

T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
PARAZİTOLOJİ AD.

*FASCIOLA HEPATICA*  
CATHEPSİN L1 GENİNİN  
ÖKARYOTİK HÜCRELERDE AÇIKLATILMASI

1.6. TÜRKERÜNCÜLÜK KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

138078

Danışman  
Yrd. Doç. Dr. Mustafa KAPLAN

Dr. Salih KUK

Bu Uzmanlık Tezi FÜBAP tarafından 721 nolu proje ile desteklenmiştir

ELAZIĞ-2003

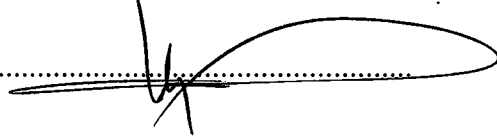
## DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. S.Sırrı KILIÇ.....  
DEKAN



Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Yrd. Doç.Dr. Mustafa KAPLAN.....  
Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı



Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç.Dr. Mustafa KAPLAN  
Danışman



Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

Yrd. Doç.Dr. Mustafa KAPLAN



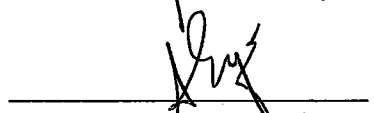
Prof. Dr. Mustafa YILMAZ



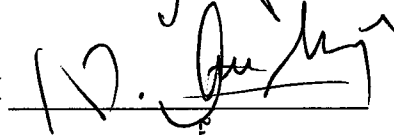
Doç.Dr. Ahmet KALKAN



Yrd. Doç. Dr. Ahmet ERENŞOY



Yrd. Doç. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ



## İTHAF

Ülkemin, benim ve insanlığın güzelliklere sahip olmasında katkısı olanlara ve katkısı olacaklara ithaf olunur.



## TEŐEKKÜR

Çalıőmalarımnda her türlü desteğini esirgemeyen tez danıőmanım Yrd. Doç. Dr. Mustafa Kaplan hocama, desteklerinden dolayı Prof. Dr. S. Sırrı Kılıç hocama, katkılarını esirgemeyen Prof. Dr. M. Ziya Doymaz'a, Doç. Dr. Ahmet Kalkın'a, Doç. Dr. Ahmet Gödekmerdan'a, Yrd. Doç. Dr. Ahmet Erensoy'a, Yrd. Doç. Dr. Aykut Özdarendeli'ye, Dr. A. Kürőat Azkur'a, Dr. Őükrü Tonbak'a, Dr. S. Yaőar Çelik'e, manevi desteği için eőime ve sağladığı maddi destek sebebiyle Fırat Üniversitesi Bilimsel Araőtırma Proje Birimine (FÜBAP) teőekkür ederim.



## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>1.ÖZET</b>	1
<b>2. ABSTRACT</b>	2
<b>3. GİRİŞ</b>	3
3.1. Yaşam döngüsü	5
3.2. Patoloji ve klinik	6
3.3. Tanı	7
3.4. İmmünoloji	9
3.5. Tedavi	11
3.6. Korunma ve kontrol	12
3.7. <i>Fasciola hepatica</i> 'nın moleküler yapısı	12
3.8. Proteazlar	12
<b>4. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	16
4.1. Parazit	16
4.2. Hücre	16
4.3. Plazmit (pCI-neo Mammalian Expression Vector)	16
4.4. <i>F. hepatica</i> 'dan Toplam RNA izolasyonu	17
4.5. RNA miktarının ölçülmesi	17
4.6. Primerlerin oluşturulması	18
4.7. Tersine Transkripsiyon ile kopya DNA (cDNA) elde edilmesi	19
4.8. <i>F. hepatica</i> Cathepsin L1 geninin polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması	19
4.9. <i>F. hepatica</i> cathepsin L1 geninin agaroz jelden saflaştırılması	20
4.10. DNA miktarının ölçülmesi	20
4.11. <i>F. hepatica</i> cathepsin L1 geni ve pCI-neo vektörünün restriksiyon enzimleriyle kesimi	20
4.12. Rekombinant plazmitin oluşturulması (Ligasyon)	21

4.13. Kompetan <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )JM 109 hücrelerinin hazırlanması	21
4.14. Rekombinant pFhCL1 plazmitin kompetan JM 109 <i>E. coli</i> hücreleri içine sokulması (Transformasyon)	22
4.15. Kolonilerdeki rekombinant pFhCL1 plazmitinin PZR Tarama (PCR Screening) ile gösterilmesi	23
4.16. Alkali lizis metoduyla rekombinant pFhCL1 plazmit DNA'sının elde edilmesi	23
4.17. Rekombinant plazmit (pFhCL1) varlığının kesim deneyleri ile doğrulanması	24
4.18. Rekombinant pFhCL1 plazmitinin Vero hücrelerinde açıklatılması	24
4.18.1. Rekombinant plazmit ile Vero hücrelerinin transfeksiyonu	24
4.18.2. Transfekte Vero hücrelerinin parçalanması ve Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) için hazırlanması	25
4.18.3. Rekombinant cathepsin L1 proteininin Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)	25
4.18.4. SDS-PAGE'te elde edilen rekombinant cathepsin L1 protein bandının Western blotting yöntemiyle doğrulanması	26
<b>5. BULGULAR</b>	<b>28</b>
5.1. <i>F. hepatica</i> cathepsin L1 geninin ökaryotik hücrelerde açıklatılması işlemi ile ilgili deneylerin şeması	28
5.2. Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan <i>F. hepatica</i> cathepsin L1 geninin görünümü	31
5.3. Cathepsin L1 geninin pCI-neo memeli ekspresyon vektörüne yerleştirilmesi ile elde edilen rekombinant pFhCL1 plazmitinin transforme edildiği <i>E. coli</i> kolonileri	32

5.4. Transforme edilen kompetan JM109 <i>E. coli</i> hücrelerinde rekombinant pFhCL1 plazmitinin PZR Tarama ve enzim kesim deneyleri ile gösterimi	33
5.5. Vero hücrelerinde açıklatılan cathepsin L1 proteininin Western blott deneyi ile doğrulanması	35
<b>6. TARTIŞMA</b>	<b>36</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>42</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>51</b>



## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 1:</b> <i>F. hepatica</i> cathepsin L1 geni ve primerler	18
<b>Şekil 2:</b> <i>F. hepatica</i> cathepsin L1 geninin klonlanması	29
<b>Şekil 3:</b> pFhCL1 plazmitinden cathepsin L1 proteininin elde edilmesi ve Western blot ile gösterilmesi	30
<b>Şekil 4:</b> %1.5'luk agaroz jeldeki <i>F. hepatica</i> cathepsin L1 geni	31
<b>Şekil 5:</b> Rekombinant pFhCL1 plazmitinin <i>E. coli</i> hücrelerine transformasyonundan sonra oluşan kolonilerin LB katı besiyerindeki görünümü	32
<b>Şekil 6:</b> %1.5'luk agaroz jelde PZR tarama ile cathepsin L1 DNA'sının gösterilmesi	33
<b>Şekil 7:</b> pFhCL1 plazmitinin %1.5'luk agaroz jelde enzim kesim deneyleriyle gösterilmesi	34
<b>Şekil 8:</b> Rekombinant cathepsin L1 proteinin Western blott'lama ile gösterilmesi	35



## KISALTMALAR LİSTESİ

$\mu$ l: Mikrolitre

A: Adenin

aa: Amino asit

Akr/Bis: Akrilamid/ Bisakrilamid

Bç: Baz çifti

C: Sitozin

DAB: Dietilamino Benzidine

dk: dakika

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA: Deoksiribonükleik asit

dNTP: Deoksi nükleotid trifosfat

dH<sub>2</sub>O: Distile su

DTT: Dithiothretiol

ELISA: Enzime bağlı İmmunosorbent Deneyi

E. coli: Escherichia coli

E/S: excretory secretory

FCS: Fötal Buzağı Serumu

gr: gram

GST: Glutasyon S-Transferaz

Hb: Hemogloblin

HPLC: Yüksek derecede saflaştırılan sıvı kromatografisi

İPTG: Isopropyl  $\beta$  D thiogalactopyranoside

Kb: Kilobaz

Kbç: Kilobaz çifti

KDa: Kilo dalton

LAP: Lösin aminopeptitaz

LB: Luria Bertani

lt: litre

M: Molarite

MR: Manyetik rezonans

nm: nanometre

nt: nükleotit

OD: Optik Dansite

PBS: Fosfatla tamponlanmış tuzlu su

pmol: pikomol

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RNA: Ribonükleik asit

SDS-PAGE: Sodium Dodesil Sülfat Poliakrilamid Elektroforez Jel

SMV: Sitomegalo virüs

sn: saniye

SGST: Sitolitik Glutasyon S-Transferaz

SYABP: Sitoplazmik yağ asidi bağlayan proteinin

TEMED:N, N, N, N,- tetrametilenamin

TT: Tersine Transkripsiyon

Vero: Afrika Yeşil Maymun Böbrek Hücresi

V: Volt

YABP: Yağ asidi bağlayan protein

## 1. ÖZET

*Fasciola hepatica* sıklıkla sığır ve koyunlarda nadiren de insanlarda fasciolosise neden olan bir karaciğer trematodudur. Fasciolosis dünyada ve ülkemizde yaygın olarak bulunmakta ve özellikle hayvancılık sektöründe önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. *F. hepatica*'nın ES antijenlerinden olan Cathepsin L1 parazitin dokulara penetrasyonda, immun yanıtta kaçmasında ve beslenmesinde önemli rolü olan bir enzimdir. Özgül antijenik yapısı nedeniyle tanı yöntemlerinde ve korunma amacıyla immünizasyon çalışmalarında kullanılabilecek potansiyel bir moleküldür. Bu çalışmada *F. hepatica* cathepsin L1 geninin klonlanması ve ökaryotik hücrelerde açıklanması amaçlanmıştır.

Bu amaçla erişkin *F. hepatica*'dan toplam RNA izolasyonu yapılarak tersine transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (TT-PZR) ile cathepsin L1 DNA ampliconları oluşturuldu. Cathepsin L1 genine özgü primerler kullanılarak 981 bazlık cathepsin L1 geni kodlama bölgesi çoğaltıldı. Daha sonra, cathepsin L1 geni pCI-neo açıklama vektörüne klonlanarak PZR-T ve enzim kesim deneyleri ile genin varlığı doğrulandı. Oluşturulan rekombinant plazmit, pFhCL1 olarak adlandırıldı. Rekombinant pFhCL1 plazmiti Vero hücrelerine geçici olarak transfekte edilerek cathepsin L1 proteinin varlığı Vestern immunoblotlama ile gösterildi.

**Anahtar kelimler:** *F. hepatica*, cathepsin L1, klonlama, protein açıklanması

## 2. ABSTRACT

The parasitic trematode *Fasciola hepatica* is the causative agent of fasciolosis that is common in ruminants especially sheep and cattle occasionally human. Fasciolosis is a worldwide distribution including Turkey and causes major economic losses in agricultural industry. Cathepsin L1 is one of the major molecules in the excretory-secretory products of *F. hepatica* and is involved tissue penetration, immune evasion and feeding therefore may be used in vaccination and serological diagnosis. The aim of this study was to evaluate cloning and expression of cathepsin L1 gene of *F. hepatica* eucaryotic cells.

For this purpose, total RNA was extracted from adult *F. hepatica*. Cathepsin L1 DNA amplicons were obtained with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). 981bases cathepsin L1 coding gene region was amplified by using specific primers to the cathepsin L1 gene. Then, the cathepsin L1 gene was cloned into pCI-neo mammalian expression vector. The presence of cathepsin L1 gene was confirmed by PCR screening and enzyme digestion assays. So, the resulting recombinant plasmid was named as pFhCL1. Afterwards, the pFhCL1vector was transiently transfected into Vero cells. The presence of the cathepsin L1 proteins was showed by Western Immunoblotting.

**Key words:** *F. hepatica*, cathepsin L1, cloning, protein expression.

### 3. GİRİŞ

*Fasciola hepatica* insan ve hayvanlarda fasciolosise neden olan bir karaciğer trematodu olup Digenea alt sınıfından Fasciolidea ailesinde yer alır (1, 2, 3). *F. hepatica* hakkında ilk bilgi 1379 yılında Brie tarafından verilmiş, yaşam döngüsü 1881 yılında Leuckart ve Thomas tarafından aydınlatılmıştır (4).

*Fasciola hepatica*, ortalama 20-30 mm boyunda ve 4-15 mm enindedir. Görünümü yaprak şeklinde olup parazitin baş kısmı vücudun ön bölgesinde ve koni şeklindedir. Vücudunun kenarları koyu esmer, orta kısmı sarı turuncu renkte ve besinlerle dolu olan çekum bölgesi siyah olarak görülür. Vücut yüzeyi kütikül ile kaplı olup üzerinde sert kitinden yapılmış dikenler bulunur. Parazitin, sinir sistemi, bağırsak sistemi, üreme sistemi ve salgı sistemi gibi kompleks sistemleri vardır. *F. hepatica*, hermafrodit olup son konakta kendi kendini fertilize ederek yumurta oluşturmaktadır. Kapaklı olan yumurtalar, sarı kahverengimsi renkte, oval, 130-150 µm boyunda ve 60-90 µm enindedir ve dışkı ile atıldıklarında içlerinde henüz embriyon gelişmemiştir (1, 2, 3).

*Fasciola hepatica*'nın son konağı genellikle sığır ve koyun gibi geviş getiren hayvanlardır. Ayrıca keçi, manda, deve, lama, domuz, eşek, fil, geyik, sincap ve maymun gibi hayvanlarda da bu parazite rastlanmaktadır. Laboratuvar hayvanlarından fare, kobay, rat, hamster, tavşan gibi hayvanlarda deneysel infeksiyon oluşturulabilmektedir (1, 2, 3).

Fasciolosis, hayvanlarda dünyada yaygın olarak gözlenirken insanlarda nadiren rastlanmaktadır. Dünya sağlık örgütünün 1995 yılında yaptığı bir çalışma dünyada 61 ülkede 2-5 milyon kişinin bu parazit ile infekte olduğunu ve 180 milyon kişinin de risk altında olduğunu göstermiştir (5).

Parazitin gelişimi 10-30°C arasındaki ısılarda olasıdır. Bu nedenle ısı ve nem şartları fasciolosisin yayılımını sınırlayan temel faktördür. Fasciolosise ılıman ve tropikal bölgelerde daha çok rastlanmaktadır (6, 7).

İnsan fasciolosisinin epidemiyolojisinde 1998 yılında yeni bir sınıflandırma önerilmiş ve endemik bölgeler üçe ayrılmıştır. Prevalansın %1'den az olduğu bölgeler hipoendemik, prevalansın %1-10 arası olan bölgeler mezoendemik,

prevalansın %10'dan fazla olduğu bölgeler ise hiperendemik bölge olarak sınıflandırılmıştır (8).

Fasciolosis tüm dünyada çok geniş bir coğrafyada görülmektedir. Fransa, Portekiz ve İspanya gibi Avrupa ülkelerinden, Amerika Birleşik Devletleri, Kanada Meksika, El Salvador, Guatemala ve Kostarika gibi Amerika ülkelerinden, Afrika'dan, Uzak Doğu ve Güney Asya ülkelerinden bir çok olgu bildirilmiştir. Özellikle insan fasciolosisi için endemik olan Fransa'da 1950-1983 yılları arasında 3.297 olgu tespit edilmiştir (6).

Güney Amerika'da insan fasciolosisi Bolivya, Peru ve Ekvator gibi ülkelerde ciddi bir sorundur. Bolivya'da hiperendemik bir bölge olan Altiplano bölgesinde insan fasciolosis prevalansının koprolojik metodlarla %70'in üzerinde, serolojik metodlarla %100 olduğu bildirilmiştir. Peru'da da mezoendemik ve hipoendemik bölgeler tespit edilmiştir. Dünya sağlık örgütünün 1995 yılında yaptığı bir çalışmada Peru'nun kırsal kesiminde yaklaşık 8 milyon kişinin *F. hepatica* riski altında olduğunu bildirilmiştir. Hipoendemik bir bölge olan Şili dışında Uruguay, Brezilya, Arjantin, Kolombiya gibi ülkelere de olgu bildirimleri yapılmıştır (6). İran, Lübnan, Türkiye ve Çin gibi Asya ülkelerinden de olgular rapor edilmiştir. İran'da 10.000 kişinin infekte olduğu ve 6 milyon kişinin de risk altında olduğu tespit edilmiştir. Afrika'da birçok ülkeden fasciolosis olguları bildirilmekte olup özellikle Mısır'da Nil deltasında endemik boyutlarda görülmektedir (6, 7).

*Fasciola hepatica* infeksiyonu her yaşta görülebilmekte ise de çocuklarda infeksiyonun endemik olduğu bölgelerde rastlanmaktadır. Bu bölgelerde bile 15 yaşından küçük çocuklardaki prevalans düşüktür. 6 yaşın altındaki çocuklarda prevalans en düşük düzeylerde (6, 9, 10).

*Fasciola hepatica* infeksiyonuna karşı doğal bağışıklık söz konusu değildir etkenle karşılaşan her insanda infeksiyon oluşur. Bu nedenle tüm sosyal sınıf ve meslek grubundan insanı etkilemektedir. Kırsal alanlarda yaşayanlarda kentlerde yaşanlara göre daha sık görülmektedir (6).

### 3.1. Yaşam döngüsü

*Fasciola hepatica*'nın yaşam döngüsü beş aşamada gerçekleşmektedir. Birinci dönem; yumurtaların son konaktan çevreye atılması ve yumurtaların çevrede gelişmesi, ikinci dönem; mirasidyumların oluşması ve onların ara konak salyangozları (genellikle *Lymnea* türü) bulması ve penetrasyonu, üçüncü dönem; ara konakta parazitin gelişimi, dördüncü dönem; ara konaktan serkaryanın çıkışı ve enkistasyon, beşinci dönem; son konak tarafından infektif metasekaryanın alınması ve olgun parazitin gelişmesidir (11).

*Fasciola hepatica* yumurtaları safra yolu ile duodenuma oradan da dışkı ile dışarı atılır. Yumurtalar dışkıda 3 haftadan birkaç aya kadar canlı kalabilirler. Isı, nem, ve pH gibi birçok fiziksel ve kimyasal faktör embriyon (mirasidyum) gelişiminde etkilidir. Embriyon gelişimi için en uygun ısı 23-26°C olup bu ısıda 2-3 hafta içinde embriyon gelişimi olmaktadır. Embriyon gelişimi 16°C'de ise gelişme 2-3 ay kadar sürmekte ve 10°C'nin altında gerçekleşmemektedir. Suya ulaşan yumurtalardan mirasidyumlar çıkar. Mirasidyumun yumurtan çıkması için ışığın rolü olduğunun ileri sürüldüğü teoriler vardır (1, 11, 12).

Mirasidyumlar, buldukları suda ara konak olan *Lymnea* türü salyangozlara penetre olur ve salyangozun lenf kanallarında tüylerini kaybederek sporokiste dönüşürler. Salyangozun lenf kanallarında 7. günden sonra sporokistlerden yavru sporokistler veya rediler oluşur. Redilerin hepatopankreasa migrasyonu ile salyangozların ölümüne kadar uzanan ciddi patolojiler oluşur. Göç eden eden redilerin her birinden 10-20 serkarya gelişir. Tek bir mirasidyumla infekte salyangozda 500 serkarya oluşmaktadır. Salyangozu terkeden serkarya su bitkilerine yerleşir. Burada kuyruğunu kaybeden serkaryalar, metaserkarya haline gelirler (11, 13).

Son konağa bulaşma, metaserkarya ile infekte bitki ve suların alınmasıyla olmaktadır. Metasekaryanın alınmasından 1 saat sonra, konağın bağırsak duvarında, ductus coledochus'un açılma deliğinin altında, ekskistasyon başlamakta 2 saat içinde ise bağırsak duvarını delerek abdominal boşluğa geçmektedir. Yeni ekskiste olan genç parazit periton duvarından geçerek karaciğere ulaşmakta, safra yollarına

yerleşmekte ve erişkin formu gelişmektedir. Burada seksüel olarak da olgunlaşan parazit yumurtlamaya başlamaktadır (11, 12).

Larvanın migrasyonu safra yollarına olmakla birlikte nadiren diğer organlara da yerleşim olmaktadır. İnsan vücudunda nadir olarak deri altında, lenf nodlarında, venlerde, apendiks apselerinde, midede, dalakda, pankreasda, timusda, akciğerde, plevral kavitede, iskelet kaslarında, kalpte, genitoüriner yollarda, gözde, beyinde parazit yerleşimine rastlanması periton dışında dolaşım sistemleri ile yayılım olabileceğini düşündürmektedir. Endemik bölgelerde çiğ yenen karaciğerdeki erişkin formlar faringeal mukozaya tutunarak halzoan sendromuna sebep olabilmektedirler (1, 2, 3, 6, 14).

### **3.2. Patoloji ve klinik**

Fasciolosis kliniği iki dönemde incelenebilir; birinci dönem parazitin vücuda girişi ile safra yollarına yerleşmesi arasında geçen larval dönem veya prepatent dönem, ikinci dönem parazitin karaciğer ve safra yollarına yerleşme dönemi veya kronik dönemdir (1, 15).

Hastalığın şiddeti genel olarak alınan parazitin sayısına ve parazitin yerleştiği organdaki dağılım şekline bağlı olarak değişmektedir. Fazla sayıda alınan parazit bacaklarda ve vücutta ödem ve kaşeksiye hatta ölüme neden olabilir. Fakat bu durum nadir olup genellikle az sayıda alınan parazite bağlı olarak yıllarca süren kronik bir tablo gelişir (1, 15).

Parazitin vücuda girişi ile safra yollarına yerleşmesi arasında geçen dönem genellikle asemptomatik seyreder. Değişik şiddette bazı lokal ve sistemik belirtiler oluşur. Hastalık iştahsızlık, mide-bağırsak şikayetleri ve ishal şeklinde başlayabilir. Tabloya düzensiz ve uzun süren ateş, terleme ve baş ağrısı şikayetleri eklenebilir. Ateş, karaciğer büyümesi ve karaciğere uyan bölgelerde ağrı şikayetleri hastalığı düşündürülen en önemli bulgulardır. Larvanın salgıladığı toksinlere bağlı olarak safra yollarında hiperplazi oluşur. Dışkıda yumurtaların görülmediği bu dönemde allerjiye bağlı olarak ürtiker, eozinofilili akciğer infiltrasyonları ile pnomoni, plevral effüzyon, ve ödem gibi akciğer tutulumuna bağlı bulgular görülebilir. Akciğer tutulumu olan olgularda öksürük, hemoptizi, nefes darlığı ve göğüs ağrısı gibi



solunum sistemi semptomları gözlenebilir. Bunun yanı sıra eozinofili, lökositoz ve orta derecede anemi gibi sistemik bulgularda gözlenebilmektedir (1, 6, 15, 16).

Parazitin karaciğer ve safra yollarına yerleştiği ve kronik dönem olarak da isimlendirilen dönem de genellikle asemptomatiktir. Safra yolları ve karaciğerde meydana gelen hasarın şiddeti alınan parazitin sayısına bağlıdır. Safra yolları epitel hiperplazisi, portal veya total safra yollarında fibrozise sıkça rastlanmaktadır. Ayrıca parazitin karaciğer parankimine invazyonu ile de abse oluşmaktadır. Kronik dönemde zayıflık, sindirim sistemi bozuklukları, ateş, karaciğer bölgesinde ağrı ve karaciğer büyümesi, bazen sarılık gibi belirtiler gözlenir. Nadiren safra yolları tıkanıklığı ve kolanjite yol açabilir ve bu durumda akut epigastrik ağrı, ateş, kaşıntı, sarılık, karaciğer büyümesi akut pankreatit, hemobilia ile birlikte mukozal erezyon ve eozinofili görülebilir. Çok daha nadir olarak, ekstrahepatik yerleşimlere bağlı olarak plöroperikarditis, menenjitis ve lenfadenopati oluşabilir (1, 6, 15, 16).

Fasciolosis komplikasyon olarak kanama yapabilir, subkapsüler hematom, hematobilia, hematemez ve melena görülebilir. Diğer bir komplikasyon bilier sirozdur. İnfeksiyonun seyri sırasında inflamasyon ve safra yolları epitelinin hiperplazisi ve hipertrofisi ile periduktal fibrosiz oluşabilir. Ölüme sebep olabilecek ciddi bir komplikasyon ise multipl ekstrahepatik venöz trombozdur. Çok az ölüm bildirilmiş ve ölümün safra yolları tıkanıklığı sonucunda gelişen tablodan kaynaklandığı tespit edilmiştir (6).

### 3.3. Tanı

İnfeksiyonun tanısı klasik olarak dışkıda *F. hepatica* yumurtalarının görülmesi ile konulmaktadır (1, 2, 6). Son konak tarafından alınan parazitin olgunlaşp yumurtlaması için 3-4 ay gerekte olup bu dönemde dışkıda parazit yumurtası bulunmamaktadır. Parazitin seksüel olarak olgun olmasına rağmen yumurtlamaması, yumurtaların dışkıya belirsiz aralıklarla atılması ve dışkıdaki yumurta sayısının az olması gibi nedenlerle dışkı incelemesi tek başına tanı için yeterli olmayabilir (6).

*Fasciola hepatica* ile infekte koyun ve sığır karaciğerlerinin yenilmesi durumunda dışkıda parazit yumurtaları görülebilmektedir. Bu nedenle dışkı

incelemesinde yumurta saptanan durumlarda yalancı parazitliği ekarte etmek için hastanın karaciğer yeme öyküsünün sorgulanması ve gerekli durumlarda diyet uygulanarak dışkı incelemesinin tekrarlanması önerilmektedir. Ülkemizde görüldüğü rapor edilmemiş ise de *F. hepatica* yumurtaları ile benzer görünüm ve büyüklükte olan *Fasciolopsis buski* ve *Echinostoma ilocanum* yumurtalarını dışkı bakışı ile birbirinden ayırt edebilmek oldukça zor olduğundan tanıda güçlük çekilebilir. Bu nedenlerle, dışkıda *F. hepatica* yumurtalarının görülmesi kuvvetle fasciolosisi düşündürmekle birlikte tanının klinik ve laboratuvar testleri ile desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca, ektopik yerleşimin olduğu durumlarda dışkıda parazit yumurtası saptanmamakta ve tanı klinik ve laboratuvar testleri ile konulmaktadır (6).

Akut fasciolosisde ateş, karaciğer büyümesi ve ağrı, kronik olgularda ise kolanjit ve bilier kolik gibi bir çok hastalıkta görülebilen ve fasciolosisde özgül olmayan semptom ve bulgular sebebiyle klinik, kesin tanısını koydurmaktan çok tanıyı desteklemek amacıyla kullanılmaktadır. Benzer şekilde, hastalarda fasciolosisde özgül olmayan eozinofili, lökositoz, anemi, hipoalbuminemi ve hiperglobunemi gibi laboratuvar bulguları saptanabilir. Anemi normokrom normositer bir anemi olup parazitin direkt kanla beslenmesinden kaynaklanmaktadır. Karaciğer enzimlerinden glutamate dehydrogenase ve glutamate-oxaloacetate aminotransferase seviyeleri fasciolosisin erken dönemlerinde artarak parankimal dönemim sonlarına doğru pik yaparlar. Bu piki takiben safra yollarındaki hasarın göstergesi olan  $\gamma$ -glutamyl transferase tespit edilir (6, 15).

ELISA, Counterelektroforez ve IHA gibi serolojik yöntemler, fasciolosisin tanısında ve seroepidemiolojik çalışmalarda en sık kullanılan yöntemlerdir. ELISA, özellikle de FAST-ELISA tarama testi olarak Western blot ise doğrulama testi olarak tercih edilmektedir. Fasciolosisin tanısında kullanılan ELISA'nın duyarlılık ve özgüllüğü testlerde kullanılan antijenler bağlı olarak değişmektedir. Serolojik çalışmalarda antijen olarak somatik antijenler ve E/S antijenleri kullanılmıştır.

Son yıllarda yağ asidi bağlayan protein, glutatyon-s-transferaz ve cathepsin proteaz proteinleri gibi purifiye, nativ ve rekombinant antijenler kullanılmaya başlanmıştır (16).

Radyolojik yöntemlerde fasciolosise özgül bulgu yoktur ancak tanıya yardımcı olabilmektedir. Ultrasonografide bulunan safra yollarında dilatasyon ve duvar kalınlaşması hastalığın tanısında güçlü bir kriter olmayabilir. Dikkatli bir bakı ile Abdomen Sintigrafisinde akut fasciolosisli hastaların yaklaşık %90'ında anomalileri görebilmekteyiz. Sintigrafide lezyonlar, karakteristik olarak küçük, çok sayıda, birbirinden farklı, hipodens lezyonlar şeklindedirler. Mikroapseler sıklıkla supkapsüler yerleşimli ve tünel benzeri kontras gösteren görünümündedirler. Karaciğerde kapsül kalınlaşması ve supkapsüler hemoraji tanımlanmıştır. Manyetik rezonans (MR) ile akut fasciolosisli hastaların karaciğerlerinde parankimal harabiyet gözlenebilmektedir (17, 18, 19).

Fasciolosis tanısı için karaciğer biyopsisine gerek duyulmaz. Ancak yapılırsa, örneklerde nekroz alanları, ray benzeri parankimal harabiyet, bol eozinofili ile birlikte polimorfonükleer infiltrasyon, Charcot Leyden kristalleri, granuloamlar, fibrosis ve safra yolu proliferasyonu görülebilir. Biyopsi örneklerinde nadiren olgun parazit veya parazit yumurtalarına rastlanabilir (17).

### 3.4. İmmünoloji

Bağışıklık sistemi doğal ve edinsel olarak ikiye ayrılmaktadır. Organizma doğal anatomik ve fizyolojik yollarla mikroorganizmayı engellemeye çalışır. Mikroorganizma bu engelleri aştığında edinsel bağışık yanıt gelişmektedir. *F. hepatica*'ya karşı doğal yanıtta bağırsak epiteli, periton ve mide pH'ı gibi faktörler rol oynamaktadır (20). Fakat parazite karşı edinsel cevap daha önemlidir. Edinsel immünite, antikorların sentez ve salınımı düzenleyen sıvısal immünite, sitokinler salgılayarak immün yanıtı düzenleyen hücreli immünite olarak ikiye ayrılmaktadır. Hücreli immünite de CD4<sup>+</sup> T hücreleri ve CD8<sup>+</sup> T hücreleri rol oynamaktadır (21).

CD4<sup>+</sup> T hücreleri, sitokin salgılama durumlarına ve fonksiyonlarına göre Th1 ve Th2 şeklinde iki büyük gruba ayrılır. Th1 hücreleri, IFN  $\gamma$ , IL-2 ve TNF- $\beta$  üretimini ve makrofaj aktivasyonunu ve opsonize edici antikorların üretimini sağlar. Gecikmiş tip hipersensitivite ve inflamatuvar reaksiyonlarda rol alır. Th2 hücreleri,

IL-4, IL-5, IL-6 ve IL-10 üretimini sağlarken IgE, eozinofil ve mast hücrelerini içeren tip I hipersensitivite reaksiyonlarını uyarır (21):

Bir çok helmantik parazitoza karşı oluşan immün yanıtta Th2 cevabının ön planda olduğunu ve IgE düzeyinin arttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte *F. hepatica* enfeksiyonu sırasında meydana gelen immün cevap hakkındaki bilgilerimiz sınırlıdır (20).

*Fasciola hepatica* ile infekte farelerde yapılan çalışmalar lokal ve sistemik Th2 cevabının varlığını, periferik kan ve kemik iliği hücrelerinde belirgin bir eozinofili artışı olduğunu göstermiştir. Deneysel fasciolosis oluşturulan farelerde lokal mezenterik ve hepatik lenf nodüllerinde ve dalakta yüksek oranda IL-4, IL-5 ve IL-10 sekrete edildiği fakat IFN- $\gamma$  ve IL-2 seviyesinde bir artış olmadığı gösterilmiştir (20, 22).

Genç parazitler karaciğerde enfeksiyondan sonra en erken 4. gün görülürken, infekte ratlarda enfeksiyondan sonraki ilk hafta içinde çok az olan makrofaj ve eozinofilik hücre sayısı enfeksiyondan iki hafta sonra yükselmeye ve doku harabiyetinin olduğu bölgelerde birikmeye başlamaktadır. CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> lenfositlerinin toplanmaya başlaması da enfeksiyondan iki hafta sonra başlamaktadır (20, 23-26).

İnfekte koyunlarda lokal immünolojik ve inflamatuvar reaksiyonları gösteren histolojik çalışmalar; enfeksiyonun erken döneminde eozinofil ve CD4<sup>+</sup> infiltrasyonunu, enfeksiyonun geç döneminde ise CD8<sup>+</sup> ve  $\gamma\delta$  TCR<sup>+</sup> infiltrasyonun olduğunu göstermiştir. Ayrıca IgG1 antikör cevabının IgG2 cevabının üzerinde baskın bir rol oynadığını gösterilmiştir (20, 27-29).

Fasciolosisli insanlarda, semptomlara ek olarak sistemik bir eozinofili, IgM, IgG ve IgE yanıtı gözlenmektedir. İnfekte insanlarda anti-*Fasciola hepatica* IgE antikörleri hastaların %48'inde tespit edilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile parazitin E/S antijenlerine ve cathepsin L1'e karşı konak IgG1 ve IgG4 yanıtının daha baskın olduğu bildirilmiştir (20).

### 3.5. Tedavi

İnsan fasciolosisinin tedavisinde bithinol, praziquantel, mebendazol, triklabendazol gibi ilaçlarla değişik derecede başarı sağlanmıştır. Önceleri praziquantel denenmiş fakat olumlu sonuçlar alınmamıştır (30). Fasciolosisli olguların tedavisinde 30 mg/kg/gün 5 gün bithionol kullanımı sonrası hastaların yaklaşık %20-30'un da ikinci bir kür tedavisi gerekmiştir (30, 31). Ayrıca bithional'ın 10-15 gün ve günde üç kez alınması gerekmektedir. Hastaların %50'sinde bithionol kullanımı ile, bulantı, karın ağrısı, döküntü ve ishal gibi yan etkiler görülebilmektedir (30).

Benzimidazole içeren triklabendazol protein ve mikrotübüler sentezini inhibe ederek etki gösterir. İyi tolere edilebilen ve kolay uygulanabilen bir ilaç olan triklabendazol 1983'den beri veteriner parazitolojide hem erişkin hem de genç parazite karşı kullanılmaktadır. 1988 yılından itibaren Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanılan bu ilaç 1989'da İran'da bir epidemi sonrası Dünya Sağlık Teşkilatı ile ortak bir çalışmada kullanılmıştır (17, 30). Triklabendazol ile tedavi başarısının bithinol, praziquantel ve mebendazole göre daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Triklabendazolün 10 veya 20 mg/kg dozlarda, tek doz veya 12-24 saat arayla iki doz gibi farklı doz ve uygulama şekilleri bulunmaktadır. Tek doz şeklinde uygulamanın tedavi başarısı %79.4, iki doz uygulamanın %92.2-93.9 düzeyinde olduğu bildirilmektedir (32, 33, 34, 35, 36, 37). Belirgin yan etkileri olmamakla birlikte triklabendazolün hafif karın ağrısı, bulantı gibi yan etkileri vardır (6, 17, 30).

Fasciolosis tedavisinin değerlendirilmesinde, klinik semptomların bir kaç hafta veya bir kaç ay içinde düzelmeye başlaması, periferik eozinofilide azalma, dışkıda yumurtaların kaybolması, radyolojik bulguların düzelmesi ve ELISA titrelerinin 6 ay ile 2 yıl arasında derecede derece azalması kullanılmaktadır. Eğer tedavinin altıncı ayında bu düzelmeler yoksa tedavi yinelenmelidir (17, 38).

### 3.6. Korunma ve kontrol

*Fasciola hepatica*'nın endemik olduğu bölgelerde koruyucu halk sağlığı eğitimi verilmesi, sağlık çalışanlarının bilgilendirilmesi ve su bitkilerinin pişirilmeden yenmemesi önerilmektedir.

Laboratuvarlarda çalışan teknik personel fasciolosisin tanısı için eğitilmelidir. Üniversiteler ile araştırma merkezleri arasında koordinasyon sağlanmalı, infeksiyonun varlığı ve yaygınlığı tespit edilmeli ve insan olgularının tedavisi için ilaçlar temin edilmelidir.

Hastalığın kontrolü ve önlenmesi için Sağlık bakanlığı ve ilgili kuruluşlar gibi sektörler arası işbirliği ile ulusal bir program uygulanmalıdır (39).

### 3.7. *Fasciola hepatica*'nın moleküler yapısı

*Fasciola hepatica*'nın moleküler yapısı hakkında çok az şey bilinmekte olup bu konudaki bilgiler henüz başlangıç aşamasındadır. Yaşam döngüsü boyunca *F. hepatica* farklı gelişim dönemlerinden geçmekte ve bu dönemlerde antijenik yapı değişmektedir. *F. hepatica* populasyonları arasında genetik çeşitlilik görülmektedir. Bu genetik çeşitliliğin mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (40).

### 3.8. Proteazlar

Proteazlar proteinlerin hidrolizini katalizleyen bir enzim grubudur. Proteazlar katalizlediği reaksiyonun tipi, katalizledikleri bölgenin kimyasal yapısı, etkinlik gösterdikleri bölge gibi değişik kriterlere göre sınıflandırılmaktadır. Ekili oldukları bölgeye göre endopeptidaz ve ekzopeptidaz şeklinde iki büyük gruba ayrılırlar. Ekzopeptidazlar, substratların amino veya karboksi uçlarındaki peptid bağlarını kırarken endopeptidazlar substratların orta kısımlarındaki peptid bağlarını kırarlar. Proteazlar ilave olarak etkinlik gösterdikleri bölgedeki fonksiyoner gruplara bağlı olarak serin proteazlar, aspartik proteazlar, sistein proteazlar ve metalloproteazlar şeklinde dört gruba ayrılabilirler (41).

Genelde ekstrasellüler proteazlar, büyük proteinleri küçük moleküllere hidrolize ederek hücrelerin absorpsiyonuna yardımcı olurken intrasellüler proteazlar metabolizmanın düzenlenmesinde kritik bir role sahiptir. Proteazlar, protein



katabolizması, kan pıhtılaşması, hücre büyümesi ve migrasyon, doku düzenlenmesi ve gelişmenin morfogenezi, inflamasyon, tümör büyümesi ve metastaz, zimogenlerin aktivasyonu, hormonların salınımı, prokürsör proteinlerden farmakolojik olarak aktif peptidlerin oluşumu, sekretuar proteinlerin membrandan transportu gibi bir çok fizyolojik ve patolojik olayda önemli rol oynarlar (41).

Tüm proteazlar hücreleri kontrolsüz yıkımlardan korumak için sinyal peptid ve propeptidden oluşan bir proregion bölge ile birlikte sentezlenmektedir. Proregion bölge matür enzimin güçlü ve selektif bir inhibitörüdür (42). Matür enzimin son şeklini alması için, ilk olduğu yerden sinyal peptidi aracılığı ile endoplazmik retikuluma geçmesi, burada glikozilasyona uğraması, golgi kompleksine geçerek mannoz rezidülerinin fosforilasyona uğraması ve lizozomlarda proregion bölgesinin kesilmesi gerekmektedir. Proregion bölgesindeki propeptid proteinin katlanarak üç boyutlu yapısının oluşmasına da yardımcı olmaktadır (43, 44, 45).

Sistein proteazlar hem prokaryot hem de ökaryotlarda bulunurlar. Yaklaşık 20 farklı sistein proteaz ailesi tanımlanmıştır. Bütün sistein proteazlar katalitik bölgesinde sistein veya histidin içerirler. Aileler arasında sistein ve histidin rezidüleri farklıdır. Sistein proteazlar yan zincir spesifitesine göre papain benzeri, tripsin benzeri, glutamik asit benzeri ve diğerleri şeklinde dört önemli guruba ayrılırlar. Papain en iyi bilinen sistein proteazdır (41).

Cathepsin B ve cathepsin L sistein proteazlar içinde en iyi tanımlananlarıdır (46, 47). Bu enzimler hemoglobini, immünoglobulinleri ve fibrinojeni parçalamaktadırlar. Parazitin hem olgun hem genç dönemlerinde oluşan cathepsin L, IgG ve IgM'i parçalamakta ve eozinofillerin tutunmasını önleyerek immün yanıtı kaçınmasına yardımcı olmaktadır. Cathepsin L proteaz'ın önemli bir proteolitik özelliği de fibrinojeni parçalaması ve pıhtı oluşumudur. Kollejenolitik aktivite ile hücre duvarı yapısında bulunan fibronektin ve lamininin parçalanmasını da sağlamaktadır (48, 49, 50, 51).

*Fasciola hepatica* ve onun E/S ürünleri üzerinde yapılan çalışmalar 27-29 kDa ağırlığında cathepsin L proteinazların varlığını göstermiştir. Işık ve elektron mikroskopik seviyede yapılan immüno-lokalizasyon çalışmaları ile, bu proteazın *F. hepatica* bağırsak epitel hücrelerindeki veziküllerde bulunduğu gösterilmiştir.

Cathepsin L parazitin E/S proteinlerinin %60-80'lik bir kısmını oluşturmaktadır (45, 52, 53).

Daha sonra yapılan çalışmalar ile cathepsin'in tek bir proteaz olmayıp, 27 kDa'lık cathepsin L1 ve 29.5 kDa'lık cathepsin L2 olmak üzere iki ayrı enzim olduğunu gösterilmiştir. Cathepsin L1 ve cathepsin L2'nin N-terminal DNA dizilimleri biyokimyasal ve fizikokimyasal olarak farklılıklar içermektedir. Yedi numaralı protein cathepsin L1'de prolin, cathepsin L2'de arjinin'dir (45, 52, 54).

*Fasciola hepatica* ve diğer helmintlerinin major bir proteazı olan cathepsin L1, parazitin migrasyonunda, dokulara penetrasyonunun kolaylaştırılmasında, beslenmesinde, safra yollarında ülserasyon oluşumunda ve immün yanıtta kaçışında rol oynamaktadır. Cathepsin L1 ve cathepsin L2 proteinazların her ikisi de hücre dışı matriks proteini, kollagen, laminin, fibronektin, tip IV kollagen gibi bir çok proteini parçalamaktadır (41, 49, 55, 56).

Cathepsin L1 protein, eozinofillerin yeni eksiğe tutunmasını önlemektedir (50). Ayrıca immünoglobulinleri parçalayıp parazite tutunmasını engelleyerek parazitin immün sistemden kaçmasına yardımcı olmaktadır. *F. hepatica*'nın her gelişme döneminde salgılanan E/S ürünlerindeki cathepsin L1 enzimi tüm IgG alt gruplarını spesifik olarak menteşe bölgesinden parçalayarak Fab ve Fc kısımlarına ayırmaktadır (48, 51).

*Fasciola hepatica* ile infekte kişilerde cathepsin L1'e karşı spesifik IgM, IgG (IgG1 ve IgG4), IgA ve IgE antikor cevabı gelişmektedir (20).

Cathepsin L1 klonlanmış ve rekombinant cathepsin, öncelikle *E. coli*'de (57), sonra insekt hücrelerinde (58) ve *Saccharomyces cerevisiae*'de (59) açıklanmıştır. *F. hepatica* cathepsin L1'in gen bankasından elde edilen DNA dizilim analizleri incelendiğinde yedi farklı izolat görülmektedir. Bu izolatlar AJ279092, AF271385, L33772, U62288, L33771, AB00306, Z22765 olup birbirleriyle sırasıyla %96, 87, 88, 93, 95, 92, 78 oranında benzerlik göstermektedir (60, 61, 62).

Çalışmamızda Wijffels ve arkadaşları tarafından izole edilen ve Genbank L33771'de tanımlanan izolattan yararlanılmıştır. *F. hepatica* cathepsin L1 geni bu izolatta, 1.062 nükleotid büyüklüğünde, kodlayan bölgesi 25-1.005 nükleotit (nt) arasında, kodlamayan bölgeleri ise 5' ucunda 1-24 nt ve 3' ucunda 1.006-1.062 nt



arasındadır. 25-1.005 nt arasında bölge, 326 aminoasit (aa)'dan oluşan bir proteini kodlamaktadır. Bu proteinin 17 aa'sı sinyal peptidi, 90 aa'sı proregion ve 219 aa'sı matür enzimden oluşmaktadır (45).

*Fasciola hepatica*, koyun, keçi ve sığır gibi besi hayvanlarında oldukça sık insanlarda ise daha nadir görülen fasciolosisin etkeni olan bir karaciğer trematodudur. Dünyada ve ülkemizde yaygın olarak bulunmakta ve önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. İnsan infeksiyonlarında kesin tanı dışkıda *F. hepatica* yumurtalarının görülmesiyle konur. Serolojik tanı yöntemlerinden ELISA en sık kullanılan yöntemdir.

*Fasciola hepatica* ES antijenlerinden catepsin L1 proteaz enziminin antijenik olarak daha özgül olduğu ve çapraz reaksiyonların çok daha az görüldüğü bildirilmektedir. Catepsin L1 enzimi *F. hepatica*'nın dokulara penetrasyonunda, immün yanıtın gelişiminde ve fasciolosisin patogenezinde oldukça önemli görevler almaktadır.

Klonlama ve protein açıklatılma çalışmaları parazitolojide yeni bir alan olup ülkemizde de henüz gelişme aşamasındadır. *F. hepatica* E/S antijenlerinden catepsin L1 proteaz enziminin klonlanması ülkemizde henüz yapılmamıştır. Oysa rekombinant catepsin L1 enziminin elde edilmesi ile daha duyarlı serolojik testler geliştirilmesi ve immünizasyon çalışmalarının yapılması mümkün olabilecektir.

Fasciolosisin serolojik tanısı ve fasciolosisden korunma için aşı geliştirme çalışmaları yapılmış ve elde edilen sonuçların geliştirilmesi çalışmaları devam etmektedir. Ülkemizin de bir sorunu olan fasciolosis için ülkemiz olanaklarıyla benzer çalışmaları yapabilmek ve serolojik hızlı tanı testleri geliştirmek amacındayız. Bu amaçla, doğal olarak infekte sığır karaciğerinden elde edilen *F. hepatica*'dan toplam RNA izolasyonu yapılması ve kopya DNA (cDNA)'nın PZR ile çoğaltılması, kesim enzimleriyle kesilen DNA'nın plazmite yerleştirilmesi ve rekombinant plazmitin Vero hücrelerine transfekte edilip catepsin L1 proteinin açıklatılması planlanmıştır.

## 4. GEREÇ ve YÖNTEM

### 4.1. Parazit

*Fasciola hepatica*'nın erişkin şekli Elazığ GÜNET kesimhanesinde kesimi yapılan doğal olarak infekte sığır karaciğerinin safra yollarından elde edildi. Kesilen sığırların karaciğerleri kontrol edilirken parazit şüpheli karaciğerler bistürü ile kesilerek safra yollarındaki *F. hepatica*'lar toplandı. Parazit, serum fizyolojik ile 5-6 kez yıkanarak fosfatla tamponlanmış tuzlu su (PBS= 8 gr NaCl, 0.2 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.3 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>12H<sub>2</sub>O, 0.1 gr MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O, 0.132 gr CaCl<sub>2</sub>) içine alınarak vakit kaybetmeden laboratuvara ulaştırıldı. Parazitten toplam RNA izolasyonu işlemi başlatılıncaya kadar PBS içerisinde 37°C'de bekletildi.

### 4.2. Hücre

Afrika yeşil maymun böbrek hücresi (Vero) Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Laboratuvarı'ndan sağlandı. Hücreler %10 Föetal Sığır Serum (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, A.B.D. ), 100 IU penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium'da (DMEM) (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, A.B.D. ) üretildi.

### 4.3. Plazmit (pCI-neo Mammalian Expression Vector)

pCI-neo Mammalian Expression Vector'ü Promega firmasından (Promega Co. Madison, WI, A.B.D. ) temin edildi. Bu vektör ana iskeleti pGEM<sup>®</sup>-3Zf (+) vektöründen derive edilen 5.472 baz çifti (bç) büyüklüğünde bir vektör olup protein açıklatılması (ekspresyonu) işlemi için kullanıldı. pCI-neo vektörü, neomisin fosfotransferaz geni ve ampisiline dirençlilik geni içermektedir. Ayrıca vektörün yapısında sitomegalo virüs (SMV) promotörü, T7 ve T3 RNA polimeraz promotör bölgeleri, SV40 orjini ve faj fl orjin bölgesi bulunmaktadır. T7 ve T3 promotör bölgeleri arasına klonlanacak olan DNA'nın yerleştirileceği ve *Nhe I*, *XhoI*, *EcoR I*, *Mlu I*, *Xba I*, *Sall*, *Acc I*, *Sma I*, *Not I* kesim enzimlerini tanıyan bölge mevcuttur (63). Çalışmamızda bu enzimlerden klonlamayı amaçladığımız *F. hepatica* cathepsin L1 genini kesmeyen *XhoI* ve *Sall* enzimleri seçilmiştir.

#### 4.4. *F. hepatica*'dan Toplam RNA izolasyonu

Toplam RNA izolasyonu steril steril koşullarda yapıldı. İşlem süresince eldiven kullanıldı. PBS içerisinden canlı olarak çıkartılan üç erişkin *F. hepatica* önce tartıldı. Ardından PBS ile birkaç kez yıkandı ve bistüri ile steril koşullarda olabildiğince küçük parçalara ayrıldı. Mikrosantrifüj tüplerine konulan parçacıkların her 50-100 mg'ına 1ml TRI reagent (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, A.B.D. ) eklendi. On dk süreyle +4°C'de 13.500 rpm'de santrifüj edildi. Tüpte oluşan üst sıvı pipetle yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine kullanılan TRI reagent'in her ml'si için 0.2 ml kloroform eklendi. Onbeş sn süre ile elle hafifçe çalkalandıktan sonra oda ısısında 10 dk süreyle bekletildi. Ardından onbeş dk süreyle +4°C'de 13.500 rpm'de santrifüj edildi. Tüpte oluşan ve üstten altta doğru sırasıyla RNA, protein ve DNA tabakalarından RNA içeren üst sıvı tabakası pipetle yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine başlangıçta kullanılan TRI reagent'in her ml'si için 0.5 ml isopropanol eklenerek 10 dk oda ısısında bekletildi. Bu sürenin sonunda yine on dk süreyle +4°C'de 13.500 rpm'de santrifüjlendi. Tüpte oluşan üst sıvı pipetle uzaklaştırıldı ve çöküntü üzerine başlangıçtaki TRI reagent'in her bir ml'si için en az 1 ml olacak şekilde %70'lik soğuk etanol eklendi. Bekletilmeden 5 dk +4°C'de 13.500 rpm'de santrifüjlendi ve üst sıvı uzaklaştırıldı. Hafifçe kurutulmaya bırakılan RNA peleti, içinde 1 µl RNasin (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D. ) bulunan 100 µl steril dH<sub>2</sub>O ile sulandırılıp -80°C'de stok örnek olarak saklandı (64).

#### 4.5. RNA miktarının ölçülmesi

Stok örneğin 10 µl'si 490 µl steril distile su ile sulandırıldı. Spektrofotometrede (Jasco V-530, Japonya ) 260nm dalga boyunda okutuldu. Spektrofotometrede Optik Dansite (OD)<sub>260</sub>: 1 değeri, RNA için 40 µg/ml miktarına eş tutularak RNA miktarı hesaplandı (65).

#### 4.6. Primerlerin oluşturulması

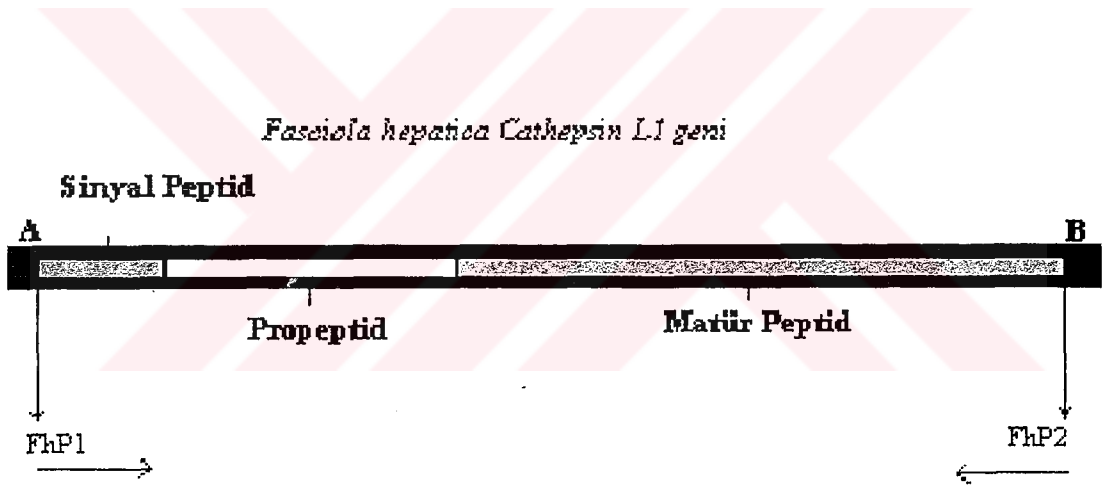
Tersine Transkripsiyon (TT) ve PZR için kullandığımız primerler *F. hepatica* cathepsin L1 geninin gen kodlayan bölgesine uygun olarak Genbank EMBL

L33771'den yararlanılarak dizayn edildi (Şekil 1). Dizayn edilen primerler FhP1 ve FhP2 olarak adlandırıldı. Midland (The Midland Certified Reagent Co, Texas, A.B.D. ) firmasından temin edildi.

FhP1 (5'- GG CTC GAG CCA CCA TGA GAT TGT TCA TAT - 3')

FhP2 (5'- GG GTC GAC TCA CGG AAA TCG TGC - 3')

Klonlama işleminde kullanmak üzere FhP1'e, *XhoI* enzimini tanıyan CTC GAG; FhP2' ye ise *Sall* enzimini tanıyan GTC GAC enzim kesim bölgesi eklendi. Aynı şekilde, ekspresyon işlemi sırasında protein ekspresyonunu arttırmak amacıyla FhP1'in ATG başlangıç kodonundan önce kozak dizisi (CCA) eklendi. Aynı amaçla FhP1 primerinde Arjinin aminoasitini kodlayan CGA baz dizilimindeki ilk nükleotit olan C, değiştirilerek (mutasyon) yerine A nükleotiti eklendi (65, 66, 67).



Şekil 1: *F. hepatica* cathepsin L1 geni ve primerler. A: 5' ucunda 1-24 nt kodlamayan bölge, B: 3' ucunda 1.006-1.062 nt kodlamayan bölge, 17 aa'lık sinyal peptidi, 90 aa'lık proregion, 219 aa'lık matür enzim, TT ve PZR'de kullanılan FhP1 ve FhP2 primerleri

#### 4.7. Tersine Transkripsiyon ile kopya DNA (cDNA) elde edilmesi

Tersine Transkripsiyon işlemi için başlangıçta FhP1 ve FhP2 primerleri yapılacak işleme uygun olarak 20 pmol olacak şekilde sulandırıldı. Ardından 2 µg

stok RNA ile 20 pmol FhP1 ve FhP2 primerleri bir mikrosantrifüj tüpünde birleştirildi. Bu tüp 70°C'de 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpler oda ısısına gelinceye kadar soğutuldu. Bu ürünün 10 µl'si ile 15 µl TT karışımı [1µl Moloney-Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) (Promega Co. Madison, WI, A.B.D. ), 1µl Reverse Transcriptase Buffer (Promega Co. Madison, WI, A.B.D. ), 1 µl RNasin (Promega Co. Madison, WI, A.B.D. ), 4 µl dNTP (Promega Co. Madison, WI, A.B.D. ), 8 µl dH<sub>2</sub>O] başka bir tüpte birleştirildi. Bu karışım da 37°C'de 1 saat inkübe edilerek cDNA elde edilmiş oldu (68).

#### **4.8. *F. hepatica* cathepsin L1 geninin polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması**

Polimeraz zincir reaksiyonu için; FhP1 ve FhP2 primerlerinden 20'şer pmol, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, her bir dNTP'den 200 µM, 2 µg cDNA ve 1.25U Taq DNA Polimeraz (Promega Co. Madison, WI, A.B.D. ) içeren 50 µl'lik karışım hazırlandı. *F. hepatica* cathepsin L1 geni 95°C'de 2 dk'lık ön ısıtma ile başlayan ve 94°C'de 1 dk ayrılma, 50°C'de 1 dk birleşme, 72°C'de 1 dk'lık uzamadan oluşan 35 döngü ile devam edip 72°C'de 10 dk'lık son uzama ile sonlanan PZR programı ile çoğaltıldı. Çoğaltılan geni görüntülemek için %1.5'lük agaroz jel hazırlandı. Bunun için 0.75 gr agaroz (Promega Co. Madison, WI, A.B.D. ) 50 ml Tris-asetat / EDTA elektroforez tamponu (TAE, 0.04 M Tris-asetat, 0.001 M EDTA) bir balon jöle içinde eritilerek kaynatıldı. Yaklaşık 54°C'ye kadar soğutulan karışıma 0.5 µg/ml oranında etidyum bromid (Promega Co. Madison, WI, A.B.D. ) eklenerek agaroz jel donduruldu. Örnekler jöle 6X yükleme tamponu (%0.25 bromfenol mavisi, %30 gliserol) kullanılarak yüklendi. Marker olarak 100 baz'lık ladder DNA (Promega Co. Madison, WI, A.B.D. ) kullanıldı. Yüz volt sabit akımla 30 dk elektroforez uygulandı. Ultraviyole (UV) ışık kaynağı altında agaroz jelde *F. hepatica* cathepsin L1 geni görüntülendi (65, 69).

#### **4.9. *F. hepatica* cathepsin L1 geninin agaroz jelden saflaştırılması**

Agaroz jelde görüntülenen cathepsin L1 DNA'sı, Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega Co. Madison, WI, A.B.D. ) kullanılarak üretici firma

önerisine göre aşağıdaki gibi saflaştırıldı: Önce DNA steril bir bistüri ile kesilerek mikrosantrifüj tüpüne konuldu ve üzerine 1 ml Resin eklendi. Bu tüp 65°C'deki su banyosunda yaklaşık 5 dk bekletilerek içindeki jelin iyice erimesi sağlandı. Birkaç dk oda ısısında bekletilen tüp içeriği, ucuna kolon yerleştirilmiş enjektöre boşaltıldı. Enjektör pistonu itilerek DNA'nın kolona tutunması sağlandı. Sonra enjektör içine %80'lik isopropanol'dan 2 ml konularak piston itildi. Kolon bir mikrosantrifüj tüpüne takılarak +4°C'de 7.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Yeni bir santrifüj tüpüne aktarılan kolonun üzerine 50 µl steril dH<sub>2</sub>O eklendi ve oda ısısında 5 dk inkübe edildi. Kolonun +4°C'de 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmesi ile DNA tüpte toplandı ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı (70).

#### 4.10. DNA miktarının ölçülmesi

Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılarak -20°C'de saklanan DNA örneği steril distile su ile sulandırıldı (10 µl DNA örneği + 490 µl distile su). Örnekteki DNA miktarı spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda ölçüldü. Spektrofotometrede Optik Dansite (OD)<sub>260</sub>: 1 değeri çift sarmal DNA için 50 µg/ml miktarına eş tutularak DNA miktarı hesaplandı (65).

#### 4.11. *F.hepatica* cathepsin L1 geni ve pCI-neo vektörünün restriksiyon enzimleriyle kesimi

Jelden saflaştırılan ve miktarı ölçülen *F. hepatica* cathepsin L1 DNA'sı ile pCI-neo vektörünün kesimi için *XhoI* ve *Sall* restriksiyon enzimleri kullanıldı. *F. hepatica* cathepsin L1 DNA'sının kesim işlemi için; steril bir mikrosantrifüj tüpünde 10 µl *F. hepatica* cathepsin L1 DNA'sı, 2 µl *XhoI* (Promega Co. Madison, WI, A.B.D. ) enzimi, 2 µl *Sall* (Promega Co. Madison, WI, A.B.D. ) enzimi, 4 µl bovine serum albumin (10mg/ml konsantrasyondaki 100XBSA), 4 µl 10X Buffer D enzim kesim solüsyonu (25 mM tris-asetat pH 7.8, 100 mM potasyum asetat, 10 mM magnezyum asetat ve 1 mM dithiothreitol) ve 18 µl dH<sub>2</sub>O birleştirildi. pCI-neo DNA'sının kesim işlemi için ise; steril bir mikrosantrifüj tüpünde 2 µl pCI-neo DNA'sı, 1 µl *XhoI* enzimi, 1 µl *Sall* enzimi, 2 µl bovine serum

albumin, 2 µl 10X Buffer D enzim kesim solüsyonu ve 12 µl dH<sub>2</sub>O birleştirildi. Her iki santrifüj tüpü enzim aktivasyonu için, 37°C'de bir gece bekletildi. (65).

Kesimi yapılan cathepsin L1 DNA'sını ve pCI-neo vektörünü görüntülemek için; 4.8. nolu başlıkta anlatıldığı şekilde %1.5'luk agaroz jel hazırlandı. Örnekler, 6X yükleme tamponu kullanılarak jele yüklendi. Jelde görüntülenen DNA'lar, 4.9. nolu başlıkta anlatıldığı gibi jelden saflaştırıldı. Saflaştırılan DNA'lar sulandırıldı. *F.hepatica* cathepsin L1 DNA'sının ve pCI-neo vektörünün ligasyonda kullanılacak oranını belirlemek için bu sulandırımın birer mikrolitresi %1.5'luk agaroz jelde görüntülenerek oran belirlendi. Ligasyon işlemine kadar -20°C'de bekletildi.

#### 4.12. Rekombinant plazmitin oluşturulması (Ligasyon)

Agaroz jelden saflaştırılarak -20°C'de bekletilen *F. hepatica* cathepsin L1 geninin pCI-neo Mammalian Expression vektörüne yerleştirilme işlemi için; 3 µl saflaştırılmış cathepsin L1 DNA'sı, 1 µl pCI-neo vektörü, 1 µl T4 DNA Ligase (MBI Fermentas, Graiciuno, Vilnius, Lithuania ) enzimi, 1 µl T4 DNA Ligase Tampon solüsyonu (MBI Fermentas, Graiciuno, Vilnius, Lithuania ) ve 4 µl dH<sub>2</sub>O'dan oluşan 10 µl'lik ligasyon karışımı bir mikrosantrifüj tüpüne konuldu. Bu karışım 16°C'de bir gece bekletildi. Elde edilen rekombinant plazmit ürünü pFhCL1 olarak adlandırıldı ve *E. coli*'ye transformasyon işleminde kullanıldı (65).

#### 4.13. Kompetan *Escherichia coli* (*E. coli*) JM 109 hücrelerinin hazırlanması

Kompetan *E. coli* hücreleri Rubidyum klorid metoduna göre hazırlandı (65, 71). İşlem için gerekli olan *E. coli* JM 109 suşu Promega (Promega Co. Madison, WI, A.B.D. ) firmasından sağlandı. Suşun çoğaltılması amacıyla Luria Bertani (LB) katı besi yeri kullanıldı. Luria Bertani (LB) katı besi yeri; %1 Bakto-tryptone, %0.5 Bakto-yeast extract, %1 NaCl ve %1.5 agar distile suda eritildi ve pH, 10 M NaOH ile 7.2'ye ayarlanarak hazırlandı. *E. coli*'nin steril koşullarda tek nokta ekimi yapıldı ve 37°C'de bir gece bekletildi.



Besi yerinde oluşan kolonilerden bir tanesi, içinde 5 ml'lik LB sıvı besi yeri bulunan tüpe ekildi ve çalkalama aparatı üzerinde 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Ardından tüp içeriği 100 ml'lik LB sıvı besi yerine aktarıldı. Üremenin varlığı belirli aralıklarla spektrofotometrede kontrol edilerek OD<sub>600</sub>=0.5 olana kadar yaklaşık 4 saat süreyle çalkalama aparatı üzerinde inkübasyona devam edildi. Bu işlemin sonunda besi yeri steril santrifüj tüplerine aktarıldı ve tüpler +4°C'de 3.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı. Pelet toplam 40 ml RF1 (100 mM RbCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>-4H<sub>2</sub>O, 30 mM K-Acetate, 10 mM CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O %15 Gliserol ) ile resüspanse edildi. Karışım buzlu su içinde 20 dk bekletildikten sonra +4°C'de 3.000 rpm'de 15 dk santrifüjlendi. Üst sıvı atıldıktan sonra pelet toplam 5 ml RF2 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 75 mM CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O, %15 Gliserol) ile tekrar resüspanse edildi. On dk buzlu suda bekletilen karışım her birinde 100 µl olacak şekilde steril mikrosantrifüj tüplerine paylaştırıldı. Bu tüpler -80°C'deki metanol içinde 10 dk bekletildi ve ardından kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı (65).

#### **4.14. Rekombinant pFhCL1 plazmitin kompetan JM 109 *E. coli* hücreleri içine sokulması (Transformasyon)**

Transformasyon işlemi için; önceden hazırladığımız 100 µl JM 109 kompetan *E. coli* hücrelerinin bulunduğu mikrosantrifüj tüpüne 5 µl ligasyon karışımı eklendi. Bu mikrosantrifüj tüpü sırasıyla buz içinde 30 dk, 42°C'lik su banyosunda 1.5 dk, buz içinde 1.5 dk bekletildi ve üzerine 400 µl LB sıvı besi yeri eklenerek çalkalayıcı aparat üzerinde 37°C'de 1.5 saat inkübe edildi (65). Böylece elde edilen transformasyon ürününün 100 µl'si, önceden hazırlanan 60 µl/ml ampisinli LB katı besi yerine ekilerek 37°C'de bir gece inkübe edildi. Süre sonunda besi yerinde kolonilerin varlığı görüldü. Bu kolonilerdeki hücrelerin transforme edilen rekombinant plazmiti içerip içermediğini anlamak için PZR tarama işlemi yapıldı.



#### **4.15. Kolonilerdeki rekombinant pFhCL1 plazmitinin PZR Tarama (PCR Screening) ile gösterilmesi**

Yukarıda sözü edilen kolonilere değdirilen steril kürdan bir santrifüj tüpü içindeki 15 µl'lik PZR karışımına [2 µl 25 mM'lık MgCl<sub>2</sub> (Promega Co, Madison, WI, A.B.D. ), 2 µl 10XPCR buffer (Promega Co, Madison, WI, A.B.D. ), 3 µl 1.25 mM dNTP (Promega Co, Madison, WI, A.B.D. ), 4 µl 10 pmol/µl cathepsin L1 genine özgü primerler ve 4 µl dH<sub>2</sub>O] temas ettirildi. Mikrosantrifüj tüpü, 95°C'de 10 dk bekletildi. Hafifçe santrifüj edilen tüpe 1 IU Taq DNA Polimeraz (Promega Co. Madison, WI, A.B.D. ) eklendi ve üzerine mineral yağ damlatıldı. Bu işlem her bir koloni için tekrarlandı. 95°C'de 5 dk ön ısıtma ile başlayan 94°C'de 1 dk, 55°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk'lık 25 döngü ile sonlanan PZR programı uygulandı. Elde edilen ürünler %1.5'luk etidyum bromidle boyanmış agaroz jelde UV altında görüntülendi (65, 72, 73).

#### **4.16. Alkali lizis metoduyla rekombinant pFhCL1 plazmit DNA'sının elde edilmesi**

Alkali lizis metodu PZR-T ile pozitif bulunan kolonilere uygulandı. Bu amaçla; bir cam tüpün içine 10 ml LB sıvı besi yeri ve 60 µg/ml'lik ampisilinden 10 µl konuldu. Steril koşullarda kolonilerden bir tanesinden tüpe ekim yapıldı ve 37°C'de 14 saat süreyle inkübe edildi. Bu sürenin sonunda tüp +4°C'de 4.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Üst sıvı döküldü, pelet 1 ml STE (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) ile resüspanse edildi ve mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 13.500 rpm'de +4°C'de 10 dk santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırılarak pelet üzerine 150 µl Solüsyon I [50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM EDTA (pH 8.8)] eklenerek pipetle homojen hale getirildi. Buzlu suda 10 dk bekletildi. Sonra içine taze hazırlanmış 300 µl Solüsyon II (0.2 N NaOH, %1 SDS) eklendi ve buzlu suda 5 dk bekletildi. Daha sonra üzerine 200 µl Solüsyon II (5 M Potasyum asetat ve %10 glasiyel asetik asit içeren solüsyon) eklenerek buzlu suda 10 dk bekletildi. Bu tüp +4°C'de 13.500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Üst sıvı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine eşit miktarda fenol kloroform izoamilalkol (25:24:1) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, A.B.D. ) eklenerek vortekslendi. +4°C'de

santrifüj edildi. Yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılan üst sıvıya eşit miktarda kloroform (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, A.B.D. ) eklenerek vortekslendi ve +4°C'de 13.500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Üst sıvı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine 10 µg/ml DNase free panreatik RNase (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, A.B.D. 10 µg/ml stok konsantrasyonu) eklendi. 37°C'lik su banyosunda 2 saat bekletildi. Süre sonunda üzerine eşit miktar fenol kloroform izoamilalkol (25:24:1) eklenerek vortekslendi. +4°C'de 13.500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Üst sıvı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak üzerine sıvınının 1/10'u kadar sodyum asetat ve iki katı soğuk etanol eklendi. -20°C'de bir gece bekletildi. Ardından -20°C'den alınarak 4°C'de 13.500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Üst sıvı döküldü, pelet üzerine %70 soğuk etanol eklenerek vortekslendi. +4°C'de 13.500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Üst sıvı atılarak pelet oda ısısında kurutuldu. Steril dH<sub>2</sub>O ile sulandırıldı ve -20°C'de saklandı (65).

#### **4.17. Rekombinant plazmit (pFhCL1) varlığının kesim deneyleri ile doğrulanması**

Alkali lizis yöntemiyle elde edilen plazmit DNA'sı *XhoI-Sall* ve *EcoRI-Sall* kesim enzimleriyle kesildi ve etidyum bromidle boyanmış %1.5'lük agaroz jelde görüntülendi (65).

#### **4.18. Rekombinant pFhCL1 plazmitinin Vero hücrelerinde açıklatılması**

##### **4.18.1. Rekombinant plazmit ile Vero hücrelerinin transfeksiyonu**

Rekombinant pFhCL1 plazmitinin Vero hücrelerine geçici (transient) transfeksiyonu TransFast Transfection Reagent (Promega Co, Madison, WI, A.B.D. ) kiti kullanılarak kit prosedürüne göre yapıldı. Buna göre; transfeksiyondan bir gün önce, oda ısısında ısıtılan TransFast Transfection Reagent'ın konsantrasyonu 1 mM olarak hazırlandı ve -20°C'ye kaldırıldı. Yirmi beş cm<sup>2</sup>'lik hücre üretim kabının %80'i Vero hücreleri ile kaplandıktan sonra transfeksiyon işlemi yapıldı. Transfeksiyon öncesi -20°C'de bekletilen TransFast transfeksiyon solüsyonunun oda ısısında çözülmesi sağlandı. Mikrosantrifüj tüpünde 1 µg rekombinant pFhCL1

plazmiti ile 3 µl TransFast Transfection Reagent karıştırılıp vortekslenildi ve oda ısısında 15 dk bekletildi. Bu sırada hücre üretim kabındaki vasat boşaltılarak iki kez PBS ile yıkandı. Sonra rekombinant plazmit ve TransFast karışımına 1 ml DMEM eklenerek hücre üretim kabına kondu ve 37°C'de bir saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kabin içine 3.5 ml DMEM, 0.5 ml fetal sıgır serumu eklenerek 37°C'de 72 saat daha inkübasyona bırakıldı (74).

#### **4.18.2. Transfekte Vero hücrelerinin parçalanması ve Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) için hazırlanması**

İnkübasyon sonunda hücre üretim kabındaki sıvı döküldü. Kap iki kere PBS ile yıkandı. Üzerine 2 ml PBS konularak hücreler kaptan plastik bir kazıyıcı ile dikkatlice kazındı ve kap içeriği mikrosantrifüj tüplerine konuldu. +4 °C'de 13.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Üst sıvı atılarak pelet 450 µl SDS yükleme solüsyonu (loading buffer; %0.2 Sodyum dodesil sulfat, 125 mM Tris-HCl, %10 gliserol, %0.2 2-merkaptotanol, %0.002 bromfenol mavisi) ile sulandırıldı (65).

#### **4.18.3. Rekombinant cathepsin L1 proteininin Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)**

Rekombinant cathepsin L1 proteininin varlığını göstermek amacıyla SDS-PAGE ile transfekte Vero hücrelerinin protein analizi yapıldı. SDS-PAGE analizi şu şekilde yapıldı: Biri cam diğeri mika olan 20x20x0.5 cm ebatlarındaki elektroforez kasetinin her iki yanına ve alt tarafına 0.5 cm kalınlığındaki çubuklar yerleştirildi ve sıvı sızdırmayacak şekilde bantlandı. Hazırlanan 50 ml %10'luk ayırıcı jel (seperasyon jel; 19.8 ml dH<sub>2</sub>O, 16.7 ml %30 poliakrilamid, 12.5 ml 1.5 M Tris pH=8.8, 500 µl %10'luk SDS, 500 µl amonyom persülfat, 30 µl N,N,N,-N tetrametiletülenamin (TEMED) solüsyonu) elektroforez kasetinin içine döküldü. Yüzey gerilimini azaltmak ve jelin hava ile temasını keserek polimerizasyonu kolaylaştırmak amacıyla jelin üzerine hemen 2 ml bütanol (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, A.B.D. ) eklendi ve polimerizasyon için 30 dk bekletildi. Bütanol döküldü ve dH<sub>2</sub>O ile yıkanarak kurutma kağıdı ile kurutuldu. Kaset içinde polimerize olan jelin üzerine 20 ml %5'lik yığınlayıcı jel (stacking jel; 12.6 ml dH<sub>2</sub>O, 3.4 ml

%30 akrilamid karışımı, 2.5 ml 1 M Tris pH=6.8, 200 µl %10 amonyum persülfat, 20 µl TEMED içeren solüsyon) döküldü. Vakit kaybetmeden örneklerin yükleneceği kuyucukların oluşması için tarak yerleştirildi ve polimerizasyon için 30 dk beklendi. Tarak çıkarılarak kuyucuklar dH<sub>2</sub>O ile yıkandı ve jel parçacıkları temizlendi. Elektroforez kaseti soğutmalı elektroforez tankına Owl separation systems (Apogent Technologies, Portsmouth, NH, A.B.D. ) yerleştirildi. Tank, Tris-glycine elektroforez solüsyonu (950 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde 94 gr glisin ve 1.51 gr Tris base çözüldü ve 50 ml %1 SDS ilavesi ile 5X stok hazırlandı) ile dolduruldu. Anot ve Katot kabloları tanka bağlanarak 150 Volt sabit akımla 10 dk oda ısısında ön elektroforez yapıldı. 4.18.2.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan örneklere %10 dithiothreitol (DDT) eklendi ve kaynar suda 3 dk bekletildi. Moleküler ağırlık markeri (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, A.B.D. ) ise kaynar suda 20 sn bekletildi. Kuyucuklara, örnekler 40 µl, moleküler ağırlık markeri 5 µl olacak şekilde yüklendi. Elektroforez işlemi oda ısısında 150 Volt akımla 8 saatte gerçekleştirildi (65).

#### **4.18.4. SDS-PAGE'te elde edilen rekombinant cathepsin L1 protein bandının Western blotting yöntemiyle doğrulanması**

Elektroforezin sekizinci saatinin sonunda elektirik akımı kesilerek elektroforez kaseti tanktan çıkarıldı. Yığınlama jeli kesilip atıldı. Jel ile aynı ebatlarda nitroselüloz membran (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, A.B.D. ) ve 6 adet Whatmann 3M kurutma kağıdı hazırlandı. Nitroselüloz membran distile suda; ikişer adet kurutma kağıdı ise Anot Solüsyonu I (0.3 M Tris pH=10.4, %20 metil alkol), Anot Solüsyonu II (0.0025 M Tris pH 10.4, %20 metil alkol) ve Katot Solüsyonu (0.025 M Tris pH 9.4, %20 metil alkol)'nda 10'ar dk. bekletildi. Jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana transferi Semi Dry System (WED Camp, Seattle, WA, A.B.D. )'de gerçekleştirildi. Transfer cihazına anottan Katota doğru sırasıyla; Anot I ve Anot II'de ıslatılmış kurutma kağıtları, nitroselüloz membran, jel ve en son olarak da katotta bekletilmiş kurutma kağıtları konuldu. Anot ve Katot kabloları güç kaynağına bağlandı. Transfer işlemi oda ısısında 10 mA akımla 2 saatte tamamlandı. İşlem sonunda nitroselüloz membran şeritler halinde kesildi. Moleküler ağırlık

markerinin bulunduğu şerit kurutulup saklandı. Şerit şeklinde kesilen membranların bloklanması amacıyla; sulandırma solüsyonu (%0.02 Tween 20 PBS) ile sulandırılan %5'lik yağsız süt tozunun bulunduğu kaba konulan membranlar 37°C'de sallayıcı üzerinde 2 saat inkübe edildi. Membranlar PBS ile yıkandı ve fasciolosis yönünden ELISA'da pozitif ve negatif bulunan insan serumları ile inkübe edildi. Bu amaçla pozitif ve negatif serumlar sulandırma solüsyonu ile 1/50 oranında sulandırıldı ve üzerlerine membranlar bırakılarak 4°C'de sallayıcı üzerinde bir gece bekletildi. Kap içindeki serumlar döküldü. Membranlar yıkama solüsyonu (%0.1 Tween 20 PBS) ile oda ısısında 5 dk. yıkandı. Bu işlem 5 kez tekrarlandı. Ardından membranlar sulandırma solüsyonu ile 1/1000 oranında sulandırılan goat Anti human IgG Biotin konjuge (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, A.B.D. ) ile bir kap içersinde 37°C'de sallayıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi. Kap içindeki konjuge dökülerek membranlar 5'er dk'lık sürelerle 5 kez oda ısısında yıkama solüsyonu ile yıkandı. Bu membranlar daha sonra, sulandırma solüsyonu ile 1/1000 oranında sulandırılan Avidin-Horseradish Peroxidase (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, A.B.D. ) ile bir kap içinde 37°C'de 1 saat sallayıcı üzerinde inkübe edildi. Membranlar 5'er dk'lık sürelerle 5 kez daha oda ısısında yıkama solüsyonu ile yıkandı. Cathepsin L1'e özgü bantı gözlemek amacıyla, karanlık bir kutu içinde kromojen DAB solüsyonu [15 ml 0.05 M Tris-HCl pH 7.6 içinde 0.5 mg DAB tablet (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, A.B.D. ) eritildi, süzüldü ve kullanımdan hemen önce %20 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den 25 µl eklendi] ile birkaç dk inkübe edildi. Membranlar dH<sub>2</sub>O ile yıkanarak reaksiyon durduruldu.

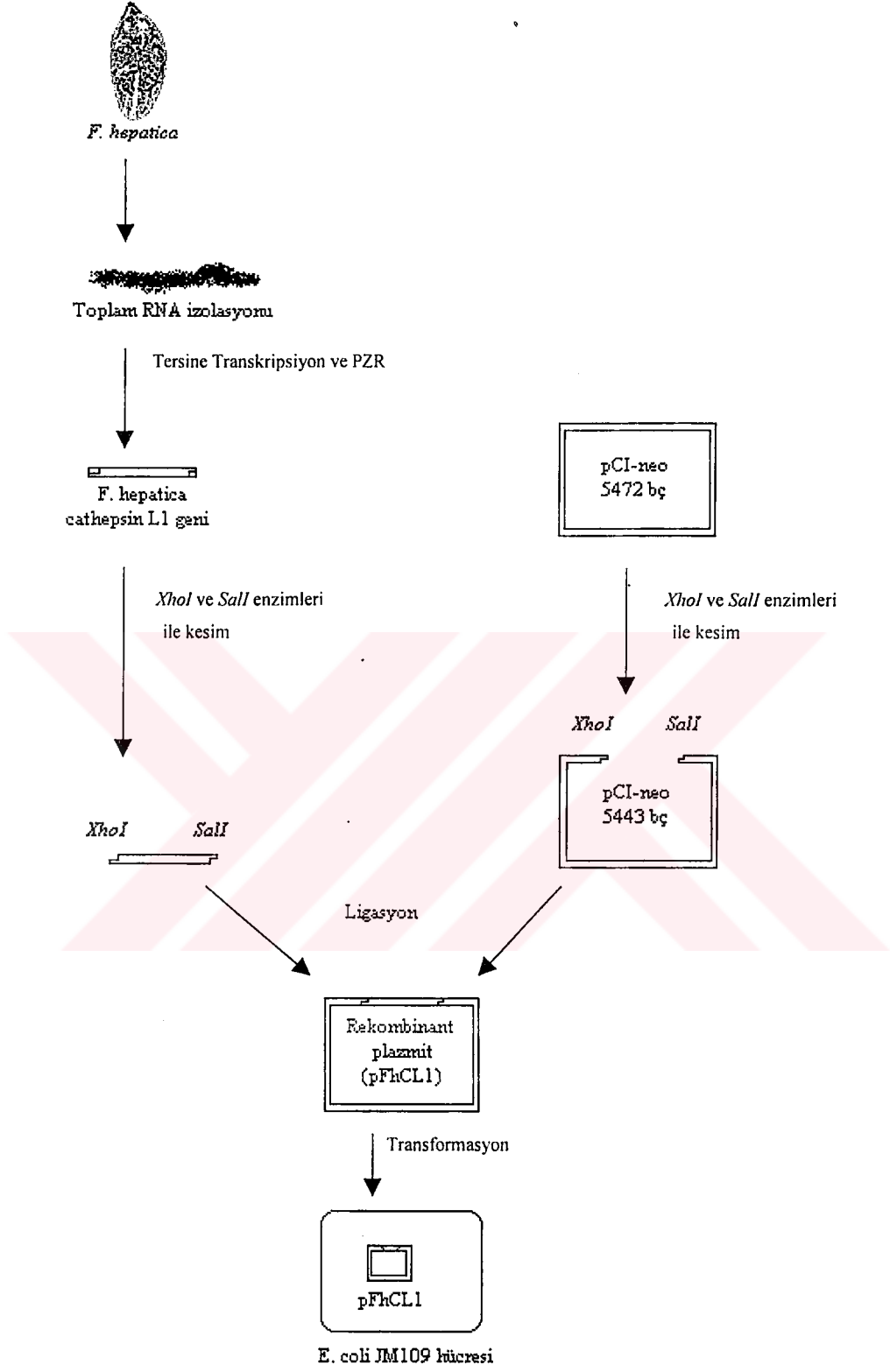
Önceden kesilip kurutulan moleküler ağırlık markeri ile membranlar karşılaştırılarak beklenen moleküler ağırlıktaki cathepsin L1'e özgü bant gözlemlendi. Kurutma kağıdında kurutulan membranlar saklandı (65).

## 5. BULGULAR

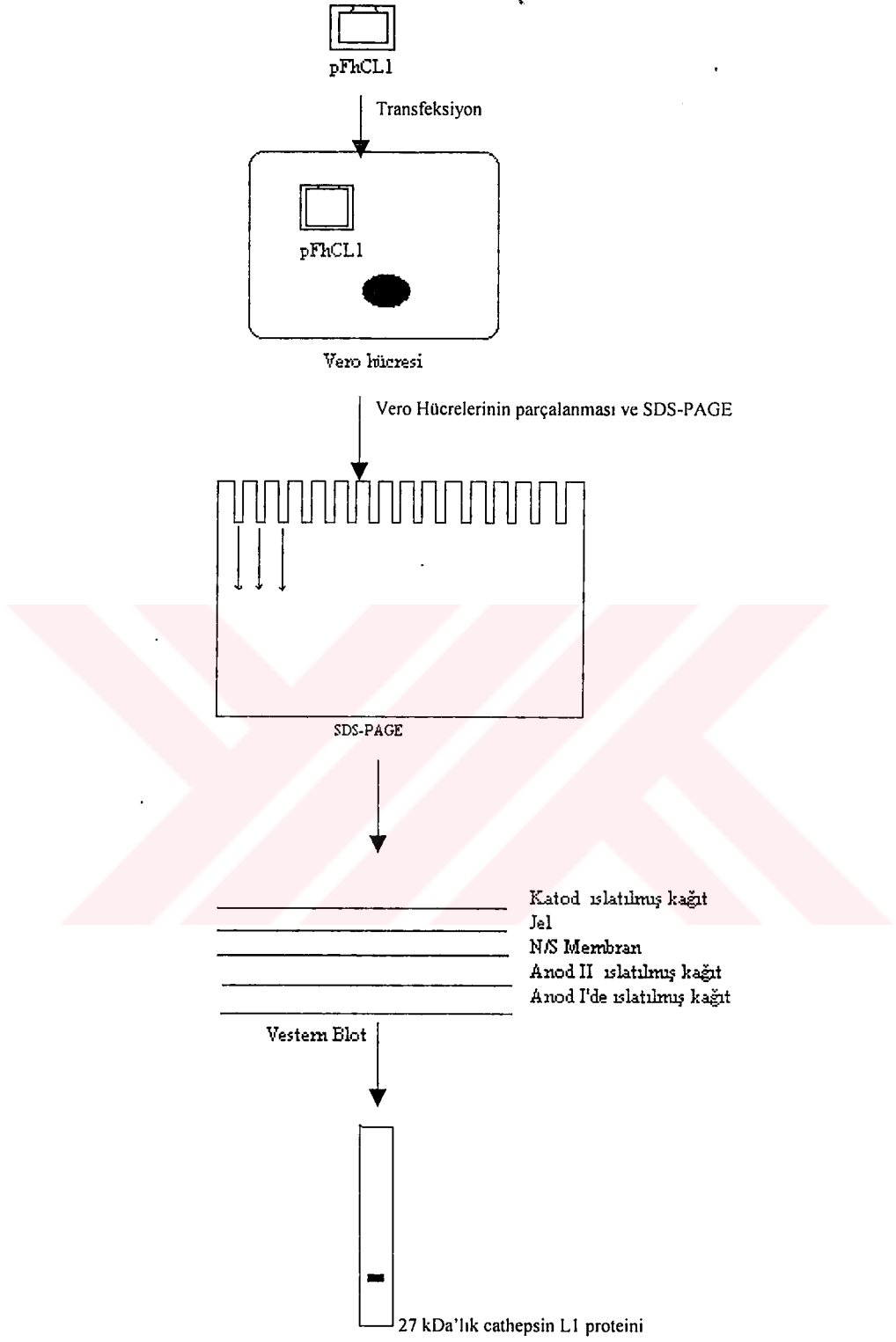
**5.1. *F. hepatica* cathepsin L1 geninin ökaryotik hücrelerde açıklatılması işlemi ile ilgili deneylerin şeması.**

*F. hepatica* cathepsin L1 geninin ökaryotik hücrelerde açıklatılması işlemi ile ilgili tüm işlem basamakları Şekil 2 ve 3’de şematize edilmiştir.





**Şekil 2:** *F. hepatica* cathepsin L1 geninin klonlanması

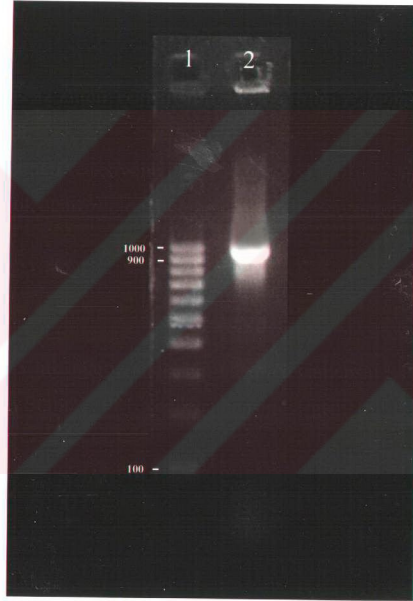


**Şekil 3:** pFhCL1 plazmitinden cathepsin L1 proteininin elde edilmesi ve Western blot ile gösterilmesi



## 5.2. Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan *F. hepatica* cathepsin L1 geninin görünümü

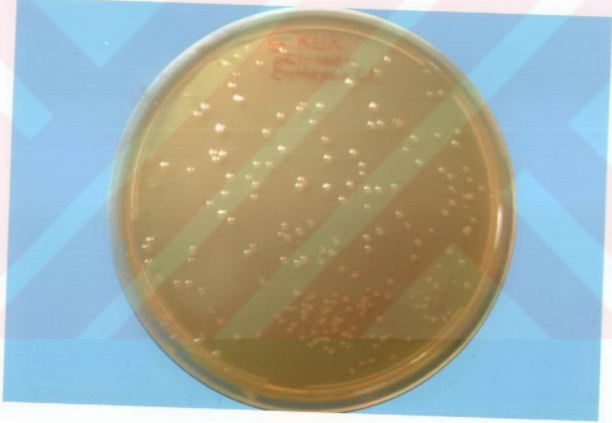
Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan 981 bazlık *F. hepatica* cathepsin L1 geninin %1.5'luk agaroz jeldeki görünümü Şekil 4'de sunulmuştur.



Şekil 4: %1.5'luk agaroz jeldeki *F. hepatica* cathepsin L1 geni. Sütun 1; 100 baz'lık ladder DNA, Sütun 2; 981 bazlık cathepsin L1 geni

5.3. Cathepsin L1 geninin pCI-neo memeli ekspresyon vektörüne yerleştirilmesi ile elde edilen rekombinant pFhCL1 plazmitinin transforme edildiği *E. coli* kolonileri

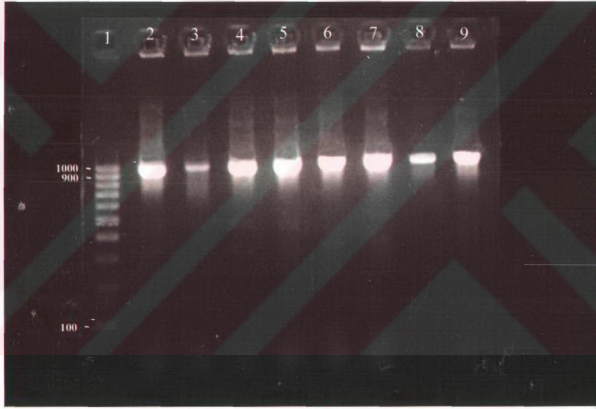
Rekombinant pFhCL1 plazmitinin kompetan JM109 *E. coli* hücrelerine transforme edilerek ampisilinli LB katı besiyerine ekimi sonucu elde edilen koloniler Şekil 5'de görülmektedir.



Şekil 5: Rekombinant pFhCL1 plazmitinin *E. coli* hücrelerine transformasyonundan sonra oluşan kolonilerin LB katı besiyerindeki görünümü

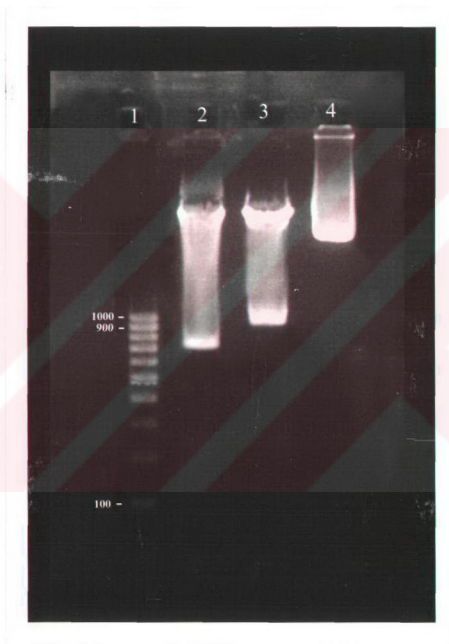
**5.4. Transforme edilen kompetan JM109 *E. coli* hücrelerinde rekombinant pFhCLI plazmitinin PZR Tarama ve enzim kesim deneyleri ile gösterimi**

Ampisilinli LB katı besiyerinde üreyen kompetan JM109 *E. coli* kolonilerinden yapılan PZR Tarama deneyi sonucu elde edilen cathepsin L1 bantlarının %1.5'lük agaroz jeldeki görünümü Şekil 6'da gösterilmiştir.



**Şekil 6:** %1.5'lük agaroz jelde PZR tarama ile cathepsin L1 DNA'sının gösterilmesi. Sütun 1; 100 baz'lık ladder DNA, Sütun 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9; cathepsin L1 DNA'sı

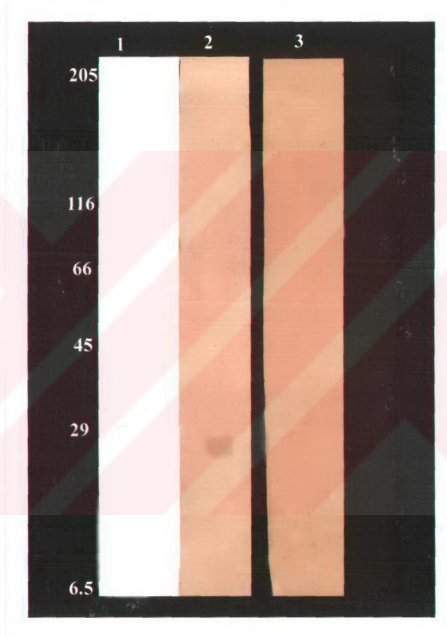
Kompetan JM109 *E. coli* kolonilerinden alkali lizis metodu ile elde edilen plazmit DNA'ların enzimlerle kesilerek %1.5'luk agaroz jelde yürütülmesi sonucu elde edilen bantlar Şekil 7'de gösterilmiştir. pCI-neo *XhoI* – *Sall* enzim kesimleriyle kesilmiş ve böylece plazmitin klonlama bölgesindeki *EcoRI* kesim bölgesi ortadan kaldırılmıştır. *XhoI* – *Sall* enzimleriyle kesilince 981 bazlık cathepsin L1 geni gözlenmiştir. Ayrıca rekombinant plazmitin *EcoRI* – *Sall* enzimleriyle kesimi sonucunda 761 bazlık bant elde edilmiştir.



**Şekil 7:** pFhCL1 plazmitinin %1.5'luk agaroz jelde enzim kesim deneyleriyle gösterilmesi. Sütun 1: 100 baz'lık ladder DNA, Sütun 2: pFhCL1 plazmitinin *EcoRI* – *Sall* enzimleriyle kesilmesi Sütun 3: pFhCL1 plazmitinin *XhoI* – *Sall* enzimleriyle kesilmesi Sütun 4: Rekombinant pFhCL1 plazmiti

### 5.5. Vero hücrelerinde açıklatılan cathepsin L1 proteininin Western blott deneyi ile doğrulanması

ELISA ile *F. hepatica*'ya karşı pozitif ve negatifliği kanıtlanmış serumlar kullanılarak gerçekleştirilen Western blott deneyi sonucu elde edilen 27 kDa ağırlığındaki cathepsin L1 protein bantı Şekil 8'de gösterilmiştir.



**Şekil 8:** Rekombinant cathepsin L1 proteinin Western blott'lama ile gösterilmesi. Sütun 1: Marker Sütun 2: 27 kDa ağırlığındaki cathepsin L1 proteinini Sütun 3: *F. hepatica* negatif serumla yapılan Western blott sonucu Nitroseluloz membran

## 6. TARTIŞMA

Bu çalışma gelecekte fasioliosis tanısı için ELISA kiti geliştirilmesi ve korunma için DNA aşısı çalışmalarına temel oluşturmak amacıyla Türkiye’de ilk kez yapılan bir çalışma olup *F. hepatica* cathepsin L1 geni ökaryotik Vero hücresinde açıklanmıştır. Bu amaçla, doğal olarak infekte sığır karaciğerinden elde edilen *F. hepatica*’dan toplam RNA ve RNA’lardan cathepsin L1 cDNA elde edilmiş, cDNA PZR ile çoğaltılarak pCI-neo memeli ekspresyon vektörüne yerleştirilmiştir. Bu rekombinant vektör, Vero hücrelerine transfekte edilerek cathepsin L1 proteinini elde edilmiş ve bu protein Western blott ile doğrulanmıştır.

Çalışmada *F. hepatica* cathepsin L1 geni proregion bölgesi ile birlikte klonlanmış ve ökaryotik Vero hücrelerinde açıklanmıştır. Proregion bölgesinin bulunması cathepsin L1 proteinin doğru bir şekilde katlanması, stabilizasyonu, endoplazmik retikulumdan çıkışı ve son şeklini almasını sağlamıştır (42, 43, 44).

Gen açıklanması çalışmalarında kullanılan vektörlerin promotor bölge içermesi gerekmektedir. Bunun için sık olarak Simian virus 40 (SV40), Bovine papilloma virus (BPV), Epstein Barr virus (EBV) ve SMV promotorları kullanılmaktadır. Simian virus 40, BPV ve EBV promotoru içeren vektörler memeli hücrelerde düşük-orta derecede ekspresyon sağlarken, SMV promotoru içeren vektörler bir çok hücre tipinde yüksek derecede ekspresyon oluşturmaktadır. Etkin bir protein sentezi için RNA transkriptine poli A eklenmesi ve uzamanın durdurulması gerekmektedir. Bunu sağlamak için vektörlere erken ve geç SV40 poliadenilasyon bölgeleri eklenmektedir. Geç SV40 poliadenilasyon bölgesi, erken SV40 poliadenilasyon bölgesine göre beş kat fazla RNA stabilizasyonu sağlamaktadır.

Bu çalışmada SMV promotoru ve geç SV40 poliadenilasyon bölgesi içeren pCI-neo vektörü seçilerek etkin bir protein sentezinin oluşturulması amaçlanmıştır. Ayrıca protein sentezinin verimliliğinin artırılmasında ökaryotik genlerin kozak dizisi içermesi önemlidir. Bu nedenle çalışmada primer oluşturulurken kozak dizisi eklenmiştir.

Vektöre yerleştirilen genin varlığı, hücrelerdeki rekombinant vektörün elde edilmesini takiben PZR, enzim kesim deneyleri, dizi analizi ve transforme hücrelerdeki rekombinant vektörün varlığını gösteren PZR-T ile yapılmaktadır. Bu amaçla kullanılan PZR-T diğer yöntemlere göre daha kısa sürede sonuç veren daha kolay uygulanabilir bir yöntemdir. Bu nedenle, çalışmamızda *E. coli* JM109 hücrelerindeki rekombinant vektörün varlığı enzim kesim deneylerinin yanı sıra PZR-T ile de gösterilmiştir.

Transfeksiyon için yaygın olarak; kalsiyum fosfat, DEAE-dekstran, elektroporasyon, mikro injeksiyon ve lipozom kaynaklı yöntemler kullanılmaktadır. Kalsiyum fosfat ve DEAE-dekstran yöntemleri basit olmalarına karşın bir çok hücre tipi için etkin değildirler. Bilgisayar destekli bir sistem olan mikro injeksiyon oldukça pahalı ve zahmetli bir yöntemdir. Elektrik akımı ile hücre membran porlarını açarak DNA'nın stoplazmaya verilmesi esasına dayanan elektroporasyon ile hücre membranı ve transfekte DNA zarar görebilmektedir. Lipozom kaynaklı TransFast™ Transfection Reagent yapısındaki sentetik lipidlerin pozitif yüklü baş kısmı negatif yüklü nükleik asitler ile kompleks oluşturmakta ve nükleik asitlerin hücrelere endositozla veya plazma zarından füzyonla girişini kolaylaştırmaktadır. Ayrıca, uygulaması basit olan ve çabuk sonuç veren TransFast™ Transfection Reagent in vitro ve in vivo uygulanabilmekte, DNA ve RNA'yı da içeren bir çok molekülün NIH3T3, CHO, K562 gibi hücrelere transfekte edilebilmektedir. Bu özellikleri nedeniyle transfeksiyon için çalışmamızda TransFast™ Transfection Reagent kullanılmıştır (74).

Proteinin elde edilmesi stabil transfeksiyon ile bir ay kadar sürmektedir. Oysa transient transfeksiyon ile proteinler 48-72 saat gibi kısa bir zamanda elde edilmektedir (74). Bu nedenle bu çalışmada transfeksiyon işlemi transient (geçici) olarak yapılmıştır.

*Fasciola hepatica* tüm dünyada yaygın olarak görülen bir parazittir. Dünya sağlık örgütü 180 milyon kişinin de risk altında olduğunu bildirmiştir. Fasciolosis genellikle sporadik olgular şeklinde olup sıklığı bölgelere göre farklılık göstermektedir. Endemik ve epidemik olduğu bölgeler vardır. Yakın komşularımızdan İran'da endemik olduğu bildirilmektedir (6). Ülkemizde



genellikle cerrahi girişimle tanı konan olgu bildirimleri dışında, insanlarda fasciolosis insidansı ve prevalansı konusundaki çalışmalar oldukça az sayıdadır (32, 75, 76).

İnfeksiyonun klasik tanısı, dışkıda *F. hepatica* yumurtalarının görülmesi ile yapılmaktadır. *F. hepatica*'nın alınması ve yumurtlayacak olgunluğa erişmesi arasında geçen dönemde dışkıda yumurta bulunmamaktadır. Olgunlaşan parazitin düzensiz yumurtlamaması nedeniyle her zaman dışkıda yumurta görülmemesi, dışkı bakısında görülen yumurtaların başka parazitlerle karışabilmesi ve yalancı parazitöz gibi nedenlerle dışkı bakısı tanıda tek başına yeterli olmamaktadır. Ayrıca fasciolosis genellikle asemptomatik seyretmekte, semptomatik olgularda görülen semptom ve bulgular da özgül olmadığı için gözden kaçabilmektedir. Laboratuvar tetkiklerinde sık rastlanan eozinofilinin yanı sıra ultrason, BT, MR gibi radyolojik yöntemlerle saptanan bulgular da fasciolosise özgül değildir ve ancak tanıyı destekleyebilirler (1, 2, 3).

Fasciolosise özgül antikorların araştırıldığı IHA ve ELISA gibi serolojik yöntemler tanı ve epidemiyolojik çalışmalarda sık kullanılan yöntemlerdir. Serolojik yöntemler mikroskopik bakıya göre oldukça duyarlı ve özgül olmakla birlikte duyarlılık ve özgüllükleri kullanılan antijene göre değişmektedir (16). İlk dönemlerde kullanılan somatik antijenler nedeniyle *Dicrocoelium dentriticum*, *Taenia saginata*, *Echinococcus granulosus*, *Ascaris suum*, *Schistosoma mansoni* ve *Trichinella spiralis* gibi helmint enfeksiyonları ile oldukça fazla çapraz reaksiyon görülürken, daha sonra aynı amaçla E/S antijenlerinin kullanılması ile çapraz reaksiyon görülme sıklığı azalmıştır (77, 78). Son zamanlarda rekombinant antijenlerin kullanılması ile serolojik tanı yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri artırılmaya çalışılmaktadır (16).

*Fasciola hepatica*'ya özgül antikorlarının aranmasında kullanılma potansiyeli olan üç recombinant antijenle çalışmalar sürmektedir. Bunlar yağ asidi bağlayan protein, glutathione S-transferaz ve cathepsin proteazlar olup ilk ikisi *S. mansoni* antijenleri ile çok benzerlik göstermekte ve çapraz reaksiyonlara neden olmaktadır. Bu antijenlerle yapılan immünizasyon çalışmaları ile *S. mansoni*'ye karşı değişik düzeylerde korunma sağlandığı da görülmüştür. Cathepsin L1 ile



yapılan çalışmalar; cathepsin L1 proteininin hem insan hem de hayvan fasciolosis olgularının tanısında kullanılabileceğini göstermiştir. Bu antijenin kullanıldığı ELISA ile özgülüğün %96.5-100, duyarlılığın ise %98.9-100 arasında değiştiği bildirilmektedir (16).

Bu çalışmada elde edilen rekombinant cathepsin L1 proteininin serolojik testlerde kullanılması ülkemizde gereksinim duyulan fakat ticari olarak bulunmayan ELISA kitlerinin üretilebilmesine olanak sağlayacaktır. Ayrıca ülkemizde sık olarak cerrahi girişim sırasında tanı konan fasciolosis olgularında cerrahi girişim öncesi erken tanı için gereğinde hasta başında uygulanabilecek basit ve çabuk sonuç veren hızlı tanı yöntemlerine olan gereksiniminin karşılanmasına da olanak sağlayacaktır.

Fasciolosisin tanısı kadar özellikle hayvancılıkta fasciolosisden korunmada önem taşımaktadır. Hayvancılığın yaygın olduğu ülkelerde önemli bir sorun olan fasciolosis besi hayvanlarında verim kaybına ve ölümler nedeniyle her yıl milyarlarca dolarlık ekonomik kayba yol açmaktadır. Her türlü immünizasyon ve eradikasyon çalışmalarına rağmen tüm dünyada her yıl fasciolosis nedeniyle oluşan ekonomik kaybın 2 milyar dolardan fazla olduğu (79), sadece İngiltere’de yıllık kaybın 50 milyon sterlin olduğu bildirilmiştir (80). Ülkemizde hayvancılık sektörü ekonomimiz için önemli bir sektördür. Hayvanlardaki fasciolosisin yaygınlığı ve ekonomik kayıpların boyutu ile ilgili çalışmalar yıllık ekonomik kaybın önemli düzeylerde olduğunu göstermektedir (81). Buna karşılık fasciolosis için alınacak etkili ve ekonomik önlemlerden düzenli aşılama ve eradikasyon çalışmaları oldukça yetersizdir.

*Fasciola hepatica*’ya karşı aşılama için çeşitli moleküller protein aşısı olarak denenmiştir. Cathepsin L1, cathepsin L2, lösin aminopeptitaz (LAP), glutatyon S-Transferaz (GST), *F. hepatica* hemoglobini, yağ asidi bağlayan protein (YABP) ve paromyosin gibi proteinler tek veya karışımlar halinde aşı olarak kullanılmıştır (82).

Yağ asidi bağlayan protein, oleat, palmitat, safra asitleri ve bir çok hidrofobik ligandların bağlanması ve taşınmasında rol alan büyük bir protein gurubudur. Bu ailenin en iyi tanımlananı sitoplazmik yağ asidi bağlayan proteindir. Sitoplazmik yağ asidi bağlayan protein (SYABP) fasciolosis karşı aşılama için ilk kullanılan molekül

olup koruyuculuğu farelerde %69-78, buzağılarda %55 olarak bulunmuştur. Ancak, yüksek derecede saflaştırılan YABP adjuvan ile birlikte sığırlarda uygulanmış ve koruma sağlamadığı gösterilmiştir. Glutasyon S-Transferazın sığırlarda protein aşısı olarak kullanımıyla ancak %69 başarı sağlanmıştır. *F. hepatica*'nın subtegümental bir proteini olan paramyosin ile aşılama sonucu koyunlarda parazit sayısının %45, sığırlarda %47 oranında azaldığı bildirilmiştir. *F. hepatica* hemoglobini ile aşılanan sığırlarda ise parazit sayısı %43.8 oranında azalmıştır (82).

Koyunlarda yapılan çalışmalar sistein proteinazlar ile %65, lösün aminopeptidazlar ile %81 koruyuculuk sağlandığını göstermiştir. *F. hepatica*'nın E/S ürününün büyük bir kısmını oluşturan bir sistein proteinaz olan cathepsin L, fasciolosise aşı adayı olarak ilk kez koyunlarda denenmiştir. Aşılanan hayvanlarda parazit sayısında azalma görülmez iken parazitin çıkardığı yumurta sayısında %69.7 oranında azalma görülmüştür. Cathepsin L1 ile yapılan diğer çalışmalarda koyunlarda parazit sayısının %33-69 ve yumurta çıkarmanın %40-71 düzeyinde azaldığı bildirilmiştir. Sığırlarda ise cathepsin L1 aşısı ile parazit sayısında %42.5 azalma görüldüğü bildirilmiştir. Sığırlarda aşı amacıyla cathepsin L1 proteini ile *F. hepatica* hemoglobini beraber kullanıldığında parazit sayısının %51.9 oranında azaldığı, atılan yumurtaların canlılığının ise %0-80 düzeylerinde olduğu bildirilmiştir (82). Cathepsin L1 ve cathepsin L2'nin birlikte uygulanması halinde koruyuculuk %60, cathepsin L1, cathepsin L2 ve LAP'ın birlikte uygulanması halinde ise %78 olarak saptanmıştır (83).

Protein aşılarının bu düşük koruyuculuk oranları fasciolosise karşı korunma için daha etkili aşılardan arayışını başlatmış ve DNA aşıları gündeme gelmiştir (84, 85, 86). *F. hepatica* sistein proteaz genini kodlayan cDNA ile 50 µg tek injeksiyon şeklinde aşı uygulanan bir çalışmada, aşının koruyuculuğu dişi ratlarda %74, erkek ratlarda ise %100 olduğu bildirilmiştir (87). DNA aşısı ile ilgili çalışmalar henüz çok yeni olup yeterli bilgi birikimi oluşmamıştır. Bu konuda ileri çalışmaların yapılmasına gereksinim vardır. DNA aşıları antijenik bir proteini kodlayan genin bir plazmite yerleştirilmesi ile oluşturulur. Bu plazmitin etkin bir promotor ve Poli A kuyruğu içermesi gerekmektedir (63). Çalışmamızda bu özellikleri taşıyan pCI-neo

vektörünün kullanılmış olması elde ettiğimiz rekombinant plazmitin DNA aşısı çalışmalarında kullanılabilmesine olanak sağlayacaktır.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen cathepsin L1 proteini fasciolosis tanısında gereksinim duyulan özgül ve duyarlı serolojik testlerin geliştirilmesi ve üretimi, çalışmalarımız için temel oluşturacaktır. ELISA tanı kiti geliştirilmesi ile ülkemizde tanı ve epidemiyolojik çalışmalarla ilgili verilerin artacağı kanısındayız. Diğer yandan cathepsin L1 proteini ile geliştirilebilecek hasta başında uygulanabilecek hızlı tanı yöntemleri rutinde gereksinim duyulan bir eksikliği giderecektir. Ayrıca, bu çalışmada elde edilen rekombinant plazmit, hayvanlarda fasciolosis'e karşı immünizasyon için ileri çalışmaların yapılmasına olanak sağlayacaktır.



## 7. KAYNAKLAR

- 1- Unat EK. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. 5. Baskı, İstanbul: Cerrahpaşa Tıp Fak. Vakfı Yayınları, 1995: 379-387.
- 2- Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. 3. Baskı, Washington: ASM Press, 1997: 363-364.
- 3- Saygı G. Temel Tıbbi Parazitoloji. 1. Baskı, Sivas: Esnaf Ofset Matbaacılık, 1998: 131-134.
- 4- Dalton JP. Fasciolosis. Andrews SJ (editor). The Life Cycle of Fasciola hepatica. <http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/ReadingRoom/0851992609.asp>: 1-30.
- 5- WHO. Control of foodborne trematode infections. WHO Technical Report Series 1995 No: 849.
- 6- Dalton JP. Fasciolosis. Mas-Coma S, Bargues MD, Esteban JG (editors). Human Fasciolosis. [http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/ReadingRoom/0851992609](http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/ReadingRoom/0851992609.asp).asp: 411-434.
- 7- Dalton JP. Fasciolosis. Malone JB, Yilma JM (editors). Predicting outbreaks of Fasciolosis: from ollerenshaw to satellites. <http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/ReadingRoom/0851992609.asp>: 151-183.
- 8- Mas-Coma MS, Esteban JG, Bargues MD. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. Bulletin of the World Health Organization 1999; 77: 340-346.
- 9- Esteban JG, Flores A, Aguirre C, Strauss W, Angles R, Mas-Coma S. Presence of very high prevalence and intensity of infection with Fasciola hepatica among Aymara children from the Northern Bolivian Altiplano. Acta Trop 1997; 66: 1-14.
- 10- Esteban JG, Gonzalez C, Bargues MD, Angles R, Sanchez C, Naquira C, Mas-Coma S. High fascioliasis infection in children linked to a man-made irrigation zone in Peru. Trop Med Int Health 2002; 7: 339-348.

- 11- Dalton JP. Fasciolosis. Andrews S J (edıtor). The Life Cycle of *Fasciola hepatica*. <http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/ReadingRoom/0851992609.asp>: 1-30.
- 12- Dalton JP. Fasciolosis. Fasciolosis. Fairweather I, Threadgold LT, Hanna REB (editors). Development of *Fasciola hepatica* in the Mammalian Host. <http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/ReadingRoom/0851992609.asp>: 47-111.
- 13- Dalton JP. Fasciolosis. Graczyk TK, Fried B (editors). Development of *Fasciola hepatica* in the Intermediate Host. <http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/ReadingRoom/0851992609.asp>: 31-46.
- 14- Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. 1. Baskı, İzmir: Asya Tıp Yayıncılık Ltd Şti, 1998: 460-463.
- 15- Dalton JP. Fasciolosis. Behm CA, Sangster NC (editors). Pathology, Pathophysiology and Clinical Aspects. <http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/ReadingRoom/0851992609.asp>: 185-224.
- 16- Dalton JP. Fasciolosis. Hillyer GV (editor). Immunodiagnosis of Human and Animal Fasciolosis. <http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/ReadingRoom/0851992609.asp>: 435-447.
- 17- Camilla SG, Sharon BB, Peter FW. Imported *Fasciola hepatica* infection in the United States and treatment with triclabendazole. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1-5.
- 18- Price TA, Tuazon CU, Simon GL. Fascioliasis: case reports and review. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 426-430.
- 19- Pulpeiro JR, Armesto V, Varela J, Corredoira J. Fascioliasis: findings in 15 patients. *Br J Radiol* 1991; 64: 798-801.
- 20- Dalton JP. Fasciolosis. Mulcahy G, Joyce P, Dalton JP (editors). Immunology of *Fasciola hepatica* infection. <http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/ReadingRoom/0851992609.asp>: 341-375.
- 21- Roitt IM, Brostoff J, Male DK. Immunology. Rook G (editor). Cell-Mediated Immune Reactions. London: Mosby-Year book Europe Limited, 1983: 8.1-8.15.

- 22- O'Neill SM, Brady MT, Callanan JJ, Mulcahy G, Joyce P, Mills KH, Dalton JP. *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunol* 2000; 22: 147-155.
- 23- Cervi L, Cejas H, Masih DT. Cytokines involved in the immunosuppressor period in experimental fasciolosis in rats. *Int J Parasitol* 2001; 31: 1467-1473.
- 24- Paz A, Sanchez-Andrade R, Panadero R, Suarez JL, Diez-Banos P, Morrondo P. Subclass profile of specific IgG antibodies in rats challenged during acute and chronic primary infection with *Fasciola hepatica*. *Parasitol Res* 1999; 85: 770-775.
- 25- Tliba O, Sibille P, Boulard C, Chauvin A. Early hepatic cytokine mRNA expression in experimental rat fasciolosis. *Vet Parasitol* 2002; 103: 237-249.
- 26- Van Milligen FJ, Cornelissen JB, Bokhout BA. Protection against *Fasciola hepatica* in the intestine is highly correlated with eosinophil and immunoglobulin G1 responses against newly excysted juveniles. *Parasite Immunol* 1999; 21: 243-251.
- 27- Bossaert K, Jacquinet E, Saunders J, Farnir F, Losson B. Cell-mediated immune response in calves to single-dose, trickle, and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 2000; 29: 17-34.
- 28- McCole DF, Doherty ML, Baird AW, Davies WC, McGill K, Torgerson PR. T cell subset involvement in immune responses to *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Parasite Immunol* 1999; 21: 1-8.
- 29- Prowse RK, Chaplin P, Robinson HC, Spithill TW. *Fasciola hepatica* cathepsin L suppresses sheep lymphocyte proliferation in vitro and modulates surface CD4 expression on human and ovine T cells. *Parasite Immunol* 2002; 24: 57-66.
- 30- Dalton JP. Fasciolosis. Fairweather I, Boray JC (editors). Mechanisms of Fasciolicide action and drug resistance in *Fasciola hepatica*. <http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/ReadingRoom/0851992609.asp>: 225-276.
- 31- Bacq Y, Besnier JM, Duong TH, Pavie G, Metman EH, Choutet P. Successful treatment of acute fascioliasis with bithionol. *Hepatology* 1991; 14: 1066-1069.

- 32- Kaplan M, Kuk S, Kalkan A. Fasciolosis: Olgu sunusu. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2002; 26: 393-395.
- 33- el-Karaksy H, Hassanein B, Okasha S, Behairry B, Gadallah I. Human fasciolosis in Egyptian children: succesful treatment with triclabendazole. J Trop Pediatr 1999; 45: 135-138.
- 34- Laird PP, Boray JC. Human fasciolosis succesfully treated with triclabendazole. Aust N Z J Med 1992; 22: 45-47.
- 35- Milan JC, Mull R, Freise S, Richter J. The efficacy and tolerability of triclabendazole in Cuban patients with latent and chronic Fasciola hepatica infection. Am J Trop Med Hyg 2000; 63: 264-269.
- 36- Sönmez A, Mas MR, Aras E, Uygun A, Tanyüksel M. Fasciola hepatica: Karaciğerde nadir bir kitle sebebi. Türk Gastroenteroloji Dergisi. 2001; 12: 145-148.
- 37- Yılmaz H, Öner AF, Akdeniz H, Arslan S. The effect of triclabendazole (fasinex) in children with fasciolosis. J Egypt Soc Parasitol; 28: 497-502.
- 38- Apt W, Aguilera X, Vega F, Miranda C, Zulantay I, Perez C, et al. Treatment of human chronic fascioliasis with triclabendazole: drug efficacy and serologic response. Am J Trop Med Hyg 1995; 52: 532-535.
- 39- Dalton JP. Fasciolosis. Spithill TW, Smooker PM, Copeman DB (editors). Fasciola gigantica: Epidemiology, Control, Immunology and Molecular Biology. <http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/ReadingRoom/0851992609.asp>:465-525.
- 40- Dalton JP. Fasciolosis. Panaccio M, Trudgett A (editors). Molecular Biology. <http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/ReadingRoom/0851992609.asp>:449-464.
- 41- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62: 597-635.

- 42- Roche L, Tort J, Dalton JP. The propeptide of *Fasciola hepatica* cathepsin L is a potent and selective inhibitor of the mature enzyme. *Mol Biochem Parasitol* 1999; 25: 271-277.
- 43- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 3. Baski, New York & London: Garland Publishing, 1994: 551-599.
- 44- Tao K, Stearns NA, Dong J, Wu QL, Sahagian GG. The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. *Arch Biochem Biophys* 1994; 15: 19-27.
- 45- Wijffels GL, Panaccio M, Salvatore L, Wilson L, Walker ID, Spithill TW. The secreted cathepsin L-like proteinases of the trematode, *Fasciola hepatica*, contain 3-hydroxyproline residues. *Biochem J* 1994; 299: 781-790.
- 46- Heussler VT, Dobbelaere DA. Cloning of a protease gene family of *Fasciola hepatica* by the polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 64: 11-23.
- 47- Wilson LR, Good RT, Panaccio M, Wijffels GL, Sandeman RM, Spithill TW. *Fasciola hepatica*: characterization and cloning of the major cathepsin B protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke. *Exp Parasitol* 1998; 88: 85-94.
- 48- Berasain P, Carmona C, Frangione B, Dalton JP, Goni F. *Fasciola hepatica*: parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses: determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced. *Exp Parasitol* 2000; 94: 99-110.
- 49- Berasain P, Goni F, McGonigle S, Dowd A, Dalton JP, Frangione B, Carmona C. Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. *J Parasitol* 1997; 83: 1-5.
- 50- Carmona C, Dowd AJ, Smith AM, Dalton JP. Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 62: 9-17.



- 51- Smith AM, Dowd AJ, Heffernan M, Robertson CD, Dalton JP. Fasciola hepatica: a secreted cathepsin L-like proteinase cleaves host immunoglobulin. *Int J Parasitol* 1993; 23: 977-983.
- 52- Dowd AJ, Smith AM, McGonigle S, Dalton JP. Purification and characterisation of a second cathepsin L proteinase secreted by the parasitic trematode *Fasciola hepatica*. *Eur J Biochem* 1994; 223: 91-98.
- 53- Smith AM, Dowd AJ, McGonigle S, Keegan PS, Brennan G, Trudgett A, Dalton JP. Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 62: 1-8.
- 54- Dowd AJ, Tort J, Roche L, Ryan T, Dalton JP. Isolation of a cDNA encoding *Fasciola hepatica* cathepsin L2 and functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biochem Parasitol* 1997; 88: 163-174.
- 55- Piacenza L, Acosta D, Dowd A, McGonigle S, Dalton J, Carmona C. Proteinases secreted by *Fasciola hepatica*: time course of the inhibitory effect of serum from experimentally infected rabbits demonstrated by gelatin-substrate polyacrylamide gel electrophoresis. *J Helminthol* 1997; 71: 333-338.
- 56- Halton DW. Nutritional adaptations to parasitism within the platyhelminthes. *Int J Parasitol* 1997; 27: 693-704.
- 57- McKerrow JH. Parasite proteases. *Exp Parasitol* 1989; 68: 111-115.
- 58- Gotz B, Klinkert MQ. Expression and partial characterization of a cathepsin B-like enzyme (Sm31) and a proposed 'haemoglobinase' (Sm32) from *Schistosoma mansoni*. *Biochem J* 1993; 290: 801-306.
- 59- Roche L, Dowd AJ, Tort J, McGonigle S, McSweeney A, Curley GP, et al. Functional expression of *Fasciola hepatica* cathepsin L1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 1997; 245: 373-380.
- 60- Cornelissen JB, Gaasenbeek CP, Borgsteede FH, Holland WG, Harmsen MM, Boersma WJ. Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L-like protease. *Int J Parasitol* 2001; 31: 728-737.

- 61- Panaccio M, Hollywell C, Mailer S, Wijffels GL, Spithill TW, Identification of a new L-like cathepsin protease of *Fasciola hepatica*. Localisation of the sites of expression of the L-like cathepsin proteases to both the gut microvilli and the Mehlis' gland. Genbank Accession No: L33772.
- 62- Smooker PM, Whisstock JC, Irving JA, Siyaguna S, Spithill TW, Pike RN. A single amino acid substitution affects substrate specificity in cysteine proteinases from *Fasciola hepatica*. *Protein Sci* 2000; 9: 2567-2572.
- 63- pCI-Neo Mammalian expression vector. Promega Technical Bulletin. 2000. TB125.
- 64- TRI Reagent. SIGMA Bio Sciences Technical Bulletin. 1995. No:205.
- 65- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3. Baskı, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- 66- Kozak M. Compilation and analysis sequence upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 1984; 12: 857-872.
- 67- Kozak M. The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* 1989; 108: 229-241.
- 68- Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase. Promega Product Information. 2000. M170.
- 69- Innis AM, Gelfold DH, Sninsky JJ. *PCR Strategies*. 1. Baskı, London: Academic Press, 1995.
- 70- Wizard<sup>®</sup> PCR Preps DNA purification system. Promega Technical Bulletin. 1999. TB118.
- 71- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *S Mol Biol* 1993; 5: 557-580.
- 72- Hofmann MA, Brian DA. Sequencing PCR DNA amplified directly from a bacterial colony. *Biotechniques* 1991; 11: 30-31.

- 73- Ozdarendeli A, Ascı ZT, Kuk S, Tonbak S, Bulut Y, Kalkan A. Polimeraz zincir reaksiyonu ile bakteriyel kolonilerin belirlenmesi (PZR-Tarama). Fırat Tıp Dergisi 2003 (Baskıda).
- 74- Transfast™ Transfection Reagent. Promega Technical Bulletin. 2000. TB260.
- 75- Kaplan M, Kuk S, Kalkan A, Özkan A. Elazığ yöresinde *Fasciola hepatica* seroprevalansı. 12. Ulusal Parazitoloji Kongresi Özet Kitabı, 2001: 126.
- 76- Saba R, Mamikoğlu L, Korkmaz M, Ynan D, Erdaloğlu G, Kabaalioğlu A. Thirty-two cases of fascioliasis in Antalya and its surroundings. 11th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Özet Kitabı 2001: 1603.
- 77- Bossaert K, Farnir F, Leclipteux T, Protz M, Lonneux JF, Losson B. Humoral immun response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. Veterinary Parasitology 2000; 87: 103-123.
- 78- Hillyer GV, Soler De Galanes M. İdentification of a 17-Kilodalton *Fasciola Hepatica* immunodiagnostic antigen by the Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot Technique. J Clin Microbiol 1988; 26: 2048-2053.
- 79- Spithill TW, Dalton JP. Progress in Development of Liver Fluke Vaccines. Parasitol Today 1998; 14: 224- 228.
- 80- <http://www.aber.ac.uk/parasitology/Edu/Digen/DigenTxt.html>
- 81- Kaplan M, Kuk S. Elazığ ELET AŞ. Kesimhanesinde 1998-2000 yılları arasında kesilen hayvanlarda fasyoliyaz görülme sıklığı. 12. Ulusal Parazitoloji Kongresi Özet Kitabı, 2001: 149.
- 82- Dalton JP. Fasciolosis. Spithill TW, Smooker PM, Sexton JL et all (editors). Development of Vaccines Against *Fasciola hepatica*. <http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/ReadingRoom/0851992609.asp>: 377-410.
- 83- Piacenza L, Acosta D, Basmadjian I, Dalton JP, Carmona C. Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. Infect Immun 1999; 67: 1954-1961.
- 84- Abath FG, Montenegro SM, Gomes YM. Vaccines against human parasitic diseases: an overview. Acta Trop 1998; 71: 237-254.
- 85- Kofta W, Wedrychowicz H. c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages. Vet Parasitol 2001; 100: 3-12.

86- Liljeqvist S, Stahl S. Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *J Biotechnol* 1999; 73: 1-33.

87- Kofta W, Mieszczanek J, Plucienniczak G, Wedrychowicz H. Successful DNA immunisation of rats against fasciolosis. *Vaccine* 2000; 18: 2985-2990.



## 8. ÖZGEÇMİŞ

1969 yılında Samsun'da doğdum. İlkokulu 1975-1980 yılları arasında Samsun Devrim ilkokulunda, ortaokulu 1980-1983 yılları arasında Samsun 100. yıl ortaokulunda, liseyi Samsun 100. yıl lisesinde 1983-1986 yılları arasında okudum. Üniversiteyi 19 Mayıs Üniversitesi Tıp fakültesinde 1987-1995 yıllarında okudum. 1996-1999 yılları arasında Çankırı ili Merkez 1 nolu sağlık ocağında pratisyen hekim olarak çalıştım. Askerliğimi Ağustos-Eylül 2001 tarihleri arasında yaptım. Aralık 1999 yılından itibaren Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalında Arş. Gör. olarak çalışmaktayım. Evli ve iki çocuk babasıyım.



**DOKÜMANTASYON MEMEZİ**