

T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNERLİK PARAZİTOLOJİSİ ANABİLİM DALI

***THEILERIA ANNULATA* İLE DOĞAL ENFEKTE  
SIĞIRLARIN DOLAŞIMINDAKİ EKSOZOMAL  
MİCRORNA'LARIN KARAKTERİZASYONU,  
EKSPRESYON PROFİLLERİ VE FONKSİYONEL  
ÖNEMLERİ**

Hazırlayan  
Vet. Hek. Sadullah USLU

Danışman  
Prof. Dr. Önder DÜZLÜ

Doktora Tezi

Aralık 2023  
KAYSERİ



T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNERLİK PARAZİTOLOJİSİ ANABİLİM DALI

***THEILERIA ANNULATA* İLE DOĞAL ENFEKTE  
SIĞIRLARIN DOLAŞIMINDAKİ EKSOZOMAL  
MİKRORNA'LARIN KARAKTERİZASYONU,  
EKSPRESYON PROFİLLERİ VE FONKSİYONEL  
ÖNEMLERİ**

Hazırlayan  
Vet. Hek. Sadullah USLU

Danışman  
Prof. Dr. Önder DÜZLÜ

Doktora Tezi

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2022-11726 nolu proje ile desteklenmiştir.

Aralık 2023  
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: Sadullah USLU**

**İmza :**

## YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

**“*Theileria annulata* ile Doğal Enfekte Sığırların Dolaşımındaki Eksozomal microRNA’ların Karakterizasyonu, Ekspresyon Profilleri ve Fonksiyonel Önemleri”**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

**Tezi Hazırlayan**

**Sadullah USLU**

**Danışman**

**Prof. Dr. Önder DÜZLÜ**

**Anabilim Dalı Başkanı**

**Prof. Dr. Önder DÜZLÜ**

**Prof. Dr. Önder DÜZLÜ** danışmanlığında **Sadullah USLU** tarafından hazırlanan **“Theileria annulata ile Doğal Enfekte Sığırların Dolaşımındaki Eksozomal microRNA’ların Karakterizasyonu, Ekspresyon Profilleri ve Fonksiyonel Önemleri”**, konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Parazitoloji** Anabilim Dalı’nda **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

22/12/2023

**JÜRİ :**

**İmza**

**Danışman:** Prof. Dr. Önder DÜZLÜ

**Üye:** Prof. Dr. Hamza AVCIOĞLU

**Üye:** Prof. Dr. Süleyman AYPAK

**Üye:** Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

**Üye:** Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM

**ONAY**

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

...../...../.....

**Prof. Dr. Bilal AKYÜZ**

**Enstitü Müdürü**

## TEŞEKKÜR

Başta tez konumun seçilmesinden çalışmalarımın yürütülmesine kadar her aşamasında her zaman desteğini gördüğüm, doktora eğitimime başladığım günden itibaren maddi ve manevi desteğini her zaman hissettiğim, her türlü bilgi birikimini ve tecrübelerini aktaran akademik ortamda sonsuz desteğiyle gelişmeme katkıda bulunan değerli danışman hocam Prof. Dr. Önder DÜZLÜ'ye en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Tez çalışmamın başlangıcından sonuna kadar ilgisini ve önerilerini göstermekten kaçınmayan, kıymetli bilgi ve birikimlerinin ışığında hep yol gösterici olan, çalışmamın laboratuvar analizlerinde karşılaştığım güçlükler karşısında çözüm odaklı önerileri ile yardımlarını her an hissettiğim ve bu yolda özveriyle emek verip öğrenmeyi, araştırmayı ve kendimi daha da geliştirmeme katkı sağlayan ve en önemlisi bu yolda bana inanması, fedakârlıklar gösterip hem maddi hem manevi desteği ile her daim yanımda hisettiğim değerli hocam Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM'a sonsuz teşekkürü bir borç bilirim. Parazitoloji Anabilim Dalı'nda çalışmaya başladığım günden bu yana desteğini gördüğüm değerli hocalarım Prof. Dr. Abdullah İNCİ, Doç. Dr. Zuhâl ÖNDER, Doç. Dr. Arif ÇİLOĞLU ve Araş. Gör. Dr. Gamze YETİŞMİŞ'e, çalışma süresince laboratuvar analizlerinde yardımlarını esirgemeyen emeği geçen isimleri saymadığım Anabilim Dalımızdaki çalışma arkadaşlarıma ve malzeme bazında TDK-2022-11726 kodlu proje ile çalışmaya destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Doktora hayatım boyunca beni destekleyen bir YÖK 100/2000 Doktora Projesi bursiyeri olarak Yükseköğretim Kurulu Başkanlığına teşekkür ederim.

Ayrıca saha örneklem çalışması boyunca bana yardımcı olan Veteriner Hekim Yasin YILMAZER, Veteriner Hekim Mustafa Mercan, Veteriner Hekim Kadir ŞEN ve Veteriner Teknikeri İsmail HODUL'a teşekkür ederim. Bunun yanında saha ve laboratuvar çalışmalarım süresince bana yardım eden, gecelere kadar saha

örneklerinin işlenmesinde yanımda olan on yıllık dostum, kardeşim, değerli arkadaşım Abdullah MERT'e çok teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde büyük fedakârlıklar gösterip beni destekleyerek her an yanımda olan başta aileme olmak üzere tüm dost ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimim süresince benden desteğini esirgemeyen ve çalışmalarımda beni sabırla destekleyen ve bir an olsun yanımdan ayrılmayan ailemizin en küçüğü kardeşim Muhammet USLUĞ'a sonsuz teşekkür ederim.



**THEILERIA ANNULATA İLE DOĞAL ENFEKTE SIĞIRLARIN  
DOLAŞIMINDAKİ EKSOZOMAL MİKRO RNA'LARIN  
KARAKTERİZASYONU, EKSPRESYON PROFİLLERİ VE FONKSİYONEL  
ÖNEMLERİ**

**Vet. Hek. Sadullah USLU**

**T.C. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı**

**Doktora Tezi, Aralık 2023**

**Danışman: Prof. Dr. Önder DÜZLÜ**

**ÖZET**

*Theileria annulata*'nın (*T. annulata*) neden olduğu tropikal theileriosis, vektör kenelerle bulaşan ve tüm dünyada sığırlarda yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden ekonomik öneme sahip bir protozoon hastalığıdır. *T. annulata*, sığır B lenfositleri ve miyeloid hücrelerde immortalizasyon, hiper proliferasyon ve yayılma ile karakterize kanser benzeri lökoma transformasyona yol açma yeteneği ile öne çıkan yegâne bir protozoon parazittir. *T. annulata*'nın bu yeteneğini açıklamak üzere önce yapılmış çalışmaların çoğu parazit ile çeşitli transkripsiyon faktörlerinin yapısal aktivasyonu arasındaki ilişkiye odaklanmıştır. Diğer yandan eksozomlar ve içerdikleri microRNA'ların (miRNA) *T. annulata*'nın hücrel ve biyopatolojik gelişimi üzerindeki regülatör fonksiyonlarıyla ilgili olarak hücre kültürü temelinde sınırlı araştırmalar yapılmış ve bazı miRNA'ların önemli fonksiyona sahip olduğu gösterilmiştir. Diğer yandan *T. annulata* ile doğal enfekte sığırların dolaşımındaki eksozomal miRNA'lar üzerine günümüze kadar herhangi bir çalışma bulunmadığı dikkati çekmiştir. Bu araştırma açığına veri sağlamak amacıyla çalışmada *T. annulata* ile doğal akut ve sublinik enfekte sığırların dolaşımındaki eksozomal miRNA'ların araştırılması hedeflenmiş olup enfekte sığırlarda *T. annulata* enfeksiyonu ile ilgili olarak farklı ifade düzeyi sergileyen miRNA'ların bulunabileceği ve bunların da parazitin hücreleri invaze etmesi ve

biyopatogenezindeki süreçlerle ilgili yollarda görev alan genlerin regülasyonunda önemli fonksiyonlara sahip olabileceği hipotez edilmiştir.

Bu kapsamda Kayseri'nin Develi ilçesine bağlı tropikal theileriosis'in endemik seyrettiği bölgelerden non-enfekte, akut ve subklinik enfekte gruplarının teşekkülü için sığırlardan örneklem gerçekleştirilmiş ve *T. annulata* yönünden teşhis paneli kullanılarak değerlendirmeleri yapılmıştır. Akut ve subklinik enfekte gruplara dahil edilen örneklerde *T. annulata* sporozoit yüzey proteini (TASP) genini içeren rekombinant plazmitler kullanılarak standartlar oluşturulmuş ve qPCR analizi ile örneklerdeki gen kopya sayısı belirlenerek parazit yükleri hesaplanmıştır. Akut, subklinik ve non-enfekte gruplar için belirlenen 15 sığıra ait serum örneklerinin beşerli olarak birleştirilmesiyle (parazit yükleri temelinde) her grup için üç replikasyon oluşturulmuş ve serum örneklerinden eksozom izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen eksozomların taramalı elektron mikroskobu (SEM), nanopartikül izleme analizi (NTA) ve Western blot analizleriyle karakterizasyonları sağlanmıştır. Eksozomal miRNA'ların karakterizasyonu amacıyla yapılan yeni nesil dizileme (NGS) analizleri sonucunda çalışma gruplarında toplam 288 bilinen 164'te potansiyel yeni miRNA tespit edilmiştir. Biyoinformatik analizlerle non-enfekte ve enfekte gruplar arasında farklı ifade sergileyen toplam 15 miRNA belirlenmiştir. NGS analizlerinde artan ifade düzeyi önemli bulunan dört miRNA'nın (bta-miR-29d, bta-miR-122, bta-miR-124a ve bta-miR-136) sığırların dolaşımındaki ekspresyonel farklılıkları ayrıca qPCR analizleriyle teyit edilmiştir. Gen ontoloji ve Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi (KEGG) analiz sonuçları ilgili miRNA'ların *T. annulata*'nın hücreleri enfekte etmesi ve transformasyonunda önemli olduğu bilinen tümör büyüme faktörü-beta (TGF-beta) ve tümör nekroz faktör (TNF) sinyal yolları başta olmak üzere serin/treonin kinaz ve mitojen aktivasyon protein kinaz (MAPK) yollarındaki genlerin regülasyonunda önemli görev aldığını göstermiştir. Çalışma ile ayrıca özellikle bta-miR-29d olmak üzere *T. annulata* ile enfekte sığırlarda ifade düzeyi önemli olan miRNA'ların hastalığın tanısında potansiyel yeni biyobelirteçler olabileceği de gösterilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Theileria annulata*, Eksozom, miRNA, Biyobelirteç, Validasyon

**CHARACTERIZATION, EXPRESSION PROFILES AND FUNCTIONAL IMPORTANCE OF EXOSOMAL MICRORNAS IN THE CIRCULATION OF NATURALLY INFECTED CATTLE WITH *THEILERIA ANNULATA***

**Sadullah USLU**

**Erciyes University, Graduate School of Health Science**

**Department of Veterinary Parasitology**

**PhD Thesis, December 2023**

**Supervisor: Prof. Dr. Onder DUZLU**

**ABSTRACT**

Tropical theileriosis caused by *Theileria annulata* (*T. annulata*) is a protozoan disease transmitted by vector ticks, exhibiting high morbidity and mortality in cattle worldwide, thus holding economic significance. *T. annulata* is an important protozoan parasite characterized by the ability to transform into cancer-like leukocytes, leading to immortalization, hyper-proliferation, and dissemination in bovine B lymphocytes and myeloid cells. Previous studies explaining this capability have primarily focused on the relationship between the structural activation of various transcription factors and the parasite. On the other hand, limited research has been conducted on the basis of cell culture regarding the regulatory functions of exosomes and the miRNAs they contain on the cellular and biopathological development of *T. annulata*, and some miRNAs have been shown to have important functions. On the other hand, it is noteworthy that there is no study to date on exosomal miRNAs in the circulation of cattle naturally infected with *T. annulata*. To address this research gap, this study aims to investigate exosomal miRNAs in the circulation of naturally acute and subclinically infected cattle with *T. annulata*. The hypothesis is that there may be miRNAs with varying expression levels related to *T. annulata* infection, and these miRNAs could play important roles in regulating genes involved in the invasion of parasite cells and the biopathogenesis processes.

In this context, cattle samples were taken from the regions where tropical theileriosis is endemic in Kayseri's Develi district, to establish non-infected, acute, and

subclinically infected groups, and they were evaluated using a diagnostic panel for *T. annulata*. Standards were created using recombinant plasmids containing the *T. annulata* sporozoite surface protein (*TASP*) gene in the samples included in the acute and subclinically infected groups, and parasite loads were calculated by determining the gene copy number in the samples with qPCR analysis. Three replications were created for each group by combining the serum samples of 15 cattle determined for the acute, subclinical, and non-infected groups (based on parasite loads) and exosome isolation was performed from the serum samples. The isolated exosomes were characterized using scanning electron microscopy (SEM), nanoparticle tracking analysis (NTA), and Western blot analysis.

Next-generation sequencing (NGS) analysis was conducted for the characterization of exosomal miRNAs. A total of 288 known and 164 potentially new miRNAs were identified across the study groups. Bioinformatic analyses revealed 15 miRNAs with differential expression between non-infected and infected groups. The increased expression levels of four miRNAs (bta-miR-29d, bta-miR-122, bta-miR-124a, and bta-miR-136) identified in NGS analyses were further confirmed by qPCR. The results of gene ontology and KEGG pathway analyses indicated that these miRNAs, particularly bta-miR-29d, are involved in the regulation of genes in signaling pathways such as TGF-beta and TNF, as well as serine/threonine kinases and MAPK pathways, which are known to be crucial in the infection and transformation of the infected cells with *T. annulata*.

The study also showed that miRNAs, whose expression levels are important in *T. annulata*-infected cattle, especially bta-miR-29d, may be potential new biomarkers in the diagnosis of the disease.

**Key words:** *Theileria annulata*, miRNA, Biomarker, Validation, Next Generation Sequencing.

# İÇİNDEKİLER

## **THEILERIA ANNULATA İLE DOĞAL ENFEKTE SIĞIRLARIN DOLAŞIMINDAKİ EKSOZOMAL MİKRORNA'LARIN KARAKTERİZASYONU, EKSPRESYON PROFİLLERİ VE FONKSİYONEL ÖNEMLERİ**

İÇ KAPAK .....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
TEŞEKKÜR .....	iv
ÖZET .....	vi
ABSTRACT .....	viii
İÇİNDEKİLER.....	x
KISALTMALAR VE SİMGELER .....	xiii
TABLolar LİSTESİ.....	xvi
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 <i>Theileria annulata</i> .....	3
2.2 <i>Theileria annulata</i> 'nın Morfolojisi .....	5
2.3 <i>Theileria annulata</i> 'nın Yaşam Döngüsü .....	7
2.4 Omurgasız Ara Konaktaki Dönem.....	8
2.5 Omurgalı Ara Konaktaki Dönem.....	10
2.6 Tropikal Theileriosis'de Tanı ve Tedavi .....	11
2.7 Klinik Bulgular ve Patogenez .....	13
2.8 Ekstraselüler Veziküller .....	15
2.9 Ekstraselüler Veziküllerin Genel Bileşimi ve İçeriği.....	18
2.9.1 Protein Bileşimi .....	18
2.9.2 RNA İçeriği .....	19
2.9.3 DNA İçeriği .....	21
2.9.4 Lipid İçeriği .....	21

2.9.5	Ekstraselüler Veziküllerin Alımı ve Biyolojik Fonksiyonları .....	22
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1	Çalışma Gruplarının Oluşturulması .....	26
3.1.1	Sığırların Örneklenmesi ve Materyal Toplanması .....	26
3.1.2	<i>Theileria annulata</i> Teşhis Paneli Değerlendirmesi, Gen Kopya Sayısı (Gcn) ve Parazit Yükünün Hesaplanması.....	27
3.1.3	Teşhis Paneli.....	27
3.2	Gruplara Dahil Edilen Sığırlarda <i>Theileria annulata</i> Gen Kopya Sayısı (GCN) ve Parazit Yükünün Hesaplanması.....	29
3.3	Çalışma Gruplarındaki Sığırlardan Serumların Eldesi, Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu.....	30
3.3.1	Serum Örneklerinden Eksozom İzolasyonu .....	31
3.3.2	Eksozomların Karakterizasyonu .....	32
3.4	Eksozomal miRNA'ların İzolasyonu ve Yeni Nesil Dizileme (NGS) Platformunda Sekanslanması.....	37
3.4.1	Serum Örneklerinden Eksozomal miRNA İzolasyonu .....	37
3.4.2	Eksozomal miRNA İzolatlarının Yeni Nesil Dizileme (NGS) Platformunda Sekanslanması.....	39
3.5	miRNA Dizileme Verilerinin Biyoinformatik Analizleri .....	40
3.5.1	Veri Ön işleme .....	40
3.5.2	Anlamlılık Testleri .....	40
3.6	<i>Theileria annulata</i> Enfeksiyonu ile İlişkili miRNA'ların RT-qPCR ile Validasyonu .....	41
4.	BULGULAR.....	44
4.1	<i>Theileria annulata</i> ile Enfekte Akut, Subklinik ve Non-enfekte Hayvanların Belirlenmesi ve Çalışma Gruplarının Oluşturulması .....	44
4.2	Çalışma Gruplarına Dahil Edilen Akut ve Subklinik Sığırlarda <i>Theileria annulata</i> Gen Kopya Sayıları (GCN) ve Parazit Yükleri Üzerine Sonuçlar .....	46
4.3	Serum Örneklerinde Eksozomların Karakterizasyon Sonuçları .....	52
4.3.1	Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Sonuçları .....	52
4.3.2	Nanopartikül İzleme Analizi (NTA) Sonuçları .....	52
4.3.3	Western Blot Analizi Sonuçları .....	53

4.4	Sığır Gruplarında Eksozomların small-RNA Profilleri.....	54
4.5	Eksozomal miRNA'ların İdentifikasyonu ve Uzunluk Analizleri.....	56
4.6	Sığır Grupları Arasında Farklı ve Ortak Bilinen miRNA'ların Dağılımı .....	60
4.7	Sığır Grupları Arasında Farklı İfade Edilen Bilinen miRNA'ların Analiz Sonuçları.....	63
4.8	<i>Theileria annulata</i> ile Enfekte Sığırlarda Farklı İfade Sergileyen miRNA'ların KEGG-Klasifikasyonu ile Sinyal Yolağı ve Gen Ontoloji (GO) Zenginleştirme Analiz Sonuçları .....	68
4.9	Gruplar Arasında Farklı İfade Gösteren, Bilinen miRNA'ların qPCR ile Validasyonu .....	74
5.	TARTIŞMA .....	81
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER .....	92
7.	KAYNAKLAR .....	94
	EKLER	
	ÖZGEÇMİŞ	

## KISALTMALAR VE SİMGELER

aa	: Amino asit
Ago	: Argonaut
BL20	: Sığır lenfosit hücre hattı 20
cDNA	: Komplementer DNA
CELLmotif	: Hüresel retansiyon dizisi
cm	: Santimetre
CYC	: Cytochrome C
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
ECF	: East Coast Fever
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ENO1	: Enolaz 1
ESCRT	: Endosomal sorting complexes required for transport
EV	: Ekstrasülüler vezikül
EV-DNA	: EV'ler içindeki DNA
EXOmotif	: Eksozom dışı aktarma dizisi
FS	: Fosfatidilserin
GAPDH	: Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz
GCN	: Gen kopya sayısı
gDNA	: Genomik DNA
GO	: Gen ontoloji
HRP	: Horsedish proksidaz
IFA	: İndirekt floresan antikor
IFAT	: İndirekt floresan antikor tekniği
IFN- $\gamma$	: İnterferon Gama
IgE	: İmmunoglobulin E
IgG	: İmmünoglobulin G
IL	: İnterlökin
ILV	: Intraluminal vesicles
JIP-2	: JNK-Interacting Protein-2

TBP	: Kene kaynaklı patojenler
kDa	: Kilodalton
KEGG	: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
kg	: Kilogram
lncRNA	: Uzun kodlamayan RNA
M	: Marker
miRNA	: Mikro Ribonükleik Asit
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
MMP9	: Matris Metallo-Proteinaz 9
mRNA	: Mesajcı RNA
mt-COI	: Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I
MVB	: Multivesicular body
ng	: Nanogram
NGS	: Yeni Nesil Dizileme
nm	: Nanometre
NTA	: Nanopartikül İzleme Analizi
PAGE	: Poliakrilamid jel
PCR	: Polymerase Chain Reaction
piRNA	: piwi ile etkileşen RNA
pmol	: Pikomol
PVDF	: Poliviniliden difluorür
RISC	: RNA nedenli susturma kompleksi
RNA	: Ribo Nükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
rpm	: Revolutions Per Minute
rRNA	: Ribozomal RNA
rRNA	: Ribozomal RNA
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
sEV	: Küçük Ekstraselüler vezikül
sn	: Saniye

snRNA	: Küçük kodlamayan RNA
<i>T.annulata</i>	: <i>Theileria annulata</i>
TASP	: <i>Theileria annulata</i> sporozoit yüzey protein
TBL20	: <i>T. annulata</i> ile enfekte sığır lenfosit hücre hattı 20
TBS	: Tris Buffered Saline
TBST	: Tris Buffered Saline Tween 20
TGF-beta	: Transforming growth factor- $\beta$
TNF	: Tumor necrosis factor
TPM	: Milyondaki transkript sayısı
tRNA	: Transfer RNA
UV	: Ultraviolet
vtRNA	: Vault RNA
$\mu\text{g}$	: Mikrogram
$\mu\text{l}$	: Mikrolitre
$\mu\text{m}$	: Mikrometre
$\mu\text{M}$	: Mikromolar

## TABLolar LİSTESİ

Sayfa

<b>Tablo 2.1</b>	Ekstraselüler veziküllerin boyut temelli kategorileri .....	17
<b>Tablo 3.1.</b>	cDNA sentezinde kullanılan stem-loop primerleri. ....	42
<b>Tablo 3.2.</b>	qPCR analizinde kullanılan miRNA primer çiftleri.....	42
<b>Tablo 4.1.</b>	Akut ve Subklinik enfekte gruplarındaki sığırlarda hesaplanan GCN ve Parazitemi düzeyleri. Aynı grupta farklı renkte gösterilmiş sığırlara ait serumlar parazitemi düzeyleri temelinde 5'erli olarak birleştirilmiş ve 3 replikasyon oluşturulmuştur. ....	50
<b>Tablo 4.2.</b>	Akut ve subklinik enfekte gruplardaki sığırların parazitemi düzeylerine göre grupların istatistiksel analizi. ....	51
<b>Tablo 4.3.</b>	Sığır serumlarından elde edilen ekzosomların okuma istatistikleri. ....	55
<b>Tablo 4.4.</b>	Sığır serumlarından elde edilen ekzosomların filtrelenmiş okuma istatistikleri. ....	55
<b>Tablo 4.5.</b>	Her bir deney grubu ve ilgili biyolojik tekrarları için elde edilen bilinen ve yeni miRNA sayıları. ....	56
<b>Tablo 4.6.</b>	Sığır gruplarında belirlenen ekzosomal bilinen ve yeni miRNA'ların uzunlukları.....	57
<b>Tablo 4.7.</b>	Sığır grupları arasında karşılaştırmalı analiz sonucunda farklı ifade edilen bilinen miRNA'lar. ....	64
<b>Tablo 4.8.</b>	Non-enfekte gruba göre akut enfekte grupta farklı ifade sergileyen miRNA'lar .....	67
<b>Tablo 4.9.</b>	Non-enfekte gruba göre subklinik enfekte grupta farklı ifade sergileyen miRNA'lar .....	67
<b>Tablo 4.10.</b>	Akut enfekte gruba göre subklinik enfekte grupta farklı ifade sergileyen miRNA'lar .....	67

<b>Tablo 4.11.</b> Non-enfekte ve akut enfekte gruplar arasında farklı ifade düzeyi sergileyen miRNA'ların KEGG yolağı analiz sonuçları .....	69
<b>Tablo 4.12.</b> Non-enfekte ve akut enfekte gruplar arasında farklı ifade düzeyi sergileyen miRNA'ların GO analiz sonuçlarına göre moleküler fonksiyon yolakları.....	70
<b>Tablo 4.13.</b> Non-enfekte ve akut enfekte gruplar arasında farklı ifade düzeyi sergileyen miRNA'ların GO analiz sonuçlarına göre hücrenel bileşen yolakları .....	72
<b>Tablo 4.14.</b> Non-enfekte ve akut enfekte gruplar arasında farklı ifade düzeyi sergileyen miRNA'ların GO analiz sonuçlarına göre biyolojik süreç yolakları.....	73
<b>Tablo 4.16.</b> bta-mir29d'un sığır gruplarında belirlenen ifade düzeyleri ve Cq değerleri.....	75
<b>Tablo 4.17.</b> bta-mir122'nin sığır gruplarında belirlenen ifade düzeyleri ve Cq değerleri .....	77
<b>Tablo 4.18.</b> bta-mir124'ün sığır gruplarında belirlenen ifade düzeyleri ve Cq değerleri.....	78
<b>Tablo 4.19.</b> bta-mir136'nın sığır gruplarında belirlenen ifade düzeyleri ve Cq değerleri .....	80

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 2.1.** *Theileria annulata*'nın coğrafi dağılımı.....5
- Şekil 2.2.** *Theileria annulata*'nın lenf aspiratından hazırlanan giemsa boyamasındaki şizont formu (orjinal).....6
- Şekil 2.3.** *Theileria annulata*'nın perifer kandan hazırlanan giemsa boyamasındaki pirolasmik formu (orjinal).....7
- Şekil 2.4.** *Theileria annulata*'nın vektör kene ve omurgalı konaktaki yaşam döngüsü (Mans ve ark., 2015'den modifiye edilmiştir).....8
- Şekil 2.5.** *Theileria annulata* sporozoitinin lenfosit ve monosit hücrelerine girişi .....11
- Şekil 2.6.** Biyojenez yoluna göre EV'lerin iki ana sınıfı (Buzás, 2022'den düzenlenmiştir). .....16
- Şekil 2.7.** EV'lerin genel etkileşim ve alım mekanizmaları (Van Niel ve ark., 2018'den düzenlenmiştir). .....23
- Şekil 3.1.** Çalışmada oluşturulan sığır grupları ve kullanılan teşhis paneli.....27
- Şekil 4.1.** Araştırma bölgesinde akut theileriosis'li sığır (orijinal).....44
- Şekil 4.2.** Akut enfekte sığırın lenf aspiratı frotisinde belirlenen *T. annulata* şizontları (B); Perifer kan frotisinde belirlenen *T. annulata* pirolasmik formları (A) (orjinal) .....45
- Şekil 4.3.** *Theileria annulata* spesifik TASP qPCR ile pozitif değerlendirilen bazı sığırlara ait amplifikasyon eğrileri (A) ve spesifik melt eğrisi (B).....46
- Şekil 4.4.** *Theileria annulata* ile subklinik enfekte belirlenen bir sığırın perifer kan frotilerinde tipik pirolasmik formlar .....46

<b>Şekil 4.5.</b> Akut ve subklinik enfekte gruplardaki sığırlara ait gDNA izolatlarının TASP PCR analizi sonucu agaroz jel üzerinde belirlenen ampliconlar .....	47
<b>Şekil 4.6.</b> Enfekte belirlenen bir sığırdaki <i>T. annulata</i> TASP gen bölgesi nükleotid sekansı .....	47
<b>Şekil 4.7.</b> TASP gen bölgesi yönünden katı besi yerinde üreyen <i>E. coli</i> hücrelerinin koloni PCR analizi sonucu belirlenen pozitif koloniler .....	48
<b>Şekil 4.8.</b> TASP rekombinant plazmid DNA ile oluşturulan standartlar ve örneklere ait genomik DNA'ların qPCR analizi sonucu belirlenen amplifikasyon (A), melt curve (B) ve standart eğrileri (C). C grafisi üzerindeki "X" sembolleri örnekleri, "O" sembolleri ise standartları ifade etmektedir. ....	49
<b>Şekil 4.9.</b> Akut ve subklinik enfekte gruplardaki sığırların parazitemi düzeylerine göre dağılım grafiği. ....	51
<b>Şekil 4.10.</b> Eksozomlardan elde edilen SEM görüntüleri (orjinal) .....	52
<b>Şekil 4.11.</b> Sığır serumlarından elde edilen eksozomların NTA ile partikül boyutu dağılımı (orjinal) .....	53
<b>Şekil 4.12.</b> Sığır serumlarından elde edilen eksozomlara ait proteinlerin Western Blot analizi sonucu (orjinal) .....	54
<b>Şekil 4.13.</b> Biyolojik tekrar düzeyinde belirlenen miRNA sayıları. ....	56
<b>Şekil 4.14.</b> Deney grubu düzeyinde belirlenen miRNA sayıları.....	57
<b>Şekil 4.15.</b> Sığır gruplarından elde edilen bilinen eksosomal miRNA'ların uzunluklarının dağılımı. ....	59
<b>Şekil 4.16.</b> Sığır gruplarından elde edilen yeni eksosomal miRNA'ların uzunluklarının dağılımı. ....	60
<b>Şekil 4.17.</b> Non-enfekte ve Akut enfekte sığır gruplarının serumlarında belirlenen bilinen miRNA'ların ikili kıyaslamalarını gösteren Venn diyagramı.....	60

<b>Şekil 4.18.</b> Non-enfekte ve subklinik enfekte sığır gruplarının serumlarında belirlenen bilinen miRNA'ların ikili kıyaslamalarını gösteren Venn diyagramı.....	61
<b>Şekil 4.19.</b> Subklinik enfekte ve akut enfekte sığır gruplarının serumlarında belirlenen bilinen miRNA'ların ikili kıyaslamalarını gösteren Venn diyagramı.....	62
<b>Şekil 4.20.</b> Non-enfekte, akut enfekte ve subklinik enfekte sığır gruplarının serumlarında belirlenen bilinen miRNA'ların kıyaslamalarını gösteren Venn diyagramı .....	63
<b>Şekil 4.21.</b> İkili karşılaştırmalarda farklı ifade edilen miRNA sayıları. ....	64
<b>Şekil 4.22.</b> Farklı ifade edilen miRNA'lara ait ısı grafiği.....	66
<b>Şekil 4.23.</b> Non enfekte ve akut Enfekte sığır grupları arasında farklı ifade edilen miRNA'ların KEGG yolağı grafisi.....	69
<b>Şekil 4.24.</b> Non enfekte ve akut enfekte sığır grupları arasında farklı ifade edilen miRNA'ların zenginleştiği moleküler fonksiyon yolakları.....	71
<b>Şekil 4.25.</b> Non enfekte ve akut enfekte sığır grupları arasında farklı ifade edilen miRNA'ların zenginleştiği hücresel bileşen yolakları.....	72
<b>Şekil 4.26.</b> Non enfekte ve akut enfekte sığır grupları arasında farklı ifade edilen miRNA'ların zenginleştiği biyolojik süreç yolakları.....	74
<b>Şekil 4.24</b> bta-mir29d amplifikasyon ve melt eğrisi.....	75
<b>Şekil 4.25</b> bta-mir29d'nin sığır grupları arasındaki ekspresyon düzeyi ve ısı haritası.....	76
<b>Şekil 4.26.</b> bta-mir122 amplifikasyon (A) ve melt eğrisi (B).....	77
<b>Şekil 4.27.</b> bta-mir122'in sığır grupları arasındaki ekspresyon düzeyi ve ısı haritası.....	77
<b>Şekil 4.28.</b> bta-mir124 amplifikasyon ve melt eğrisi .....	78
<b>Şekil 4.29.</b> bta-mir124'ün sığır grupları arasındaki ekspresyon düzeyi ve ısı haritası.....	79

<b>Şekil 4.30.</b> bta-mir136 amplifikasyon ve melt eğrisi .....	80
<b>Şekil 4.35.</b> bta-mir136 ekspresyon düzeyi ve ısı haritası .....	80



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

*Theileria annulata*'nın (*T. annulata*) neden olduğu tropikal theileriosis, tüm dünyada sığırlarda yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden büyük ekonomik öneme sahip, vektör kenelerle bulaşan bir protozoon hastalığıdır. Etken sığırlarda fatal lökoproliferatif bir hastalık tablosu şekillendirmektedir. *T. annulata* apicompleksan parazitler içerisinde myeloid, dentritik ve B hücreleri gibi konak hücrelerini transforme yeteneklerinden dolayı yeganedir. Parazitin sporozoitleri tarafından istila edildikten ve makroşizont evresi geliştikten sonra, enfekte konak hücre, kanser hücrelerine benzer özellikler gösteren kontrolsüz çoğalma ve metastaz evresine girer. *T. annulata*, konak savunma mekanizmalarını nötralize etmek ve enfektif olma, çoğalma ve yayılma kapasitelerini artırmak için sinyal kaskadlarına müdahale ederek konak hücrelerinin global gen ekspresyon modellerini değiştirebilmektedir. Parazit ayrıca konak hücrelerinin miRNomlarını kendi çıkarları doğrultusunda da manipüle edebilme yeteneğinde olduğu bazı in-vitro çalışmalarda gösterilmiştir. Diğer yandan parazit-konak ilişkisinin daha iyi anlaşılması ve *T. annulata*'nın konak hücrelerinin manuplasyonundaki moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması noktasında son yıllarda RNA tabanlı transkriptom çalışmalarının artış gösterdiği dikkati çekmektedir. Konak patojen interkasyonundan ana bir bileşeni olan gen ekspresyonlarının miRNA'lar ile posttranskripsiyonel kontrolü çeşitli bakteriyel ve viral patojenlerin yanısıra *T. annulata*'yı da içeren çeşitli parazitik protozoon ve helmintlerde önemi artan bir araştırma konusu olmuştur. Ekstrasellüler veziküllerin en önemlisi olan eksozomlar hücre-hücre iletişimde önemli rollere sahiptir ve tümör hücrelerinin vücudun başka yerlerine transferine olanak tanıyan metastatik bir niş oluşturma kapasiteleri de dahil olmak üzere onkogeneze yol açan çeşitli süreçlerdeki rolleri nedeniyle özellikle çeşitli kanser tiplerindeki fonksiyonları iyi karakterize edilmiştir. Eksozomlar, miRNA veya mesajcı RNA (mRNA) gibi protein

ve nükleik asitleri içerebilir. Türetildikleri hücre tipine bağlı olarak, hücresel iletişimdeki rolleri, kargolarının karmaşık ve dinamik doğasına bağlı olarak değişebilir. Eksozomlar, enfeksiyöz hastalıkların biyolojisinde önem kazanmaktadır ve son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar, eksozomların hem patogeneizde hem de konak bağışıklık tepkilerinin modülasyonunda önemlerini vurgulamaktadır. Eksozomlar ayrıca bağışıklık tepkilerinin başlatılması ve/veya düzenlenmesinde de rol oynar. Enfekte hücrelerden antijenik peptitlerin antijen sunan hücrelere aktarılmasına aracılık edebilir ve bağışıklık yanıtlarının indüksiyonunu ve farklılaşmasını düzenlemek için uyarıcı veya baskılayıcı sinyaller iletebilirler. Eksozomların taşıdıkları, enfeksiyonla ilişkili biyoaktif moleküllerin ileri teknolojik metotlarla identifiye edilmeleri önem arz etmektedir. Dolaşımdaki eksozomal miRNA'lar, patofizyolojik duruma bağlı olarak spesifik ekspresyon yapısı karakteristiklerinden dolayı başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıkların erken dönem teşhisinde invaziv olmayan etkin biyobelirteçler olarak kullanılmaktadırlar. Theileriosis'in mevcut kontrolü problem teşkil etmekte olup özellikle konak-parazit ilişkisindeki mekanizmaların daha iyi anlaşılmasının hastalıkla mücadele noktasında yeni yollar sunabileceği literatürde vurgulanmaktadır.

Günümüze kadar *T. annulata* ile ilgili eksozomlar ve miRNA bazlı in-vitro zeminde sınırlı sayıda araştırma yapılmış olmakla birlikte parazitin doğal konağı olan sığırlarda eksozomal miRNA'ların karakterizasyonu ile enfekte sığırlarda farklı ifade sergileyen miRNA'ların tespiti ve regüle ettikleri genlerin yolları hakkında bir araştırma yapılmamıştır. Bu tez çalışmasında *T. annulata* ile doğal akut ve subklinik enfekte sığırların dolaşımındaki enfeksiyonla ilgili eksozomal miRNA'ların non-enfekte sığırlara göre farklı ifade sergileyerek tespit edilebileceği ve bunlardan ifade düzeyi önemli bulunan miRNA'ların potansiyel yeni biyobelirteçler olabileceği hipotez edilmiştir. Çalışmada ayrıca *T. annulata* enfeksiyonuna bağlı olarak eksprese olan önemli miRNA'ların gen anotasyonları ile biyolojik proses ve yollarda zenginleştirdikleri genler ve fonksiyonları üzerine özgün çıktılar sağlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 *Theileria annulata*

Apicompleksa şubesi, omurgalılar ve omurgasızların zorunlu parazitleri olarak bilinen karmaşık ökaryotik organizmaların büyük bir grubunu içerir. Bu organizmalar, omurgalı veya omurgasız konakta parazitin istilası ve/veya yerleşmesinde rol oynadığı düşünülen sekretuar organel içeren apikal bir komplekse sahiptirler (Bishop ve ark., 2004). Şube, dört ana gruba ayrılmıştır; *Coccidia*, *Gregarinasina* (gregarins), *Haemospororida* (haemosporidianlar) ve *Piroplasmorida* (piroplazmlar) (Adl ve ark., 2012). Piroplasmorida, evcil ve vahşi hayvanların ekonomik olarak önemli hastalıklarından sorumlu olan *Babesia* ve *Theileria* olmak üzere iki ana cinsi içerir. Alman mikrobiyoloji uzmanı Robert Koch, *Theileria* soyuna dair ilk gözlemlerin tanıklığını yapmıştır. 1897 yılında Doğu Afrika'nın Tanzania şehri Darusselam bölgesinde redwater (kızıl su) hastalığını araştırırken, Giemsa boyama yöntemiyle sığır eritrositlerini inceledi. İlk başta bu hücrelerde *Babesia bigemina*'nın genç formlarını düşündü, ancak daha küçük, oval ve yuvarlak yapıdaki formlarla karşılaştı. 1901'de Güney Afrika'da patlak veren Doğu Sahil Humması (East Coast Fever-ECF) salgınıyla birlikte daha kapsamlı bir çalışma alanı buldu ve lenfosit içindeki şizont aşamalarını Koch cisimcikleri olarak tanımladı. Koch, bu türün etkeninin *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* adlı keneler olduğunu düşündü, ancak 1904'te Lounsbury, patojenin *R. appendiculatus* tarafından transtadial şekilde aktarıldığını ortaya koydu. 1904'te *Theileria*, etkeni *Piroplasma parvum* olarak adlandırdı; ancak bu isim, 1907'de Bettencourt, França ve Borges tarafından *Theileria parva* olarak değiştirildi. Gonder tarafından 1911'de *T. parva*'nın şizontları lenfositler içinde doğrulandı (Neitz, 1957; Norval ve ark., 1992). Aynı şekilde, 1904 yılında Kafkasya coğrafyasında sığır eritrositleri üzerine

araştırma yapan Dschunkowsky ve Luhs, yuvarlak olmalarından dolayı etkenleri *Piroplasma annulatum* olarak adlandırdılar. *Piroplasma annulatum*'da şizontlar tespit edilirken, *Piroplasma bigeminium*'da ise iç organlarda şizontlara rastlanmadığı belirlendi ve Bettencourt, França ve Borges tarafından *Theileria* soyuna ait *T. annulata* olarak adlandırılması kabul edildi (Norval ve ark., 1992). *T. annulata*, sığırlarda Tropikal Theileriosis'in paraziter etkenidir. Bu hastalık, sığırlarda verim kaybına, ölümlere ve buna bağlı olarak büyük ekonomik zararlara yol açar. Yerli sığırlarda hastalık genellikle çok patojenik olmasa da özellikle kültür ırkı sığırlar için patojen özellikler göstermektedir. *Theileria* soyundaki türlerin sistematik konumu henüz tam olarak özümlememiştir. Son yıllarda genetik düzeydeki ilerlemeler, Apikompleksa kökenli birçok türün genom dizilimlerinin belirlenmesini içerir ve bu, bunların sistematik konusunda yeni bilgiler sunmaktadır. *T. annulata*'nın sistematik konumu, Levine (1988)'e göre aşağıdaki gibi açıklanmıştır:

Alem: Animale

Alem altı: Protozoa

Ana: Apicomplexa

Sınıf: Sporozoea

Sınıf altı: Piroplassmia

Dizi: Piroplassmida

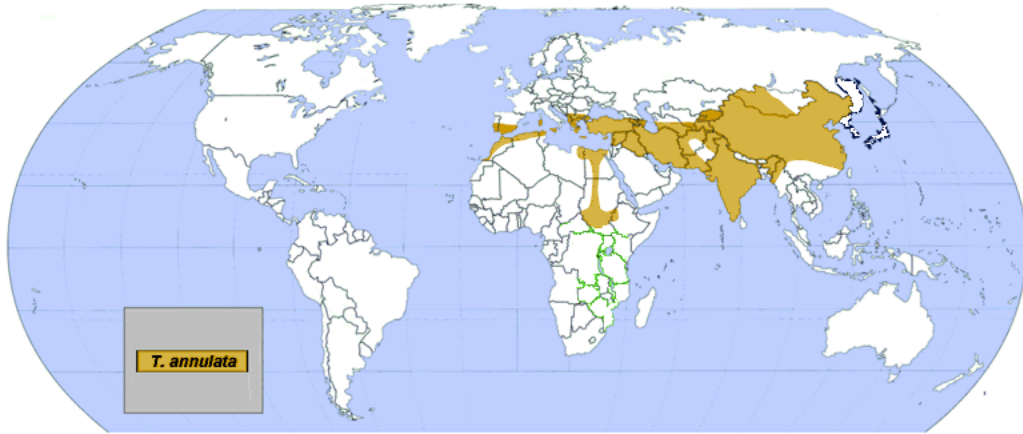
Aile: Theileriidae

Soy: *Theileria*

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

*Theileria annulata*, ilk olarak 1904 yılında Transkafkasya'daki sığırlarda keşfedildi (Dschunkowsky 1904). Parazitin omurgalı konaktaki şizont döneminin tanımlanmasıyla birlikte *T. annulata* adını aldı (Bettencourt, 1907). *T. annulata*,

tropikal theileriosis, Akdeniz sahil humması veya tropikal piroplazmosis gibi çeşitli isimlerle bilinen hastalığın etkenidir. Bu parazit, sığır, manda, zebu ve bizonların kan hücrelerini enfekte etmektedir (Mimoğlu ve ark., 1969). *T. annulata*, Kuzey Afrika, Güney Avrupa, Hindistan ve Türkiye dahil olmak üzere Orta Doğu ve Asya'da geniş bir yayılım göstermektedir (İnci ve ark., 2002) (Şekil 2.1). Hastalığın bu kadar geniş bir coğrafyada görülmesi, çevresel koşulların *T. annulata*'nın vektörü olan Hyalomma soyuna ait Ixodid keneler için uygun olmasından kaynaklanmaktadır (Purnell, 1978). Keneler tarafından taşınan hastalıklar, tropikal ve ılıman bölgelerde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (de Castro, 1997). *T. annulata*, transstadial olarak taşınan iki veya üç konaklı özellik gösteren keneler tarafından nakledilir (İnci ve ark., 2016). Hastalığın nakledilmesinde rol oynayan 15 adet Hyalomma soyuna ait tür belirlenmiştir (Robinson, 1982).

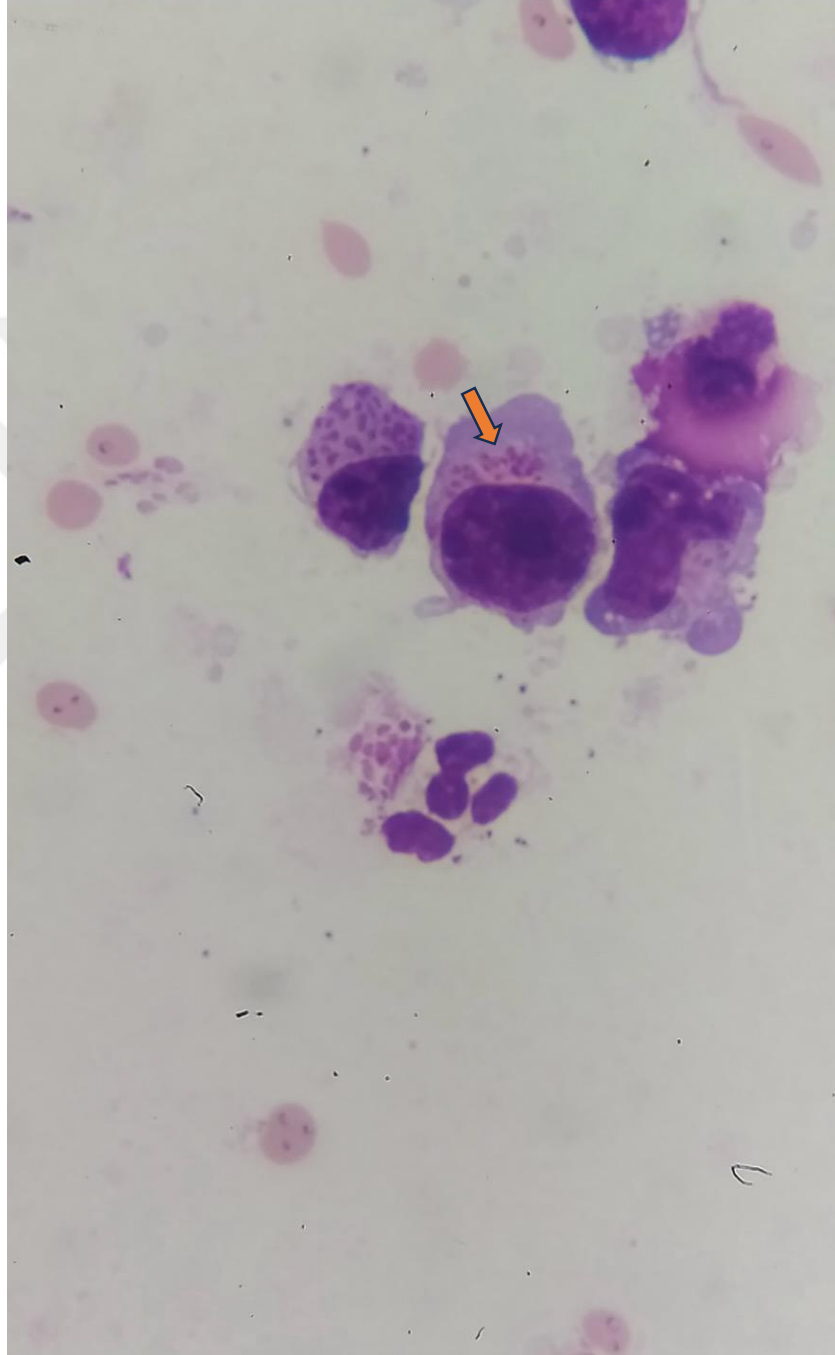


**Şekil 2.1** *Theileria annulata*'nın coğrafi dağılımı (<http://www.cfsph.iastate.edu>)

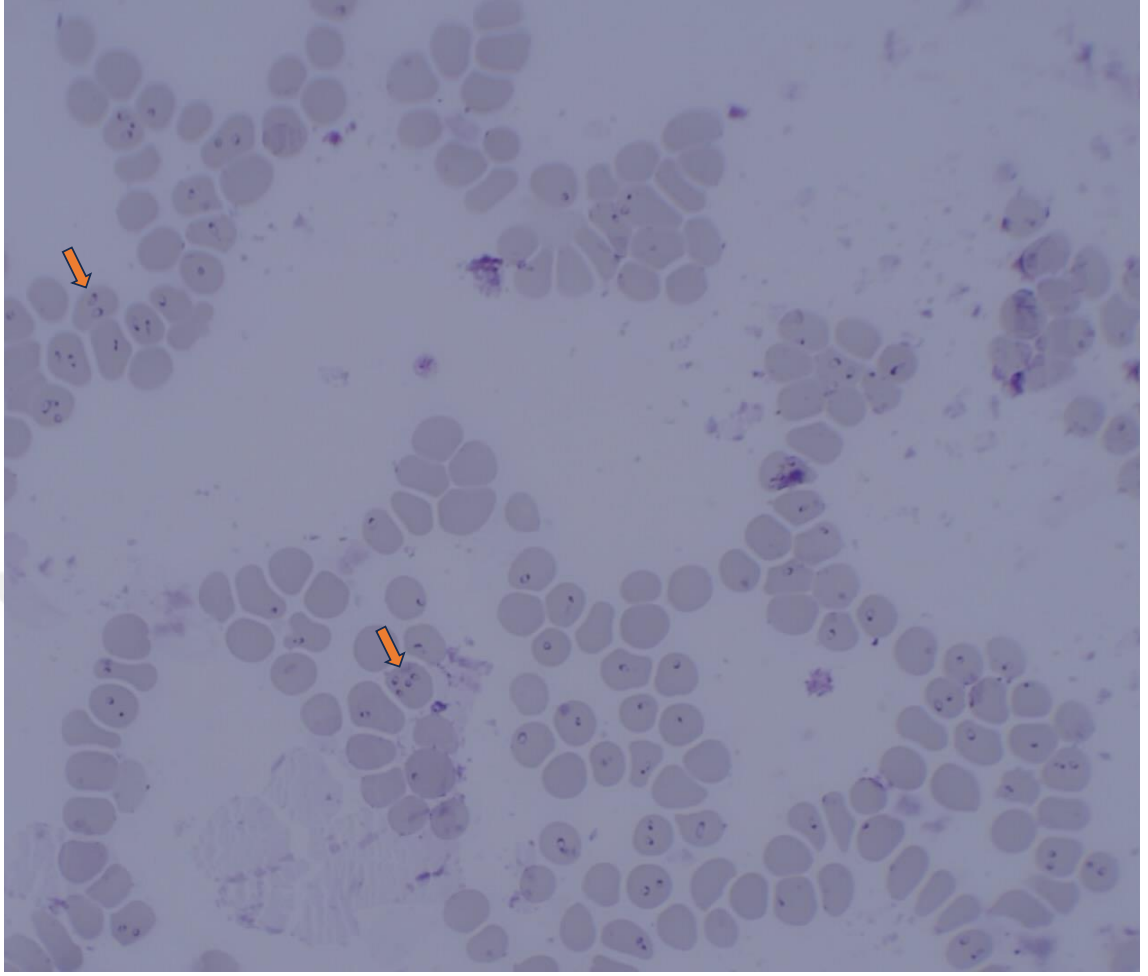
## 2.2 *Theileria annulata*'nın Morfolojisi

*Theileria* türlerinin eritrosit içinde bulunan piroplazm formları, morfolojik olarak yuvarlak, çomak, oval, haç, anaplasmoid ve virgül şekillerinde olabilmektedir (Mimoğlu ve ark., 1969, Uilenberg, 1981). *T. annulata*'nın şizont (Şekil 2.2) ve piroplazm (Şekil 2.3) (eritrositik) formları arasında morfolojik farklılıklar bulunmaktadır. Lenf yumrusu ve dalaktaki lenfositlerde bulunan şizontlar ortalama 8 µm çapındadır. Makroşizontlardaki kromatin taneleri (çekirdekler) 0.4-1.9 µm, mikroşizontların ise 0.3-0.8 µm boyutundadır. Piroplazm formlarının çoğu (%70-80)

oval, yuvarlak veya yüzük şeklindedir. *T. annulata* piroplazmaları genellikle orta boylu, yuvarlak ve oval formlarda görülür. Geri kalan etkenlerin çoğu toplu iğne veya virgül şeklindedir. Oval olanlar  $2 \times 0.6 \mu\text{m}$  boyutundadır. Bir eritrositte birden fazla piroplazm görülebilir.



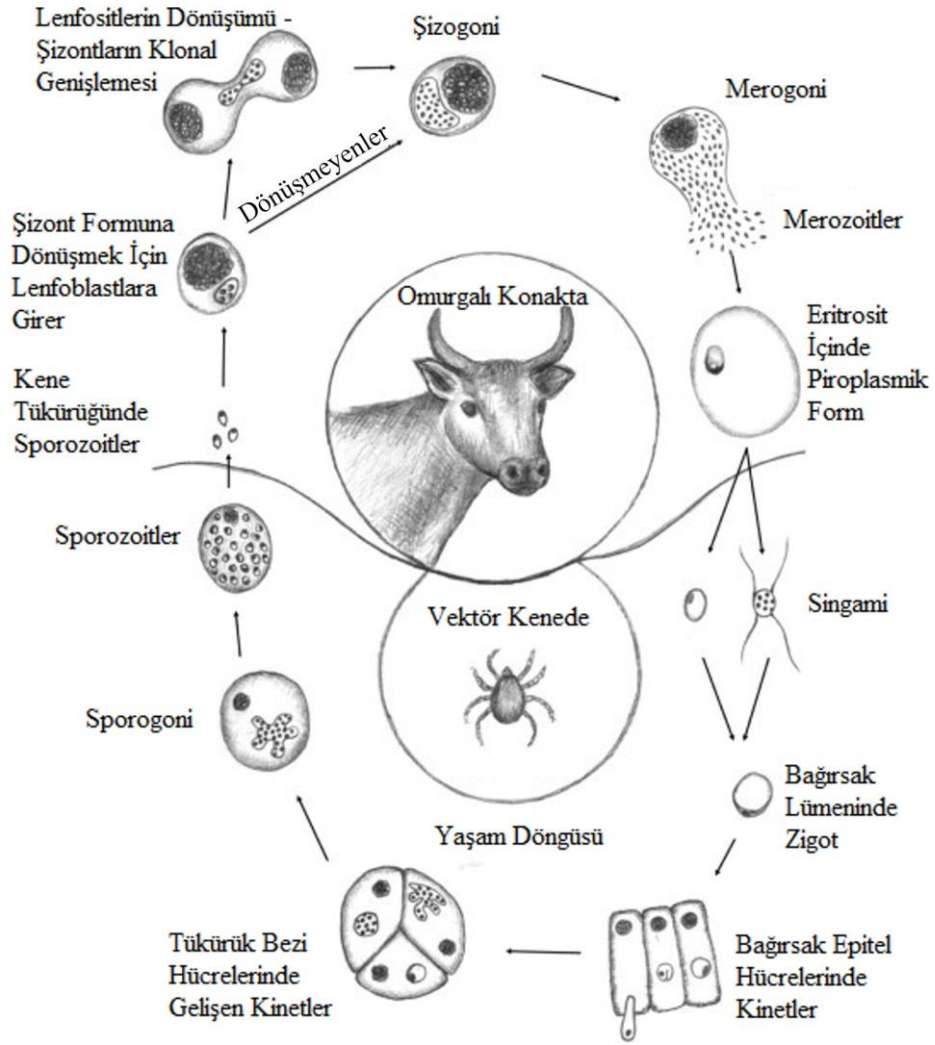
**Şekil 2.2** *Theileria annulata*'nın lenf aspiratından hazırlanan giemsa boyamasındaki şizont formu (orjinal).



**Şekil 2.3** *Theileria annulata*'nın perifer kandan hazırlanan giemsa boyamasındaki pirolasmik formu (orjinal).

### **2.3 *Theileria annulata*'nın Yaşam Döngüsü**

*Theileria annulata*'nın kene ve ruminantlarda farklı morfolojik gelişme basamaklarına sahip karmaşık bir yaşam döngüsü bulunmaktadır (Şekil 2.4). Farklı *Theileria* türlerinin biyolojisindeki çeşitlilik, gelişme basamaklarının zamanlaması ve replikasyon seviyelerinde ortaya çıkmaktadır (Shaw, 2002). *Theileria* cinsine ait türlerin vektörleri Ixodidae (sert kene) keneleridir. *T. annulata*'nın yaşam döngüsü, omurgalı konakta şizogoni ve merogoni, ardından vektör olan kenelerde gametogoni ve sporogoni dönemlerini içeren dört temel evreden oluşmaktadır (Sayın ve ark., 2000; Sayın ve ark., 2003; Sayın ve ark., 2004).



Şekil 2.4 *Theileria annulata*'nın vektör kene ve omurgalı konaktaki yaşam döngüsü (Mans ve ark., 2015'ten modifiye edilmiştir)

## 2.4 Vektör Kenedeki Gelişme

Transstadial nakil, bazı kene kaynaklı patojenlerin (TBP) vektör kenenin bir gelişme basamağında alınmalarını, takip eden gelişme basamağına geçmelerini ve bu basamakta TBP'nin omurgalı konak için enfektif formlarının oluşmasını kapsar. Diğer bir ifadeyle aç larva veya aç nimf döneminde alınan TBP, gelecek gelişme döneminde duyarlı konağa nakledilir. Örneğin; *Theileria parva*'nın piroplasmik formları üç konutlu *R. Appendiculatus* kenesinin larva veya nimf gelişme dönemlerinde alınır, vektör kenede seksüel bir gelişmeden sonra sadece sığırlar için

enfektif form sporozoitler oluşur ve sporozoitler takip eden kene gelişme basamağında bir başka duyarlı sığira transstadial nakledilirler (İnci ve ark., 2016).

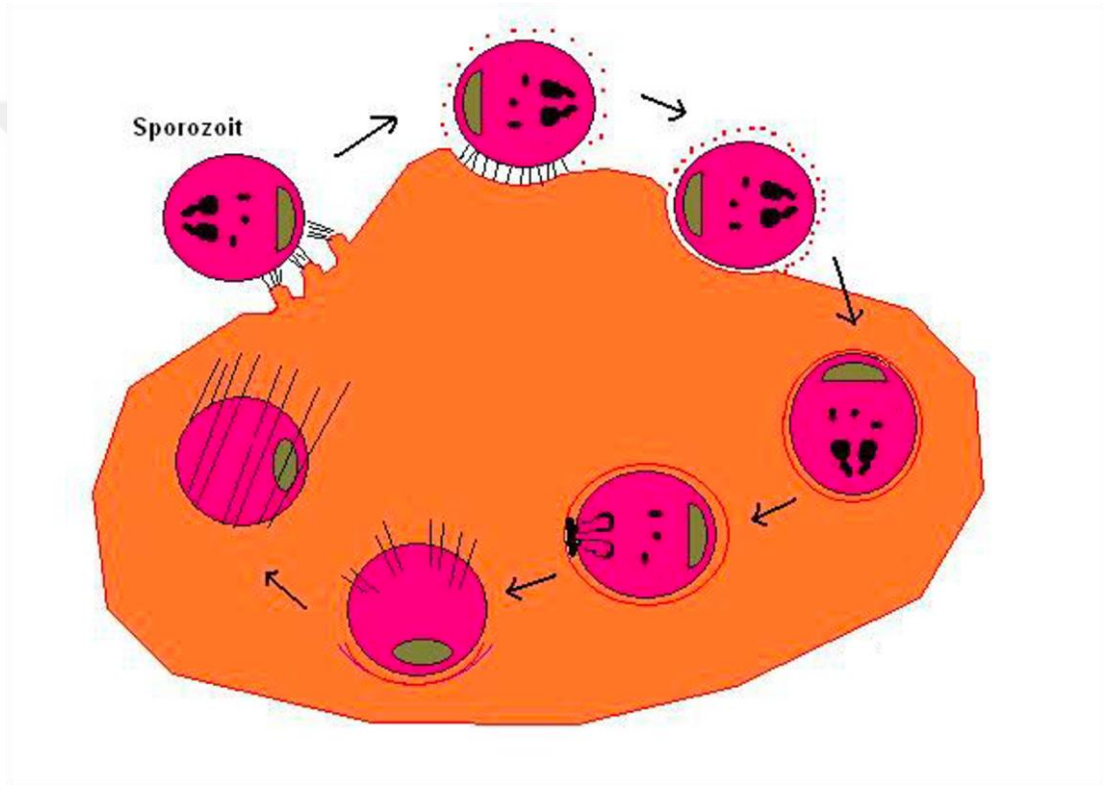
Vektör kene, enfekte bir hayvandan kan emerken eritrositlerle birlikte etkeni de alır. *T. annulata*'nın, ilk kez Cezayir'de yapılan bir çalışmada, ixodid bir kene olan *Hyalomma detritum* tarafından nakledildiği gösterilmiştir (Sergent, 1928). Tropikal theileriosis'i nakleden keneler arasında en önemlileri *Hyalomma anatolicum anatolicum* ve *Hyalomma detritum* keneleridir (Uilenberg, 1981; İnci ve ark., 2016). *T. annulata*, keneler tarafından transtadial olarak nakledilir. Keneler, larva veya nimf dönemlerinde enfekte hayvanlardan kan emerken aldıkları etkenleri, gömlek değiştirip bir sonraki gelişme dönemine geçtiklerinde omurgalı konaklara nakledebilirler (İnci ve ark., 2016). *Hyalomma excavatum* keneleri deneysel şartlarda *T. annulata*'yı nakledebilir, ancak doğal ortamda bu kenenin larva ve nimfleri kemirgenlerden kan emdikleri için olgunları hastalığı nakledecek yetenekte değildir (Barnett, 1977). Keneler tarafından alınan eritrositler, bağırsakta lize olarak içerdikleri etkenleri ortaya çıkarır. Burada gametositler oluşur ve her bir mikrogamonttan bölünmeyle dört adet mikrogamet meydana gelir. Makrogamont, bölünmeden gelişerek makrogameti oluşturur. Kene barsağında mikrogamet, makrogameti dölleyerek zigotu meydana getirir. Zigotun görülmesinden sonraki 12-15 gün içinde, parazitin hareketli formu olan kinetler, kenenin hemolenfine geçerek tükürük bezlerine doğru göç eder (Schein ve Friedhoff, 1978). Parazitin yaşam çemberinde tek diploid dönem zigot ve kinet dönemleridir. Barsak zarını delen kinet, hemolenf yoluyla tükürük bezi asini hücrelerine girerek sporont formunu alır ve sporonttan sporoblast oluşur. *Theileria parva*'da çekirdek bölünmesi kinet daha tükürük bezine gitmeden önce başlarken, *T. annulata*'da çekirdek bölünmesi kinet tükürük bezine gittiğinde başlamaktadır. Bu sırada kene gömlek değiştirmesini tamamlar. Sporoblastın gelişmesini sürdürebilmesi için bir sonraki safhaya geçen aç kenenin kan emmesi gerekmektedir. Bu esnada kene duyarlı bir konaktan kan emerse, eşeysiz bölünme olan sporogoni ile binlerce sporozoit meydana gelir. Sporozoitler, kenenin tükürük kanallarına gelerek kan emdiği duyarlı konağa ikinci veya üçüncü günlerde nakledilir. Kenede sporogoni dönemi başladıktan sonra oluşan sporozoitler, kenenin asini hücrelerini parçalayarak kenenin tükürüğünde serbest hale

geçerler. Her bir enfekte asini hücresinde yaklaşık 40 bin sporozoit oluşabilmektedir (Young ve ark., 1992). Memeli konağa aktarılan sporozoitler, lenfoid hücelere girerek burada çok çekirdekli sinsityal şizont formunu alır. Bu aşama, aynı zamanda hücre transformasyonu ve proliferasyonun indüklendiği safhadır (Shaw, 2002).

## 2.5 Omurgalı Konakta Gelişme

Vektör keneler, enfektif form olan sporozoitleri sığırdan kan emerken nakletmektedirler. Bazen, konjenital yolla anneden buzağıya etkenin nakledilmesi mümkündür (Levine, 1988). Sporozoitler, kenenin kan emmesi sırasında en yakın lenfoid hücelere girmektedir. Bu olay, kene kan emmeye başladıktan sonraki dönemde yavaşça meydana gelir. *Theileria parva*, B ve T lenfositleri enfekte ederken, *T. annulata* ise B lenfositleri ve monositleri enfekte etmektedir (Baldvin ve ark., 1988). Sporozoitin lenfosit hücresine girişi temel olarak üç aşamada gerçekleşir. Bu aşamalar (Şekil 2.5); bağlanma, membranla kaplanıp hücre içine alınma ve membranın lize edilerek konak hücre sitoplazmasına serbestçe yerleşme aşamalarını içermektedir (Shaw, 2002). Sporozoit ve konak hücre arasındaki etkileşimde rol oynayan birçok sporozoit yüzey proteini bulunmaktadır. Bağlanma gerçekleşikten sonra, lenfosit hücresi yüzey membranı ile sporozoitin etrafı kısmen kaplanır ve bu şekilde sporozoit hücre içine alınmaya başlar. Daha sonra hücre içine giren sporozoitin yüzeyi, lenfosit hücresinin membranıyla tamamen kaplanır. Parazit, bu membranı lize ederek kurtulur ve lenfosit hücresi sitoplazmasına serbestçe yerleşir. Parazitin etrafını saran lenfosit hücre membranından kurtulması ve salgı organellerinin (rhoptry ve mikrosfer) salgılama yapması, eş zamanlı olarak gerçekleşir. Bu esnada lenfosit hücresinden köken alan mikrotübüllerle parazitin etrafı sarılır (Shaw, 2002). Lenfosit hücresi sitoplazmasına serbest olarak yerleşen parazit, iki veya üç gün içerisinde çok çekirdekli makroşizont formuna farklılaşır. Makroşizont formlarının görülmesi ve lenfosit transformasyonunun başlaması birbirleriyle kesişen olaylardır (Shiels ve ark., 2006). *Theileria*'nın parazitin konak hücrede meydana getirdiği transformasyon; apoptozis, bölünme ve gen ifadesini düzenleyen sinyal transdüksiyon yollarına etki eder. *T. annulata* ve *T. parva*, transformasyona uğramış lenfosit hücresinde programlı hücre ölümünün inhibe edilmesini ya da tam tersine aktive edilmesini uyararak kendisinin hücre dışına

salınımını sağlar ve böylece yaşam döngüsüne devam edebilir. Konak hücre apoptozisinin inhibe edilmesi ya da kontrolsüz konak hücre bölünmesinden sorumlu olan parazit kaynaklı faktörler hala bilinmemektedir (Shiels ve ark., 2006). Heussler'e (2002) göre, enfekte olan hücrelerin tamamen transforme olmuş hale gelmesi için dört ana olay gerçekleşmelidir. Bunlar; hücre dışından gelen büyüme uyarıcı sinyallere karşı bağımsız olmak, tümör baskılayıcı protein aktivitesine karşı dirençli hale gelmek, programlı hücre ölümüne karşı direnç geliştirmek ve sınırsız çoğalma kapasitesi elde etmektir.



**Şekil 2.5** *Theileria annulata* sporozoitinin lenfosit ve monosit hücrelerine girişi (Shaw, 2002'den modifiye edilmiştir)

## 2.6 Tropikal Theileriosis'de Tanı ve Tedavi

Hastalığın teşhisi genellikle klinik ve makroskobik bulgulara dayanarak, yaz aylarında hayvan üzerinde görülen kene varlığına odaklanılarak yapılır. Laboratuvar koşullarında en sık kullanılan yöntem, kan frotisinin giemsa ile boyanması ve lenf veya karaciğer biyopsisinde şizontların veya kanda piroplazmik formların

mikroskopik inceleme ile tanının konmasıdır (Sergent, 1945; Pipano, 1994). Hastalığın erken evrelerinde hazırlanan kan frotilerinde, piroplazmlarla enfekte eritrositler bazen hiç görülmeyebilir; bu durum, taşıyıcı konumundaki hayvanlarla kolayca karışabilir. *T. annulata* enfeksiyonlarıyla ilişkilendirilen, periferik kandan hazırlanan frotilerde şizontlara nadiren rastlanır. Piroplazmlarla enfekte eritrosit sayısı hastalığın ilerleyen aşamalarında artar ve %90 seviyelerine ulaşabilir. Hastalığı atlatan hayvanlarda piroplazmlar uzun süre kan dolaşımında kalabilir; ancak bu kalıcı piroplazmların doğrudan mikroskop altında teşhisi her zaman mümkün olmayabilir (Pipano ve ark., 1974).

*Theileria annulata*'ya karşı oluşturulan antikorların belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan serolojik yöntem, indirekt floresan antikor (IFAT) testidir. IFAT testinde, piroplazm veya hücre kültürlerindeki şizontlardan elde edilen örnekler antijen olarak kullanılır. IFA testi, prevalans çalışmaları ve aşılanmış hayvanlardaki antikor yanıtının belirlenmesinde sıkça kullanılan bir testtir (Pipano ve ark., 1974). Mikroskopik olarak kan frotilerinde piroplazmların belirlenmesine göre, IFA testinin daha etkili bir yöntem olduğu gösterilmiştir (Darghouth ve ark., 1996). Ancak, bazı diğer *Theileria*, *Babesia* ve *Anaplasma* cinslerine ait piroplazmlarla belirli oranlarda çapraz reaksiyon görülmesi, testin özgüllüğünü olumsuz etkilemektedir (Burrige ve ark., 1974; Kiltz ve ark., 1986; Kocan ve ark., 2000).

Enzim bağlantılı immunosorbent test (ELISA), hastalıkların tanısı ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanılan ve IFA testine göre daha duyarlı ve özgün olan bir yöntemdir. ELISA, daha fazla örneğin incelenebilmesi, maliyet açısından daha avantajlı olması gibi nedenlerle tercih edilmektedir (Kemeny ve Chantler, 1988). Tropikal theileriosis'in görüldüğü hayvanlarda, etkene karşı oluşan antikorların belirlenmesi amacıyla bu yöntemle yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (Prasanth ve ark., 1995; Beniwal ve ark., 1997). Son yıllarda parazitin omurgalı konaktaki farklı yaşam dönemlerine ait antijenler belirlenmiş ve bunlar ELISA testlerinde kullanılmıştır (Schneider ve ark., 2007).

Rekombinant DNA çalışmaları, parazite özgü DNA bölgelerinin plazmid vektörlere klonlanması sayesinde, enfekte hayvanlarda *Theileria* DNA'sının varlığını belirleme

imkânı sağlamaktadır (Allsopp ve ark., 1993). Parazite ait piroplazm ve şizont dönemlerinin morfolojik farklılıklarına dayanarak tür ayrımları yapılamayan durumlarda, yine bu yöntemler aracılığıyla parazit türleri ve bu türlere ait farklı suşların ayrımı mümkün hale gelmiştir (Norval ve ark., 1992). Vektör kenelerde ve omurgalı konaklarda parazitin teşhisi için birden fazla polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi kullanılmıştır (de Kok ve ark., 1993; İlhan ve ark., 1998).

Tropikal theileriosis tedavisinde en etkili ilaç olarak kabul edilen buparvaquone, çeşitli çalışmalarda kanıtlanmıştır (McHardy ve ark., 1985; Singh ve ark., 1993). Deneysel olarak enfekte edilmiş sığırlarda yapılan çalışmalarda, 5 mg/kg veya 2.5 mg/kg dozlarda intramusküler tek dozluk enjeksiyonun, hastalığa sebep olan şizont ve piroplazmlara karşı etkili olduğu gösterilmiştir (Singh ve ark., 1993). Ancak, buparvaquone ve parvaquone'un sırasıyla %90 ve %80 iyileştirme oranlarına sahip olduğu belirlenmiştir (Muraguri ve ark., 1999).

## **2.7 Klinik Bulgular ve Patogenez**

Tropikal theileriosis'in inkübasyon periyodu genellikle 9-25 gün arasında değişkenlik göstermektedir. Enfeksiyonun şiddeti, hastanın ırkına ve parazit suşunun virulansına bağlı olarak farklılık göstermektedir (Sergent, 1945; Rayfi ve ark., 1965). Bağışıklık geliştiren hayvanlarda klinik bulgular genellikle hafif seyrederek veya hiç görülmez; bu durumda hayvan, kendiliğinden iyileşebilir (Pipano, 2006). Özellikle hastalığın patogenezinde metastazik özellik çok önemlidir. Daha çok kanser hücreleri için kullanılan bu terim, son zamanlarda kanser hücreleri gibi davrandığı sanılan Theileriosis için de kullanılmaktadır. Tıpkı kanser hücrelerinin metastaz ve invazyonunda rol oynayan Matrix Metalloproteinazların (MMPs) *Theileria* şizontları ile enfekte lenfoid hücrelerde de bulunduğu ve aynı şekilde rol oynadığının saptanmasıyla theileriosis'in de metastazik davranışlar sergileyebileceği düşünülmektedir. *Theileria* enfeksiyonlarında 7 adet konak matriks metalloprotein aktivitesi bulunmuş olup bunların arasında MMP9 önemli bir yere sahiptir. Bu durum, sığır theileriosisinde patolojik özelliklerin açıklanmasında önemli bir etkiye sahiptir (İnci ve ark., 2012). Bunun yanında hastalığın patogenezinin oluşmasında hücreler arası iletişimde Toll-like reseptörlerinde (TLR) önemi vurgulanmıştır (İnci

ve Bişkin, 2007). Yine hastalığın patogeneğinde apoptozis mekanizmasının inhibe edilmesi önemli bir yer tutmaktadır. *Theileria* türleri tarafından apoptozisin inhibisyon mekanizması; NF-KB, JNK ve protein kinaz A (PKA)'nın aktivasyonu ile ilişkilidir. *Theileria* türlerinin konak hücre proliferasyonunu indüklenmesi ve apoptozisi inhibe edebilme kabiliyeti, T ve B hücreleri ile makrofajların parazitler tarafından enfekte edilmesini takiben reverzible bir transformasyon ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (İnci ve ark., 2009).

Hastalık, klinik belirtilere göre hafif, perakut, akut, subakut ve kronik olarak sınıflandırılmaktadır (Sergent, 1945). Genel belirtiler arasında yüksek ateş, kenenin kan emdiği bölgedeki yüzeysel lenf nodüllerinde büyüme, parazitemi sırasında eritrosit sayısında azalma nedeniyle şiddetli anemi, mukozalarda peteşiyal kanamalar, ruminasyonun durması ve seröz burun akıntısı bulunmaktadır. *T. annulata*, B lenfosit hücrelerini ve monositleri enfekte etmektedir (Baldwin ve ark., 1988). Transforme olmuş enfekte hücreler, lenf nodüllerinin morfolojisini ve fonksiyonunu bozmaktadır (Campbell ve ark., 1995). Ayrıca, bu enfekte hücreler lenfoid dokular yoluyla yayılarak kalp, akciğer ve beyin gibi lenfoid olmayan organlarda hemorajik lezyonlara neden olmaktadır (Forsyth ve ark., 1997). En belirgin makroskopik lezyonlar arasında subkutan doku ve serozalarda peteşiler, lenf nodüllerinde hiperplazi, splenomegali, karaciğerde genişleme ve sarı renk oluşumu, idrar kesesinde büyüme, epiendokardiyal peteşi ve ekimozlar, böbrek korteksinde gri-beyaz odaklar yer almaktadır. Hastalığın en belirgin bulgularından biri, abomasumda görülen sigara yanığı şeklindeki ülserlerdir. Bu ve benzeri ülserlere ince ve kalın barsak boyunca rastlanabilir. Akciğerler genellikle ödemlidir. Duyarlı sığırlarda ölüm oranı, parazitin virulansına bağlı olarak %40-60 arasında değişmektedir ve genellikle klinik belirtilerin gözlemlenmesinden sonraki 7-14 gün içinde gerçekleşmektedir (Uilenberg, 1981). Hastalığı atlatan hayvanlar, paraziti uzun süre taşıyıcı olarak kalabilirler (Sergent, 1945).

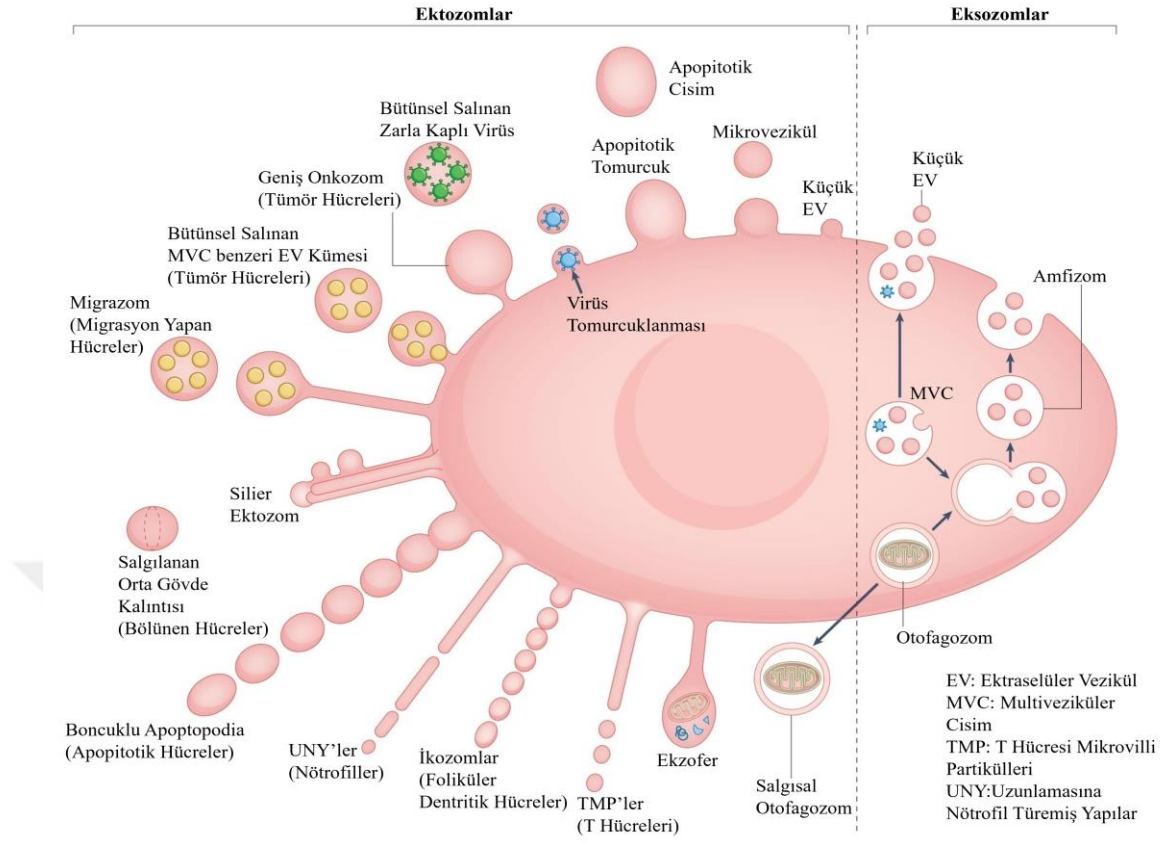
## **2.8 Ekonomik Etki**

Doğu sahili humması (ECF), Ruanda, Güney Sudan, Kenya, Zimbabve, Tanzanya, Uganda, Burundi, Kongo Demokratik Cumhuriyeti, Mozambik, Zambiya ve Malavi

gibi ülkelerde hala akut ve genellikle ölümcül bir hastalık olarak varlığını sürdürmektedir (Malak ve ark., 2012). ECF ile ilişkilendirilen yıllık ekonomik kayıplar yaklaşık olarak 300 milyon Amerikan doları civarındadır ve ölüm anlamında sığır kaybı yılda yaklaşık bir milyon sığıra ulaşmaktadır (McLeod ve ark., 1999). Dünya genelinde yaklaşık 250 milyon sığır, Tropikal theileriosis riski altındadır (Erdemir ve ark., 2012). Tropikal theileriosis, hastalıkla ilişkilendirilen ölüm, azalmış süt verimi, kilo kaybı, düşükler ve hastalıkla ilişkili kontrol maliyetleri göz önüne alındığında ciddi ekonomik etkisi vardır (Gharbi ve ark., 2015). İnci ve ark. (2007) Kapadokya yöresinde tropikal theileriosis'e bağlı ekonomik kayıpların 590.000 doların üzerinde olduğu (İnci ve ark., 2007), bu miktarın Hindistan'da 800 milyon doların üzerine ulaştığı rapor edilmiştir (Brown ve ark., 1997). Bu nedenle etkili ve sürdürülebilir kontrol için en iyi yol hastalığın önlenmesidir (Gharbi ve ark., 2015).

## **2.9 Ekstraselüler Veziküller**

Ekstraselüler veziküller (EVs), eksozomlar da dahil olmak üzere hücreler arası doğrudan temas olmadan bilgi alışverişini mümkün kılan hücresel iletişimin temel araçlarından biri olarak bilinmektedirler (İnci, 2018). Uzun süre hücresel artıklardan başka bir şey olarak kabul edilen ve hücrelerin "çöp kutuları" olarak işlev gördüğüne inanılan ekstraselüler veziküller (EV'ler) günümüzde yoğun bir araştırmanın konusu olmuştur. EV'ler, bir fosfolipid çift tabaka ile çevrili küçük veziküllerdir ve bakteriler ve arkea dahil olmak üzere tüm hücresel organizmalar tarafından salgınır, tüm yaşam alanlarını kapsarlar (Toyofuku ve ark., 2019). Erken 2000'li yılların başlarından bu yana, birkaç EV alt türü tanımlanmış olup bu EV'lerin özellikleri ve işlev çeşitlilikleri gösterilmiştir (Théry ve ark., 2018; Verweij ve ark., 2021; van Niel ve ark., 2022). EV'lerin iki ana sınıfı vardır ve bunlar biyogenez yoluna göre ayırt edilir (Şekil 2.6).



**Şekil 2.6.** Biyogenez yoluna göre EV'lerin iki ana sınıfı (Buzás, 2022'den düzenlenmiştir).

Ekzosomlar, çoklu veziküler cisimlerin (MVB'ler) veya amfizomların içe doğru tomurcuklanmasıyla intraluminal veziküller (ILV'ler) olarak oluşur ve endozomal membranın plazma membran ile birleşmesini takiben salınmaktadır (Mathieu ve ark., 2019; Jeppesen ve ark., 2019; van Niel ve ark., 2022). Bu süreç, memelilerde endozomal taşıma için gereken endozomal ayırma kompleksleri (ESCRT) tarafından yönetilen iyi tanımlanmış bir mekanizmayı içerir (Jadli ve ark., 2020). ESCRT, ekzosom salınımlarında merkezi bir rol oynarken, ESCRT bağımsız yollar da rapor edilmiştir. Bu yollar arasında ceramide mikrodan bağımlı ekzosom biyogenez örnekleri (Trajkovic ve ark., 2008) ve tetraspanin protein ailesi üyelerini (örneğin, CD63) içeren bir yol bulunmaktadır (Andreu ve Yáñez-Mó, 2014). Ayrıca çeşitli biyogenez sistemlerinin bir arada çalıştığı hibrit mekanizmalar da olabilir (de la Torre-Escudero ve ark., 2016). Son kanıtlar, endoplazmik retikulum (Barman ve ark., 2022) ve nükleer zar (Arya ve ark., 2022) katılımını göstermektedir, bu da ekzosomların çeşitli hücre kökenleri için potansiyel göstermektedir. Diğer bir EV

türü, genellikle etkosomlar olarak bilinen, plazma membranının doğrudan dışa doğru tomurcuklanmasından kaynaklanan vezikülleri içermektedir.

Farklı biyogenetik yollar için özel moleküler belirteçler eksik olduğundan, EV'lerin biyogenezine dayalı olarak tanımlanması zordur. Bunun yerine, EV'leri biyokimyasal ve biyofiziksel özelliklerine göre ayırt etmek için işlevsel terimler önerilmiştir (Théry ve ark., 2018). EV'lerin dikkate değer heterojenliği, farklı biyogenez yollarının yanı sıra hücre kökenlerinin, hücrelerin aktivasyon durumunun ve işlevsel durumunun aşırı çeşitliliğinden kaynaklanmaktadır. Önemli olan şudur ki, bunlar aynı zamanda nekroptoz, apoptoz ve piroptoz gibi farklı hücre ölüm mekanizmalarının bir sonucu olarak salınan vezikülleri de içermektedirler (Tablo 1.1). EV'ler, tükürük, kan, asit, anne sütü, beyin omurilik sıvısı ve idrar gibi vücut sıvılarında bulunmaktadır (Pisitkun ve ark., 2004; Caby ve ark., 2005; Keller ve ark., 2006; Vella ve ark., 2008) ve burada çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlere katkıda bulunurlar. Ayrıca, EV'ler, doku kültürü süpernatantlarında yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. (Yuana ve ark., 2010; Dragovic ve ark., 2011; Van der Pol ve ark., 2012). EV alt türlerinin sınıflandırılması, evrensel alt tür özgü belirteçlerin eksikliği ve çoğu izolasyon prosedürünün bu belirteçlere dayanması nedeniyle kısmen zorlayıcı ve tutarsızdır (Raposo ve Stahl 2019). En yaygın EV tipleri, küçük EV'ler (endozomal veya plazma membran kökenli) ve mikroveziküllerdir.

**Tablo 2.1.** Ekstraselüler veziküllerin boyut temelli kategorileri (Buzás, 2022).

Özellik	Small EVs	Medium EVs	Large EVs
Çap	~ 50 – 150 nm	~ 200 – 800 nm	≥1,000 nm
Biyojenezi	Endozomal (eksozomlar) ancak bazı küçük EV'ler plazma zarından (ektozomlar) türetilir.	Plazma zarından türetilen ektozomlar	Plazma zarından türetilen ektozomlar (bazıları endozomal küçük EV'ler taşıyabilir)
Örnekler	Eksozomlar, küçük	Mikropartiküller,	Apoptotik cisimcikler,

	ektozomlar (Mathieu ve ark., 2021), siliyer ektozomlar (Cao ve ark., 2015), mikroveziküller (Wang ve Lu, 2018)	FDC'den türetilen ikozomlar, T hücresi mikrovillus parçacıkları (Kim ve ark., 2018), uzun nötrofilden türetilen yapılar (Marki ve ark., 2021), salgılanan orta vücut kalıntıları (Rai ve ark., 2021)	büyük onkozomlar (Di Vizio ve ark., 2012), boncuklu apoptopodia (Atkin-Smith ve ark., 2019), migrasomlar (Ma ve ark., 2015), ekshoferler (Melentijevic ve ark., 2015), blok halinde salınan virüs kümeleri (Kerviel ve ark., 2021), blok halinde salınan MVB benzeri EV kümeleri (Valcz ve ark., 2019), salgı otofagozomları (van Niel ve ark., 2022), sitoplastlar (Yipp ve ark., 2012)
--	--	--	--

## 2.10 Ekstraselüler Veziküllerin Genel Bileşimi ve İçeriği

### 2.10.1 Protein Bileşimi

Çeşitli hücrelerden, in vivo ve in vitro olarak elde edilen ve çeşitli organizmalardan elde edilen EV'lerin proteomik çalışmaları, farklı EV alt kümeleme yoğunluğunda bulunan geniş proteomik protein listelerini ortaya koymuştur. EV örneklerinde sıkça bulunan bazı proteinler genel EV belirteçleri olarak kabul edilir. Bunlar arasında tetraspaninler (CD9, CD63, CD81, CD89), 14-3-3 proteinleri, endozomal taşıma için gerekli olan ESCRT-3 bağlayıcı proteinler Alix ve Tsg101 ve ısı şok proteinleri, aynı zamanda sitoskeleton proteinleri olan  $\beta$ -aktin, kofilin, myozin ve tubulin bulunmaktadır (Witwer ve ark., 2013). Ayrıca, metabolik proteinler olan gliser aldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) ve enolaz 1 (ENO1) ortak EV belirteçleridir (Simons ve Raposo 2009; Théry ve ark., 2009; Cocucci ve ark., 2009; Mathivanan ve

ark., 2010; Beyer ve Pisetsky 2010; Bobrie ve ark., 2011; Chaput ve Théry 2011; Record ve ark., 2011). Birçok EV ayrıca MHC sınıf I ve II proteinlerini taşır, bu da onların naif lenfositlere antijen sunumuna katkıda bulunabileceği fikrini destekler (Utsugi-Kobukai ve ark., 2003; Qazi ve ark., 2009; Urbanelli ve ark., 2013).

Önemli bir şekilde, EV'lerin çeşitli sitokinleri ve kemokinleri ya iç yük olarak (Fitzgerald ve ark., 2018) ya da yüzeye bağlı olarak (Lima ve ark., 2021) taşıdığı gösterilmiştir. Şaşırtıcı olmayan bir şekilde, sitokin içeren EV'lerde bulunan çözünür mediatörlerin seçimi, ana hücrenin hücresel kökeni ve aktivasyon durumuna son derece bağlıdır. Sitokinlerin veziküller içinde kapsüllenmesi, enzimatik bozunmadan koruma sağlar ve potansiyel olarak bunların uzak hücrelere iletilmesine izin verebilir (Buzas, 2022).

Ancak, kullanılan izolasyon yöntemlerinin çeşitliliği, kurtarılan EV'lerin alt tiplerini ve homojenliğini büyük ölçüde etkiler ve bu da sonuçta elde edilen protein profili üzerindeki etkiyi sınırlayarak çalışmalar arasında karşılaştırma yapmayı zorlaştırır. Protein profilleri, EV'lerin hücresel kökenini ve biyogenez yolunu temsil edebilir ve bu nedenle farklı EV alt tiplerine özgü olabilir, ancak EV'lere özgü tek bir protein belirteci bulunmamaktadır (Yáñez-Mó ve ark., 2015).

### **2.10.2 RNA İçeriği**

Hücre dışı ortamda, RNA serbest RNA olarak dolaşırken, protein komplekslerine bağlı veya EV'ler içinde kapsüllenmiş olarak bulunmuştur. Çeşitli RNA türlerinin EV'ler içinde lokalize olduğu bildirilmiştir, bunlar arasında haberci RNA (mRNA), mRNA fragmentleri ve uzun kodlamayan RNA (lncRNA)'dır. Bunların yanısıra, mikroRNA (miRNA), piwi ile etkileşen RNA (piRNA), ribozomal RNA (rRNA) ve transfer RNA (tRNA) fragmanları, Y RNA ve vault RNA (vtRNA) gibi çeşitli küçük kodlamayan RNA'ları (snRNA'lar) da içermektedirler. EV'lerde bulunan mRNA'lar tipik olarak 700 nükleotidden (nt) daha uzun değildir (Chen ve ark., 2010, Batagov ve Kurochkin 2013) ve hedef hücrede bir kez çevrilebilir ve fonksiyonel kalabilirler (Ratajczak ve ark., 2006, Valadi ve ark., 2007). EV'ler, miRNA bağlama sitelerini içeren 3'UTR mRNA fragmentleri açısından zengindir. Bu nedenle, alıcı hücre RNA'sı ile regülatör miRNA'ların bağlanması için rekabet edebilecekleri öne

sürülmüştür ki, bu da RNA stabilitesine ve çevirime katkıda bulunabilir (Batagov ve Kurochkin 2013).

miRNA'lar genellikle EV'lerin ayrılmaz bileşenleri olarak tanımlanır. Yaklaşık olarak 22 nt uzunluğunda olan miRNA'lar, gen ifadesinin düzenleyicileri olarak işlev görür. Özellikle, miRNA'lar argonaut proteinleri (Ago) tarafından bağlanır, RNA nedenli susturma kompleksi (RISC) tarafından çekilir ve onların seed dizisi (genellikle miRNA'nın 5'-ucundan nükleotid 2-7'ye kadar olan bölge) mRNA'nın komplementer dizileri ile baz çiftleri yaparak ribozomal bağlanmayı engelleyerek mRNA'nın bozulmasını veya çeviriminin bastırılmasını tetikler (O'Brien ve ark., 2018). Tipik olarak, baz eşleşmesi mRNAların 3'UTR bölgesinde meydana gelir; ancak kodlama dizilerinin, 5'UTR ve gen promotörleri gibi diğer bölgelerle etkileşimleri de gözlemlenmiştir (Broughton ve ark., 2016; O'Brien ve ark., 2018). RISC kompleksi proteinlerinin EV'lerde bulunma durumu farklı gruplar tarafından tutarsız bir şekilde bildirilmiştir (Li ve ark., 2012; Jeppesen ve ark., 2014; Weaver ve ark., 2020) ve bu durum EV ile ilişkilendirilmiş miRNA'ların işlevleri ve gereksinimleri hakkında birçok soru ortaya çıkarır.

EV'lerin RNA yükü, köken aldığı hücre RNA populasyonunu yansıtmaz; bunun yerine, belirli RNA populasyonları EV'lerde zenginleştirilir. Bu seçim yalnızca boyut dışlama temeline dayanmaz, çünkü belirli miRNA alt kümeleri genellikle EV'lerde tercihen bulunur (Mittelbrunn ve ark., 2011; Nolte-t Hoen ve ark., 2012), bu da miRNA'ların aktif bir şekilde EV yükü olarak dahil edilmek üzere sıralandığını düşündürmektedir (Yáñez-Mó ve ark., 2015). Bu bağlamda, küçük Ekstrasüler vezikül (sEV) dışa aktarma dizilerinin (EXOmotif) ve hücrel retansiyon dizilerinin (CELLmotif) yakın zamandaki keşfi, altında yatan sıralama mekanizmalarını aydınlatmada önemli bir ilerleme olarak kabul edilmektedir, ancak tam süreç hala belirsizdir (Garcia-Martin ve ark., 2022). EXOmotifler, yüksek G+C içeriğine sahip 4-7 nt uzunluğundadır ve varlıkları, hücrel içeriğe kıyasla sEV'lerde miRNA zenginleşirmesi ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. Bunun aksine, miRNA'ların hücrel retansiyonu, düşük G+C içeren CELL motiflerinin varlığıyla güçlü bir ilişki gösterir. Bu lokalizasyon dizilerinin hücreye özgü olduğu ve regülatör seed dizisinin uzak olduğu miRNA'nın 3' ucunda tercihen bulunduğu görünmektedir (Garcia-Martin ve ark., 2022).

### 2.10.3 DNA İçeriği

EV'ler içindeki DNA (EV-DNA) ile ilgili erken raporlara rağmen (Holmgren ve ark., 1999), bu konuya nispeten az dikkat gösterilmiştir. Bununla birlikte, çeşitli hücre tiplerinden türetilen EV'lerde tek iplikli ve çift iplikli DNA tespit edilmiş (Waldenström ve ark., 2012; Thakur ve ark., 2014; Lee ve ark., 2014; Vagner ve ark., 2018) ve DNA transferi, EV-DNA'nın hedef hücrenin sitozol ve çekirdeklerinde lokalize olduğu şekilde gösterilmiş (Waldenström ve ark., 2012) ve ayrıca raporlara göre alıcı hücrenin genomuna entegre olabileceği öne sürülmüştür (Mitra ve ark., 2015). Ayrıca ilginç olan, Guescini ve ark (2010), astroglialardan, glioblastoma hücrelerinden ve miyoblastlardan türetilen EV'lerin mitokondriyal DNA (mtDNA) içerdiğini rapor etmişlerdir (Guescini ve ark., 2010). EV'lerin ne kadarının DNA içerdiğini ve EV-DNA'nın yükünün anlamını belirlemek zordur, ancak hala belirsizdir, ancak hücrel homeostaz (Wang ve ark., 2017; Takahashi ve ark., 2017; Torralba ve ark., 2018,) ve inflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde rol oynama olasılıkları öne sürülmüştür (Marsman ve ark., 2016; Kitai ve ark., 2017; Anel ve ark., 2019).

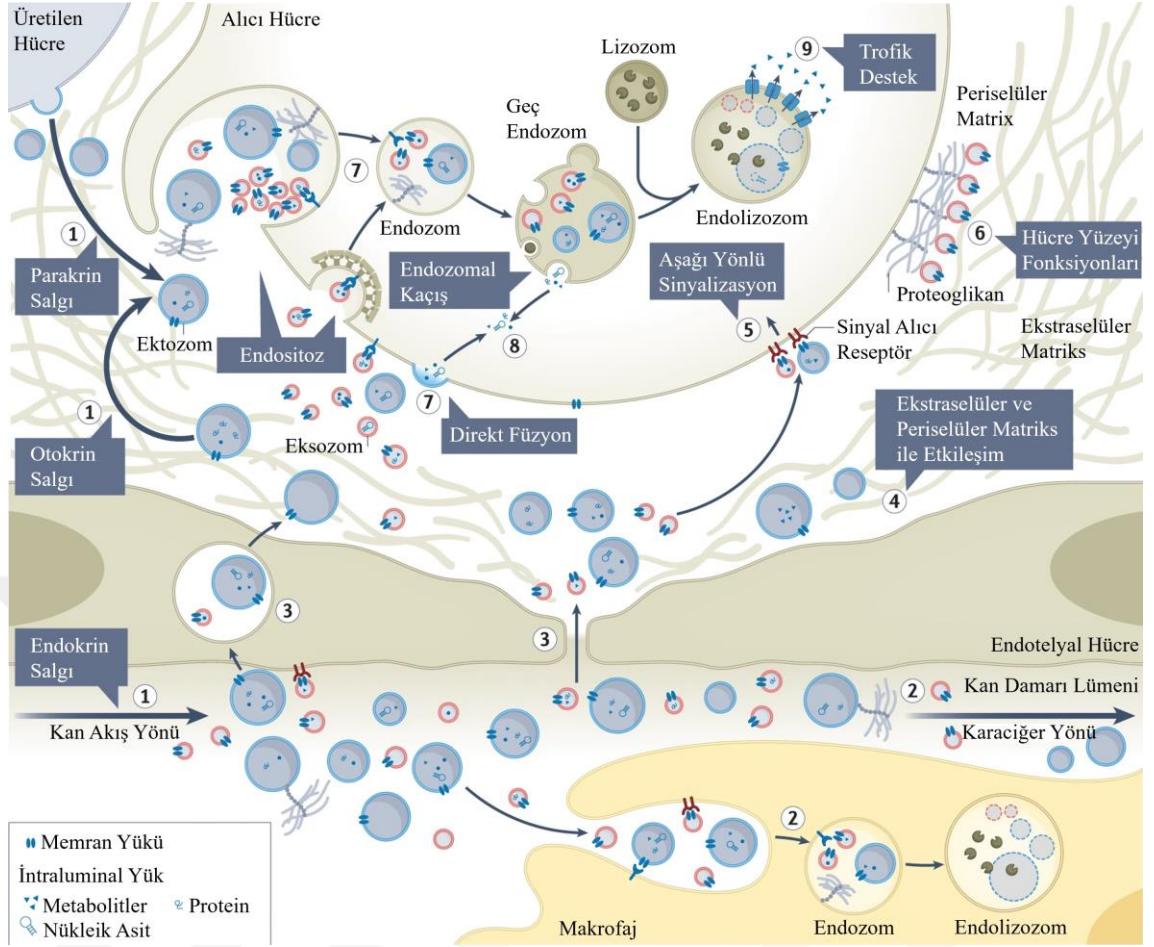
### 2.10.4 Lipid İçeriği

Ekstraselüler veziküllerin lipidomikleri hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır. Lipidler EV'lerin esansiyel bir bileşeni olmalarına rağmen lipid kompozisyonu kaynaklara ve EV alt tiplerine bağlı olarak değişebilmekte ve EV'lerin lipid kompozisyonunun analizleri genellikle EV'ler arasında zenginleşmiş belirli lipitleri tanımlamıştır. Özellikle, EV'ler genellikle kolesterol, sfingolipidler, seramid, glikosfingolipidler ve fosfatidilserin (PS) bakımından ana hücrelerine kıyasla zenginleşmiştir (Subra ve ark., 2007; Trajkovic ve ark., 2018). Osteikoetxea ve ark., (2015), çeşitli hücre hatlarından elde edilen ekzosomlarda mikroveziküllerden ve aynı hücrelerden kaynaklanan apoptotik cisimlerden daha yüksek kolesterol ve sfingomiyelin içeriğini tutarlı bir şekilde gözlemlemiştir. Bu durum ekzosomların diğer EV alt tiplerine kıyasla deterjanlara daha az duyarlı olduğu raporlarıyla uyumludur (Osteikoetxea ve ark., 2015). Kolesterol ve uzun doymuş yağ asitleri lipid membranlara yapısal rijitlik sağlar, komşu fosfolipid kuyrukları arasındaki moleküler etkileşimleri artırarak sıkıca

paketlenmiş bir lipid düzenlemesi oluşturur. Bu aynı zamanda fizyokimyasal değişikliklere karşı direnç sağlar. EV'lerin belirgin lipid kompozisyonu, farklı özelliklere sahip olmalarını ve farklı hücre dışı ortamlarda stabil olmalarına katkıda bulunmalarını sağlamaktadır (Yáñez-Mó ve ark., 2015).

#### **2.10.5 Ekstraselüler Veziküllerin Alımı ve Biyolojik Fonksiyonları**

Ekstraselüler veziküller, sadece bir hastalık durumunda canlı vücudunda bulunmamaktadırlar. Özellikle gereksiz moleküllerin uzaklaştırılması, hücre olgunlaşması ve çevresel değişkenlere uyum gibi homeostatik süreçler, gebelik ve doğum regülasyonu (Taylor ve ark., 2006), tümör büyümesi için uygun koşulların oluşturulması gibi durumlarda salgılanabilmektedirler (Park ve ark., 2010, Higginbotham ve ark., 2011). Bu fonksiyonlar alıcı hücrelerle etkileşim yoluyla gerçekleşir. EV'ler, hücreler arası haberciler olarak hareket eder ve bir hücreden diğerine sinyaller ileterek çeşitli mekanizmalar aracılığıyla hücrel fonksiyonu etkileyebilir. Belirgin karakteristiklere sahip birçok EV alt türünün, hücrel etkileşimlerini ve ardından gelen etki mekanizmalarını ve spesifik EV alım mekanizmaları hakkındaki bilgiler sınırlıdır (Mathieu ve ark., 2019). Genel EV etkileşim ve alım mekanizmaları Şekil 2.7'de gösterilmiştir. EV'ler, bir EV ile bir hücre arasındaki doğrudan temas sonucunda başlatılan ligand-reseptör etkileşimi yoluyla hedef hücre intrasellüler sinyal kaskadlarını etkileyebilirler. Bir hedef hücrenin plazma membranı ile doğrudan füzyon yaparak, bu şekilde içerisindeki mesajı hücrenin sitoplazmasına salabilir veya hedef hücreler EV'yi endositoz aracılığıyla içselleştirebilir. EV'ler, hücre sinyalleme için önemli bileşenlerini temsil eder ve fonksiyonları büyük ölçüde bileşenlerine ve kapsülenmiş kargo moleküllerine bağlıdır. Bu moleküllerin çeşitliliği ve potansiyel etkileşim mekanizmaları, EV'lere atfedilen etkileyici bir dizi fonksiyonun sorumlusudur (Şekil 2.7) (Van Niel ve ark., 2018).



**Şekil 2.7** EV'lerin genel etkileşim ve alım mekanizmaları (Van Niel ve ark., 2018'den düzenlenmiştir).

Ekstraselüler veziküller, bir organizma içinde çeşitli fonksiyonları sürdürürler ancak aynı zamanda organizma arası ve türler arası iletişime katıldığı bildirilmiştir. Özellikle, bunların enfeksiyonlar sırasında konak-parazit etkileşimlerine katkıda bulunduğu dair birikmekte olan kanıtlar bulunmaktadır (Schorey ve Bhatnagar, 2008; Barteneva ve ark., 2013; Twu ve Johnson, 2014). Örneğin, sıtma kaynaklı EV'ler sıtma ile enfekte olmuş insan ve fare konaklardan tespit edilmiştir. Bu durumlarda dolaşan EV'lerin düzeyi hastalığın klinik belirtileri ile ilişkilendirilmiş, bu da EV'lerin bir konakta patolojinin gelişimine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (Combes ve ark., 2004; Pankoui Mfonkeu ve ark., 2010; Campos ve ark., 2010; Nantakomol ve ark., 2011). Bu fikri destekleyen bir başka örnek olarak, sıtmadan enfekte olmuş farelerin plazmasından izole edilen EV'ler, makrofajların TLR bağımlı aktivasyonu aracılığıyla şiddetli bir şekilde inflamasyon

oluşturmuş ve inflamatuvar sitokinlerin artan üretimine neden olmuştur (Couper ve ark., 2010; Mantel ve ark., 2013). Dahası, EV oluşumunun inhibisyonu fareleri serebral sıtma modelinde korumuştur (Combes ve ark., 2005). Ayrıca, *Plasmodium berghei*, T-hücre yanıtlarını inhibe edebilen EV'ler salgıladığı bildirilmiştir (Demarta- Gatsi ve ark., 2019). Benzer şekilde, *Toxoplasma gondii* enfekte olmuş makrofajlardan izole edilen EV'ler, hem in vitro hem de in vivo proinflamatuvar yanıtları tetiklediği bildirilmiştir (Bhatnagar ve ark., 2007). Apikompleksa, EV'lerin önemli olduğu protozoan parazitler arasında tek örnekler değildir. *Trypanosoma* ve *Leishmania* türlerini içeren kinetoplastidler, parazitin hayatta kalması için uygun bir ortamın gelişimini indükleyebilecekleri öne sürülen EV'ler üretir ve salgılar (Gonçalves ve ark., 1991; Trocoli Torrecilhas ve ark., 2009; Geiger ve ark., 2010; Silverman ve ark., 2010, Garcia-Silva ve ark., 2014). *Leishmania* EV'leri monositlerde ve monosit türetilmiş dendritik hücrelerde anti-inflamatuvar bir fenotipin gelişimini teşvik ederek Th2 polarizasyonunu tercih eder ve hastalığı şiddetlendirir (Silverman ve ark., 2010).

EV'ler ayrıca konak içindeki bireysel parazitler arasındaki iletişimi de sağlar. İn vitro ortamda, *Plasmodium falciparum* enfekte olan eritrositler hem konak hem de parazit kaynaklı proteinleri içeren veziküller salgılar. Bu veziküller daha sonra diğer enfekte eritrositler tarafından alınır ve bu da gametositogenezin başlatılmasına katkıda bulunur (Mantel ve ark., 2013, Regev-Rudzki ve ark., 2013).

*Theileria annulata* kaynaklı EV'ler hakkında oldukça az şey bilinmektedir, çünkü bu alan daha yakın zamanda bir araştırma konusu olmuştur. Gillan ve ark. (2019) *T. annulata* ile enfekte sığır lenfosit hücre hattı 20 (TBL20) ve sığır lenfosit hücre hattı 20 (BL20) da yaptıkları çalışmada *T. annulata* ile ilişkin EV ve miRNA profilini incelemişler ve majör tümör baskılayan miRNA'nın azaldığını, pro-onkogenik miRNA'nın yükseldiğini tespit etmişlerdir (Gillan ve ark., (2019). *T. annulata* ile enfekte olmuş sığır lökositlerinde konakçı hücre protein kinaz A (PKA) aktivitesinin cAMP'den bağımsız düzenlenmesinde miR-34c-3p'nin düzenleyici bir rolü araştırılmış ve yeni bir miR-34c-3p hedef geni olarak prkar2b'yi (cAMP'ye bağımlı protein kinaz A tip II-beta düzenleyici alt birim) tanımlanmıştır. miR-34c-3p'nin enfeksiyonun neden olduğu yukarı regülasyonunun PKA aktivitesini arttırmak için

PRKAR2B ekspresyonunu nasıl bastırđını gösterilmiştir. Bu da *T. annulata* ile dđnüşürölmüş makrofajların yayılan tümör benzeri fenotipini güçlendirdiğini ortaya çıkarmıştır (Haidar ve ark., 2023).

Ancak, son yıllarda birçok parazit türünde yapılan EV çalışmaları özellikle bu veziköllerin karakterizasyonu ve bunların intra ve ekstrasellöler sinyalleşmeyi nasıl sağlayabileceği veya değiştirebileceği, yeni teşhis araçlarının geliştirilmesi yanı sıra olası ilaç ve/veya aşı hedeflerinin belirlenmesinde faydalı olabileceğini düşünölmektedir.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması kapsamında kan örnekleme yapılan sığırlar için gerekli Etik Kurul Kararı, Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu (Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu (EÜHADYEK)'nun 02.02.2022 tarihli, 22/025 Karar nolu onayı alınmıştır (Toplantı sayısı: 02).

#### 3.1 Çalışma Gruplarının Oluşturulması

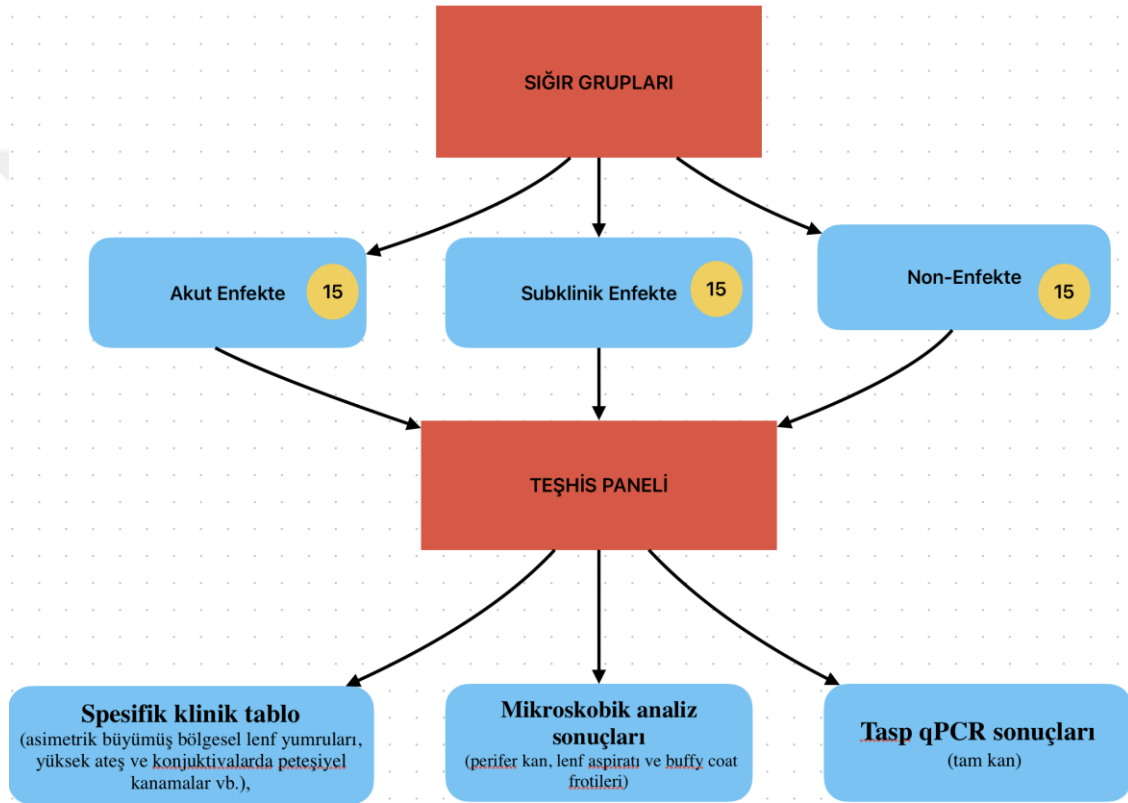
##### 3.1.1 Sığırların Örnekleme ve Materyal Toplanması

Çalışma kapsamında, Kayseri ilinin *T. annulata* yönünden endemik olduğu bilinen (Inci ve ark., 2002; Inci ve ark., 2007) Kayseri'nin Develi ilçesindeki meraya bağlı sığır yetiştiriciliği yapılan halk elindeki işletmelerden materyal temin edilmiştir. Bu kapsamda öncelikle 1) *T. annulata* ile akut enfekte, 2) *T. annulata* ile subklinik enfekte ve 3) Non-enfekte sığırlar olmak üzere çalışma gruplarının oluşturulması hedeflenmiş ve her grup için 15'er sığırın eksozomal miRNA karakterizasyon çalışmasına dahil edilmiştir. Akut hasta grubuna dahil edilecek sığırların tespiti için bölgedeki özel kliniklerdeki veteriner hekimlerle iletişim kurulmuştur. Bölgede özellikle kenelerin aktif olduğu Mayıs-Eylül 2022 tarihleri arasında akut hastalık belirtisi gösteren hayvanların tedavisi için hayvan sahipleri veteriner hekimlere müracaat etmektedir. Bölgedeki veteriner veterinerine gelen bildirimler doğrultusunda, potansiyel hasta sığırların muayenesi sonrası tanı konulan hayvanlardan tedavi öncesi kan ve lenf yumrusu aspiratı örnekleri alınmıştır. Subklinik enfekte ve non-enfekte gruplara dahil edilecek hayvanlar için yine aynı bölgede akut hasta hayvanların bulunduğu işletmelerdeki sağlıklı görünümlü 2-5 yaş arası toplam 50 sığırdan

randomize olarak veteriner hekim tarafından perifer kan örnekleri alınmıştır. Ayrıca beş adet yeni doğan (1 haftalık) buzağı da Non-enfekte gruba dahil edilmiştir.

### 3.1.2 *Theileria annulata* Teşhis Paneli Değerlendirmesi, Gen Kopya Sayısı (Gcn) ve Parazit Yükünün Hesaplanması

Oluşturulan gruplar ile gruplara dahil edilen sığırların *T. annulata* enfeksiyonu yönünden kontrolünde kullanılan teşhis paneli Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1 Çalışmada oluşturulan sığır grupları ve kullanılan teşhis paneli

### 3.1.3 Teşhis Paneli

#### *Spesifik Klinik Tablo*

Akut enfekte sığırların belirlenmesinde asimetrik büyümüş bölgesel lenf yumruları, yüksek ateş (39-41°C) ve konjunktivalarda peteşiyel kanamalar gibi hastalığın tipik klinik belirtilerinden yararlanılmıştır.

### ***Perifer Kan ve Lenf Aspiratı Frotilerinin Mikroskopik Analizi***

Sığırlardan tekniğine uygun olarak alınan perifer kan örnekleri ve lenf aspiratlarından ince yayma frotiler hazırlanmış ve Giemsa protokolüne uygun şekilde boyandıktan sonra *T. annulata* formlarının varlığı yönünden immersiyon yağı kullanılarak 100X'lik büyütmede ışık mikroskopunda (Olympus BX50, Tokyo, Japan) incelenmiştir (Coles 1986).

### ***Theileria annulata Sporozoit Yüzey Protein (TASP) Geni Sybergreen Tabanlı qPCR Analizi***

Çalışma kapsamında klinik tablo ve mikroskopik analizler temelinde akut enfekte olarak değerlendirilen sığırlar ile subklinik enfekte ve non enfekte gruplara dahil edilecek sığırlar için örneklenen 50 hayvan ve 5 adet yeni doğan buzağıya (1 haftalık) ait EDTA'lı kan örneklerinden PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak üreticinin açıklamalarına göre 35 µl toplam hacimde gDNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen gDNA'nın miktarı Qubit Florometre (Thermo Scientific, ABD) ile belirlenmiştir. Elde edilen gDNA'lar takip eden analizlerde kullanılana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Genomik DNA izolatlarında *T. annulata* DNA'sının araştırılması için *T. annulata* sporozoit yüzey protein genindeki (*TASP*) korunmuş bir alanı (160 bp) spesifik olarak amplifiye eden primerlerle (Forward: 5'-ATAAGCGCCCGAAGGGTAAT-3' ve Reverse: 5'- CCACCAGTCAAACGCTACAG -3', (Dandasena ve ark., 2018) Sybergreen tabanlı qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu, 5 µl gDNA, her bir primerden 0.25 µM ve 1× SYBR Green miks içeren 20 µl son hacimde kurulmuştur. Real-time PCR analizleri CFX Connect system (Bio-Rad, Hercules, CA) ile bir döngü 95 °C'de 4 dk, 40 döngü 95 °C'de 15 s, 60 °C'de 1,5 dk, 72 °C'de 5 dk thermal profili ve erime eğrisi analizi ile gerçekleştirilmiştir (Dandasena ve ark., 2018). Floresans sinyali, her 60 °C basamağının sonunda ve erime eğrisi edinimi sırasında sürekli olarak ölçülerek melt curve analizi oluşturulmuştur. *TASP*-qPCR pozitifliği belirlenen örneklerle ait ampikonlar ayrıca %1,5 agaroz jel üzerinde elektroforeze tabii tutulmuş ve ampikonlar Sanger sekanslama platformunda sekanslanarak *T. annulata* doğrulanması yapılmıştır.

### **3.2 Gruplara Dahil Edilen Sığırlarda *Theileria annulata* Gen Kopya Sayısı (GCN) ve Parazit Yükünün Hesaplanması**

*Theileria annulata*'nın qPCR ile teşhisini takiben, teşhis paneli sonuçları temelinde akut ve subklinik enfekte gruplara dahil edilen 15'er sığırdaki *T. annulata* gen kopya sayısı (GCN) ve parazit yükleri Dandasena ve ark. (2018) tarafından tarif edilen protokolün modifiye edilmesi ile aşağıda verildiği gibi belirlenmiştir:

#### ***Theileria annulata Sporozoit Yüzey Protein Geninin (TASP) Klonlanması ve Rekombinant Plazmid DNA Eldesi***

*Theileria annulata* TASP klonlanmasında pJet 1.2 plasmidini içeren CloneJet PCR cloning kit (Thermo scientific, ABD) kullanılmıştır. Bu kapsamda öncelikle, TASP geninin *T. annulata* gDNA'larından (laboratuvardaki referans izolatlar ve çalışmadan elde edilmiş izolatlar) amplifikasyonu 5'-TTGCGAATGCGGTCCATTTC-3' ve 5'-CTGGCAGGGTGAGAACGTAA -3' primerleri ile Phusion High fidelity DNA polimerase (ThermoScientific) kullanılarak Dandasena ve ark. (2018) tarafından tarif edilen protokol üzerinden gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel üzerinde belirlenen hedef büyüklükteki PCR ürünleri GenJet Jel Ekstraksiyon kiti (Invitrogen, ABD) ile pürifiye edilerek pJet 1.2 plasmidine kit protokolüne göre klonlanmış ve takiben ligasyon ürünleri Top10 kompetent *E. coli* hücrelerine transforme edilerek ampisilinli LB agarda 37 °C'de 1 gece inkübe edilmiştir. LB agarda belirlenen kolonilerden *T. annulata* TASP primerleri ile PCR analizleri sonucu pozitif belirlenen koloniler ampisilinli LB medyuma aktararak 37 °C'de 1 gece inkübe edilmiştir. Sonrasında transforme *E. coli* hücrelerinden Thermo GenJet Plasmid pürifikasyon kiti (Invitrogen, ABD) kullanılarak rekombinant plazmitler elde edilmiştir. Rekombinant plazmitler, TASP primerleri ile PCR analizine tabii tutularak hedef geni taşıdıkları kontrol edilmiştir.

#### ***Gen Kopya Sayısının (GCN) Hesaplanması***

Plazmitlerin gen kopya sayısı, aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır (Gotia ve ark., 2016).

$$GCN = \frac{6.02 \times 10^{23} \text{ (kopya/mol)} \times \text{DNA miktarı (g)}}{\text{DNA uzunluğu (bp)} \times 660 \text{ (g/mol/bp)}}$$

Formülde; DNA uzunluğu = plazmid uzunluğu (2974 bp; pJet 1.2) + insert uzunluğu (tasP = 1065 bp). DNA miktarı = Plazmid konsantrasyonunu göstermektedir.

### ***Akut ve Subklinik Enfekte Sığırlarda Parazit Yükü Hesaplaması***

Akut ve subklinik enfekte gruplardaki sığırlarda *T. annulata* yükü aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (Ros-García ve ark., 2012). Bu kapsamda yukarıda verilen formüle göre belirlenen tahmini parazit gen kopya sayısı (Q), aşağıda belirtilen denklemde kullanılmış ve mililitre kandaki *T. annulata* ile enfekte hücre sayısının hesaplanmasında kullanılmıştır. Tüm analizler ve hesaplamalar ile eksozomal miRNA araştırılması için oluşturulan akut ve subklinik enfekte gruplardaki sığırlarda parazit yükleri ortaya konulmuştur.

$$\text{Parazitemi (P)} = Q \times (V_B/V_{EX}) \times (V_{EL}/V_T) \times (1/CN)$$

$V_B$  = Kan hacmi, 1000 ul

$V_{EX}$  = Ekstrakte edilen örnek hacmi, 200 ul

$V_{EL}$  = Elute hacmi, 50 ul

$V_T$  = PCR için kullanılan template, 1 ul

CN = Gen kopya sayısı (Genom başına 2 kopya olacak şekilde)

### **3.3 Çalışma Gruplarındaki Sığırlardan Serumların Eldesi, Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu**

Çalışma süresince klinik olarak akut theileriosis belirtileri gösteren sığırlardan teşhis paneli için alınan kan örneklerinin yanısıra serum izolasyonu için de tam kan örnekleri alınmıştır. Ayrıca subklinik enfekte ve non enfekte sığır gruplarının oluşturulması için örneklenen 50 adet sığır ile 5 adet yeni doğan buzağıdan da eş zamanlı olarak serum izolasyonu için tam kan örnekleri alınmıştır. Tam kan örnekleri buz aküleri eşliğinde soğuk zincir altında aynı gün bekletilmeden laboratuvara

getirilerek serumları uygun protokolle çıkarılmıştır. Elde edilen serumlar hemen -80 °C derin dondurucuya alınarak eksozom izolasyonuna kadar muhafaza edilmiştir.

### 3.3.1 Serum Örneklerinden Eksozom İzolasyonu

Çalışma kapsamında akut enfekte, subklinik enfekte ve non-enfekte gruplardaki 15'er sığırdan elde edilen serum örnekleri beşerli olarak her sığırın serum örneğinden 200 µl alınarak birleştirilmiş (akut ve subklinik enfekte gruplarda birleştirmelerde parazitemi değeri dikkate alınmıştır) ve her grup için üç replikasyon oluşturulmuştur. Bu şekilde her grup için üç örnek olmak üzere toplam dokuz örnek exoEasy Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) protokolüne göre miRNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Kit protokolüne geçmeden önce serum örnekleri saflaştırılmıştır. Bunun için de her gruptaki hayvanlardan elde edilen serum örnekleri nükleaz free su ile 1:1 oranında sulandırılmış ve ardından 300xg'de +4 °C'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatli bir şekilde steril bir ependorfa aktarılmıştır. Ardından süpernatant 10.000xg'de +4 °C'de 15 dk santrifüj edilmiş ve steril bir ependorf tüpe aktarılmıştır. Sonraki basamakta örnekler 0,22 µm'lik filtrelerden (GVS, İtalya) geçilerek filtreleme işlemi gerçekleştirilmiş ve kit protokolüne geçilmiştir. Protokol kısaca aşağıdaki gibi uygulanmıştır:

- ✓ Filtrelenmiş örnekler XBP solüsyonu ile 1:1 oranında karıştırılmıştır ve tüp birkaç defa alt üst olacak şekilde karıştırılmıştır.
- ✓ Karışım exoEasy kolonlarına aktarılmıştır ve 1000xg'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- ✓ Santrifüj bittikten sonra kolonun altındaki toplama tüpündeki içerik dökülmüş ve kolon tekrar bu tüpe yerleştirilmiştir.
- ✓ Kolon üzerine 10 ml XWP solüsyonu eklenerek 5000xg'de 5 dk santrifüj edilmiş ve toplama tüpü uzaklaştırılarak kolon 1.5 ml'lik steril ependorfa yerleştirilmiştir.

Kolon membranının tam ortasına 400 µl XE solüsyonu eklenerek oda ısısında 1 dk inkübe edildikten sonra 500xg'de 5 dk santrifüj edilerek eksozom izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

### 3.3.2 Eksozomların Karakterizasyonu

#### 3.3.2.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Elde edilen eksozomların yüzey morfolojisi, 25 kV'da taramalı elektron mikroskobu (SEM, Zeiss EVO LS10) kullanılarak elde edilmiştir. Taramalı elektron mikroskopisi için eksosomlar, 15 dakika boyunca %3,7 glutaraldehit içeren PBS kullanılarak fikse edilmiştir. PBS ile iki kez yıkandıktan sonra, sabitlenmiş eksozomlar artan orandaki etanol (sırasıyla %40, %60, %80, %96–98%) ile dehidre edilmiştir. Etanol buharlaştıktan sonra, numuneler silisyum bir alt tabakada oda sıcaklığında yaklaşık 30 dk kurumaya bırakılmış ve sonrasında SEM görüntüleme için, 120 saniye boyunca altın-paladyum (Au-Pd) katmanıyla püskürtmeyle kaplanmış (Quorum150R-ES) ve SEM ile analiz edilmiş ve görüntüler kaydedilmiştir.

#### 3.3.2.2 Western Blot

Eksozom izolasyonunun validasyonu için, eksozoma özgü tetraspanin grubu proteinlerin (CD9, CD63 ve CD81) varlığının gösterilmesi Western-blot analizleri ile yapılmıştır. Ayrıca proteinlerin hücresel orijinli olmadığını göstermek için negatif kontrol CYC (sitokrom C) de analizlerde kullanılmıştır.

#### SDS-PAGE Analizleri

SDS-PAGE analizlerinde TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit, %10 (Bio-Rad) aşağıdaki basamaklar takip edilerek Mini Protean Pre Cast Jel Sisteminde (Bio-Rad) uygulanmıştır. Her analiz öncesi aşağıdaki oranlarda taze %10'luk Amonyum Persülfat (APS) hazırlanmıştır.

#### %10 APS

% 10 APS	50 mg APS
	500 µl dH <sub>2</sub> O

1. Analize başlamadan önce 1 mm'lik cam plakalar kasete yerleştirilmiş ve ardından Mini-PROTEAN Tetra Jel dökme standına sabitlenmiştir. Daha sonra resolving jel içeriği aşağıdaki hacimlerde hazırlanarak elde edilen karışım vortekslenmiştir. Hazırlanan karışım, kasete yerleştirilecek olan tarağın dış kısmına kadar 0,5-1 cm kalacak şekilde dökülmüş ve donması beklenmiştir.

<b>Resolving jel</b>	
Resolver A	6 ml
Resolver B	6 ml
%10 APS	30 µl
Temed	3 µl

2. Ardından stacking jel içeriği aşağıdaki hacimlerde hazırlanarak vortekslenmiştir. Hazırlanan karışım kasetin boş kalan kısmını dolduracak şekilde dökülmüş ve tarak yerleştirilerek elektroforez öncesi 30 dk polimerizasyon için bekletilmiştir.

<b>Stacking jel</b>	
Stacker A	1 ml
Stacker B	1 ml
%10 APS	10 µl
Temed	2 µl

3. Elde edilen ekzosomlara 1:1 oranında 2X Laemmli sample buffer (Bio-Rad) eklenerek homojenizatörde lize edilmiştir.
4. İyice karışan ve jel kıvamı alan örnekler ısıtılmalı kuru blok içerisinde 95 °C'de 5 dk inkübe edilmiş ve proteinlerin denatüre olması sağlanmıştır.

5. İnkübasyon sonrası örnekler oda ısısında soğutulmuştur.
6. Jeller tanka yerleştirildikten sonra iç ve dış kısım 1X SDS elektroforez bufferı ile doldurulmuştur.
7. Taraklar jelden dikkatlice çıkarıldıktan sonra örnek ve Laemmli sample buffer karışımından 10 µl alınarak kuyulara yükleme yapılmıştır.
8. Protein büyüklüklerinin belirlenmesi için ilgili kuyucuklara protein standartları (Bio-Rad Precision Plus Protein Unstained Standards) 5 µl hacimde ilave edilmiştir.
9. Jeller 135 V'da 50 dk yürütülmüştür.
10. Proteinlerin jel içerisinde ilerlemesi tamamlandıktan sonra, jeller dikkatli bir şekilde iki cam plaka arasından çıkarılmış ve 1X SDS elektroforez bufferı içerisine alınmıştır.
11. Jel üzerindeki proteinlerin görüntülenmesi iBright CL750 Imaging System (Invitrogen, Carlsbad, CA) kemoluminesans görüntüleme sisteminde uygun UV dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

Elektroforez basamağından sonra SDS-PAGE jelleri Western Blot analizleri için PVDF membranlarına aktarılmıştır.

- ✓ Western Blot analizlerinde primer antikor olarak 4 °C'de anti-CD9, CD63, CD81 ve Cytochrome C (CYC) antikorları eklenmiş ve gece boyunca inkübe edilecektir ve 1/100 dilüsyonları kullanılmıştır.
- ✓ Blocking buffer içerisinde 1:5000 olarak dilüe edilmiş Goat anti-mouse IgG (H+L), HRP (Invitrogen, Carlsbad, CA) sekonder antikorunu kullanılmıştır.

Reaksiyonların görüntülenmesi "Western Blot Analizleri" başlığı altındaki protokol takip edilerek iBright CL750 Imaging System (Invitrogen, Carlsbad, CA) kemoluminesans görüntüleme sisteminde gerçekleştirilmiştir.

### **Western blot basamakları**

Western blot analizleri, Eksozom izolasyonunun validasyonu için, eksozoma özgü proteinlerin (CD9, CD63 ve CD81) varlığının gösterilmesi amacıyla yapılmıştır. Western Blot Analizleri Trans-Blot Turbo Transfer Sisteminde (Bio-Rad, ABD)

gerçekleştirilmiştir. Western blot için kullanılan solüsyonlar ve basamakları aşağıda verilmiştir.

1X Transfer Buffer	100 ml 10X Transfer Buffer (Bio-Rad)
	200 ml methanol
	700 ml dH <sub>2</sub> O

10X 1L TBS (Tris Buffered Saline)	24,2 g Tris base
	80 g NaCl
	pH 7.6 için HCl

1X TBS	90 ml dH <sub>2</sub> O + 10 ml 10X TBS
--------	---

Wash Buffer (TBS/T)	45 ml 10X TBS
	405 ml dH <sub>2</sub> O
	450 µl Tween 20 (%0,1)

Blocker Buffer (BSA)	90 ml 1X TBS
	10 ml BSA
	50 µl Tween 20 (%0,05)

1. 1X SDS elektroforez buffer içerisindeki SDS-PAGE jel, membrana transfer aşamasına kadar bekletilmiştir.
2. PVDF membran blotlama öncesi 30 ml saf methanolde şeffaf hale gelene kadar yaklaşık 3-4 dk bekletilmiş şeffaflandıktan sonra 30 ml 1X Transfer içerisinde 3 dk bekletilmiştir.
3. Ardından Transfer pedler (alt üst toplam 20 adet) 50ml 1X Transfer buffer içerisinde 3 dk tutulmuştur.
4. Bu basamaklar tamamlandıktan sonra kaset çıkarılmış ve kasetin tabanına birinci ıslatılmış ped (10 ad) ve üzerine PVDF membran daha sonra SDS-PAGE jel düzgün bir şekilde yerleştirildikten sonra jel üzerine ikinci ıslatılmış ped (10 ad) yerleştirilerek sandviç oluşturulmuştur.

5. Oluşturulan sandviçteki hava kabarcıkları roller ile giderilmiştir.
6. Kasetin kapağı kapatılarak Trans-Blot Turbo Transfer Cihazına (Bio-Rad, ABD) yerleştirilmiş ve 2,5 mA akımda 3 dk'da transferi gerçekleştirilmiştir.
7. Transfer sonrasında SDS-PAGE jel ve membran, membrana aktarım gerçekleştiğini kontrol etmek için UV ışın altında incelenmiştir.
8. Transfer sonrası PVDF membran 35 ml TBS/T içerisine alınmış ve 5 dk çalkalayıcıda tutulmuştur.
9. 20 ml blocking buffer içerisinde 200 µl (1:1000 oranında) dilüe edilmiş anti-CD9, CD63, CD81 ve CYC antikoları primer antikor olarak kullanılmıştır.
10. PVDF membran blocking buffer ile dilüe edilen primer antikor içerisine konulmuş ve oda sıcaklığında bir saat boyunca çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Böylece hem bloklama işlemi yapılmış hem de primer antikorun bağlanması sağlanmıştır.
11. İnkübasyon sonrasında PVDF membran TBS/T içerisine alınarak 5 dk 3'er kez yıkanmıştır.
12. Yıkama sonrasında UV ışın altında membrandan marker kısmı steril bistüri ucu ile kesilerek ayrılmıştır.
13. Marker bulunan membran ayrı traye alınıp 5 µl StrepTactin-HRP Conjugate (Biorad, ABD) ile 5 ml TBS-T içerisinde (1:1000 oranında dilüsyon) oda sıcaklığında bir saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır.
14. Diğer kısım membran ise ayrı bir traye alınarak 1:5000 oranında Blocker BSA ile dilüe edilmiş Goat anti-mouse IgG (H+L) HRP (Invitrogen) sekonder antikorunu içerisinde oda sıcaklığında bir saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır.
15. İnkübasyon sonrasında PVDF membranlar shaker'da 5 dk 3'er kez TBS/T ile yıkanmıştır.
16. Yıkama sonrası kemoluminesans görüntüleme için Clarity Western ECL Substrat (Bio-Rad, ABD) üreticinin açıklamalarına göre membran üzerine ilave edilerek 5 dk muamele edilmiştir.

Membranın görüntülenmesi iBright CL750 Imaging System (Invitrogen, Carlsbad, CA) kemolüminesans görüntüleme sisteminde uygun UV dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

### **3.3.2.3 Nanopartikül İzleme Analizi (NTA)**

Serumlardan elde edilen ekzozomların boyutlarının ve partikül sayılarının incelenmesi için NTA analizleri gerçekleştirilmiştir. NTA analizleri için üreticinin kullanım kılavuzunda belirttiği gibi (NanoSight NS300 Kullanım Kılavuzu, MAN0541-01-EN-00, 2017) belirli parametreler kullanılarak NanoSight NS300 (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, İngiltere) ile gerçekleştirilmiştir. Yakalamalar ve analizler, yerleşik NanoSight Yazılımı NTA3.3.301 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm parçacıkların bu seviyede görünür olduğu ve sinyal doygunluğu olmadığı bir seviye olarak kamera düzeyi 14 olarak ayarlanmıştır. Algılama eşiği ise belirsiz olanları hariç tutarken çoğu gözlemlenen parçacığı içeren 5 olarak sabitlenmiştir. Örnekler, nükleaz free su ile bir mL'lik nihai bir hacme seyreltildi ve parçacıkların/saniye oranını (30–100 parçacık/saniye) gözlemleyerek konsantrasyonları ayarlanmıştır. Buna göre en uygun seyretme oranı 100 kat olarak belirlenmiştir. Her ölçüm için, şu koşullar altında beş ardışık 60 saniyelik videolar kaydedilmiştir: hücre sıcaklığı 25 °C, şırınga hızı 22 µL/s (100 a.u.). Ekzozomlar, 488 nm lazer (mavi) ve bir bilimsel CMOS kamera kullanılarak tespit edilmiştir. NanoSight Yazılımı NTA3.3.301 yazılımını tarafından verilen ortalama boyut, mod (yani en çok bulunan EV'lerin boyut popülasyonu) ve parçacık/mL bilgileri incelenerek NTA analizi tamamlanmıştır.

## **3.4 Ekzozomal miRNA'ların İzolasyonu ve Yeni Nesil Dizileme (NGS) Platformunda Sekanslanması**

### **3.4.1 Serum Örneklerinden Ekzozomal miRNA İzolasyonu**

Çalışma kapsamında akut, subklinik ve non-enfekte gruplardaki 15'er sığırdan elde edilen serum her sığırın serum örneğinden 200 µl alınarak (Akut ve subklinik gruplarda birleştirmelerde parazitemi değeri dikkate alınmıştır) ve her grup için üç replikasyon oluşturulmuştur. Bu şekilde her grup için üç örnek olmak üzere toplam

dokuz örnek miRNeasy Serum/Plasma Kit (50) (Qiagen, Hilden, Almanya) protokolüne göre miRNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

- ✓ Sığır gruplarının serum örnekleri için Midi kolon kullanılmıştır.
- ✓ Örnekler XBP solüsyonu ile 1:1 oranında karıştırılarak tüp beş kez alt üst edilmiştir.
- ✓ Örnek/XBP solüsyonunun tamamı exoEasy kolonlarına aktarılmış ve ardından 1000xg'de +4 °C 1 dk santrifüj edilmiştir.
- ✓ Santrifüj sonrası kolonun altında bulunan toplama tüpünün içerisindeki içerik uzaklaştırılmış ardından kolon tekrar aynı toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- ✓ Kolon üzerine 3,5 ml XWP solüsyonu eklenmiş ve ardından 5000xg'de +4 °C 5 dk santrifüj edilmiş ve toplama tüpü atılıp kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- ✓ Kolon içerisine 700 µl Qiazol solüsyonu eklenerek 5000xg'de +4 °C 5 dk santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası toplama tüpünde biriken sıvı steril 1,5 ml hacme sahip ependorfa aktarılmış ve hızlıca vortexlenmiştir. Oda ısısında 5 dk inkübe edilmiştir.
- ✓ Inkübasyon sonunda 90 µl kloroform ependorfa ilave edilerek 15 saniye (sn) boyunca hızlıca çalkalanmıştır. Oda ısısında 3 dk tekrar inkübe edilmiştir.
- ✓ Inkübasyon sonunda 12.000xg'de +4 °C'de 15 dk santrifüj edilmiştir.
- ✓ Santrifüj sonrasında üç ayrı faza ayrılan örneklerin üst kısımda bulunan şeffaf reklı RNA'yı içeren kısmı ayrı bir steril 1,5 ml hacme sahip ependorfa alınmıştır.
- ✓ RNA içeren kısma kendisinin 2 katı hacimde etanol eklenerek iyice karıştırılmıştır.
- ✓ Elde edilen karışım RNeasy MinElute kolonunda tamamı bitene kadar 8000xg'de +4 °C'de 15 sn santrifüj edilmiştir.
- ✓ Santrifüj sonunda toplama tüpünde biriken içerik uzaklaştırılmış ve kolon aynı toplama tüpüne yerleştirerek kolona 700 µl RWT solüsyonu eklenmiş ve 8000xg'de +4 °C'de 15 sn santrifüj edilmiştir.

- ✓ Toplama tüpü içerisindeki sıvı uzaklaştırılmış kolon aynı toplama tüpüne yerleştirilmiş ve kolona 500 µl RPE solüsyonu eklenerek 8000xg'de +4 °C'de 15 sn santrifüj edilmiş ve takiben toplama tüpünde biriken sıvı boşaltılarak tekrar yerleştirilmiştir.
- ✓ Kolona 500 RPE solüsyonu eklenmiş ve 8000xg'de 2 dk santrifüj edilmiş ve toplama tüpü içerisinde biriken sıvıyla birlikte atılarak kolon yeni bir toplama tüpü yerleştirilmiştir.
- ✓ Kolonun kapağı açık bir şekilde santrifüj cihazının en yüksek hızında 5 dk membran kurutulmak için santrifüj edilmiştir.
- ✓ Santrifüjden sonra kolon steril 1,5 ml ependorfa yerleştirilmiş ve 14 µl RNase-free steril su kolona eklenerek 1 dk oda ısısında inkübe edilmiştir.
- ✓ İnkübasyondan sonra kolonun kapağı kapatılmış ve santrifüj cihazının en yüksek hızında 1 dk santrifüj edilerek RNA izolasyonu tamamlanmıştır.
- ✓ Elde edilen RNA'lar sonraki analizlerde kullanılmak üzere -80 °C dondurucuya kaldırılmıştır.

### **3.4.2 Eksozomal miRNA İzolatlarının Yeni Nesil Dizileme (NGS) Platformunda Sekanslanması**

Her bir grup için serum replikasyonlarından elde edilen eksozomal miRNA izolatlarının NGS platformunda sekans analizleri Genoks Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi (Ankara, Türkiye) firması üzerinden hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir. NGS protokolü özet olarak takip eden şekilde uygulanmıştır: Small RNA kütüphaneleri Illumina platformu için geliştirilen NEBNext, Multiplex Small RNA Library Prep Set (NEB) kiti kullanılarak üreticinin protokolüne göre oluşturulmuştur. Reverse transkripsiyon primeri, 5' adaptör ligasyonunu takiben örnek başına 10 ng RNA'nın 3' adaptör ligasyonundan sonra hibridize edilmiştir. İlk iplik cDNA sentezinden sonra Illumina platformuyla uyumlu barkod primerleri kullanılarak 12 döngülük PCR gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan kütüphane native %7'lik poliakrilamid jel (PAGE) ile yürütülerek değerlendirilmiştir. 160-180 bp'ye karşılık gelen DNA fragmentleri (3' ve 5' adaptörler dahil) 10 µl DNase ve RNase

içermeyen su içinde geri ekstrakte edilmiştir. Elde edilen kütüphane konsantrasyonu DNA 1000 Chips ile Agilent 2100 Bioanalyzer'da ölçülmüştür. Sekanslama kütüphaneleri Illumina NextSeq 550 platformunda sekanslanmıştır.

### **3.5 microRNA Dizileme Verilerinin Biyoinformatik Analizleri**

#### **3.5.1 Veri Önleme**

Ham küçük RNA-dizileme verilerinde düşük kaliteli okumalar (phred <Q20), adaptör dizileri, %5'ten fazla N olan okumalar ile 15 bazdan kısa okumalar fastp v0.20 (Chen ve ark., 2018) yazılımı kullanılarak filtrelenmiştir. Temiz okumaların kalite kontrolü FastQC (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc>) ve MultiQC v1.8 (Ewels ve ark., 2016) yazılımları ile değerlendirilmiştir. Tüm temiz okumaların dizi uzunluğu dağılımı hesaplanmış ve coMpSRA v1.0.3 yazılımı (Li ve ark., 2020) ile görselleştirilmiştir. Kalan diziler BLASTn v2.11.0 yazılımı kullanılarak Rfam 14.4 veritabanında hizalama analizlerine tabii tutulmuş ve rRNA, tRNA, snoRNA, snRNA ve diğer kodlama yapmayan dizilimler (miRNA'lar dışındakiler) filtrelenmiştir. Sonraki basamakta bilinen miRNA'ların tespit edilmesi için temiz okumalar, BLASTn v2.11.0 yazılımı ve -task "blastn-short" seçeneği kullanılarak sığır miRNA veri tabanı (mirBase) ve *T. annulata* için yayınlanmış small RNA verileri ile ilgili prekürsör ve olgun dizilere hizalanmıştır. Potansiyel yeni miRNA tahmini için, temiz okumalar miRNA'lara özgü dizilerin Bowtie2 (v2.2.5) (Langmead ve Salzberg 2012) yazılımı ve gen transfer formatı (gtf) verisi kullanılarak *Bos taurus* (GCA\_002263795.2) ve *T. annulata* (GCA\_000003225.1) genomlarına hizalanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Takiben, bilinen ve potansiyel yeni miRNA'ların ve ikincil yapıların tahmin edilmesi için miRDeep2 v2.0.1.2 (Friedländer ve ark., 2012) yazılımı kullanılmıştır.

#### **3.5.2 Anlamlılık Testleri**

miRNA ifade verilerinin gruplar arasında karşılaştırılabilmesi ve *T. annulata* enfeksiyonuyla ilişkili miRNA'ların belirlenebilmesi için, tespit edilen her miRNA'nın okuma sayıları milyondaki transkript sayısı (TPM) ya da ortanca oranı yöntemleri (Love ve ark., 2014) ile normalleştirilmiştir. Gruplar arasındaki anlamlı

miRNA'ların tespitine yönelik üç farklı yöntem, DESeq2 v1.30 (Love ve ark 2014), edgeR v3.14 (Robinson ve ark., 2010) ve limma (Ritchie ve ark., 2015) uygulanmıştır. Çoklu test probleminin giderilmesi amacıyla elde edilen p değerleri Benjamini-Hochberg (1995) prosedürüne (Benjamini ve Hochberg 1995) göre düzeltilmiştir. Düzeltilmiş p değeri %5'in altında olan ve kat değişimi 2 katın üzerinde olan miRNA'lar anlamlı kabul edilmiştir. Anlamlı bulunan miRNA'ların hedeflerinin tespitine yönelik TargetScan v7.2 (Agarwal ve ark., 2015) ve miRmap (<https://mirmap.ezlab.org/app/>) (Vejnar ve ark., 2013) yazılımları kullanılmıştır. Elde edilen hedef genlerin kesişimi, nihai kestirim sonucu olarak kullanılmıştır. Bu genler kullanılarak, GOSec v1.42 R package ve KOBAS v3.0 (Xie ve ark., 2011) yazılımları yardımıyla, gen ontolojisi (GO) fonksiyonel zenginleştirme analizleri ve Kyoto Gen ve Genom Aksiklopedisi (KEGG) yolak analizleri gerçekleştirilmiştir.

### **3.6 *Theileria annulata* Enfeksiyonu ile İlişkili miRNA'ların RT-qPCR ile Validasyonu**

Dizileme analizlerinde gruplar arasında ifade düzeyi önemli bulunan dört eksozomal miRNA'nın dolaşımdaki ekspresyon seviyeleri sekanslama verilerinin validasyonu için RT-qPCR platformunda analiz edilmiştir. Bu amaçla her gruptaki aynı bireylerden porsiyonlanarak ayrılmış serumlardan (akut enfekte, subklinik enfekte ve non-enfekte gruplarındaki 15'er sığır) miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen, ABD) izolasyon kitiyle miRNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen miRNA konsantrasyonu ve kalitesi Qubit MicroRNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) ile belirlenmiş ve RT-qPCR analizlerinde kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

Komplementer DNA'ların (cDNA) elde edilmesi için izole edilen RNA'ların ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis (NEB, ABD) kitinin standart protokolü takip edilerek reverse transkripsiyonu gerçekleştirilmiştir. Kit protokolü takip edilirken kit içerisinde bulunan random primerler yerine dizayn edilen stem-loop primerleri ve normalizasyon primeri için U6 gen bölgesi primeri kullanılmıştır. Kullanılan stem-loop primerleri ve normalizasyon primeri Tablo 4.1'de verilmiştir.

**Tablo 4.1** cDNA sentezinde kullanılan stem-loop primerleri.

Primer adı	Stem-Loop RT-Primer
	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACT
<b>bta-mir-29d</b>	AATCG
<b>bta-miR-124a</b>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCT TGGC
<b>bta-miR-122</b>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACC AAACA
<b>bta-mir-136</b>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTC CATC
<b>U6-RrtS</b>	CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT

Stem-loop primerleri ve U6 normalizasyon primeri 10 pmol'e sulandırılıp her primerden 5 µl alınarak primer mix hazırlanmıştır. Elde edilen primer mix karışımından 2 µl, miRNA'den 2 µl alınıp karışım miktarı nuclease free su ile 8 µl'ye tamamlanmıştır. Sonrasında elde edilen mix 65 C'de 5 dk inkube edilip hemen buz üzerine konulmuştur. Elde edilen mix üzerine 10 µl ProtoScript II Reaction Mix (2X) ve 2 µl ProtoScript II Enzyme Mix (10X) eklenerek sırasıyla 25°C de 5 dk, 42°C 1 saat ve son olarak enzim denatürasyonu için 80°C de 5 dk tutularak cDNA'lar elde edilmiştir. Elde edilen cDNA'lar Luna® Universal qPCR Master Mix (NEB, ABD), ve dizayn edilmiş primerlerle (Tablo 4.2) CFX Connect Real-time PCR sisteminde (Biorad, ABD) amplifikasyona tabii tutulmuştur.

**Tablo 4.2** qPCR analizinde kullanılan miRNA primer çiftleri

Primer adı	Forward Primer	Reverse Primer
<b>bta-mir-29d</b>	AACACGCTAGCACCATTTGAA	GTCGTATCCAGTGCAGGGT
<b>bta-miR-124a</b>	AACAATTAAGGCACGCGGTG	GTCGTATCCAGTGCAGGGT
<b>bta-miR-122</b>	AACCGGTGGAGTGTGACAAT	GTCGTATCCAGTGCAGGGT
<b>bta-mir-136</b>	AACACGCACTCCATTTGTTTTG	GTCGTATCCAGTGCAGGGT
<b>U6-FS/UNI-RS</b>	GCTTCGGCAGCACATATACTAAA AT	CGCTTCACGAATTTGCGTGTC AT

İnternal normalizasyon kontrol için U6 small RNA kullanılmıştır. Tüm örnekler üç tekrarlı çalışılmıştır. qPCR için termal döngü; 95°C’de 20 sn 1 siklus, takiben 95°C’de 10 sn ve 60°C’de 20 sn, 40 siklus, 70°C’de 10 sn 1 siklus olarak uygulanmış ayrıca primer spesifikliğini konfirmasyonu için melt eğrisi basamağı protokolün sonuna eklenmiştir. Elde edilen okumalar (Cq değerleri) U6 small RNA okumaları ile normalize edilerek  $\Delta\Delta C_t$  yöntemi ile gruplar arasındaki hedef miRNA’ların rölatif ekspresyon düzeylerinin hesaplanmasında kullanılmıştır (Faraldi ve ark., 2019).



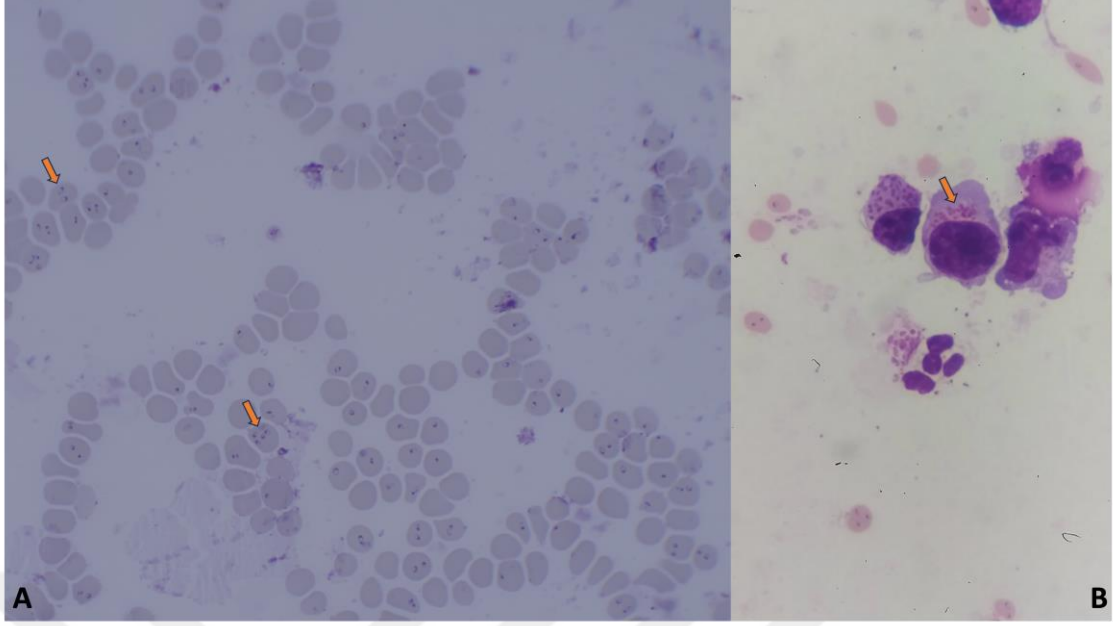
## 4. BULGULAR

### 4.1 *Theileria annulata* ile Enfekte Akut, Subklinik ve Non-enfekte Hayvanların Belirlenmesi ve Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışma kapsamında bölgedeki özel çalışan veteriner hekimlerin bildirimleri ile akut theileriosis klinik belirtileri sergileyen sığırların bulunduğu işletmelere gidilerek hayvanların klinik bulguları değerlendirilmiş ve akut theileriosis olarak klinik teşhis veteriner hekim eşliğinde konulmuştur (Şekil 4.1). Çalışma kapsamına alınan akut enfekte hayvanların perifer kan ile lenf yumrusu aspiratı frotilerinin incelenmesinde tipik olarak *T. annulata* şizont ve piroplasmik formların varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2).

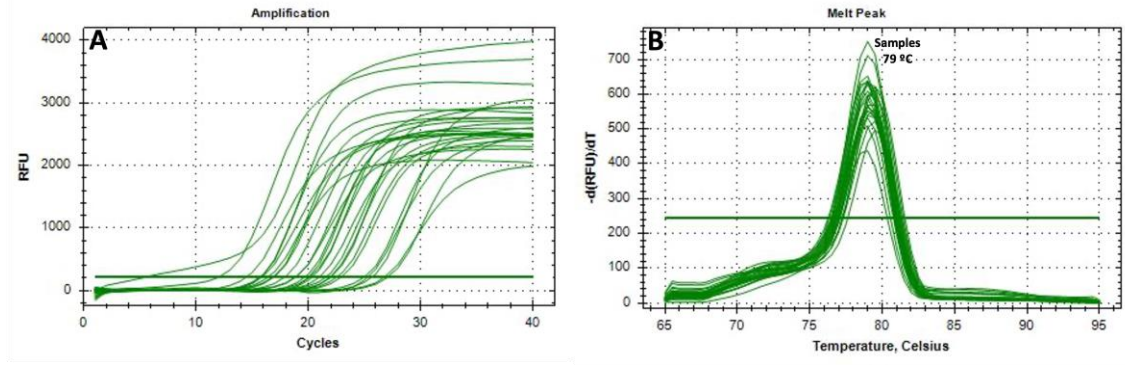


Şekil 4.1 Araştırma bölgesinde akut theileriosis'li sığır (orijinal)

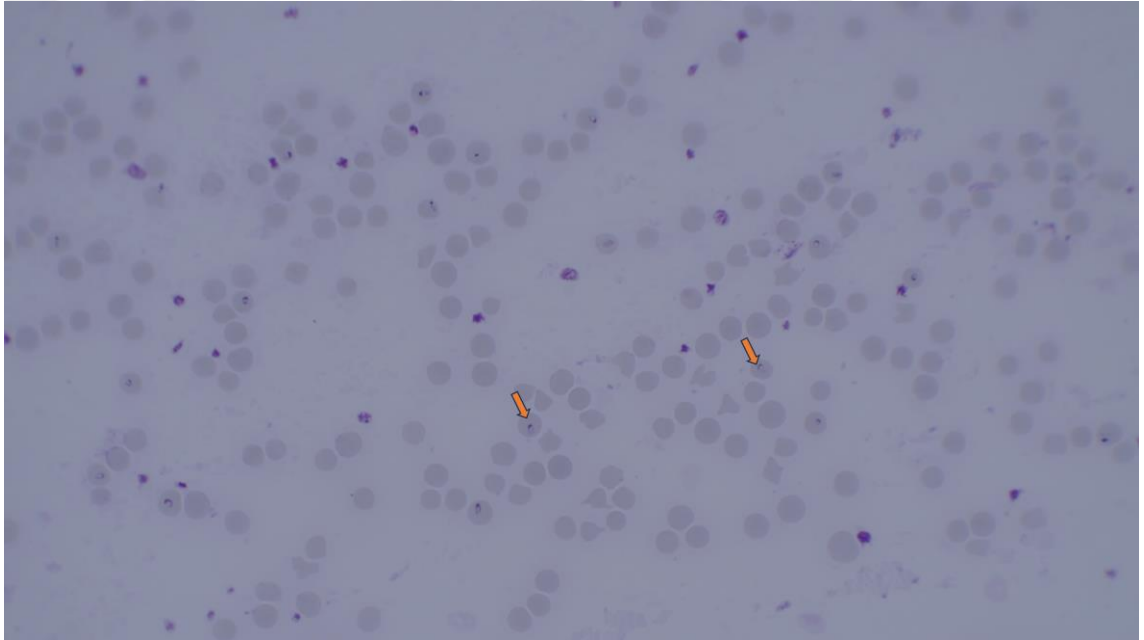


**Şekil 4.2** Akut enfekte sığırın lenf aspiratı frotisinde belirlenen *T. annulata* şizontları (B); Perifer kan frotisinde belirlenen *T. annulata* piroplasmik formları (A) (orjinal)

Çalışma kapsamında subklinik enfekte ve non-enfekte sığırların belirlenmesi için akut enfekte hasta hayvanların bulunduğu işletmelerden örneklenen toplam 50 sığıra ait kan örneklerinden elde edilen gDNA izolatları *T. annulata* varlığı yönünden ön basamakta TASP qPCR ile analiz edilmiş ve 27'sinin moleküler olarak pozitif olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Ayrıca akut enfekte gruba dahil edilen sığırların da TASP qPCR ile pozitif olduğu belirlenmiştir. Subklinik enfekte olduğu moleküler olarak belirlenen 27 sığırın perifer kan frotilerinin incelenmesinde 20 örneğe ait frotide piroplasmik formlar görülmüştür (Şekil 4.4). Akut enfekte gruba klinik tablo, mikroskopi ve qPCR pozitif değerlendirilen toplam 15 sığır dahil edilmiştir. Subklinik enfekte belirlenen 27 sığırdan 15'i takip eden parazit yükü hesaplamalarına göre ilgili gruba dahil edilmiştir. Ayrıca TASP qPCR analizleri ile negatif belirlenen hayvanlardan 10'u ile yeni doğan bir haftalık beş adet buzağıdan kan örnekleri de moleküler ve mikroskobik analizlere tabii tutularak non-enfekte grup oluşturulmuştur.



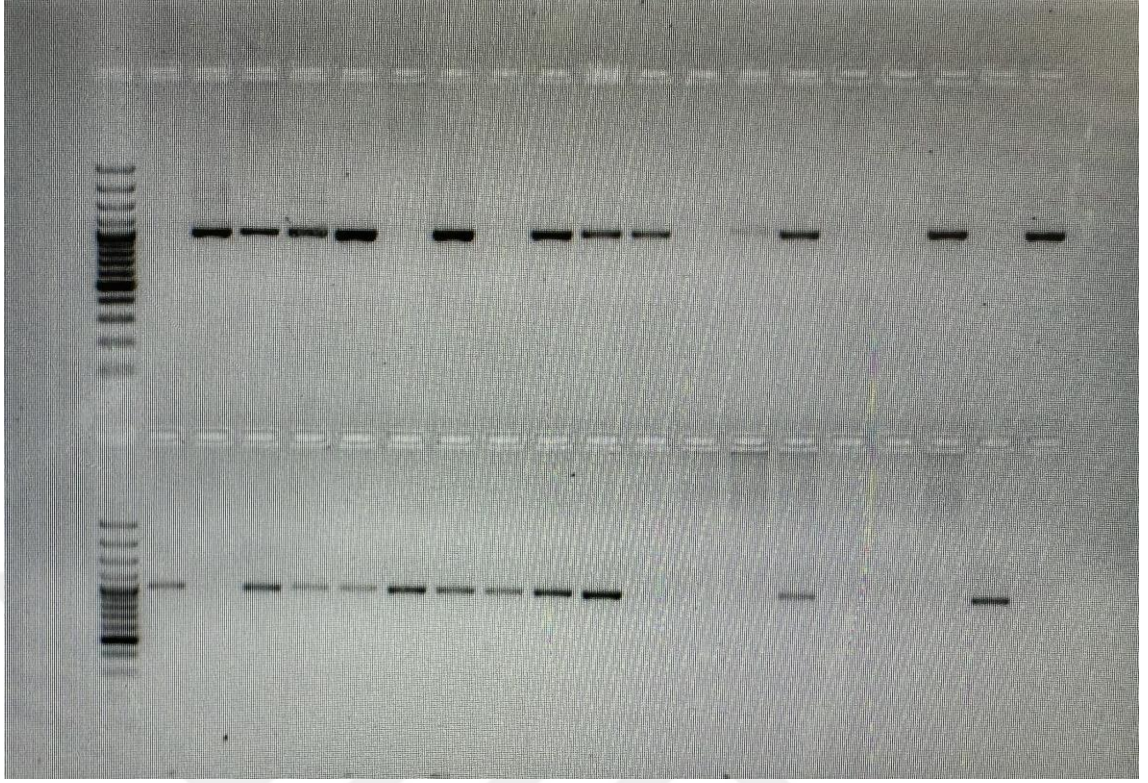
Şekil 4.3 *Theileria annulata* spesifik TASP qPCR ile pozitif değerlendirilen bazı sığırlara ait amplifikasyon eğrileri (A) ve spesifik melt eğrisi (B)



Şekil 4.4 *Theileria annulata* ile subklinik enfekte belirlenen bir sığırın perifer kan frotilerinde tipik piroplasmik formlar (orjinal)

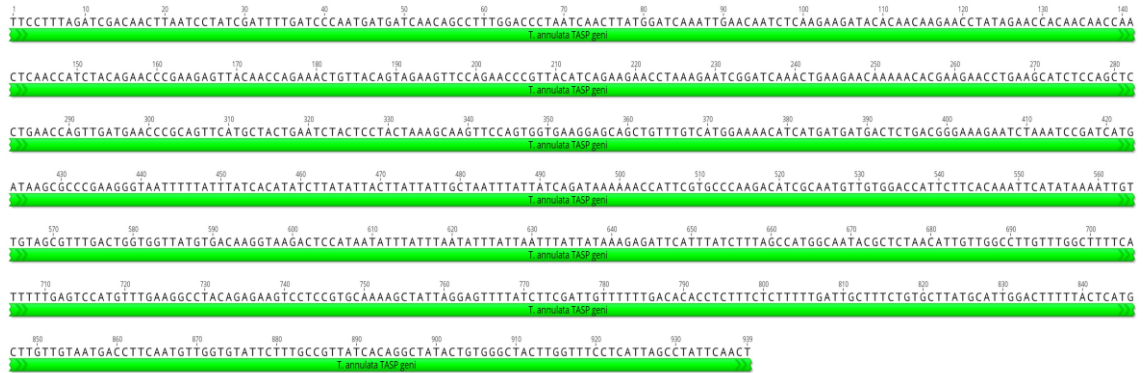
#### 4.2 Çalışma Gruplarına Dahil Edilen Akut ve Subklinik Sığırlarda *T. annulata* Gen Kopya Sayıları (GCN) ve Parazit Yükleri Üzerine Sonuçlar

Akut ve subklinik enfekte gruplara dahil edilen grup başına 15 olmak üzere toplam 30 sığırın tam kan örneklerinden çıkarılan gDNA izolatlarında öncelikle TASP gen bölgesi spesifik primerlerle PCR'da çoğaltılmış ve tüm örneklerde hedef büyüklükte (1065 bp) ampliconlar agaroz jel üzerinde belirlenmiştir (Şekil 4.5).



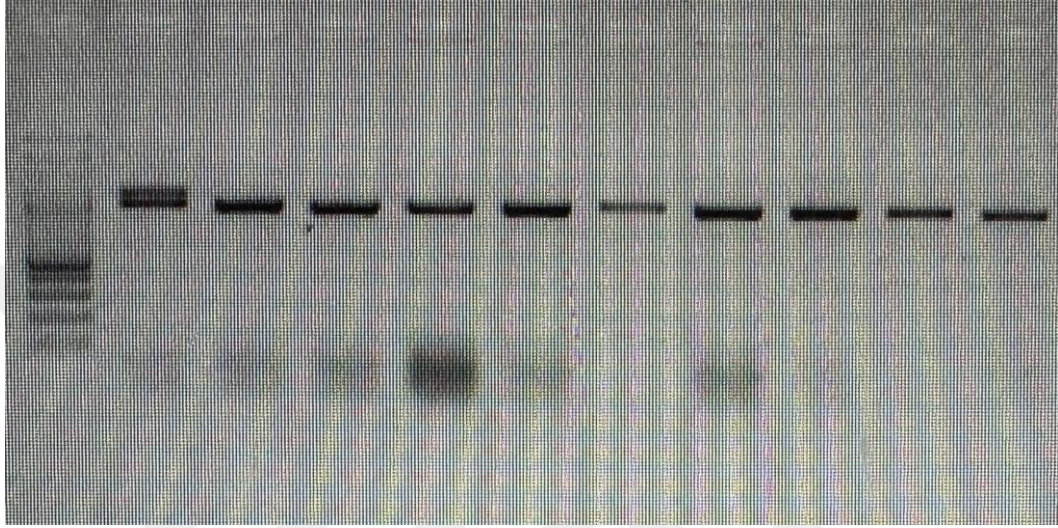
**Şekil 4.5** Akut ve subklinik enfekte gruplardaki sığırlara ait gDNA izolatlarının TASP PCR analizi sonucu agaroz jel üzerinde belirlenen ampliconlar

Gen kopya sayıları (GCN) ve parazit yükü hesaplamaları için ilgili protokole geçmeden önce her iki gruptaki hayvanlara ait TASP gen bölgesi ampliconları Sanger platformunda sekanslanarak *T. annulata* confirmasyonu yapılmıştır. Elde edilen 30 örneğe ait nükleotid sekanslarının hizalama analizleri sonucu %100 benzer oldukları tespit edilmiştir. Şekil 4.6'da bir örneğe ait TASP gen bölgesi nükleotid dizisi sunulmuştur.



**Şekil 4.6** Enfekte belirlenen bir sığırdaki *T. annulata* TASP gen bölgesi nükleotid sekansı

Gen kopya sayısı (GCN) ve parazit yükünün izolatlarda belirlenmesi için bir örneğe ait TASP PCR ürünü pJet 1.2 plazmid vektöre klonlanarak rekombinant plazmid elde edilmiştir. *E. coli* Top10 hücrelerine transforme olan plazmidleri içeren katı besiyerindeki koloniler PCR ile konfirme edilerek (Şekil 4.7) sıvı besi yerine aktarılmış ve sonrasında hücresel peletlerden plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır.



**Şekil 4.7** TASP gen bölgesi yönünden katı besi yerinde üreyen *E. coli* hücrelerinin koloni PCR analizi sonucu belirlenen pozitif koloniler

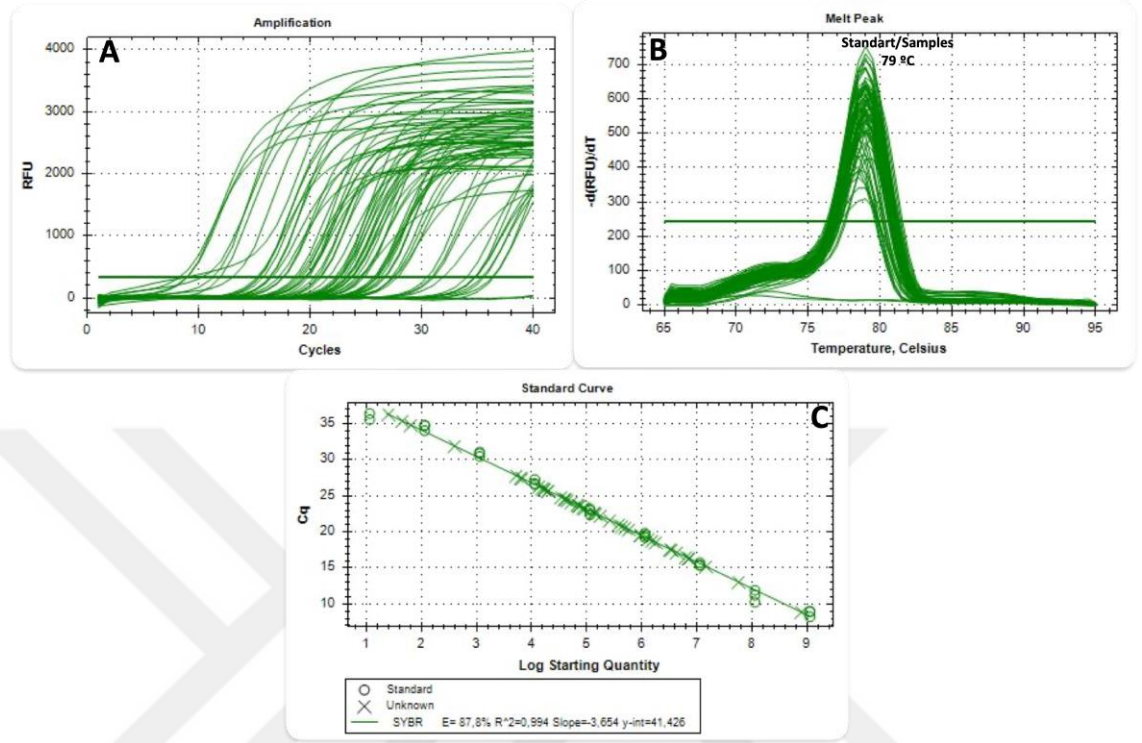
Elde edilen rekombinant plazmid DNA'nın konsantrasyonu belirlendikten sonra aşağıdaki formüle yerleştirilerek gen kopya sayısı hesaplanmıştır:

$$GCN = \frac{6.02 \times 10^{23} \text{ (copy/mol)} \times \text{Amount of DNA (g)}}{\text{DNA length (bp)} \times 660 \text{ (g/mol/bp)}}$$

DNA uzunluğu = Plazmid uzunluğu (2974 bp) + insert uzunluğu (tasp = 1065 bp), = 4039bp; DNAMiktarı = Plazmid konsantrasyonu  $50,3 \times 10^{-9} = 1,14 \times 10^{10}$

Gen kopya sayısı (GCN) hesaplanan rekombinant plazmid önce 1/10 sulandırılmış ve qPCR'da başlangıç konsantrasyon olarak  $1,14 \times 10^9$  alınmıştır. Bu şekilde  $1,14 \times 10^9$ 'dan  $1,14 \times 10^1$ 'e kadar 10 tabanında sulandırmalar hazırlanarak 9 standart oluşturulmuştur. İlgili standartlar üç tekrarlı oluşturularak qPCR sonucu elde edilen amplifikasyon, melt curve ve standart eğrileri Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Akut ve subklinik enfekte hayvanlara ait genomik DNA örneklerinin standartlara göre

GCN'leri ve ilgili formüle göre belirlenen parazit yükleri (parazitemi) Tablo 4.1'de verilmiştir.

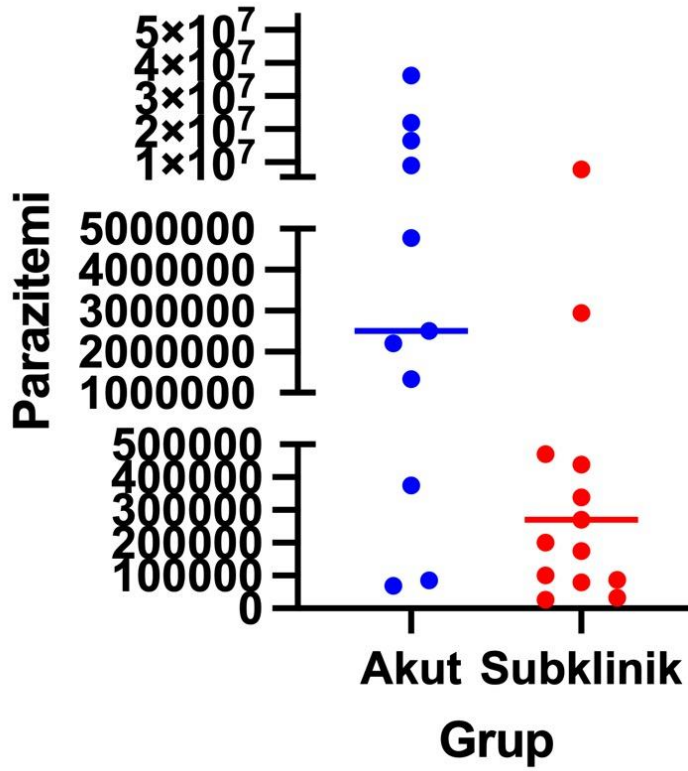


**Şekil 4.8** TASP rekombinant plazmid DNA ile oluşturulan standartlar ve örneklere ait genomik DNA'ların qPCR analizi sonucu belirlenen amplifikasyon (A), melt curve (B) ve standart eğrileri (C). C grafisi üzerindeki "X" sembolleri örnekleri, "O" sembolleri ise standartları ifade etmektedir.

**Tablo 4.1** Akut ve Subklinik enfekte gruplarındaki sığırlarda hesaplanan GCN ve Parazitemi düzeyleri. Aynı grupta farklı renkte gösterilmiş sığırlara ait serumlar parazitemi düzeyleri temelinde 5'erli olarak birleştirilmiş ve 3 replikasyon oluşturulmuştur.

Sığır Grupları	GCN	Parazitemi
<b>Akut Enfekte</b>	1,38E+04	6,90E+04
	1,71E+04	8,55E+04
	7,50E+04	3,75E+05
	1,49E+05	7,45E+05
	1,79E+05	8,95E+05
	2,66E+05	1,33E+06
	4,39E+05	2,20E+06
	5,02E+05	2,51E+06
	9,56E+05	4,78E+06
	1,80E+06	9,00E+06
	3,32E+06	1,66E+07
	4,39E+06	2,20E+07
	7,25E+06	3,63E+07
	5,79E+07	2,90E+08
	7,99E+08	3,99E+09
<b>Ortalama</b>	<b>5,84E+07</b>	<b>2,92E+08</b>
<b>Subklinik enfekte</b>	5,32E+03	2,66E+04
	6,43E+03	3,22E+04
	1,60E+04	8,00E+04
	1,73E+04	8,65E+04
	2,00E+04	1,00E+05
	3,49E+04	1,75E+05
	4,02E+04	2,01E+05
	5,40E+04	2,70E+05
	6,76E+04	3,38E+05
	8,77E+04	4,39E+05
	9,39E+04	4,70E+05
	1,38E+05	6,90E+05
	1,39E+05	6,95E+05
	5,90E+05	2,95E+06
	1,57E+06	7,84E+06
<b>Ortalama</b>	<b>1,92E+05</b>	<b>9,59E+05</b>

Akut ve subklinik enfekte gruplarındaki sığırların parazitemi düzeylerine göre dağılım grafiği Şekil 4.9'da grupların istatistiksel analizi ise Tablo 4.2'de verilmiştir. Akut enfekte sığırlarda belirlenen parazitemi düzeyleri subklinik enfekte sığırlara oranla yüksek belirlenmiş ve bu farklılık istatistiksel olarak da önemli bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).



Şekil 4.9 Akut ve subklinik enfekte gruplardaki sığırların parazitemi düzeylerine göre dağılım grafiği.

Tablo 4.2 Akut ve subklinik enfekte gruplardaki sığırların parazitemi düzeylerine göre grupların istatistiksel analizi.

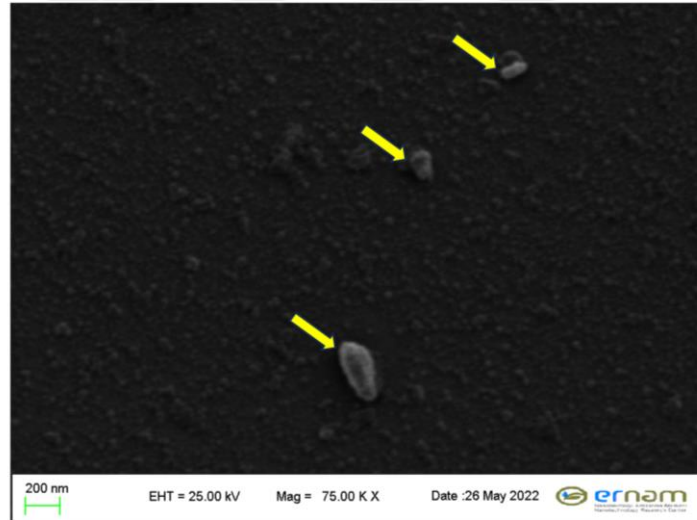
Table Analyzed	Col: One sample t test
Column B	Subklinik
vs.	vs.
Column A	Akut
Mann Whitney test	
P value	0,0027
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	303 , 162
Mann-Whitney U	42
Difference between medians	
Median of column A	2510000, n=15
Median of column B	270000, n=15
Difference: Actual	-2240000
Difference: Hodges-Lehmann	-2167800

Akut ve subklinik enfekte gruplardaki sığırların serum örnekleri (15 sığır/grup) parazitemi düzeylerine göre kategorize edilerek beşerli olarak birleştirilmiş ve her grup için üç tekrar oluşturulmuştur.

### 4.3 Serum Örneklerinde Eksozomların Karakterizasyon Sonuçları

#### 4.3.1 Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Sonuçları

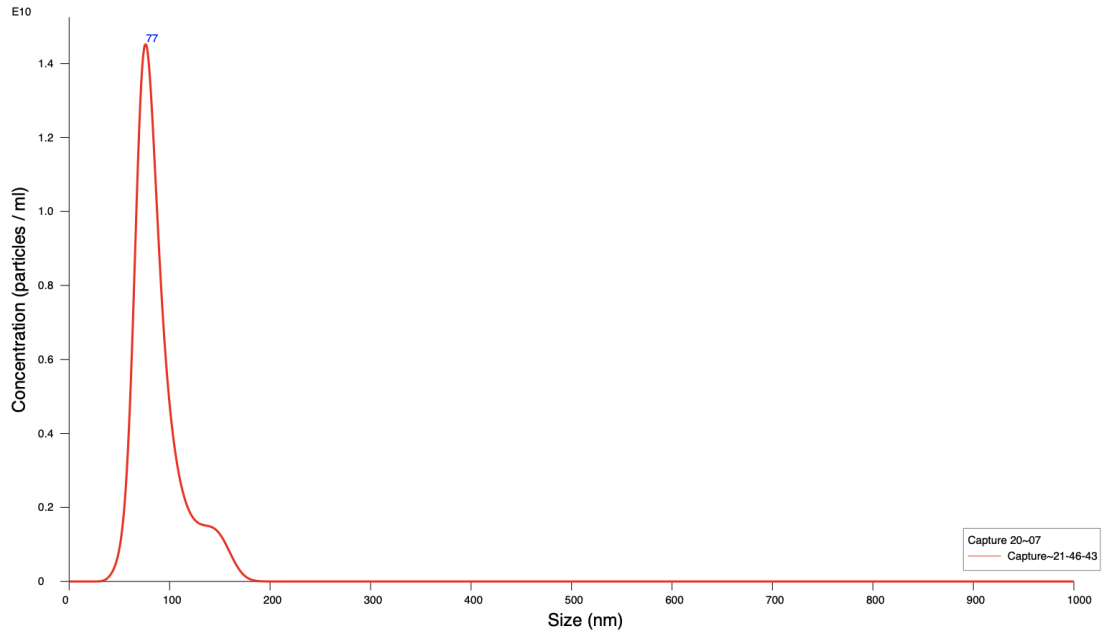
Çalışmada tüm gruplardaki sığır serumlarından elde edilen eksozomların SEM analizi sonucu Şekil 4.10'da verilmiştir. SEM analizi sonucu eksozomlara özgü yuvarlak-şekilli (round-shape) ve 70-150 nm boyutunda tipik veziküller tespit edilmiştir.



Şekil 4.10 Eksozomlardan elde edilen SEM görüntüleri (orjinal)

#### 4.3.2 Nanopartikül İzleme Analizi (NTA) Sonuçları

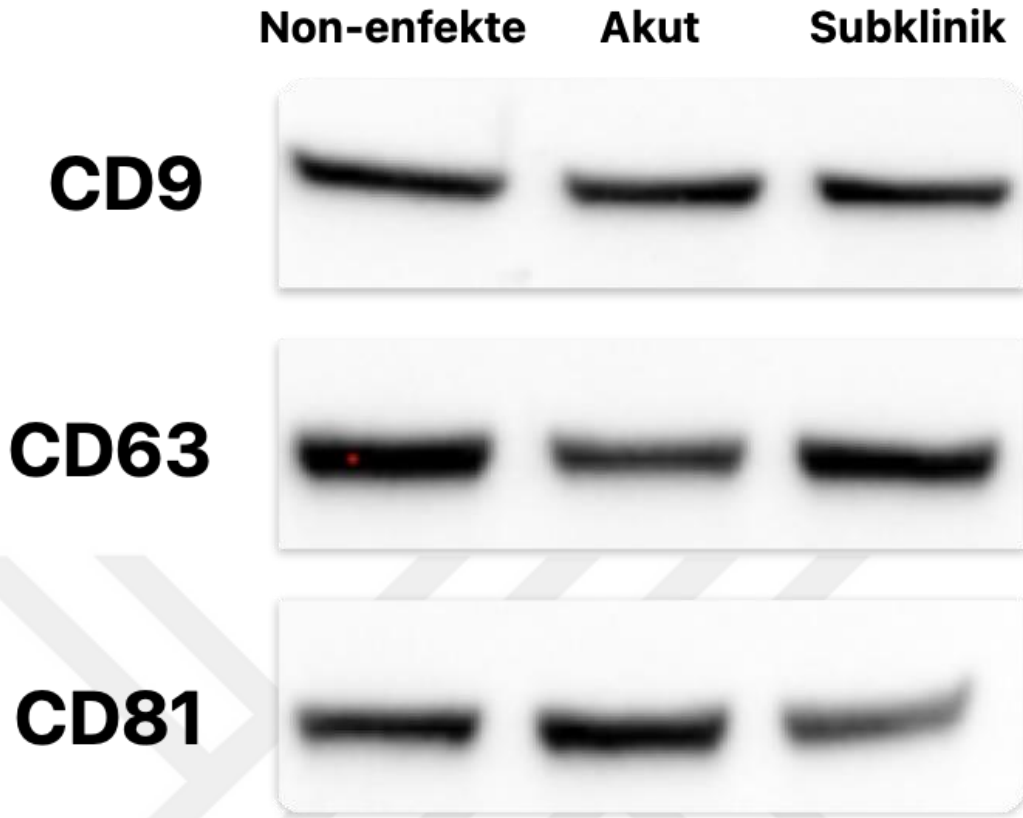
Çalışmada tüm gruplardaki sığır serumlarından elde edilen eksozomların NTA ölçümleri, ana parçacık boyutundaki en büyük pikin yaklaşık 79 nm olduğunu ve genel boyut dağılımının da 70 ila 200 nm arasında olduğunu (Şekil 4.11) göstermiş olup sonuçlar eksozomların karakterizasyonunu sağlamıştır.



**Şekil 4.11** Sığır serumlarından elde edilen eksozomların NTA ile partikül boyutu dağılımı (orjinal)

#### **4.3.3 Western Blot Analizi Sonuçları**

Çalışmada tüm gruplardaki sığırlardan izole edilen eksozomlardan elde edilen proteinlerin SDS-PAGE ve sonrasında spesifik antikorlarla Western Blot analizleri sonucunda eksozom markörleri CD9, CD63 ve CD81'in tüm örneklerde ifade olduğu tespit edilmiş (Şekil 4.12) ve eksozomların karakterizasyonu sağlanmıştır.



**Şekil 4.12** Sığır serumlarından elde edilen eksozomlara ait proteinlerin Western Blot analizi sonucu (orjinal)

#### 4.4 Sığır Gruplarında Eksozomların small-RNA Profilleri

Illumina NextSeq 550 dizileme sonucunda akut, subklinik ve non-enfekte gruplarda 3'er replikasyon olmak üzere (her bir replikasyon beş sığır serumunun birleştirilmesi ile oluşturulmuştur) toplam dokuz örneğin her bir örnek başına ortalama 15,84 milyon okuma ve örnek başına ortalama 783 milyon bazdan oluşuna ham veri elde edilmiştir. Toplam okuma sayısı yaklaşık 142,6 milyon, toplam baz sayısı ise yaklaşık 7,1 milyar olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.3).

**Tablo 4.3** Sığır serumlarından elde edilen eksozomların okuma istatistikleri.

Dosya	Sekans Sayısı	Toplam Uzunluk	Minimum Uzunluk	Ortalama Uzunluk	Maksimum Uzunluk	Q20 (%)	Q30 (%)	GC (%)
A1E1	19640241	971654822	38	49.5	50	95.05	93.38	53.47
A2E1	17709816	876034381	35	49.5	50	95.02	93.25	53.68
A3E1	18754079	926927845	39	49.4	50	95.21	93.5	52.75
C1E1	11788897	583227352	35	49.5	50	94.93	93.18	54.06
C2E1	18087591	892053713	35	49.3	50	95.34	93.75	53.8
C3E1	12204223	603411316	39	49.4	50	95.02	93.19	54.24
S1E1	13929002	688001477	35	49.4	50	93.63	91.43	54.82
S2E1	15869794	784225007	35	49.4	50	95.12	93.44	53.2
S3E1	14596732	721957446	35	49.5	50	95.17	93.42	54.53

Minimum kalite skoru 20 (PHRED>20) olacak şekilde gerçekleştirilen filtreleme işlemi sonrası elde edilen Tablo 4.4'te verilen ortalama okuma sayısı 10,9 milyon, baz sayısı 336,7 milyon olarak elde edilmiştir. Filtreleme işlemi sonrası elde edilen toplam okuma sayısı 130,9 milyon, baz sayısı ise 4 milyardır.

**Tablo 4.4** Sığır serumlarından elde edilen eksozomların filtrelenmiş okuma istatistikleri.

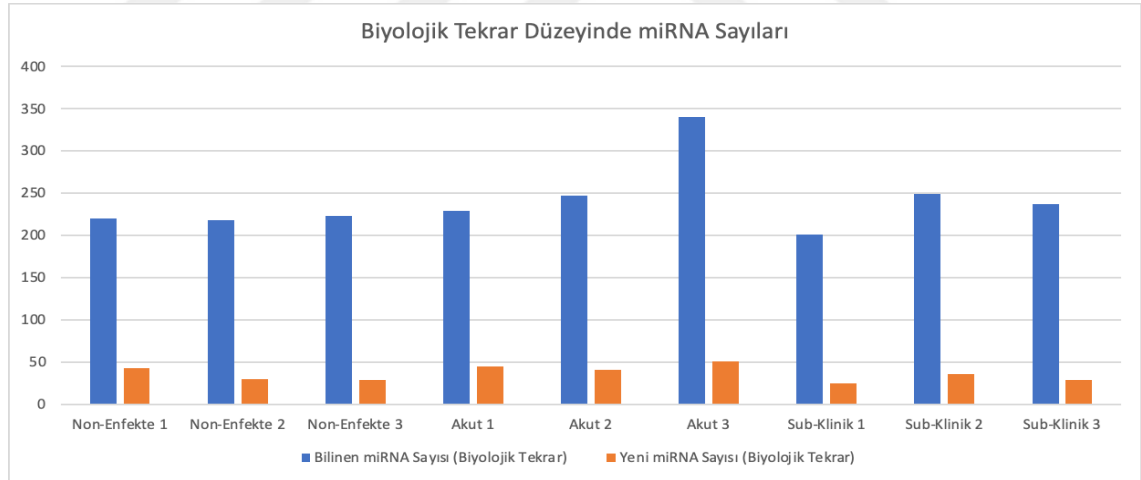
Dosya	Sekans Sayısı	Toplam Uzunluk	Minimum Uzunluk	Ortalama Uzunluk	Maksimum Uzunluk	Q20 (%)	Q30 (%)	GC (%)
A1E1	14189992	427457520	18	30.1	50	96.11	95.04	52.76
A2E1	12100973	367903150	18	30.4	50	96.16	95.08	52.32
A3E1	13517422	416137763	18	30.8	50	96.27	95.16	51.08
C1E1	7932004	243560838	18	30.7	50	96.06	94.99	52.98
C2E1	13467231	411573697	18	30.6	50	96.46	95.48	52.44
C3E1	7945105	242335930	18	30.5	50	96.19	95.09	52.66
S1E1	7165403	226382823	18	31.6	50	95.47	94.17	52.62
S2E1	10417196	325886157	18	31.3	50	96.34	95.3	52.3
S3E1	10397701	322063110	18	31	50	96.28	95.25	52.84

#### 4.5 Eksozomal microRNA'ların İdentifikasyonu ve Uzunluk Analizleri

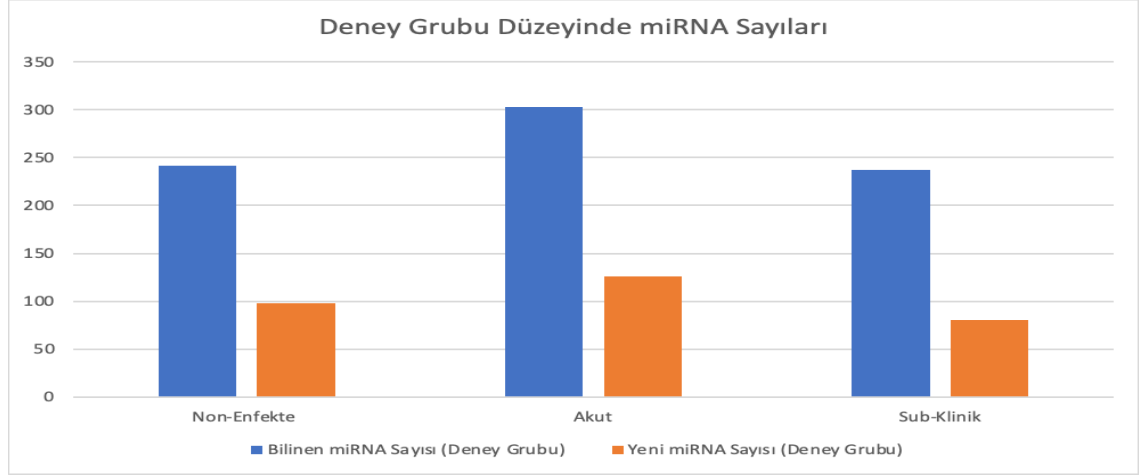
Small RNA geçerli verileri uzunluk taranmasına tabii tutularak 18-26 nt baz uzunluğu olan diziler korunarak biyoinformatik analizlerle miRNA molekülleri olarak identifiye edilmiştir. Her bir deney grubu ve ilgili biyolojik tekrarları için elde edilen bilinen ve yeni miRNA sayıları Tablo 4.5'te verilmiştir. Biyolojik tekrar ve deney grubu düzeyinde belirlenen miRNA sayıları sırasıyla Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.5** Her bir deney grubu ve ilgili biyolojik tekrarları için elde edilen bilinen ve yeni miRNA sayıları.

	Non-Enfekte 1	Non-Enfekte 2	Non-Enfekte 3	Akut 1	Akut 2	Akut 3	Sub-Klinik 1	Sub-Klinik 2	Sub-Klinik 3
Bilinen miRNA Sayısı (Biyolojik Tekrar)	220	218	223	229	247	340	201	249	237
Yeni miRNA Sayısı (Biyolojik Tekrar)	43	30	29	45	41	51	25	36	29



**Şekil 4.13** Biyolojik tekrar düzeyinde belirlenen miRNA sayıları.



**Şekil 4.14** Deney grubu düzeyinde belirlenen miRNA sayıları.

Çalışmada analiz edilen sığır gruplarında tespit edilen bilinen ve potansiyel yeni miRNA'lar mature dizilimleri, uzunlukları ile birlikte non-enfekte, akut ve subklinik enfekte gruplar için sırasıyla Tablo Ek1-Ek6'da verilmiştir.

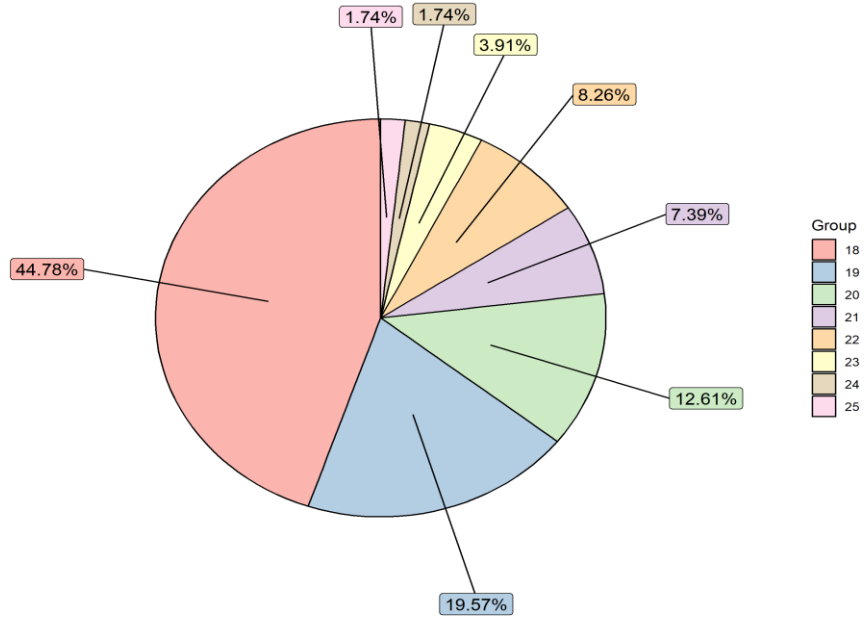
Sığır gruplarında belirlenen ekzozomal miRNA'ların uzunlukları Tablo 4.6'da verilmiştir. Bilinen ve potansiyel yeni ekzozomal miRNA'ların uzunluğunun 18 ila 25 nt arasında değiştiği görülmüştür (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16). Toplam bilinen miRNA uzunluğu dağılımında, en yoğun boyut sınıfının 18 nt olduğu, bunu sırasıyla 19 nt, 20 nt ve 22 nt takip ettiği belirlenmiştir (Şekil 4.15). Toplam yeni miRNA uzunluğu dağılımında, en yoğun boyut sınıfının 22 nt olduğu, bunu sırasıyla 21 nt, 23 nt ve 20 nt takip ettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.16). Hem bilinen hem de potansiyel yeni miRNA'lar için bu dört boyut sınıfının toplamının, toplam miRNA'ların toplam sayısının %50'sinden fazlasını oluşturduğu görülmüştür.

**Tablo 4.6** Sığır gruplarında belirlenen ekzozomal bilinen ve yeni miRNA'ların uzunlukları.

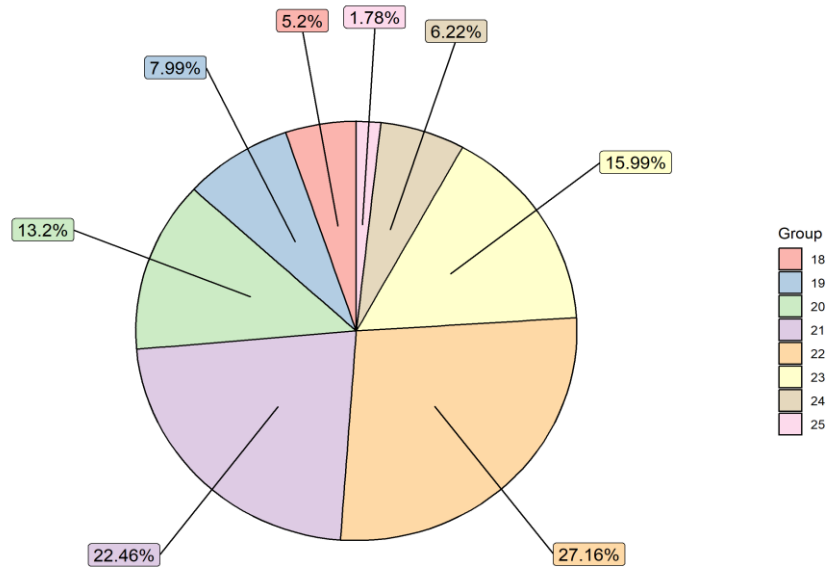
	Sayı	Uzunluk	Oran (%)
<b>Bilinen miRNA'lar</b>	103	18	44,78
	45	19	19,57
	29	20	12,61
	17	21	7,39
	19	22	8,26
	9	23	3,91

	4	24	1,74
	4	25	1,74
<b>Yeni miRNA'lar</b>	41	18	5,20
	63	19	7,99
	104	20	13,20
	177	21	22,46
	214	22	27,16
	126	23	15,99
	49	24	6,22
	14	25	1,78





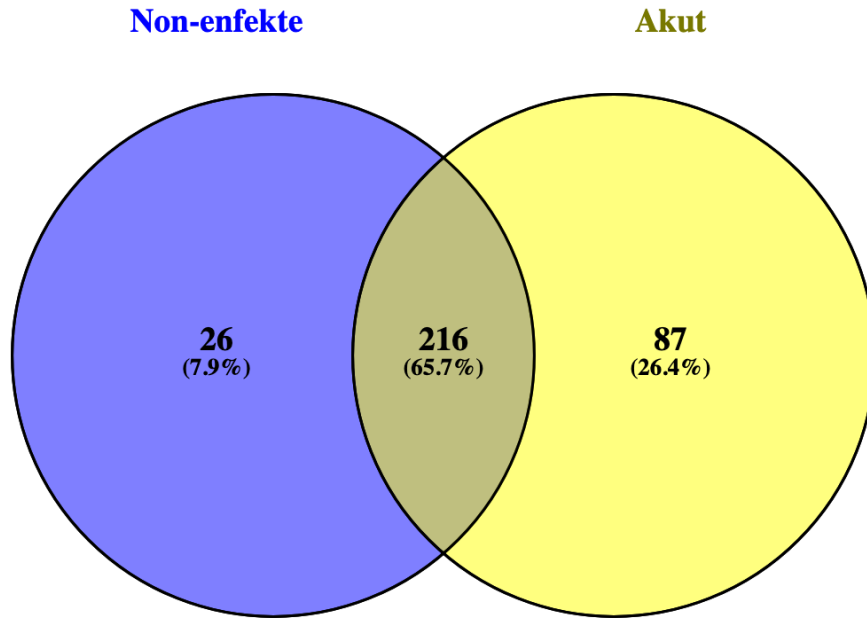
Şekil 4.15 Sığır gruplarından elde edilen bilinen eksosomal miRNA'ların uzunluklarının dağılımı.



**Şekil 4.16** Sığır gruplarından elde edilen yeni eksosomal miRNA'ların uzunluklarının dağılımı.

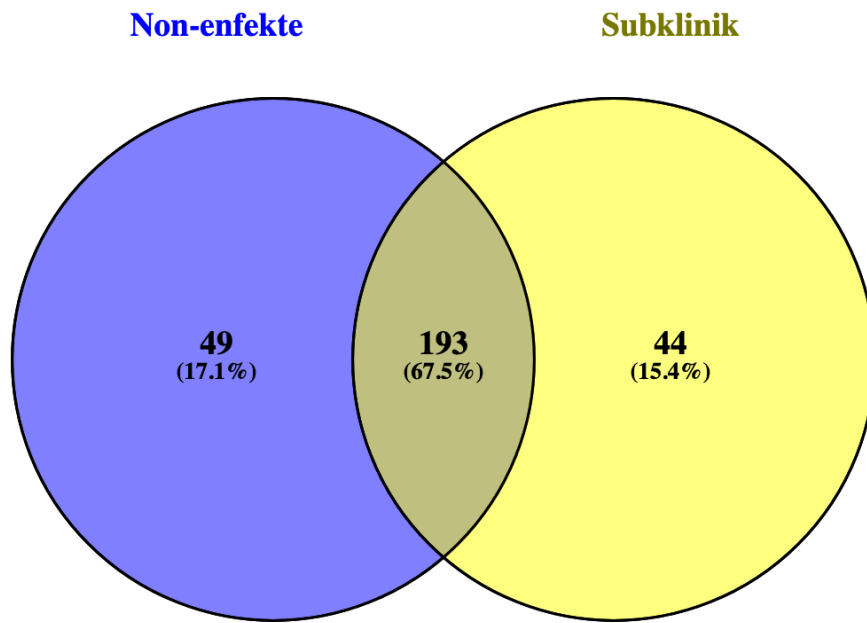
#### 4.6 Sığır Grupları Arasında Farklı ve Ortak Bilinen microRNA'ların Dağılımı

Akut enfekte, subklinik enfekte ve non-enfekte sığır gruplarının serumlarında belirlenen bilinen miRNA'ların gruplar arasında ikili kıyaslamalarını gösteren Venn diyagramları Şekil 4.17-Şekil 4.19'da gösterilmiştir. Non enfekte ve akut enfekte gruplar arasında 216 ortak miRNA bulunurken 26 miRNA yalnızca Non enfekte grupta, 87 miRNA ise yalnızca akut enfekte grupta belirlenmiştir (Şekil 4.17).



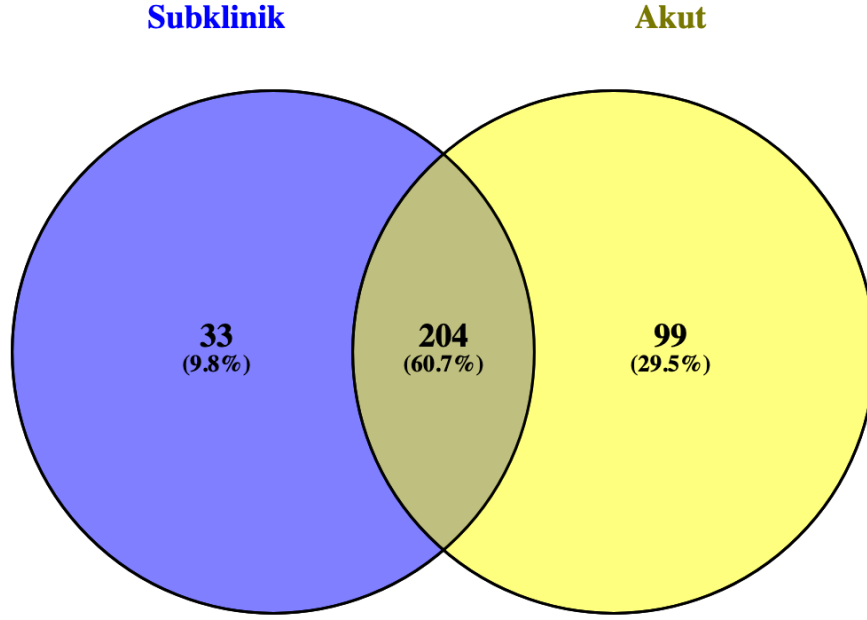
**Şekil 4.17** Non-enfekte ve Akut enfekte sığır gruplarının serumlarında belirlenen bilinen miRNA'ların ikili kıyaslamalarını gösteren Venn diyagramı.

Non enfekte ve subklinik enfekte gruplar arasında 193 ortak miRNA bulunurken 49 miRNA yalnızca non-enfekte grupta, 44 miRNA ise yalnızca subklinik enfekte grupta belirlenmiştir (Şekil 4.18).



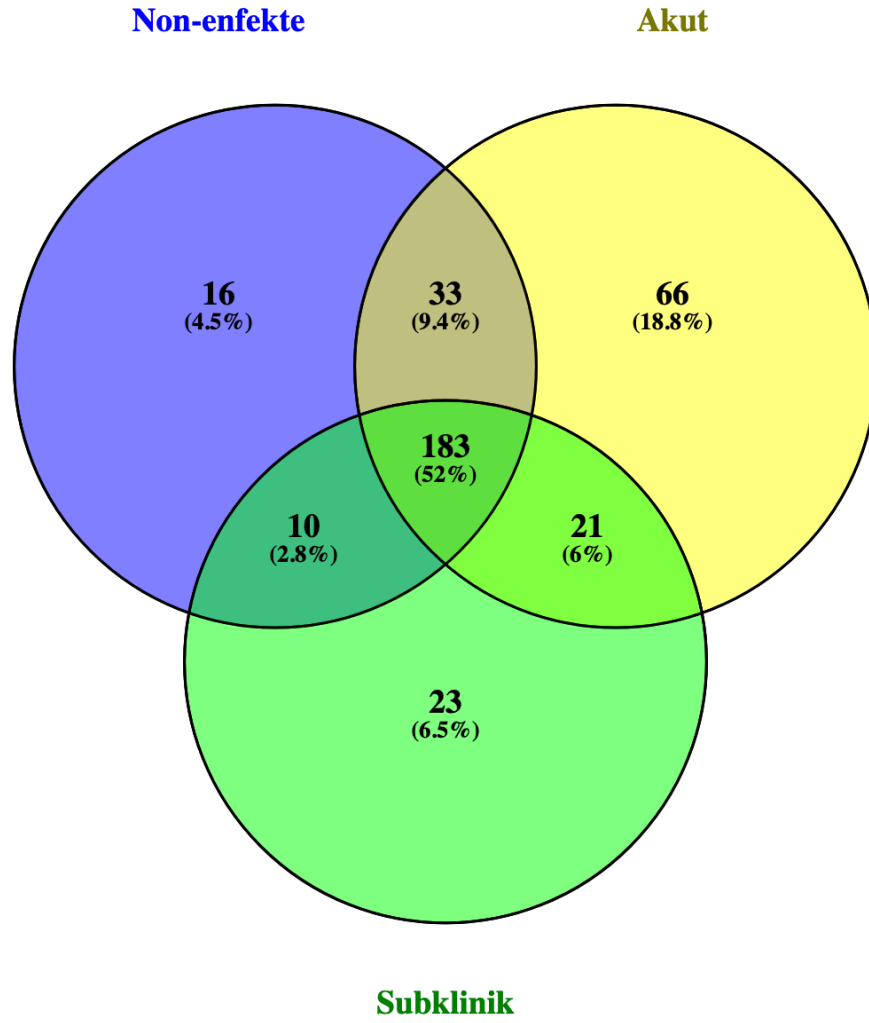
**Şekil 4.18** Non-enfekte ve subklinik enfekte sığır gruplarının serumlarında belirlenen bilinen miRNA'ların ikili kıyaslamalarını gösteren Venn diyagramı.

Subklinik ve akut enfekte gruplar arasında 204 ortak miRNA bulunurken 33 miRNA yalnızca subklinik enfekte grupta, 99 miRNA ise yalnızca akut enfekte grupta belirlenmiştir (Şekil 4.19).



**Şekil 4.19** Subklinik enfekte ve akut enfekte sığır gruplarının serumlarında belirlenen bilinen miRNA'ların ikili kıyaslamalarını gösteren Venn diyagramı.

Her üç grubun venn diagramı incelendiğinde (Şekil 4.20), 183 miRNA'nın her üç grupta ortak bulunduğu belirlenmiş, 16 miRNA yalnızca non-enfekte grupta, 23 miRNA yalnızca subklinik enfekte grupta ve 66 miRNA da yalnızca akut enfekte grupta tespit edilmiştir (Şekil 4.20).



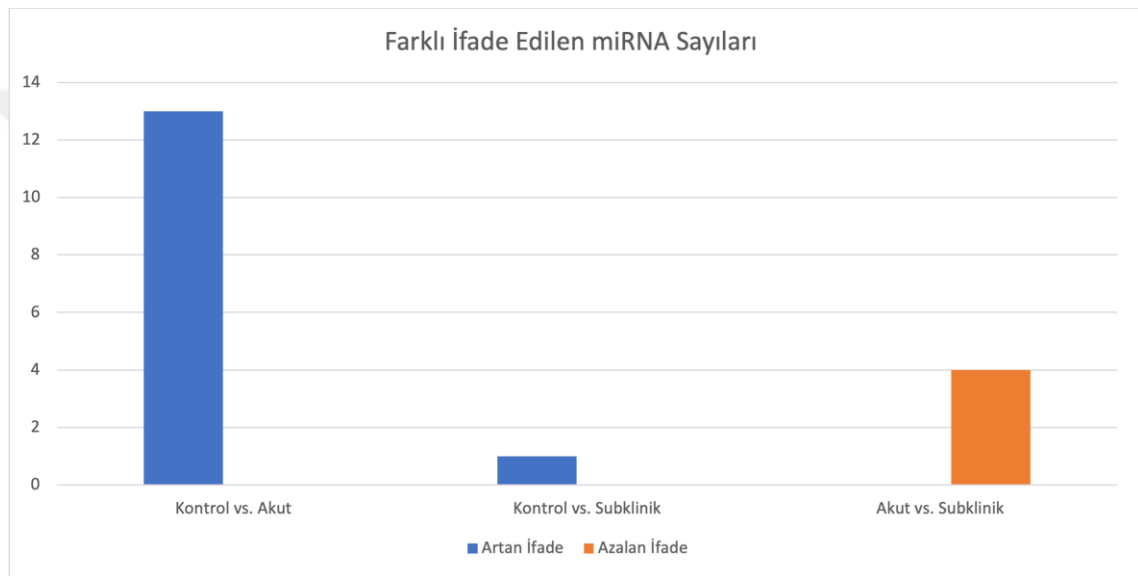
**Şekil 4.20** Non-enfekte, akut enfekte ve subklinik enfekte sığır gruplarının serumlarında belirlenen bilinen miRNA'ların kıyaslamalarını gösteren Venn diyagramı

#### **4.7 Sığır Grupları Arasında Farklı İfade Edilen Bilinen microRNA'ların Analiz Sonuçları**

Sığır grupları arasında karşılaştırmalı analiz sonucunda farklı ifade edilen bilinen miRNA'lar Tablo 4.7'da verilmiştir. Gruplar arasında upregüle veya downregüle olduğu belirlenen miRNA'lar ayrıca Şekil 4.21'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.7** Sığır grupları arasında karşılaştırmalı analiz sonucunda farklı ifade edilen bilinen miRNA'lar.

	Artan İfade	Azalan İfade
<b>Kontrol vs. Akut</b>	13	0
<b>Kontrol vs. Subklinik</b>	1	0
<b>Akut vs. Subklinik</b>	0	4

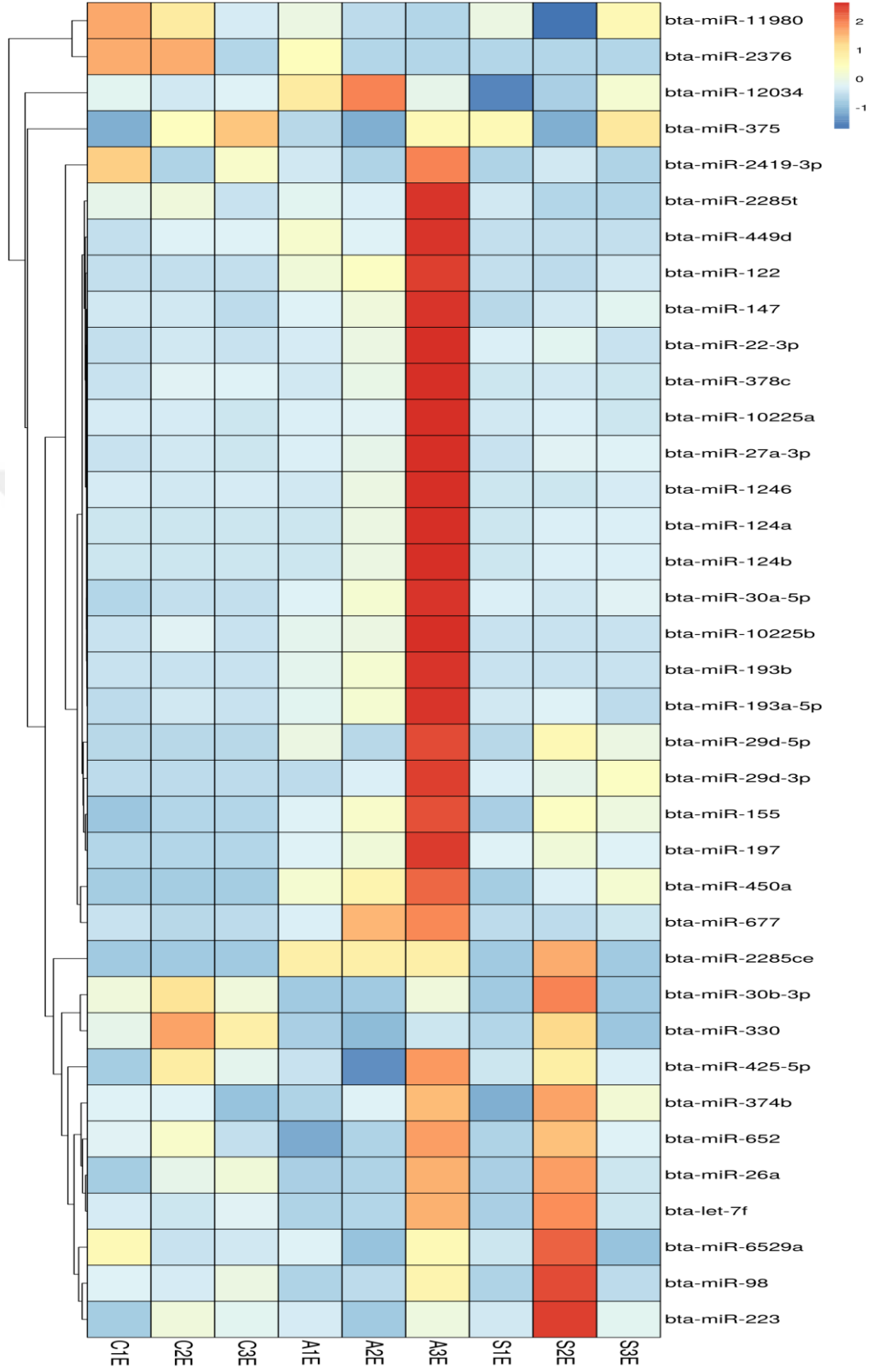


**Şekil 4.21** İkili karşılaştırmalarda farklı ifade edilen miRNA sayıları.

Gruplar arasında farklı ekspresyon düzeyi gösteren miRNA'ların ısı grafiği Şekil 4.22'de verilmiş olup ayrıca gruplar arası ikili kıyaslamalar sonucu upregülasyon ve downregülasyon sergileyen miRNA'lar kat değişimleri ve istatistiksel önemlilik anlamında "padj" değerleriyle birlikte Tablo 8 -Tablo 10'da verilmiştir. İkili karşılaştırmalar arası farklı ifade edilen miRNA'ların ilişkileri incelendiğinde: Non-enfekte ve subklinik enfekte grupların karşılaştırmasında artan ifade gösteren tek bir miRNA (bta-miR-29d-3p) tespit edilmiş olup bu miRNA'nın non-enfekte gruba göre akut enfekte grupta da anlamlı düzeyde artan ifadeye sahip olduğu görülmüştür. Ancak subklinik ve akut enfekte gruplar arasında bu miRNA'nın ifade düzeylerinde bir farklılık ortaya çıkmadığı belirlenmiştir. Diğer yandan gruplar arası kıyaslama

sonuçlarına göre non-enfekte gruba göre akut enfekte grupta anlamlı düzeyde artan ifade sergileyen bta-miR-122, bta-miR-124 ve bta-miR-136'nin enfeksiyonla ilgili önemli miRNA'lar olabileceği düşünülmüştür. Subklinik enfekte grupta akut enfekte gruba göre anlamlı düzeyde azalış sergileyen dört adet miRNA'dan bta-miR-122 ve bta-miR-677'nin non-enfekte gruba göre akut enfekte grubunda önemli düzeyde artan ifade sergilediği tespit edilmiştir. Tüm bu sonuçlarla *T. annulata* enfeksiyonları için tanısal biyobelirteç adayı olabilecek farklı ifade sergileyen 4 adet miRNA (bta-miR-29d, bta-miR-122, bta-miR-124a ve bta-miR-136) qPCR validasyon analizlerine dahil edilmiştir.





Şekil 4.22 Farklı ifade edilen miRNA'lara ait ısı grafiği.

**Tablo 4.8** Non-enfekte gruba göre akut enfekte grupta farklı ifade sergileyen miRNA'lar

		C1E	C2E	C3E	A1E	A2E	A3E	padj	log2FoldChange
ARTAN	bta-miR-22-3p	3412	4757	4239	6598	10297	12375	0,003692211	1,240968858
	bta-miR-2285ce	0	0	0	79	65	17	0,028461039	8,244910299
	bta-miR-29d-3p	0	0	0	0	98	271	0,035851826	9,309280815
	bta-miR-197	0	0	0	39	65	70	0,016170583	8,295167044
	bta-miR-193b	0	0	0	39	65	78	0,014078366	8,354835388
	bta-miR-450a	0	0	0	79	98	52	0,003692211	8,727156711
	bta-miR-124a	0	0	0	0	130	262	0,028461039	9,409381221
	bta-miR-122	16508	7703	10889	146560	164928	141164	8,37455E-16	3,653395975
	bta-miR-124b	0	0	0	0	130	262	0,028461039	9,409381221
	bta-miR-193a-5p	42	177	116	434	653	666	0,009805467	2,44828066
	bta-miR-677	1151	390	661	2252	11572	3637	0,00358411	2,949189204
	bta-miR-30a-5p	1194	1597	1789	3200	4642	3944	0,001567033	1,384829267
	bta-miR-27a-3p	5886	6603	6339	9325	12815	18160	0,014078366	1,083496741
AZALAN	NONE								

**Tablo 4.9** Non-enfekte gruba göre subklinik enfekte grupta farklı ifade sergileyen miRNA'lar

		C1E	C2E	C3E	S1E	S2E	S3E	padj	log2FoldChange
ARTAN	bta-miR-29d-3p	0	0	0	155	98	379	1,72283E-05	10,08961192
AZALAN	NONE								

**Tablo 4.10** Akut enfekte gruba göre subklinik enfekte grupta farklı ifade sergileyen miRNA'lar

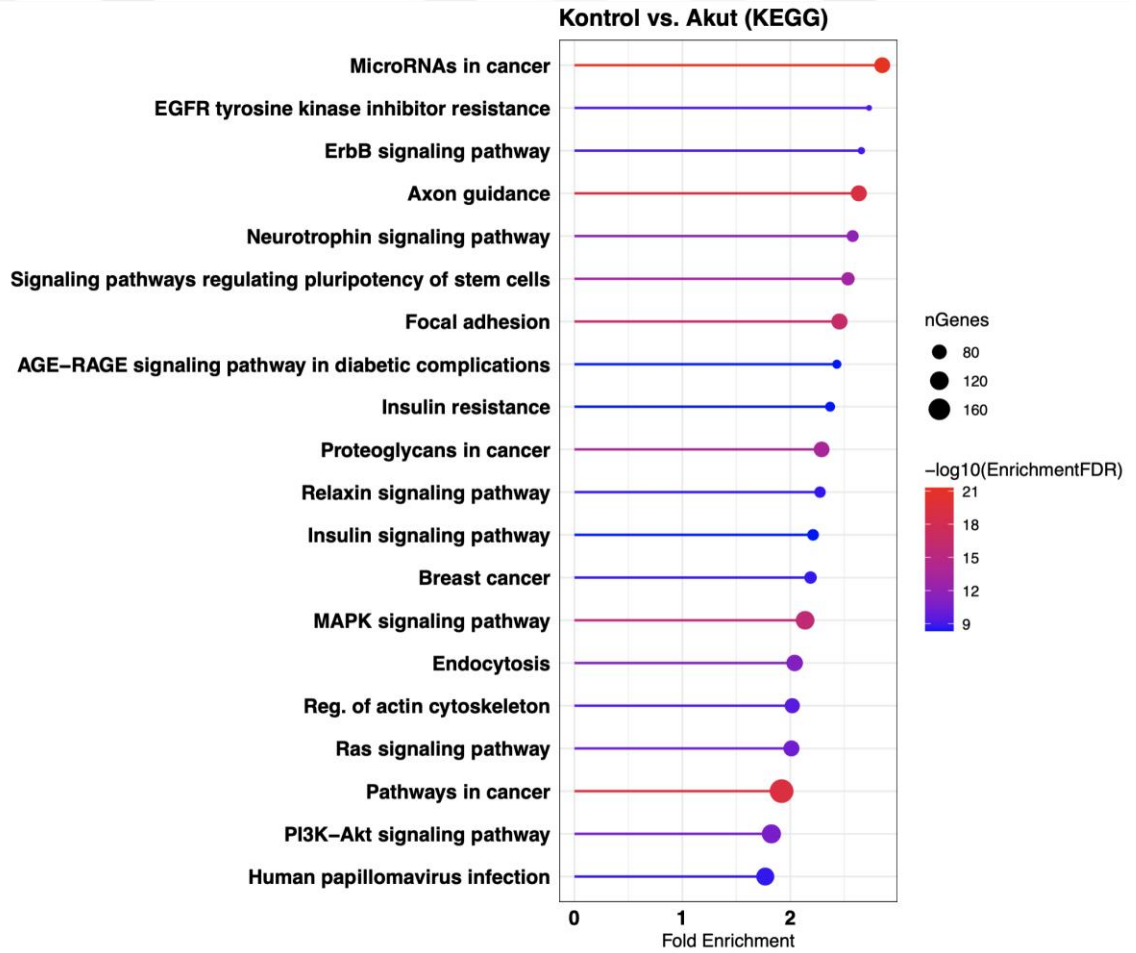
		A1E	A2E	A3E	S1E	S2E	S3E	padj	log2FoldChange
ARTAN	NONE								
AZALAN	bta-miR-122	146560	164928	141164	15508	3114	36257	0,000304407	-3,08399675
	bta-miR-677	2252	11572	3637	672	236	1327	0,002910414	-2,989221209
	bta-miR-10225b	118	130	236	0	0	0	5,1756E-05	-9,64429813
	bta-miR-449d	118	32	105	0	0	0	0,008011692	-8,753346757

#### **4.8 *Theileria annulata* ile Enfekte Sığırlarda Farklı İfade Sergileyen miRNA'ların KEGG-Klasifikasyonu ile Sinyal Yolağı ve Gen Ontoloji (GO) Zenginleştirme Analiz Sonuçları**

Sığır grupları arasında farklı ifade düzeyi sergilediği belirlenen Tablo 4.11-Tablo 4.14'te verilen miRNA'ların hedef genlerinin KEGG-yolağı ve GO veri bankası üzerinden zenginleştirme analizleri yapılmıştır. Bu kapsamda non-enfekte ve subklinik enfekte gruplar arasında farklı ifade sergileyen bir miRNA bulunması ve bu miRNA'nın aynı zamanda akut enfekte grupta da ifadesinin yüksek bulunması sebebiyle KEGG ve GO zenginleştirme analiz sonuçları non-enfekte ve akut enfekte gruplar arasında farklı ifade sergileyen miRNA'lar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada Q değeri ( $-\log_{10}$ , Enrichment FDR)  $<0,001$  önemli zenginleştirme indikatörü olarak belirlenmiş ve ilgili yolakların grafiğe dökülmesinde anlamlılık düzeyi olarak kullanılmıştır. KEGG-yolağı analiz sonuçları Tablo 4.11'da verilmiştir. Ayrıca akut enfekte grupta kontrol grubuna göre önemli düzeyde artan ifade sergileyen miRNA'ların hedeflediği genlerin zenginleştiği yolaklar Şekil 4.23'te verilmiştir. *T. annulata* ile enfekte sığırlarda non-enfekte gruba göre önemli artan ifade sergileyen miRNA'ların hedef genlerin KEGG-yolağı klasifikasyon sonuçlarına göre büyük kısmının kanser, akson yönlendirme, fokal adezyon ve MAPK sinyali gibi çoklu yolaklar içinde zenginleştiği ve görev aldığı tespit edilmiştir.

**Tablo 4.11** Non-enfekte ve akut enfekte gruplar arasında farklı ifade düzeyi sergileyen miRNA'ların KEGG yolağı analiz sonuçları

Enrichment FDR	nGenes	Pathway Genes	Fold Enrichment	Pathway	URL
4,90E-22	90	160	2.85176542207792	MicroRNAs in cancer	<a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta05206">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta05206</a>
6,38E-20	195	515	1.91963497667381	Pathways in cancer	<a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta05200">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta05200</a>
9,50E-20	92	177	2.63515298261061	Axon guidance	<a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04360">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04360</a>
2,30E-17	93	192	2.45568689123377	Focal adhesion	<a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04510">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04510</a>
1,33E-16	121	287	2.13744400199104	MAPK signaling pathway	<a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04010">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04010</a>
2,21E-14	89	197	2.29041960577494	Proteoglycans in cancer	<a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta05205">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta05205</a>
6,76E-14	69	138	2.5349025974026	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	<a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04550">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04550</a>
1,56E-12	60	118	2.57786704820603	Neurotrophin signaling pathway	<a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04722">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04722</a>
5,53E-12	97	241	2.0405439995689	Endocytosis	<a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04144">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04144</a>
2,10E-11	126	350	1.82512987012987	PI3K-Akt signaling pathway	<a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04151">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04151</a>
5,23E-11	92	232	2.01043999104344	Ras signaling pathway	<a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04014">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04014</a>
3,43E-10	84	211	2.01831107281344	Reg. of actin cytoskeleton	<a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04810">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04810</a>
5,65E-10	42	78	2.7298951048951	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	<a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta01521">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta01521</a>
9,66E-10	43	82	2.65855638264175	ErbB signaling pathway	<a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04012">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04012</a>
1,89E-09	63	146	2.18765566625156	Breast cancer	<a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta05224">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta05224</a>
1,93E-09	113	324	1.7681727994228	Human papillomavirus infection	<a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta05165">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta05165</a>
2,02E-09	57	127	2.27542437877084	Relaxin signaling pathway	<a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04926">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04926</a>
4,56E-09	50	107	2.36906784803981	Insulin resistance	<a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04931">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04931</a>
4,75E-09	47	98	2.43143718526372	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	<a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04933">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04933</a>
4,75E-09	58	133	2.21089249096768	Insulin signaling pathway	<a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04910">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04910</a>

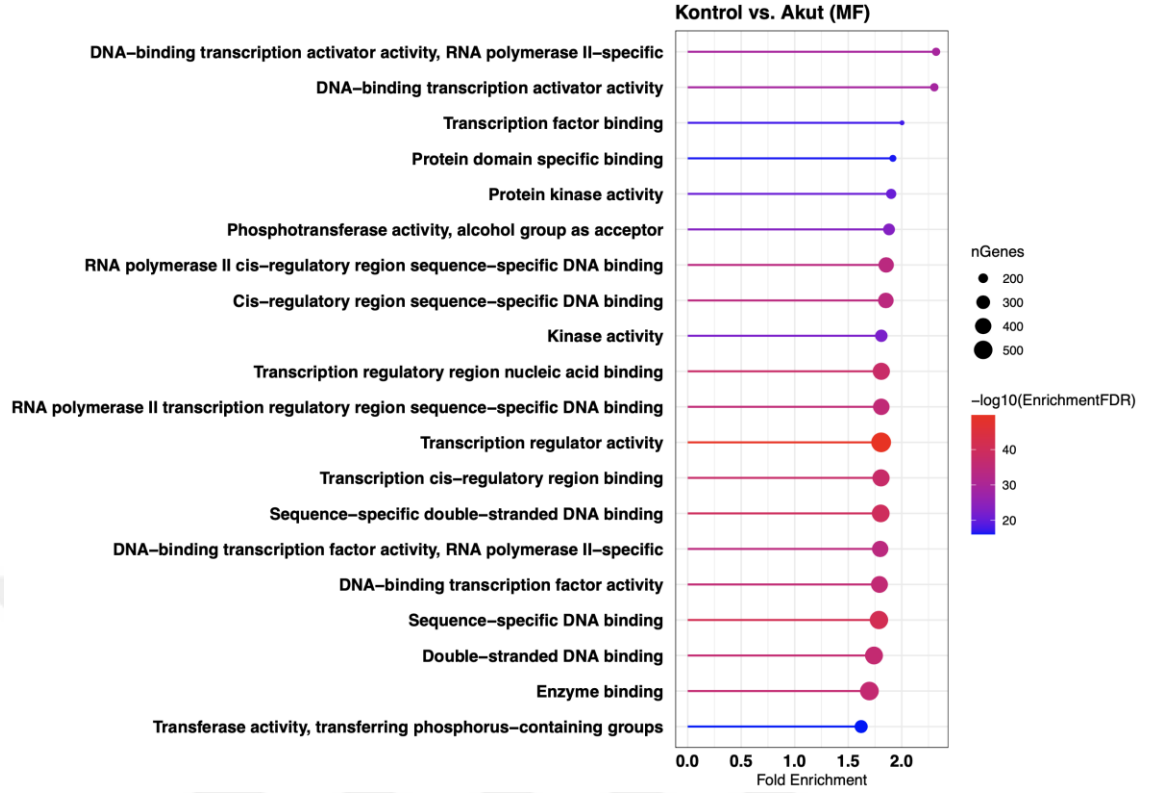


**Şekil 4.23** Non enfekte ve akut Enfekte sığır grupları arasında farklı ifade edilen miRNA'ların KEGG yolağı grafisi

Gen ontoloji (GO) veri bankasında gerçekleştirilen ilgili miRNA'ların hedef genlerinin fonksiyonel zenginleştirme analizi verileri moleküler fonksiyon bazında Tablo 4.12'de sonuçların grafik üzerinde gösterimi de Şekil 4.24'te verilmiştir. GO analiz sonuçları farklı ifade sergileyen miRNA'ların çeşitli moleküler fonksiyon yollarında zenginleştiğini göstermiş olup en yüksek düzeyde zenginleşme belirlenen üç moleküler fonksiyon yolağı Transkripsiyon regülatör aktvitesi (GO:0140110), Sekans spesifik DNA bağlanması (GO:0043565) ve Transkripsiyon regülatör bölgesi nükleik asit bağlanması (GO:0001067) olarak tespit edilmiştir.

**Tablo 4.12** Non-enfekte ve akut enfekte gruplar arasında farklı ifade düzeyi sergileyen miRNA'ların GO analiz sonuçlarına göre moleküler fonksiyon yolları

Enrichment FDR	nGenes	Pathway Genes	Fold Enrichment	Pathway	URL
1,78E-50	564	1582	1.80744003152347	Transcription regulator activity	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0140110">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0140110</a>
5,93E-42	491	1393	1.78698804784591	Sequence-specific DNA binding	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0043565">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0043565</a>
1,71E-40	461	1296	1.80337977994228	Sequence-specific double-stranded DNA binding	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:1990837">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:1990837</a>
1,35E-38	436	1222	1.80886666524964	Transcription regulatory region nucleic acid binding	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0001067">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0001067</a>
2,06E-38	435	1221	1.80619595392323	Transcription cis-regulatory region binding	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0000976">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0000976</a>
5,82E-37	469	1366	1.74065785970984	Double-stranded DNA binding	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0003690">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0003690</a>
5,89E-37	507	1514	1.69774850314811	Enzyme binding	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0019899">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0019899</a>
2,03E-36	422	1194	1.79184069699145	DNA-binding transcription factor activity	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0003700">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0003700</a>
4,69E-36	406	1138	1.80873542099377	RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific DNA binding	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0000977">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0000977</a>
7,56E-35	367	1005	1.85136169800349	Cis-regulatory region sequence-specific DNA binding	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0000987">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0000987</a>
9,86E-35	398	1122	1.79838009583999	DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0000981">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0000981</a>
1,74E-34	361	987	1.85430564875854	RNA polymerase II cis-regulatory region sequence-specific DNA binding	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0000978">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0000978</a>
8,01E-30	179	391	2.32095941143256	DNA-binding transcription activator activity, RNA polymerase II-specific	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0001228">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0001228</a>
1,52E-29	180	396	2.30445690672963	DNA-binding transcription activator activity	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0001216">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0001216</a>
4,25E-24	246	663	1.88110418992772	Phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0016773">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0016773</a>
6,26E-23	263	737	1.80917064617879	Kinase activity	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0016301">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0016301</a>
3,97E-21	210	560	1.90117694805195	Protein kinase activity	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0004672">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0004672</a>
3,03E-18	158	400	2.00257305194805	Transcription factor binding	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0008134">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0008134</a>
5,46E-17	166	439	1.9170561784457	Protein domain specific binding	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0019904">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0019904</a>
1,03E-16	281	879	1.6207227073268	Transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0016772">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0016772</a>

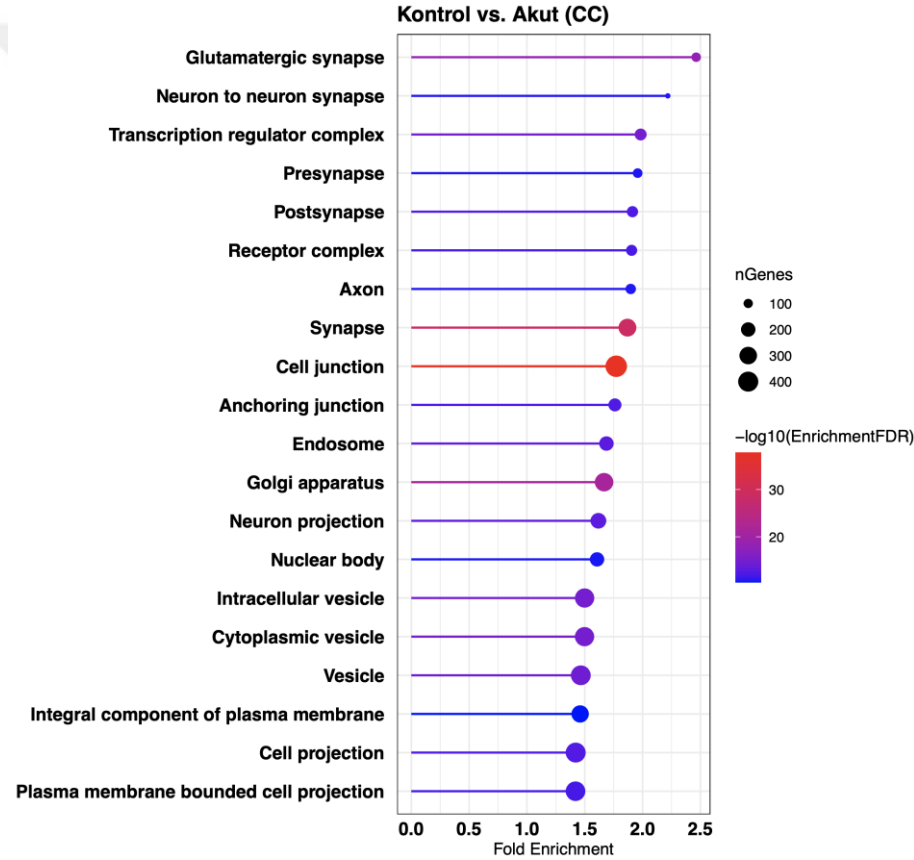


**Şekil 4.24** Non enfekte ve akut enfekte sığır grupları arasında farklı ifade edilen miRNA'ların zenginleştiği moleküler fonksiyon yolları

İlgili miRNA'ların hedef genlerinin GO fonksiyonel zenginleştirme analizi verileri hücresel bileşen bazında Tablo 4.13'te, sonuçların grafik üzerinde gösterimi de Şekil 4.25'te verilmiştir. GO analiz sonuçları farklı ifade sergileyen miRNA'ların çeşitli hücresel bileşen yollarında zenginleştiğini göstermiş olup en yüksek düzeyde zenginleşme belirlenen üç hücresel bileşen yolağı hücreler arası bağlantı (GO:0030054), Synapse (GO:0045202) ve Golgi aygıtı fonksiyonu (GO:0005794) olarak tespit edilmiştir.

**Tablo 4.13** Non-enfekte ve akut enfekte gruplar arasında farklı ifade düzeyi sergileyen miRNA'ların GO analiz sonuçlarına göre hücresel bileşen yolları

Enrichment FDR	nGenes	Pathway Genes	Fold Enrichment	Pathway	URL
1,52E-38	467	1336	1.7721549595614	Cell junction	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0030054">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0030054</a>
1,68E-29	310	841	1.86877480426826	Synapse	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0045202">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0045202</a>
5,49E-22	337	1025	1.66685302502376	Golgi apparatus	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0005794">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0005794</a>
6,41E-19	103	212	2.46316007106101	Glutamatergic synapse	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0098978">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0098978</a>
1,32E-15	142	363	1.98322958033702	Transcription regulator complex	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0005667">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0005667</a>
1,32E-15	368	1245	1.49854482866531	Intracellular vesicle	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0097708">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0097708</a>
1,33E-15	367	1242	1.49808253340862	Cytoplasmic vesicle	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0031410">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0031410</a>
5,01E-15	390	1349	1.46569609041811	Vesicle	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0031982">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0031982</a>
7,20E-14	239	749	1.61773490194718	Neuron projection	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0043005">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0043005</a>
1,10E-13	202	607	1.6871509873981	Endosome	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0005768">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0005768</a>
3,72E-13	397	1416	1.4214072474136	Cell projection	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0042995">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0042995</a>
4,82E-13	129	342	1.91229494190021	Postsynapse	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0098794">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0098794</a>
4,82E-13	166	478	1.76064364505787	Anchoring junction	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0070161">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0070161</a>
1,02E-12	127	338	1.90492680396527	Receptor complex	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0043235">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0043235</a>
1,14E-12	382	1364	1.41984280382374	Plasma membrane bounded cell projection	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0120025">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0120025</a>
1,70E-11	116	310	1.89708839547549	Axon	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0030424">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0030424</a>
1,83E-11	77	176	2.21803977272727	Neuron to neuron synapse	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0098984">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0098984</a>
2,09E-11	105	272	1.9570939171123	Presynapse	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0098793">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0098793</a>
2,44E-11	198	625	1.60611428571429	Nuclear body	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0016604">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0016604</a>
4,03E-11	292	1014	1.45994390225159	Integral component of plasma membrane	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0005887">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0005887</a>



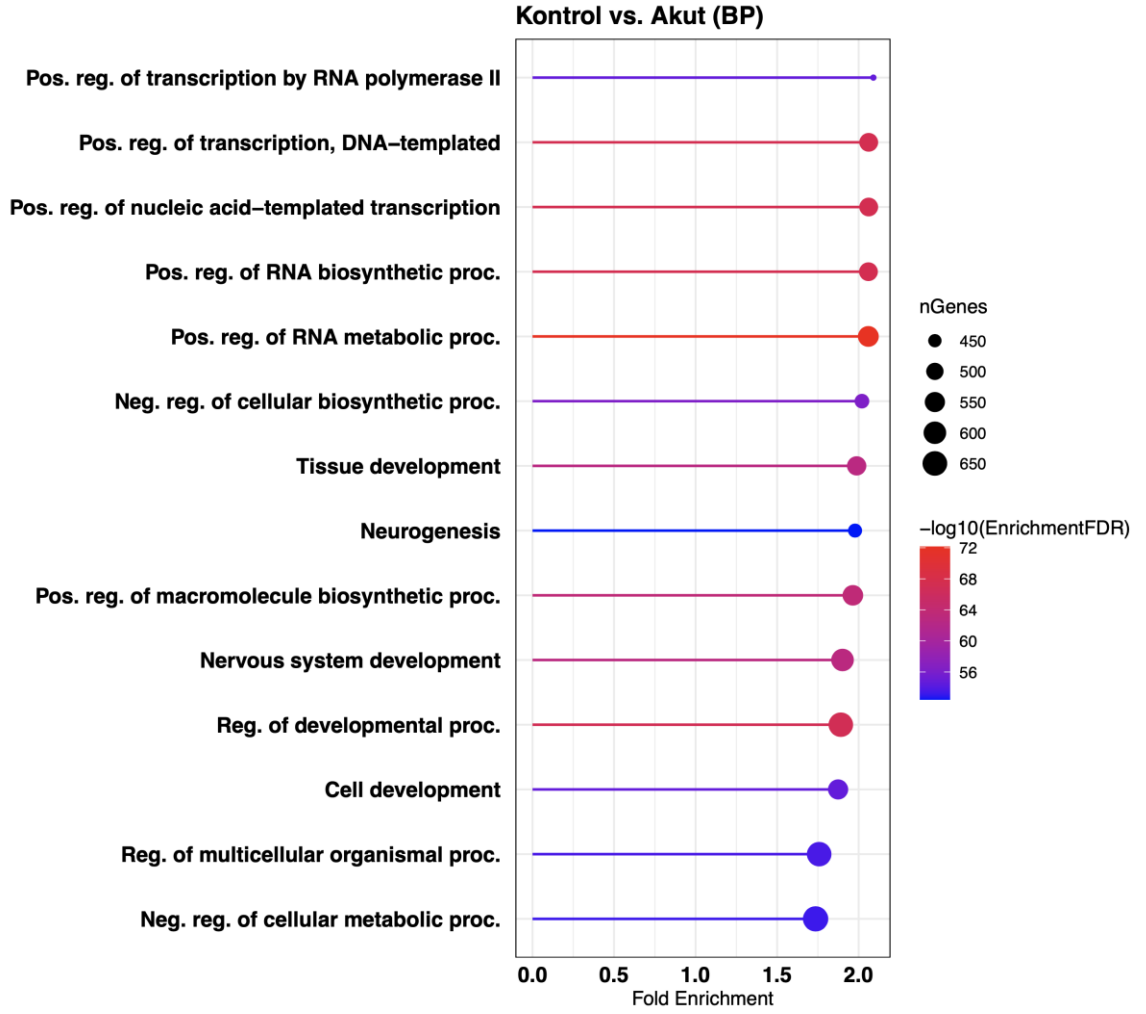
**Şekil 4.25** Non enfekte ve akut enfekte sığır grupları arasında farklı ifade edilen miRNA'ların zenginleştiği hücresel bileşen yolları

İlgili miRNA'ların hedef genlerinin GO fonksiyonel zenginleştirme analizi verileri biyolojik süreç bazında Tablo 4.14'te, sonuçların grafik üzerinde gösterimi de Şekil 4.26'de verilmiştir. GO analiz sonuçları farklı ifade sergileyen miRNA'ların çeşitli biyolojik süreç yollarında zenginleştiğini göstermiş olup en yüksek düzeyde

zenginleşme belirlenen üç biyolojik süreç yolağı RNA metabolik prosesi post regülasyonu (GO:0051254), DNA tabanlı transkripsiyonun post regülasyonu (GO:0045893) ve RNA biyosentez prosesinin post regülasyonu (GO:1902608) olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar miRNA'ların hedeflediği genlerin sitoplazmik ve nükleer metabolik süreçler ve transkripsiyon başta olma üzere önemli role sahip olduğunu göstermiştir.

**Tablo 4.14** Non-enfekte ve akut enfekte gruplar arasında farklı ifade düzeyi sergileyen miRNA'ların GO analiz sonuçlarına göre biyolojik süreç yolları

Enrichment FDR	nGenes	Pathway Genes	Fold Enrichment	Pathway	URL
7,66E-73	563	1386	2.05937974363299	Pos. reg. of RNA metabolic proc.	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0051254">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0051254</a>
4,42E-68	525	1291	2.0616945989719	Pos. reg. of transcription, DNA-templated	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0045893">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0045893</a>
4,42E-68	525	1291	2.0616945989719	Pos. reg. of nucleic acid-templated transcription	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:1903508">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:1903508</a>
4,56E-68	525	1292	2.06009886011821	Pos. reg. of RNA biosynthetic proc.	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:1902680">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:1902680</a>
1,11E-67	647	1735	1.89058441558442	Reg. of developmental proc.	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0050793">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0050793</a>
2,38E-64	558	1440	1.96454951298701	Pos. reg. of macromolecule biosynthetic proc.	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0010557">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0010557</a>
1,56E-63	600	1600	1.90117694805195	Nervous system development	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0007399">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0007399</a>
2,01E-63	534	1362	1.98772097946107	Tissue development	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0009888">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0009888</a>
5,05E-57	465	1167	2.02010232697893	Neg. reg. of cellular biosynthetic proc.	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0031327">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0031327</a>
2,07E-55	550	1488	1.87391993087558	Cell development	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0048468">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0048468</a>
2,10E-55	416	1009	2.09022691877003	Pos. reg. of transcription by RNA polymerase II	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0045944">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0045944</a>
2,44E-54	647	1866	1.75785850002088	Reg. of multicellular organismal proc.	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0051239">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0051239</a>
6,32E-54	667	1948	1.73591379103443	Neg. reg. of cellular metabolic proc.	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0031324">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0031324</a>
3,71E-53	458	1174	1.97782860240271	Neurogenesis	<a href="http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0022008">http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0022008</a>



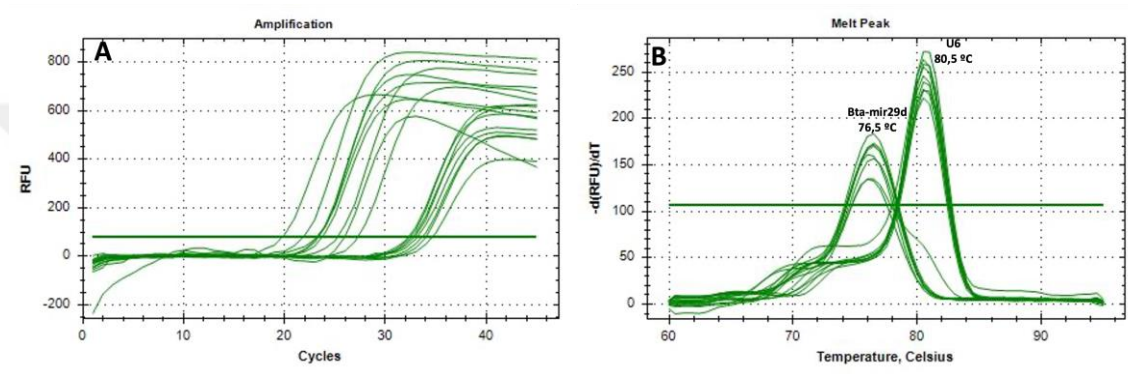
Şekil 4.26 Non enfekte ve akut enfekte sığır grupları arasında farklı ifade edilen miRNA'ların zenginleştiği biyolojik süreç yolları

#### 4.9 Gruplar Arasında Farklı İfade Gösteren, Bilinen miRNA'ların qPCR ile Validasyonu

Sığır grupları arasında NGS sonuçlarına göre non-enfekte grupta kıyaslandığında önemli düzeyde up-regüle olduğu belirlenen 4 miRNA'nın (bta-mir29d, bta-mir122, bta-mir124 ve bta-mir136) dolaşımdaki ekspresyon seviyelerini belirlemek ve validasyon için qPCR analizi gerçekleştirilmiştir. Gruplardaki okumalar referans U6 geni okumaları ile normalize edilerek ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır.

bta-mir29d'un qPCR analizleri sonucunda tüm gruplardaki replikasyonlarda amplifikasyon gösterdiği ve spesifik olarak melt pikinin 76,5 °C olduğu

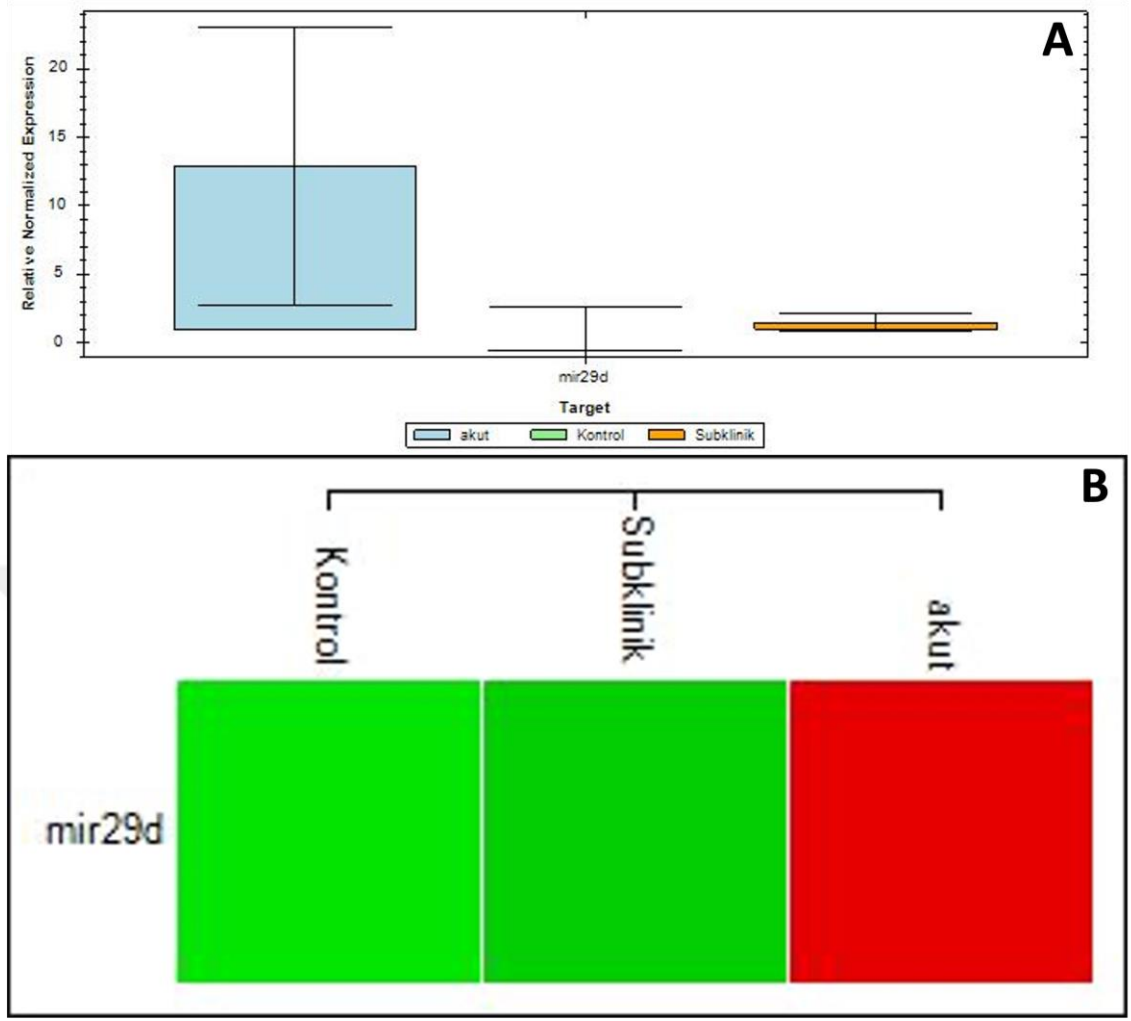
belirlenmiştir (Şekil 4.24). Sığır grupları arasında bta-mir29d'nin Cq değerleri ile birlikte normalize ifade düzeyleri ve kat değişimleri Tablo 4.16'da verilmiştir. Ayrıca sığır grupları arasında bta-mir29d'nin ifade düzeylerinin karşılaştırılması (A) ve ısı haritası (B) Şekil 4.25'de gösterilmiştir. bta-mir29d'nin non enfekte gruba oranla subklinik enfekte ve akut enfekte sığırlarda sırasıyla 146 ve 1284 kat fazla ifade olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca subklinik enfekte gruba göre akut enfekte grupta ilgili mRNA'nın 881 kat fazla ifade olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar bta-mir29d için NGS sonuçlarının validasyonunu sağlamıştır.



Şekil 4.27 bta-mir29d amplifikasyon ve melt eğrisi

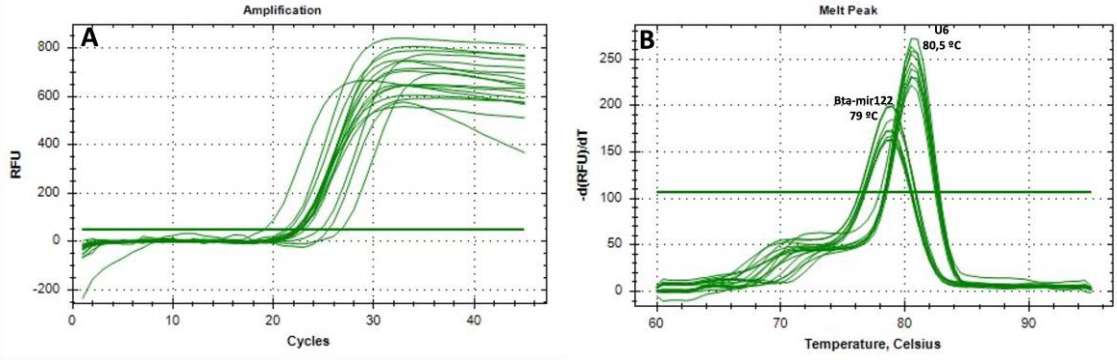
Tablo 4.15 bta-mir29d'un sığır gruplarında belirlenen ifade düzeyleri ve Cq değerleri

Hedef	Örnek	Kontrol	Ekspresyon	Ekspresyon SEM	Düzeltilmiş Ekspresyon SEM	Ortalama Cq	Cq SEM	Kat değişimi
mir29d	Akut		12,84333	10,14784	10,14784	32,58	0,16822	1284
mir29d	Non-enf	C	1,00000	1,58014	1,58014	34,13	0,50795	1.0
mir29d	Subklinik		1,45822	0,65956	0,65956	33,19	0,47118	146



**Şekil 4.28** bta-mir29d'nin sığır grupları arasındaki ekspresyon düzeyi ve ısı haritası.

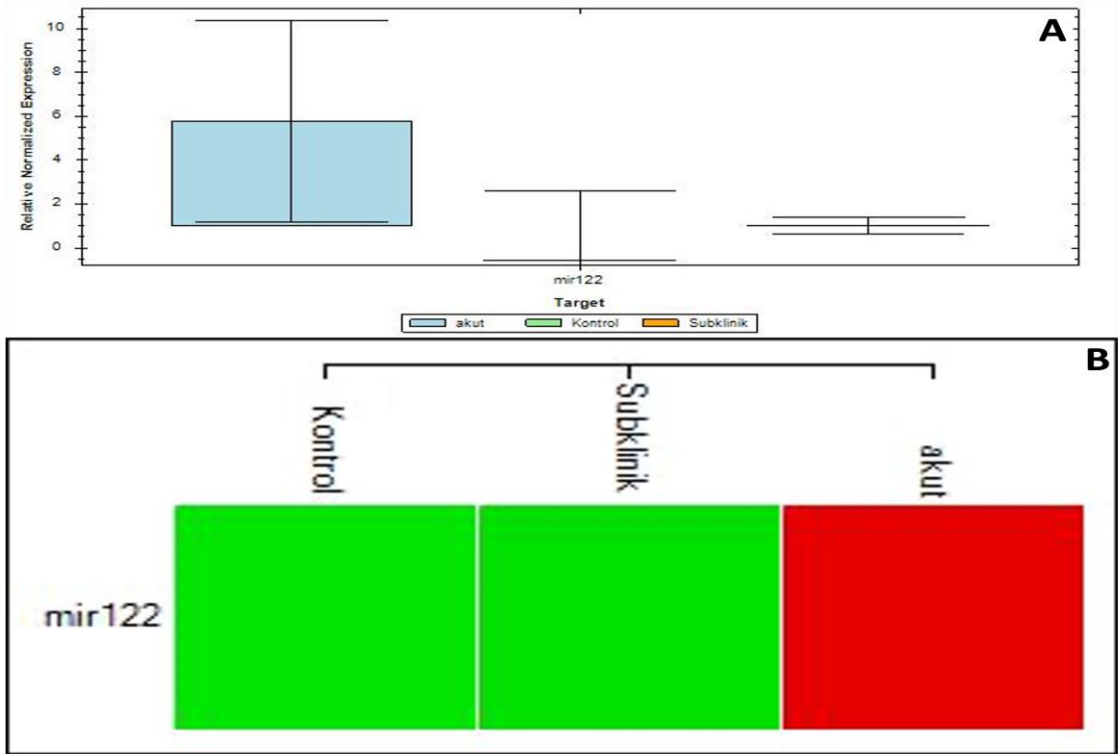
bta-mir122'nin qPCR analizleri neticesinde tüm gruplardaki replikasyonlarda amplifikasyon gösterdiği ve spesifik olarak melt pikinin 79,0 °C olduğu saptanmıştır (Şekil 4.26). Sığır grupları arasında bta-mir122'nin Cq değerleri ile birlikte normalize ifade düzeyleri ve kat değişimleri Tablo 4.17'de verilmiştir. Ayrıca sığır grupları arasında bta-mir122'nin ifade düzeylerinin karşılaştırılması (A) ve ısı haritası (B) Şekil 4.27'de gösterilmiştir. bta-mir122'nin non enfekte gruba oranla subklinik enfekte ve akut enfekte sığırlarda sırasıyla 104 ve 577 kat fazla ifade olduğu belirlenmiştir. Subklinik enfekte gruba göre akut enfekte grupta ilgili mRNA'nın 558 kat fazla ifade olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar bta-mir122 için NGS sonuçlarının validasyonunu sağlamıştır.



Şekil 4.29 bta-mir122 amplifikasyon (A) ve melt eğrisi (B)

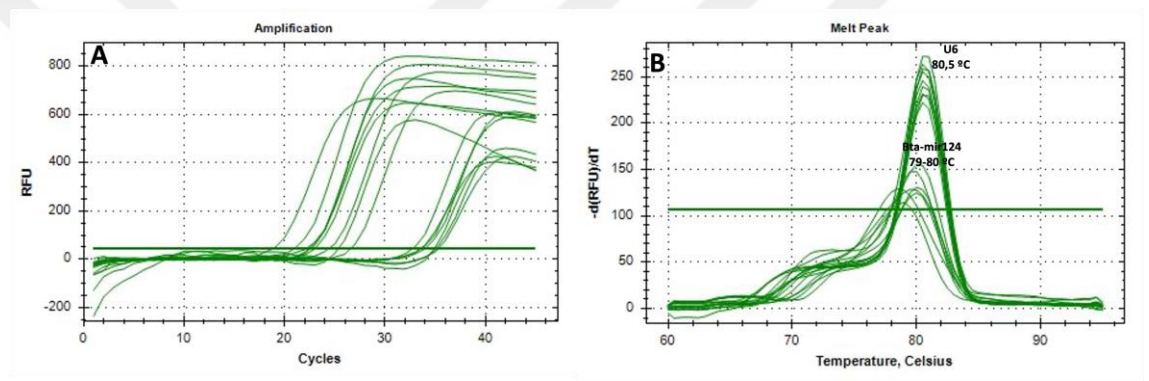
Tablo 4.16 bta-mir122'nin sığır gruplarında belirlenen ifade düzeyleri ve Cq değerleri

Hedef	Örnek	Kontrol	Ekspresyon	Ekspresyon SEM	Düzeltilmiş Ekspresyon SEM	Ortalama Cq	Cq SEM	Kat değişimi
mir122	Akut		5,77341	4,56887	4,56887	22,23	0,05803	577
mir122	Non-enf	C	1,00000	1,57591	1,57591	22,63	0,03094	1.0
mir122	Subklinik		1,03553	0,37868	0,37868	22,04	0,28448	104



Şekil 4.30 bta-mir122'in sığır grupları arasındaki ekspresyon düzeyi ve ısı haritası.

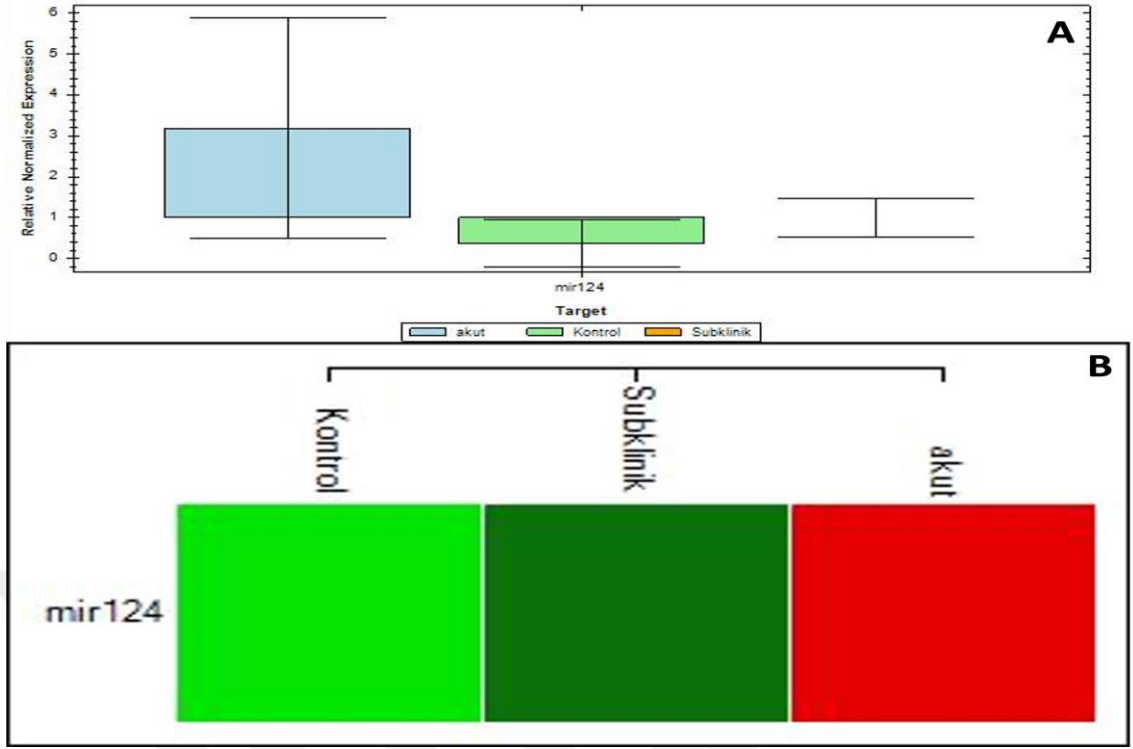
bta-mir124'nün qPCR analizleri neticesinde tüm gruplardaki replikasyonlarda amplifikasyon gösterdiği ve spesifik olarak melt pikinin 79,0-80,0 °C olduğu saptanmıştır (Şekil 4.28). Sığır grupları arasında bta-mir124'nün Cq değerleri ile birlikte normalize ifade düzeyleri ve kat değişimleri Tablo 4.18'de verilmiştir. Ayrıca sığır grupları arasında bta-mir122'nin ifade düzeylerinin karşılaştırılması (A) ve ısı haritası (B) Şekil 4.29'da gösterilmiştir. bta-mir124'nün non enfekte gruba oranla subklinik enfekte ve akut enfekte sığırlarda sırasıyla 277 ve 881 kat fazla ifade olduğu belirlenmiştir. Subklinik enfekte gruba göre akut enfekte grupta ilgili mRNA'nın 318 kat fazla ifade olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar bta-mir124 için NGS sonuçlarının validasyonunu sağlamıştır.



Şekil 4.31 bta-mir124 amplifikasyon ve melt eğrisi

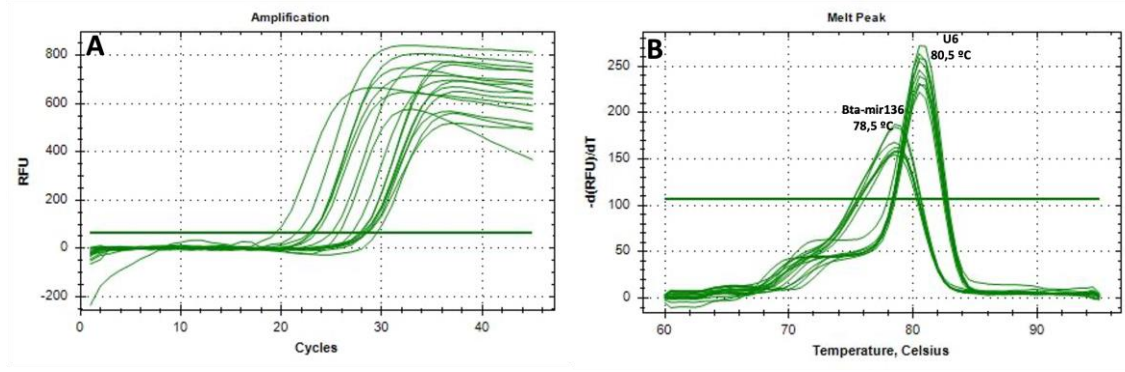
Tablo 4.17 bta-mir124'ün sığır gruplarında belirlenen ifade düzeyleri ve Cq değerleri

Hedef	Örnek	Kontrol	Ekspresyon	Ekspresyon SEM	Düzeltilmiş Ekspresyon SEM	Ortalama Cq	Cq SEM	Kat değişimi
mir124	Akut		3,18493	2,69075	2,69075	34,16	0,40495	881
mir124	Non-enf	C	0,36157	0,57613	0,57613	35,22	0,09424	1.0
mir124	Subklinik		1,00000	0,46540	0,46540	33,17	0,40890	277



**Şekil 4.32** bta-mir124'ün sığır grupları arasındaki ekspresyon düzeyi ve ısı haritası.

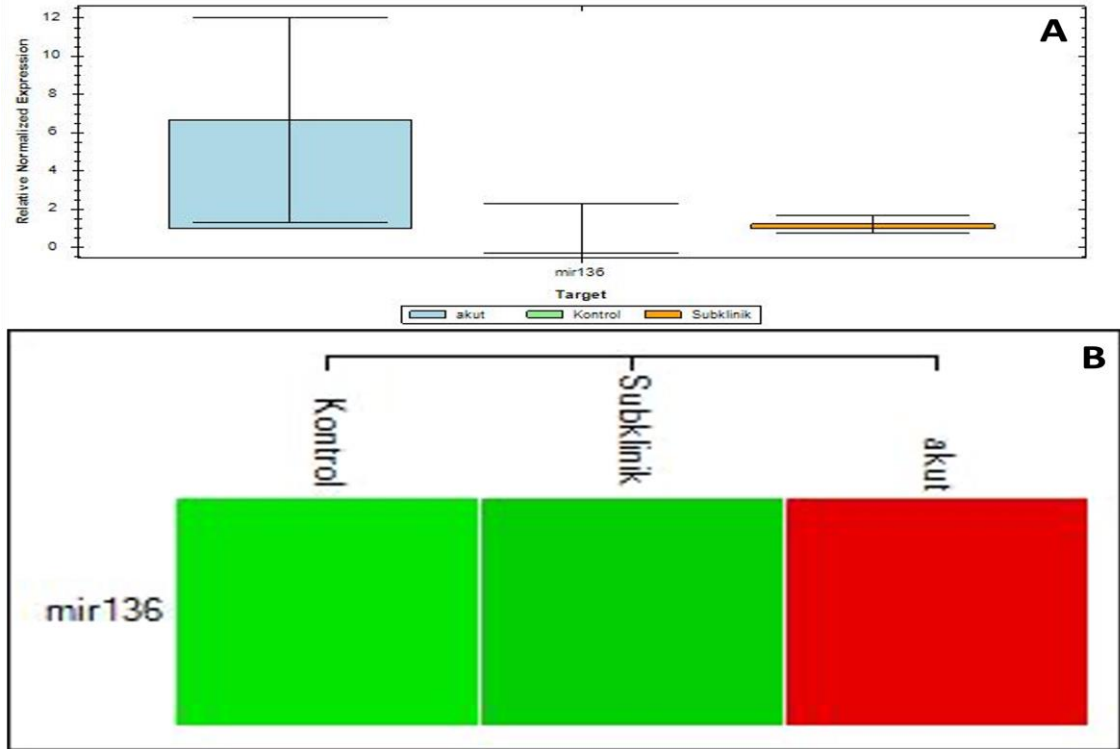
bta-mir136'nın qPCR analizleri neticesinde tüm gruplardaki replikasyonlarda amplifikasyon gösterdiği ve spesifik olarak melt pikinin 78,5 °C olduğu saptanmıştır (Şekil 4.30). Sığır grupları arasında bta-mir136'nın Cq değerleri ile birlikte normalize ifade düzeyleri ve kat değişimleri Tablo 4.19'de verilmiştir. Ayrıca sığır grupları arasında bta-mir136'nın ifade düzeylerinin karşılaştırılması (A) ve ısı haritası (B) Şekil 4.31'de gösterilmiştir. bta-mir136'nın non-enfekte gruba oranla subklinik enfekte ve akut enfekte sığırlarda sırasıyla 122 ve 665 kat fazla ifade olduğu belirlenmiştir. Subklinik enfekte gruba göre akut enfekte grupta ilgili mRNA'nın 546 kat fazla ifade olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar bta-mir136 için NGS sonuçlarının validasyonunu sağlamıştır.



Şekil 4.33 bta-mir136 amplifikasyon ve melt eğrisi

Tablo 4.18 bta-mir136'nın sığır gruplarında belirlenen ifade düzeyleri ve Cq değerleri

Hedef	Örnek	Kontrol	Ekspresyon	Ekspresyon SEM	Düzeltilmiş Ekspresyon SEM	Ortalama Cq	Cq SEM	Kat değişimi
mir136	Akut		6,64710	5,36199	5,36199	28,17	0,24741	665
mir136	Non-enf	C	1,00000	1,30239	1,30239	28,70	0,38442	1.0
mir136	Subklinik		1,21765	0,48297	0,48297	27,97	0,07242	122



Şekil 4.34 bta-mir136 ekspresyon düzeyi ve ısı haritası

## 5. TARTIŞMA

miRNA'ların önemli bazı fonksiyonlarının parazitlerin neoplast biyolojisi, gelişimi, fizyolojisi, enfeksiyonu ve bağışıklığı ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Zheng Y ve ark., 2013). *T. annulata*, konak gen ekspresyonunu bozma ve enfekte konak lökositinde kanser benzeri bir fenotipe neden olarak hücrelerde transformasyona yol açma konusundaki benzersiz yeteneğiyle ökaryotik patojenlerin en ilgi çekici olanları arasında yer almaktadır. *T. annulata* üzerine önceki çalışmaların çoğu parazit ile NFkB, AP1 ve cMyc gibi konak transkripsiyon faktörlerinin yapısal aktivasyonu arasındaki ilişkiye odaklanmıştır (Baumgartner ve ark., 2000; Dessauge ve ark., 2005). Eksozomlar başta olmak üzere ekstrasellüler veziküllerin (EV), sinyalleri donörden alıcı hücrelere ileterek çeşitli hücre tipleri arasındaki iletişime aracılık ettiği ve hücreden hücreye temas gerekliliğini ortadan kaldırdığı bilinmektedir (Tkach ve Thery, 2006). Alıcı hücrelerin daha sonra yeniden programlanması, özellikle onkogenез sürecinde olmak üzere hastalık ilerlemesine ilişkin önemli bilgiler sağlamıştır (Choi ve ark., 2007). Günümüze kadar *T. annulata* ile ilgili olarak eksozomlar ve miRNA içeriklerinin karakterizasyonu ve fonksiyonel analizleri üzerine yalnızca bir araştırma (Gillan ve ark., 2019) yapılmış olup parazitin göçü ve hücre dışı matris sindiriminde rol oynayan proteinlerin TBL20 hücrelerinden gelen eksozomlarda zenginleştiği gösterilmiştir. Ayrıca ilgili çalışmada (Gillan ve ark., 2019) çoğu tümör ve/veya enfeksiyon biyolojisinde bilinen rollere sahip konak miRNA'larında da ekspresyonel önemli farklılıklar gözlenmiştir. *T. annulata* enfeksiyonunda miRNA'ların önemleri üzerine eksozomlar hedeflenmeden bazı araştırmanın da yapıldığı görülmekte olup bir dizi miRNA'nın transforme lökositler ve myeloid hücrelerin virulansında çeşitli yolları aktive ederek rol üstlendiği ortaya çıkarılmıştır (Marsolier ve ark., 2013; Haidar ve ark., 2015b; Haidar ve ark., 2018). Günümüze kadar *T. annulata*'nın doğal konağı sığırların dolaşımındaki

enfeksiyona bağlı eksozomal miRNA'lar, ekspresyonel değişimleri ve fonksiyonel analizleri üzerine herhangi bir araştırma bulunmamaktadır. Bu araştırma açığına veri sağlamak ve tropikal theileriosis'in konak-parazit ilişkisinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlamak amacıyla yürütölen bu tez çalışmasında non-enfekte, akut enfekte ve subklinik enfekte sığır gruplarında eksozomların izolasyonu, karakterizasyonu, eksozomal miRNA'ların NGS platformunda araştırılması, farklı ifade sergilediği belirlenen miRNA'ların gen ontoloji analizleri ile sinyal yolaklarının ortaya çıkarılması ve qPCR analizleri ile validasyonlarının sağlanarak potansiyel biyobelirteç oluşturma potansiyellerinin değerlendirilmesi yapılmıştır.

Tez çalışması kapsamında öncelikle akut enfekte, subklinik enfekte ve non-enfekte sığır gruplarının oluşturulması amacıyla klinik tablo ile bir dizi analizi içeren teşhis paneli oluşturulmuştur. Akut theileriosis yüksek ateş, kenenin kan emdiği bölgedeki yüzeysel lenf nodüllerinde büyüme, parazitemi sırasında eritrosit sayısında azalma nedeniyle şiddetli anemi, mukozalarda peteşiyal kanamalar, ruminasyonun durması ve seröz burun akıntısı gibi klinik belirtileriyle teşhis edilebilen bir hastalık olup (Baldwin ve ark., 1988) çalışma kapsamına dahil edilen akut enfekte sığırlarda bu belirtilerin çoğu görölmüştür. Akut enfekte hayvanlarda *T. annulata*'nın teşhisi için kan ve lenf yumrusu aspiratlarından hazırlanan frotilerde etkenin gelişim dönemleri belirlenmiş ve parazitin sporozoit yüzey proteini genini (TASP) hedef alan qPCR ve ilgili genin sekans analizleri ile teşhisler doğrulanmıştır. TASP'ın yanısıra 18S rRNA, merozoit yüzey proteini (tams), ve Sitokrom III (COIII) gibi çeşitli genler konvansiyonel ve/veya qPCR tabanlı olarak *T. annulata*'nın özgün teşhisinde kullanılan yaygın gen bölgelerinin başında gelmektedir (Santos ve ark., 2013; García ve ark., 2014; Mans ve ark., 2015; Ros- Ziam ve ark., 2015). Çalışmamızda akut klinik tablo sergileyen sığırların hem kan hem de lenf aspiratlarında *T. annulata* gelişim dönemleri tespit edilmiş olup gerçekleştirilen TASP qPCR analizlerinde ilgili örneklerin Cq değerlerinin genel olarak 28'den düşük olduğu ve örneklerde parazit DNA kopya sayısının yüksek olduğu görölmüştür. Diğer yandan subklinik enfekte ve non-enfekte sığırların belirlenmesinde öncelikle TASP qPCR analizleri gerçekleştirilmiş sonrasında pozitif belirlenen örneklerin perifer kan frotileri incelenmiştir. Subklinik enfekte sığırlarda TASP qPCR Cq değerleri genel olarak 32-

35 arasında saptanmış ve parazit DNA'sının akut enfekte gruba oranla daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Nitekim ilgili sığırların kan frotilerinde de etkenin piroplazmik formlarının düşük düzeyde olduğu görülmüştür.

Çalışmada eksozomal miRNA'ların araştırılması için yukarıda bahsedilen teşhis paneli ile her grupta 15 sığır olacak şekilde çalışma grupları oluşturulmuştur. Akut ve subklinik enfekte gruplara dahil edilecek sığırların belirlenmesi ve her grup için üç tekrarı oluşturacak (her grup için 5 sığır serumu birleştirilerek) hayvan serumlarının birleştirilmesi noktasında kategorizasyon için enfekte sığırlarda moleküler yaklaşımla gen kopya sayıları (GCN) ve buna bağlı formülizasyon ile parazit yükleri (parazitemi) hesaplanmıştır. *Theileria annulata* ile enfekte sığırlarda GCN ve parazit yüklerinin belirlenmesi üzerine qPCR yaklaşımı kullanılarak yapılan araştırmalarda 18SrRNA (Ros Garcia ve ark., 2012) ve TASP (Dandasena ve ark., 2019) genlerinin hedeflendiği ve ilgili gen fragmentlerinin plazmid vektörlere klonlandıktan sonra elde edilen rekombinant plasmidlerin seri sulandırmalarla standartlarının oluşturularak analizlerde kullanıldığı görülmektedir. Çalışmamızda parazit yüklerinin hesaplanmasında TASP geni tercih edilmiş olup, ilgili genin 18S rRNA gen bölgesine göre daha spesifik olduğu, gen kopya sayısının daha yüksek olduğu ve bu nedenle de 18S rRNA, TAMS geni gibi diğer belirleyicilere göre tanı amaçlı moleküler yaklaşımlarda daha çok tercih edildiği görülmektedir (Sibeko ve ark., 2008; Kundave ve ark., 2014; Ghoneim ve El-Fayomy, 2014; Dandasena ve ark., 2019). Ayrıca *T. annulata*'nın tespiti ve parazit yükünün tayini için 18S rRNA bazlı qPCR kullanımının, tek genomdaki çoklu kopyaları ve çeşitli *Theileria* ve *Babesia* parazitleri arasındaki sekans benzerliği nedeniyle, klinik örneklerin test edilmesinde çeşitli dezavantajlarının ve sınırlamalarının bulunduğu kaydedilmiştir (Sibeko ve ark., 2008; Gotia ve ark., 2016; Dandasena ve ark., 2019). TASP qPCR analizleri sonucu çalışmamızda akut enfekte belirlenen ve çalışma gruplarına dahil edilen sığırlarda parazit yükünün  $6,90E+04$  ile  $3,99E+09$  arasında olduğu, subklinik enfekte hayvanlarda ise parazit yüklerinin  $2,66E+04$  ile  $7,84E+06$  arasında değiştiği tespit edilmiş olup ilgili sonuçlar çeşitli araştırmacıların bulguları ile paralellik göstermiştir (Ros Garcia ve ark., 2012; Dandasena ve ark., 2019).

Tez çalışmasında yukarıdaki yaklaşımlarla gruplara dahil edilen sığırlar belirlendikten sonra her üç grup için beşer hayvanın serumlarının birleştirilmesi ile oluşturulan serum örneklerinden (grup başına 3 replikasyon) ticari kit kullanılarak eksozom izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Çeşitli biyolojik örneklerden eksozomların karakterizasyonunda TEM, STEM ve SEM gibi görüntüleme teknikleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Marcilla ve ark., 2012; Shears ve ark., 2018). Çalışmamızda non-enfekte, akut enfekte ve subklinik enfekte sığır serum replikasyonlarından izole edilen eksozomların görüntülemelerinde SEM tercih edilmiş ve eksozomlara özgü yuvarlak-şekilli (round-shape) ve 70-150 nm boyutunda tipik veziküllerin belirlenmesiyle izole edilen veziküllerin eksozom oldukları teyit edilmiştir. Çalışmamızda eksozomların partikül boyutu ve konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla NTA kullanılmış olup, ilgili teknik tek tek parçacıkların ortalama kare yer değiştirmesini belirlemek için her bir parçacığın Brown hareketini ayrı ayrı izleyen ışık saçılmasına dayalı bir yöntemdir (Vestad ve ark., 2017). Karmaşık örneklerin partikül boyutunu ve konsantrasyonunu ölçmek için her bir deneysel yaklaşımın uygunluğunu göstermek amacıyla, ölçümlerden önce kalite kontrol olarak biyolojik örneklerin karmaşıklığını taklit eden referans malzemelerin test edilmesi kritik öneme sahiptir (Caputo ve ark., 2019). Bu kapsamda çalışmamızda ölçümler esnasında kullanılan tüm malzemeler ve solüsyonların steril olmasına azami seviyede dikkat edilmiştir. Gerçekleştirilen analizler NTA tabanlı çalışmalara (Filipe ve ark., 2010; Jin ve ark., 2019; Bachurski ve ark., 2019) uygun olarak elde edilen veziküllerin, ana parçacık boyutundaki en büyük pikin yaklaşık 79 nm olduğunu ve genel boyut dağılımının da 70 ila 200 nm arasında olduğunu göstermiş olup sonuçlar eksozomların karakterizasyonunu sağlamıştır. Eksozomların içerdikleri bazı spesifik proteinlerin gösterilmesi biyolojik örneklerde ilgili ekstrasellüler veziküllerin karakterizasyonu amacıyla yaygın kullanılan güvenilir bir yöntemdir (Kowaj ve ark., 2016). Bu proteinlerden tetraspaninler dört transmembran alanı içeren bir grup olup belirli karakteristik özelliklere sahiptir. Tetraspaninler'den CD9, CD63 ve CD81 bu veziküllere özgü transmembran proteinleri olup Western Blot ve Flow Sitometrisi gibi tekniklerle yaygın olarak eksozomların karakterizasyonunda kullanılmaktadır (Li ve ark., 2018; Jeppesen ve ark., 2019). Çalışmamızda da ilgili üç protein markörü için SDS-PAGE ve Western Blot analizleri gerçekleştirilmiş ve izole edilen

eksozomal proteinlerde CD9, CD63 ve CD81'in tüm örneklerde ifade olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlarda eksozomların karakterizasyonu sağlanmıştır.

Çeşitli biyolojik örnekler ile eksozomlar gibi ekstrasellüler veziküllerde miRNA tabanlı karakterizasyon çalışmalarında doğruluk oranı yüksek ve uygun maliyetli miRNA profillemeye teknikleri gereklidir. Yeni nesil dizileme (NGS), önsel bir gen açıklamasına dayanmaz ve bu nedenle yeni miRNA türlerinin keşfedilmesine olanak tanır (Friedländer ve ark., 2008). En önemlisi, NGS, örnek zenginleştirme için yüksek kapasiteye sahip olmasıyla yüksek hassasiyete sahiptir. Buna ek olarak, NGS tarafından sağlanan tek nükleotid çözünürlüğü, izomiR'lerin (miRBase'de açıklanan türlerden sekans veya uzunluk bakımından farklılık gösteren miRNA varyantları) tanımlanmasını sağlar (Neilsen ve ark., 2012). Bunun yanında small RNA dizileme kütüphanesi hazırlama ile ilgili, yanlı adaptör ligasyonu, adaptör dimerlerinin oluşumu, küçük RNA türlerinin boyut seçiminin yapılması gerekliliği ve özellikle biyolojik sıvılar analiz ediliyorsa çok düşük girdi protokollerine uyum sağlama zorunluluğu gibi önemli zorluklarda gözlenebilir. miRNA sekanslama için kütüphaneler hazırlamak üzere giderek daha fazla sayıda aracın kullanıma sunulmasıyla birlikte, bu farklı metodolojilerin etkinlik ve hassasiyetleri üzerine çeşitli araştırmalar yapılmıştır (Linsen ve ark., 2009; Baker, 2010; Hafner ve ark., 2011; Alon ve ark., 2011). Tüm bu araçların temel işleyişi small RNA dizileme (sRNA-seq) kütüphaneleri oluşturmak için, adaptörler miRNA'nın her iki ucuna bağlanması, ardından ters transkripsiyon, PCR ile şablon amplifikasyonu ve küçük RNA türlerinin boyut seçimine dayanmaktadır (Coenen-Stass ve ark. 2018). Çalışmamızda kütüphane hazırlanmasında Illumina platformu için geliştirilen NEBNext, Multiplex Small RNA Library Prep Set kullanılmış ve sekanslama kütüphaneleri Illumina NextSeq 550 platformunda sekanslanmıştır. NGS analizleri sonucu her bir örnek başına ortalama 15,84 milyon okuma ve örnek başına ortalama 783 milyon bazdan oluşuna ham veri elde edilirken bu ham verilerin minimum kalite skoru 20 (PHRED>20) olacak şekilde filtrelenmesi sonrası örnek başına ortalama 10,9 milyon okuma sayısı ve 336,7 milyon baz sayısı elde edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar aynı platformda gerçekleştirilen bazı çalışmaların (Podnar ve ark., 2014; Lu

ve ark., 2021; Decsi ve ark., 2022) eksozomal miRNA sekanslama sonuçları ile yakın değerler sergilediği görülmüştür.

Çalışmada incelenen örneklere ait ilgili prekürsör ve olgun small RNA okumalarının sığır miRNA veri tabanı (mirBase) ve *T. annulata* için yayınlanmış small RNA verileri kullanılarak gerçekleştirilen analizlerinde her bir gruptaki örnek başına 201 ila 340 arasında değişen bilinen miRNA'lar karakterize edilmiştir. Potansiyel yeni miRNA tahmini için, *Bos taurus* (GCA\_002263795.2) ve *T. annulata* (GCA\_000003225.1) genomları üzerinden ilgili biyoinformatik araçlarla analiz edilen okumalarda her bir gruptaki örnek başına 25-51 potansiyel yeni miRNA sekanslarının varlığı tespit edilmiştir. Bilinen ve potansiyel yeni miRNA'ların uzunluk analizleri sonucu 18 ila 25 nt arasında dağılım gösterdikleri tespit edilmiştir. Toplam bilinen miRNA uzunluğu dağılımında, en yoğun boyut sınıfının 18 nt olduğu, bunu sırasıyla 19 nt, 20 nt ve 22 nt takip ettiği, potansiyel yeni miRNA'lar için ise sıralamanın sırasıyla 22 nt, 21 nt, 23 nt ve 20 nt şeklinde olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar çalışma gruplarındaki sığırlarda karakterize edilen miRNA'ların literatürde tanımlanan sınırlar içerisinde olduğu ve uzunluk dağılımlarının da çeşitli çalışmalarda (Ioannidis ve ark., 2018; Romao ve ark., 2011; Huang ve ark., 2021;) elde edilen verilerle uyumlu olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda sığır grupları arasında ekspresyonel farklılıklar açısından değerlendirmeler için bilinen miRNA'lar üzerinde analizler gerçekleştirilmiştir. Potansiyel yeni miRNA'lar üzerine karakterizasyon, tanımlama ve validasyon temelinde ileri araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Bu açıdan elde edilen verilerin sonraki proje çalışmalarında kullanılması planlanmıştır. Yapılan ikili ve üçlü kıyaslamalar sonucunda Bilinen miRNA'ların akut, subklinik ve non-enfekte gruplar arasında deney grubu bazında kıyaslanması sonucunda non enfekte ve akut enfekte gruplar arasında 216, non enfekte ve subklinik enfekte gruplar arasında 193, subklinik ve akut enfekte gruplar arasında 204 ve her üç grupta 183 miRNA'nın ortak bulunduğu belirlenmiştir. Gruplar arasında anlamlı ifade değişimi sergileyen miRNA'ların tespitine yönelik biyoinformatik analizlerde düzeltilmiş p değeri %5'in altında olan ve kat değişimi iki katın üzerinde olan toplam 15 miRNA karakterize edilmiştir. İlgili miRNA'ların tüm deney gruplarındaki sığırlarda ifade olduğu

görülmüştür. Gruplar arası kıyaslama analizlerinde non-enfekte gruba kıyasla subklinik ve akut enfekte gruplarda düzeltilmiş P değeri <0,001 olan ve kat değişimi 4-10 arasında olmak üzere dört miRNA'nın (bta-miR-29d, bta-miR-122, bta-miR-124a ve bta-miR-136) subklinik ve akut enfekte gruplarda artan ifade sergilemesi önemli değerlendirilmiştir. *T. annulata* üzerine in-vitro olarak yürütülen sınırlı sayıda miRNA karakterizasyon çalışmaları sonuçları incelendiğinde (Haidar ve ark 2018; Gillan ve ark., 2019; Tajeri ve ark., 2021; Haidar ve ark., 2023) çalışmamızda önemli değerlendirilen miRNA'lar için herhangi bir çıkarım yapılmadığı görülmüştür. Diğer yandan *T. annulata* ile in-vitro deneysel yaklaşımların kullanıldığı yukarıdaki araştırmalarda bazı miRNA'ların önemi vurgulanmıştır. Bu araştırmalardan ilkinde Marsolier ve ark. (2013) miR-155'in transformasyona uğramış lökositlerin virülansındaki rolünün göstermişler ve ilgili miRNA'nın c-Jun aktivasyonu ve AP-1 güdümlü transkripsiyon yoluyla indüklendiğini gösterilmişlerdir. Araştırmacılar (Marsolier ve ark., 2013) miR-155 aracılı De-Etiolated Homolog 1 ekspresyonunun baskılanmasının c-Jun ubiquitinasyonunu azalttığını göstermiş ve c-Jun'un stabilitesinin, miR-155 içeren BIC geninin transkripsiyonunu yönlendirerek, pozitif bir geri besleme döngüsü oluşturarak *Theileria* ile transforme olmuş lökositlerin büyümesine ve hayatta kalmasına katkıda bulunduğunu açıklamışlardır. Diğer bir çalışmada (Haidar ve ark., 2018) miR-126-5p'nin enfekte miyeloid hücrelerinde JIP-2'yi (JNK-Interacting Protein-2) baskıladığı ve böylece JNK1'i çekirdeğe girmesinde ve c-Jun'u fosforile etmesinde önemli rolü olduğu gösterilmiş ve böylece tümör yayılımını teşvik etmek için Matris Metallo-Proteinaz 9'u kodlayan genin (mmp9) AP-1 güdümlü transkripsiyonunun aktive olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, miR-125b'nin *T. annulata* ile enfekte edilmiş ve transforme olmuş miyeloid hücrelerin virülansındaki rolü araştırılmış (Metheni ve ark., 2015) ve gen ontolojisi fonksiyonel zenginleştirme analizleri ile miR-125b tarafından ifadesi değiştirilen genlerin metabolik süreç, hücre döngüsü ve DNA replikasyonunda önemli ölçüde zenginleştirildiği göstermiştir. Son olarak Gillan ve ark. (2019), *T. annulata* enfeksiyonunun patobiolojisinde ekstraselüler veziküller (EV) ve kargolarının karakterizasyonu için yürüttükleri çalışmada non-enfekte sığır lenfosarkom (BL20) ve *T. annulata* (TBL20) ile enfekte BL20 hücre hatlarından EV'ler saflaştırılmış ve karşılaştırmalı kütle spektrometrisi ve NGS bazlı miRNA profili ile karakterize

edilmiştir. İlgili çalışmada çoğu tümör ve/veya enfeksiyon biyolojisinde bilinen rollere sahip konak miRNA repertuarında ifade değişiklikleri belirlenmiş ve bu miRNA'lar arasında tümör baskılayıcı fonksiyonları bilinen miRNA'lardan, bta-miR-181a ve bta-miR-181b'nin önemi vurgulanarak bta-miR181a'nın hücre içi adezyon molekülü ICAM-1 ile etkileşimi gösterilmiştir (Gillan ve ark., 2019). Yukarıdaki çalışmalarda in-vitro çalışmalarla bazı fonksiyonel rolleri ve önemleri vurgulanan miR-155, miR-126-5p, miR-125-5b, bta-miR-181a ve bta-miR-181b çalışmamızda tüm gruplara ait serum eksozomal miRNA içerisinde de belirlenmiştir. Ancak gruplar arasındaki ekspresyonel farklılık analizlerinde bu beş miRNA'nın non-enfekte ve enfekte gruplar arasında ifade düzeyleri açısından istatistiksel olarak belirlenen cut-off değeri temelinde önemli bir farklılık tespit edilememiştir. Diğer yandan sonuçlarımız non-enfekte ve *T. annulata* ile doğal enfekte sığırlar arasında enfeksiyonun patobiyolojisinde önem arz edebilecek ve ayrıca potansiyel biyobelirteç adayı olabilecek bta-miR-29d, bta-miR-122, bta-miR-124a ve bta-miR-136 olmak üzere bilinen miRNA'ları ilk kez ortaya koymuştur. Nitekim qPCR validasyon analizleri sonucunda elde edilen veriler her dört miRNA için NGS sonuçlarını valide etmiş ve bu miRNA'ların sığırların dolaşımında olduğunu teyit etmiştir.

Çalışmamızda önemli ifade düzeyi sergilediği belirlenen ve qPCR ile validasyonu ile sığırların dolaşımındaki düzeylerinin önemli olduğu belirlenen bta-miR-29d, bta-miR-122, bta-miR-124a ve bta-miR-136 ile birlikte NGS sonuçlarına göre toplam 15 farklı ifade sergileyen miRNA data setinin gen ontoloji ve KEGG analizleri ile zenginleştirdikleri genlerin yolakları üzerine veriler sağlanmıştır. qPCR sonuçları gruplar arasında en yüksek değişim gösteren miRNA'nın bta-miR-29d olduğunu, ilgili miRNA'nın akut enfekte grupta non-enfekte ve sub-klinik enfekte gruplara kıyasla 1284 ve 881 kat fazla ifade gösterdiğini, ayrıca non-enfekte gruba göre subklinik enfekte grupta bta-miR-29d'nin 146 kat fazla ifade olduğunu göstermiştir. İlgili miRNA'nın genom veri bankasında zenginleştirdiği genlerin KEGG yolakları incelendiğinde sığırlarda toplam 352 yolakta fonksiyon aldığı görülmüştür ([https://www.genome.jp/dbget-bin/get\\_linkdb?-t+pathway+gn:T01008](https://www.genome.jp/dbget-bin/get_linkdb?-t+pathway+gn:T01008)). Bu yolaklar arasında özellikle Transforming growth factor- $\beta$  (TGF-beta) ve Tumor necrosis

factor (TNF) sinyal yollarının varlığı tespit edilmiş ve *T. annulata* enfeksiyonları yönünden önemli değerlendirilmiştir. Nitekim TGF- $\beta$  hücre büyümesini, farklılaşmasını ve hareketliliğini düzenlediği bilinen önemli bir sitokin ailesi olarak bilinmektedir (Massagué, 1998). Normal hücrelerde ve kanserin erken evrelerinde TGF- $\beta$  hücre büyümesini inhibe ederken, kanserin geç evrelerinde metastaz ve invazyonu destekleyen zıt bir rol üstlenir. Bu çelişkinin altında yatan mekanizmanın hala iyi tanımlanamadığı kaydedilmektedir (Tajeri ve ark., 2021). TGF- $\beta$ 'nin TGF- $\beta$ 1, 2 ve 3 olmak üzere üç izoformu vardır. Kanserde, TGF- $\beta$ 2 oldukça agresif ve malign tümörlerde güçlü bir şekilde ifade edilir (Gold ve ark., 2000; Gomes ve ark., 2012). TGF- $\beta$ 2 üretiminin hastalığa duyarlı *Theileria* ile enfekte ve transforme Holstein-Friesian (HF) miyeloid hücrelerinde hastalığa dirençli enfekte Sahiwal transforme miyeloid hücrelerine kıyasla daha yüksek olduğu gösterilmiş bunun da transforme duyarlı miyeloid hücrelerdeki daha yüksek seviyedeki Matrigel geçiş kapasitesi (yayılma kapasitesinin bir göstergesi) ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Chaussepied ve ark., 2010).

Diğer yandan bta-miR-29d'nin fonksiyonel görev aldığı yollardan TNF- $\alpha$ , *Theileria* enfeksiyonunun genel bir klinik belirtisi olan yüksek ateşi tetikleyen önemli bir sitokindir (Glass ve Jensen, 2007). TGF- $\beta$ 2'ye benzer şekilde, TNF- $\alpha$  da theileriosis'te iyi karakterize edilmiş bir sitokindir. *Theileria parva* ile transforme olmuş B hücrelerinde, TNF- $\alpha$ 'nın ekspresyonu olduğu ve salgılandıktan sonra enfekte lenfositler üzerindeki reseptörlerine bağlandığı bilinmektedir (yani, otokrin sinyal modu). TNF- $\alpha$ 'nın reseptörlerine (TNFR1 veya TNFR2) bağlanmasının ardından TRAF'in işe alınması ve NF- $\kappa$ B ve AP-1 güdümlü transkripsiyonun aktivasyonu söz konusudur (Guergnon ve ark., 2003). NF- $\kappa$ B, *Theileria*'ya bağımlı bir şekilde kanonik olmayan bir şekilde aktive edilir (Heussler ve ark. 2002) ve TNF- $\alpha$  ifadesinin düzenlenmesinden sorumlu olduğu belirtilmektedir. Nitekim NF- $\kappa$ B'nin farmakolojik olarak bloke edilmesinin, *T. annulata* ile enfekte olmuş ve transforme miyeloid hücrelerde TNF- $\alpha$  seviyelerinde bir düşüşe yol açtığı ispatlanmıştır (Ma ve Baumgartner, 2014). Enfekte lökositlerin bir TNF- $\alpha$  sentezi inhibitörü ile muamele edilmesi veya dominant-negatif TNF reseptör-ilişkili faktör 2 (TRAF2) transfeksiyonu yoluyla TNF- $\alpha$ /TNFR/TRAF sinyalinin inhibisyonu, NF- $\kappa$ B'nin

transkripsiyonel aktivitesini önemli ölçüde azaltmıştır (Guergnon ve ark., 2003). *T. annulata* ile enfekte ve transforme miyeloid hücrelerde TNF- $\alpha$  indüksiyonunun, konak hücre serin/treonin kinaz MAP4K4 ekspresyonunu indükleyerek hücre dışı matrisin istilasına katkıda bulunduğu bilinmektedir. Çalışmada ifade düzeyi önemli bulunan ve validasyonu sağlanan ilgili dört miRNA'nın aynı zamanda serin/treonin kinaz ve MAPK sinyal yollarındaki genleri zenginleştirdiği dikkati çekmiştir. MAP4K4 yolağı, Ezrin, Radixin, Moesin ailesi (ERM) proteinlerinin hareketli makrofajların lamellipodisinin ön kenarında birikimini artırdığı ve bunların fosforilasyonundan da kısmen sorumlu olduğu kaydedilmektedir (Tajeri ve ark., 2021). Aktive edilmiş ERM proteinlerin konak hücre aktin dinamiklerini kontrol ettiği ve *Theileria* ile enfekte olmuş ve transforme miyeloid hücrelerin hücre mobilizasyonunu ve Matrigel geçişini artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, MAP4K4'nın JNK fosforilasyonuna katkıda bulunduğu ve JNK aktivasyonunun TNF- $\alpha$  aracılı MAP4K4 ekspresyonu için gerekli olduğu bulunmuştur (Ma ve Baumgartner, 2014). İlginç bir şekilde, deneysel olarak enfekte edilmiş sığırlar üzerinde yapılan eski bir çalışmada (Forsyth ve ark., 1999), histopatoloji gösteren organlarda TNF- $\alpha$ -pozitif hücreler bulunmuş ve bu bulgu TNF- $\alpha$ 'nın *Theileria* ile transforme olmuş miyeloid hücrelerin yayılmasındaki rolü için in-vivo kanıt sağlanmıştır. Tüm bu verilerle TNF- $\alpha$ 'nın, *Theileria* kaynaklı lökosit transformasyonunun iki önemli unsuru olan proliferasyon ve hücre hareketliliğinde önemli rol üstlendiği kanıtlanmıştır.

Çalışmamızda qPCR validasyonu yapılarak *T. annulata* ile enfekte sığır grupları arasında artan ifade düzeyi önemli bulunan diğer üç miRNA'dan bta-miR-122'nin KEGG ve GO yolak analizleri sonucu şimdiye kadar yalnızca kanserde miRNA yolağı ile ilişkilendirildiği görülmüştür. Diğer iki miRNA bta-miR 124a ve bta-miR-136'nın gen data bankasında olmasına karşın henüz yolak tanımlarının bulunmadığı görülmüştür. Bu sonuçlarla *T. annulata* patobiyolojisi ile ilgili olduğu görülen tüm bu miRNA'lar ve fonksiyonları üzerine ileri araştırmalara ihtiyaç olduğu düşünülmüştür. Diğer yandan *T. annulata* enfeksiyonu için bu çalışma ile önemli roller üstlendiği belirlenen ve enfekte gruplarda ifade düzeyi diğer miRNA'lara oranla daha yüksek tespit edilen bta-miR-29d-3p başta olmak üzere ilgili miRNA'ların *T. annulata* enfeksiyonlarının spesifik teşhisinde ve tedavi sonrası

takibinde etkin ve aday potansiyel biyobelirteçler olabileceği kanaatine varılmıştır. Ancak bu çıkarım biyobelirteç oluşturma ve validasyon noktasında ileri çalışmalarla desteklenmelidir.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması ile *T. annulata* ile doğal enfekte sığırların dolaşımındaki eksozomlar ve miRNA içerikleri ile ilgili ilk özgün sonuçlar sağlanmıştır. Araştırma gruplarının oluşturulması için enfekte ve non-enfekte sığırların tespit edilmesinde hastalığa özgü klinik belirtiler ve konvansiyonel mikroskopik teşhisin yanı sıra moleküler tanı yöntemlerini de içeren teşhis paneli kullanılmış ve bu yaklaşımla güvenilir deney tasarımı oluşturulmuştur. Akut ve subklinik enfekte gruplara dahil edilen sığırlardaki parazit yükleri, TASP geninin klonlanması ve rekombinant plazmit DNA eldesi sonrası oluşturulan standartlarla qPCR analizi sonrası belirlenen gen kopya sayısı temelinde ortaya çıkarılmış ve enfeksiyon gruplarının replikasyonlarının oluşturulmasında kriter olarak kullanılmıştır. Ayrıca TASP qPCR'ın pozitif örneklerin sekans konfirmasyonları da dikkate alındığında güvenilir ve hassas bir yöntem olarak *T. annulata* ile enfekte hayvanların moleküler teşhisinde kullanışlı bir tanı yaklaşımı olduğu düşünülmüştür.

Çalışmamızda tüm gruplardaki sığırların serumlarından oluşturulan replikasyonlarda eksozomların izolasyonu başarı ile gerçekleştirilmiş ve karakterizasyonu için referans yöntemler olan SEM, NTA ve Western Blot analizleriyle tüm gruplar için eksozomların konfirmasyonu yapılmıştır. Ekzozomal small RNA izolasyonları sonrasında her gruptaki örnekler için oluşturulan kütüphaneler NGS platformunda başarı ile işlenmiş ve örnek başına kalite skoru yüksek olan ortalama 10,9 milyon okuma sayısı ve 336,7 milyon baz veri elde edilmiştir. Verilerin biyoinformatik analizleri sonucu tüm çalışma gruplarında toplam 288 bilinen miRNA ve 164 potansiyel yeni miRNA karakterize edilmiş olup uzunluklarının miRNA'ların bilinen aralığında (18-25 nt) dağıldığı belirlenmiştir.

miRNA'ların NGS okumalarına göre ifade düzeylerinin kıyaslanması sonucunda araştırma gruplarındaki sığırlarda farklı ifade düzeyi sergileyen toplam 15 miRNA belirlenmiş olup bunlardan bta-miR-29d başta olmak üzere bta-miR-122, bta-miR-124a ve bta-miR-136'nın enfekte gruplarda non-enfekte gruba oranla önemli düzeyde artan ifade sergilediği tespit edilmiştir. Sığırların dolaşımındaki ilgili miRNA'ların ekspresyonel farklılıkları ayrıca qPCR analizleriyle teyit edilmiş ve bta-miR-29d'nin NGS verilerine paralel olarak en yüksek farklılığı sergileyen miRNA olduğu belirlenmiştir.

Tez çalışmaları ile bta-miR-29d, bta-miR-122, bta-miR-124a ve bta-miR-136 ile birlikte NGS sonuçlarına göre toplam 15 farklı ifade sergileyen miRNA veri setinin gen ontoloji ve KEGG analizleri ile zenginleştirdikleri genlerin yolları üzerine özgün veriler sağlanmıştır. Özellikle bta-miR-29d'nin *T. annulata*'nın hücreleri enfekte etmesi ve transformasyonunda önemli olduğu bilinen TGF-beta ve TNF sinyal yolları başta olmak üzere serin/treonin kinaz ve MAPK yollarındaki genlerin regülasyonunda görev aldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar da *T. annulata* ile doğal enfeksiyonların patobiyolojisindeki moleküler mekanizmalar için özgün veriler oluşturmuştur.

Tez çalışmasının çıktıları ayrıca özellikle bta-miR-29d olmak üzere *T. annulata* ile enfekte sığırlarda ifade düzeyi önemli olan miRNA'ların hastalığın tanısında potansiyel yeni biyobelirteçler olabileceğini ortaya çıkarmıştır. İlgili miRNA markörlerinin etkin ve duyarlı biyobelirteç olarak tanımlanması için daha geniş örneklem ve kestirim analizleri gibi çeşitli biyoinformatik yaklaşımlarla teyit edilmesi gerekmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

- Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EA, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol*, 2012; 59(5): 429-93.
- Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*, 2015; 4: e0500
- Allsopp BA, Baylis HA, Allsopp MT, Cavalier-Smith T, Bishop RP, Carrington DM, Sohanpal B, Spooner P. Discrimination between six species of *Theileria* using oligonucleotide probes which detect small subunit ribosomal RNA sequences. *Parasitology*, 1993; 107: 157-165.
- Alon S, Vigneault F, Eminaga S, Christodoulou DC, Seidman JG, Church GM, Eisenberg E. Barcoding bias in high-throughput multiplex sequencing of miRNA. *Genome Res*, 2011; 21(9): 1506-1511.
- Andreu Z, Yáñez-Mó M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol*, 2014; 5: 442.
- Anel A, Gallego-Lleyda A, de Miguel D, Naval J, Martínez-Lostao L. Role of Exosomes in the Regulation of T-cell Mediated Immune Responses and in Autoimmune Disease. *Cells*, 2019; 8(2): 154.
- Arya SB, Chen S, Jordan-Javed F, Parent CA. Ceramide-rich microdomains facilitate nuclear envelope budding for non-conventional exosome formation. *Nat Cell Biol*, 2022; 24(7): 1019-1028.
- Atkin-Smith GK, Miles MA, Tixeira R, Lay FT, Duan M, Hawkins CJ, Phan TK, Paone S, Mathivanan S, Hulett MD, Chen W, Poon IKH. Plexin B2 Is a

- Regulator of Monocyte Apoptotic Cell Disassembly. *Cell Rep*, 2019; 29(7): 1821-1831.
- Bachurski D, Schuldner M, Nguyen PH, Malz A, Reiners KS, Grenzi PC, Babatz F, Schauss AC, Hansen HP, Hallek M, Pogge von Strandmann E. Extracellular vesicle measurements with nanoparticle tracking analysis- An accuracy and repeatability comparison between NanoSight NS300 and ZetaView. *J Extracell Vesicles*, 2019; 8(1): 1596016.
- Baker M. MicroRNA profiling: separating signal from noise. *Nat Methods*, 2010; 7(9): 687-692.
- Baldwin CL, Black SJ, Brown WC, Conrad PA, Goddeeris BM, Kinuthia SW, Lalor PA, MacHugh ND, Morrison WI, Morzaria SP. Bovine T cells, B cells, and null cells are transformed by the protozoan parasite *Theileria parva*. *Infection and immunity*, 1988; 56(2): 462-467.
- Barman B, Sung BH, Krystofiak E, Ping J, Ramirez M, Millis B, Allen R, Prasad N, Chetyrkin S, Calcutt MW, Vickers K, Patton JG, Liu Q, Weaver AM. VAP-A and its binding partner CERT drive biogenesis of RNA-containing extracellular vesicles at ER membrane contact sites. *Dev Cell*, 2022; 57(8): 974-994.
- Barnett SF. *Theileria* In Parasitic Protozoa. Kreier JP (ed) Academic Press: New York. 1977. p. 77-113.
- Barteneva NS, Maltsev N, Vorobjev IA. Microvesicles and intercellular communication in the context of parasitism. *Front Cell Infect Microbiol*, 2013; 3: 49.
- Batagov AO, Kurochkin IV. Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions. *Biol Direct*, 2013; 8: 12.
- Baumgartner M, Chaussepied M, Moreau MF, Werling D, Davis WC, Garcia A, Langsley G. Constitutive PI3-K activity is essential for proliferation, but not survival, of *Theileria parva*-transformed B cells. *Cell Microbiol*, 2000; 2(4):329-339.
- Beniwal RK, Nichani AK, Sharma RD, Rakha NK, Suri D, Sarup S. Responses in animals vaccinated with the *Theileria annulata* (Hisar) cell culture vaccine. *Trop Anim Health Prod*, 1997; 29: 109-113.

- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B Methodol*, 1995; 57(1): 289-300
- Beyer C, Pisetsky DS. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*, 2010; 6(1):21-29.
- Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ, Schorey JS. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood*, 2007; 110(9): 3234-3244.
- Bishop R, Musoke A, Morzaria S, Gardner M, Nene V. *Theileria*: intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by *ixodid* ticks. *Parasitology*, 2004; 129: 271-283.
- Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Théry C. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic*, 2011; 12(12): 1659-1668.
- Broughton JP, Lovci MT, Huang JL, Yeo GW, Pasquinelli AE. Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Mol Cell*, 2016; 64(2): 320-333.
- Burridge MJ, Young AS, Stagg DA, Kanhai GK, Kimber CD. *Theileria lawrencei* infection of cattle and African buffalo: evaluation of a buffalo cell culture schizont antigen for the indirect fluorescent antibody test. *Res Vet Sci*, 1974; 17(3): 285-289.
- Buzas EI. The roles of extracellular vesicles in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2023; 23(4): 236-250.
- Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol*, 2005;17(7): 879-887.
- Campbell JD, Howie SE, Odling KA, Glass EJ. *Theileria annulata* induces aberrant T cell activation in vitro and in vivo. *Clin Exp Immunol*, 1995; 99(2): 203-210.
- Campos FM, Franklin BS, Teixeira-Carvalho A, Filho AL, de Paula SC, Fontes CJ, Brito CF, Carvalho LH. Augmented plasma microparticles during acute *Plasmodium vivax* infection. *Malar J*, 2010; 9: 327.

- Cao M, Ning J, Hernandez-Lara CI, Belzile O, Wang Q, Dutcher SK, Liu Y, Snell WJ. Uni-directional ciliary membrane protein trafficking by a cytoplasmic retrograde IFT motor and ciliary ectosome shedding. *Elife*, 2015; 4: e05242.
- Caputo F, Clogston J, Calzolari L, Rösslein M, Prina-Mello A. Measuring particle size distribution of nanoparticle enabled medicinal products, the joint view of EUNCL and NCI-NCL. A step by step approach combining orthogonal measurements with increasing complexity. *J Control Release*, 2019; 299: 31-43.
- Chaput N, Théry C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol*, 2011; 33(5): 419-440.
- Chaussepied M, Langsley G. *Theileria*-Induced Leukocyte Transformation: an Example of Oncogene Addiction? In Kaufmann SHE, Rouse BT, Sacks DL, (Eds.), *The Immune Response to Infection*. ASM Press, Washington, DC 2011; p: 537-546
- Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 2018; 34(17): i884-i890.
- Chen TS, Lai RC, Lee MM, Choo AB, Lee CN, Lim SK. Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic Acids Res*, 2010; 38(1): 215-224.
- Choi D, Lee TH, Spinelli C, Chennakrishnaiah S, D'Asti E, Rak J. Extracellular vesicle communication pathways as regulatory targets of oncogenic transformation. *Semin Cell Dev Biol*, 2017; 67: 11-22.
- Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*, 2009; 19(2): 43-51.
- Coenen-Stass AML, Magen I, Brooks T, Ben-Dov IZ, Greensmith L, Hornstein E, Fratta P. Evaluation of methodologies for microRNA biomarker detection by next generation sequencing. *RNA Biol*, 2018; 15(8):1133-1145.
- Combes V, Coltel N, Alibert M, van Eck M, Raymond C, Juhan-Vague I, Grau GE, Chimini G. ABCA1 gene deletion protects against cerebral malaria: potential pathogenic role of microparticles in neuropathology. *Am J Pathol*, 2005; 166(1): 295-302.

- Combes V, Taylor TE, Juhan-Vague I, Mège JL, Mwenechanya J, Tembo M, Grau GE, Molyneux ME. Circulating endothelial microparticles in malawian children with severe falciparum malaria complicated with coma. *JAMA*, 2004; 291(21): 2542-2544.
- Couper KN, Barnes T, Hafalla JC, Combes V, Ryffel B, Secher T, Grau GE, Riley EM, de Souza JB. Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. *PLoS Pathog*, 2010; 6(1): e1000744.
- Dandasena D, Bhandari V, Sreenivasamurthy GS, Murthy S, Roy S, Bhanot V, Arora JS, Singh S, Sharma P. A Real-Time PCR based assay for determining parasite to host ratio and parasitaemia in the clinical samples of bovine theileriosis. *Sci Rep*, 2018; 8(1): 15441.
- Darghouth ME, Bouattour A, Ben Miled L, Sassi L. Diagnosis of *Theileria annulata* infection of cattle in Tunisia: comparison of serology and blood smears. *Vet Res*. 1996; 27(6): 613-621.
- de Castro JJ. Sustainable tick and tick-borne disease control in livestock improvement in developing countries. *Vet Parasit*, 1997; 71: 77-97.
- de Kok JB, d'Oliveira C, Jongejan F. Detection of the protozoan parasite *Theileria annulata* in *Hyalomma* ticks by the polymerase chain reaction. *Exp Appl Acarol*, 1993; 17(11): 839-846.
- de la Torre-Escudero E, Bennett APS, Clarke A, Brennan GP, Robinson MW. Extracellular Vesicle Biogenesis in Helminths: More than One Route to the Surface? *Trends Parasitol*, 2016; 32(12): 921-929
- Decsi K, Kutasy B, Kiniczky M, Hegedűs G, Virág E. RNA-seq datasets of field soybean cultures conditioned by Elice16Indures® biostimulator. *Data Brief*, 2022; 42: 108182.
- Demarta-Gatsi C, Rivkin A, Di Bartolo V, Peronet R, Ding S, Commere PH, Guillonneau F, Bellalou J, Brûlé S, Abou Karam P, Cohen SR, Lagache T, Janse CJ, Regev-Rudzki N, Mécheri S. Histamine releasing factor and elongation factor 1 alpha secreted via malaria parasites extracellular vesicles promote immune evasion by inhibiting specific T cell responses. *Cell Microbiol*, 2019; 21(7): e13021.

- Dessaige F, Hilaly S, Baumgartner M, Blumen B, Werling D, Langsley G. c-Myc activation by *Theileria* parasites promotes survival of infected B-lymphocytes. *Oncogene*, 2005; 24(6): 1075-1083.
- Di Vizio D, Morello M, Dudley AC, Schow PW, Adam RM, Morley S, Mulholland D, Rotinen M, Hager MH, Insabato L, Moses MA, Demichelis F, Lisanti MP, Wu H, Klagsbrun M, Bhowmick NA, Rubin MA, D'Souza-Schorey C, Freeman MR. Large oncosomes in human prostate cancer tissues and in the circulation of mice with metastatic disease. *Am J Pathol*, 2012; 181(5): 1573-1584.
- Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJ, Hole P, Carr B, Redman CW, Harris AL, Dobson PJ, Harrison P, Sargent IL. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine*, 2011; 7(6): 780-788.
- Dschunkowsky E, and Luhs J. Die piroplasmen der rinder zentralblatt für bacteriology, Parasitenkunde. *Infectionskrankheiten und Hygiene. Abteilung I originale*. 1904; 35: 486-492.
- Erdemir A, Aktas M, Dumanli N. Isolation, cloning and sequence analysis of the lactate dehydrogenase gene from *Theileria annulata* may lead to design of new anti *Theilerial* drugs. *Veterinari Medicina*, 2012; 57(10):559-567.
- Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 2016; 32(19): 3047-3048.
- Faraldi M, Gomasasca M, Sansoni V, Perego S, Banfi G, Lombardi G. Normalization strategies differently affect circulating miRNA profile associated with the training status. *Sci Rep*, 2019; 9(1): 1584.
- Filipe V, Hawe A, Jiskoot W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm Res*, 2010; 27(5): 796-810.
- Fitzgerald W, Freeman ML, Lederman MM, Vasilieva E, Romero R, Margolis L. A System of cytokines encapsulated in extracellular vesicles. *Sci Rep*, 2018; 8(1): 8973.

- Forsyth LM, Jackson LA, Wilkie G, Sanderson A, Brown CG, Preston PM. Bovine cells infected in vivo with *Theileria annulata* express CD11b, the C3b complement receptor. *Vet Res Commun.* 1997; 21(4): 249-263.
- Friedländer MR, Chen W, Adamidi C, Maaskola J, Einspanier R, Knespel S, Rajewsky N. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nat Biotechnol.* 2008; 26(4): 407-415.
- Friedländer MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(1): 37-52.
- Garcia-Martin R, Wang G, Brandão BB, Zanotto TM, Shah S, Kumar Patel S, Schilling B, Kahn CR. MicroRNA sequence codes for small extracellular vesicle release and cellular retention. *Nature.* 2022; 601(7893): 446-451.
- Garcia-Silva MR, das Neves RF, Cabrera-Cabrera F, Sanguinetti J, Medeiros LC, Robello C, Naya H, Fernandez-Calero T, Souto-Padron T, de Souza W, Cayota A. Extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* are linked to small RNA pathways, life cycle regulation, and susceptibility to infection of mammalian cells. *Parasitol Res.* 2014; 113(1): 285-304.
- Geiger A, Hirtz C, Bécue T, Bellard E, Centeno D, Gargani D, Rossignol M, Cuny G, Peltier JB. Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*. *BMC Microbiol.* 2010; 10: 20
- Gharbi M, Darghouth M.A. Control of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection in cattle) in North Africa. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease.* 2015; 5(7):505-510.
- Ghoneim AM, El-Fayomy AO. Targeting tams-1 gene results in underestimation of *Theileria annulata* infection in diseased cattle in Egypt. *Acta Parasitol.* 2014; 59(1): 85-90.
- Gillan V, Simpson DM, Kinnaird J, Maitland K, Shiels B, Devaney E. Characterisation of infection associated microRNA and protein cargo in extracellular vesicles of *Theileria annulata* infected leukocytes. *Cell Microbiol.* 2019; 21(1): e12969.

- Glass EJ, Jensen K. Resistance and susceptibility to a protozoan parasite of cattle-- gene expression differences in macrophages from different breeds of cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, 2007; 120(1-2): 20-30.
- Gold LI, Jussila T, Fusenig NE, Stenbäck F. TGF-beta isoforms are differentially expressed in increasing malignant grades of HaCaT keratinocytes, suggesting separate roles in skin carcinogenesis. *J Pathol*, 2000; 190 (5): 579-588.
- Gomes LR, Terra LF, Wailemann RA, Labriola L, Sogayar MC. TGF- $\beta$ 1 modulates the homeostasis between MMPs and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast cancer cells. *BMC Cancer*, 2012; 12: 26.
- Gonçalves MF, Umezawa ES, Katzin AM, de Souza W, Alves MJ, Zingales B, Colli W. *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. *Exp Parasitol*, 1991; 72(1): 43-53.
- Gotia HT, Munro JB, Knowles DP, Daubenberger CA, Bishop RP, Silva JC. Absolute Quantification of the Host-To-Parasite DNA Ratio in *Theileria parva*-Infected Lymphocyte Cell Lines. *PLoS One*, 2016; 11(3): e0150401.
- Guergnon J, Chaussepied M, Sopp P, Lizundia R, Moreau MF, Blumen B, Werling D, Howard CJ, Langsley G. A tumour necrosis factor alpha autocrine loop contributes to proliferation and nuclear factor-kappaB activation of *Theileria parva*-transformed B cells. *Cell Microbiol*, 2003; 5(10): 709-716.
- Guescini M, Genedani S, Stocchi V, Agnati LF. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J Neural Transm*, 2010; 117(1): 1-4.
- Guescini M, Guidolin D, Vallorani L, Casadei L, Gioacchini AM, Tibollo P, Battistelli M, Falcieri E, Battistin L, Agnati LF, Stocchi V. C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction. *Exp Cell Res*, 2010; 316(12): 1977-1984.
- Hafner M, Renwick N, Brown M, Mihailović A, Holoch D, Lin C, Pena JT, Nusbaum JD, Morozov P, Ludwig J, Ojo T, Luo S, Schroth G, Tuschl T. RNA-ligase-dependent biases in miRNA representation in deep-sequenced small RNA cDNA libraries. *RNA*, 2011; 17(9): 1697-1712.
- Haidar M, Rchiad Z, Ansari HR, Ben-Rached F, Tajeri S, Latre De Late P, Langsley G, Pain A. miR-126-5p by direct targeting of JNK-interacting protein-2 (JIP-2)

- plays a key role in *Theileria*-infected macrophage virulence. PLoS Pathog, 2018; 14(3): e1006942.
- Haidar M, Rchiad Z, Ansari HR, Ben-Rached F, Tajeri S, Latre De Late P, Langsley G, Pain A. miR-126-5p by direct targeting of JNK-interacting protein-2 (JIP-2) plays a key role in *Theileria*-infected macrophage virulence. PLoS Pathog, 2018; 14(3) :e1006942.
- Haidar M, Tajeri S, Momeux L, Mourier T, Ben-Rached F, Mfarrej S, Rchiad Z, Pain A, Langsley G. miR-34c-3p regulates protein kinase A activity independent of cAMP by dicing *prkar2b* transcripts in *Theileria annulata*-infected leukocytes. mSphere, 2023; 8(2): e0052622.
- Haidar M, Whitworth J, Noé G, Liu WQ, Vidal M, Langsley G. TGF- $\beta$ 2 induces Grb2 to recruit PI3-K to TGF-RII that activates JNK/AP-1-signaling and augments invasiveness of *Theileria*-transformed macrophages. Sci Rep, 2015; 5: 15688.
- Heussler VT. *Theileria* Survival Strategies and Host Cell Transformation, Academic Publishers, United States of America. 2002. p. 71-77
- Higginbotham JN, Demory Beckler M, Gephart JD, Franklin JL, Bogatcheva G, Kremers GJ, Piston DW, Ayers GD, McConnell RE, Tyska MJ, Coffey RJ. Amphiregulin exosomes increase cancer cell invasion. Curr Biol, 2011; 21(9): 779-786.
- Holmgren L, Szeles A, Rajnavölgyi E, Folkman J, Klein G, Ernberg I, Falk KI. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. Blood, 1999; 93(11): 3956-3963.
- Huang C, Ge F, Ma X, Dai R, Dingkao R, Zhaxi Z, Burenchao G, Bao P, Wu X, Guo X, Chu M, Yan P, Liang C. Comprehensive analysis of mRNA, lncRNA, circRNA, and miRNA expression profiles and their ceRNA networks in the longissimus dorsi muscle of cattle-ak and yak. Front Genet, 2021; 12: 772557.
- Ilhan T, Williamson S, Kirvar E, Shiels B, Brown CG. *Theileria annulata*: carrier state and immunity. Ann N Y Acad Sci, 1998; 849: 109-125.
- Inci A, Cakmak A, Ica A, Gunay O. Kayseri yöresinde tropikal theileriosis'in istatistiksel analizi. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 2002, Vol 26 No 1: 38-41

- İnci A, İca A, Yıldırım A, Vatansver Z, Cakmak A, Albasan H, Cam Y, Atasever A, Sariozkan S, Duzlu O. Economical impact of tropical theileriosis in the Cappadocia region of Turkey. *Parasitol Res.* 2007; 101 Suppl 2: 171-174.
- İnci A, Çakmak A, Çam Y, Karaer Z, Atasever A, İça A. Kayseri yöresinde tropikal theileriosis'e bağıli ekonomik kayıplar. *Türkiye Parazitoloji Dergisi.* 2002;26(2):156-60.
- İnci A, Yıldırım A, Düzlü Ö. Kenelerin Medikal ve Veteriner Önemleri. Erciyes Üniversitesi Yayınları, Kayseri 2016.
- İnci A. Genel Bakış: Eksozomlar ve Bazı Parazit Protozoon Enfeksiyonlardaki Rollerini. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg.* 2018;15(2):179-8.
- İnci A, Bişkin Z. Toll-Like Reseptörler ve Protozoon Enfeksiyonlarındaki Rollerini. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg.* 2007;4(2):121-9.
- İnci A, Yıldırım A, Yavuz A, Düzlü Ö. Bazı Protozoon Enfeksiyonlarda Apoptozis. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg.* 2009;6(2):121-33.
- Ioannidis J, Sánchez-Molano E, Psifidi A, Donadeu FX, Banos G. Association of plasma microRNA expression with age, genetic background and functional traits in dairy cattle. *Sci Rep,* 2018; 8(1): 12955.
- Jadli AS, Ballasy N, Edalat P, Patel VB. Inside(sight) of tiny communicator: exosome biogenesis, secretion, and uptake. *Mol Cell Biochem,* 2020; 467(1-2): 77-94.
- Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, Higginbotham JN, Zhang Q, Zimmerman LJ, Liebler DC, Ping J, Liu Q, Evans R, Fissell WH, Patton JG, Rome LH, Burnette DT, Coffey RJ. Reassessment of exosome composition. *Cell,* 2019; 177(2): 428-445
- Jeppesen DK, Nawrocki A, Jensen SG, Thorsen K, Whitehead B, Howard KA, Dyrskjøt L, Ørntoft TF, Larsen MR, Ostensfeld MS. Quantitative proteomics of fractionated membrane and lumen exosome proteins from isogenic metastatic and nonmetastatic bladder cancer cells reveal differential expression of EMT factors. *Proteomics,* 2014; 14(6): 699-712.
- Jin J, Shi Y, Gong J, Zhao L, Li Y, He Q, Huang H. Exosome secreted from adipose-derived stem cells attenuates diabetic nephropathy by promoting autophagy flux and inhibiting apoptosis in podocyte. *Stem Cell Res Ther,* 2019; 10(1): 95.

- Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett*, 2006; 107(2): 102-108
- Kemeny DM, Chantler S. An introduction to ELISA. In *ELISA and other solid phase immunoassays. Theoretical and practical aspects*, D. M. Kemeny and Challacombe, John Wiley and Son Ltd: Chichester 1988 p. 1-30
- Kerviel A, Zhang M, Altan-Bonnet N. A new infectious unit: Extracellular vesicles carrying virus populations. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2021; 37: 171-197.
- Kiltz HH, Uilenberg G, Franssen FF, Perié NM. *Theileria orientalis* occurs in Central Africa. *Res Vet Sci*, 1986; 40(2): 197-200.
- Kim HR, Mun Y, Lee KS, Park YJ, Park JS, Park JH, Jeon BN, Kim CH, Jun Y, Hyun YM, Kim M, Lee SM, Park CS, Im SH, Jun CD. T cell microvilli constitute immunological synaptosomes that carry messages to antigen-presenting cells. *Nat Commun*, 2018; 9(1):3630
- Kitai Y, Kawasaki T, Sueyoshi T, Kobiyama K, Ishii KJ, Zou J, Akira S, Matsuda T, Kawai T. DNA-containing exosomes derived from cancer cells treated with topotecan activate a STING-dependent pathway and reinforce antitumor immunity. *J Immunol*, 2017; 198(4): 1649-1659.
- Kocan KM, Blouin EF, Barbet AF. Anaplasmosis control. Past, present, and future. *Ann N Y Acad Sci*, 2000; 916: 501-509
- Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M, Théry C. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016; 113(8): E968-77.
- Kundave VR, Patel AK, Patel PV, Hasnani JJ, Joshi CG. Qualitative and quantitative assessment of *Theileria annulata* in cattle and buffaloes Polymerase Chain Reaction. *Trop Biomed*, 2014; 31(4) :728-735.
- Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*, 2012; 9(4): 357-359.
- Lee TH, Chennakrishnaiah S, Audemard E, Montermini L, Meehan B, Rak J. Oncogenic ras-driven cancer cell vesiculation leads to emission of double-stranded DNA capable of interacting with target cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014; 451(2): 295-301.

- Levine ND. Apicomplexa: The Piroplasms. *Vet Parasit*, 1985; 291-328
- Levine NO. The protozoan phylum Apicomplexa (Vol. I and II). CRC press, Boca Raton, Florida, USA 1988.
- Li J, Kho AT, Chase RP, Pantano L, Farnam L, Amr SS, Tantisira KG. COMPSRA: a COMprehensive Platform for Small RNA-Seq data Analysis. *Sci Rep*, 2020; 10(1): 4552.
- Li L, Zhu D, Huang L, Zhang J, Bian Z, Chen X, Liu Y, Zhang CY, Zen K. Argonaute 2 complexes selectively protect the circulating microRNAs in cell-secreted microvesicles. *PLoS One*, 2012; 7(10): e46957.
- Lima LG, Ham S, Shin H, Chai EPZ, Lek ESH, Lobb RJ, Müller AF, Mathivanan S, Yeo B, Choi Y, Parker BS, Möller A. Tumor microenvironmental cytokines bound to cancer exosomes determine uptake by cytokine receptor-expressing cells and biodistribution. *Nat Commun*, 2021; 12(1): 3543.
- Linsen SE, de Wit E, Janssens G, Heater S, Chapman L, Parkin RK, Fritz B, Wyman SK, de Bruijn E, Voest EE, Kuersten S, Tewari M, Cuppen E. Limitations and possibilities of small RNA digital gene expression profiling. *Nat Methods*, 2009; 6(7): 474-476.
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, 2014; 15(12): 550.
- Lu YA, Liao CT, Raybould R, Talabani B, Grigorieva I, Szomolay B, Bowen T, Andrews R, Taylor PR, Fraser D. Single-nucleus RNA sequencing identifies new classes of proximal tubular epithelial cells in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, 2021; 32(10): 2501-2516.
- Ma L, Li Y, Peng J, Wu D, Zhao X, Cui Y, Chen L, Yan X, Du Y, Yu L. Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration. *Cell Res*, 2015; 25(1): 24-38.
- Ma M, Baumgartner M. Intracellular *Theileria annulata* promote invasive cell motility through kinase regulation of the host actin cytoskeleton. *PLoS Pathog*, 2014; 10(3): e1004003.
- Malak AK, Mpoke L, Banak J, Muriuki S, Skilton RA, Odongo D et al. Prevalence of livestock diseases and their impact on livelihoods in Central Equatoria State, Southern Sudan *Preventive Veterinary Medicine* 2012; 104:216-223.

- Mans BJ, Pienaar R, Latif AA. A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology. *Int J Parasitol Parasites Wildl*, 2015; 4(1): 104-118.
- Mantel PY, Hoang AN, Goldowitz I, Potashnikova D, Hamza B, Vorobjev I, Ghiran I, Toner M, Irimia D, Ivanov AR, Barteneva N, Marti M. Malaria-infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune system. *Cell Host Microbe*, 2013; 13(5): 521-534.
- Marki A, Buscher K, Lorenzini C, Meyer M, Saigusa R, Fan Z, Yeh YT, Hartmann N, Dan JM, Kiosses WB, Golden GJ, Ganesan R, Winkels H, Orecchioni M, McArdle S, Mikulski Z, Altman Y, Bui J, Kronenberg M, Chien S, Esko JD, Nizet V, Smalley D, Roth J, Ley K. Elongated neutrophil-derived structures are blood-borne microparticles formed by rolling neutrophils during sepsis. *J Exp Med*, 2021; 218(3).
- Marsman G, Zeerleder S, Luken BM. Extracellular histones, cell-free DNA, or nucleosomes: differences in immunostimulation. *Cell Death Dis*, 2016; 7(12): e2518.
- Marsolier J, Pineau S, Medjkane S, Perichon M, Yin Q, Flemington E, Weitzman MD, Weitzman JB. OncomiR addiction is generated by a miR-155 feedback loop in *Theileria*-transformed leukocytes. *PLoS Pathog*, 2013; 9(4): e1003222.
- Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Théry C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol*, 2019; 21(1): 9-17.
- Mathieu M, Névo N, Jouve M, Valenzuela JI, Maurin M, Verweij FJ, Palmulli R, Lankar D, Dingli F, Loew D, Rubinstein E, Boncompain G, Perez F, Théry C. Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9. *Nat Commun*, 2021; 12(1): 4389.
- Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics*, 2010; 73(10): 1907-1920.
- McLeod A, Kristjanson R. Impact of ticks and associated diseases on cattle in Asia, Australia and Africa. ILRI and eSYS report to ACIAR. International Livestock Research Institute, Nairobi, Kenya, 1999.

- McHardy N, Wekesa LS, Hudson AT, Randall AW. Antitheilerial activity of BW720C (buparvaquone): a comparison with parvaquone. *Res Vet Sci*, 1985; 39(1): 29-33.
- Melentijevic I, Toth ML, Arnold ML, Guasp RJ, Harinath G, Nguyen KC, Taub D, Parker JA, Neri C, Gabel CV, Hall DH, Driscoll M. *C. elegans* neurons jettison protein aggregates and mitochondria under neurotoxic stress. *Nature*, 2017; 542(7641): 367-371.
- Metheni M, Lombès A, Bouillaud F, Batteux F, Langsley G. HIF-1 $\alpha$  induction, proliferation and glycolysis of *Theileria*-infected leukocytes. *Cell Microbiol*, 2015; 17(4): 467-472.
- Mimoğlu M, Göksu K, Sayın F. Veteriner ve Tıbbi Protozooloji. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara. 1969; s.: 980-981.
- Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González MÁ, Bernad A, Sánchez-Madrid F. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*, 2011; 2: 282.
- Mitra I, Khare NK, Raghuram GV, Chaubal R, Khambatti F, Gupta D, Gaikwad A, Prasannan P, Singh A, Iyer A, Singh A, Upadhyay P, Nair NK, Mishra PK, Dutt A. Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes. *J Biosci*, 2015; 40(1): 91-111
- Muraguri GR, Kiara HK, McHardy N. Treatment of East Coast fever: a comparison of parvaquone and buparvaquone. *Vet Parasitol*, 1999; 87(1): 25-37.
- Nantakomol D, Dondorp AM, Krudsood S, Udomsangpetch R, Pattanapanyasat K, Combes V, Grau GE, White NJ, Viriyavejakul P, Day NP, Chotivanich K. Circulating red cell-derived microparticles in human malaria. *J Infect Dis*, 2011; 203(5): 700-706
- Neilsen CT, Goodall GJ, Bracken CP. IsomiRs--the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome. *Trends Genet*, 2012; 28(11): 544-549.
- Neitz WO. Theileriosis, gonderioses and cyauxzoonoses: a review 2 *Theileria annulata* infection. *Onderstepoort J Vet Res*, 1957; 27: 275-346
- Nolte-'t Hoen EN, Buermans HP, Waasdorp M, Stoorvogel W, Wauben MH, 't Hoen PA. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the

- selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res*, 2012; 40(18): 9272-9285.
- Norval RAI, Perry BD, Young AS. *The Epidemiology of Theileriosis in Africa*. London, Academic Press. 1992; 68-84.
- O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol*, 2018; 9: 402.
- Osteikoetxea X, Balogh A, Szabó-Taylor K, Németh A, Szabó TG, Pálóczi K, Sódar B, Kittel Á, György B, Pállinger É, Matkó J, Buzás EI. Improved characterization of EV preparations based on protein to lipid ratio and lipid properties. *PLoS One*, 2015; 10(3): e0121184.
- Osteikoetxea X, Sódar B, Németh A, Szabó-Taylor K, Pálóczi K, Vukman KV, Tamási V, Balogh A, Kittel Á, Pállinger É, Buzás EI. Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations. *Org Biomol Chem*, 2015; 13(38): 9775-9782
- Pankoui Mfonkeu JB, Gouado I, Fotso Kuate H, Zambou O, Amvam Zollo PH, Grau GE, Combes V. Elevated cell-specific microparticles are a biological marker for cerebral dysfunctions in human severe malaria. *PLoS One*, 2010; 5(10): e13415.
- Park JE, Tan HS, Datta A, Lai RC, Zhang H, Meng W, Lim SK, Sze SK. Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. *Mol Cell Proteomics*, 2010; 9(6): 1085-1099.
- Pipano E, Weishman Y, Benado A. The virulence of four local strains of *Theileria annulata*. *Refuah Veterinarith*, 1974; 23: 186-194.
- Pipano E. *Theileria annulata* Theileriosis. *Infectious Diseases of Livestock, with Special Reference to Southern Africa*. Oxford University Press, Oxford, UK, 1994; p.:341-348.
- Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004; 101(36): 13368-13373.

- Podnar J, Deiderick H, Huerta G, Hunicke-Smith S. Next-generation sequencing RNA-seq library construction. *Curr Protoc Mol Biol*, 2014; 106: 4.21.1-4.21.19.
- Prasanth, CS, Jagannath MS, Rajasekhar M, Rahman SA. Transfer and persistence of maternal antibodies against *Theileria annulata* in calves. *Indian Journal of Animal Sciences*. 1995; 65: 492-496.
- Purnell RE. *Theileria annulata* as a hazard to cattle in countries on the northern Mediterranean littoral. *Veterinary Science Communications* 2, 1978; 3-10.
- Qazi KR, Gehrman U, Domange Jordö E, Karlsson MC, Gabriellsson S. Antigen-loaded exosomes alone induce Th1-type memory through a B-cell-dependent mechanism. *Blood*, 2009; 113(12): 2673-2683.
- Rafyi A, Maghami G, Houshmand P. Sur la virulence de *Theileria annulata* (Dschunkowsky et Luhs, 1904) et la prémunition contre la Theilériose bovine en Iran [On the virulence of *Theileria annulata* (Dschunkowsky and Luhs, 1904) and the premunition against bovine theileriosis in Iran]. *Bull Off Int Epizoot*, 1965; 64: 431-446.
- Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*, 1996; 183(3): 1161-1172.
- Raposo G, Stahl PD. Extracellular vesicles: a new communication paradigm? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019; 20(9): 509-510.
- Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, Ratajczak MZ. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, 2006; 20(5): 847-856
- Record M, Carayon K, Poirot M, Silvente-Poirot S. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochim Biophys Acta*, Jan; 1841(1): 108-120.
- Record M, Subra C, Silvente-Poirot S, Poirot M. Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochem Pharmacol*, 2011; 81(10): 1171-1182.

- Regev-Rudzki N, Wilson DW, Carvalho TG, Sisquella X, Coleman BM, Rug M, Bursac D, Angrisano F, Gee M, Hill AF, Baum J, Cowman AF. Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. *Cell*, 2013; 153(5): 1120-1133.
- Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*, 2015; 43(7): e47.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: A bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 2010; 26(1): 139-140.
- Robinson PM. *Theileria annulata* and its transmission-a review. *Trop Anim Health Prod*, 1982; 14(1):3-12.
- Romao JM, Jin W, Dodson MV, Hausman GJ, Moore SS, Guan LL. MicroRNA regulation in mammalian adipogenesis. *Exp Biol Med*, 2011; 236(9): 997-1004.
- Ros-García A, Nicolás A, García-Pérez AL, Juste RA, Hurtado A. Development and evaluation of a real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria annulata* in cattle. *Parasit Vectors*, 2012; 5: 171.
- Ros-García A, Nicolás A, García-Pérez AL, Juste RA, Hurtado A. Development and evaluation of a real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria annulata* in cattle. *Parasit Vectors*, 2012; 5: 171.
- Samoil V, Dagenais M, Ganapathy V, Aldridge J, Glebov A, Jardim A, Ribeiro P. Vesicle-based secretion in schistosomes: Analysis of protein and microRNA (miRNA) content of exosome-like vesicles derived from *Schistosoma mansoni*. *Sci Rep*, 2018; 8(1): 3286.
- Santos M, Soares R, Costa P, Amaro A, Inácio J, Gomes J. Revisiting the Tams1-encoding gene as a species-specific target for the molecular detection of *Theileria annulata* in bovine blood samples. *Ticks Tick Borne Dis*, 2013; 4(1-2): 72-77.
- Sayın F, Nalbantoğlu S, Karaer Z, Çakmak A, Dinçer Ş, Vatansever Z, İnci A, Yukarı BA, Eren H, Günay M, Onar H, Alp H. Türkiyede tropikal theileriosis üzerine araştırmalar. *Turk J Vet Anim Sci*. 2004; 28: 963-971.

- Sayın F, Dincer S, Karaer Z, Cakmak A, İnci A, Yukarı BA, Nalbantoglu S. Studies on the epidemiology of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) in cattle in Central Anatolia, Turkey. *Tropical animal health and production*. 2003; 35, 521-539.
- Sayın F, Dinçer Ş, Karaer Z, Çakmak A, İnci A, Yukarı BA, Eren H, Brown CGD, Melrose TR. Ankara yöresinde elde edilen *Theileria annulata* (Dschunkowsky and Luhs, 1904) izolatları üzerinde araştırmalar. 4. Vektör kenelerin *Theileria annulata* ile deneysel enfeksiyonları. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1999; 46(1): 127-35.
- Schein E, Buscher G, Friedhoff KT. Light microscopic studies on the development of *Theileria annulata* (Dschunkowsky and Luhs, 1904) in *Hyalomma anatolicum excavatum* (Koch, 1844). I. The development in the gut of engorged nymphs (author's transl). *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 1978; 48: 123-136.
- Schein E, Friedhoff KT. Light microscopic studies on the development of *Theileria annulata* (Dschunkowsky and Luhs, 1904) in *Hyalomma anatolicum excavatum* (Koch, 1844). II. The development in haemolymph and salivary glands. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 1978; 56: 287-303.
- Schneider I, Haller D, Kullmann B, Beyer D, Ahmed JS, Seitzer U. Identification, molecular characterization and subcellular localization of a *Theileria annulata* parasite protein secreted into the host cell cytoplasm. *Parasitol Res*, 2007; 101(6):1471-1482.
- Schorey JS, Bhatnagar S. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic*, 2008; 9(6): 871-881.
- Sergent E, Donatien A, Parrot L, Lestoquard F. Etudes sur les piroplasmoses bovines. Institut Pasteur d'Algeria. 1945; p. 264.
- Sergent E, Donatien AL, Parrot LM and Lestoquard F. Transmission de la piroplasmose bovine a *Theileria dispar*, de l'Afrique du Nord, par la tique *Hyalommo mauritanicum*. *Compte Rendue de l'Academie des Sciences*, 1928; 187: 259-260.
- Shaw MK. *Theileria*. Kluwer Academic Publishers. United States of America. 2002. p.: 1-2, 7 11.

- Shiels B, Langsley G, Weir W, Pain A, McKellar S, Dobbelaere D. Alteration of host cell phenotype by *Theileria annulata* and *Theileria parva*: mining for manipulators in the parasite genomes. *Int J Parasitol*, 2006; 36(1): 9-21.
- Sibeko KP, Oosthuizen MC, Collins NE, Geysen D, Rambritch NE, Latif AA, Groeneveld HT, Potgieter FT, Coetzer JA. Development and evaluation of a real-time polymerase chain reaction test for the detection of *Theileria parva* infections in Cape buffalo (*Syncerus caffer*) and cattle. *Vet Parasitol*, 2008; 155(1-2): 37-48.
- Silverman JM, Clos J, Horakova E, Wang AY, Wiesgigl M, Kelly I, Lynn MA, McMaster WR, Foster LJ, Levings MK, Reiner NE. Leishmania exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. *J Immunol*, 2010; 185(9): 5011-5022.
- Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*, 2009; 21(4): 575-581.
- Singh DK, Thakur M, Raghav PR, Varshney BC. Chemotherapeutic trials with four drugs in crossbred calves experimentally infected with *Theileria annulata*. *Res Vet Sci*, 1993; 54(1): 68-71.
- Skotland T, Sagini K, Sandvig K, Llorente A. An emerging focus on lipids in extracellular vesicles. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020; 159: 308-321.
- Subra C, Laulagnier K, Perret B, Record M. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie*, 2007; 89(2): 205-212.
- Tajeri S, Haidar M, Sakura T, Langsley G. Interaction between transforming *Theileria* parasites and their host bovine leukocytes. *Mol Microbiol*, 2021; 115(5): 860-869.
- Takahashi A, Okada R, Nagao K, Kawamata Y, Hanyu A, Yoshimoto S, Takasugi M, Watanabe S, Kanemaki MT, Obuse C, Hara E. Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat Commun*, 2017; 8: 1-16.
- Taylor DD, Akyol S, Gercel-Taylor C. Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling. *J Immunol*, 2006; 176(3): 1534-1542.
- Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B, Zheng Y, Hoshino A, Brazier H, Xiang J, Williams C, Rodriguez-Barrueco R, Silva JM,

- Zhang W, Hearn S, Elemento O, Paknejad N, Manova-Todorova K, Welte K, Bromberg J, Peinado H, Lyden D. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res*, 2014; 24(6):766-769.
- Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*, 2009; 9(8): 581-93.
- Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles* 2018, 7, 1535750.
- Tkach M, Théry C. Communication by extracellular vesicles: Where we are and where we need to go. *Cell*, 2016; 164(6): 1226-1232.
- Torralba D, Baixauli F, Villarroya-Beltri C, Fernández-Delgado I, Latorre-Pellicer A, Acín-Pérez R, Martín-Cófreces NB, Jaso-Tamame ÁL, Iborra S, Jorge I, González-Aseguinolaza G, Garaude J, Vicente-Manzanares M, Enríquez JA, Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Priming of dendritic cells by DNA-containing extracellular vesicles from activated T cells through antigen-driven contacts. *Nat Commun*, 2018; 9(1): 1-17.
- Toyofuku M, Nomura N, Eberl L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat Rev Microbiol*, 2019;17(1): 13-24.
- Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brügger B, Simons M. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 2008; 319: 1244-1247.
- Trocoli Torrecilhas AC, Tonelli RR, Pavanelli WR, da Silva JS, Schumacher RI, de Souza W, E Silva NC, de Almeida Abrahamsohn I, Colli W, Manso Alves MJ. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes Infect*, 2009; 11(1): 29-39.
- Twu O, Johnson PJ. Parasite extracellular vesicles: mediators of intercellular communication. *PLoS Pathog*, 2014; 10(8): e1004289.



- Uilenberg G. *Theileria* species of domestic livestock, in advances in the control of theileriosis. ed. Irvin AD, Cunningham MP, and Young AS, Martinus Nijhoff, The Hague. 1981; 4-37.
- Urbanelli L, Magini A, Buratta S, Brozzi A, Sagini K, Polchi A, Tancini B, Emiliani C. Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate. *Genes*, 2013; 4(2): 152-170.
- Utsugi-Kobukai S, Fujimaki H, Hotta C, Nakazawa M, Minami M. MHC class I-mediated exogenous antigen presentation by exosomes secreted from immature and mature bone marrow derived dendritic cells. *Immunol Lett*, 2003; 89(2-3): 125-131.
- Vagner T, Spinelli C, Minciocchi VR, Balaj L, Zandian M, Conley A, Zijlstra A, Freeman MR, Demichelis F, De S, Posadas EM, Tanaka H, Di Vizio D. Large extracellular vesicles carry most of the tumour DNA circulating in prostate cancer patient plasma. *J Extracell Vesicles*, 2018; 7(1): 1505403.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 2007; 9(6): 654-659.
- Valcz G, Buzás EI, Kittel Á, Krenács T, Visnovitz T, Spisák S, Török G, Homolya L, Zsigrai S, Kiszler G, Antalffy G, Pálóczi K, Szállási Z, Szabó V, Sebestyén A, Solymosi N, Kalmár A, Dede K, Lőrincz P, Tulassay Z, Igaz P, Molnár B. *En bloc* release of MVB-like small extracellular vesicle clusters by colorectal carcinoma cells. *J Extracell Vesicles*, 2019; 8(1): 1596668.
- van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev*, 2012; 64(3): 676-705.
- van Niel G, Carter DRF, Clayton A, Lambert DW, Raposo G, Vader P. Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022; 23(5): 369-382.
- van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018; 19(4): 213-228.
- Vejnar CE, Blum M, Zdobnov EM. miRmap web: Comprehensive microRNA target prediction online. *Nucleic Acids Res*, 2013;41 (Web Server issue): W165-168

- Vella LJ, Greenwood DL, Cappai R, Scheerlinck JP, Hill AF. Enrichment of prion protein in exosomes derived from ovine cerebral spinal fluid. *Vet Immunol Immunopathol*, 2008; 124(3-4): 385-393.
- Verweij FJ, Balaj L, Boulanger CM, Carter DRF, Compeer EB, D'Angelo G, El Andaloussi S, Goetz JG, Gross JC, Hyenne V, Krämer-Albers EM, Lai CP, Loyer X, Marki A, Momma S, Nolte-'t Hoen ENM, Pegtel DM, Peinado H, Raposo G, Rilla K, Tahara H, Théry C, van Royen ME, Vandenbroucke RE, Wehman AM, Witwer K, Wu Z, Wubbolts R, van Niel G. The power of imaging to understand extracellular vesicle biology in vivo. *Nat Methods*, 2021; 18(9): 1013-1026.
- Vestad B, Llorente A, Neurauder A, Phuyal S, Kierulf B, Kierulf P, Skotland T, Sandvig K, Haug KBF, Øvstebø R. Size and concentration analyses of extracellular vesicles by nanoparticle tracking analysis: a variation study. *J Extracell Vesicles*, 2017; 6(1): 1344087.
- Waldenström A, Genneback N, Hellman U, Ronquist G. Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *PLoS One*, 2012; 7(4): e34653.
- Wang Q, Lu Q. Plasma membrane-derived extracellular microvesicles mediate non-canonical intercellular NOTCH signaling. *Nat Commun*, 2017; 8(1):709.
- Wang W, Kong P, Ma G, Li L, Zhu J, Xia T, Xie H, Zhou W, Wang S. Characterization of the release and biological significance of cell-free DNA from breast cancer cell lines. *Oncotarget*, 2017; 8(26): 43180-43191.
- Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvalld J, Nolte-'t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Théry C, Wauben MH, Hochberg F. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*, 2013; 2.
- Xie C, Mao X, Huang J, Ding Y, Wu J, Dong S, Kong L, Gao G, Li CY, Wei L. KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases. *Nucleic Acids Res*, 2011; 39(Web Server issue): W316-322
- Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colás E, Cordeiro-da Silva A, Fais S, Falcon-

- Perez JM, Ghobrial IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel M, Heegaard NH, Hendrix A, Kierulf P, Kokubun K, Kosanovic M, Kralj-Iglic V, Krämer-Albers EM, Laitinen S, Lässer C, Lener T, Ligeti E, Linē A, Lipps G, Llorente A, Lötvall J, Manček-Keber M, Marcilla A, Mittelbrunn M, Nazarenko I, Nolte-'t Hoen EN, Nyman TA, O'Driscoll L, Oliván M, Oliveira C, Pállinger É, Del Portillo HA, Reventós J, Rigau M, Rohde E, Sammar M, Sánchez-Madrid F, Santarém N, Schallmoser K, Ostefeld MS, Stoorvogel W, Stukelj R, Van der Grein SG, Vasconcelos MH, Wauben MH, De Wever O. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*, 2015; 4: 27066.
- Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytnuik LD, Pittman K, Asaduzzaman M, Wu K, Meijndert HC, Malawista SE, de Boisleury Chevance A, Zhang K, Conly J, Kubes P. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*, 2012; 18(9): 1386-1393.
- Young AS, Mutugi JJ, Kariuki DP, Lampard D, Maritim AC, Ngumi PN, Linyonyi A, Leitch BL, Ndungu SG, Lesan AC, et al. Immunisation of cattle against theileriosis in Nakuru District of Kenya by infection and treatment and the introduction of unconventional tick control. *Vet Parasitol*, 1992 May; 42(3-4): 225-240.
- Yuana Y, Oosterkamp TH, Bahatyrova S, Ashcroft B, Garcia Rodriguez P, Bertina RM, Osanto S. Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. *J Thromb Haemost*, 2010; 8(2): 315-23.
- Zheng Y, Cai X, Bradley JE. microRNAs in parasites and parasite infection. *RNA Biol*, 2013; 10(3): 371-379.
- Ziam H, Kelanamer R, Aissi M, Ababou A, Berkvens D, Geysen D. Prevalence of bovine theileriosis in North Central region of Algeria by real-time polymerase chain reaction with a note on its distribution. *Trop Anim Health Prod*, 2015; 47(5): 787-796.

## EKLER

### Ek 1. Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul kararı (Karar no: 22/025)



Tarih: 02.02.2022 Toplantı Sayısı: 02 Karar No:22/025

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 02.02.2022 tarihinde Prof. Dr. Gültekin ATALAN 'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi
Vehbi GÜNEŞ	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Fusun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Yusuf KONCA	Prof. Dr.	Ziraat Fakültesi
Ahmet ÖZTÜRK	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
M. Betül AYCAN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Ayşe EKEN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Nurcan DURSUN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Sezer DEMİRBUĞA	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi
İbrahim KARAMAN	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi
Zeynep CAFEROĞLU	Dr.Öğr.Üyesi	Sağlık Bilimleri Fakültesi
Ali İleriş AYKUN	Arş. Gör.	Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi ERÜTA
Umut ALPMAN	Arş. Gör.	Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)
Mustafa ERMIŞ	Veteriner Hekim	Deneyel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.
Ali KOÇ	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Sivil Üye
Mehmet TAV	Dernek Üyesi (Avukat)	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinik Öncesi Bilimler Bölümü'nden Prof.Dr.Önder DÜZLÜ tarafından sunulan "Theileria annulata'nın Hücre Kültürü ve Doğal Enfekte Sığırların Dolaşımındaki Eksozomal Mikrorna'ların Karakterizasyonu: Tanısal Biyobelirteç Potansiyelleri" başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 02.02.2022  
Etik Kurul Başkanı : Prof. Dr. Gültekin ATALAN  
İmza :

**Tablo 1.** Non-enfekte sığır gruplarında tespit edilen bilinen miRNA'lar, mature dizilimleri ve uzunlukları.

mirna	length	mature
bta-let-7a-5p	22	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT
bta-let-7c	22,18	TGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT,TGAGGTAGTAGGTTGTAT
bta-let-7d	22	AGAGGTAGTAGGTTGCATAGTT
bta-let-7e	23,18,22	CTGAGGTAGGAGGTTGTATAGTT,TGAGGTAGGAGGTTGTAT,TGAGGTAGGAGGTTGTATAGTT
bta-let-7f	22	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT
bta-let-7g	22	TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT
bta-let-7i	22	TGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTT
bta-miR-1	20,23	TGGAATGTAAAGAAGTATGT,TGGAATGTAAAGAAGTATGTATT
bta-miR-100	22	AACCCGTAGATCCGAACCTGTG
bta-miR-101	22,23,23	TACAGTACTGTGATAACTGAAG,TACAGTACTGTGATAACTGAAGG,TACAGTACTGTGATAACTGAAGA
bta-miR-10167-3p	18	CGGGTGGTCGGGGCGGGT
bta-miR-10172-3p	22	TTCACTGGGCATCCTCTGCTTT
bta-miR-10172-5p	22,2	TTCACTGGGCATCCTCTGCTTT,TCACCTGGGCATCCTCTGCTT
bta-miR-10174-5p	24	ATCACATTGCCAGGGATTACCACG
bta-miR-10175-5p	20	TGGAGAGAACAGGTGGCTTT
bta-miR-10225a	20	CCGAGCCTGACAGATCACAC
bta-miR-103	22,23	AGCAGCATTGTACAGGGCTATG,AGCAGCATTGTACAGGGCTATGA
bta-miR-106a	23	AAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG
bta-miR-106b	22,19	CCGCACTGTGGGTTACTTGCTGC,CCGCACTGTGGGTTACTTGC
bta-miR-107	23,19,21	AGCAGCATTGTACAGGGCTATCA,AGCAGCATTGTACAGGGCT,AGCAGCATTGTACAGGGCTAT

bta-miR-10a	22	TACCCTGTAGATCCGAATTTGT
bta-miR-10b	22	TACCCTGTAGAACCGAATTTGT
bta-miR-11973	22	CTTGCTGAGTGACCTCCCTGCT
bta-miR-11982	23	TTCGGCGCCACCACCCCTGCGGGT
bta-miR-12028	19	AAGAGACACCTCTGAGGGG
bta-miR-12034	18	CCCGGGGAGCCCGGCGGT
bta-miR-122	21	TGGAGTGTGACAATGGTGTTT
bta-miR-1249	24	AGGAGGGAGGAGATGGGCCACGTT
bta-miR-125a	21,25,23,2 2	TCCCTGAGACCCTTTAACCTG,GCAAAGCACACGGCCTGCAGAGAGG,TCCCTGAGACCCTTTAACCTGTG,TCCCTGAGACCCTTTAACCTGT
bta-miR-125b	23,23,21,2 2	TCCCTGAGACCCTAACTTGTGAG,TCCCTGAGACCCTAACTTGTGAT,TCCCTGAGACCCTAACTTGTG,TCCCTGAGACCCTAACTTGTGA
bta-miR-126-5p	22	TCGTACCGTGAGTAATAATGCG
bta-miR-127	22	TCGGATCCGTCTGAGCTTGGCT
bta-miR-1271	21,22	CTTGGCACCTAGTAAGTACTC,CTTGGCACCTAGTAAGTACTCA
bta-miR-128	21	TCACAGTGAACCGGTCTCTTT
bta-miR-129	21	CTTTTTGCGGTCTGGGCTTGC
bta-miR-129-5p	21	CTTTTTGCGGTCTGGGCTTGC
bta-miR-1296	22	TTAGGGCCCTGGCTCCATCTCC
bta-miR-1306	21,22,21	TGGACGTTGGCTCTGGTGGTG,GACGTTGGCTCTGGTGGTGATG,GACGTTGGCTCTGGTGGTGAT
bta-miR-1307	23,24	ACTCGGCGTGGCGTTCGGTTCGTGG,ACTCGGCGTGGCGTTCGGTTCGTGGT
bta-miR-130a	20	CAGTGCAATGTTAAAAGGGC
bta-miR-130b	21,22	ACTCTTTCCTGTTGCACTAC,ACTCTTTCCTGTTGCACTACT
bta-miR-132	22,22	ACCGTGGCTTTCGATTGTTACT,TAACAGTCTACAGCCATGGTTCG
bta-miR-133a	22	TTGGTCCCCTTCAACCAGCTGT
bta-miR-133b	22	TTGGTCCCCTTCAACCAGCTAC
bta-miR-135a	23,22	TATGGCTTTTTATTTCCTATGTGA,TATGGCTTTTTATTTCCTATGTG

bta-miR-138	21	AGCTGGTGTGTGAATCAGGC
bta-miR-1388-5p	22	AGGACTGTCCAACCTGAGAATG
bta-miR-139	23	TCTACAGTGCACGTGTCTCCAGT
bta-miR-140	21,23	ACCACAGGGTAGAACCACGGA,ACCACAGGGTAGAACCACGGACA
bta-miR-141	21	TAACACTGTCTGGTAAAGATG
bta-miR-143	21	TGAGATGAAGCACTGTAGCTC
bta-miR-1434-5p	18,19	AATTTCTTCACTTTGACC,AAATTTCTTCACTTTGACC
bta-miR-144	20,21	TACAGTATAGATGATGTACT,TGGGATATCATCATATACTGT
bta-miR-145	20	GATTCCTGGAAATACTGTTC
bta-miR-1468	21	CTCCGTTTGCCTGTTTTGCTG
bta-miR-146a	22	TGAGAACTGAATCCATAGGTT
bta-miR-146b	24	TGAGAACTGAATCCATAGGCTGT
bta-miR-147	19	GTGTGCGGAAATGCTTCTG
bta-miR-148a	22	TCAGTGCACTACAGAACTTTGT
bta-miR-148b	22	TCAGTGCACTACAGAACTTTGT
bta-miR-149-5p	22	TCTGGCTCCGTGTCTTCACTCC
bta-miR-150	22	TCTCCCAACCCTTGACCAGTG
bta-miR-151-5p	21	CTAGACTGAAGCTCCTTGAGG
bta-miR-152	21,22	TCAGTGCATGACAGAACTTGG,TCAGTGCATGACAGAACTTGGG
bta-miR-154b	23	AGAGGTCTTCCATGGTGCATTCCG
bta-miR-154c	22	AGATATTGCACGGTTGATCTCT
bta-miR-155	24,23,21	TTAATGCTAATCGTGATAGGGGTT,TTAATGCTAATCGTGATAGGGGT,GAGAGATCAGAGGCGCAGAGT
bta-miR-15a	18,19	TAGCAGCACATAATGGTT,TAGCAGCACATAATGGTTT
bta-miR-15b	23,21	CGAATCATTATTTGCTGCTCTAG,CGAATCATTATTTGCTGCTCT
bta-miR-16a	22,21,24	TAGCAGCACGTAAATATTGGTG,TAGCAGCACGTAAATATTGGT,TAGCAGCACGTAAATATTGGTGTT
bta-miR-16b	22,24	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG,TAGCAGCACGTAAATATTGGCGTA

bta-miR-17-5p	23	CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG
bta-miR-181a	21,23	AACATTCAACGCTGTCGGTGA,AACATTCAACGCTGTCGGTGAGT
bta-miR-181b	20,23,21	AACATTCATTGCTGTCGGTG,AACATTCATTGCTGTCGGTGGGT,TCACTGATCAATGAATGTAAA
bta-miR-181d	21	AACATTCATTGTTGTCGGTGG
bta-miR-1839	22	AAGGTAGATAGAACAGGTCTTG
bta-miR-184	21,2	TGGACGGAGAACTGATAAGGG,TGGACGGAGAACTGATAAGG
bta-miR-1842	22	TGGCTCTGTGAGGTCCGGCTCAA
bta-miR-185	22	TGGAGAGAAAGGCAGTTCCTGA
bta-miR-186	22	CAAAGAATTCTCCTTTTGGGCT
bta-miR-187	23	TCGTGTCTTGTGTTGCAGCCGGA
bta-miR-191	22	CAACGGAATCCCAAAGCAGCT
bta-miR-192	20,21	CTGACCTATGAATTGACAGC,CTGACCTATGAATTGACAGCC
bta-miR-193a-5p	19,21	TGGGTCTTTGCGGGCGAGA,TGGGTCTTTGCGGGCGAGATG
bta-miR-193b	21	CGGGGTTTTGAGGGCGAGATG
bta-miR-194	21,19	TGTAACAGCAACTCCATGTGG,TCCTTCATTCCACCGGAGT
bta-miR-195	21,21	TAGCAGCACAGAAATATTGGC,CCAATATTGGCTGTGCTGCTC
bta-miR-196b	23	TAGGTAGTTTCCTGTTGTTGGGA
bta-miR-199a-5p	21	ACAGTAGTCTGCACATTGGTT
bta-miR-199b	21	ACAGTAGTCTGCACATTGGTT
bta-miR-19a	22,23,24	TGTGCAAATCTATGCAAAACTG,TGTGCAAATCTATGCAAAACTGA,TTGTGCAAATCTATGCAAAACTGA
bta-miR-19b	22,23	TGTGCAAATCCATGCAAAACTG,TGTGCAAATCCATGCAAAACTGA
bta-miR-200a	19,21	TAACACTGTCTGGTAACGA,TAACACTGTCTGGTAACGATG
bta-miR-200b	21,21	AATACTGCCTGGTAATGATGA,TAATACTGCCTGGTAATGATG
bta-miR-200c	21,23	TAATACTGCCGGTAATGATG,TAATACTGCCGGTAATGATGGA
bta-miR-204	22,21	TTCCCTTTGTATCCTATGCCT,GCTGGGAAGGCAAAGGGACGT
bta-miR-205	19,21	TCCTTCATTCCACCGGAGT,TCCTTCATTCCACCGGAGTCT

bta-miR-206	22,20,19	TGGAATGTAAGGAAGTGTGTGG,TGGAATGTAAGGAAGTGTGT,TGGAATGTAAGGAAGTGTG
bta-miR-20a	23	TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG
bta-miR-21-5p	23	TAGCTTATCAGACTGATGTTGAC
bta-miR-210	19	CTGTGCGTGTGACAGCGGC
bta-miR-212	21	TAACAGTCTCCAGTCACGGCC
bta-miR-214	18	ACAGCAGGCACAGACAGG
bta-miR-215	20	ATGACCTATGAATTGACAGA
bta-miR-218	21	TTGTGCTTGATCTAACCATGT
bta-miR-219	19	AGAGTTGAGTCTGGACGTC
bta-miR-219-5p	21,22	AGAATTGTGGCTGGACATCTG,AGAATTGTGGCTGGACATCTGT
bta-miR-22-5p	22	AAGCTGCCAGTTGAAGAACTGT
bta-miR-221	22	AGCTACATTGTCTGCTGGGTTT
bta-miR-222	21,25	AGCTACATCTGGCTACTGGGT,AGCTACATCTGGCTACTGGGTCTCT
bta-miR-223	22,23,22	CCGTGTATTTGACAAGCTGAGT,TGTCAGTTTGTCAAATACCCCAA,TGTCAGTTTGTCAAATACCCCA
bta-miR-224	20	CAAGTCACTAGTGGTTCCGT
bta-miR-2284ab	22	TAAAAGTTTGGTTGGGTTTTTC
bta-miR-2284f	23	TTCGGTTGGTCAGAAAGTTCGTT
bta-miR-2284w	21,22	AAAACCTCAATGAACTCTTTG,AAAACCTCAATGAACTCTTTGG
bta-miR-2284x	22	TGAAAAGTTCGTTCCGGTTTTT
bta-miR-2285aa	22	AAAACCTGGAACGAACTTTTGGG
bta-miR-2285ae	22	AAACTTGAACGGACTTTTTGGC
bta-miR-2285bc	22,21	AAAAACCTGAATGACCCTTTTTG,AAAAACCTGAATGACCCTTTTT
bta-miR-2285e	18	ACGAACTTTTTGGCCAAC
bta-miR-2285p	20	AAAACCTTGAGTGAACTTTT
bta-miR-2285q	19,22	AGGACCTGAATGAACTTTC,AAGGACCTGAATGAACTTTCTG
bta-miR-2285t	18	ATGAACTTTTTGGCCAAC

bta-miR-2310	20	TGGTTTTGTTGGGTTTGTT
bta-miR-2336	22	CTAACCGTAACTTTGAAGTGCT
bta-miR-2372	21	AGAATGATGAAAGGATTGGGT
bta-miR-2376	23,23	CCTCTGAGATCTTGCTAGGCGCT,CTCTGAGATCTTGCTAGGCGCTC
bta-miR-2398	22	ATCTAGGGACGCGTCGGCAACT
bta-miR-23a	22,18,21	ATCACATTGCCAGGGATTTCCTCA,ATCACATTGCCAGGGATT,ATCACATTGCCAGGGATTTC
bta-miR-24	22,2	TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAG,TGGCTCAGTTCAGCAGGAAC
bta-miR-24-3p	22,2	TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAG,TGGCTCAGTTCAGCAGGAAC
bta-miR-2406	18	AAAGGGAAGAAGGAAGCT
bta-miR-2415-5p	20	CCAGGCCTGCTGGACCGACG
bta-miR-2419-5p	21	ATCGCATCAACTCGTCTGT
bta-miR-2450a	22	CATGGGCAGTAGAGGTGCATGT
bta-miR-2454-5p	22	TCTCCTCTGGCCGCTCTCCTCC
bta-miR-2474	23	TACCGGGCCAGCTGGAAGGAGAC
bta-miR-2484	22	TCCTCTAAGAAGTTCTGAGCTT
bta-miR-25	22	CATTGCACTTGTCTCGGTCTGA
bta-miR-26a	22	TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT
bta-miR-26b	22	TTCAAGTAATCAGGATAGGTT
bta-miR-27a-5p	20	TTCACAGTGGCTAAGTCCG
bta-miR-27b	19	TTCACAGTGGCTAAGTTCT
bta-miR-28	24,21,22	AAGGAGCTCACAGTCTATTGAGTT,CACTAGATTGAGAGCTCCTGG,CACTAGATTGAGAGCTCCTGGA
bta-miR-2881	20	GGCGGGTGGGCAGGCAGGCC
bta-miR-296-5p	20,21	AGGGTTGGGCGGAGGCTTTC,AGGGTTGGGCGGAGGCTTTC
bta-miR-29a	21,22	TAGCACCATCTGAAATCGGTT,CTAGCACCATCTGAAATCGGTT
bta-miR-29b	22,18	CTAGCACCATTTGAAATCAGTG,TAGCACCATTTGAAATCA
bta-miR-301a	22	GCTCTGACTTTATTGCACTACT

bta-miR-301b	23	CAGTGCAATGATATTGTCAAAGC
bta-miR-30a-5p	24	TGTAAACATCCTCGACTGGAAGCT
bta-miR-30b-5p	22,24	TGTAAACATCCTACACTCAGCT,TGTAAACATCCTACACTCAGCTGT
bta-miR-30d	24	TGTAAACATCCCCGACTGGAAGCT
bta-miR-30e-5p	24	TGTAAACATCCTTGACTGGAAGCT
bta-miR-30f	24,23	TGTAAACACCCTACACTCTCAGCT,TGTAAACACCCTACACTCTCAGC
bta-miR-32	21,22	TATTGCACATGACTAAGTTGC,TATTGCACATGACTAAGTTGCA
bta-miR-320a	21,22	AAAAGCTGGGTTGAGAGGGCG,AAAAGCTGGGTTGAGAGGGCGA
bta-miR-326	21	CCTCTGGGCCCTTCCTCCAGC
bta-miR-328	23,22	CTGGCCCTCTCTGCCCTTCCGTC,CTGGCCCTCTCTGCCCTTCCGT
bta-miR-329b	21,21	AACACACCTGGTTAACCTCTT,ACACACCTGGTTAACCTCTTT
bta-miR-330	25	GCAAAGCACACGGCCTGCAGAGAGG
bta-miR-331-5p	23,22	CTAGGTATGGTCCCAGGGATCCC,GCCCCTGGGCCTATCCTAGAAC
bta-miR-335	22	TTTTTCATTATTGCTCCTGACC
bta-miR-338	21,21	TCCAGCATCAGTGATTTTGTT,AACAATATCCTGGTGCTGAGT
bta-miR-340	22,22	TTATAAAGCAATGAGACTGATT,TCCGTCTCAGTTACTTTATAGC
bta-miR-342	24,25	TCTCACACAGAAATCGCACCCATC,TCTCACACAGAAATCGCACCCATCT
bta-miR-3431	21,22,22	ATCTAGAGGACTGACTGAAAT,CCTCAGTCAGCCTTGTTGATGT,CATCTAGAGGACTGACTGAAAT
bta-miR-3432a	21	TGCGGGATCTTTAGTTGTGGT
bta-miR-345-5p	21,22	CCTGAACTAGGGGTCTGGAGG,CCCTGAACTAGGGGTCTGGAGG
bta-miR-34a	23	TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGTT
bta-miR-34b	24	CAATCACTAGTTCCACTGCCATCA
bta-miR-34c	23	AGGCAGTGTAGTTAGCTGATTGC
bta-miR-361	20,25,19	TTATCAGAATCTCCAGGGGT,TCCCCCAGGTGTGATTCTGATTTGC,TTATCAGAATCTCCAGGGG
bta-miR-363	21	AATTGCACGGTATCCATCTGC
bta-miR-365-5p	24	AGGGACTTTTGGGGGCAGATGTGT

bta-miR-370	22	GCCTGCTGGGGTGGAACCTGGT
bta-miR-374a	22,22,21	CTTATCAGGTTGTATTGTAATT,TTATAATACAACCTGATAAGTG,TTATAATACAACCTGATAAGT
bta-miR-374b	20,22	ATATAATACAACCTGCTAAG,ATATAATACAACCTGCTAAGTG
bta-miR-375	21,22	TTTGTTTCGTTCCGGCTCGCGTG,TTTGTTTCGTTCCGGCTCGCGTGA
bta-miR-378	22	ACTGGACTTGGAGTCAGAAGGC
bta-miR-379	21,2	TATGTAACATGGTCCACTAAC,TGGTAGACTATGGAACGTAG
bta-miR-381	22	TATACAAGGGCAAGCTCTCTGT
bta-miR-382	20,22	GAAGTTGTTTCGTGGTGGATT,GAAGTTGTTTCGTGGTGGATTCCG
bta-miR-383	23	CAGATCAGAAGGTGATTGTGGCT
bta-miR-409a	21,22,21	AATGTTGCTCGGTGAACCCCT,GAATGTTGCTCGGTGAACCCCT,GAATGTTGCTCGGTGAACCCCT
bta-miR-410	21	AATATAACACAGATGGCCTGT
bta-miR-411a	20,22	ATAGTAGACCGTATAGCGTA,ATAGTAGACCGTATAGCGTACG
bta-miR-411c-5p	22,2	GGTTGATCAGAGAACATACATT,GGTTGATCAGAGAACATACA
bta-miR-412	20	TGGTCGACCAGTTGGAAAGT
bta-miR-421	23	ATCAACAGACATTAATTGGGCGC
bta-miR-423-5p	23	TGAGGGGCAGAGAGCGAGACTTT
bta-miR-425-5p	25	AATGACACGATCACTCCCGTTGAGT
bta-miR-429	21	TAATACTGTCTGGTAATGCCG
bta-miR-432	20,21	TCTTGGAGTAGGTCATTGGG,TCTTGGAGTAGGTCATTGGGT
bta-miR-449d	18	AGGCTGTGTGCTGTGGAG
bta-miR-450b	21	TTTTGCAATATGTTCTGAAT
bta-miR-455-5p	21,23	TGTGCCTTTGGACTACATCGT,TATGTGCCTTTGGACTACATCGT
bta-miR-485	20,22	GTCATACACGGCTCTCCTCT,GTCATACACGGCTCTCCTCTCT
bta-miR-486	23	TCCTGTAAGTACTGAGCTGCCCCGAGG
bta-miR-487a	21	GTGGTTATCCCTGCTGTGTTT
bta-miR-487b	21,22	AATCGTACAGGGTCATCCACT,AATCGTACAGGGTCATCCACTT

bta-miR-493	22	TTGTACATGGTAGGCTTTCATT
bta-miR-494	23	TGAAACATACACGGGAAACCTCT
bta-miR-495	22,21	AAACAAACATGGTGCACCTTCTT,AAACAAACATGGTGCACCTTCT
bta-miR-497	19,22	CAGCAGCACACTGTGGTTT,CAGCAGCACACTGTGGTTTGTA
bta-miR-499	20,21	TTAAGACTTGCAGTGATGTT,TTAAGACTTGCAGTGATGTTT
bta-miR-500	19	ATGCACCTGGGCAAGGATT
bta-miR-502a	19	ATGCACCTGGGCAAGGATT
bta-miR-505	23,22	GGGAGCCAGGAAGTATTGATGTT,TCAACACTTGCTGGTTTCCTCT
bta-miR-532	22	CATGCCCTTGAGTGTAGGACCGT
bta-miR-543	22,21	AAACATTTCGCGGTGCACCTTCTT,AAACATTTCGCGGTGCACCTTCT
bta-miR-574	25	TGAGTGTGTGTGTGTGAGTGTGTGT
bta-miR-6119-5p	23	AGAGGTAAAAAATTGATTTGACT
bta-miR-6120-5p	22	TATGTTGGACAACGTGGATAGC
bta-miR-6123	19	TGCCAAGCCCACGTTCAAA
bta-miR-615	19	TCCGAGCCTGGGTCTCCCT
bta-miR-628	22,24	TCTAGTAAGAGTGGCAGTCGAA,ATGCTGACATATTTACTAGAGGGT
bta-miR-6517	23,23	TCTCAGGGTCCGTGAGCTCCTCG,TCAGGGTCCGTGAGCTCCTCGGC
bta-miR-652	21,22	AATGGCGCCACTAGGGTTGTG,AATGGCGCCACTAGGGTTGTGC
bta-miR-6520	21,25	TGAGTATTGTCAGAGAGAGCG,TTGAGTATTGTCAGAGAGAGCGATT
bta-miR-6523a	20,23	TCTGGGGTAACTTTGAGCAG,TCTGGGGTAACTTTGAGCAGGGG
bta-miR-6524	21	TTACTCTGAGTAACCTAACTG
bta-miR-6529a	21	GAGAGATCAGAGGCGCAGAGT
bta-miR-660	22	TACCCATTGCATATCGGAGCTG
bta-miR-664b	23,21	ACAGGCTAGGAGAAATGATTGGA,TTCAATTATCTCCCAGCCTAC
bta-miR-671	21	TCCGTTTCTCAGGGCTCCACC
bta-miR-7	24	TGGAAGACTAGTGATTTTGTGTT

bta-miR-760-5p	22,23	CGGCTCTGGGTCTGTGGGGAGC,TCGGCTCTGGGTCTGTGGGGAGC
bta-miR-769	22,21	TGAGACCTCCGGGTTCTGAGCT,TGAGACCTCCGGGTTCTGAGC
bta-miR-7857-5p	21	ATTGTTCTCCAACCTGGCTCT
bta-miR-7859	23	AAAAACTGGCAGCTTCATGTAAT
bta-miR-7860	21,22	TGGAGCGGCTGCACAGAGCGT,TGGAGCGGCTGCACAGAGCGTG
bta-miR-7861	23	CACACTCAGATAAAGTAGGCACT
bta-miR-874	24	CTGCCCTGGCCCGAGGGACCGACT
bta-miR-9-5p	22,23	TCTTTGGTTATCTAGCTGTATG,TCTTTGGTTATCTAGCTGTATGA
bta-miR-92a	22	TATTGCACTTGTCCCGCCTGT
bta-miR-92b	21,23	TATTGCACTCGTCCCGCCTC,TATTGCACTCGTCCCGCCTCCG
bta-miR-93	23	CAAAGTGCTGTTTCGTGCAGGTAG
bta-miR-95	22	TTCAACGGGTATTTATTGAGCA
bta-miR-98	22	TGAGGTAGTAAGTTGTATTGTT
bta-miR-99a-5p	21	AACCCGTAGATCCGATCTTGT
bta-miR-99b	22	CACCCGTAGAACCGACCTTGCG

**Tablo 2.** Akut sığır gruplarında tespit edilen bilinen miRNA'lar, mature dizilimleri ve uzunlukları

mirna	length	mature
bta-let-7a-5p	22	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT
bta-let-7c	18	TGAGGTAGTAGGTTGTAT
bta-let-7d	22	AGAGGTAGTAGGTTGCATAGTT
bta-let-7e	22,22	CTGAGGTAGGAGGTTGTATAGT,TGAGGTAGGAGGTTGTATAGTT
bta-let-7f	22	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT
bta-let-7g	22	TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT
bta-let-7i	22	TGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTT
bta-miR-1	22,2	TGGAATGTAAAGAAGTATGTAT,TGGAATGTAAAGAAGTATGT
bta-miR-100	22,21	AACCCGTAGATCCGAACCTTGTG,AACCCGTAGATCCGAACCTTGT
bta-miR-101	22,20,21,23, 23	TACAGTACTGTGATAACTGAAG,TACAGTACTGTGATAACTGA,GTACAGTACTGTGATAACTGA,TACAGTACTGTGATAACTGAAGG,TACAGTACTGTGATAACTGAAGA
bta-miR-10162-5p	22	TGGACAGGCCAAGCCGCTGTGC
bta-miR-10164-3p	18	AACTGTTAGGAGGCTTGG
bta-miR-10167-3p	18	CGGGTGGTCGGGGCGGGT
bta-miR-10172-5p	20	TCACTGGGCATCCTCTGCTT
bta-miR-10174-5p	24	ATCACATTGCCAGGGATTACCACG
bta-miR-10175-5p	20	TGGAGAGAACAGGTGGCTTT
bta-miR-10179-5p	21	TGCAGGGTGGTAGGCTGTGGG
bta-miR-10225a	18,21,20,19	GAGCCTGACAGATCACAC, CCGAGCCTGACAGATCACACA, CCGAGCCTGACAGATCACAC, CCGAGCCTGACAGATCACACA
bta-miR-103	23	AGCAGCATTGTACAGGGCTATGA

bta-miR-106a	23	AAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG
bta-miR-106b	22	CCGCACTGTGGGTACTTGCTGC
bta-miR-107	18	AGCAGCATTGTACAGGGC
bta-miR-10a	22	TACCCTGTAGATCCGAATTTGT
bta-miR-10b	22	TACCCTGTAGAACCGAATTTGT
bta-miR-1185	22	AGAGGATACCCTTTGTATGTTC
bta-miR-1197	21	TAGGACACATGGTCTACTTCT
bta-miR-11971	20	TGAGGGGCAGAGAGTGAGAA
bta-miR-11977	20	TGTCTCAGTTCAGCAGGAAG
bta-miR-11979	23	TGCACCACCCGTGGTCACTCCTG
bta-miR-11984	23	ACACGCGTCCTTGGATCCTGACT
bta-miR-11993	22	TGAGTGTGCATCCACGGGGACC
bta-miR-11994	21	TCCAAAACGGGACCTTTCTGG
bta-miR-11999	22	TCAGACCCATATTCTCATAGGC
bta-miR-12004	18	TGGCTCTGGCTCTCTGCC
bta-miR-12028	20	TGTCTGGGACCCCGATTCTC
bta-miR-12034	18,18	CCCGGGGAGCCCGGCGGT,CCCGGGGAGCCCGGCGG
bta-miR-12042	24	TGTGTCTTTCTTCTGTGTGTGCT
bta-miR-12057	22	ACTGGGAGTGAAGGAGAGCCC
bta-miR-122	21	TGGAGTGTGACAATGGTGTTT

bta-miR-1246	20	AATGGATTTTTGGAGCAGGG
bta-miR-1247-3p	22	CCGGGAACGTCGGGACTGGAGC
bta-miR-1247-5p	22	CCGGGAACGTCGGGACTGGAGC
bta-miR-124a	20	TAAGGCACGCGGTGAATGCC
bta-miR-124b	20	TAAGGCACGCGGTGAATGCC
bta-miR-125a	22,23	TCCCTGAGACCCTTTAACCTGT,TCCCTGAGACCCTTTAACCTGTG
bta-miR-125b	21,22	TCCCTGAGACCCTAACTTGTG,TCCCTGAGACCCTAACTTGTGA
bta-miR-126-5p	22	TCGTACCGTGAGTAATAATGCG
bta-miR-1260b	18	ATCCCACCACTGCCACCA
bta-miR-127	22,18	TCGGATCCGTCTGAGCTTGGCT,TCGGATCCGTCTGAGCTT
bta-miR-1271	22	CTTGGCACCTAGTAAGTACTCA
bta-miR-128	21	TCACAGTGAACCGGTCTCTTT
bta-miR-129	21	CTTTTTGCGGTCTGGGCTTGC
bta-miR-129-5p	22,21	AAGCCCTTACCCCAAAAAGCAT,CTTTTTGCGGTCTGGGCTTGC
bta-miR-1296	22	TTAGGGCCCTGGCTCCATCTCC
bta-miR-1306	21,2	GACGTTGGCTCTGGTGGTGAT,GACGTTGGCTCTGGTGGTGA
bta-miR-1307	23	ACTCGGCGTGGCGTCGGTCGTGG
bta-miR-130a	20	CAGTGCAATGTTAAAAGGGC
bta-miR-130b	21	ACTCTTCCCTGTTGCACTAC
bta-miR-132	22	TAACAGTCTACAGCCATGGTGC

bta-miR-133a	22	TTGGTCCCCTTCAACCAGCTGT
bta-miR-133b	20	TTGGTCCCCTTCAACCAGCT
bta-miR-135a	23	TATGGCTTTTTATTCCCTATGTGA
bta-miR-136	21,22	ATCATCGTCTCAAATGAGTCT,ACTCCATTTGTTTTGATGATGG
bta-miR-137	23	TTATTGCTTAAGAATACGCGTAG
bta-miR-138	24,23,21	AGCTGGTGTTGTGAATCAGGCCGT,AGCTGGTGTTGTGAATCAGGCCG,AGCTGGTGTTGTGAATCAGGC
bta-miR-1388-5p	22,21	AGGACTGTCCAACCTGAGAATG,AGGACTGTCCAACCTGAGAAT
bta-miR-139	23	TCTACAGTGCACGTGTCTCCAGT
bta-miR-140	22	TACCACAGGGTAGAACCACGGA
bta-miR-141	21	TAACACTGTCTGGTAAAGATG
bta-miR-143	22,21	TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAG,TGAGATGAAGCACTGTAGCTC
bta-miR-1434-5p	18,19,18	AAATTTCTTCACTTTGACC,AAATTTCTTCACTTTGACC,AAATTTCTTCACTTTGAC
bta-miR-144	20,23	TACAGTATAGATGATGTACT,GGATATCATCATATACTGTAAGT
bta-miR-145	20,19,23	GATTCTGGAAATACTGTTC,ATTCCTGGAAATACTGTTC,GTCCAGTTTTCCAGGAATCCCT
bta-miR-1468	22	CTCCGTTTGCCTGTTTTGCTGA
bta-miR-146a	21,22	TGAGAACTGAATTCCATAGGT,TGAGAACTGAATTCCATAGGTT
bta-miR-146b	23,22	TGAGAACTGAATTCCATAGGCTG,TGAGAACTGAATTCCATAGGCT
bta-miR-147	18,19	GTGTGCGGAAATGCTTCT,GTGTGCGGAAATGCTTCTG
bta-miR-148a	22	TCAGTGCACTACAGAACTTTGT
bta-miR-148b	22	TCAGTGCACTACAGAACTTTGT
bta-miR-149-5p	22	TCTGGCTCCGTGTCTTCACTCC
bta-miR-150	22	TCTCCCAACCCTTGTACCAGTG

bta-miR-151-5p	21	CTAGACTGAAGCTCCTTGAGG
bta-miR-152	21,18	TCAGTGCATGACAGAACTTGG,TCAGTGCATGACAGAACT
bta-miR-153	22	TTGCATAGTCACAAAAGTGATC
bta-miR-154b	21	AGAGGTCTTCCATGGTGCATT
bta-miR-154c	22	AGATATTGCACGGTTGATCTCT
bta-miR-155	23	TTAATGCTAATCGTGATAGGGGT
bta-miR-15a	18,21	TAGCAGCACATAATGGTT,TAGCAGCACATAATGGTTTGT
bta-miR-16a	22,21	TAGCAGCACGTAAATATTGGTG,TAGCAGCACGTAAATATTGGT
bta-miR-16b	23	TAGCAGCACGTAAATATTGGCGT
bta-miR-17-5p	23	CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG
bta-miR-181a	21,23	AACATTCAACGCTGTCGGTGA,AACATTCAACGCTGTCGGTGAGT
bta-miR-181b	22,20,23	CTCACTGATCAATGAATGTA, AACATTCACTGCTGTCGGTG, AACATTCATTGCTGTCGGTGGGT
bta-miR-181c	22	ACCATCGACCGTTGAGTGGACC
bta-miR-181d	24	AACATTCATTGTTGTCGGTGGGTT
bta-miR-183	21	ATGGCACTGGTAGAATCACT
bta-miR-1839	20	AAGGTAGATAGAACAGGTCT
bta-miR-184	20,21	TGGACGGAGAACTGATAAGG,TGGACGGAGAACTGATAAGGG
bta-miR-1842	20	TTGGCTCTGTGAGGTCGGCT
bta-miR-185	21,22	TGGAGAGAAAGGCAGTTCCTG,TGGAGAGAAAGGCAGTTCCTGA
bta-miR-186	22	CAAAGAATTCTCCTTTTGGGCT
bta-miR-187	21	TCGTGTCTTGTGTTGCAGCCG
bta-miR-188	21	CATCCCTTGCATGGTGGAGGG

bta-miR-190a	24	TGATATGTTTGTATATATTAGGTTG
bta-miR-191	23,22	CAACGGAATCCCAAAAGCAGCTG,CAACGGAATCCCAAAAGCAGCT
bta-miR-192	20	CTGACCTATGAATTGACAGC
bta-miR-193a-5p	19,21	TGGGTCTTTGCGGGCGAGA,TGGGTCTTTGCGGGCGAGATG
bta-miR-193b	22	AACTGGCCACAAAAGTCCCGCT
bta-miR-194	21	TGTAACAGCAACTCCATGTGG
bta-miR-195	22,22,21	CCAATATTGGCTGTGCTGCTCC,TAGCAGCACAGAAATATTGGCA,TAGCAGCACAGAAATATTGGC
bta-miR-197	22	TTCACCACCTTCTCCACCCAGC
bta-miR-199a-5p	21,22	ACAGTAGTCTGCACATTGGTT,TGAGAACTGAATTCCATAGGTT
bta-miR-199b	21	ACAGTAGTCTGCACATTGGTT
bta-miR-19a	23	TGTGCAAATCTATGCAAAACTGA
bta-miR-19b	23,22	TGTGCAAATCCATGCAAAACTGA,TGTGCAAATCCATGCAAAACTG
bta-miR-200a	21	TAACACTGTCTGGTAACGATG
bta-miR-200b	21	TAATACTGCCTGGTAATGATG
bta-miR-200c	21,23	TAATACTGCCGGTAATGATG,TAATACTGCCGGTAATGATGGA
bta-miR-204	22	TTCCCTTTGTCATCCTATGCCT
bta-miR-205	22,19,23	TCCTTCATTCCACCGGAGTCTG,TCCTTCATTCCACCGGAGT,TCCTTCATTCCACCGGAGTCTGT
bta-miR-206	20,22	TGGAATGTAAGGAAGTGTGT,TGGAATGTAAGGAAGTGTGTGG
bta-miR-208b	18	ATAAGACGAACAAAAGGT
bta-miR-20a	23	TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG
bta-miR-20b	23	CAAAGTGCTCACAGTGCAGGTAG
bta-miR-21-5p	23,21	TAGCTTATCAGACTGATGTTGAC,TAGCTTATCAGACTGATGTTG

bta-miR-210	23,2	CTGTGCGTGTGACAGCGGCTGAT,CTGTGCGTGTGACAGCGGCT
bta-miR-212	23	TAAACAGTCTCCAGTCACGGCCAC
bta-miR-214	20,20,18	TACAGCAGGCACAGACAGGC,TGCCTGTCTACACTTGCTGT,ACAGCAGGCACAGACAGG
bta-miR-215	20	ATGACCTATGAATTGACAGA
bta-miR-218	21	TTGTGCTTGATCTAACCATGT
bta-miR-219	22	AGAGTTGAGTCTGGACGTCCCG
bta-miR-219-5p	22	AGAATTGTGGCTGGACATCTGT
bta-miR-22-5p	22,19	AAGCTGCCAGTTGAAGAACTGT,AAGCTGCCAGTTGAAGAAC
bta-miR-221	22	AGCTACATTGTCTGCTGGGTTT
bta-miR-222	25,24,21	AGCTACATCTGGCTACTGGGTCTCT,AGCTACATCTGGCTACTGGGTCTC,AGCTACATCTGGCTACTGGGT
bta-miR-223	22,21,23	TGTCAGTTTGTCAAATACCCCA,CGTGTATTTGACAAGCTGAGT,TGTCAGTTTGTCAAATACCCCA
bta-miR-224	21	CAAGTCACTAGTGGTTCCGTT
bta-miR-2284ab	21,2	TAAAAGTTTGGTTGGGTTTTT,TAAAAGTTTGGTTGGGTTTT
bta-miR-2284w	21	AAAACCTCAATGAACTCTTTG
bta-miR-2284x	22,21	TGAAAAGTTCGTTCCGGTTTTT,GAAAAGTTCGTTCCGGTTTTT
bta-miR-2285aa	22,23	AAAACCTGGAACGAACTTTTGGG,AAAACCTGGAACGAACTTTTGGGC
bta-miR-2285ac	22	CAGAAAGTTTGTTTGGGTTTTT
bta-miR-2285b	19,22	AAATCTGAGTGAACTTTTT,AAAATCTGAGTGAACTTTTTGG
bta-miR-2285bc	21,22	AAAAACCTGAATGACCCTTTTT,AAAAACCTGAATGACCCTTTTTG
bta-miR-2285bd	22	AAAACCTGATGAACTTTTTGA
bta-miR-2285by	22	AAAAGTTTGGTTGGGTTTTTCT
bta-miR-	23	GAAAACCGAAACGAACTTTATGG

2285h		
bta-miR-2285p	22,22	AATTGTTTCATTTGGGTTTTTCC,AAAACTTGAGTGAACTTTTGG
bta-miR-2285q	22	AAGGACCTGAATGAACCTTCTG
bta-miR-2285t	19	AGAATCTGGATGAACCTTT
bta-miR-2299-3p	22	GTCCGGGGAATGGATCCAGCGT
bta-miR-2299-5p	22	GTCCGGGGAATGGATCCAGCGT
bta-miR-2310	19	GGTTTTGTTTGGGTTTGT
bta-miR-2319a	20	CTCTGTATTAGGCACTTAGC
bta-miR-2319b	20	CTCTGTATTAGGCACTTAGC
bta-miR-2329-5p	18	CTGATCTGTGATGTGAGC
bta-miR-2336	22	CTAACCGTAACTTTGAAGTGCT
bta-miR-2350	18	AGGCTGGGCAGAGGGGCA
bta-miR-2372	21	AGAATGATGAAAGGATTGGGT
bta-miR-2376	24	CCTCTGAGATCTTGCTAGGCGCTC
bta-miR-2387	21	TGGAAGGCCTGGCTTTGCAGC
bta-miR-23a	22,19,18	ATCACATTGCCAGGGATTTCCA,ATCACATTGCCAGGGATTT,ATCACATTGCCAGGGATT
bta-miR-24	22,2	TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAG,TGGCTCAGTTCAGCAGGAAC
bta-miR-24-3p	22,2	TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAG,TGGCTCAGTTCAGCAGGAAC
bta-miR-2402	20	AGAAAGGCAGAGAGGCAGGC
bta-miR-	19	TGGAGTGA CTGTCAGATGC

2411-5p		
bta-miR-2415-5p	20,23	CCAGGCCTGCTGGACCGACG,CCAGGCCTGCTGGACCGACGCC
bta-miR-2419-5p	22	ATCGCATCAACACTCGTCTGTT
bta-miR-2425-5p	23	ACCAGGGCACGGATCCATGAACT
bta-miR-2427	25	AGCCCTTAACGCTGTGACCAAAGAC
bta-miR-2431-5p	20,21	AGGTCATATAAGTGTGGAGT,CAGGTCATATAAGTGTGGAGT
bta-miR-2448-3p	22	GTGGTTGATTGGATCCGTGGGT
bta-miR-2448-5p	22,19	GTGGTTGATTGGATCCGTGGGT,CCCTCTGTGGTTTCTGCAC
bta-miR-2453	24	TCCTCAGGGCAGGAAGTGCGCAGA
bta-miR-2457	22	TTGCCAACTGCAGAGCCGCGCT
bta-miR-2483-5p	23	AAACATCTGGTTGGTTGAGAGAA
bta-miR-2484	22,21	TCCTCTAAGAAGTTCTGAGCTT,CCTCTAAGAAGTTCTGAGCTT
bta-miR-25	22	CATTGCACTTGTCTCGGTCTGA
bta-miR-26a	22	TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT
bta-miR-26b	22	TTCAAGTAATTCAGGATAGGTT
bta-miR-27a-5p	20	TTCACAGTGGCTAAGTTCCG
bta-miR-27b	19	TTCACAGTGGCTAAGTTCT
bta-miR-28	22,21,21,23	CACTAGATTGAGAGCTCCTGGA,TCCCTGAGACCCTAACTTGTG,CACTAGATTGAGAGCTCCTGG,AAGGAGCTCACAGTCTATTGAGT
bta-miR-296-5p	18	AGGGTTGGGCGGAGGCTT
bta-miR-299	22	TATGTGGGACGGTAAACCGCTT
bta-miR-29a	19,23,21	TAGCACCATCTGAAATCGG,TCAAGAGCAATAACGAAAAATGT,TAGCACCATCTGAAATCGGTT

bta-miR-29b	23,22,19	TAGCACCATTGAAATCAGTGTT,CTAGCACCATTGAAATCAGTG,TAGCACCATTGAAATCAG
bta-miR-29d-5p	24,20,19	TGACCGATTTCTCCTGGTGTTCAG,TAGCACCATTGAAATCGGT,TAGCACCATTGAAATCGA
bta-miR-301b	23	CAGTGCAATGATATTGTCAAAGC
bta-miR-30a-5p	20,22,24	TGTAAACATCCTCGACTGGA,TGTAAACATCCTCGACTGGAAG,TGTAAACATCCTCGACTGGAAGCT
bta-miR-30b-5p	22	TGTAAACATCCTACACTCAGCT
bta-miR-30d	24,22	TGTAAACATCCCCGACTGGAAGCT,TGTAAACATCCCCGACTGGAAG
bta-miR-30e-5p	24	TGTAAACATCCTGACTGGAAGCT
bta-miR-30f	20	TGTAAACACCCTACACTCTC
bta-miR-31	23	AGGCAAGATGCTGGCATAGCTGT
bta-miR-32	22,21	TATTGCACATGACTAAGTTGCA,TATTGCACATGACTAAGTTGC
bta-miR-320a	20,22	AAAAGCTGGGTTGAGAGGGC,AAAAGCTGGGTTGAGAGGGCGA
bta-miR-323	21,22	CACATTACACGGTCGACCTCT,GCACATTACACGGTCGACCTCT
bta-miR-324	23	CGCATCCCCTAGGGCATTGGTGT
bta-miR-326	21	CCTCTGGGCCCTTCCTCCAGC
bta-miR-328	22	CTGGCCCTCTCTGCCCTTCCGT
bta-miR-329b	22	AACACACCTGGTTAACCTCTTT
bta-miR-330	25,23	GCAAAGCACACGGCCTGCAGAGAGG,GCAAAGCACACGGCCTGCAGAGA
bta-miR-331-5p	21,22	CTAGGTATGGTCCCAGGGATC,TCTAGGTATGGTCCCAGGGATC
bta-miR-335	22	TTTTTCATTATTGCTCCTGACC
bta-miR-338	21,21	AACAATATCCTGGTGCTGAGT,TCCAGCATCAGTGATTTTGT
bta-miR-339b	21	TCCCTGTCTCCAGGAGCTCA
bta-miR-33a	20	GTGCATTGTAGTTGCATTGC

bta-miR-340	22,20,22	TCCGTCTCAGTTACTTTATAGC,TTATAAAGCAATGAGACTGA,TTATAAAGCAATGAGACTGATT
bta-miR-342	23,24	TCTCACACAGAAATCGCACCCAT,TCTCACACAGAAATCGCACCCATC
bta-miR-3431	20,22	CTCAGTCAGCCTTGTGGATG,CCTCAGTCAGCCTTGTGGATGT
bta-miR-3432a	22,23	TGCGGGATCTTTAGTTGTGGTG,TGCGGGATCTTTAGTTGTGGTGT
bta-miR-345-5p	21	CCTGAACTAGGGGTCTGGAGG
bta-miR-34a	19	TGGCAGTGTCTTAGCTGGT
bta-miR-34c	22,23	AGGCAGTGTAGTTAGCTGATTG,AGGCAGTGTAGTTAGCTGATTGC
bta-miR-3533	19	AGTGTGACGTGGACATCCG
bta-miR-361	19	TTATCAGAATCTCCAGGGG
bta-miR-362-5p	24	AATCCTTGGAACCTAGGTGTGAGT
bta-miR-363	20	AATTGCACGGTATCCATCTG
bta-miR-365-3p	19	TAATGCCCTAAAAATCCT
bta-miR-369-5p	21	AATAATACATGGTTGATCTTT
bta-miR-370	19,22	GCCTGCTGGGGTGGAACT,GCCTGCTGGGGTGGAACTGGT
bta-miR-374a	21,22	TTATAATACAACCTGATAAGT,TTATAATACAACCTGATAAGTG
bta-miR-374b	22,18,21	ATATAATACAACCTGCTAAGTG,ATATAATACAACCTGCTA,ATATAATACAACCTGCTAAGT
bta-miR-375	19	TTTGTTTCGTTCCGGCTCGCG
bta-miR-376a	21	GTAGATTCTCCTTCTATGAGT
bta-miR-377	22	ATCACACAAAGGCAACTTTTGT
bta-miR-378	22	ACTGGACTTGGAGTCAGAAGGC
bta-miR-379	21	TGGTAGACTATGGAACGTAGG
bta-miR-380-5p	21	TATGTAATGTGGTCCACGTCT

bta-miR-381	22	TATACAAGGGCAAGCTCTCTGT
bta-miR-382	22	GAAGTTGTTCGTGGTGGATTCG
bta-miR-3957	20	CTCGGAGAGTGCAGCTGTGG
bta-miR-409a	22,21	GAATGTTGCTCGGTGAACCCCT,AATGTTGCTCGGTGAACCCCT
bta-miR-410	21	AATATAACACAGATGGCCTGT
bta-miR-411a	22,23	ATAGTAGACCGTATAGCGTACG,ATAGTAGACCGTATAGCGTACGC
bta-miR-411c-5p	22	GGTTGATCAGAGAACATACATT
bta-miR-421	20	ATCAACAGACATTAATTGGG
bta-miR-423-5p	23,21	TGAGGGGCAGAGAGCGAGACTTT,TGAGGGGCAGAGAGCGAGACT
bta-miR-424-5p	20	CAGCAGCAATTCATGTTTTG
bta-miR-425-5p	25	AATGACACGATCACTCCCGTTGAGT
bta-miR-429	21	TAATACTGTCTGGTAATGCCG
bta-miR-432	23,21,22	TCTTGAGTAGGTCATGGGTGG,TCTTGAGTAGGTCATTGGGT,TCTTGAGTAGGTCATTGGGTG
bta-miR-449d	18	AGGCTGTGTGCTGTGGAG
bta-miR-450a	20,19,21	TTTTGCGATGTGTTCCCTAAT,TTTGCGATGTGTTCCCTAAT,TTTTGCGATGTGTTCCCTAATA
bta-miR-455-5p	23,21	TATGTGCCTTTGGACTACATCGT,TGTGCCTTTGGACTACATCGT
bta-miR-485	21	AGAGGCTGGCCGTGATGAATT
bta-miR-486	23	TCCTGTACTGAGCTGCCCCGAGG
bta-miR-487a	22	AATCATACAGGGACATCCAGTT
bta-miR-487b	22	AATCGTACAGGGTCATCCACTT
bta-miR-488	23	CCCAGATAATGGCACTCTCAAAC

bta-miR-490	23	CAACCTGGAGGACTCCATGCTGT
bta-miR-493	22,22	TTGTACATGGTAGGCTTTCATT,TGAAGGTCTACTGTGTGCCAGG
bta-miR-494	23	TGAAACATACACGGGAAACCTCT
bta-miR-495	22,21	AAACAAACATGGTGCACCTTCT,AAACAAACATGGTGCACCTTCT
bta-miR-499	21	TTAAGACTTGCAGTGATGTTT
bta-miR-500	20,22	ATGCACCTGGGCAAGGATTC,AATGCACCTGGGCAAGGATTCT
bta-miR-502a	20,2	ATGCACCTGGGCAAGGATTC,AATGCACCTGGGCAAGGATT
bta-miR-504	21	AGACCCTGGTCTGCACCTCTGT
bta-miR-505	20,22,23,23	TCAACACTTGCTGGTTTCCT,TCAACACTTGCTGGTTTCCTCT,GGGAGCCAGGAAGTATTGATGTT,GTCAACACTTGCTGGTTTCCTCT
bta-miR-532	22	CATGCCTTGAGTGTAGGACCGT
bta-miR-539	23	GGAGAAATTATCCTTGGTGTGTT
bta-miR-541	18	AAAGGATTCTGCTGTCGG
bta-miR-542-5p	19	TTGTGACAGATTGATAACT
bta-miR-543	20,22	AAACATTCGCGGTGCACCTTC,AAACATTCGCGGTGCACCTTCTT
bta-miR-574	22	CACGCTCATGCACACCCACA
bta-miR-582	20,23	TTACAGTTGTTCAACCAGTT,TTACAGTTGTTCAACCAGTTACT
bta-miR-592	22	TTGTGTCAATATGCGATGATGT
bta-miR-6119-5p	23	AGAGGTAAAAAATTGATTTGACT
bta-miR-6120-5p	22	TATGTTGGACAACGTGGATAGC
bta-miR-6123	20	TGCCAAGCCCACGTTCAAAG
bta-miR-615	20	TCCGAGCCTGGGTCTCCCTC
bta-miR-628	23	TTCTAGTAAGAGTGGCAGTCGAA
bta-miR-6517	23	TCTCAGGGTCCGTGAGCTCCTCG

bta-miR-652	21,22	AATGGCGCCACTAGGGTTGTG,AATGGCGCCACTAGGGTTGTGC
bta-miR-6523a	22,21	TCTGGGGTAACTTTGAGCAGGG,TCTGGGGTAACTTTGAGCAGG
bta-miR-6524	21	TTACTCTGAGTAACCTAACTG
bta-miR-6525	21	CTGGGGAAAGCAGGAGTGAGG
bta-miR-6529a	21,22	GAGAGATCAGAGGCGCAGAGT,TGAAAAGTTCGTTCCGGGTTTTT
bta-miR-654	21	TATGTCTGCTGACCATCACCT
bta-miR-655	22	ATAATACATGGTTAACCTCTCT
bta-miR-660	23,22	TACCCATTGCATATCGGAGCTGT,TACCCATTGCATATCGGAGCTG
bta-miR-664b	19,22	ACAGGCTAGGAGAAATGAT,CAGGCTAGGAGAAATGATTGGA
bta-miR-7	24	TGGAAGACTAGTGATTTTGTGTT
bta-miR-7180	20	TGTGGCCTCTGGGTGTGTAC
bta-miR-758	22	TTTGTGACCTGGTCCACTAACC
bta-miR-760-5p	18,22	CGGCTCTGGGTCTGTGGG,CGGCTCTGGGTCTGTGGGGAGC
bta-miR-769	21,22	TGAGACCTCCGGGTTCTGAGC,TGAGACCTCCGGGTTCTGAGCT
bta-miR-7857-5p	21,22,20,21, 20,21	ATTGTTCTCCAACCTGGCTCT,ATTGTTCTCCAACCTGGCTCTT,ATAGCCAGTTGGGGAAGAAT,ATAGCCAGTTGGGGAAGAATG,TAGCCAGTTGGGGAAGAATG,TAGCCAGTTGGGGAAGAATGC
bta-miR-7858	20	TAGGATTTGGAAAGATTGCT
bta-miR-7859	21,19	AAAACTGGCAGCTTCATGTA,AAAACTGGCAGCTTCATG
bta-miR-7860	23	TGGAGCGGCTGCACAGAGCGTGA
bta-miR-874	22,2	CTGCCCTGGCCCAGGGACCGA,CTGCCCTGGCCCAGGGACC
bta-miR-877	23	GTAGAGGAGATGGCGCAGGGGAC
bta-miR-885	22	TCCATTACACTACCCTGCCTCT
bta-miR-9-	22,23	TCTTTGGTTATCTAGCTGTATG,TCTTTGGTTATCTAGCTGTATGA

5p		
bta-miR-92a	22	TATTGCACTTGTCCCGGCCTGT
bta-miR-92b	18,22,21	AGGGACGGGACGCGGTGC,TATTGCACTCGTCCCGGCCTCC,TATTGCACTCGTCCCGGCCTC
bta-miR-93	23	CAAAGTGCTGTTCGTGCAGGTAG
bta-miR-935	22	CAGTTACCGCTTCCGCTACCGC
bta-miR-95	21	TTCAACGGGTATTTATTGAGC
bta-miR-98	22	TGAGGTAGTAAGTTGTATTGTT
bta-miR-99a-5p	21	AACCCGTAGATCCGATCTTGT

**Tablo 3.** Sub-klinik sığır gruplarında tespit edilen bilinen miRNA'lar, mature dizilimleri ve uzunlukları

mirna	length	mature
bta-let-7a-5p	22	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT
bta-let-7c	20,18,22	AAGGAGCTCACAGTCTATTG,TGAGGTAGTAGGTTGTAT,TGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT
bta-let-7d	22	AGAGGTAGTAGGTTGCATAGTT
bta-let-7e	23,21	TGAGGTAGGAGGTTGTATAGTTG,TGAGGTAGGAGGTTGTATAGT
bta-let-7f	22	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT
bta-let-7g	22	TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT
bta-let-7i	22	TGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTT
bta-miR-1	22,2	TGGAATGTAAAGAAGTATGTAT,TGGAATGTAAAGAAGTATGT
bta-miR-100	22,21	AACCCGTAGATCCGAACCTTGTG,AACCCGTAGATCCGAACCTTGT
bta-miR-101	22,23,23	TACAGTACTGTGATAACTGAAG,TACAGTACTGTGATAACTGAAGG,TACAGTACTGTGATAACTGAAGA
bta-miR-10162-5p	22	TGGACAGGCCAAGCCGCTGTGC
bta-miR-10167-3p	18,19	CGGGTGGTCGGGGCGGGT,CGGGTGGTCGGGGCGGGTC
bta-miR-10172-5p	20	TCACTGGGCATCCTCTGCTT
bta-miR-10174-5p	24	ATCACATTGCCAGGGATTACCACG
bta-miR-10175-5p	20	TGGAGAGAACAGGTGGCTTT
bta-miR-10180-3p	24	GAGGAGGGGCGCGCTGTGCTCTTG
bta-miR-10225a	23,20,21,2 2	CCGAGCCTGACAGATCACACAG,CCGAGCCTGACAGATCACAC,CCGAGCCTGACAGATCACACA,CCGAGCCTGACAGATCACACAC
bta-miR-103	23	AGCAGCATTGTACAGGGCTATGA
bta-miR-106b	22,21	CCGCACTGTGGGTTACTTGTGCTG,CCGCACTGTGGGTTACTTGTGCTG
bta-miR-107	19,22,21	AGCAGCATTGTACAGGGCT,AGCAGCATTGTACAGGGCTATC,AGCAGCATTGTACAGGGCTAT
bta-miR-10a	22	TACCCTGTAGATCCGAATTTGT
bta-miR-10b	22	TACCCTGTAGAACCGAATTTGT

bta-miR-11973	22,21	CTTGCTGAGTGACCTCCCTGCT,CTTGCTGAGTGACCTCCCTGC
bta-miR-11987	21,18	GAGGAATCTCTGGTGGAGGTA,GAGGAATCTCTGGTGGAG
bta-miR-11997	21	AACCAAGGGTGTGGGCCGAGA
bta-miR-11998	22	TTCTCTAGTGTGTTTCCCAAC
bta-miR-12002b	21	CCTCATGTGGAATCTTTAGCT
bta-miR-12008	20	AAAAGGATGAAGAGTTAAAG
bta-miR-12034	18,18	CCCCGGGGAGCCCGGCGG,CCCGGGGAGCCCGGCGGT
bta-miR-12060	21	TTGGGAGACCAGGGGAAGACT
bta-miR-122	21	TGGAGTGTGACAATGGTGTTT
bta-miR-124a	21,19	TAAGGCACGCGGTGAATGCCA,TAAGGCACGCGGTGAATGC
bta-miR-124b	21,19	TAAGGCACGCGGTGAATGCCA,TAAGGCACGCGGTGAATGC
bta-miR-125a	23,22	TCCCTGAGACCCTTTAACCTGTG,TCCCTGAGACCCTTTAACCTGT
bta-miR-125b	21	TCCCTGAGACCCTAACTTGTG
bta-miR-126-5p	22	TCGTACCGTGAGTAATAATGCG
bta-miR-127	22	TCGGATCCGTCTGAGCTTGGCT
bta-miR-1271	22	CTTGGCACCTAGTAAGTACTCA
bta-miR-128	21	TCACAGTGAACCGGTCTCTTT
bta-miR-129	21	CTTTTTGCGGTCTGGGCTTGC
bta-miR-129-5p	21	CTTTTTGCGGTCTGGGCTTGC
bta-miR-1306	22	TGGACGTTGGCTCTGGTGGTGA
bta-miR-1307	23	ACTCGGCGTGGCGTCCGGTCGTGG
bta-miR-130b	21	ACTCTTCCCTGTTGCACTAC
bta-miR-132	23	TAACAGTCTACAGCCATGGTCGC
bta-miR-133a	23,22,20	TTGGTCCCCTTCAACCAGCTGT,TTGGTCCCCTTCAACCAGCTGT,TTGGTCCCCTTCAACCAGCT
bta-miR-133b	21,2	TTGGTCCCCTTCAACCAGCT,TTGGTCCCCTTCAACCAGCT
bta-miR-134	19,24	TGTGTGACTGGTTGACCAG,TGTGTGACTGGTTGACCAGAGTGG

bta-miR-136	22,21	ACTCCATTTGTTTTGATGATGG,CATCATCGTCTCAAATGAGTC
bta-miR-1388-5p	22	AGGACTGTCCAACCTGAGAATG
bta-miR-139	23	TCTACAGTGCACGTGTCTCCAGT
bta-miR-140	22	TACCACAGGGTAGAACCCACGGA
bta-miR-141	19,21	TAACACTGTCTGGTAAAGA,TAACACTGTCTGGTAAAGATG
bta-miR-143	21,22	TGAGATGAAGCACTGTAGCTC,GGATTCCCTGGAAATACTGTTCT
bta-miR-1434-5p	19	AAATTTCTTCACTTTGACC
bta-miR-144	23	GGATATCATCATATACTGTAAGT
bta-miR-145	21	GTCCAGTTTTCCCAGGAATCC
bta-miR-1468	20,21	CTCCGTTTGCCTGTTTTGCT,CTCCGTTTGCCTGTTTTGCTG
bta-miR-146a	22	TGAGAACTGAATTCCATAGGTT
bta-miR-146b	23,22	TGAGAACTGAATTCCATAGGCTG,TGAGAACTGAATTCCATAGGCT
bta-miR-147	19	GTGTGCGGAAATGCTTCTG
bta-miR-148a	22	TCAGTGCACACTACAGAACTTTGT
bta-miR-148b	22	TCAGTGCATCACAGAACTTTGT
bta-miR-149-5p	21,22	TCTGGCTCCGTGTCTTCACTC,TCTGGCTCCGTGTCTTCACTCC
bta-miR-150	22	TCTCCCAACCCTTGTACCAGTG
bta-miR-151-5p	21	CTAGACTGAAGCTCCTTGAGG
bta-miR-152	21,18	TCAGTGCATGACAGAACTTGG,TCAGTGCATGACAGAACT
bta-miR-154a	22	ATCATACACGGTTCACCTATTT
bta-miR-154c	22	AGATATTGCACGGTTGATCTCT
bta-miR-155	24,23,22,21	TTAATGCTAATCGTGATAGGGGTT,TTAATGCTAATCGTGATAGGGGT,TGAAAAGTTCGTTCCGGGTTTTT,TCCCTGAGACCCTAACTTGTG
bta-miR-15a	21,18	TAGCAGCACATAATGGTTTGT,TAGCAGCACATAATGGTT
bta-miR-15b	22	TAGCAGCACATCATGGTTTACA
bta-miR-16a	21,22	TAGCAGCACGTAAATATTGGT,TAGCAGCACGTAAATATTGGTG

bta-miR-16b	23,22	TAGCAGCACGTAAATATTGGCGT,TAGCAGCACGTAAATATTGGCG
bta-miR-17-5p	24	CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGT
bta-miR-181a	23	AACATTCAACGCTGTCGGTGAGT
bta-miR-181b	20,23	AACATTCATTGCTGTCGGTG,AACATTCATTGCTGTCGGTGGGT
bta-miR-181c	21	ACCATCGACCGTTGAGTGGAC
bta-miR-181d	21	AACATTCATTGTTGTCGGTGG
bta-miR-1839	22	AAGGTAGATAGAACAGGTCTTG
bta-miR-184	21,22,20	TGGACGGAGAACTGATAAGGG,TGGACGGAGAACTGATAAGGGT,TGGACGGAGAACTGATAAGG
bta-miR-1842	19,21	TGGCTCTGTGAGGTCCGGCT,TGGCTCTGTGAGGTCCGGCTCA
bta-miR-185	21,22	TGGAGAGAAAGGCAGTTCCTG,TGGAGAGAAAGGCAGTTCCTGA
bta-miR-186	22	CAAAGAATTCTCCTTTTGGGCT
bta-miR-191	22	CAACGGAATCCAAAAGCAGCT
bta-miR-192	21,2	CTGACCTATGAATTGACAGCC,CTGACCTATGAATTGACAGC
bta-miR-193a-5p	19	TGGGTCTTTGCGGGCGAGA
bta-miR-194	21	TGTAACAGCAACTCCATGTGG
bta-miR-195	21	TAGCAGCACAGAAATATTGGC
bta-miR-196a	22	TAGGTAGTTTCATGTTGTTGGG
bta-miR-196b	22,23	TAGGTAGTTTCCTGTTGTTGGG,TAGGTAGTTTCCTGTTGTTGGGA
bta-miR-197	22	TTCACCACCTTCTCCACCCAGC
bta-miR-199a-5p	23,21	CCCAGTGTTACAGACTACCTGTTC,ACAGTAGTCTGCACATTGGTT
bta-miR-199b	24,21	CCCAGTGTTTAGACTATCTGTTCA,ACAGTAGTCTGCACATTGGTT
bta-miR-19a	23	TGTGCAAATCTATGCAAAACTGA
bta-miR-19b	22	TGTGCAAATCCATGCAAAACTG
bta-miR-200a	21	TAACACTGTCTGGTAACGATG
bta-miR-200b	21	TAATACTGCCTGGTAATGATG
bta-miR-200c	21,23,19	TAATACTGCCGGGTAATGATG,TAATACTGCCGGGTAATGATGGA,TAATACTGCCGGGTAATGA

bta-miR-204	22	TTCCCTTTGTCATCCTATGCCT
bta-miR-205	18,21	TCCTTCATTCCACCGGAG,TCCTTCATTCCACCGGAGTCT
bta-miR-206	22,2	TGGAATGTAAGGAAGTGTGTGG,TGGAATGTAAGGAAGTGTGT
bta-miR-20a	23	TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG
bta-miR-21-5p	23	TAGCTTATCAGACTGATGTTGAC
bta-miR-210	24,19	CTGTGCGTGTGACAGCGGCTGATC,CTGTGCGTGTGACAGCGGC
bta-miR-214	22	TACAGCAGGCACAGACAGGCAG
bta-miR-215	20	ATGACCTATGAATTGACAGA
bta-miR-218	21	TTGTGCTTGATCTAACCATGT
bta-miR-219-5p	22	AGAATTGTGGCTGGACATCTGT
bta-miR-22-5p	22	AAGCTGCCAGTTGAAGAACTGT
bta-miR-221	22	AGCTACATTGTCTGCTGGGTTT
bta-miR-222	24,23,25	AGCTACATCTGGCTACTGGGTCTC,AGCTACATCTGGCTACTGGGTCT,AGCTACATCTGGCTACTGGGTCTCT
bta-miR-223	23,22	TGTCAGTTTGTCAAATACCCCAA,TGTCAGTTTGTCAAATACCCCA
bta-miR-224	22	CAAGTCACTAGTGGTTCCGTTT
bta-miR-2284ab	21	TAAAAGTTTGGTTGGGTTTTT
bta-miR-2284p	19	TGAAAGTTTGTTCGGGATT
bta-miR-2284q	23	TGCAAACGAACTTTTTGGCCAAC
bta-miR-2284w	21,23	AAAACCTCAATGAACTCTTTG,AAAACCTCAATGAACTCTTTGG
bta-miR-2284x	22,21	TGAAAAGTTCGTTCCGGTTTTT,AACCCGTAGATCCGATCTTGT
bta-miR-2285aa	22	AAAACCTGGAACGAACTTTTTGGG
bta-miR-2285ai-5p	19	AAAACCTGAGTGAACTTTTT
bta-miR-2285b	20,22,21	TGAACTTTTTGGCCAACCCA,AAATCTGAGTGAACTTTTTGGT,AAATCTGAGTGAACTTTTTGG
bta-miR-2285bc	22	AAAACCTGAATGACCCTTTTG
bta-miR-2285e	21	ACGAACTTTTTGGCCAACCCA

bta-miR-2285h	23	GAAAACCGAAACGAACTTTATGG
bta-miR-2285n	20	ATGAACTTTTGGGCCAATCC
bta-miR-2285o	19	GAAACCCGAACGAACTTTT
bta-miR-2285p	22	AAAAACTTGAGTGAACTTTGG
bta-miR-2299-3p	21	TCCGGGGAATGGATCCAGCGT
bta-miR-2299-5p	21	TCCGGGGAATGGATCCAGCGT
bta-miR-2349	24	TGGCACTTCTGGTCTCAGACTCAA
bta-miR-23a	19,22,21	ATCACATTGCCAGGGATTT,ATCACATTGCCAGGGATTCCA,ATCACATTGCCAGGGATTCC
bta-miR-24	20,22	TGGCTCAGTTCAGCAGGAAC,TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAG
bta-miR-24-3p	20,22	TGGCTCAGTTCAGCAGGAAC,TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAG
bta-miR-2411-5p	19	GTGGAGTGAAGTGTTCAGATG
bta-miR-2419-5p	22	ATCGCATCAACACTCGTCTGTT
bta-miR-2441	18	ACAGGACAGGACAGTGGG
bta-miR-2448-3p	22	GTGGTTGATTGGATCCGTGGGT
bta-miR-2448-5p	22	GTGGTTGATTGGATCCGTGGGT
bta-miR-2454-5p	22	TCTCCTCTGGCCGCTCTCCTCC
bta-miR-2484	22	TCCTCTAAGAAGTTCTGAGCTT
bta-miR-25	22	CATTGCACTTGTCTCGGTCTGA
bta-miR-26a	22	TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT
bta-miR-26b	22	TTCAAGTAATCCAGGATAGGTT
bta-miR-27a-5p	20	TTCACAGTGGCTAAGTTCCG
bta-miR-27b	19,21	TTCACAGTGGCTAAGTTCT,TTCACAGTGGCTAAGTTCTGC
bta-miR-28	20,22	AAGGAGCTCACAGTCTATTG,AAGGAGCTCACAGTCTATTGAG
bta-miR-296-5p	21,2	AGGGTTGGGCGGAGGCTTCC,AGGGTTGGGCGGAGGCTTTC
bta-miR-29a	20,21,19	TAGCACCATCTGAAATCGGT,TAGCACCATCTGAAATCGGTT,TAGCACCATCTGAAATCGG
bta-miR-29b	23	TAGCACCATTGAAATCAGTGTT

bta-miR-29d-3p	19	TAGCACCATTTGAAATCGA
bta-miR-29d-5p	19	TAGCACCATTTGAAATCGA
bta-miR-30a-5p	22,23	TGTA AACATCCTCGACTGGAAG,TGTA AACATCCTCGACTGGAAGC
bta-miR-30b-5p	22	TGTA AACATCCTACACTCAGCT
bta-miR-30d	24	TGTA AACATCCCCGACTGGAAGCT
bta-miR-30e-5p	24	TGTA AACATCCTTGACTGGAAGCT
bta-miR-30f	21,23	CTGGGAGAAGGCTGTTTACTC,TGTA AACACCCTACACTCTCAGC
bta-miR-32	22,21	TATTGCACATGACTAAGTTGCA,TATTGCACATGACTAAGTTGC
bta-miR-320a	22	AAAAGCTGGGTTGAGAGGGCGA
bta-miR-323	22	GCACATTACACGGTCGACCTCT
bta-miR-324	22	CGCATCCCCTAGGGCATTGGTG
bta-miR-326	21,23	CCTCTGGGCCCTTCTCCAGC,AGGCAGTGTAGTTAGCTGATTGC
bta-miR-328	22,23	CTGGCCCTCTTGCCCTTCCGT,CTGGCCCTCTTGCCCTTCCGTC
bta-miR-330	25	GCAAAGCACACGGCCTGCAGAGAGG
bta-miR-331-5p	23,21,21	TTCTAGGTATGGTCCCAGGGATC,TCTAGGTATGGTCCCAGGGAT,CTAGGTATGGTCCCAGGGATC
bta-miR-335	22,22	TCAAGAGCAATAACGAAAAATG,TTTTTCATTATTGCTCCTGACC
bta-miR-338	21	AACAATATCCTGGTGCTGAGT
bta-miR-340	22	TTATAAAGCAATGAGACTGATT
bta-miR-342	24,23	TCTCACACAGAAATCGCACCCATC,TCTCACACAGAAATCGCACCCAT
bta-miR-3431	22,2	ATCTAGAGGACTGACTGAAATT,CTCAGTCAGCCTTGTGGATG
bta-miR-345-5p	22,21	CCCTGAACTAGGGGTCTGGAGG,CCTGAACTAGGGGTCTGGAGG
bta-miR-34a	22	TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT
bta-miR-361	19,24	TTATCAGAATCTCCAGGGG,CCCCAGGTGTGATTCTGATTTC
bta-miR-362-5p	24	AATCCTTGGAACCTAGGTGTGAGT
bta-miR-363	23,21	AATTGCACGGTATCCATCTGCGA,AATTGCACGGTATCCATCTGC
bta-miR-365-3p	21	TAATGCCCTAAAAATCCTTA

bta-miR-369-5p	21	AGATCGACCGTGTTATATTCG
bta-miR-370	18	GCCTGCTGGGGTGAACC
bta-miR-374a	22	TTATAATACAACCTGATAAGTG
bta-miR-374b	22,21	CTTATCAGGTTGTATTATCATT,ATATAATACAACCTGCTAAGT
bta-miR-375	19,22	TTTGTTTCGTTCCGGCTCGCG,TTTGTTTCGTTCCGGCTCGCGTGA
bta-miR-378	23,22	ACTGGACTTGGAGTCAGAAGGCC,ACTGGACTTGGAGTCAGAAGGC
bta-miR-379	21	TGGTAGACTATGGAACGTAGG
bta-miR-381	22	TATACAAGGGCAAGCTCTCTGT
bta-miR-382	22	GAAGTTGTTTCGTGGTGGATTCCG
bta-miR-383	22	AGATCAGAAGGTGATTGTGGCT
bta-miR-409a	23,23	CGAATGTTGCTCGGTGAACCCCT,GAATGTTGCTCGGTGAACCCCTT
bta-miR-410	21	AATATAACACAGATGGCCTGT
bta-miR-411a	22,21,21	ATAGTAGACCGTATAGCGTACG,ATAGTAGACCGTATAGCGTAC,TAGTAGACCGTATAGCGTACG
bta-miR-421	23,22	ATCAACAGACATTAATTGGGCGC,TCAACAGACATTAATTGGGCGC
bta-miR-423-5p	23	TGAGGGGCAGAGAGCGAGACTTT
bta-miR-425-5p	25	AATGACACGATCACTCCCGTTGAGT
bta-miR-432	21	TCTTGGAGTAGGTCATTGGGT
bta-miR-450a	22,21	TTTGCGATGTGTTCCCTAATATG,TTTTGCGATGTGTTCCCTAATA
bta-miR-450b	23	TTTTGCAATATGTTCCCTGAATAT
bta-miR-452	21	TCAGTCTCATCTGCAAAGAAG
bta-miR-455-5p	23,21	TATGTGCCTTTGGACTACATCGT,TGTGCCTTTGGACTACATCGT
bta-miR-486	23	TCCTGTACTGAGCTGCCCGAGG
bta-miR-494	23	TGAAACATACACGGGAAACCTCT
bta-miR-495	22,21	AAACAAACATGGTGCCTTCTT,AAACAAACATGGTGCCTTCT
bta-miR-497	21	CAGCAGCACACTGTGGTTTGT
bta-miR-499	21,22	TTAAGACTTGCAGTGATGTTT,TTAAGACTTGCAGTGATGTTA

bta-miR-500	23	ATGCACCTGGGCAAGGATTCTGA
bta-miR-505	22	TCAACACTTGCTGGTTTCCTCT
bta-miR-532	22	CATGCCTTGAGTGTAGGACCGT
bta-miR-539	23	ATACAAGGACAATTTCTTTCTGA
bta-miR-543	22	AAACATTTCGCGGTGCACTTCTT
bta-miR-574	22	CACGCTCATGCACACACCCACA
bta-miR-6119-5p	18,23,21	AGAGGTAAAAAATTGATT,AGAGGTAAAAAATTGATTTGACT,AGAGGTAAAAAATTGATTTGA
bta-miR-6120-5p	22	TATGTTGGACAACGTGGATAGC
bta-miR-6123	23,23	TGCCAAGCCCACGTTCAAAGGCT,AGCAGCATTGTACAGGGCTATGA
bta-miR-615	19	TCCGAGCCTGGGTCTCCCT
bta-miR-628	24	TTCTAGTAAGAGTGGCAGTCGAAG
bta-miR-652	21	AATGGCGCCACTAGGGTTGTG
bta-miR-6524	22	TTACTCTGAGTAACCTAACTGG
bta-miR-6529a	21	GAGAGATCAGAGGCGCAGAGT
bta-miR-6532	22	AGTGCGGACAGGAAAGACGGTT
bta-miR-6533	21,23	AAGTTCTCTGATGCTCTACCG,AAGTTCTCTGATGCTCTACCGCA
bta-miR-660	22,23	TACCCATTGCATATCGGAGCTG,TACCCATTGCATATCGGAGCTGT
bta-miR-664b	22	CAGGCTAGGAGAAATGATTGGA
bta-miR-665	20	ACCAGTAGGCCGAGGCCCT
bta-miR-671	21	TCCGGTTCTCAGGGCTCCACC
bta-miR-7	24	TGGAAGACTAGTGATTTTGTGTT
bta-miR-708	24	AAGGAGCTTACAATCTAGCTGGGG
bta-miR-760-5p	21,23	CGGCTCTGGGTCTGTGGGGAG,TCGGCTCTGGGTCTGTGGGGAGC
bta-miR-769	23,24	GAGACCTCCGGTTCTGAGCTGT,TGAGACCTCCGGTTCTGAGCTGT
bta-miR-7857-5p	21	ATTGTTCTCCAACCTGGCTCT
bta-miR-7860	21,22,22	GGAGCGGCTGCACAGAGCGTG,CTGGAGCGGCTGCACAGAGCGT,TGGAGCGGCTGCACAGAGCGTG

bta-miR-7861	23	CACACTCAGATAAAGTAGGCACT
bta-miR-874	22,24	CTGCCCTGGCCCGAGGGACCGA,CTGCCCTGGCCCGAGGGACCGACT
bta-miR-9-5p	22,21	TCTTTGGTTATCTAGCTGTATG,TCTTTGGTTATCTAGCTGTAT
bta-miR-92a	22	TATTGCACTTGTCCCGGCCTGT
bta-miR-92b	20,23	TATTGCACTCGTCCCGGCCT,AGGGACGGGACGCGGTGCAGTGT
bta-miR-93	23	CAAAGTGCTGTTTCGTGCAGGTAG
bta-miR-95	18,21	TTCAACGGGTATTTATTG,TTCAACGGGTATTTATTGAGC
bta-miR-98	22	TGAGGTAGTAAGTTGTATTGTT
bta-miR-99a-5p	21	AACCCGTAGATCCGATCTTGT

**Tablo 4.** Non-enfekte sığır gruplarında tespit edilen potansiyel yeni miRNA'ların dizilimleri ve uzunlukları.

No	miRNA Dizilimi	Uzunluk
1	AGAAGGAAATGGCAACCCAC	20
2	AGGGACTGTTGCTGAAGC	18
3	AAAGAATACTGGAGTGGGT	19
4	GCGGGGGAGAGGCGTGGC	18
5	AAGAGCTTTTTGGCCAAC	18
6	AAGGAAGGGGCTTCTGAGCTTC	22
7	AGAGACTGAGCATGTACA	18
8	GGGGTGTAGCTCAGAGGTAGAGT	23
9	AAAACCTCAACGAACTCTTTGG	22
10	AGGAACTTTTTGGCCAAC	18
11	GTTTCCTTAGTGTAGTGG	18
12	AGGAGAAGCTCTGCTACG	18
13	GGAAGATCTGCTGGAGAAGG	20
14	AAGGTGCTGTCTGGTCTATTCACA	24
15	CCTGACACTGAGAGACGA	18
16	AGAAGCAGGCGGGAGCCT	18
17	ATGGACATGAGTTTGAGC	18
18	GGCTGGTCCGAAGGTGGTA	19
19	AAGGACTTCCCTGGTGGC	18
20	AGGAGAGAAAGGAGATTC	18
21	AAAACCTCAACGAACTCTTTGG	22
22	AAGAACTTTTTGGCCAAG	18
23	AGAGAACTCTGGAGAAGG	18
24	ATGAACTTTTTGGCCAAC	18
25	AGCCTCGGGGTGGCAGGCG	19
26	AGAAGACGGTTGAACTTT	18
27	ACATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATT	25
28	AGAATTGATGTTTTTGAAGTGTG	23
29	AGGGCGCTGTGCTCCCCG	18
30	CCTGGTTAGTACTTGGATGG	20
31	AAGGACTGATGCTGAAGC	18
32	AGAAAGAACTGCTCTGGC	18
33	TGAAAGGCTAAACAACTG	19
34	GGCCAGGGGCGTGTCCGGCT	20
35	AGAGGAGGAAGAGGCTGTGC	20
36	CATGGGTGGTGGTGCATG	18
37	GGGGTGTAGCTCAGTGGT	18
38	AGAGGGCTGTCACCGCCG	18
39	CGGATCTGGCTTCTGAGGTG	20

40	AGAAGGAAACCTCTGGAGG	19
41	AGAAAAGAGGGATAAGAGA	19
42	ACACGGACAGGATTGACAGA	20
43	ATGTAGGTAAGGGAAGTCGGCA	22
44	AAAGGTTCAATTTGTGTTTTTCT	22
45	GGGCGCCGCCGCCCCCG	19
46	GTGAAATGTTTAGGACCACT	20
47	CCGGTACTGTAGGCTTT	18
48	AGCCTCTAAGAAGTTGACTGAAG	23
49	CAGGCAAGAATACTGGAGTG	20
50	GTTTCCTTAGTGTAGTGG	18
51	AGGAGTCTGCACCTGGGCAG	20
52	TTCCTGGTCTAGTGGTTAGGATT	23
53	ACAAGATCCACTGGAGAAGGG	21
54	TAGGCAAGAATACTGGAGTG	20
55	GAAGATCCCCTGGAGAAGG	19
56	CCTGACACTGAGAGACGA	18
57	CCGGCTGCTGTAGGCTTT	18
58	AGAAGCAGGCGGGAGCCT	18
59	GGCTGGTCCGAAGGTGGTA	19
60	AGAGAACTCTGGAGAAGG	18
61	TGGATGTGGATGTGAAGTG	19
62	GAGGCGTGCCTGTTCCCCT	19
63	AGAGTCTTCTCCAACACCA	19
64	AGACTGACTGATTTTGAC	18
65	GGTGGAGTATGTGGTTAAT	20
66	GTGAAAGGCTAAACAACTG	20
67	AGGGGTGTAGCTCAGTGG	18
68	AGGGACAGTGCCTGGTGG	18
69	AAGGTGCTGTCTGGTCTATTCACA	24
70	ATCCTGTAGCTGATGCCA	18
71	AGATGGAGAGTGACTTTGCCC	21
72	ACACGGACAGGATTGACAGA	20
73	AGAGAACTCTGGAGAAGG	18
74	AAAACCTCAACGAACTCTTTGG	22
75	CCCTCGCCTGACTTTTCCCCC	22
76	GCGGGGGAGAGGCGTGCC	18
77	TGAAATGTTTAGGACCACTAGA	22
78	AAAACCTCAACGAACTCTTTGG	22
79	GTTTCCTTAGTGTAGTGG	18
80	CCTGGTCTAGTGGTTAGGATTTGCC	25
81	GTTTCGACTCCTGGTGTGA	18
82	CCTGACACTGAGAGACGA	18

83	AAGTTGCTCAGTCGTGTC	18
84	AGAAGCAGGCGGGAGCCT	18
85	CGGTGGAACCTGTGTGGC	18
86	AGAGAACTCTGGAGAAGG	18
87	GAAGCTGACTTGATTTTG	18
88	AAGGAGGAGAAGGGGGGT	18
89	GAGTGGAACCTCAGATCAG	18
90	AGGTGCTGTCTGGTCTATTCAC	22
91	AGGAGGTGGAGCTGCAGCTGC	21
92	GTGAAAGGCTAAACAACTG	20
93	AGAAGGAAATGGCAACCCAC	20
94	CCAACTCTGTGCGACCCT	18
95	GGGCGCCGCCGCCCCCG	19
96	CGGATCTGGCTTCTGAGGTG	20
97	AAACTGGTAGGCAACGAGACC	21
98	GGTGAGAGGTGTCAGAAA	18

**Tablo 5.** Akut enfekte sığır gruplarında tespit edilen potansiyel yeni miRNA'ların dizilimleri ve uzunlukları.

No	miRNA Dizilimi	Uzunluk
1	CGCGGCGGCGGGCGCGTC	18
2	GTCGCCGGTGAAATACCACTAC	22
3	GTTCATGGGGTTGCAAAGAGTCAGA	25
4	GCGGGGGAGAGGCGTGGC	18
5	AGGGCTCTGTTGAATATGGC	20
6	GGGCTCTGTTGAATATGGC	19
7	AGCAGGACGTGGTGGCCG	18
8	AGGAAGGGGCTTCTGAGCTTC	21
9	AAAAATGCGGATTCCATGGC	20
10	CCGGGTACTGTAGGCTTT	18
11	CCTGGGCTGGGAAGATCCC	19
12	GTTTCCTTAGTGTAGTGG	18
13	AGGAGCCGGCGGGAGCTC	18
14	CGCCTGTCTGAGCGTCGCT	19
15	AGGTCTGGGGGTTCTCTC	18
16	CCTGGTCTAGTGGTTAGGATTTGGC	25
17	GCTCGGGCTCCCGGATCTCC	20
18	CTGACACTGAGAGACGAG	18
19	GGAGTTGGTGTATGGACAGG	19
20	GCAAGAATACTGGAGTGGG	19
21	TCTGTCCATGGGATTCTCCAGGC	23

22	CCGGCTGCTGTAGGCTTT	18
23	AGGAGTCTAACAAGTGCA	18
24	AGAAGCAGGCGGGAGCCT	18
25	GCATGGATGGTTCAGTGG	18
26	CCCATGGATCCCCCAGC	18
27	AGAGAACTCTGGAGAAGG	18
28	TGAAATGTTTAGGACCACTAG	21
29	AGACTGACTGATTTTGAC	18
30	AGGAAGCAGGAGGACTGG	18
31	GGGCGCCGCCGCCCCCG	19
32	GTGAAAGGCTAAACAACTG	20
33	AGGAGGAACTTGCTGGCC	18
34	AAGACTGAAGTGGAGGAA	18
35	AGGGGTGTAGCTCAGTGG	18
36	CGGATCTGGCTTCTGAGGTG	20
37	AAACTGGTAGGCAACGAGACC	21
38	ACGCGCCGCCGCCACCC	18
39	GCTGGGACTGAGGGGCGGGC	20
40	ACACGGACAGGATTGACAGA	20
41	AGAAGGAAATGGCAACCCAC	20
42	TCTTGCCTGGAGAATCCC	18
43	AGAGCTGGACACGACTGAGTGAC	23
44	AGGAAATGGCAACCCACTC	19
45	CGGCGTGGCGGGCGGCGGCTCC	22
46	CCTCGCCTGACTTTTCCCCC	21
47	GCAAGATCGCCTGGAGAAGG	20
48	AAAACTCAAACGAACTTTTG	21
49	GGAGGATCTCCTGGAGAGGG	20
50	TTCTCCAGGGGATCTTCC	18
51	GCGGGGGAGAGGCGTGCC	18
52	AAGGAAGGGGCTTCTGAGCTT	21
53	GCGGGGGAGAGGCGTGCC	18
54	AGGATGTCTGGCTCTAGG	18
55	AAGGTGCTGTCTGGTCTATCAC	23
56	AGGCTCCTCTGTCCATGG	18
57	AGGAGGTGGAGCTGCAGC	18
58	ATGAACTTTTGGCCAAC	18
59	CAATTCTTTGGGGCTCAGC	19
60	TGGGCAGTGCTGAGAAGG	18
61	CGCGTCCTCAGACCAGAC	18
62	AGGTCTGGGGGTCTCTC	18
63	GTTTCCTTAGTGTAGTGG	18
64	AGGAGAAGCTCTGCTACG	18

65	CCTGGTCTAGTGGTTAGGATTTGGC	25
66	AGAAGCAGGCGGGAGCCT	18
67	GGCCAGGGGCGTGTCCGGCT	20
68	AGGACTTCCCTGGTGGCT	18
69	AAGGACTGATGTTGAAGC	18
70	AGAGAACTCGGGAGACGG	18
71	AGAGAACTCTGGAGAAGG	18
72	GGAGATCAAACCACTCAATCC	21
73	GTGAAAGGCTAAACAACTG	20
74	AGGGGTGTAGCTCAGTGG	18
75	CCCTGCCTCAGATCAGAC	18
76	AGGGAAGAAAGGGGACCTGAGGCC	24
77	AGGCCTCTGGGAACGAGC	18
78	CGGATCTGGCTTCTGAGGTG	20
79	ACACGGACAGGATTGACAGA	20
80	AGAAGGAAATGGCAACCCAC	20
81	TCCTCTGTCCATGGGATT	18
82	AAGAGACTCTGATGCCGGG	19
83	GCGGGGGAGAGGCGTGGC	18
84	TGAGAGACGTGACCTTGTTTTG	22
85	GCGGGGGAGAGGCGTGGC	18
86	AAAAGTTCGTTTGAGTTTTTCC	22
87	GCGGGGGAGAGGCGTGGC	18
88	AGGGGCTCTGATGCTGGG	18
89	GGGACTCTGCGCTCTCAC	18
90	AAGGTGCTGTCTGGTCTATTCAC	23
91	GTGAAATGTTTAGGACCACT	20
92	TGAGATACGACTGAAGTGACT	21
93	GGGATCTTCCTGACTCTGGG	20
94	AAAACTCAAACGAACCTTTTG	21
95	AGAAGGAAATGGCAACCCAC	20
96	AGGCTCCTCTGTCCATGG	18
97	TGGGCAGTGCTGAGAAGG	18
98	AGGATCTTTCTGACACAGG	19
99	CCCGGATAGCTCAGTGGG	18
100	CCATGTGGTCTAGTGGTTAGGATTC	25
101	AGAATCCCATGGACAGAGG	19
102	AGGAGAAGCTCTGCTACG	18
103	AAGATTCTCTGGAGAAGG	18
104	CTGCAGTGATGATGGATC	18
105	AGGCTCCTCTGTCCATGG	18
106	CTGACACTGAGAGACGAG	18
107	AGAAGGAAATGGCAACCCAC	20

108	GGCTGGTCCGAAGGTGGTA	19
109	TTCTCAGGTTGGACAGTCCTG	21
110	AGGTCTGGGGGTTCTCTC	18
111	AAGGAGAGGGGAGAGGAAGAAGG	22
112	AGGAGAAAAACCATGCAGG	19
113	AGAGAACTCTGGAGAAGG	18
114	AGAAAAAGCACGTGTACGA	19
115	CGGTAGAGCATCAGAGAACT	20
116	GAGAAGGCAATGGCACCCCACT	22
117	AGGAGAAAAACCATGCAGG	19
118	AGGCTCCTCTGTCCATGG	18
119	ATGGATTTTTGGAGCAGGG	19
120	AGGAGGGGAAGGGGGGAGG	19
121	GAAGACTGAAGTGGAGCA	18
122	AAACCTCAACGAACTCTTTGG	22
123	CTAGCGGTTAGGATTCCA	18
124	GTGAAAGGCTAAACAAACTG	20
125	AGGGGTGTAGCTCAGTGG	18
126	AGGGATTTGATTTGGGTT	18

**Tablo 6.** Subklinik enfekte sığır gruplarında tespit edilen potansiyel yeni miRNA'ların dizilimleri ve uzunlukları.

No	miRNA Dizilimi	Uzunluk
1	GCGGGGGAGAGGCGTGGC	18
2	CTCTGCTGGGCCGACACAG	19
3	AAAATCCCGTGGACTGCG	18
4	AGGAAGGGGCTTCTGAGCTTCT	22
5	AAGGGTTGGACATGACTGAGCG	22
6	GTTTCCTTAGTGTAGTGG	18
7	CTGGGGAACCTCATGGAC	18
8	AAGACTGAAGAGGAGAAA	18
9	TGAAATGTTTAGGACCACTAG	21
10	AGAAGCAGGCGGGAGCCT	18
11	AGAAGAACCTCTGGAGAAG	19
12	GGCTGGTCCGAAGGTGGTA	19
13	AGAGAACTCTGGAGAAGG	18
14	AGGAGAGACTTAGCAGCAGC	20
15	TCCTCAGTAGCTCAGTGG	18
16	GTGAAAGGCTAAACAAACTG	20
17	CCTGGTGGTCTAGAGGTTAGGATT	24
18	AGAGGAGGAAGAGGCTGTGC	20

19	ACAGGTGCTGCATGGCTG	18
20	CTGACACTGAGAGACGAG	18
21	AAGACTGAAGTGGAGGAA	18
22	AGGCTGGGTGTGGAGGCG	18
23	ACACGGACAGGATTGACAGA	20
24	AGAGAACTCTGGAGAAGG	18
25	CCTGGTGCTGTAGGCTTT	18
26	GGAGTTGGTGATGGACAGG	19
27	AGTTTTACCCTACTGATG	18
28	GCGGGGGAGAGGCCGTGGC	18
29	GAGGCGATTCTGATCTGA	18
30	GTGAAATGTTTAGGACCAC	19
31	AAGAGTTGGACACGACTGAG	20
32	TGGTGACGGGTGACGGAG	18
33	GAAGATCCCCTGGAGAAGG	19
34	GGTTCGACTCCTGGTGTGA	19
35	AGCCTCTAAGAAGTTGACTGAAG	23
36	CATGGACAGGATGACAGA	18
37	AGGAGAAGCTCTGCTACG	18
38	AGAGGATCCTCTGGGGAAG	19
39	CTGTGGTCTAGCGGTTAGGATT	22
40	AGAGAACTCTGGAGAAGG	18
41	AGAGAACTCGGGAGACGG	18
42	AGAGAACTGGGGAGAAGG	18
43	CCTCTGGATCACCTCCTT	18
44	AAAGAACTTTTTGGCGAA	18
45	AGAGAAAAGGTCTGAGGTTC	21
46	AGGTCTGGGGGTTCTCTC	18
47	GTGAAAGGCTAAACAAACTG	20
48	AGAAGACTGGCTTGTGTGT	19
49	CCCTGCCTCAGATCAGAC	18
50	AAGACTTGTCTGTGAAGA	18
51	CTAGCGGTTAGGATTCCA	18
52	GGCGCCGCCGCCCG	18
53	CGGATCTGGCTTCTGAGGTG	20
54	AGGATCTCCGACTCAGG	19
55	AGGGGTGTAGCTCAGTGG	18
56	AGAGAACTCTGGAGAAGG	18
57	CCCTCGCCTGACTTTTCCCCC	22
58	GCGGGGGAGAGGCCGTGGC	18
59	AAGGTGCTGTCTGGTCTATCACA	24
60	GGAGCCGGCGGGAGCCCT	18
61	AGCAGGACGTGGTGGCCG	18

62	CCGGGTA CTGTAGGCTTT	18
63	AGCCTCTAAGAAGTTGACTGAAG	23
64	GGAAGATCTTCTGGAGAAG	19
65	CCTGGTCTAGTGGTTAGGATTTGGC	25
66	GGGCTCTGTTGAATATGG	18
67	AGAAGCAGGCGGGAGCCT	18
68	AGGGCTCTGTTGAATATGG	19
69	AGGACTTCCCTGGTGGCT	18
70	AGAGAACTCTGGAGAAGG	18
71	GGAGTTGGTGATGGACAGG	19
72	AGGAGGTGGAGCTGCAGC	18
73	GTGGGCAGTTTGT TTTGGG	18
74	GTGAAAGGCTAAACAACTG	20
75	AAGGAAGGGGCTTCTGAGCTTCT	23
76	AGAAGATACTCTGGAGGAGG	20
77	AGGAGAGAAAGGAGATTC	18
78	CCCTGCCTCAGATCAGAC	18
79	CTGACACTGAGAGACGAG	18
80	CGGATCTGGCTTCTGAGGTG	20

THEİLERİA ANNULATA'NIN DOĞAL ENFEKTE SİĞİRLARIN  
DOLAŞIMINDAKİ EKSOZOMAL MİKRORNA'LARIN  
KARAKTERİZASYONU: EPİDEMİYOLOJİK PERSPEKTİFTE  
TANISAL BİYOBELİRTEÇ POTANSİYELLERİ

ORJİNALLİK RAPORU

% <b>7</b>	% <b>7</b>	% <b>1</b>	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	apsis.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	% <b>2</b>
<b>2</b>	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>3</b>	cdn.comu.edu.tr İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>4</b>	bapsis.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>5</b>	www.cihancalli.com.tr İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>6</b>	www.omicsdi.org İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>7</b>	Debabrata Dandasena, Vasundhra Bhandari, G. S. Sreenivasamurthy, Shweta Murthy et al. "A Real-Time PCR based assay for determining parasite to host ratio and	<% <b>1</b>

# ÖZGEÇMİŞ

## KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Sadullah USLU

Uyruğu: (TC)

## EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lise	Kadirli Anadolu Lisesi/ Kayseri	2013
Lisans	Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2018

## İŞ DENEYİMLERİ

<u>YIL</u>	<u>KURUM</u>	<u>GÖREV</u>
2022-Devam ediyor	Erciyes Üni. Veteriner Fak.	Öğretim Görevlisi

## YABANCI DİL

İngilizce