 110 bç'nin görüntülediği %2'lik jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.11'de belirtilmiştir.



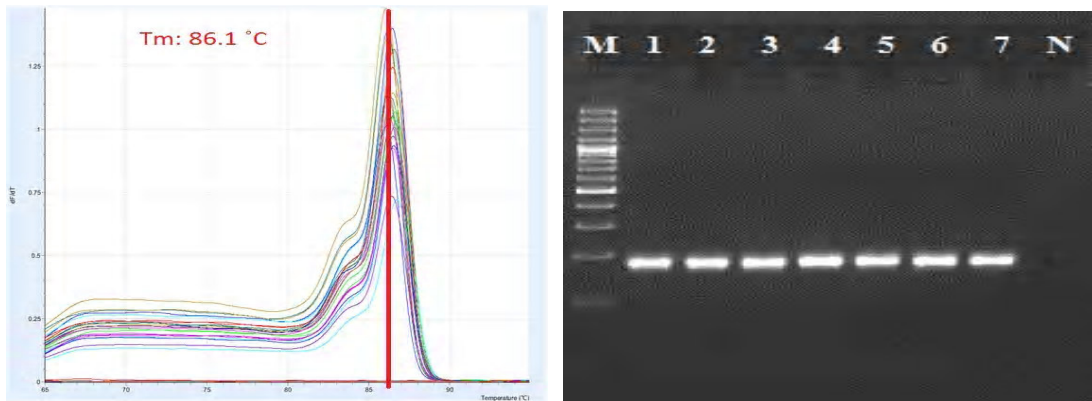
Şekil 4.11. *IFN- γ* genine ait erime sıcaklığının 81°C belirlendiği pik grafiği ve jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bç'lik marker; 1-7: 110 bç; N: Negatif kontrol).

GAPDH genine ait erime sıcaklığı 82,5°C olarak belirlenmiştir ve bu gene ait 114 bç'nin görüntülediği %2'lik jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.12'de belirtilmiştir.



Şekil 4.12. *GAPDH* genine ait erime sıcaklığının belirlendiği pik grafiği ve jel elektroforez görüntüsü (M:100 bç; 1-7: 114 bç; N: Negatif kontrol).

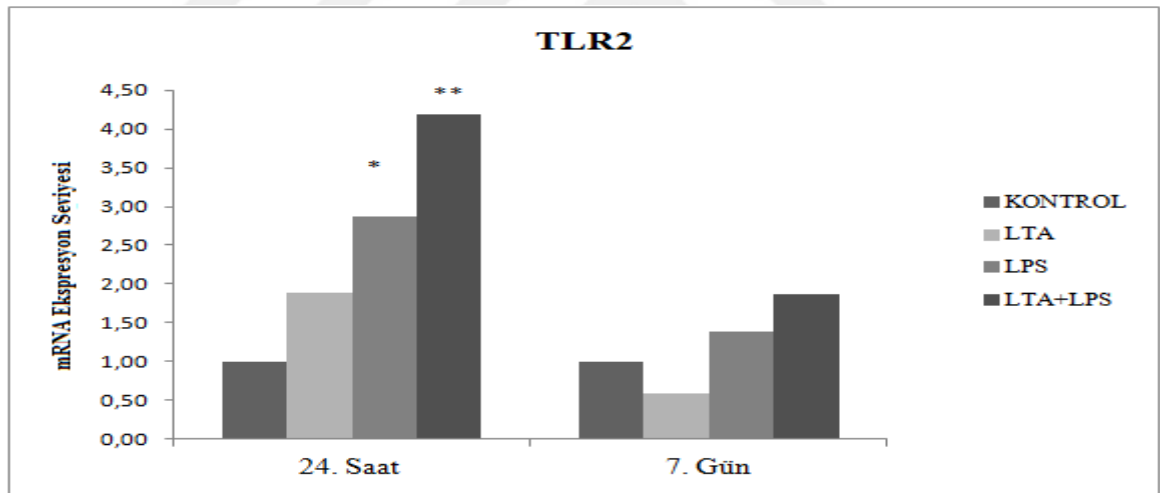
B-actin genine ait erime sıcaklığı 86,1°C olarak belirlenmiştir ve bu gene ait 179 bç'nin görüntülediği %2'lik jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.13'te belirtilmiştir.



Şekil 4.13. β -actin genine ait erime sıcaklığının belirlendiği pik grafiği ve jel elektroforez görüntüsü (M:100 bç marker; 1-7: 179 bç; N: Negatif kontrol).

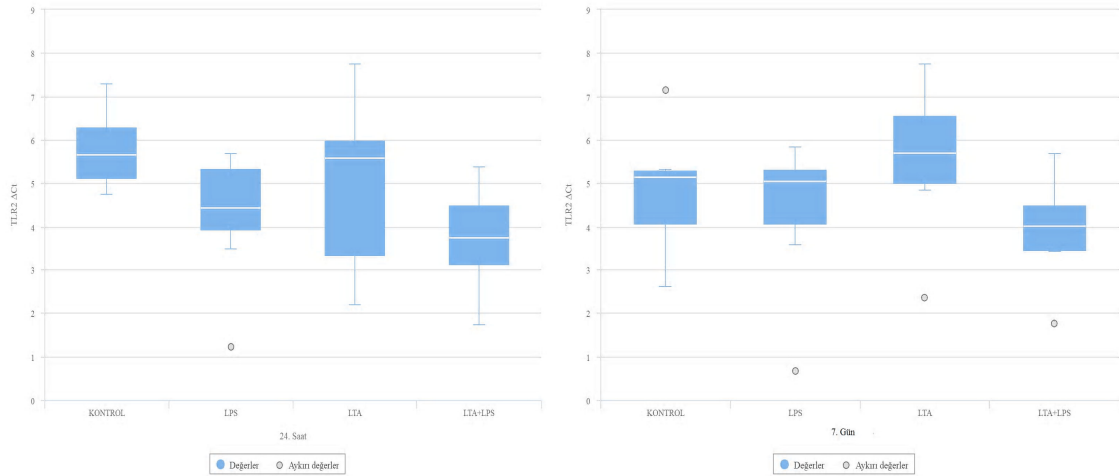
4.4. mRNA ekspresyon verilerine ait istatistiksel bulgular

İncelenen genlere ait mRNA ekspresyon verileri analizleri sonucu mRNA ekspresyon seviyesi ekspresyon grafikleri düzenlenmiştir.

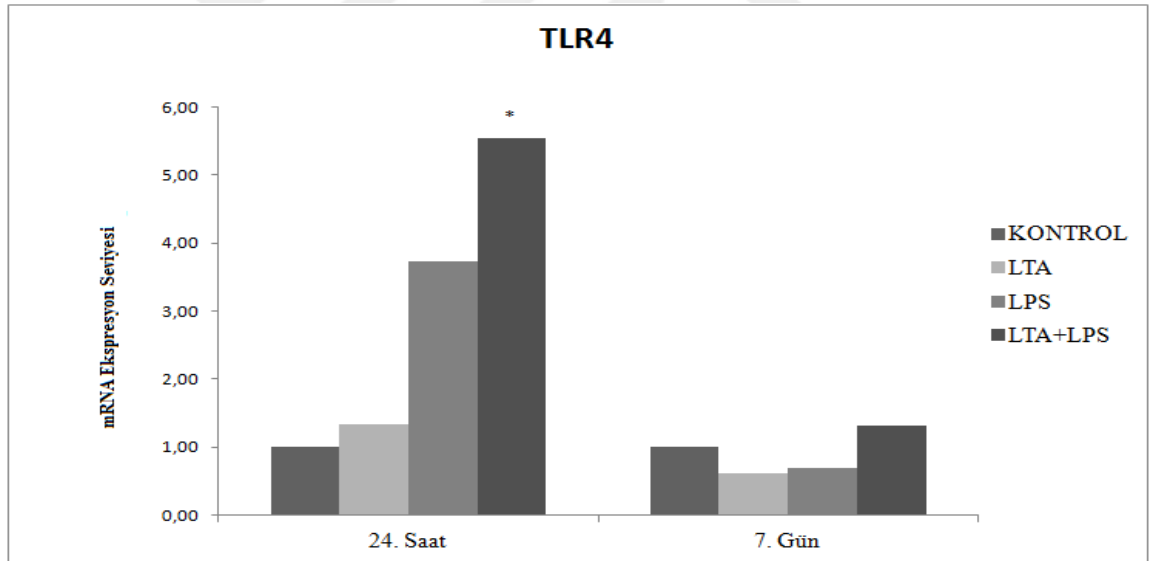


Şekil 4.14. *TLR2* genine ait 24. saat ve 7. gün ekspresyon seviyesi (mRNA ekspresyon seviyesi) *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

TLR2 mRNA ekspresyon verileri kontrol grubuna göre kıyaslandığında 24. saat LTA grubunda 1,89 kat, LPS grubunda 2,87 kat ($P<0.05$), LTA+LPS grubunda 4,18 kat ($P<0.01$) bulunmuştur. Ayrıca 7. gün mRNA ekspresyon verileri LTA grubunda 0,59 kat, LPS grubunda 1,38 kat, LTA+LPS grubunda 1,87 kat bulunmuştur (Şekil 4.14).

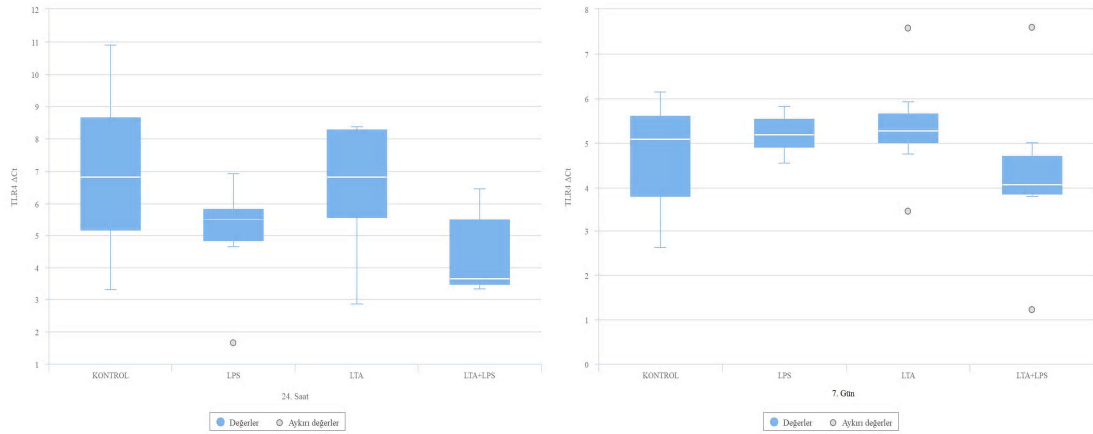


Şekil.4.15. Tüm gruplarda *TLR2* genine ait 24. saat ve 7. gün ΔC_t Ort $\pm$ S.Hata kutu grafikleri.

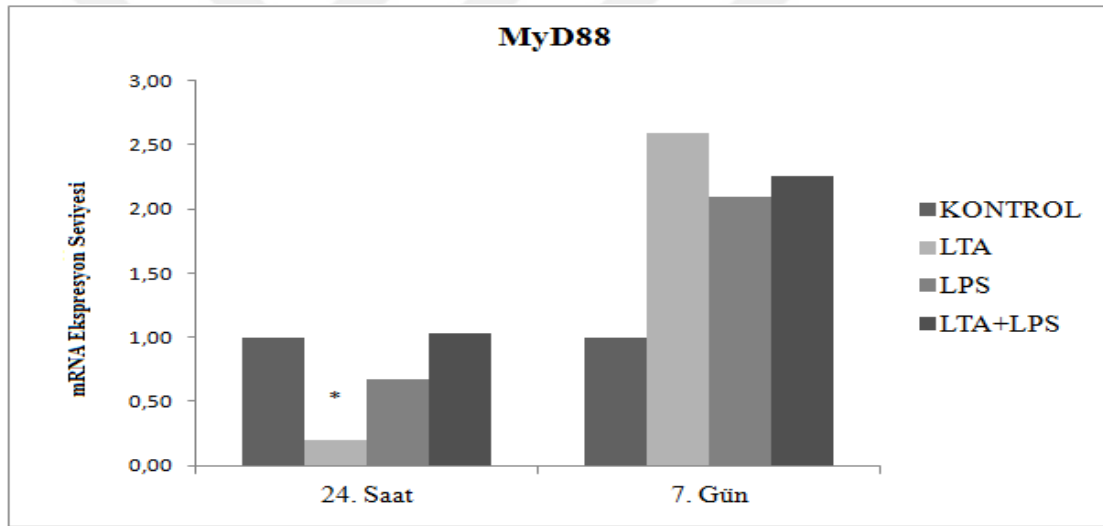


Şekil 4.16. *TLR4* genine ait 24. saat ve 7. gün ekspresyon seviyesi (mRNA ekspresyon seviyesi) *: P<0.05.

TLR4 geninin mRNA ekspresyon verileri kontrol grubuna göre kıyaslandığında 24. saat LTA grubunda 1,33 kat, LPS grubunda 3,72 kat, LTA+LPS grubunda 5,54 kat (P<0.05) bulunmuştur. Ayrıca 7. gün mRNA ekspresyon verileri LTA grubunda 0,61 kat, LPS grubunda 0,69 kat, LTA+LPS grubunda 1,31 kat bulunmuştur (Şekil 4.16).

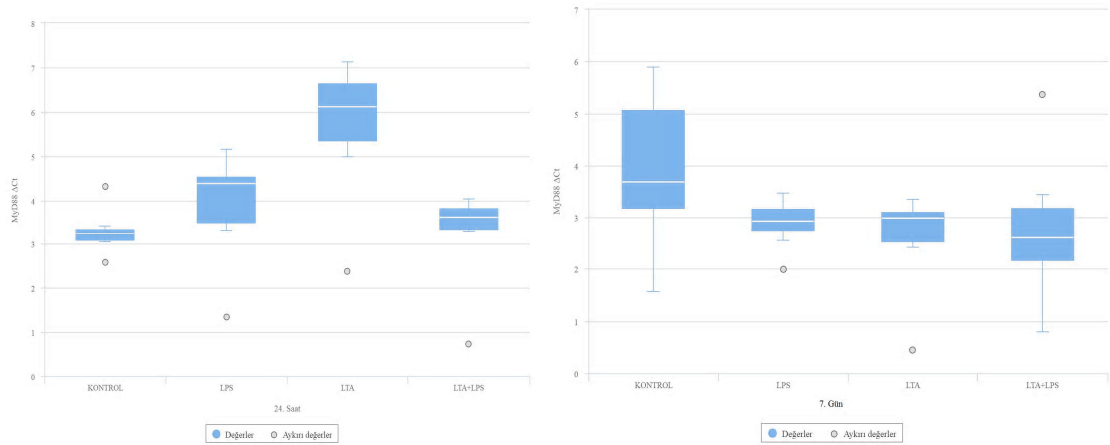


Şekil.4.17. Tüm gruplarda *TLR4* genine ait 24. saat ve 7. gün Δ Ct Ort $\pm$ S.Hata kutu grafikleri.

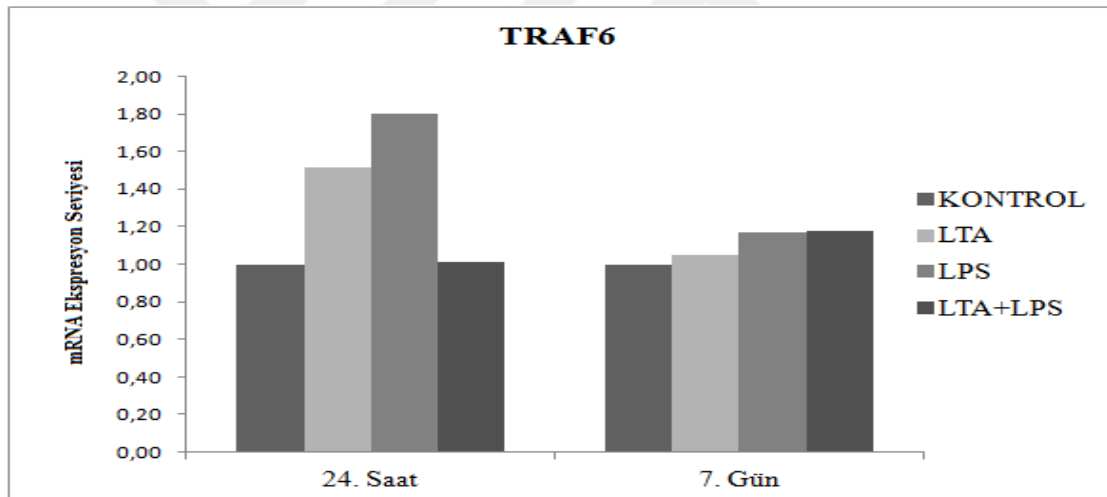


Şekil 4.18. *MyD88* genine ait 24. saat ve 7. gün ekspresyon seviyesi (mRNA ekspresyon seviyesi) *: P<0.05.

MyD88 geninin mRNA ekspresyon verileri kontrol grubuna göre kıyaslandığında 24. saat LTA grubunda 0,19 kat (P<0.05) , LPS grubunda 0,68 kat, LTA+LPS grubunda 1,03 kat bulunmuştur. Ayrıca 7. gün mRNA ekspresyon verileri LTA grubunda 2,59 kat, LPS grubunda 2,09 kat, LTA+LPS grubunda 2,25 kat bulunmuştur (Şekil 4.18).

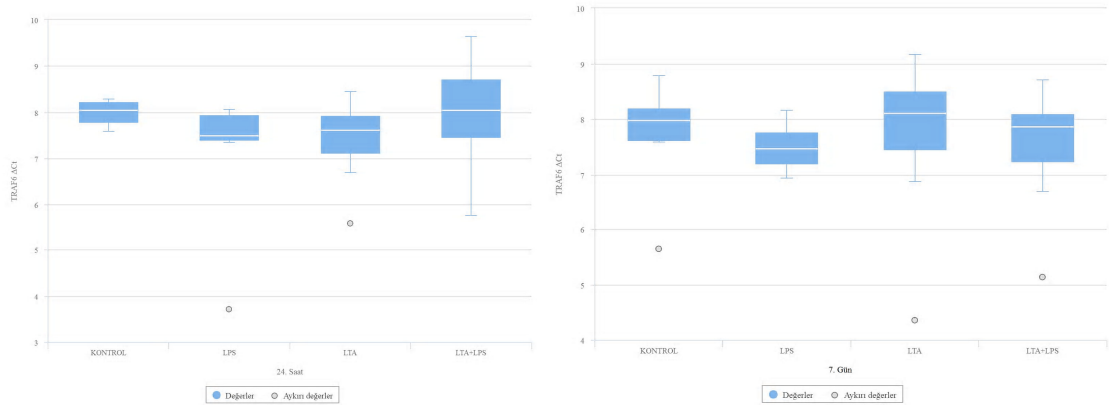


Şekil.4.19. Tüm gruplarda *MyD88* genine ait 24. saat ve 7. gün ΔC_t Ort $\pm$ S.Hata kutu grafikleri.

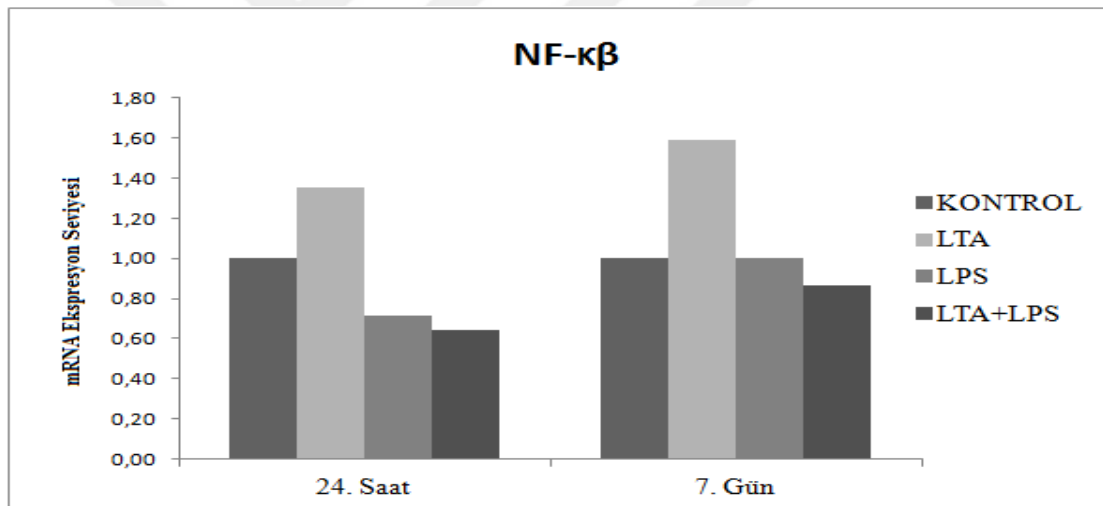


Şekil 4.20. *TRAF6* genine ait 24. saat ve 7. gün ekspresyon seviyesi (mRNA ekspresyon seviyesi).

TRAF6 geninin mRNA ekspresyon verileri kontrol grubuna göre kıyaslandığında 24. saat LTA grubunda 1,52 kat, LPS grubunda 1,80 kat, LTA+LPS grubunda 1,01 kat bulunmuştur. Ayrıca 7. gün mRNA ekspresyon verileri LTA grubunda 1,05 kat, LPS grubunda 1,17 kat, LTA+LPS grubunda 1,18 kat bulunmuştur (Şekil 4.20).

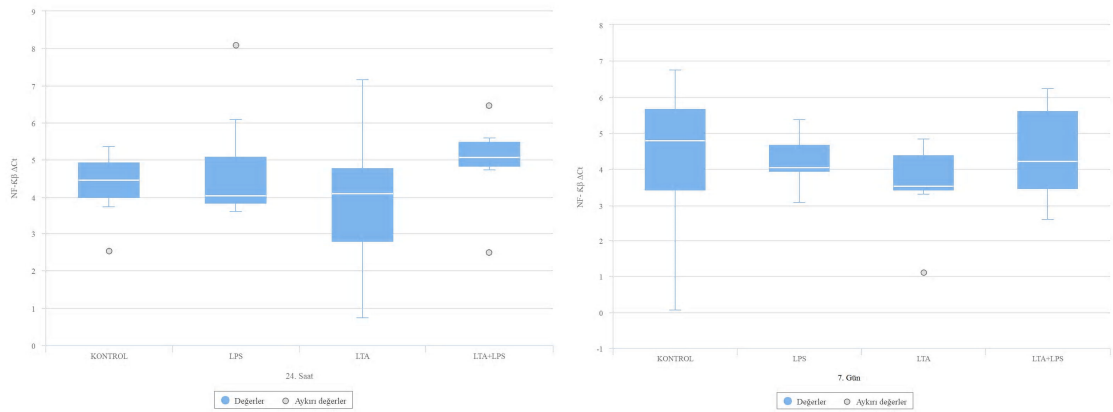


Şekil.4.21. Tüm gruplarda *TRAF6* genine ait 24. saat ve 7. gün ΔC_t Ort $\pm$ S.Hata kutu grafikleri.

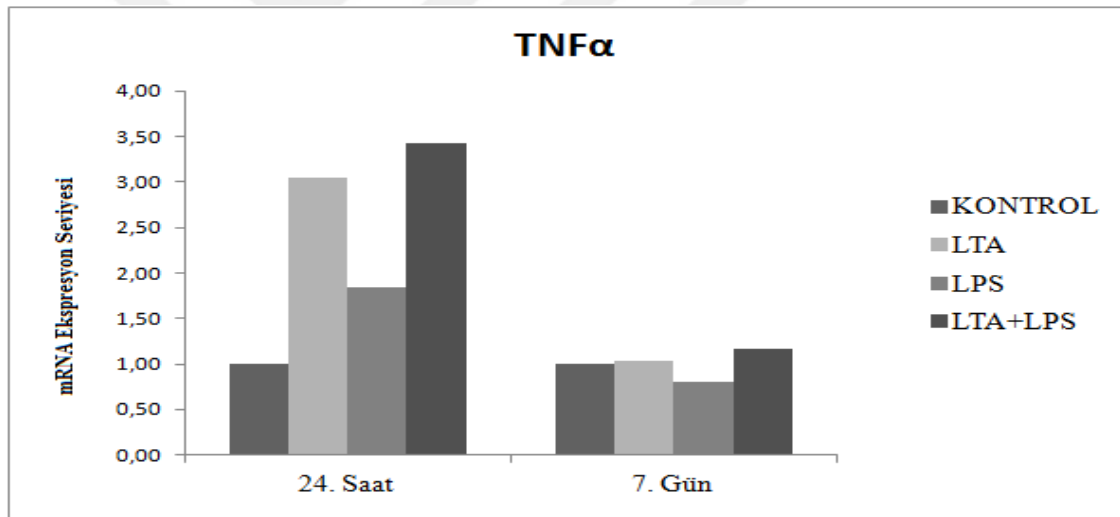


Şekil 4.22. *NF- κ B* genine ait 24. saat ve 7. gün ekspresyon seviyesi (mRNA ekspresyon seviyesi).

NF- κ B geninin mRNA ekspresyon verileri kontrol grubuna göre kıyaslandığında 24. saat LTA grubunda 1,35 kat, LPS grubunda 0,72 kat, LTA+LPS grubunda 0,64 kat bulunmuştur. Ayrıca 7. gün mRNA ekspresyon verileri LTA grubunda 1,59 kat, LPS grubunda 1,01 kat, LTA+LPS grubunda 0,87 kat bulunmuştur (Şekil 4.22).

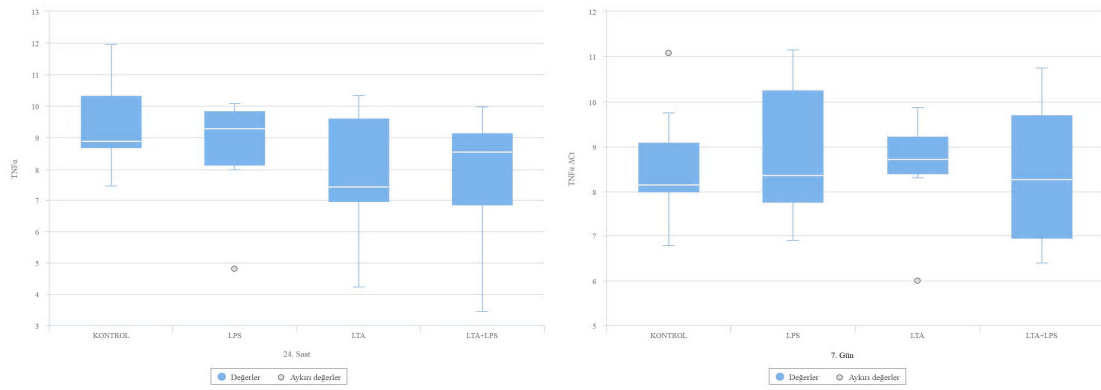


Şekil.4.23. Tüm gruplarda *NF-κB* genine ait 24. saat ve 7. gün ΔC_t Ort±S.Hata kutu grafikleri.

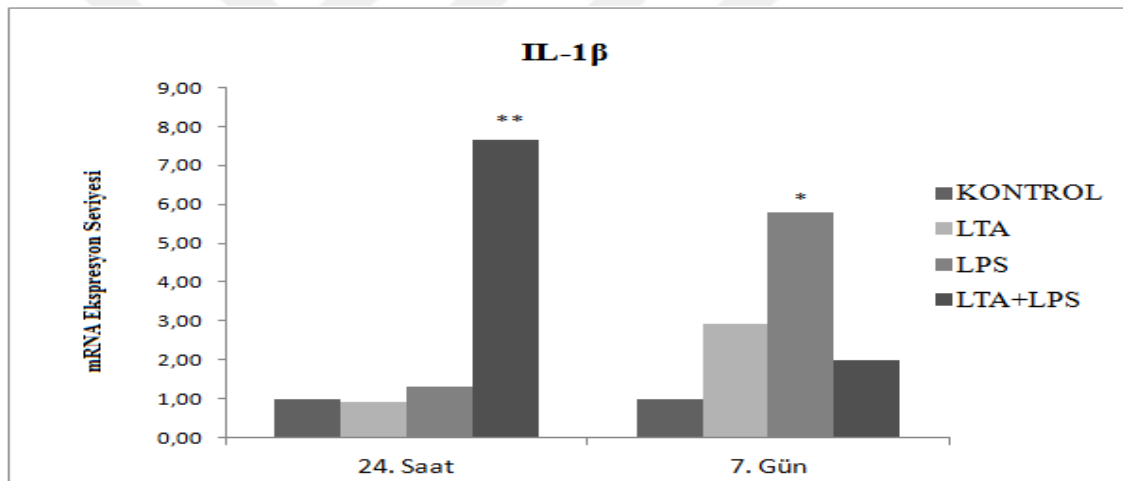


Şekil 4.24. *TNFα* genine ait 24. saat ve 7. gün ekspresyon seviyesi (mRNA ekspresyon seviyesi).

TNFα geninin mRNA ekspresyon verileri kontrol grubuna göre 24. saat LTA grubunda 3,04 kat, LPS grubunda 1,85 kat, LTA+LPS grubunda 3,43 kat bulunmuştur. Ayrıca 7. gün mRNA ekspresyon verileri LTA grubunda 1,04 kat, LPS grubunda 0,81 kat, LTA+LPS grubunda 1,16 kat bulunmuştur (Şekil 4. 24).

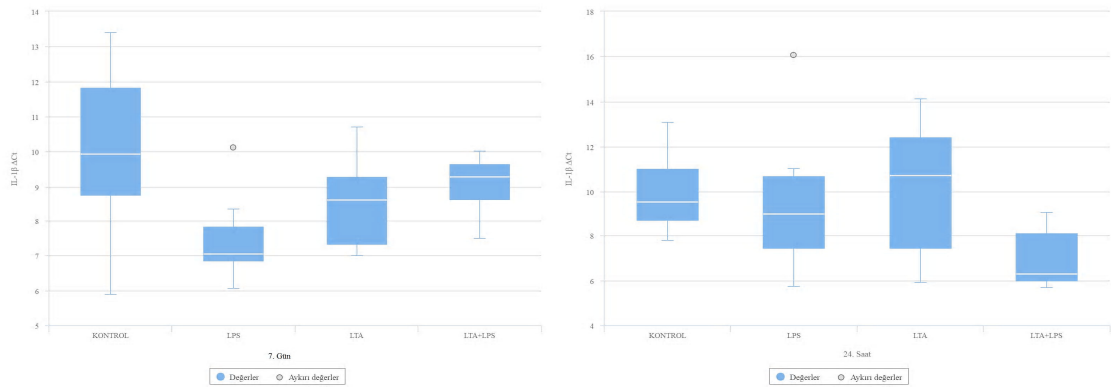


Şekil.4.25. Tüm gruplarda $TNF\alpha$ genine ait 24. saat ve 7. gün ΔC_t Ort $\pm$ S.Hata kutu grafikleri.

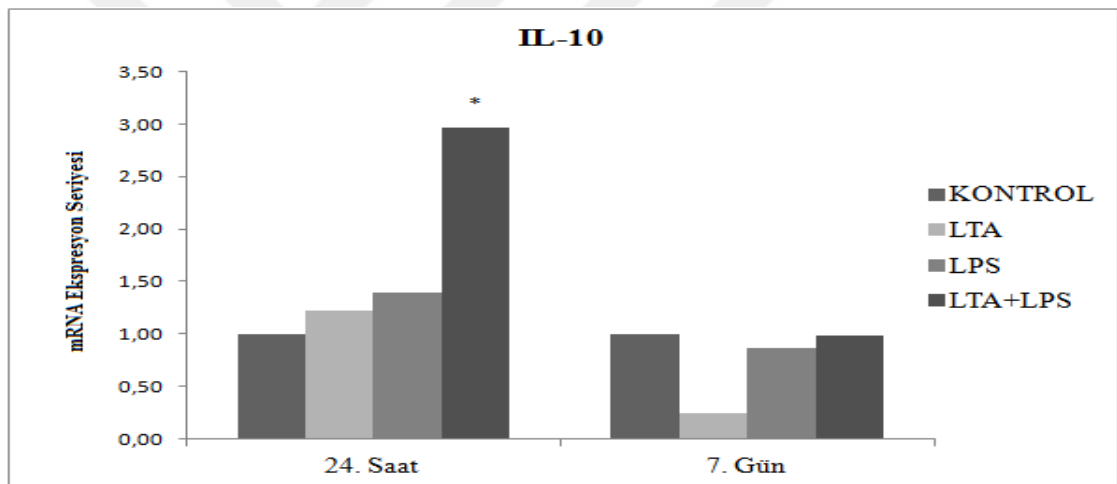


Şekil 4.26. $IL-1\beta$ genine ait 24. saat ve 7. gün ekspresyon seviyesi (mRNA ekspresyon seviyesi) *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

$IL-1\beta$ geninin mRNA ekspresyon verileri kontrol grubuna göre kıyaslandığında 24. saat LTA grubunda 0,93 kat, LPS grubunda 1,31 kat, LTA+LPS grubunda 7,66 kat bulunmuştur. Ayrıca 7. gün mRNA ekspresyon verileri LTA grubunda 2,93 kat, LPS grubunda 5,79 kat, LTA+LPS grubunda 2,01 kat bulunmuştur (Şekil 4.26).

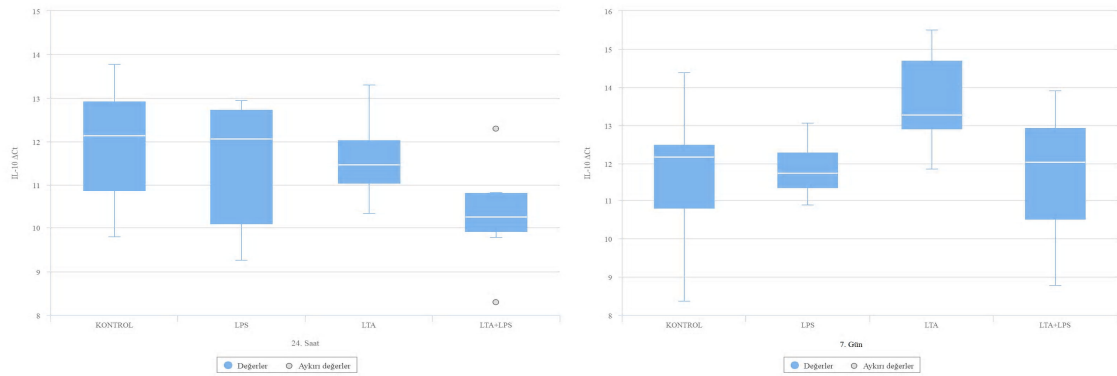


Şekil.4.27. Tüm gruplarda *IL-1β* genine ait 24. saat ve 7. gün ΔC_t Ort $\pm$ S.Hata kutu grafikleri.

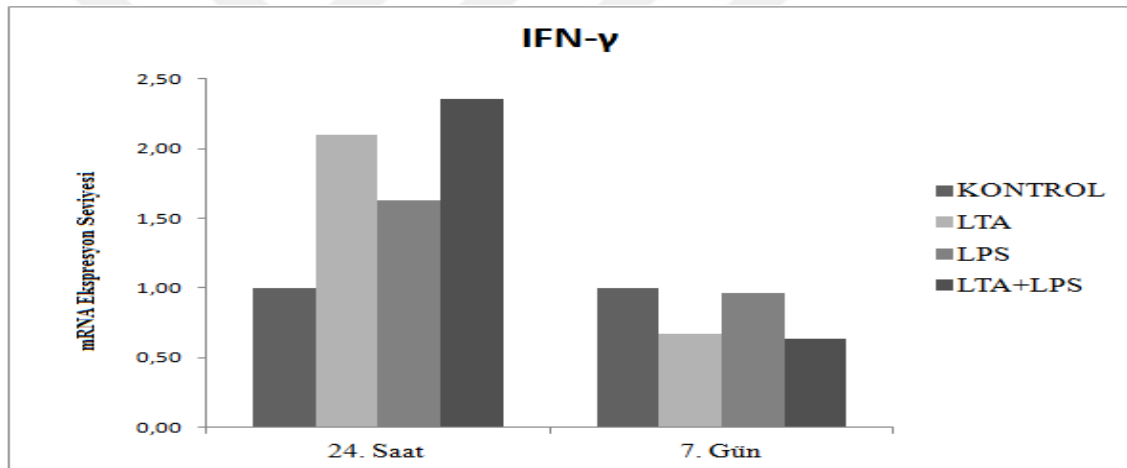


Şekil 4.28. *IL-10* genine ait 24. saat ve 7. gün ekspresyon seviyesi (mRNA ekspresyon seviyesi) *: P<0.05.

IL-10 geninin mRNA ekspresyon verileri kontrol grubuna göre kıyaslandığında 24. saat LTA grubunda 1,22 kat, LPS grubunda 1,40 kat, LTA+LPS grubunda 2,97 kat bulunmuştur. Ayrıca 7. gün mRNA ekspresyon verileri LTA grubunda 0,24 kat, LPS grubunda 0,86 kat, LTA+LPS grubunda 0,99 kat bulunmuştur (Şekil 4.28).

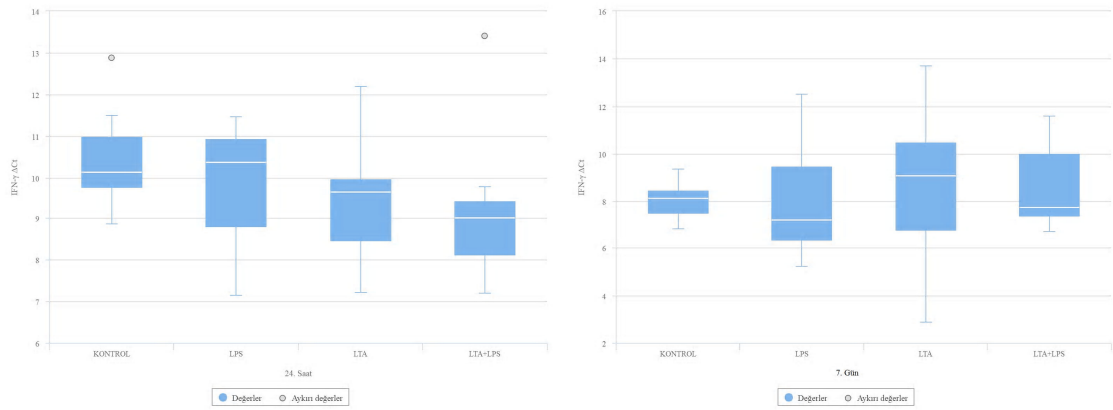


Şekil.4.29. Tüm gruplarda *IL-10* genine ait 24. saat ve 7. gün Δ Ct Ort $\pm$ S.Hata kutu grafikleri.



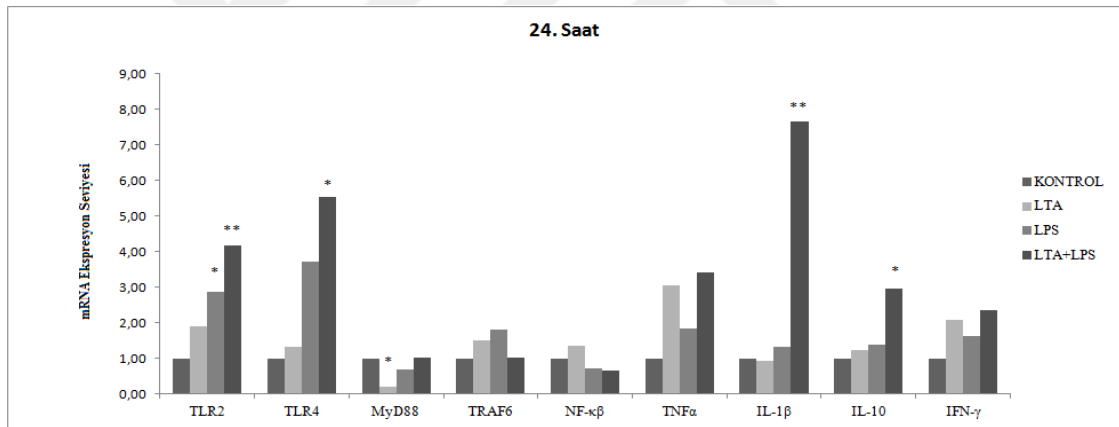
Şekil 4.30. *IFN- γ* genine ait 24. saat ve 7. gün ekspresyon seviyesi (mRNA ekspresyon seviyesi).

IFN- γ geninin mRNA ekspresyon verileri kontrol grubuna göre kıyaslandığında 24. saat LTA grubunda 2,10 kat, LPS grubunda 1,63 kat, LTA+LPS grubunda 2,35 kat bulunmuştur. Ayrıca 7. gün mRNA ekspresyon verileri LTA grubunda 0,67 kat, LPS grubunda 0,96 kat, LTA+LPS grubunda 0,64 kat bulunmuştur (Şekil 4.30).

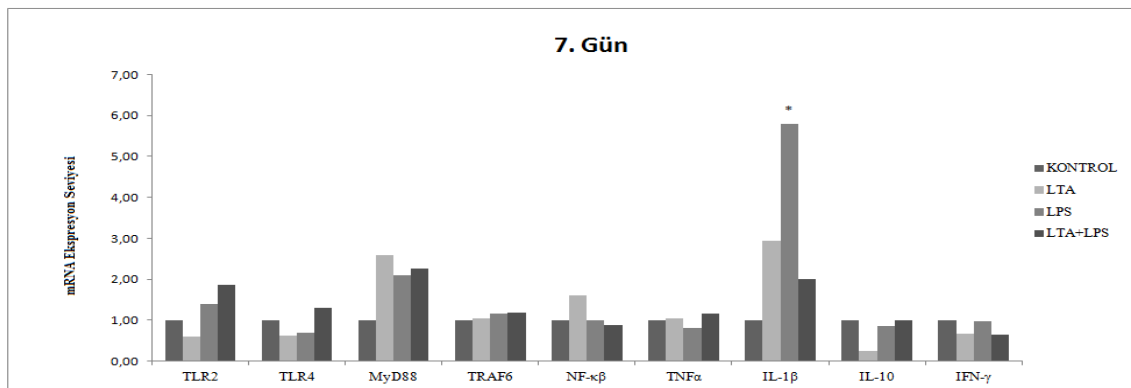


Şekil.4.31. Tüm gruplarda *IFN- γ* genine ait 24. saat ve 7. gün ΔC_t Ort $\pm$ S.Hata kutu grafikleri.

Deneyisel uygulama sonrası tüm gruplarda incelenen genlerin 24. saat ve 7. güne ait göreceli ekspresyon seviyesi grafikleri Şekil 4.32 ve Şekil 4.33'te belirtilmiştir.



Şekil 4.32. Tüm gruplarda incelenen tüm genlere ait 24. saat ekspresyon seviyeleri (mRNA ekspresyon seviyesi).



Şekil 4.33. Tüm gruplarda incelenen tüm genlere ait 7. gün ekspresyon seviyeleri (mRNA ekspresyon seviyesi).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Koyunlarda görülen hastalıkların yaklaşık %5-6'sını oluşturan solunum sistemi hastalıkları tüm dünyada koyun yetiştiricileri için önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Bell, 2008). Bu nedenle koyunculukta solunum sistemi hastalıklarından kaynaklanan ekonomik kayıpların azaltılmasında bakım ve korunma yöntemlerinin iyileştirilmesi önemlidir (Kennerman, 2017). Sürü yönetimi ile ilgili bu uygulamalarla birlikte yetiştiricilikte kullanılacak hayvanların aşılması da hastalıklardan korunmada önemli bir araçtır. Ancak koyun yetiştiriciliğinde bu amaçla kullanılacak aşı sayısı sınırlıdır (Erganiş, 2001). Bu nedenle gerek solunum sistemi hastalıklarına gerekse diğer sistemleri etkileyen enfeksiyon hastalıklarına karşı genetik olarak dirençli bireylerin yetiştiricilikte kullanılması işletmelerde hastalıklardan kaynaklanan kayıpların azaltılmasında önemli katkı sağlayacaktır.

Çiftlik hayvanlarında hastalık etkenlerine karşı doğal ve kazanılmış bağışıklık mekanizmasının anlaşılmasında bu mekanizmada rol oynayan hücre ve dokulara ait genlerin mikroyarray, RNA-seq, transkriptom, qRT-PCR ile analizleri araştırmacılara yeni bakış açıları sunmaktadır (Roitt, 2008; Gao ve ark., 2010; Singh ve ark., 2017). Kullanılan bu teknolojiler, hastalıklara karşı uygulanan tedavi protokollerine verilen bireysel tepkilerin genetik temelini açıklanmasında ve ilerleyen süreçte hastalığın kontrolü ve tedavisinde gereken önlemlerin erken safhada alınmasında araştırmacılara katkı sağlayabilir (Davies ve ark., 2009).

Bu tez çalışmasında, Akkaraman ırkı kuzulara intranazal olarak uygulanan LTA, LPS ve LTA+LPS karışımının, PBMC'lerdeki *TLR2*, *TLR4*, *MyD88*, *TRAF6*, *NF-κβ*, *TNFα*, *IL-1β*, *IL-6*, *IL-10*, *IFN-γ* genlerinin ekspresyon seviyelerini 24. saat ve 7. günde etkileyip etkilemediğinin zamansal olarak araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma sonunda elde edilen bulgular ile özellikle koyunlarda bakteriyel kökenli patojenik etkenlerin

PBMC'lerdeki TLR yolağında görevli genler üzerindeki akut gelişim süreci hakkında veriler elde edilmiştir.

Farelerde *TLR2* geninin susturulduğu bir çalışmada, Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarında bulunan LTA'ya karşı immun yanıt oluşmadığı dolayısıyla, *TLR2*'nin LTA, peptidoglikan gibi mikrobiyal ajanlara duyarlı olduğu belirtilmiştir (Takeuchi ve ark., 1999; Echchannaoui ve ark., 2002). Aynı zamanda *TLR2*'nin, LPS için de hücre reseptörün sinyal bileşeni olabileceği bildirilmiştir (Kirschning ve ark., 1998). *TLR4* geni susturulan (knock-out) farelerin de LPS'ye duyarlı olduğu ve bu ajana karşı immun yanıtın gelişmediği için ölüm gerçekleştiği bildirilmiştir (Osamu Takeuchi ve ark., 1999). Ayrıca hem *TLR2*'nin hem de *TLR4*'ün Gram-negatif bakteriyel enfeksiyonlara karşı oluşan inflamatuvar yanıtta önemli roller oynadığı bildirilmiştir (Medzhitov ve ark., 1997; Yang ve ark., 1998; Hirschfeld ve ark., 2000). Yapılan bir *in vitro* olarak çalışmada LPS ile uyarılan domuz PBMC'lerinde 1., 3., 6., 9., 12., 24. ve 48. saatlerde *TLR1-10*'u kodlayan genler qRT-PCR analizi ile incelenmiştir. Çalışma sonunda uygulama grubunda *TLR2* mRNA seviyesindeki kontrole grubuna kıyasla artmış ve bu artışta istatistiksel açıdan önemli olduğu gözlenmiştir. *TLR4* mRNA seviyesinin ise LPS uygulanmasından 3 saat sonra arttığı ve bu artışın istatistiki açıdan önemli olduğu, yüksek mRNA seviyesinin 48. saate kadar sabit kaldığı bildirilmiştir (Uddin ve ark., 2012). Uddin ve ark. (2012) yapmış oldukları çalışmaya kıyasla tez çalışmasında koyunlara *in vivo* uygulanan LTA, LPS ve LTA+LPS uygulaması sonucu yalnızca 24. saat ve 7. gün ekspresyon verileri ölçülmüş ve 24. saatte yapılan gen ekspresyonu ölçümlerinde hem *TLR2* [LPS ($P<0.05$) ve LTA+LPS ($P<0.01$)] hemde *TLR4* [LTA+LPS ($P<0.05$)] genlerine ait ekspresyon verilerinde tüm gruplarda artış gözlenmiştir. Ayrıca her iki kimyasalın bir arada uygulandığı gruplarda her iki gendeki ekspresyon seviyelerinin en yüksek seviyede olduğu ve 7. günde de tüm gruplarda düştüğü belirlenmiştir. Dolayısıyla intranazal yolla uygulanan tüm kimyasalların Akkaraman ırkı kuzu PBMC'lerindeki 24. saat *TLR2* ve *TLR4* gen ekspresyonu seviyesinde uyarım yaptığı, karışım gruplarında ise her iki genin ekspresyon seviyesinin en yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir.

Farelerde LPS (20 mg/kg) ve LTA'nın (15 mg/kg) intraperitoneal olarak uygulanması sonrası kurban edilen hayvanlardan elde edilen hücreler kültüre edilerek 0., 2., 4. ve 6. saatlerde *TLR2*, 4, 6 ile *TNF α* gen ekspresyonuna; IL1- α/β , IL-6 gibi sitokinlerin protein

ekspresyon seviyelerine bakılmış ve LPS'nin ölçülen zaman dilimlerinde *TLR2* ve *TLR6* ile *TNF α* gen ekspresyonu seviyelerini istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde artırdığı LTA'nın ise etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Ehrentraut ve ark., 2011). Ehrentraut ve ark. (2011) yapmış olduğu çalışmaya kıyasla yapılan bu tez çalışmasında koyunda yalnızca intranazal uygulama sonrası 24. saat ve 7. gün ekspresyon verileri incelendiği için uygulama sonrası bağışıklık sisteminde görevli incelenen genlerin sadece bu zaman dilimlerindeki tepkilerinin ekspresyon verilerine yansıttığı değişimler ortaya konulmuştur. Yapılan tez çalışmasında incelenen TLR genlerinde tüm gruplarda artış gözlenmesi intranazal uygulanan dozun etkin olduğunun bir göstergesidir.

Koyunlarda amniyon sıvısı içerisindeki fetüslerin PAMCysK₄, LPS ve poly I:C dsRNA'a maruz bırakılması sonrası *TLR2*, *TLR3* ve *TLR4* genlerinin 2. gün ve 7. gün gen ekspresyonu (RNase protection assay yöntemi ile) ölçülmüş ve elde edilen veriye göre LPS uygulananların akciğerlerinde *TLR2* ve *TLR4*'ün ekspresyonunun 2. günde arttığı 7. günde ise azaldığı bildirilmiştir (Hillman ve ark., 2008). İslam ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada farklı yaşlarda (5 günlük ve 120 günlük) sakrifiye edilen domuz alveolar makrofaj hücrelerinin kültüre edilmiş ve farklı dozlarda uygulanan LPS molekülünün *TLR 2, 4, 5, 9* ve *LBP, CD14, MD2, MyD88, IRAK4* ve *TRAF6* genlerinin ekspresyon seviyeleri 0., 1., 8., 24., 48. ve 72. saatlerde qRT-PCR yöntemi ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre LPS uygulaması sonrası *TLR2* ve *TLR4* genleri incelendiğinde ekspresyon seviyesinin ölçülen zaman dilimlerinde 48. saate kadar artış gösterdiği ve sonra düştüğü bildirilmiştir. Çalışmamızda da *TLR2* ve *TLR4* genlerine ait 24. saatte ölçülen ekspresyon artışı ve 7. günde ekspresyon seviyelerinde belirlenen azalışın literatürlerde destekleniyor olması, *in vivo* deneysel uygulamanın incelenen TLR genleri bakımından 24. saatte etkin olduğunun bir göstergesidir. Ayrıca uygulanan LTA kimyasalının da LPS gibi her iki TLR üzerinde etkin olduğu gözlenmiştir. Her iki kimyasalın bir arada uygulandığı karışım grubunda diğer gruplara göre en yüksek seviyede ekspresyon gösteriyor olması da uygulanan dozların bir arada daha yüksek seviyede bir etki göstereceğini dolayısıyla deneysel uygulamanın başarısını destekler niteliktedir. Uddin ve ark. (2012) yapmış oldukları çalışmada, LPS dozu arttırıldıkça *TLR2* ve *TLR4* genlerinde ki tepkinin de zamansal olarak artış gösterdiğini bildirmiştir. Elde edilen verilere göre Akkaraman ırkı kuzularda intranazal yolla uygulanan LPS ve LTA dozlarının bağışıklık yanıtın aktive edilmesinde *TLR2* ve *TLR4* genlerinin 24. saatte artışının belirlenmesi ile etkin

oldukları ortaya konulmuştur. Koyunlarda bağışıklık sistemi ile ilgili benzer çalışmalar planlayacak araştırmacılar için elde edilen bu veriler LTA ve LPS dozaj hesaplanmasında model oluşturacaktır.

Domuzlarda *TLR2* ve *TLR4* üzerinde bulunan varyasyonların özellikle akciğerle ilişkili enfeksiyöz hastalıklarla yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (Fang ve ark., 2013). Farklı ırk domuzlarda yapılan bir çalışmada *TLR2* ve *TLR4*'e ait bazı SNP'ler tespit edilmiş ve *TLR4*'e ait 1027C>A SNP'ine sahip domuzlarda *TLR2*, *TLR4*, *TNF α* ve *IL-1 β* genlerinin ekspresyon seviyelerinde farklıklar tespit edilmiştir. Buna göre domuzlara ait kültüre edilen alveolar makrofajlara LPS uygulaması sonrası *TLR2* ve *TLR4* gen ekspresyonlarının 1027CC genotipli hücrelerin 1027AC genotipli hücrelere göre daha yüksek seviyede olduğu *TNF α* ve *IL-1 β* genlerinin ekspresyonunda ise 1027AC genotipli hücrelere göre 1027CC genotipli hücrelerin daha düşük seviyede ekspresyon gösterdiği istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (Fang ve ark., 2013). Çalışmamızda elde edilen verilere göre *TLR2* ve *TLR4* genlerine ait ekspresyon artışı ile bu genlerin koyun PBMC'leri üzerinde etkisinin hem Gram-pozitif, hem de Gram-negatif bakterilere karşı immun yanıtta 24. saatte etkin olduğunu düşündürmektedir. Akkaraman ırkı kuzularda bu genler üzerinde yapılacak karakterizasyon çalışmalarının ve elde edilecek SNP'lere göre belirlenecek genotiplerin özellikle solunum yolu ile bulaşan hastalıklara direnç konusunda, ayrıca hastalıkların kontrolü ve tedavisinde araştırmacılara ve yetiştiricilere katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Adaptör proteinlerden MyD88'in hem TLR'lerin tamamı için hem de IL'lerin bağlanabildiği Toll-interlokin reseptör (TIR) alanı olduğu (Lord ve ark., 1990; Hultmark., 1994) bu genin susturulduğu farelerde birçok (fakat hepsi değil) TLR sinyalinin ortadan kalktığı bildirilmiştir (Kawai ve ark., 1999). Islam ve ark. (2012) yapmış oldukları *in vitro* bir çalışmada, domuz alveolar makrofaj hücrelerine uygulanan LPS sonrası *MyD88* geninin 0. saatten, 24., 48. ve 72., saatte ölçülen ekspresyon verilerine göre sürekli artış gösterdiği belirlenmiştir. Koyunlarda *in vivo* yürütülen çalışmamızda PBMC hücrelerinde *MyD88* geninin 24. saat mRNA ekspresyon verileri kontrol grubuna göre kıyaslandığında tüm gruplarda artış gözlenmemiştir. Ancak 7. gün gen ekspresyon verilerinde kontrole kıyasla artış gözlenmiştir. Islam ve ark., (2012) yapmış olduğu çalışmaya kıyasla *in vivo* yapılan çalışmamızda *MyD88* genindeki 7. gündeki artışın beklenen bir durum olabileceği düşünülmüştür. Bu hususun

aydınlatılabilmesi için daha uzun zaman aralıklarında bu gene ait ekspresyon verilerinin ölçümüne ihtiyaç duyulmaktadır. Koyun ve keçilerde MyD88 ve TRAF6'nın incelendiği bir çalışmada (Xue ve ark., 2015) ovine enfeksiyöz plöropnömoniye neden olan *Mycoplasma ovipneumoniae* ve solunum yolu epitel hücreleri arasındaki patojen-konak etkileşimini anlamak için, Ningxia Tan koyunun bronşiyal epitelyal hücreleri kültüre edilmiş ve patojene maruz bırakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre enfeksiyon sonrası 24. saatte MyD88 geninin ekspresyon seviyesinin kontrole göre arttığı bildirilmiştir. İmmun yanıtlar antijen çeşidi, antijenin dozu, antijenin vücuda giriş yolu yada veriliş yolu ve bireyin genetik yapısına göre değişir (Male ve ark., 2008). Xue ve ark.'nın (2015) *Mycoplasma ovipneumoniae* enfeksiyonu ile yapmış oldukları çalışmada MyD88 geninde anlamlı bir artış belirlemeleri farklı bir etken uygulandığı için veya çalışmanın *in vitro* ortamda uygulanmasından kaynaklanmış olabilir. Ayrıca bu gene ait dizayn edilen primerler 3. ve 4. ekzon üzerinde olduğu için Burns ve ark.'nın (2003) yapmış oldukları çalışmada tespit ettikleri alternatif splicing sebebiyle MyD88 geninin ekspresyonu gözlenmemiş olabilir. Bunun tespiti için bu gene özgü daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Adaptör proteinlerden olan TRAF6 geninin immün sistemle ilgili hücrelerin transkripsiyonunun hızlandırılmasında rol oynadığı (Ishida ve ark., 1996; Medzhitov ve ark., 1998; Muzio ve ark., 1998) ve bu genin sürdürüldüğü farelerde yapılan araştırmada immün ve inflamatuvar sistemlerin oluşturulması için temel bir gen olduğu ortaya konulmuştur (Naito ve ark., 2002). Adaptör proteinlerden olan *TRAF6* geninin mRNA ekspresyon verileri kontrol grubuna göre kıyaslandığında 24. saat LTA ve LPS grubunda artış gözlenmiş ancak istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır. Ayrıca 7. gün gen ekspresyonu verileri 24. saat ekspresyon verilerine göre tüm gruplarda azalmıştır. Xue ve ark., (2015) yapmış oldukları çalışmada TRAF6 geninin de MyD88 gibi 24. saatte *Mycoplasma ovipneumoniae* enfeksiyonu sonrası kontrole kıyasla arttığı belirlenmiştir. İslam ve ark. (2012) yapmış olduğu çalışmada TRAF6 geninin domuz alveolar makrofaj hücrelerine uygulanan LPS sonrası 24. saatte en yüksek seviyede ekspresyon gösterdiği daha sonra düşüşe geçtiği belirlenmiştir. İlgili çalışmaların sonuçları ile kıyaslandığında çalışmamızda da 24. saat LTA ve LPS verilerindeki artışın beklenen bir sonuç niteliğinde olduğu düşünülmüştür. Ancak *TRAF6* geninin 24. saat ekspresyon verilerinde bu genin LTA ve LPS'ye ayrı halde iken tepki verdiği ancak bir arada uygulandığında tepki vermeyişi elde edilen sonucun deneysel uygulamaya bağlı

olmayabileceğini de düşündürmüştür. Bu gene ait 7. gün ekspresyon verilerinin kontrole kıyasla değişmemesi de genin inaktif olabileceğini uygulanan kimyasalların o zaman diliminde etkisiz olabileceğini düşündürmüştür.

Bağışıklık sisteminde görevli genlerden biri olan NF- κ B, MyD88'in yanı sıra diğer bazı adaptör moleküllerin TLR'lerden sinyaller ileterek uyarılması sonucu hücre içinde oluşan bir sinyal iletim kaskadı sonrası nükleusa geçerek transkripsiyon faktörü görevini yerine getirir. Böylece inflamatuvar reaksiyonlarda görevli sitokinlerin kemokinlerin ve hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunu uyarır (Male ve ark., 2008). Enkhbaatar ve ark. (2015) yapmış oldukları mikroyarray çalışmasında koyun ve insandan elde edilen PBMC hücrelerine 1 μ g/mL LPS uygulanmış ve doksan dakikalık inkubasyon sonrası *IL-1*, *IL-6*, *TNF α* , *NF- κ B* gibi major inflamatuvar yanıtta görevli genlerin ekspresyonunda her iki türde de artış gözlemlendiği bildirilmiştir. *NF- κ B* geninin 24. saat ekspresyon verileri kontrol grubuna göre kıyaslandığında yalnızca LTA grubunda 1,35 kat arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca 7. gün mRNA ekspresyon verileri incelendiğinde 24. saate göre görülen artışın istatistiki açıdan önemsiz olduğu belirlenmiştir. Enkhbaatar ve ark. (2015) yapmış oldukları doksan dakikalık çalışmaya kıyasla bu gene ait 24. saat ve 7. gün ölçüm zamanının geç olduğu bu sebeple elde edilen verilerin deneysel uygulama ile ilişkili olmadığı kanaatine varılmıştır. Bu genle ilgili ekspresyon ölçümlerinin daha kısa zaman aralıklarında ölçülmesi ile bu gene ait çalışma mekanizması hakkında daha ayrıntılı bilgi sağlanabilir.

Farklı Gram-pozitif bakterilerden elde edilen LTA'ların fare kemik iliğinden kültüre edilmiş makrofajların artışının uyarılmasında ve *TNF α* salınımının artışından da sorumlu olduğu bildirilmiştir (Keller ve ark., 1992). İnsan monositlerinin 5-15 dakikalık LPS'ye maruz bırakılması sonucu *TNF α* salınımının gerçekleştiği ve dolayısıyla monositlerin bu dakikalar içinde aktifleştirdiği bildirilmiştir (Heumann, 1994). Domuzlarda PBMC hücrelerinin farklı zaman dilimlerinde TLR ve sitokinlerin mRNA ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların araştırıldığı bir çalışmada, LPS uyarımı sonrası ilk bir saatte sitokinlerden *IL-1 β* , *IL8* ve *TNF α* 'nın ekspresyonunda artışın gözlemlendiği bildirilmiştir (Uddin ve ark., 2012). Çalışmamızda ekspresyon verilerine göre *TNF α* geninin mRNA ekspresyon verilerinin kontrol grubuna göre 24. saatte tüm gruplarda arttığı 7. günde ise azaldığı gözlemlenmiştir. Elde edilen veriye göre *TNF α* geninin kontrole kıyasla artışında deneysel uygulamanın 24. saatte hala etkin olduğu 7. günde ise etkisini

yitirdiği sonucuna varılmıştır. Ehrentraut ve ark. (2011) tarafından farelerde yapılmış bir çalışmada, LPS ve LTA uygulaması sonrası 0., 2., 4. ve 6. saatlerde yapılan hem protein hem de gen ekspresyonu ölçümlerinde *TNF α* 'nın LPS uygulamasında 2. saatte pik yaptığı diğer zaman dilimlerinde de LTA'ya göre daha yüksek seviyede ölçüldüğü bildirilmiştir. Amadori ve ark. (2018) tarafından *in vitro* yapılan bir çalışmada sıgır PBMC'lerine farklı dozlarda LPS (0, 1, 20 μ g/mL) uygulaması sonucu *TLR4*, *TNF α* , *IL-1 β* , *IL-6* gibi bağışıklık sistemi ile ilgili genlerin 0., 4., ve 20. saat ekspresyon seviyelerine bakılmış, elde edilen sonuçlara göre uygulanan dozların verilen tepkilerde fark gözlenmezken zamansal olarak 4. saatte *TLR4* geninin en yüksek seviyeye ulaştığı ve 20. saate doğru hızla düşüşe geçtiği tespit edilmiştir. Ölçülen diğer genlerden *TNF α* , *IL-1 β* ve *IL-6*'nın da 4. saatte en yüksek ekspresyon seviyesine ulaştığı, 20. saate kadarda *TNF α* 'daki düşüşün *IL-1 β* ve *IL-6*'ya göre daha hızlı gerçekleştiği gözlenmiştir. Malefayt ve ark. (1998) yapmış oldukları *in vitro* çalışmada LPS uygulaması sonrası bu genin 3. saatte aktifleştğini 7. saatte düşüşe geçtiği 20. saatte de daha düşük seviyede aktif olduğunu bildirmiştir. Fernandez ve ark. (2013) rat alveolar makrofaj hücre kültürü üzerine LTA (30 mg/mL) ve LPS (1,5 μ g/mL) uygulaması sonrası 24. saatte *TNF α* sitokininin enzim bağlı immunoassay yöntemi ile arttığını tepsit etmiştir. Dolayısıyla çalışmamızda 24. saatlik zaman diliminde bu genin hala aktif olduğunun ancak ölçülen 24 saatlik ve 7 günlük zaman diliminin uzun olması sebebiyle tüm gruplarda bu sitokine ait gen ekspresyonu ölçümlerin daha kısa süreli zaman aralıkları ile planlanacak çalışmalarla desteklenmesine ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır.

Doğal ve kazanılmış bağışıklıkta monosit/makofaj ve diğer bağışıklık sistemi hücreleri tarafından salınan sitokinlerden *IL-1 β* geninin insana ait PBMC'lerinin LPS (100 ng/mL) uyarımı sonrasında 4 saat içinde aktifleştigi makrofaj ve monositlerde farklı seviyede eksprese olduğu bildirilmiştir (Netea ve ark., 2009). Enkhabaatar ve ark. (2005) yapmış oldukları çalışmada doksan dakikalık LPS inkubasyonu sonrası *IL-1 β* geni ekspresyon seviyesinde artış gözlemlendiği bildirilmiştir. Çalışmamızda bu genin mRNA ekspresyon verileri kontrol grubuna göre kıyaslandığında 24. saat karışım grubu ($P<0.01$) verilerinde en yüksek seviyede ekspresyon gösterdiği gözlenmiştir. Diğer taraftan 7. gün mRNA ekspresyon verilerinin LTA, LPS ($P<0.05$), LTA+LPS grubunda arttığı gözlenmiştir. Çalışmamızda 24. saatte bu gene ait ölçülen verilerde artışın yalnızca karışım grubunda olması sebebiyle ve Enkhabaatar ve ark. (2015) doksan dakikalık *in vitro* ölçüm ile Amadori ve ark. (2018) ve Netea ve ark. (2009) yapmış

oldukları çalışmada 4 saat gibi kısa bir sürede bu gene ait ekspresyon seviyesinin artmış olması sebebiyle *in vivo* olarak yapılan bu tez çalışmasında gözlenen artışın deneysel uygulamaya bağlı olmayabileceği sonucuna varılmıştır. Bu gene ait daha kısa zaman aralıklarında planlanacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

IL-6'nın enfeksiyona karşı hem lokal hem de sistemik doğal bağışıklık savunmasını harekete geçirdiği ve güçlendirdiği bildirilmiştir (Gabay, 2006). Çalışmamızda primer sayısının fazla olması ve cDNA yetersizliği sebebiyle bu gene ait çalışma yapılamamıştır.

Interleukinlerden *IL-10* geninin sitokin sekresyonunu, antijen sunumunu ve CD4 + T hücresi aktivasyonunu baskıladığı bildirilmiştir (De Wall Malefayt ve ark., 1991; Joss ve ark., 2000). *IL-10*'un, pro-inflamatuar sitokinlerin TNF α , IL-1 β (Opp, 1995), IL-12 (Aste-Amegaza, 1998) ve IFN- γ (Varma ve ark., 2001) sekresyonlarının üretimini inhibe ettiği bildirilmiştir (Opp, 1995; Aste-Amegaza, 1998; Varma ve ark., 2001). İnsan monositlerinin hücre kültür ortamına uygulanan 0.2 ng/mL LPS sonrası *IL-10*'un 7. saatte aktifleştiği ve bu aktivitenin 24. ve 48. saate kadar sürdüğü sonrasında 98. saatte düşüşe geçtiği bildirilmiştir (De Waal Malefayt, 1991). Çalışmamızda *IL-10* geninin ekspresyon seviyesi kontrol grubuna kıyasla 24. saat LTA, LPS, LTA+LPS ($P<0.05$) gruplarında arttığı görülmüştür. Ayrıca 7. gün mRNA ekspresyon verilerinde de tüm gruplarda kontrole kıyasla düşüş olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlarla *IL-10* geninin uygulanan dozlara göre ekspresyon seviyesinin 24. saatte, 7. güne göre özellikle karışım gruplarında artış göstermesi, bu genin aktif olduğunu düşündürmüştür. Bu genle ilgili planlanacak çalışmalarda bu hususunda göz önünde bulundurulması önerilmektedir.

Hem doğal hem kazanılmış bağışıklık hücrelerince salgılanan IFN- γ geni antiviral aktiviteye sahip ve Th1 sitokin yolunun başlıca immün düzenleme ürünü ve tetikleyicisidir (Oppenheim, 2013). Aktive ettikleri makrofajların fagosite ettikleri patojenleri yok etmesini uyardığı bildirilmiştir (Abdul, 2012). Çalışmamızda kontrol grubuna göre deneme gruplarının IFN- γ gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmış, 24. saat verilerinde kontrole kıyasla tüm gruplarda artış olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 7. gün mRNA ekspresyon verilerinin de kontrole kıyasla düştüğü gözlenmiştir. Puech ve ark. (2015) koyun, keçi ve sığırdaki sitokinlerin normalizasyonu için referans gen belirlenmesinde PBMC hücrelerinde yaptıkları *in vitro* çalışmada uygulanan Concanavalin

A etkeninin 36. saat ekspresyon verilerinde her üç türde de *IFN- γ* geni ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında da LTA, LPS ve karışım gruplarında uygulanan dozların PBMC'lerden izole edilen bu genin 24. saat ekspresyon seviyesini artırdığı tespit edilmiştir. Traore ve ark. (2012) insan farklılaşmış makrofaj hücreleri üzerinde yapmış oldukları çalışmada LTA (10 ng/mL) veya LPS'ye (100 ng/mL) maruz bırakılan hücrelerden 16. saatte multipleks sitokin immünoassay yöntemiyle IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-10 sitokinlerini ölçmüşlerdir. Elde edilen verilere göre farklılaşmış makrofaj hücrelerinde 16. saat tüm sitokinlerin hem LPS hem de LTA uygulaması sonrası arttığı ancak LPS uygulamasında ölçülen tüm sitokinlerin LTA'ya göre daha fazla artış gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmamızda ise ekspresyon analizine göre incelenen sitokinlerde LPS ve LTA uygulamasına göre IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-10 sitokinlerinin tepkileri farklılaşmaktadır. Deneysel uygulama sonrası 24. saat gen ekspresyon verilerinin kontrole göre tüm gruplarda özellikle IFN- γ , TNF- α , IL-10 sitokinlerinde de yüksek olması bağışıklık sisteminin hala aktif olduğunun ve ekspresyon seviyesinde ölçülebildiğinin bir göstergesi olabilir.

Gen ekspresyon çalışmalarında, karşılaştırılmış gruplar arasında stabil bir ifadeye sahip referans genlerin kullanılması normalizasyon için çok önemlidir. Çeşitli araştırmalar, farklı referans genlerin kullanımının çalışma sonucunu değiştirebileceğini bildirmiştir (Dheda ve ark., 2004). Günümüzde SYBR green kantitatif revers transkriptaz PCR (qRT-PCR) analizinin geniş getiren hayvanlarda sitokin gen ekspresyonunu araştırmak için kullanılan en yaygın yöntem olduğunu ancak analizin gerçekleştirildiği koşulların önemli ölçüde farklılık gösterdiği ve uygun şekilde değerlendirilmesi gerektiği bildirilmiştir (Puech ve ark., 2015). Bu sebeple qRT-PCR ile gen ekspresyonunun kantifikasyonu için çoklu referans genler ile normalizasyonun gerektiği bildirilmiştir (Puech ve ark., 2015). qRT-PCR analizlerinde kullanılması için house-keeping genlerin belirlenmesinde yapılan bir çalışmaya (Puech ve ark., 2015) göre sığır koyun ve keçilere ait PBMC hücrelerinde birkaç sitokin ve house-keeping genlerin analizinin yapıldığı bildirilmiştir. PBMC hücrelerinde *IL-4*, *IL-10*, *IL-12*, *IFN- γ* ve *TNF α* sitokinleri ve *β -actin*, *GAPDH*, *H3F3A*, *PPIA* ve *YWHAZ* house-keeping genlerin ifade analizi çalışmasından elde edilen sonuçlar geNorm ve Normfinder programlarında analiz edilmiş ve sığırdaki PBMC hücrelerinde en stabil genin *β -actin* olduğu bildirilmiştir (Puech ve ark., 2015). Koyuna ait referans genlerden ise en stabil genlerin *GAPDH*, *β -actin* ve *PPIA* olduğu bildirilmiştir (Puech ve ark., 2015). Keçi'de ise en stabil referans

genin β -actin ve YWHAZ olduğu bildirilmiştir. (Puech ve ark., 2015). Domuzlarda bronkoalveolar makrofajların in vitro çalışmasında LPS ve LTA uygulaması sonrası housekeeping genlerden olan *BM2*, *BLM*, *GAPDH*, *HPRT1*, *PPIA*, *RPL4*, *SDHA*, *TBP*, *YWHAZ* genleri üzerinde gen ekspresyonu çalışması (Çınar ve ark., 2012) yapılmıştır. Domuzlarda gen ekspresyonu çalışmalarında *SDHA*, *YWHAZ* ve *RPL4* genlerinin normalizasyon için en ideal genler olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda *GAPDH* ve β -actin genleri Puech ve ark. (2015) yapmış oldukları çalışmaya göre belirlenmiş ve normalizasyonları bu iki genin geometrik ortalaması (Vandesompele ve ark., 2002) alınarak yapılmıştır. Çalışmamızda elde edilen veriler koyunlarda *GAPDH* ve β -actin referans genlerinin PBMC ile ilgili araştırmalarda başarıyla kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

İnsan biyolojisini taklit eden hayvan modelleri, temel bilim bulgularının klinik uygulamaya başarılı bir şekilde aktarılması için önemlidir. Kemirgen modelleri, mikrobiyal ürünlere karşı insan immün yanıtının önemli özelliklerini taklit etmediği için eleştirilmiştir (Enkhbaatar ve ark., 2015). LPS uygulaması sonucu insan ve koyun kanına ait gen ekspresyonu tepkilerinin microarray teknolojisi kullanılarak karşılaştırıldığı bir araştırmada (Enkhbaatar ve ark., 2015) insanda 11431, koyunda ise 4992 ifade edilen gen tespit edilmiştir. Bunlar arasında 1029 insan ve 175 koyun geninin, 1,5 katlık bir değişim sıklığında farklı olarak ifade edildiği bildirilmiştir. Aynı araştırmada 175 koyun geninden 54'ünün insana ait genlerle ortolog olduğu kaydedilmiş, bu genler arasında 22 insan geninde >1.5 kat değişiklik olduğu, *IL-1*, *IL-6* ve *IL-8*, *TNF α* , *NF- κ B*, *ETS2*, *PTGS2*, *PTX3*, *CXCL16*, *KYNU* ve *CLEC4E* gibi major enflamatuvar mediyatör genlerinde benzer şekilde (>2-kat) LPS ile ekspresyon seviyesinde artış olduğu bildirilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada (Enkhbaatar ve ark., 2015) koyuna ait bağışıklık sistemi genleri ile insana ait genler arasındaki benzerliğin koyunda bağışıklık sistemi ile yapılacak çalışmalarda insan içinde model olabileceği vurgulanmıştır. Dolayısıyla çalışmada elde ettiğimiz çıktıların insanlar üzerindeki araştırmalar için de referans olacağı ve katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında koyunlarda intranazal yolla uygulanan LTA ve LPS dozlarının ayrı ayrı ve bir arada uygulanmasının PBMC'lerdeki TLR sinyal yolağında bulunan genlere ait etki mekanizması zamansal olarak incelenmiştir. Ayrı uygulanan dozların, 24. saatte incelenen genlerden *TLR2* ve *TLR4*'ün mRNA ekspresyon

seviyelerinde artış sağladığı, karışım dozunun uygulandığı grupta ise ekspresyon seviyesinin en yüksek seviyeye ulaştığı belirlenmiştir. Ayrıca uygulama sonrası 7. günde bu genlere ait ölçülen ekspresyon seviyesinin tüm gruplarda düşmüş olmasının da uygulanan etkenlere ait dozların aktifliğini bu zaman diliminde yitirdiğinin bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. Dolayısıyla intranazal yolla uygulanan deneysel uygulamanın koyun bağışıklık sistemini PBMC hücrelerinde 24. saat zaman diliminde aktiveleştirdiği 7. günde ise aktivitesini yitirdiği belirlenmiştir. Ölçüm zaman aralığının uzun olması sebebiyle sitokin ve interleukinlere ait ekspresyon farklılıklarının daha kısa zaman aralıklarında *in vivo* ve *in vitro* planlanacak farklı çalışmalarla tespit edilebileceği düşünülmüştür.

Ülkemize ait yerli koyun ırkları ile farklı ülkelerde yetiştirilen yerli ırklar arasında hastalıklara karşı direnç farklılıklarının ortaya konulması için bağışıklık sistemi mekanizmasında görevli TLR genleri ile ilişkili farklı patojenik etkenlerin hem ekspresyon, hem de patojen-SNP ilişkisi tespitinin yapılması hususunda daha fazla araştırmanın planlanması gerekmektedir.

Yapılan deneysel uygulama dozlarının farmakoloji ve mikrobiyoloji alanlarında planlanacak *in vivo* ve *in vitro* ilaç ve aşı geliştirilmesi çalışmalarına yardımcı olabileceği, ayrıca elde edilen sonuçlara göre hem çiftlik hayvanlarında görülen solunum sistemi enfeksiyöz hastalıkları yönünden hem de koyunun biyomodel hayvan olması bakımından insan ile ilgili planlanacak çalışmalara da katkı sağlayabileceği sonucuna varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Aderem A, Underhill DM. Mechanism of Phagocytosis in Macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999; 17(1): 593-623.
- Akçapınar H, Özbeyaz C, Ünal N. Kuzu Eti Üretimine Uygun Ana ve Baba Hatlarının Geliştirilmesinde Akkaraman, Sakız ve Kıvırcık Koyun Irklarından Yararlanma İmkanları I. Akkaraman Koyunlarda Döl Verimi, Akkaraman, Sakız x Akkaraman F1 ve Kıvırcık x Akkaraman F1 Kuzularda Yaşama Gücü ve Büyüme. *Turk J Vet Anim Sci* 2000; 24: 71-79.
- Akçapınar H. Koyun Yetiştiriciliği. Birinci baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, 1994: 163-165.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 2004; 4(7): 499-511.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006; 124(4): 783-801.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Pathogens and Innate immunity, In: *Molecular Biology of the cell*. Fourth edition, Garland Science, New York, 2002: 1363-1462.
- Amadori M, Soares-Filipe JF, Riva F, Vitali A, Ruggeri J, Lacetera N. Characterization of the blastogenic response to LPS of bovine peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One* 2018; 13: 1-17.
- Anderson KV, Jürgens G, Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: Genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 1985; 42(3): 779-789.

- Arat S, Taş A, Aktopraklıgil D. Türkiye Yerli Evcil Hayvan Genetik Kaynaklarından Bazılarının In Vitro Korunması Ve Ön Moleküler Tanımlanması - I (Türkhaygen - I) Proje Özeti 2004-2013.
- Aste-Amezaga M, Ma X, Sartori A, Trinchieri G. Molecular Mechanisms of the Induction of IL-12 and Its Inhibition by IL-10. *J Immunol* 1998; 160: 5936-5944.
- Atanasova K, Van der Gucht S, Barbé F, Duchateau L, Van Reeth K. Lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* exacerbates respiratory disease in porcine respiratory coronavirus-infected pigs. *Vet J* 2011; 188(2): 210-215.
- Bell S. Respiratory Diseases in Sheep 1. Diferantial diagnoss and epidemiology. In *Practice* 2008; 30: 200-207.
- Bendixen PH, Shewen PE, Rosendal S, Wilke BN. Toxicity of *Haemophilus pleuropneumoniae* for porcine lung macrophages, peripheral blood monocytes, and testicular cells. *Infect Immun* 1981; 33(3): 673-676.
- Beutler B, Hoebe K, Du X, Ulevict RJ. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol* 2003; 74(4): 479-485.
- Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: The story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(2): 169-176.
- Bhakdi S, Klonisch T, Nuber P, Fischer W. Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect Immun* 1991; 59(12): 4614-4620.
- Bilgen N, Cinar Kul B, Offord V, Werling D, Ertugrul O. Determination of Genetic Variations of Toll-Like Receptor (TLR) 2, 4, and 6 with Next-Generation Sequencing in Native Cattle Breeds of Anatolia and Holstein Friesian. *Diversity* 2016; 8(4): 23.
- Bishop SC, Morris CA. Genetics of disease resistance in sheep and goats. *Small Rumin Res* 2007; 70(1): 48-59.
- Bishop SC. Disease resistance, Genetics. In: Ullrey DE, Baer CK, Pond WG (eds), *Encyclopedia of Animal Science*. Second edition, CRC Press, New York, 2011: 288-290.

- Bishop SC. Genetic resistance to infections in sheep. *Vet Microbiol* 2015; 181(1-2): 2-7.
- Brigham KL, Meyrick B. Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133(5): 913-927.
- Burns K, Janssens S, Brissoni B, Olivos N, Beyaert R, Tschopp J. Inhibition of Interleukin 1 Receptor/Toll-like Receptor Signaling through the Alternatively Spliced, Short Form of MyD88 Is Due to Its Failure to Recruit IRAK-4. *J Exp Med* 2003; 197: 263-268.
- Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 1996; 383(6599): 443-446.
- Carey AJ, Tan CK, Ulett GC. Infection-induced IL-10 and JAK-STAT: A review of the molecular circuitry controlling immune hyperactivity in response to pathogenic microbes. *JAK-STAT* 2012; 1(3): 159-167.
- Carroll JA, Burdick NC, Chase CC, Coleman SW, Spiers DE. Influence of environmental temperature on the physiological, endocrine, and immune responses in livestock exposed to a provocative immune challenge. *Domest Anim Endocrinol* 2012; 43(2): 146-153.
- Chang JS, Huggett JF, Dheda K, Kim LU, Zumla A, Rook GA. Mycobacterium tuberculosis induces selective up-regulation of TLRs in the mononuclear leukocytes of patients with active pulmonary tuberculosis. *J Immunol* 2006; 176(5): 3010-3018.
- Chang JS, Russell GC, Jann O, Glass EJ, Werling D, Haig DM. Molecular cloning and characterization of Toll-like receptors 1-10 in sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 127(1-2): 94-105.
- Cinar MU, Islam MA, Uddin MJ, Tholen E, Tesfaye D, Looft C, Schellander K. Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in porcine alveolar macrophages in response to LPS and LTA. *BMC Res Notes* 2012; 5(1): 107.
- Clark EL, Bush SJ, McCulloch MEB, Farquhar IL, Young R, Lefevre L, Pridans C, Tsang HG, Wu C, Afrasiabi C, Watson M, Whitelaw CB, Freeman TC,

- Summers KM, Archibald AL, Hume DA. A high resolution atlas of gene expression in the domestic sheep (*Ovis aries*). PLoS Genet 2017; 13(9): e1006997.
- Davies G, Genini S, Bishop SC, Giuffra E. An assessment of opportunities to dissect host genetic variation in resistance to infectious diseases in livestock. Animal, 2009; 3(3): 415-436.
- De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J Exp Med 1991; 174: 1209-1220.
- Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM. Roitt's Temel Immunoloji. Elenventh edition, Blackwell Publishing, UK, 2008: 1-111.
- Deng S, Wu Q, Yu K, Zhang Y, Yao Y, Li W, Deng Z, Liu G, Li W, Lian Z.. Changes in the Relative Inflammatory Responses in Sheep Cells Overexpressing of Toll-Like Receptor 4 When Stimulated with LPS. PLoS One 2012; 7(10): 47118.
- Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. Biotechnology 2004; 37(1):112-114, 116, 118-119.
- Diez-Tascón C, Keane OM, Wilson T, Zadissa A, Hyndman DL, Baird DB, McEwan JC, Crawford AM. Microarray analysis of selection lines from outbred populations to identify genes involved with nematode parasite resistance in sheep. Physiol Genomics 2005; 21(1): 59-69.
- Doan T, Melvold R, Viselli S, Waltenbaugh C. Lippincott's Illustrated Reviews: Immunology. Second edition, William and Wilkins, Baltimore 2013: 3-199.
- Dunne A, O'Neill LAJ. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. Sci STKE, 2003; 171: 3.
- Echchannaoui H, Frei K, Schnell C, Leib SL, Zimmerli W, Landmann R. Toll-Like Receptor 2-Deficient Mice Are Highly Susceptible to *Streptococcus pneumoniae* Meningitis because of Reduced Bacterial Clearing and Enhanced Inflammation. J Infect Dis 2002; 186(6): 798-806.

- Ehrentraut H, Meyer R, Schwederski M, Ehrentraut S, Velten M, Grohé C, Knuefermann P, Baumgarten G, Boehm O. Systemically Administered Ligands of Toll-Like Receptor 2, -4, and -9 Induce Distinct Inflammatory Responses in the Murine Lung. *Mediators Inflamm* 2011; 2011: 1-12.
- Enkhbaatar P, Nelson C, Salsbury JR, Carmical JR, Torres KEO, Herndon D, Prough DS, Luan L, Sherwood ER. Comparison of Gene Expression by Sheep and Human Blood Stimulated with the TLR4 Agonists Lipopolysaccharide and Monophosphoryl Lipid A. *PLoS One* 2015; 10(12): e0144345.
- Erganiş O. *Epidemiyoloji, Mimoza Yayınları, İstanbul, 2001: 98*
- Ertuğrul M, Akın O A, Yıldırım M, Dellal G, Togan İ, Pabuçcuoğlu S, Koyuncu M, Öner Y, Yılmaz O, Koncagül S, Pehlivan E, Kiraz S, Elmacı C, Dağ B, Özder M. Türkiye Çiftlik Hayvanları Genetik Kaynaklarının Krounması ve Sürdürülebilir Kullanımı, Türkiye Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi. 12-16 Ocak 2015, Ankara, 212-236.
- Fang X, Liu X, Meng C, Fu Y, Wang X, Li B, Tu F, Zhao F, Ren S. Breed-linked polymorphisms of porcine toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 and the primary investigation on their relationship with prevention against *Mycoplasma pneumoniae* and bacterial LPS challenge. *Immunogenet* 2013; 65(11): 829-834.
- Fantuzzi G, Dinarello CA. The inflammatory response in interleukin-1 beta-deficient mice: comparison with other cytokine-related knock-out mice. *J Leukoc Biol* 1996; 59(4): 489-493.
- Farrell RE. *RNA Methodologies: Laboratory Guide for Isolation and Characterization*. Fourth edition, Elsevier/Academic Press, New York, 2010: 57.
- Fenton MJ, Golenbock DT. LPS-binding proteins and receptors. *J Leukoc Biol* 1998; 64(1): 25-32.
- Fenwick BW, Osburn BI. Immune responses to the lipopolysaccharides and capsular polysaccharides of *Haemophilus pleuropneumoniae* in convalescent and immunized pigs. *Infect Immun* 1986; 54(2): 575-582.
- Fernandez SF, Fung C, Helinski JD, Alluri R, Davidson BA, Knight PR. Low ph

- environmental stress inhibits lps and lta-stimulated proinflammatory cytokine production in rat alveolar macrophages. *Biomed Res Int*, 2013; 2013: 1-13.
- Fischer W. Physiology of Lipoteichoic Acids in Bacteria. *Adv Microb Physiol* 1988; 29(C): 233-302.
- Frost RA, Nystrom GJ, Lang CH. Lipopolysaccharide regulates proinflammatory cytokine expression in mouse myoblasts and skeletal muscle. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 2015; 283(3): 698-709.
- Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 2006; 8 (2): 3.
- Galanos C, Rietschel ET, Lüderitz O, Westphal O. Interaction of Lipopolysaccharides and Lipid A with Complement. *Eur J Biochem* 1971; 19(1): 143-152.
- Galdiero F, De L'Ero GC, Benedetto N, Galdiero M, Tufano MA. Release of cytokines induced by *Salmonella typhimurium* porins. *Infect Immun* 1993; 61(1): 155-161.
- Gallego C, Romero S, Esquinas P, Patiño P, Martínez N, Iregui C. Assessment of *Pasteurella multocida* A Lipopolysaccharide, as an Adhesin in an In Vitro Model of Rabbit Respiratory Epithelium. *Vet Med Int* 2017; 2017: 1-13.
- Gao Y, Flori L, Lecardonnel J, Esquerré D, Hu ZL, Teillaud A, Lemonnier G, Lefèvre F, Oswald IP, Rogel-Gaillard C. Transcriptome analysis of porcine PBMCs after in vitro stimulation by LPS or PMA/ionomycin using an expression array targeting the pig immune response. *BMC Genomics* 2010; 11(1): 1-25.
- Gerondakis S, Grossmann M, Nakamura Y, Pohl T, Grumont R. Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knockouts. *Oncogene* 1999; 18(49): 6888-6895.
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osbourne BE. Kuby, Janis Immunology. Fourth Edition, W.H. Freeman, New York, 2000: 227-298.
- Hancock REW, Scott MG. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97(16): 8856-8861.
- Hans M, Hans VM. Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review. *J Oral Sci* 2011; 53(3): 263-271.

- Herndon CN, Foreyt WJ, Srikumaran S. Differential expression of interleukin-8 by polymorphonuclear leukocytes of two closely related species, *Ovis canadensis* and *Ovis aries*, in response to *Mannheimia haemolytica* infection. *Infect Immun* 2010; 78(8): 3578-3584.
- Heumann D, Barras C, Severin A, Glauser MP, Tomasz A. Gram-positive Cell Wall Stimulate Synthesis of Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-6 by Human Monocytes. *Infect immun* 1994; 62(7): 2715-2721.
- Heumann D, Glauser MP, Calandra T. Molecular basis of host-pathogen interaction in septic shock. *Curr Opin Microbiol* 1998; 1(1): 49-55.
- Hillman NH, Moss TJM, Nitsos I, Kramer BW, Bachurski CJ, Ikegami M, Jobe AH, Kallapur SG. Toll-like receptors and agonist responses in the developing fetal sheep lung. *Pediatr Res* 2008; 63(4): 388-393.
- Hinds CA, Niehaus AJ, Premanandan C, Rajala-Schultz PJ, Rings DM, Lakritz J. Characterization of the contributions of Hp-MMP 9 to the serum acute phase protein response of lipopolysaccharide challenged calves. *BMC Vet Res* 2014; 10(1): 1-9.
- Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ. Cutting Edge: Repurification of Lipopolysaccharide Eliminates Signaling Through Both Human and Murine Toll-Like Receptor 2. *J Immunol* 2000; 165(2): 618-622.
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Jr CAJ. Phylogenetic Perspectives Immunity in Innate. *Science* 2014; 284(5418): 1313-1318.
- Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Quantitative Expression of Toll-Like Receptor 1-10 mRNA in Cellular Subsets of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Sensitivity to CpG Oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168(9): 4531-4537.
- Horvath CM. The Jak-STAT pathway stimulated by interferon gamma. *Sci STKE*, 2004; 23(260).
- Hoshino K, Kaisho T, Iwabe T, Takeuchi O, Akira S. Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int Immunol*

2002; 14(10): 1225-1231.

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. J Immunol 1999; 162: 3749-3752.

Hsieh CH, Yang JCS, Jeng JC, Chen YC, Lu TH, Tzeng SL, Wu YC, Wu C, Rau CS. Circulating microRNA signatures in mice exposed to lipoteichoic acid. J Biomed Sci 2013; 20(1): 1-11.

http://www.ensembl.org/Ovis_aries/Gene/Summary?g=ENSOARG00000005792;r=2:5857967-5868004;t=ENSOART00000006304. Erişim Tarihi: 20.05.2019.

http://www.ensembl.org/Ovis_aries/Transcript/Summary?db=core;g=ENSOARG00000000483;r=22:22192336-22198265;t=ENSOART00000000516. Erişim Tarihi: 20.05.2019.

<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA/visualize>. Erişim Tarihi: 20.05.2019.

http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1002. Erişim Tarihi: 20.05.2019.

https://www.ensembl.org/Ovis_aries/Gene/Sequence?db=core;g=ENSOARG000000012021;r=4:31412389-31416357;t=ENSOART000000013079. Erişim Tarihi: 20.05.2019.

https://www.ensembl.org/Ovis_aries/Gene/Sequence?db=core;g=ENSOARG000000006292;r=12:3820935-3824667;t=ENSOART000000006848. Erişim Tarihi: 20.05.2019.

https://www.ensembl.org/Ovis_aries/Gene/Summary?db=core;g=ENSOARG000000015044;r=17:3837859-3840213;t=ENSOART000000016373. Erişim Tarihi: 03.03.2019.

https://www.ensembl.org/Ovis_aries/Gene/Summary?db=core;g=ENSOARG000000001031;r=19:11552444-11553764;t=ENSOART000000001104. Erişim Tarihi: 20.05.2019.

https://www.ensembl.org/Ovis_aries/Gene/Summary?db=core;g=ENSOARG000000019079;r=15:65149135-65166747;t=ENSOART000000020775. Erişim Tarihi: 20.05.2019.

https://www.ensembl.org/Ovis_aries/Gene/Summary?db=core;g=ENSOARG000000008333;r=20:26855182-26856951;t=ENSOART000000009066. Erişim Tarihi: 20.05.2019.

https://www.ensembl.org/Ovis_aries/Gene/Summary?db=core;g=ENSOARG000000020866;r=3:60023514-60034494;t=ENSOART000000022733. Erişim Tarihi: 20.05.2019.

https://www.ensembl.org/Ovis_aries/Gene/Summary?db=core;g=ENSOARG000000001958;r=3:151527165-151535188;t=ENSOART000000002109. Erişim Tarihi: 20.05.2019.

https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=hsa04620&show_description=show. Erişim Tarihi: 03.03.2019.

https://www.miltenyibiotec.com/_Resources/Persistent/6d7e0fb8a3eab613958d142051e3c7050eb0c8a9/SP_MC_PB_density_gradient.pdf. Erişim Tarihi: 22.07.2019.

https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?interface=All&term=Lipoteich*&N=0&mode=match+partialmax&focus=product&lang=en®ion=TR, Erişim Tarihi: 16.06.2019.

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=LPS&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=en®ion=TR&focus=product>, Erişim tarihi: 16.06.2019

<https://www.tarimorman.gov.tr/HAYGEM/Belgeler/Hayvanc%C4%B1l%C4%B1k/K%C3%BC%C3%A7%C3%BCkba%C5%9F%20Hayvanc%C4%B1l%C4%B1k/Koyun%20Yeti%C5%9Ftiricili%C4%9Fi/Yerli%20Koyun%20Irkclar%C4%B1.pdf>. Erişim Tarihi: 20.05.2019.

Hultmark D. Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994; 199(1): 144-146.

Ishida T, Mizushima S, Azuma S, Kobayashi N, Tojo T, Suzuki K, Aizawa S, Watanabe T, Mosialos G, Kieff E, Yamamoto T, Inoue J. Identification of TRAF6, a Novel Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor Protein That Mediates Signaling from an Amino-terminal Domain of the CD40 Cytoplasmic

- Region. *J Biol Chem* 1996; 271(46): 28745-28748.
- Islam MA, Cinar MU, Uddin MJ, Tholen E, Tesfaye D, Looft C, Schellander K. Expression of Toll-like receptors and downstream genes in lipopolysaccharide-induced porcine alveolar macrophages. *Vet Immunol Immunopathol* 2012; 146(1): 62-73.
- Janeway CA, Medzhitov R. Innate Immune Recognition. *Annu Rev Immunol*, 2002; 20(1): 197-216.
- Janeway CA. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989; 54: 1-13.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology*. Fifth edition, Garland Science, New York, 2001: 13-448.
- Joss A, Akdis M, Faith A, Blaser K, Akdis CA. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. *Eur J Immunol*, 2000; 30(6): 1683-1690.
- Kapetanovic R, Fairbairn L, Downing A, Beraldi D, Sester DP, Freeman TC, Tuggle CK, Archibald AL, Hume DA. The impact of breed and tissue compartment on the response of pig macrophages to lipopolysaccharide. *BMC Genomics* 2013; 14(1): 581.
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*, 1999; 11(1): 115-122.
- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunol* 2010; 11(5): 373-384.
- Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* 2014; 5: 461.
- Kaymakçı M, Sönmez R. İleri Koyun Yetiştiriciliği. Ege Üniversitesi Basımevi Bornova-İzmir, 1996: 361.
- Keller R, Fischer W, Keist R, Bassetti S. Macrophage response to bacteria: Induction of marked secretory and cellular activities by lipoteichoic acids. *Infect Immun*, 1992; 60(9): 3664-3672.

- Kennerman E. Koyunlarda Solunum Sistemi Hastalıklarına Klinik Yaklaşım. Türkiye Klinikleri Veteriner Bilimleri-İç Hastalıkları - Özel Konular, 2017; 3(1): 38-46.
- Kimbrell DA, Beutler B. The evolution and genetics of innate immunity. *Genetics* 2001; 2: 256-267.
- Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Kuby Immunology*. Sixth edition, W. H. Freeman Company, New York, 2007: 1-271.
- Kirschning CJ, Wesche H, Ayres TM, Rothe M. Human Toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med*, 1998; 188(11): 2091-2097.
- Kopp EB, Medzhitov R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1999; 11(1): 13-18.
- Küçük M, Akçapınar H. Akkaraman ve Alman Siyah Başlı Etçi x Akkaraman Melezi (F1) Koyunların Süt Verimi Özellikleri. *Lalahan Hayv Araştırma Enst Dergisi* 1999; 39(1): 33-42.
- Lefort J, Motreff L, Vargaftig BB. Airway administration of Escherichia coli endotoxin to mice induces glucocorticosteroid-resistant bronchoconstriction and vasopermeation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24(3): 345-351.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/Cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86(6): 973-983.
- Leng R A. Decline in available world resources; implications for livestock production systems in Asia. *Livestock Research for Rural Development* 20 (1). Australia. 2008. ISSN 0121-3784.
- Levinson W. *Review of Medical Microbiology and immunology*. Ninth edition, McGraw-Hill 2008: 391-401.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001; 25(4): 402-408.
- Lord KA, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. *Oncogene* 1990; 5(7): 1095-1097.

- Ma Y, Weis JJ. *Borrelia burgdorferi* outer surface lipoproteins OspA and OspB possess B- cell mitogenic and cytokine-stimulatory properties. *Infect Immun* 1993; 61(9): 3843-3853.
- Majewska M, Szczepanik M. The role of toll-like receptors (TLR) in innate and adaptive immune responses and their function in immune response regulation. *Postepy Hig Med Dosw* 2006;60: 52-63.
- Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt I. *Immunology* (7 th ed), Elsevier Limited, USA, 2008: 127-243.
- Mangan DF, Wahl SM, Sultzer BM, Mergenhagen SE. Stimulation of human monocytes by endotoxin-associated protein: Inhibition of programmed cell death (apoptosis) and potential significance in adjuvanticity. *Trends Immunol* 1992; 60(4): 1684-1686.
- Mattsson E, Rollof J, Verhoef J, Van Dijk H, Fleer A. Serum-induced potentiation of tumor necrosis factor alpha production by human monocytes in response to staphylococcal peptidoglycan: Involvement of different serum factors. *Infect Immun* 1994; 62(9): 3837-3843.
- McGuire K, Jones M, Werling D, Williams JL, Glass EJ, Jann O. Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine Toll-like receptors. *Anim Genet* 2006; 37(1): 47-50.
- Meadows JRS, Hiendleder S, Kijas JW. Haplogroup relationships between domestic and wild sheep resolved using a mitogenome panel. *Heredity* 2011; 106(4): 700-706.
- Medzhitov R, Janeway CAJ. Innate immunity: Minireview the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997; 91(3): 295-298.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388(6640): 394-397.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 1998; 2(2): 253-258.

- Mundan D, Özbeyaz C. Akkaraman. Kıvırcık x Akkaraman (G1) ve Sakız x Akkaraman (G1) Koyunlarda Süt Verimi Özellikleri ile Kuzularda Büyüme ve Yaşama Gücü. *Lalahan Hayvan Araştırma Enstitüsü Dergisi* 2004; 44(2): 23-35.
- Murphy K. Janeway's immunobiology. Eighth edition, Garland Science, New York, 2011: 1-122.
- Muzio M, Natoli G, Sacconi S, Levrero M, Mantovani A. The Human Toll Signaling Pathway: Divergence of Nuclear Factor κ B and JNK/SAPK Activation Upstream of Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 6 (TRAF6). *J Exp Med* 1998; 187(12): 2097-2101.
- Myhre AE, Stuestol JF, Dahle MK, Overland G, Thiemermann C, Foster SJ, Lilleaasen P, Aasen AO, Wang JE. Organ injury and cytokine release caused by peptidoglycan are dependent on the structural integrity of the glycan chain. *Infect Immun* 2004; 72(3): 1311-1317.
- Naito A, Yoshida H, Nishioka E, Satoh M, Azuma S, Yamamoto T, Nishikawa S, Inoue J. TRAF6-deficient mice display hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99(13): 8766-8771.
- Nefefe T, Liebenberg J, van Kleef M, Steyn HC, Pretorius A. Innate immune transcriptomic evaluation of PBMC isolated from sheep after infection with *E. ruminantium* Welgevonden strain. *Mol Immunol* 2017; 91: 238-248.
- Netea MG, Nold-petry CA, Nold MF, Joosten LAB, Opitz B, Meer JHM, Veerdonk FL Van De, Ferwerda G, Heinhuis B, Devesa I, Funk CJ, Mason RJ, Kullberg BJ, Rubartelli A, Meer JWM Van Der, Dinarello CA. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1_{NL} in monocytes and macrophages. *Blood* 2009; 113: 1-3.
- Ohnishi T, Muroi M, Tanamoto K-I. MD-2 is necessary for the toll-like receptor 4 protein to undergo glycosylation essential for its translocation to the cell surface. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10(3): 405-410.
- Opp MR, Smith EM, Hughes TK. Interleukin-10 (cytokine synthesis inhibitory factor) acts in the central nervous system of rats to reduce sleep. *J Neuroimmunol* 1995; 60(1-2): 165-168.

- Oppenheim JJ. Cytokines, their Receptors and Signals. In: *The Autoimmune Diseases: Fifth Edition* 2013: 229-241.
- Özcan L. Koyunculuk. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı. Mesleki Yayınlar Kitabı, Ankara, Türkiye, 1990: 343; 15.
- Pai AB, Patel H, Prokopenko AJ, Alsaffar H, Gertzberg N, Neumann P, Punjabi A, Johnson A. Lipoteichoic Acid from *Staphylococcus aureus* Induces Lung Endothelial Cell Barrier Dysfunction: Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *PLoS One* 2012; 7(11): e49209.
- Pasparakis BM, Alexopoulou L, Episkopou V, Kollias G. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* 1996; 184(4): 1397-1411.
- Passmore MR, Byrne L, Obonyo NG, See Hoe LE, Boon AC, Diab SD, Dunster KR, Bisht K, Tung JP, Fauzi MH, Narula M, Pedersen SE, Esguerra-Lallen A, Simonova G, Sultana A, Anstey CM, Shekar K, Maitland K, Suen JY, Fraser JF. Inflammation and lung injury in an ovine model of fluid resuscitated endotoxemic shock. *Respir Res* 2018; 19(1): 231.
- Pfaffl M, Horgan G, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 2002; 30(9): e36.
- Poltorak A, Smirnova I, He X, Liu MY, Van Huffel C, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Du X, Thompson P, Chan EKL, Ledesma J, Roe B, Clifton S, Vogel SN, Beutler B. Genetic and physical mapping of the *Lps* locus: Identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis* 1998; 24: 340-355.
- Pourahmad J, Salimi A. Isolated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), a Cost Effective Tool for Predicting Immunosuppressive Effects of Drugs and Xenobiotics. *Iran J Pharm Res* 2015; 14(4): 979.
- Puech C, Dedieu L, Chantal I, Rodrigues, V. Design and evaluation of a unique SYBR Green real-time RT-PCR assay for quantification of five major cytokines in

- cattle, sheep and goats. *BMC Vet Res* 2015; 11(1): 1-14.
- Pugin J, Heumann ID, Tomasz A, Kravchenko VV, Akamatsu Y, Nishijima M, Glauser MP, Tobias PS, Ulevitch RJ. CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity* 1994; 1(6): 509-516.
- Raetz C. Biochemistry Of Endotoxins. *Annu Rev Biochem* 1990; 59(1): 129-170.
- Rakhshandeh A, de Lange CFM. Evaluation of chronic immune system stimulation models in growing pigs. *Animal* 2012; 6(02): 305-310.
- Rask-Andersen A, Malmberg P, Lundholm M. Endotoxin levels in farming: absence of symptoms despite high exposure levels. *Br J of Industrial Med* 1989; 46: 412-416.
- Reddi K, Reddi K, Wilson M, Poole S, Meghji S, Henderson B. Relative cytokine-stimulating activities of surface components of the oral periodontopathogenic bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Cytokine* 1995; 7(6): 534-541.
- Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am* 1992; 267(2): 54-61.
- Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1994; 78(4): 681-692.
- Ryder ML. Sheep. In: Mason IL (eds), *Evolution of Domesticated Animals*, Longman Group Limited, New York, 1984: 63-84.
- Schröder NWJ, Morath S, Alexander C, Hamann L, Hartung T, Zähringer U, Göbel UB, Weber JR, Schumann RR. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem* 2003; 278(18): 15587-15594.
- Schumann RR, Tapping RI. Genomic variants of TLR1 - It takes (TLR-)two to tango. *Eur J Immunol* 2007; 37(8): 2059-2062.
- Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Cj K. Peptidoglycan and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem*

1999; 274: 17406-17409.

Signore A. About inflammation and infection. *EJNMMI Res* 2013; 3(1): 1-2.

Singh A, Prasad M, Mishra B, Manjunath S, Sahu AR, Bhuvana Priya G, Wani SA, Sahoo AP, Kumar A, Balodi S, Deora A, Saxena S, Gandham RK. Transcriptome analysis reveals common differential and global gene expression profiles in bluetongue virus serotype 16 (BTV-16) infected peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in sheep and goats. *Genomics Data* 2017; 11: 62-72.

Singh Suri S, Janardhan KS, Parbhakar O, Caldwell S, Appleyard G, Singh B. Expression of toll-like receptor 4 and 2 in horse lungs. *Vet Res* 2006; 37(4):541-551.

Song J, Duncan MJ, Li G, Chan C, Grady R, Stapleton A, Abraham SN. A novel TLR4-mediated signaling pathway leading to IL-6 responses in human bladder epithelial cells. *PLoS Pathog* 2007; 3(4): 541-552.

Spellerberg B, Prasad S, Cabellos C, Burroughs M, Cahill P, Tuomanen E. Penetration of the blood-brain barrier: enhancement of drug delivery and imaging by bacterial glycopeptides. *J Exp Med* 1995; 182(4): 1037-1043.

Standiford TJ, Arenberg DA, Danforth JM, Kunkel SL, VanOtteren GM, Strieter RM. Lipoteichoic acid induces secretion of interleukin-8 from human blood monocytes: A cellular and molecular analysis. *Infect Immun* 1994; 62(1): 119-125.

Suzuki N, Suzuki S, Duncan GS, Millar DG, Wada T, Mirtsos C, Takada H, Wakeham A, Itie A, Li S, Penninger JM, Wesche H, Ohashi PS, Mak TW, Yeh WC. Severe impairment of interleukin-1 and toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 2002; 416(6882): 750-754.

Tai KF, Ma Y, Weis JJ. Normal human B lymphocytes and mononuclear cells respond to the mitogenic and cytokine-stimulatory activities of *Borrelia burgdorferi* and its lipoprotein OspA. *Infect Immun* 1994; 62(2): 520-528.

Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004; 16: 3-9.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-

376.

- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; 11(4): 443-451.
- Togan İ, Soysal İ, Berkman CC, Koban E. Irkların korunmasında moleküler işaretler. *Trakya Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 2005; 2(1): 44-49.
- Togbe D, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Couillin I, Maillet I, Bihl F, Malo D, Ryffel B, Quesniaux VFJ. TLR4 gene dosage contributes to endotoxin-induced acute respiratory inflammation. *J Leukoc Biol* 2006; 80(3): 451-457.
- Tufano MA, Rossano F, Catalanotti P, Liguori G, Capasso C, Ceccarelli MT, Marinelli P. Immunobiological activities of *Helicobacter pylori* porins. *Infect Immun* 1994; 62(4): 1392-1399.
- Turner MD, Nedja B, Hurts T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signaling and inflammatory disease. *Biochemica and Biophysica Acta* 2014; 1843(11): 2563-2582.
- Uddin MJ, Nuro-Gyina PK, Islam MA, Tesfaye D, Tholen E, Looft C, Schellander K, Cinar MU. Expression dynamics of Toll-like receptors mRNA and cytokines in porcine peripheral blood mononuclear cells stimulated by bacterial lipopolysaccharide. *Vet Immunol Immunopathol* 2012; 147(3-4): 211-222.
- Underhill DM. Toll-like receptors: Networking for success. *Eur J Immunol* 2003; 33(7): 1767-1775.
- Van GS, Labarque G, Van RK. The combination of PRRS virus and bacterial endotoxin as a model for multifactorial respiratory disease in pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 102(3): 165-178.
- Varma TK, Toliver-Kinsky TE, Lin CY, Koutrouvelis AP, Nichols JE, Sherwood ER. Cellular mechanisms that cause suppressed gamma interferon secretion in endotoxin-tolerant mice. *Infect Immun* 2001; 69(9): 5249-5263.
- Wakabayashi G, Gelfand JA, Jung WK, Connolly RJ, Burke JF, Dinarello CA. *Staphylococcus epidermidis* induces complement activation, tumor necrosis factor and interleukin-1, a shock-like state and tissue injury in rabbits without

- endotoxemia: Comparison to *Escherichia coli*. *J Clin Invest* 1991; 87(6): 1925-1935.
- Werling D, Coffey TJ. Pattern recognition receptors in companion and farm animals - The key to unlocking the door to animal disease? *Vet J* 2007; 174(2): 240-251.
- Wyns H, Plessers E, De Backer P, Meyer E, Croubels S. In vivo porcine lipopolysaccharide inflammation models to study immunomodulation of drugs. *Vet Immunol Immunopathol* 2015; 166(3-4): 58-69.
- Xu C, Chen G, Yang W, Xu Y, Xu Y, Huang X, Liu J, Feng Y, Xu Y, Liu, B. Hyaluronan ameliorates LPS-induced acute lung injury in mice via Toll-like receptor (TLR) 4-dependent signaling pathways. *Int Immunopharmacol* 2015; 28(2): 1050-1058.
- Xu X, Jia C, Luo S, Li Y, Xiao F, Dai H, Wang C. Effect of HA330 resin-directed hemoadsorption on a porcine acute respiratory distress syndrome model. *Ann Intensive Care* 2017; 7(1): 84.
- Xue D, Ma Y, Li M, Li Y, Luo H, Liu X, Wang Y. *Mycoplasma ovipneumoniae* induces inflammatory response in sheep airway epithelial cells via a MyD88-dependent TLR signaling pathway. *Vet Immunol Immunopathol* 2015; 163(1-2): 5742.
- Yalçın BC. Özel Zootekni (Koyun ve Keçi Yetiştirme-Ders Notları). İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları. İstanbul, 1990: 16-18.
- Yang R-B, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M, Goddard A, Wood WI, Gurney AL, Godowski PJ. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 1998; 395(6699): 284-288.
- Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002; 24; 415(6870): 389-395.
- Zeder MA. Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105(33): 11597-11604.



T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(EÜHADYEK)



Tarih: 15.02.2017

Toplantı Sayısı: 02

Karar No:17/009

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 15.02.2017 tarihinde
Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü	İmza
Fahri OĞUZKAYA	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Fusun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Serpil SARIÖZKAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Ahmet ÖZTÜRK	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
Zühal HAMURCU	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
M. Betül AYCAN	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	KATILMADI
Nükhet KÜTÜK	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	KATILMADI
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Yard.Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi	KATILMADI
Hamiyet ÜNAL	Yard.Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Osman İBİŞ	Yard.Doç. Dr.	Ziraat Fakültesi	
Zeynep SOYER SARICA	Dr.	Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.	
Serap ALTUNTAŞ EROĞLU	Avukat	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	KATILMADI
Asiye GÖKBELEN	Yardım Sevenler Derneği Başkanı	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	KATILMADI

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik A.D.'dan Doç. Dr. Bilal AKYÜZ tarafından sunulan "Yerli ve Kültür Irkı Koyunlarda Bağışıklık Sisteminin Genetik Mekanizmasının İn Vivo Olarak Araştırılması." başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 15.02.2017

Etik kurul Başkan Vekili : Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA

İmza :

KOYUNLARDA BAĞIŞIKLIK MEKANİZMASI İLE İLİŞKİLİ BAZI GENLERİN PERİFERAL TEK ÇEKİRDEKLİ KAN HÜCRELERİNDE (PBMC) REAL-TİME EKSPRESYON ANALİZİ YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

ORIJINALLIK RAPORU

%**4**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**3**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**2**

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

Alomari , Reem Abdullah Matar Alhamed.
"Serum Cytokines in Hepatitis C Virus Patients =
السيتوكينات في مصل دم المرضى المصابين بالفيروس الكبدي
سي", King Abdulaziz University : Scientific
Publishing Centre, 2016

Yayın

%**1**

2

www.studyblue.com
İnternet Kaynağı

<%**1**

3

www.tipharma.com
İnternet Kaynağı

<%**1**

4

www.berkeleybop.org
İnternet Kaynağı

<%**1**

5

www.slideshare.net
İnternet Kaynağı

<%**1**

6

www.avekon.org
İnternet Kaynağı

<%**1**

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Esmâ Gamze AKSEL

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 25 Ekim 1987, Kars

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90 352 207 66 66 - 29593

Fax: +90 352 337 27 40

email: gamzeilgar@erciyes.edu.tr

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Genetik anabilim Dalı, 38280
Talas/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	S Ü Veteriner Fak.	2010
Lise	Anamur Süper Lisesi (Y.D.A.)	2004

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2012- Halen	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi	Araştırma Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

SCI,SSCI,AHCI Indekslerine Giren Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Bayram D., Akyüz B., Arslan K., Özdemir F., Aksel E.G., Çınar M.U., "DGAT1, CAST and IGF-I Gene Polymorphisms in Akkaraman Lambs and Their Effects on Live Weights up to Weaning Age", KAFKAS UNIVERSITESI VETERINER FAKULTESI DERGISI, vol.1, pp.1-1, 2019
2. Metin Kiyici J., Arslan K., Akyüz B., Kaliber M., Aksel E.G. , Çınar M.U., "Relationships between Polymorphisms of Growth Hormone, Leptin and Myogenic Factor 5 Genes with Some Milk Yield Traits in Holstein Dairy Cows", INTERNATIONAL JOURNAL OF DAIRY TECHNOLOGY, vol.1, pp.1-1, 2018
3. Çınar M.U., Hizlisoy H., Akyüz B., Arslan K., Aksel E.G. , Gümüşsoy K.S., "Polymorphisms in Toll-like receptor (TLR) 1, 4, 9 and SLC11A1 genes and their association with paratuberculosis susceptibility in Holstein and indigenous crossbred cattle in Turkey", JOURNAL OF GENETICS, vol.1, pp.1-1, 2018
4. Arslan K., Aksel E.G. , Akyüz B., Çınar M.U., "Polymorphisms of TLR1, TLR4 and SLC11A1 Genes in Some Cattle Breeds Reared in Turkey", TARIM BİLİMLERİ DERGISI-JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCES, vol.1, pp.1-1, 2018
5. Çınar M.U., Akyüz B., Metin Kiyici J., Arslan K., Kaliber M., Aksel E.G. , "Effects of GH-AluI and MYF5-TaqI Polymorphisms on Weaning Weight and Body Measurements in Holstein Young Bulls", KAFKAS UNIVERSITESI VETERINER FAKULTESI DERGISI, vol.1, pp.1-8, 2018
6. Arslan K., Akyüz B., Akçay A., Aksel E.G. , Macun H.C., Çınar M.U., "Association of Number of Artificial Inseminations Per Pregnancy in Holstein Dairy Cows With Polymorphism in Luteinizing Hormone Receptor And Follicle Stimulating Hormone Receptor Genes", Slovenian Veterinary Research, vol.54, pp.91-98, 2017
7. Arslan K., Özdemir F., Aksel E.G. , Akyüz B., "Döl Tutma Problemi Olan Holştayn Irkı Sığırlarda Sitogenetik ve Moleküler Genetik Taramalar", Tarım Bılımleri Dergisi-Journal Of Agricultural Sciences, vol.22, pp.370-376, 2016

8. Çınar M.U., Arslan K., İlgar E.G. , Akyüz B., "Determination of Toll-Like Receptor 1 Gene Polymorphisms in Zavot, Turkish Grey, East Anatolian Red, Anatolian Black and South Anatolian Red Cattle Breeds", Journal Of Agricultural Science, vol.4, pp.352-355, 2016
9. Aslan Ö., Arslan K., Keleş I., Akyüz B., Uluşan M., İlgar E.G. , et al., "The Relationship Between von Willebrand Factor Gene and von Willebrand Factor Antigen Levels in Dogs", Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, vol.22, pp.585-590, 2016
10. Çınar M.U., Akyüz B., Arslan K., Aksel E.G. , "Genotyping of the kappa-casein and beta-lactoglobulin genes in Anatolian water buffalo by PCR-RFLP", International Journal Of Dairy Technology, vol.69, pp.308-311, 2016
11. Aslan Ö., Karaca Bekdik I., İlgar E.G. , "Mycoplasma haemofelis Infection and Imaging of Mycoplasma haemofelis Using Scanning Electron Microscopy in a Cat", Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, vol.21, pp.131-134, 2015

Diğer Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Aksel E. G. , Arslan K., Özdemir F., Akyüz B., "Türkiye’de yetiştirilen bazı sığır ırklarında MBL-1 gen polimorfizminin araştırılması", Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, cilt.32, ss.25-30, 2019
2. Arslan K., Akyüz B., Aksel E.G. , Özdemir F., Çınar M.U., "Türkiye’de Yetiştirilen Kıl ve Halep Keçilerinde Beta-Laktoglobulin (B-LG)/SacII Polimorfizminin Belirlenmesi", Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, cilt.14, ss.107-112, 2017
3. Akyüz B., Arslan K., Aksel E.G., "Türkiye’de Yetiştirilen Anadolu Mandalarında Butirofilin (BTN1A1) Gen Polimorfizminin HaeIII Restriksiyon Enzimi ile Araştırılması", Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, cilt.14, ss.11-16, 2017
4. Arslan K., Akyüz B., İlgar E.G. , "Kayseri Şehir Merkezinde Kasap ve Marketlerde Satışa Sunulan Sığır Etlerinde PCR Yöntemi ile Cinsiyet Tayini", Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, no.2, ss.75-79, 2015

Hakemli Kongre/Sempozyum Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar

1. Çınar M.U., Akyüz B., Hizlisoy H., Sohel M.M.H., Arslan K., Aksel E.G. , et al., "Toll Like Receptor 1 (tlr1 +1380 G/a) Snp Was Associated With With Paratuberculosis Susceptibility In Holstein And Indigenous Crossbred Cattle In Turkey", International Agricultural Science Congress, VAN, TÜRKİYE, 9-12 Mayıs 2018, pp.0-0
2. Aksel E.G. , Arslan K., Akçay A., Gümüşsoy K.S., Akyüz B., Çınar M.U., "Yerli Kara Ve Dogu Anadolu Kırmızısı Irkı Sığırlarda Tüberküloz Görülme Oranı Ile Tlr1, Tlr4, Tlr9 Ve Slca11a1 Genleri Arasındaki İlişkinin Araştırılması", Eurasian Conference On Biological And Chemical Sciences (eurasianbiochem 2018) Ankara,, ANKARA, TÜRKİYE, 26-27 Nisan 2018, pp.424-424
3. Metin Kiyici J., Akyüz B., Kaliber M., Arslan K., Aksel E.G. , Çınar M.U., "Interactions of GH, STAT5A, MYF5 gene polymorphisms with milk somatic cell counts, electrical conductivity and pH ", 10. International Animal Science Conference, ANTALYA, TÜRKİYE, 25-27 Ekim 2018, vol.1, no.1, pp.1-1
4. Metin Kiyici J., Çınar M.U., Akyüz B., Arslan K., Aksel E.G. , Kaliber M., "Relationships Between Milk Quality and Milk Yield-Composition ", Uluslararası Hayvansal Gıdalar Kongresi, GİRNE, KUZHEY KIBRIS TÜRK CUM., 10-13 Kasım 2016, pp.14-14
5. Özdemir F., Arslan K., Aksel E.G. , Akyüz B., "The Relationship of DNA Methyltransferase 3a Gene Expression Profile of Live Weight, Hot and Cold Carcass Weight in The Simmental and Brown Swiss Cattle Breeds Which Grown in Turkey ", 3rd International VETİSTANBUL Group Congress 2016, Saray Bosna, BOSNA HERSEK, 17-20 Mayıs 2016, pp.51-51
6. Akyüz B., İlgar E.G. , Arslan K., Gümüşsoy K.S., Özdemir F., Çınar M.U., "Investigation on Tuberculosis Disease and TLR1 (+1380 G/A) and TLR1 (+1446 C/A) Genotypes in Turkish Native Crossbred Cattle", 3rd International VETİSTANBUL Group Congress 2016, Saray Bosna, BOSNA HERSEK, 17-20 Mayıs 2016, pp.52-52

7. Arslan K., Özdemir F., İlgar E.G. , Akçay A., Akyüz B., "Simental ve İsviçre Esmeri Irkı Erkek Sığırlarda Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR?) ve Fatty Acid Synthase (FASN) Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması", VI. Ulusal Veteriner Zootekni Kongresi 1-4 Haziran 2016, Kapodakya, Nevşehir, Türkiye, 1-4 Haziran 2016, ss.63-64
8. Aslan Ö., Arslan K., Keleş I., Akyüz B., Uluşan M., İlgar E.G. , et al., "The relationship between von Willebrand factor gene and von Willebrand factor antigen levels in dogs", 7TH Balkan Conference on Animal Science Balnımalcon 2015, Saraybosna, BOSNA HERSEK, 3-6 Haziran 2015, pp.104-104
9. Arslan K., Özdemir F., Akyüz B., İlgar E.G. , "Investigation of Robertsonian Translocation in Repeat Breeder Holstein", 5. National Veterinary Animal Science Congress, BURDUR, BURDUR, TÜRKİYE, 29 Mayıs - 1 Haziran 2014, ss.143-143
10. Arslan K., Akyüz B., Eraslan Şakar A. , İlgar E.G. , "Determination of STAT5A/AvaI gene polymorphism on Holstein, Simmental and Brown Swiss cattles.", Dairy Cattle Symposium with International Participation, KAYSERİ, TÜRKİYE, 23-24 Nisan 2014, pp.42-42
11. Metin Kiyici J., Akyüz B., Arslan K., Kaliber M., İlgar E.G. , Çınar M.U., "Investigation on Milk Composition Traits And Growth Performance In Holstein Cows And Their Association With Some Genetic Markers", Uluslararası Katılımlı Süt Sığırcılığı Sempozyumu, Kayseri, Türkiye, Kayseri, Türkiye, 23-24 Nisan 2014, pp.20-20
12. İlgar E.G. , Akyüz B., Arslan K., "Determination of Beta-lactoglobulin (β -LG) gene polymorphism on The Brown Swiss, Simmental and Holstein cattles which grown in Turkey", Dairy Cattle Symposium with International Participation, Kayseri, Türkiye, 23-24 Nisan 2014, pp.0-0
13. Akyüz B., Arslan K., Dari M., İlgar E.G. , "Investigation of Kappa-Casein (?-CN) and Beta-Lactoglobulin (β -LG) Gene Polymorphisms in Anatolian Water Buffaloes", V. National Veterinary Animal Science Congress, Burdur, Burdur, Türkiye, 29 Mayıs - 1 Haziran 2014, ss.139-139

14. Akyüz B., Arslan K., İlgar E.G. , Gülzari B., "Investigation of Beta-Lactoglobulin (β -LG) Gene Polymorphism in Turkish Native Cattle Breeds", 5. National Veterinary Animal Science Congress, Burdur, Burdur, Türkiye, 29 Mayıs - 1 Haziran 2014, ss.141-141
15. Arslan K., Akyüz B., İlgar E.G. , "A PCR Assay for Sex Determination of Cattle (bos taurus) Meat Samples which collected from Kayseri Region in Middle Anatolia", The 2nd International Symposium on "Traditional Foods from Adriatic to Caucasus", Ohrid, MAKEDONYA, 24-26 Ekim 2013, vol.TFP, no.2639, pp.340-340

