

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FASCIOLA HEPATICA CATHEPSİN L2
GENİNİN KLONLANMASI VE DNA
DİZİLEMİNİN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Serpil BAŞPINAR

ELAZIĞ 2007

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Necip İLHAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Doç. Dr. Mustafa KAPLAN
Tıp Programı
Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Doç. Dr. Mustafa KAPLAN
Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Nilgün DALDAL _____
Prof. Dr. Mustafa Yılmaz _____
Prof. Dr. Ahmet KALKAN _____
Doç. Dr. Mustafa KAPLAN _____
Yrd. Doç. Dr. Ahmet ERENŞOY _____

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarımda her türlü desteği için hocalarım, tez danıőmanım Doç. Dr. Mustafa Kaplan, Doç. Dr. Dilek Turgut Balık, Prof. Dr. Ahmet Kalkan, Yrd Doç. Dr.Ahmet Erensoy, Araő. Gör. Venhar Çelik'e ve sağladığı maddi destek sebebiyle Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimine (FÜBAP) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
1.ÖZET.....	1
2.ABSTRACT.....	3
3. GİRİŞ.....	5
3. 1. Morfoloji.....	5
3. 2. Yaşam Döngüsü.....	6
3. 4. Epidemiyoloji.....	8
3. 5. Klinik	10
3. 6. Tanı	12
3. 7. İmmunoloji.....	15
3. 8. Tedavi	17
3. 9. Korunma ve Kontrol	18
3. 10. <i>Fasciola hepatica</i> 'nın moleküler ve antijenik yapısı.....	19
4.GEREÇ VE YÖNTEM	24
4.1. Parazit.....	24
4.2. Besiyerleri ve Solüsyonlar.....	24
4.3. Plazmit (pGEM® -T Easy Vector).....	26
4.4. Toplam RNA İzolasyonu	27
4.5. Primerlerin Oluşturulması.....	28

4.6. Tersine Transkripsiyon ile Kopya DNA (cDNA) Elde Edilmesi	28
4.7. <i>Fasciola hepatica</i> cathepsin L2 geninin polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması	29
4.8. Etidyum Bromür ile Agaroz Jel Elektroforezi	29
4.9. Kristal Viyole ile Agaroz Jel Elektroforezi	30
4.10. <i>Fasciola hepatica</i> Cathepsin L2 Geninin Agaroz Jelden Saflaştırılması	30
4.11. Rekombinant Plazmitin Oluşturulması (Ligasyon)	30
4.12. Transformasyon	31
4.13. Koloni PZR ile transformasyon sonrası pozitif insert'in doğrulanması)..	32
4.14. Rekombinant pGEM-T CL2 Vektörünün Miniprep ile Elde Edilmesi ...	32
4.15. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile CL2 Gen Bölgesinin Gösterilmesi.....	33
4.16. Cathepsin L2 cDNA sekans analizi	33
5. BULGULAR.....	34
5.1. <i>Fasciola hepatica</i> cathepsin L2 geninin klonlanması ve DNA dizileminin belirlenmesi işlemleri ile ilgili deneylerin akış şeması. ...	34
5.2. Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan <i>Fasciola hepatica</i> Cathepsin L2 geninin görünümü	36
5.3. Cathepsin L2 geninin pGEM® -T Easy vektörüne yerleştirilmesi ile elde edilen Rekombinant pGEM-T CL2 plazmitinin transforme edildiği <i>E. coli</i> kolonileri.....	37
5.4. Transforme edilen kompetan JM109 <i>E. coli</i> hücrelerinde rekombinant pGEM-T CL2 plazmitinin PZR Tarama ile gösterimi.....	37

5.5 Cathepsin L2 cDNA dizilemi ve soyağacı.....	39
6. TARTIŞMA.....	42
7. KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	57

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1:** *F. hepatica* cathepsin L2 geninin ökaryot hücrede klonlanması 35
- Şekil 2.** Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan *F. Hepatica* cathepsin L2 geninin %1'lik agaroz jelde Etidyum bromür ile boyanarak (A) ve kristal viyole ile boyanarak (B) elde edilen görüntüsü..... 36
- Şekil 3.** Rekombinant pGEM-T CL2 plazmitinin *E. Coli* hücrelerine transformasyonlarından sonra oluşan kolonilerin LB katı besiyerindeki görünümü..... 37
- Şekil 4.** Transformasyon uygulanan *E. coli* kolonilerinde rekombinant pGEM-T CL2 plazmitinin PZR tarama ile elde edilerek varlığı kanıtlanan *F. hepatica* cathepsin L2 geninin %1.5'lik agaroz jeldeki görünümü.38
- Şekil 5.** Cathepsin L2 cDNA dizilemi.....39
- Şekil 6.** Cathepsin L2 aminoasid dizilemi 40
- Şekil 7.** Cathepsin L2 soyağacı.41

KISALTMALAR LİSTESİ

DNA	:Deoksiribonükleikasit
KDa	:Kilo dalton
µg	:Mikrogram
dk	:dakika
E. coli	:Escherichia coli
dH₂O	:Distile su
RNA	:Ribonükleik asit
Pmol	:Pikomol
Lt	:Litre
M	:Molarite
OD	:Optik Dansite
PZR	:Polimeraz zincir reaksiyonu
LB	:Luria Bertani
Sn	:Saniye
µl	:Mikrolitre
ml	:Mililitre
GST	:Glutasyon S-Transferaz
SMV	:Sitomegalovirüs
BPV	:Bovine papilloma virüs
Hb	:Hemoglobin
TT	:Transkripsiyon
EBV	:Ebstein Barr virüs

ELİSA	:Enzime bağlı İmmunosorbent deneyi
M MLVRT	:Moloney Murine Leukemia Virüs
YT	:Yeast Tryptone
TAE	:Tris acetat edta
SAB	:Sample aplication buffer
CV	:Crystal viole
SYABP	: Stoplazmik yağ asidi bağlayan protein
dNTP	:Deoksi nükleotid trifosfat
mM	:Milimolar

1.ÖZET

Fasciolosis *Fasciola hepatica*'nın insan ve hayvanlarda neden olduğu paraziter bir hastalık olup tüm dünyada ve Türkiye'de sık görülmektedir. Elazığ ve çevresinde ise sporadik olgular şeklinde görülmekte olup sağlıklı bireylerde fasciolosis seroprevalansının %2.78 olduğu bildirilmektedir.

Fasciolosisin kesin tanısı dışkıda yumurtaların saptanması ile yapılmaktadır. Ancak hastalığın akut döneminde, ektopik yerleşimlerde ve yalancı parazitlik durumlarında bu mümkün olmamakta ve serolojik testler kullanılmaktadır.

Fasciola hepatica'nın ekskretuar-sekretuar antijenlerinin büyük bir bölümünü oluşturan proteazlar *F. hepatica*'ya özgül olmaları ve antijenik yapıları nedeniyle tanı yöntemlerinde ve korunma amacıyla immünizasyon çalışmalarında kullanılabilir potansiyel bir moleküldür. Bu çalışmada *F. hepatica* cathepsin L2 geninin klonlanması ve gen dizilmesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada doğal olarak infekte sığır karaciğerinden elde edilen *F. hepatica*'dan toplam RNA elde edildi ve RNA'dan cathepsin L2 cDNA oluşturuldu. PZR ile çoğaltılan cathepsin L2 cDNA pGEM-T Easy vektörüne yerleştirildi. Oluşturulan ve pGEM-T CL2 olarak adlandırılan rekombinant vektör kompetan JM109 *E. coli* hücrelerine transfekte edilerek cathepsin L2 klonlandı. JM109 *E. coli* kolonilerinden PZR tarama ile elde edilen cathepsin L2 cDNA %1.1'lik agaroz jelde yürütülerek gösterildi. Cathepsin L2 cDNA'nın nükleotid dizilemi ve soy ağacı belirlendi.

Fasciola hepatica cathepsin L2 Türkiye’de ilk kez klonlanmış olup belirlenen nükleotid dizilemi literatürde bildirilen ikinci *F. hepatica* cathepsin L2 nükleotid dizilemidir. Daha önce Dowd ve ark. tarafından bildirilen *F. hepatica* cathepsin L2 (gen bank no: U62289) ile %99 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *F. hepatica*, cathepsin L2, klonlama, nükleotid dizilemi, soy ağacı

2.ABSTRACT

Fasciolosis is a common parasite disease, caused by *Fasciola hepatica* that being found throughout all regions of the world including Turkey, affecting both human and animals. Sporadic cases of Fasciolosis have seen in Elazığ and its seroprevalance in healthy individuals is reported to be 2.78%.

Definitive diagnosis of fasciolosis is made by detection of eggs in the host faeces. But, detection of eggs is impossible in early infections, ectopic infections and false parasitosis, and serologic tests should be used to diagnose these conditions. Proteases represents the major parts of the excretory-secretory antigens of the *Fasciola hepatica* and due to their specific antigenic nature they are potential candidate molecules to be used for diagnosis and immunization methods. The aim of this study was to clone and determine the sequence of cathepsin L2 gene.

In the present study, we composed cathepsin L2 cDNA from RNA that obtained *F. hepatica* from liver of naturally infected cattle by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). After PCR amplification, cathepsin L2 cDNA was purified and was cloned into the pGEM-T Easy vector. The presence of cathepsin L2 gene was confirmed by PCR screening. This recombinant vector that named pGEM-T CL2 was tranfected into JM109 *E. coli* cells. So, pGEM-T CL2 was obtained from JM109 *E. Coli* cells by QIAGEN QIA Prep Kit and the presence of cathepsin L2 gene was confirmed by PCR screening. Cathepsin L2 cDNA was showed by agarose gel

electrophoresis. We determined DNA sequencing and performed phylogenetic analysis.

For the first time, the cathepsin L2 of *F. hepatica* cloning was performed and sequencing from a Turkey isolate and nucleotide sequence showed 99% identity with previously published sequence of *F. hepatica* cathepsin L2 (GenBank accession no.U62289) by Dowd et al.

Key words: *F. hepatica*, cathepsin L2, cloning, nucleotide sequencing, phylogenetic tree.

3. GİRİŞ

Fasciola hepatica Digenea alt sınıfından fasciolidae ailesinde yer alan bir tür karaciğer trematodu olup insan ve hayvanlarda fasciolosis yol açar. Ülkemizde geçmiş yıllara göre tıbbi önemi artmakta ise de asıl önemi hayvancılık alanında oluşturduğu büyük ekonomik kayıplara bağlıdır (80, 81, 91).

3. 1. Morfoloji

Fasciola hepatica'nın erişkinleri 1.8-5 cm (ortalama 2-3 cm) boyunda ve 4-15 mm eninde olup yaprak şeklindedir. Genç formlar ise birkaç mm uzunluğundadır ve vücutları mızrak ucuna benzer. Olgun parazitin kenarları esmer, koyu boz ortası ise sarı, turuncu renktedir (80, 90, 91).

Parazitin gövdesinin önü koni şeklindedir ve buraya baş konisi denir. Baş konisi üzerinde ağız çekmeni bulunur. Baş konisinden sonra vücut genişler ve sonra tekrar daralır, böylece parazit omuzlu bir görünüm kazanır. Omuz çıkıntılarının hizasında, orta hatta asetabulum denilen karın çekmeni vardır (80, 90, 91).

Parazit; sinir sistemi, salgı sistemi, bağırsak sistemi ve üreme sisteminden oluşan kompleks bir yapıya sahiptir. Vücudunun üzerinde arkaya doğru yönelmiş kitin yapısında sert dikenler bulunmaktadır.

Fasciola hepatica yumurtaları 130-140 µm boyunda ve 70-90 µm eninde olup tek kutuplarında kapak bulunmaktadır, kapağın karşı kutbunda ise

içeri doğru hafif bir kalınlaşma vardır. Sarı, kahverengi olan yumurtalar dışkı ile dışarı atıldığında henüz embriyon gelişmemiştir (80, 90, 91).

3. 2. Yaşam Döngüsü

Parazitin yaşam döngüsü genel olarak şu aşamalardan oluşur: Yumurtanın son konaktan atılması, yumurtada mirasidyumun gelişmesi, mirasidyumun yumurtadan çıkması ve ara konağı olan yumuşakçalara girmesi, ara konakta gelişme ve çoğalma, serkaryaların yumuşakçadan çıkması ve kistlenmesi, metaserkaryaların son konak tarafından alınması ve olgunlaşması (80).

Parazitin son konağı genellikle sığır ve koyun gibi geviş getiren hayvanlardır. Ayrıca keçi, manda, deve, lama, beygir, domuz, fil, eşek, sincap, geyik, maymun ve laboratuvar hayvanlarından tavşan, kobay, fare ve hamster da son konaklar arasında yer almaktadır. Bu parazite seyrek olarak insanlarda da rastlanmaktadır (90).

Son konağın safra yollarına bırakılan yumurtalar safra ile bağırsağa gelir ve buradan dışkı ile dışarı atılır. Yumurta içinde embriyonun gelişebilmesi için yumurtanın dışkıdan temizlenmiş olması gerekir, bu da ancak dışkının sulu bir ortamda çözülmesiyle olur. Yumurtalar oksijenden yoksun, nemin yeterli olmadığı kuru ortamlarda gelişemez fakat uzun süre canlı kalabilir (12, 80).

Yumurtaların gelişmesi için gerekli sıcaklık 5-30°C, pH ise 4.2-9 arasındadır. En uygun sıcaklık 25°C ve en uygun pH 5.5-6'dır. Parazitin

gelişimi 23-26°C’de 2-3 haftada tamamlanırken 16°C’de bu süre 3 aya kadar uzamaktadır (80).

Yumurtada oluşan mirasidyumun yumurtadan çıkması için ısı, ışık ve oksijen yoğunluğu gibi ortam koşullarının uygun olması gerekir (80).

Mirasidyumun yaşam süresi çok kısa olup, doğal koşullarda iki günden fazla değildir. Mirasidyumların gelişebilmesi için ara konakları olan Lymnaea cinsinden bazı yumuşakçaların vücuduna girmesi gerekir. Kuzey Amerika’da ara konak sıklıkla *L. bulimoides* iken, Avrupa ve diğer birçok bölgede en önemli tür *L. truncatula*’dır. Bu yumuşakçalar bataklıklarda, su birikintilerinde ve sulak çayırlarda yaşar. Mirasidyumlar bu yumuşakçaların lenf kanallarında tüylerini kaybederek sporokistlere dönüşürler. Yedinci günde sporokistlerden rediler veya yavru sporokistler gelişir. Uygun koşullarda rediler salyangozun hepatopankreas bezine göç eder ve burada her birinden 10-20 tane serkarya gelişir. Bir Lymnaea içinde yaklaşık 500 kadar serkarya gelişir. Serkaryalar salyangozu terk ettikten sonra su bitkileri üzerine yerleşirler ve kuyruklarını kaybedip vücut yüzeylerinin etrafında kılıf salgılayarak metaserkarya haline dönüşürler (90, 91).

Fasciola hepatica’nın bulaşıcı formu metaserkarya olup üzerinde metaserkarya bulunan su bitkilerinin yenilmesiyle veya suların alınmasıyla son konağa bulaşır. Son konağın ince bağırsağında genç *Fasciola hepatica*’lar kist çeperinden çıkar, barsak çeperi ve peritondan geçip karaciğer parankimine ve buradan da safra yollarına ulaşarak yerleşir. Parazitin seksüel olgunluğa ulaşması sadece safra kanalları ve safra kesesinde mümkündür. Burada

olgunlaşan parazit konağa girişinden 3-4 ay sonra yumurtlamaya başlar (37, 90, 91).

Fasciola hepatica karaciğer ve safra kanalları dışında nadiren mide, beyin, deri altı, apandiks, venler, akciğer, kalp ve plevral kaviteye de yerleşebilir. Bu nedenle parazit larvalarının periton yolu dışında dolaşım yoluyla da vücuda yayıldığı düşünülmektedir (91).

3. 4. Epidemiyoloji

Fasciolosis sığır ve koyun yetiştiren ülkelerde daha yaygın olmakla birlikte hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde görülen dünya çapında yaygın bir sorundur. Bu hastalığa hayvanlarda sık rastlanırken insanda seyrek olarak görülür (12, 37, 59, 64).

Son 10 yılda dünyada *F. hepatica* enfeksiyonlarında bir artış olmuştur ve Dünya Sağlık Örgütü'nün 1995 yılında yaptığı bir çalışmada 61 ülkede 2.5 milyon kişinin enfekte olduğu ve 180 milyondan fazla kişinin de risk altında olduğu bildirilmiştir (93).

Fasciola hepatica enfeksiyonu her yaşta görülebilir ve bu enfeksiyona karşı doğal bağışıklık olmadığı için tüm meslek gruplarını ve sosyal sınıfları etkileyebilir. Çocuklarda hastalığa enfeksiyonun endemik olduğu bölgelerde rastlanır. Kırsal alanlarda hastalık kentlere göre daha fazladır (25, 56).

Günümüzde insan fasciolosisi için yeni bir epidemiyolojik sınıflandırma sistemi önerilmiş olup, bu sınıflandırmaya göre prevalansın %1'den az olduğu bölgelerin hipoendemik, prevalansın %1-10 arasında olduğu

bölgelerin mezoendemik ve prevalansın %10'dan fazla olduğu bölgelerin ise hiperendemik bölge olarak tanımlanması uygun görülmüştür (58).

Dünyada insan fasciolosisi hipoendemik bölgelerden hiperendemik bölgelere kadar farklı bir dağılım göstermektedir. Bu dağılım farklı çevre koşullarına bağlıdır. Parazitin ara konağı olan *Lymnaea*'ların bulunduğu sular dağılım açısından önemlidir. Ayrıca iklim koşulları da *F. hepatica*'nın dağılımı üzerinde etkilidir. Fasciolosise ılıman ve tropikal bölgelerde daha sık rastlanır (32, 93).

İnfekte olguların çoğunluğu Batı Avrupa (Portekiz, Fransa, İspanya), Güney Amerika, Kuzey Afrika, Uzak Doğu, Mısır, Okyanusya ve İran'dan bildirilmiştir (58).

Güney Amerika'da insan fasciolosisi Peru, Ekvator ve Bolivya'da sık görülmektedir. Bolivya'nın Altiplano Bölgesi insan fasciolosisi açısından hiperendemik bir bölge olup yapılan koprolojik methodlarla prevalansın %70'in üzerinde olduğu bildirilmiştir. Bu bölge insan fasciolosisi prevalansının en yüksek olduğu bölgedir (65, 93). Peru insan fasciolosisinin yaygın olduğu diğer yerlerden birisi olup 1995 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün yaptığı çalışmada 8 milyon kişinin risk altında olduğu bildirilmiştir (58).

Avrupa'da Fransa önemli bir endemik bölgedir. Ayrıca Portekiz'de de hastalık önem taşımaktadır ve ülkenin kuzeyi endemik bölgedir. İspanya'da ise daha çok kuzeyde insan fasciolosisine rastlanmaktadır. Afrika'da ise en büyük problem Mısır'da olup Nil Deltası'ndan birçok olgu bildirilmiştir. Asya ülkeleri içinde İran'da uzun bir süreden beri ülkenin her bölgesinden vakalar

bildirilse de esas olarak ülkenin kuzeybatısı yüksek prevalansa sahiptir. Doğu Asya'da ise Japonya ve Kore'de sporadik vakalar bulunmaktadır (93).

Türkiye'de *F. hepatica*'nın ara konağı olan *L. truncatula* her yerde bulunur. Türkiye'de insan fasciolosisine az rastlanmakta ve hastalık sonbahar ve kış aylarında daha sık görülmektedir. Elazığ ve çevresinde sporadik olgular şeklinde görülmekle birlikte sağlıklı bireylerde yapılan bir çalışmada fasciolosis seroprevalansının %2.78 olduğu gösterilmiştir (45).

3. 5. Klinik

Fasciolosis patojenitesi yüksek bir hastalık olup patogenez ve klinik bulgular; parazitin sayısına, parazitin yerleştiği organlardaki dağılımına, konağın türüne, konağın bağışıklığına bağlı olarak değişir. Eğer parazit sayısı azsa hastalık yıllarca belirtisiz ve kronik şekilde sürebilir. Nadir olmakla birlikte fazla sayıda parazit alınırsa bacaklarda ve vücutta ödem ve kaşeksi hatta ölümlle sonuçlanan tablolar gelişebilir. (56, 8, 91).

Hastalık akut ve kronik olmak üzere 2 ayrı fazdan oluşur. Parazitin vücuda alınıp safra sistemine girene kadar geçirdiği döneme akut faz denilmektedir. Bu fazda görülen semptomlar göç eden larvaların neden olduğu hasara ve inflamatuvar yanıtı bağlıdır. Sıklıkla akut başlayan ateş, karın ağrısı, dispepsi görülür. Karın ağrısı özellikle karaciğere uyan bölgede; sağ hipokondriumdadır. Kilo kaybı ve halsizlik diğer sık görülen semptomlardır. Ayrıca göğüs ağrısı, öksürük, anoreksia, bulantı, kusma, bağırsak alışkanlığında değişiklik daha az görülen semptomlardır. Baş ağrısı ve terleme tabloya eklenebilir. Hastalığın en önemli 3 belirtisi ağrı, ateş ve karaciğer

büyümesidir. Ateş düzensizdir ve haftalarca sürebilir. Hepatomegali karaciğerin tutulduğunu gösterir. Bu dönemde allerjiye bağlı ürtiker görülebilir. Ayrıca eozinofilili akciğer infiltrasyonları, plevral effüzyon, pnömoni gibi akciğer tutulumu bulguları olabilir.

Akciğer tutulumu görülen vakalarda tabloya hemoptizi, nefes darlığı, öksürük, göğüs ağrısı gibi semptomlar eklenir. Akut fazda eozinofili önemli bir laboratuvar bulgusudur ve eozinofiliden dolayı lökositoz görülebilir (22,56,90).

Parazit safra kanallarına girdikten sonra bu semptomlar azalabilir veya tamamen kaybolabilir. Parazitin safra sistemine yerleşmesiyle kronik faz başlar. Bu dönem insanlarda 15 yıldan daha fazla sürebilir. Kronik fazda sıklıkla aralıklı sağ üst kadranda ağrısı olur. Sindirim bozuklukları, kilo kaybı, ateş bu dönemde görülebilir. Safra yollarında tıkanıklığa bağlı pankreatit ve kolanjit görülebilir. Safra yollarında tıkanıklığın semptomları olarak ateş, sarılık, ağrı ve kaşıntı tabloya eklenebilir (22, 56, 90).

Eozinofili ve hematokrit artışı kronik fazdaki vakaların yakalanması açısından önemlidir. Böylece karaciğer hasarı ve anemi, kolanjit, kolesistit, safra yollarında tıkanıklık gibi komplikasyonlar gelişmeden hastalık önlenmiş olur (22, 36).

Bazı vakalarda parazit hepatobilier sistem dışında vücudun farklı bölgelerine yerleşebilir. Buna ektopik fasciolosis denir. Akciğer ve bronşlar, periton, göz, beyin, kaslar, subkutan doku parazitin ektopik odakları arasında yer alır. Larvaların yerleştiği lokalizasyona bağlı olarak göz bulguları, lenfadenopati, meningeal ve fokal nörolojik bulgular, solunum sistemi bulguları görülebilir (22, 36).

Hastalığın şiddeti, hafif semptomlarla sınırlı kalabileceği gibi çok ciddi de olabilir. Ağır vakalarda bacaklarda başlayan sonra tüm vücuda yayılan ödem ve kaşeksi görülür. Tablo ölüme yol açacak kadar şiddetli olabilir.

Hematemez, melena, subkapsüler hematom, hematoberia, karaciğer sirozu hastalığın komplikasyonları arasında yer alır. Multipl ekstrahepatik venöz tromboz ise ölüme sonuçlanabilen diğer bir komplikasyondur (22).

3. 6. Tanı

Fasciolosis tanısında hastalık öyküsü, klinik ve laboratuvar bulgular, fasciolosisi akla getirirse de tanıya yardımcı olmaktan öteye gidemezler. Tanı için koprolojik yöntemler, serolojik testler, radyolojik görüntüleme yöntemleri ve moleküler biyolojik yöntemler kullanılmaktadır (22, 23, 34).

Klinik semptom ve laboratuvar bulguları kesin tanı koydurmaz fakat tanıyı desteklemek açısından önemlidir. Akut fasciolosisde görülen ağrı, ateş, hepatomegali ile kronik fasciolosisde görülen kolanjit ve biliyer kolik ayırıcı tanıda fasciolosis düşündürülen semptomlardandır (36, 56).

Kesin tanı için esas olarak kullanılan koprolojik yöntem yumurtaların gösterilmesidir (80, 90). Bu amaçla dışkı ve duodenum suyu incelemeleri yapılır. Fakat yumurtaların dışkıda görülmesi ancak parazitin safra kanalına girişi ve olgunlaşmasından sonra mümkündür. Bu dönem infeksiyondan yaklaşık 12 hafta sonra olur. Bu nedenle hastalığa ait semptomlar başladığı halde akut dönemde dışkıda yumurtalar gösterilemeyebilir. Ayrıca olgun parazitin yumurtlamaması, dışkıdaki yumurta sayısının az olması, yumurtaların belirli aralıklarla dışkıyla atılması gibi nedenlerle de dışkı incelemesi tanı için

yetersiz kalabilir. İlave olarak parazitli koyun, sığır gibi hayvan karaciğeri yenilmesi sonucu bağırsakta açığa çıkan yumurtaların dışkıda görülebilmesi nedeniyle yalancı parazitlik de söz konusu olabilir. Bu nedenle dışkısında *Fasciola hepatica* yumurtası bulunan kişilerde fasciolosis tanısı konmadan önce kişinin karaciğer yeme öyküsü mutlaka sorgulanmalı ve şüpheli durumlarda karaciğersiz diyet uygulandıktan sonra birkaç gün ara ile dışkı incelemesi yapılmalıdır (34, 54, 90, 91).

Laboratuvar bulguları arasında en çok dikkati çeken eozinofilidir. Akut fasciolosisde hastaların %45-95 kadarında eozinofili görülür (34, 36, 56). Kronik dönemde ise akut döneme göre eozinofilik hücre sayısı artabilir veya azalabilir. Eozinofiliye bağlı olarak hastalarda lökositoz görülebilir. Hastaların yaklaşık yarısında akut faz reaktanlarında artış olabilir. Bunlardan biri eritrosit sedimentasyon hızıdır. Ayrıca hastalarda parazitin kanla beslenmesine bağlı olarak normokrom normositer anemi görülebilir. Karaciğer enzimlerinden alanin aminotransferazdaki artış hepatosellüler hasarı göstermektedir. Gama glutamil transpeptidaz (GGT) ve alkalen fosfatazdaki (AF) artış ise safra yollarındaki hasarı göstermektedir. Tüm bu laboratuvar bulguları fasciolosis tanısını desteklemekte fakat kesin tanı koydurmamaktadır (22, 34, 92).

Fasciolosisde tanıya yardımcı yöntemlerden birisi de radyolojik yöntemlerdir. Ultrasonografinin (US) karaciğer anormalliklerini göstermesindeki duyarlılığı değişken olmakla birlikte karaciğerde küçük kistik hepatik lezyonlara bağlı oluşan parankimal heterojenite gösterilebilir. Ultrasonografi kronik dönemde safra kesesinin gösterilmesinde tanıda daha yararlı olabilir. Kronik dönemde safra kesesinde birçok ekojenik, gölge

koyuluğu olmayan kısımlar görülebilir. Kullanılan radyolojik yöntemlerden diğeri ise abdominal bilgisayarlı tomografidir (BT). Bilgisayarlı tomografi ile akut fasciolosisli hastaların %90'ından fazlasında anormallikler gösterilebilir ve subkapsüler hemorajiler tanımlanabilir. Son yıllarda manyetik rezonans görüntüleme (MRG) yöntemi fasciolosis tanısında çok fazla kullanılmaya başlanmış olup karaciğer parankim hasarınının gösterilmesinde oldukça başarılı sonuçlar alınmaktadır. Ayrıca akut fasciolosisde sintigrafinin yararlı bir yöntem olduğu bildirilmiştir (13).

Tanı amaçlı invaziv teknikler de kullanılmaktadır. Endoskopik retrograd kolanjiopankreatografi (ERCP) ile *F. hepatica*'nın safra kesesinde meydana getirdiği tipik lezyonlar gösterilebilir. Bunlar dilate safra kanalları ve küçük, radyolüsen gölgelerdir (13, 36, 66). Fasciolosis tanısında özellikle akut fasciolosisde tanıda serolojik yöntemler sık kullanılmaktadır. ELISA, IHA, Counterelektroforez ve Western Blot (WT) tercih edilenlerdir. Bu testlerde kompleks yapıda antijenlerin immunolojik özellikleri benzer olan parazitlerle çapraz reaksiyon vermesini engellemek amacıyla parazit tarafından salgılanan E/S (ekskresyon-sekresyon) ürünleri veya kısmen purifiye edilmiş parazit ürünleri kullanılır. E/S antijenleri içinde en fazla bulunan sistein proteinazlar hem erişkin hem de genç formlar tarafından sekrete edilir ve hayvan ve insanlarda oldukça antijenik özellik gösterir, bu açıdan tanı için değerli bir kaynaktır (23, 80).

Son yıllarda ise daha çok purifiye ve rekombinant antijenler kullanılmaktadır. Bunların arasında yağ asidi bağlayan protein, cathepsin

proteaz proteinleri, glutatyon-stransferaz yer alınmaktadır (18, 41, 49, 65, 78, 87).

3. 7. İmmunoloji

Parazitin konakta yerleşebilmesi ve gelişebilmesi için konağın biyokimyasal ve fizyolojik ortamına uyum sağlaması gerekmektedir. Konak ise doğal ve edinsel bağışıklık sistemi ile parazite karşı koyar. Bu iki tip bağışıklık sistemi parazitin vücuda girişini, eğer etken vücuda alınmışsa parazitin vücutta yerleşmesini ve gelişmesini engellemeye yönelik rol oynar.

Konağın doğal bağışıklık sistemi içinde deri, mukoza, mide asidi, vücut ısısı ve vücudun bazı biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri yer alır. Bu özellikler ile parazitin vücuda girişi engellenir. Fakat bu bariyerler her zaman etkenin vücuda girişini engellemek için yeterli değildir. Doğal bağışıklık sisteminin aynı zamanda makrofajlar, doğal öldürücü hücreler ve granülositlerden oluşan hücresel elemanları da vardır. Savunma bariyerlerini geçebilen parazite karşı bu hücresel elemanlar aktive olur ve etkeni vücuttan uzaklaştırmaya çalışır.

Tüm bu yanıtlara rağmen etken vücuttan uzaklaştırılmazsa edinsel bağışıklık sistemi aktive olur. Edinsel bağışıklık sisteminin aktive edilmesinde sitokinler görev almaktadır. Bu sitokinler arasında interlökin (IL)-1, IL-6, IL-12 ve tümör nekrozis faktör α (TNF α) bulunur. Bu sitokinler aracılığıyla yardımcı T lenfositler aktive olur. Ayrıca T lenfositlerin salgıladıkları interferon gama (IFN γ) gibi sitokinler bu hücrelerin etkinliklerini daha da artırır. Aynı zamanda yardımcı T lenfositler salgıladıkları sitokinlerle B

lenfositleri de uyarır, B lenfositler ise parazite karşı antikor oluşturur (9, 48, 67, 69, 86).

Fasciola hepatica infeksiyonlarında ortaya çıkan immun yanıt henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Koyun, fare ve ineklerde kronik infeksiyonda dominant antikor IgG1'dir. Ayrıca infekte fare ve ineklerde etkenin antijenlerine karşı IgE olduğu gösterilmiştir. Koyunlarda akut *F. hepatica* infeksiyonunda karaciğerde CD4+ T lenfositler, B lenfositler, nötrofiller, eozinofiller ve makrofajlar gözlenir. Kronik primer infeksiyonda ise karaciğerde esas olarak CD8+ve TCR+ lenfositler artar. Sekonder infeksiyonda ise karaciğerde CD4+ lenfositler, eozinofil ve B lenfosit infiltrasyonu hakimdir. Primer infeksiyondan 3-13 hafta sonra sistemik eozinofili gözlenir (57, 67, 77, 82, 86, 97).

Fasciola infeksiyonlarından sonra 24 saat içinde aktive makrofajlar periton boşluğuna göç eder. Ayrıca konağa parazitin salgıladığı moleküller enjekte edilince de makrofajların peritona göç ettiği gösterilmiştir (27, 82, 86).

İneklerde T lenfosit proliferasyonu ve IL-2 üretimi görülür. İnfekte ineklerde lenfositlerin Th0 ve Th2 fenotipi gösterilmişken, Th1 tipi bulunmamıştır. Bu nedenle kronik fasciolosiste Th2 yanıtı olduğu düşünülmektedir (10, 11, 63).

İnsanlarda ise parazit infeksiyonunun tipine göre farklı antikor oluşturulmaktadır. İnsan IgG alt sınıfları menteşe bölgelerine göre farklı biyolojik fonksiyonlara sahiptir. İnsanlarda fasciolosiste IgG4 yükselir (8, 22, 67).

3. 8. Tedavi

İnsan fasciolosisinin tedavisinde günümüze kadar birçok ilaç denenmiştir. Birkaç yıl öncesine kadar dihidroemetin tedavide tercih edilen ilaç olmuştur. Fakat toksisitesi nedeniyle yerini bithionol almıştır. 5 gün boyunca 30 mg/kg/gün'lük bithionol tedavisinin ardından hastaların %20-30'unda ikinci bir kür tedavi gerekmiştir. Bithionolun yan etkilerinin fazla olması, günde 3 doz ilaç uygulaması gerektirmesi ve tedavinin 10-15 gün sürmesi nedeniyle yerini praziquantel almıştır. Fakat praziquantel tedavisinden de olumlu sonuç alınamamıştır (5, 43, 44, 76, 93).

Günümüzde insan fasciolosisinde tercih edilen ilaç triclabendazol'dür. Triclabendazol bir benzimidazol derivesi olup *F. hepatica*'nın hem genç hem de erişkin formlarına karşı etkilidir. 10-12 mg/kg şeklinde tek doz uygulanmaktadır. Bu dozun iki gün uygulanmasının tedavi etkinliğini artırdığı bildirilmektedir. Ayrıca yemeklerden sonra alınması da ilacın etkinliğini artırmaktadır. Triclabendazol genellikle iyi tolere edilen bir ilaçtır. Tek kontrendikasyonu triklabendazole veya diğer benzimidazollere karşı hipersensitivite gelişen durumlardır. Triclabendazol'un en sık görülen yan etkisi bilier kolik ve abdominal ağrıdır. Diğer yan etkileri; epigastrik ağrı, terleme ve daha az sıklıkta bulantı, kusma, ateş, ürtiker, kaşıntıdır (4, 13, 17, 41, 43, 61, 62).

İlaçlara karşı gelişen direnç günümüzün önemli sorunlarından birisidir. Direnç gelişen durumlarda normal dozdaki ilaç parazitin erişkin formlarının sayısı üzerinde etkili değildir. Günümüzde triklabendazole karşı direnç geliştiği gözlenmiştir. Ancak henüz bu direncin moleküler mekanizması

aydınlatılamamıştır. Triclabendazole dirençli parazitlerin tedavisinde ilk tercih edilen ilaç nematod ve sestodların da tedavisinde kullanılan albendazoldür (16).

İlaç kullanımını takiben birkaç hafta veya birkaç ay içinde semptomlar düzelmeye başlar. Dışkıda yumurtalar kaybolur. Eozinofili azalır ve 3 ay içinde normale döner. Radyolojik bulgular düzelir. Antikor seviyeleri 6-12 ay içinde normal seviyeye iner. Bu değişiklikler tedavinin başarısının gösterilmesi açısından önemlidir. Tedaviye rağmen herhangi bir değişiklik olmazsa tedavi tekrarlanmalıdır (4, 5, 13, 17).

3. 9. Korunma ve Kontrol

Fasciola hepatica'nın son konağa geçişi metaserkaryalarla kontamine su bitkileri ve suların alınmasıyla olmaktadır (12, 80, 90). Bu nedenle fasciolosisten korunmak için alınan önlemlerin başında metaserkarya taşıyan su bitkilerinin ve suların sıkı kontrolü gelmektedir. Özellikle endemik bölgelerde su bitkileri pişirilmeden yenilmemelidir. Ayrıca genç parazitlerle infekte karaciğerlerin pişirilmeden tüketilmesi de insanda hastalığa yol açmaktadır. Bu nedenle karaciğerlerin tam pişmeden yenilmemesi gerekmektedir.

Sağlık Bakanlığı ve ilgili kuruluşlar hastalığın kontrol ve önlenmesi için çalışmalar yapmalıdır. Ayrıca sağlık çalışanları hastalık ve bulaş yolları hakkında bilgilendirilmeli, hastalığın ciddiyeti hakkında uyarılmalıdır. Endemik bölgelerde koruyucu halk sağlığı eğitimi verilmesi önerilmektedir.

Üniversiteler ve araştırma merkezleri infeksiyonun varlığını ve yaygınlığını tespit etmeli ve tedavi için gerekli ilaçları bulundurmalıdır (33).

3. 10. *Fasciola hepatica*'nın moleküler ve antijenik yapısı

Son yıllarda biyokimya, moleküler biyoloji, immunoloji ve biyofizik alanındaki gelişmeler helmintlerin biyolojisinin, biyosentezinin, yüzey antijenlerinin ve genomik organizasyonlarının anlaşılmasına yardımcı olmuştur. Fakat bu gelişmelere rağmen *F. hepatica*'nın moleküler biyolojisi hakkındaki bilgiler sınırlıdır. *Fasciola hepatica* çok hızlı olan gelişimi sırasında farklı gelişim dönemlerinde değişen gereksinimlerine uygun şekilde farklı antijenler salgılamaktadır. Parazit konağa girdikten sonra protein ekspresyonunda değişiklik yapar. Böylece konağın immun yanıtından kaçmış olur. Ayrıca *F. hepatica* olgunlaşırken gen regülasyonu ve ekspresyonunda da değişiklik olmaktadır. Parazitin genç ve erişkin formlarının enzimleri farklılık göstermektedir. *F. hepatica* populasyonları arasında genetik çeşitlilik vardır (12, 26, 80).

Fasciola hepatica'nın tanı ve immünizasyon için önemi olan antijenleri yağ asidi bağlayan proteinler (YABP), glutatyon S-transferazlar (GST), hemoglobin (Hb), paramyosin ve proteazlar olarak sıralanabilir.

Yağ asidi bağlayan proteinler özellikle parazitlerin parankim hücreleri ve reproduktif dokularında bulunurlar ve parazitin konak sıvılarından yağ asitlerin alınması ve taşınmasına yardım ederler. Yağ asitleri oleat, palmitat, safra asitleri gibi maddeleri içerir. YABP'ler ilk saflaştırılan ve fasciolosise karşı aşı olarak ilk denenilen antijenlerdir. Deneysel immünizasyon

çalışmalarında YABP'ler ile farelerde %69–78, buzağılarda %55 koruyuculuk bulunmuştur (30, 86).

Glutasyon S-Transferazlar bol miktarda salgılanan ve konak immün yanıtını güçlü bir şekilde uyaran oldukça antijenik enzimlerdir. GST'ler organizmada çeşitli kimyasal maddelerin salgılanmasında ve bazı zararlı hücrel metabolitlerin detoksifikasyonunda görevli izoenzimlerden oluşur. İmmünotokimyasal çalışmalara göre GST'ler erişkin parazitlerin bağırsak, parankim, tegüment ve kas hücrelerinde yaygın olarak bulunur. GST'lere karşı oluşan immün yanıtta antikorlar doğrudan GST'leri nötralize eder veya substrat bağlanan kısmını engelleyerek aktivitesini azaltır.

Bunun sonucunda nitrik oksit (NO) ve reaktif oksijenler detoksifiye edilemediği için parazit dokularda hasar oluşur. Yapılan çalışmalarda sığırlarda GST'lerin protein aşısı olarak kullanılmasıyla %19-69 koruma sağlanmıştır (20, 86).

Hemoglobin (Hb), oksijen taşıma ve depolama özelliği ile safra kanalları gibi düşük oksijen basıncına sahip yerlerde parazit için hayati öneme sahiptir. Yapılan deneysel immünizasyon çalışmalarında, *F. hepatica* hemoglobini (FHb) ile parazit yükünde %43,8 azalma sağlanmıştır. FHb sığırlarda cathepsin L1 ile kombine edildiğinde % 42,5-52 ve cathepsin L2 proteini ile kombine edildiğinde parazit sayısındaki azalma % 72'ye ulaşmıştır. İmmünizasyon çalışmalarında en etkili sonuçlar yumurta canlılığı üzerinde alınmıştır. *F. hepatica*'da yumurta üretimi oksidatif metabolizma ile sağlanmakta olup aşılama amacıyla kullanılan bütün antijenlerde yumurtaların canlılık oranında azalma saptanmıştır. Ancak en fazla düşüşün cathepsin L2/Hb

kullanımında olduğu görülmüş ve döl veriminde %98'den fazla azalma bulunmuştur. (20, 86).

Paramyosin, *F. hepatica*'nın subtegümental bir proteini olup immünizasyon çalışmalarında parazit yükünde koyunlarda %45, sığırlarda %47 oranında azalma sağladığı bildirilmiştir (20)

Proteazlar, proteinlerin hidrolizini katalizleyen bir grup enzimdir. Fiziyojik ve patolojik koşullarda hücresele düzeyden organ düzeyine kadar etkili olabilen değişik fonksiyonlara sahiptirler. Proteazların görevleri arasında; zimojenik enzimlerin aktivasyonu, kanın pıhtılaşması, fibrin pıhtısının eritilmesi, sekretuar proteinlerin işlenmesi ve membrandan transportu yer almaktadır (21, 73).

Proteazlar etki ettikleri yere göre endopeptidaz ve ekzopeptidaz olmak üzere 2 ana gruba ayrılır. Ekzopeptidazlar substratın amino veya karboksi terminal ucuna yakın peptid bağlarını kırarken, endopeptidazlar terminal uçlardan uzaktaki bağları kırarlar. Ayrıca proteazlar etki ettikleri yerdeki fonksiyonel gruplara göre 4'e ayrılmaktadır. Bunlar: serin proteazlar, aspartik proteazlar, metalloproteazlar ve sistein proteazlardır. Serin proteazların etki ettikleri bölgede bir serin grubu bulunmaktadır. Aspartik proteazlar ise katalitik aktiviteleri için aspartik aside ihtiyaç duymaktadırlar. Metalloproteazların aktiviteleri için çift değerlikli iyonlar gerekmektedir. Sistein proteazlar ise sistein ve histidin içeren bir katalitik bölgeye sahiptir (73).

Sistein proteazlar bir preproenzim olarak sentezlenmektedirler ve üzerlerinde sinyal peptidi ve propeptidden oluşan bir proregion bölge taşımaktadırlar. Bu şekilde endoplazmik retikuluma giden proenzim

glikozilasyona uğrar ve daha sonra golgi kompleksinde mannoz rezidüleri fosforilasyona uğrar, ardından enzimin proregion bölgesi enzimden ayrılır (2, 75, 88).

Sistein proteazlar prokaryot ve ökaryotların her ikisinde de bulunmaktadır. Yan zincir spesifitesine göre 4 gruba ayrılmaktadırlar. Bunlar; papain benzeri, glutamik asit benzeri, tripsin benzeri ve diğerleridir. Sistein ve histidin rezidülerinin sırasına göre yaklaşık 20 çeşit sistein proteaz tanımlanmıştır (73).

Sistein proteazlar konak-parazit ilişkisinde büyük bir öneme sahiptir. Parazitin beslenmesi, konak dokuya göçü ve konağın immün sisteminden kaçışında etkilidirler (8, 73, 83).

Fasciola hepatica'nın genç ve olgun formları konak dokuda birtakım proteazlar sekrete ederler ve bunların içinde en iyi bilinenleri sistein proteazlar arasında yer alan cathepsin L ve cathepsin B proteazlardır. Özellikle cathepsin L1 ve cathepsin L2 olmak üzere 2 cathepsin L parazitin E/S (ekskresyon-sekresyon) ürünlerinden elde edilir. Parazitin genç formları hem cathepsin B hem de cathepsin L sekrete ederken bazı cathepsin L'ler sadece erişkin formlar tarafından sekrete edilir (8, 20, 83).

Yapılan ilk çalışmalarda parazitten elde edilen tüm cathepsin L proteazların homolog olduğu düşünülmüştür. Daha sonra deneyler cathepsin L proteazların aslında heterojen olduğunu ve genel olarak cathepsin L1 ve L2 olmak üzere 2 ana formunun olduğunu ortaya koymuştur. Bu iki enzim arasında molekül büyüklüğü, etkili oldukları pH gibi fizikokimyasal özellikleri açısından belirgin farklılıklar vardır (20, 28, 29).

Cathepsin L1'in moleköl ağırlığı 27 kDa iken cathepsin L2'nin 29.5 kDa'dur. Ayrıca cathepsin L1'in yedi numaralı proteini prolin, cathepsin L2'nin ise arjinindir (94).

Cathepsin L1 proteazlar immunoglobulinleri parçalayarak parazitin genç formlarına karşı oluşturulan antikor aracılıklı immün yanıtı engeller ve eozinofillerin tutunmasını önler, böylece paraziti konağın bağışıklık sisteminden korur. Cathepsin L2 proteazlar ise fibrinojeni parçalayarak pıhtı oluşumunu sağlar. Parazit etrafında oluşan pıhtının, parazitin yüzeyini immün sistem hücrelerinden koruduğu düşünülmektedir. Ayrıca her iki proteaz kollajen, laminin ve fibronektin gibi matriks proteinlerini parçalamaktadır (8, 19, 20).

Bu çalışmada *F. hepatica* cathepsin L2 geninin klonlanması ve gen dizelemesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. *F. hepatica*'nın ekskretuar-sekretuar antijenlerinin büyük bir bölümünü oluşturan cathepsin L1 ve cathepsin L2 proteinleri *F. hepatica*'ya özgül olmaları ve antijenik yapıları nedeniyle tanı yöntemlerinde ve korunma amacıyla immünizasyon çalışmalarında kullanılabilir potansiyel bir moleküldür. Bu çalışmada klonlama sonucu elde edilen cDNA içeren vektör veya rekombinant cathepsin L2 proteini ile DNA ve rekombinant protein aşı çalışmaları yapılabilmesine olanak sağlanacaktır.

4.GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Parazit

Fasciola hepatica'nın erişkin şekli Malatya Malet kesimhanesinde kesilen doğal olarak infekte sığır karaciğerinin safra yollarından elde edildi. Karaciğerler kontrol edilerek parazit şüpheli olanlar diseke edilerek safra yollarındaki *F. hepatica*'lar toplandı. Parazit serum fizyolojik ile 5–6 kere yıkanarak fosfatla tamponlanmış PBS (8gr NaCl, 0.2 gr KH₂PO₄, 2.3 gr Na₂HPO₄+12H₂O, 0.1gr MgSO₄+7H₂O, 0.132 gr CaCl₂) içine alınarak zaman kaybetmeden laboratuvara getirildi. Parazitten toplam RNA izolasyonu işlemi başlatılıncaya kadar 37 °C'de tamponlu PBS içerisinde bekletildi.

4.2. Besiyerleri ve Solüsyonlar

Minimal Agar

2x Minimal Tuzlar	500 ml/l
% 3,3 Agar	500 ml/l
% 20 Glikoz	10 ml/l
% 20 Mg SO ₄ .7H ₂ O	1 ml/l
% 0,1 Tiamin hidroklorür	0,5 ml/l

SOC Medium (100 ml)

Tryptone	2 gr
Yeast extract	0,5gr
1M NaCl	1 ml
1M KCl	0,25 ml

2M Mg⁺² stok 1ml (Filtrede steril edilir)

2M Glikoz 1ml (Filtrede steril edilir)

Tryptone Yeast extract NaCl ve KCl 97ml. distile suya tamamlanır, otoklavlanır. Daha sonra final konsatrasyonu 20 M olacak şekilde 2 M MgCl stok solüsyonu ve 2M glikoz ilave edilir. Steril distile su ile 100ml'ye tamamlanır. Final Ph'nin 7 olması gerekir.

2 M Mg⁺² stok solüsyonu

MgCl₂ 6H₂O 20,33 gr

MgSO₄ 7H₂O 24,65 gr

Distile su ile 100ml 'ye tamamlanır. Filtre ile steril edilir.

2x YT Agar

Bacto Yeast extract 1gr

Bacto Tryptone 1,6gr

NaCl 0,5 gr

Agar 1,5gr

LB broth (Luria Bertani) Buyyon 100ml

Tryptone 1gr

Yeast Extract 0,5gr

NaCl 0,5gr

2x YT Broth (Yeast Tryptone) 100ml

Bacto Yeast extract 1gr

Bacto Tryptone 1,6gr

NaCl 0,5 gr

Yükleme Tamponu

Sukroz 4gr

2M TrisCl

0,5M ETDA

Brom fenol blue 4mgr

100mM CaCl₂ 100ml

100 mM CaCl₂ 6H₂O 21,9 g/L

5mM MgCl₂ 6H₂O 1,02g/L

5mM Tris 5ml (1M P 47,6)

TAE

0,04 M Tris acetat

0,001M ETDA

pH:8.0

SAB+CV (Sample application buffer + crystal viole)

% 50 gliserol

1x TAE buffer 10 µl

2µg/mlson konsantrasyonda kristal viole

4.3. Plazmit (pGEM® -T Easy Vector)

pGEM® -T Easy Vector System (Promega Co. Madison, WI, ABD)

vektörü kullanıldı (50).

4.4. Toplam RNA İzolasyonu

Toplam RNA izolasyonunun bütün aşamaları steril koşullarda yapıldı. *PBS* içerisinde canlı olarak tutulan üç erişkin *F. hepatica* tartılarak *PBS* ile birkaç kez yıkandı. Steril koşullarda bistüri ile oldukça küçük parçalara ayrıldı. Mikrosantrifüj tüplerine konulan parçacıkların her 50-100 mg'ına 1ml TRI reagent (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, ABD) eklendi. 10 dakika süreyle +4⁰C'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. 15 saniye süre ile elle hafifçe çalkalandıktan sonra oda ısısında 10 dk. bekletildi ve 15 dk süreyle +4⁰C'de 13.500 rpm'de santrifüj edildi. Tüpte üstten alta doğru sırayla oluşan RNA, protein ve DNA tabakalarından RNA içeren üst sıvı tabakası pipetle yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine başlangıçta kullanılan TRI reagent'nin her ml'si için 0.5ml isopropanol eklenerek 10 dk. oda ısısında bekletildi. Bu sürenin sonunda yine 10 dk. süreyle +4⁰C'de 13.500 rpm'de santrifüjlendi. Tüpte oluşan üst sıvı tüpten uzaklaştırıldı ve çöküntü üzerine başlangıçtaki TRI reagent'in her bir ml'si için en az 1ml olacak şekilde % 70'lik soğuk etanol eklendi. Bekletilmeden 5 dk +4⁰C'de 13.500 rpm'de santrifüjlendi ve üst sıvı uzaklaştırıldı. Hafifçe kurutulmaya bırakılan RNA peleti, içinde 1µl RNasin (Promega Co, Madison, WI, ABD) bulunan 100 µl steril dH₂O ile sulandırılıp -80⁰C'de stok örnek olarak saklandı.

4.5. Primerlerin Oluşturulması

Tersine transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (TT-PZR) için kullandığımız primerler *F.hepatica* cathepsin L2 geninin gen kodlayan bölgesine uygun olarak Genbank EMBL U62289'dan yararlanılarak tasarlandı (29). Tasarlanan primerler P1 ve P2 olarak adlandırıldı ve "The Midland Certified Reagent Co, Texas, ABD" firmasından sipariş edildi.

P1 (GGCTCGAGATGCGGTGCTTCGTA)

P2 (GGGTCGACTCACGGAAATCGTGCC)

4.6. Tersine Transkripsiyon ile Kopya DNA (cDNA) Elde Edilmesi

Tersine Transkripsiyon işlemi için başlangıçta P1 ve P2 primerleri yapılacak işleme uygun olarak 20 pmol olacak şekilde sulandırıldı. Bir ependorf tüpüne 5µl RNA ve P1 ve P2 primerlerinin her birinden 2.5µl aktarıldı. Bu tüp 70°C'de 5 dk. İnkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpler oda ısısına gelinceye kadar soğutuldu. Bu karışımdan 10µl alındı ve 1µl M-MLVRT (Moloney–Murine Leukemia Virüs Reverse Transcriptase, Promega Co Madison, WI, ABD), 5µl Reverse Transcriptase Buffer (Promega Co Madison, WI, ABD), 0.7µl RNasin (Promega Co Madison, WI, ABD), 4µl dNTP (Promega Co Madison, WI, ABD), ve 14.3µl dH₂O ile başka bir tüpte birleştirildi. Bu karışım da 37°C'de 1 saat inkübe edilerek cDNA elde edildi.

4.7. *Fasciola hepatica* cathepsin L2 geninin polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) için, 20'şer pmol konsantrasyondaki P1 ve P2 primerlerinden 2µl alınarak 2,5 mM konsantrasyondaki dNTP'den 4µl, cDNA'dan 5µl, MgCl içeren buffer'dan 5µl ve 5U/µl konsantrasyondaki Tag DNA polimerazdan (TaKaRa Ex Tag) 1µl eklendi ve dH₂O ile 50µl'ye tamamlandı. *F.hepatica* cathepsin L2 geni 95⁰C'de 2 dk ön ısıtma ile başlayan ve 94⁰C'de 1 dk ayrılma, 44⁰C'de 2 dk'lık birleşme, 72⁰C'de 2 dk'lık uzamadan oluşan 35 döngü ile devam edip 72⁰C'de 10 dk son uzama ile sonlanan PZR programı ile çoğaltıldı.

4.8. Etidyum Bromür ile Agaroz Jel Elektroforezi

Çoğaltılan geni görüntülemek için %1'lik agaroz hazırlandı. Bunun için bir erlene 0,3 gr agaroz Tris Asetat /EDTA elektroforez tamponu (TAE; 0,04 M Tris Asetat 0,001 M EDTA, pH: 8.0) alındı. Mikrodalga fırında kaynatıldı. Yaklaşık 54⁰C'ye kadar soğutulan karışıma 0,5µgr/ml edityum bromid (Promega Co. Madison, WI, ABD) eklenerek agaroz jel donduruldu. Örnekler jele yükleme tamponu (sukroz 4gr, 2M TrisCl 0,5M EDTA ve 4mg brom fenol blue) kullanılarak yüklendi. Marker olarak 100 baz'lık hyper ladder DNA kullanıldı. 60 amper akım uygulandı. Jelin 2/3'ünü koşuncaya kadar beklendi. Ultraviyole (UV) ışık kaynağı altında agaroz jelde *F. hepatica* cathepsin L2 genine uygun büyüklükte bant görüntülendi.

4.9. Kristal Viyole ile Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi yatay bir jel aparatında yapıldı. %1lik agaroz jel 1xTAE (0,04 M Tris Asetat, 0,001 M EDTA, pH: 8.0) tampon çözeltisi ile hazırlanarak mikrodalgada kaynatıldı. Elin dayanabileceği ısıda soğutuldu. Son konsantrasyon 2µg/ml olacak şekilde kristal viyole ilave edildi ve agaroz jel donduruldu. DNA örneklerine 2µl SAB+CV ilave edilerek yüklendi. Elektroforez için 40-50 mA akım uygulandı. Jelin 2/3'ünü koşuncaya kadar beklendi. Spesifik DNA bantları mümkün olduğu kadar küçük kesilerek QIA quick jel ekstraksiyon kiti kullanılarak saflaştırıldı (6, 72).

4.10. *Fasciola hepatica* Cathepsin L2 Geninin Agaroz Jelden Saflaştırılması

Agaroz jelde görüntülenen cathepsin L2 DNA'sına ait bantlar kesildi. Qiagen QIA quick jel ekstraksiyon kiti kullanılarak üretici firma önerisine göre saflaştırıldı. Saflaştırma sonucunda elde edilen DNA tüpte toplandı ve kullanılmaya kadar -20⁰C'de saklandı (72).

4.11. Rekombinant Plazmitin Oluşturulması (Ligasyon)

Agaroz jelden saflaştırılarak -20⁰C'de bekletilen *F. hepatica* cathepsin L2 geninin pGEM-T Easy vektörüne yerleştirilme işlemi için 1.5 µl saflaştırılmış cathepsin L2DNA'sı, 0.5 µl pGEM-T Easy vektörü, 1 µl T4 DNA ligaz (Promega Co Madison, WI, ABD) enzimi, 5 µl 2x Rapid T4 DNA Ligase Tampon solüsyonu (Promega Co Madison, WI, ABD) ve 2 µl dH₂O'dan oluşan

10 µl'lik ligasyon karışımı bir mikrosantrifüj tüpüne konularak 4⁰C'de bir gece bekletildi. Elde edilen rekombinant plazmit ürünü pGEM-T CL2 olarak adlandırıldı ve *E. coli*'nin JM109 suşuna aktarıldı.

4.12. Transformasyon

E. coli'nin JM109 stok kültüründen alınarak minimal agarda bir gece geliştirildi. Daha sonra *E. coli* JM109 LB-Broth besiyerine alındı ve bir gece geliştirildi. LB-Broth besiyerindeki bir gecelik *E. coli* JM109 kültürü OD₆₀₀'de ölçülerek OD₆₀₀= 0.1 olacak şekilde LB ile 60 ml'ye tamamlandı. 37⁰C'de OD₆₀₀= 0.45-0.55 arasında bir değere ulaşmaya kadar inkübasyona bırakıldı. 2 falcon tüpe bölündü, 4400 rpm'de +4⁰C'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant döküldü. Pelet 10 ml 100mM CaCl₂'de çözüldü. 30 dk buzda inkübe edildi. 4400 rpm'de +4⁰C'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pelet 2 ml 100mM CaCl₂'de çözüldü. Bir gece +4⁰C'de bekletildi.

Ligasyon ürünü ve 50 µl kompetant hücre karıştırıldı. 20 dk buzda inkübe edildi. 42⁰C'lik su banyosunda 50 sn sıcak şoku uygulandı ve üzerine 950 µl SOC medium ilave edildi ve çalkalayıcı aparat üzerinde 1,5 saat 37⁰C'de inkübe edildi. Böylece elde edilen transformasyon ürününün 100 ml'si 100 mg/ml ampisilin eklenmiş LB katı besiyerine ekilerek 37⁰C'de bir gece inkübe edildi. Daha sonra besiyerinde koloniler incelenerek hücrelerin transforme edilen rekombinant plazmiti içerip içermediğini anlamak için koloni PZR işlemi yapıldı.

4.13. Koloni PZR ile transformasyon sonrası pozitif insert'in doğrulanması)

Bakteri kolonisi 50 µl dH₂O içine alınarak yarısı içerisinde 100 µl/ml ampisilin eklenmiş LB katı besiyerine aktarıldı. Geriye kalanı 10 dk kaynatıldı ve daha sonra 13000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatantın 10 µl'si koşulları aşağıda verilen PCR için kullanıldı.

Bileşenler konsantrasyon	Miktar (µl)
dH ₂ O	31
Buffer (MgCl ₂ 'li)	5
dNTP, 2.5 mM	4
P ₁ 20pmol/µl	2
P ₂ 20pmol/µl	2
cDNA	5
Takara (5U/µl)	1

95⁰C'de 2 dk
94⁰C'de 1 dk
44⁰C'de 2 dk
72⁰C'de 2 dk
72⁰C'de 10 dk

35 siklus

4.14. Rekombinant PGEM-T CL2 Vektörünün Miniprep ile Elde Edilmesi

Rekombinant PGEM-T CL2 Vektörü QIAGEN QIA prep Miniprep kiti kullanılarak izole edildi. Bu amaçla 100mg/ml ampisilin içeren 5 ml LB sıvı

besiyerine öze yardımı ile bir koloni alınarak ekim yapıldı. Çalkalayıcı aparat yardımı ile 100 rpm de 37⁰C’de bir gece inkübe edildi.

Bir gecelik kültürden 1.5 ml alınarak bir ependorf tüpe konuldu ve üretici firma önerisine göre rekombinant pGEM-T CL2 vektörü elde edildi (71).

4.15. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile CL2 Gen Bölgesinin Gösterilmesi

Miniprep sonrasında elde edilen ürün P1 ve P2 primerleri kullanılarak PZR yapıldı. Kristal viyole ile jel elektroforezi yapılarak beklenen büyüklükteki bant gözlemlendi.

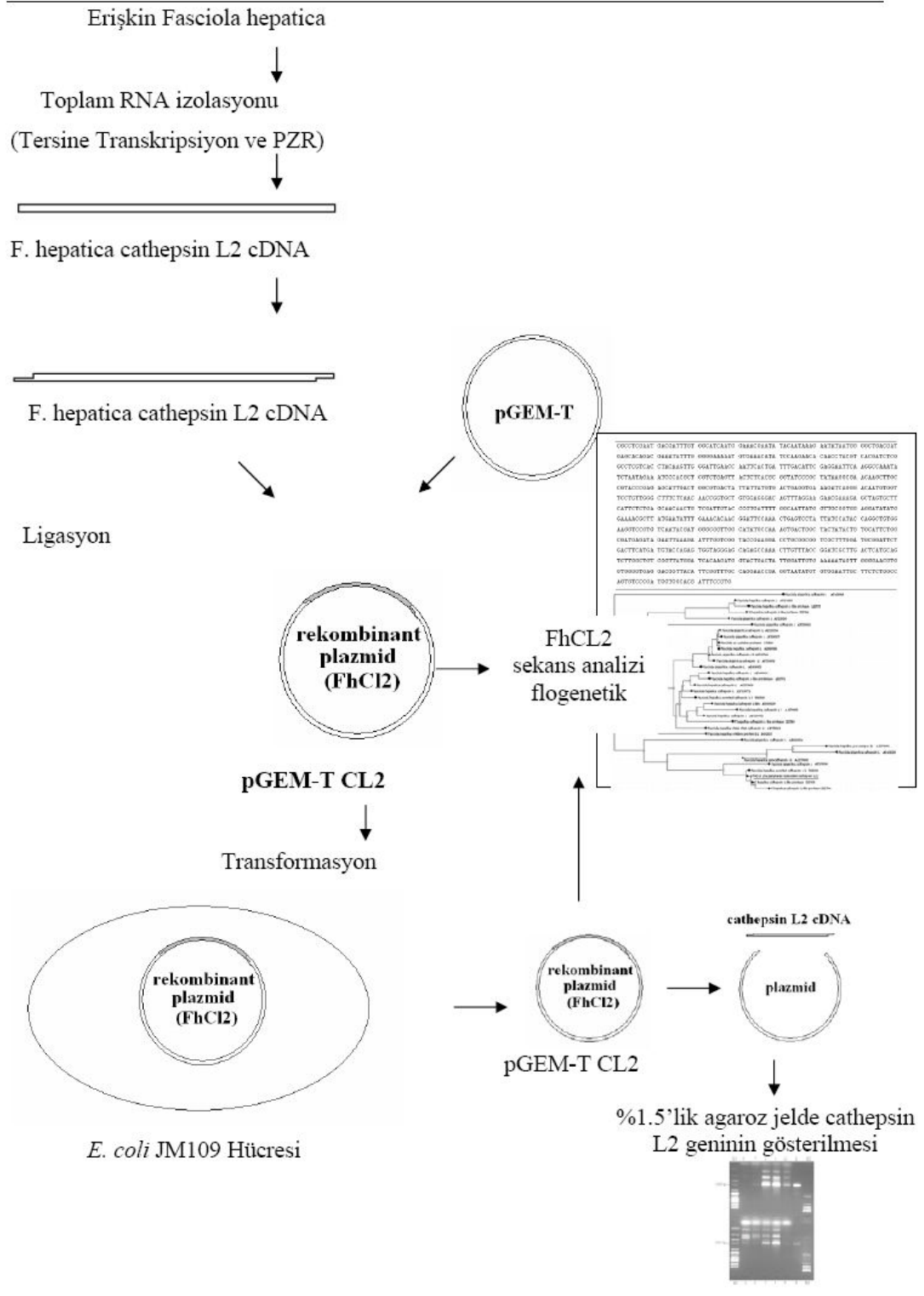
4.16. Cathepsin L2 cDNA sekans analizi

Ligasyon işleminden sonra ve JM109 *E. coli* hücrelerine transformasyondan sonra hücrelerin lizisi ile elde edilen Rekombinant pGEM-T CL2 Vektörü (İontek İlaç tanı ve biyoteknoloji ürünleri araştırma geliştirme sanayi ticaret A.Ş inde) sekans analizi uygulandı. Elde edilen veriler ile Chromas 2 for Windows programında soy ağacı oluşturuldu.

5. BULGULAR

5.1. *Fasciola hepatica* cathepsin L2 geninin klonlanması ve DNA dizileminin belirlenmesi işlemleri ile ilgili deneylerin akış şeması

Yetişkin *F. hepatica*'dan toplam RNA izolasyonu ile başlayan ve *E. Coli* hücrelerine transformasyonlarından sonra *E. coli* kolonilerinden PZR'da doğru büyüklükte bant elde edilerek sonuçlandırılan *F. hepatica* cathepsin L2 geninin ökaryot hücrede klonlanması ve DNA dizileminin saptanması işlemleri ile ilgili tüm basamaklar Şekil 1'de şematize edilmiştir.

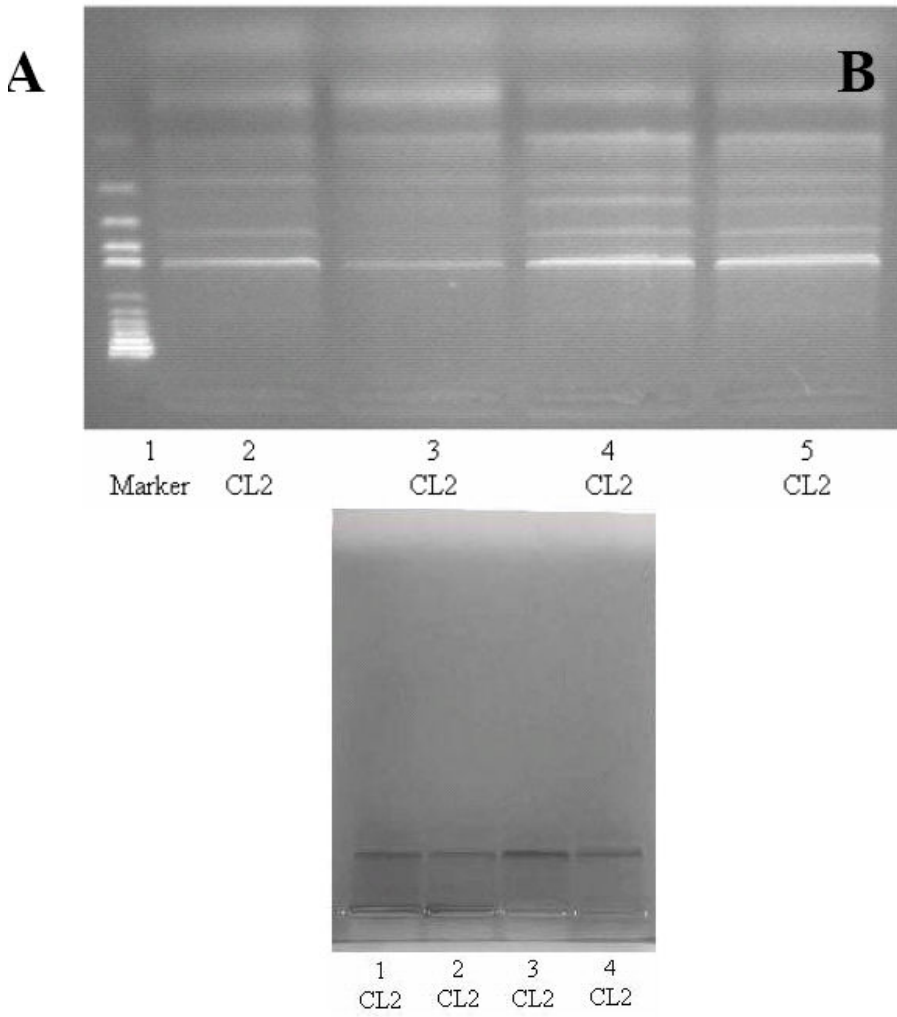


Şekil 1: *Fasciola hepatica* cathepsin L2 geninin ökaryot hücrede klonlanması

5.2. Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan *Fasciola hepatica* Cathepsin L2 geninin görünümü

Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan *F. hepatica* cathepsin L2 geninin %1'lik agaroz jelde etidyum bromür ile boyanarak elde edilen görüntüsü Şekil 2 A'da

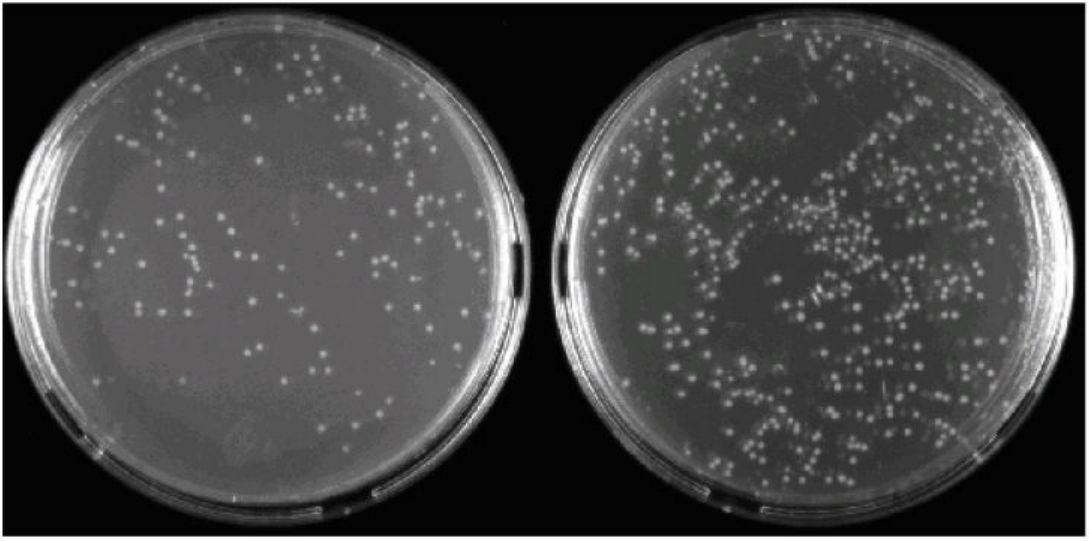
kristal viyole ile boyanarak elde edilen görüntüsü Şekil 2 B'de sunulmuştur.



Şekil 2. Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan *F. hepatica* cathepsin L2 geninin %1'lik agaroz jelde Etidyum bromür ile boyanarak (A) ve kristal viyole ile boyanarak (B) elde edilen görüntüsü. Sütun 1; 1000 baz çifti Hyper Ladder marker, Sütun; 2, 3, 4, 5 ise cathepsin L2 geni.

5.3. Cathepsin L2 geninin pGEM® -T Easy vektörüne yerleştirilmesi ile elde edilen Rekombinant pGEM-T CL2 plazmitinin transforme edildiği *E. Coli* kolonileri

Rekombinant pGEM-T CL2 plazmitinin JM109 *E. coli* hücrelerine transformasyonlarından sonra ampisilinli LB katı besi yerinde oluşan kolonilerin görünümü Şekil 3’de sunulmuştur.

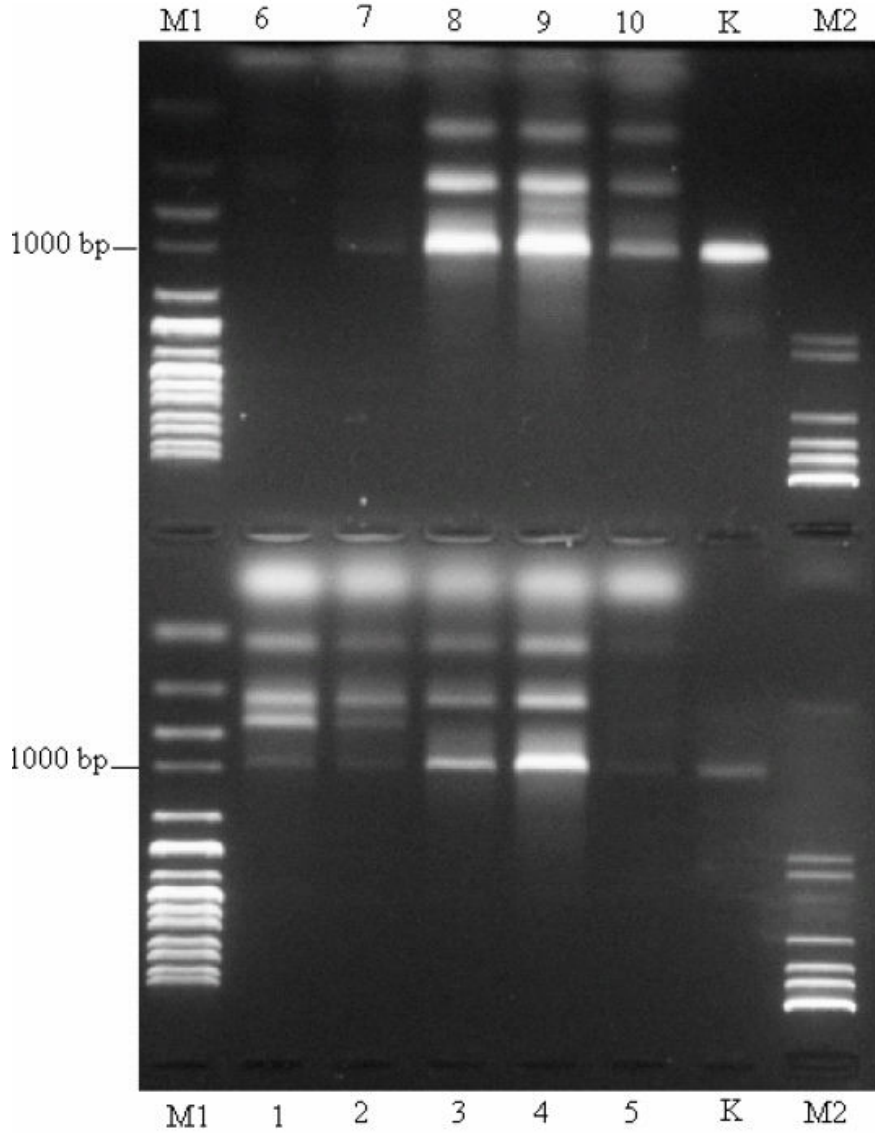


Şekil 3. Rekombinant pGEM-T CL2 plazmitinin *E. coli* hücrelerine transformasyonlarından sonra oluşan kolonilerin LB katı besiyerindeki görünümü.

5.4. Transforme edilen kompetan JM109 *E. coli* hücrelerinde rekombinant pGEM-T CL2 plazmitinin PZR Tarama ile gösterimi

Fasciola hepatica CL2 proteinini kodlayan gen pGEM-T vektörlerine klonlama yapılarak *E. coli* hücrelerine transformasyonlarından sonra kompetan JM109 *E. Coli* kolonilerinden koloni PZR yöntemi ile elde edilen plazmit DNA’ların PZR tarama sonrasında %1’lik agaroz jelde yürütülmesi sonucu

elde edilen *F. hepatica* cathepsin L2 gen bantlarının görünümü Şekil 4’de sunulmuştur.



Şekil 4. Transformasyon uygulanan *E. coli* kolonilerinde rekombinant pGEM-T CL2 plazmitinin PZR tarama ile elde edilerek varlığı kanıtlanan *F. hepatica* cathepsin L2 geninin %1.5’lik agaroz jeldeki görünümü. M1; Fermentas SMO139, M2; Lambda Marker, 1., 2., 3., 4. ve 5. sütunlar; Taq polimeraz kullanılan insert ile ligasyon, 6., 7., 8., 9. ve 10. sütun; Takara polimeraz kullanılan insert ile ligasyon, K; Kontrol (İnsert genin PZR ürünü).

5.5 Cathepsin L2 cDNA dizilemi ve soyağacı

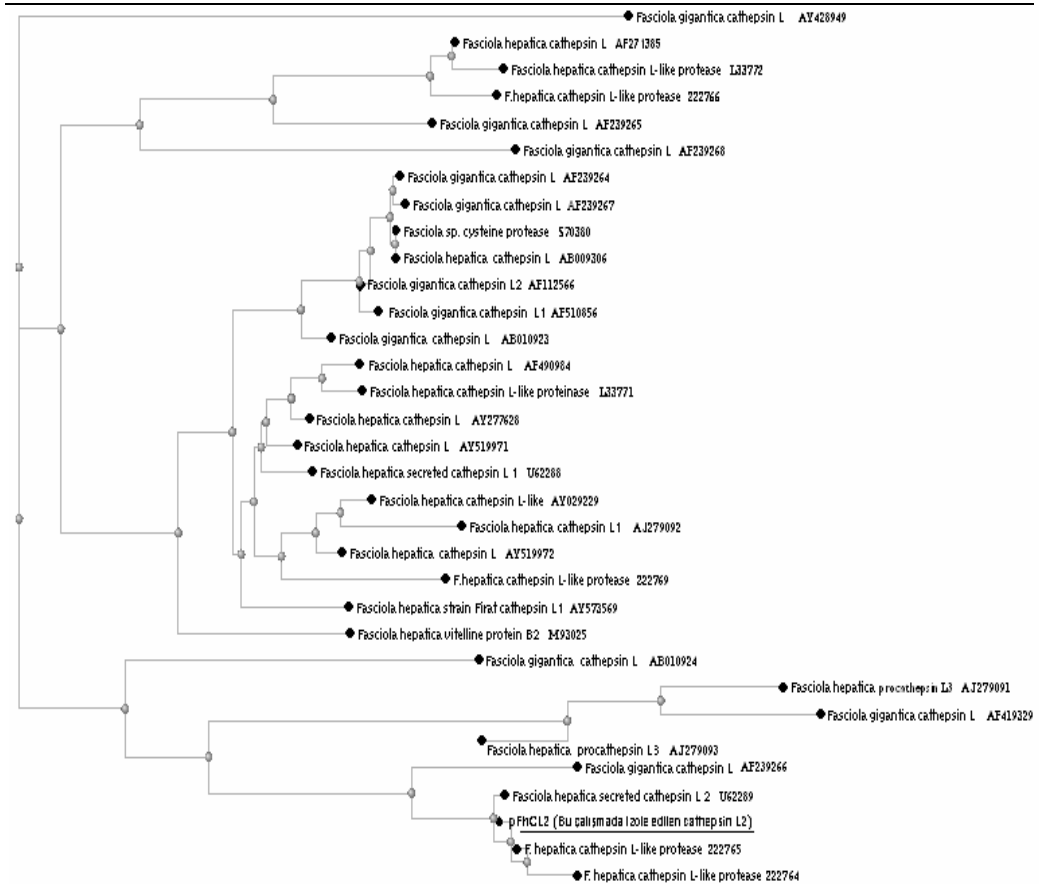
Ligasyon işleminden sonra ve JM109 *E. coli* hücrelerine transfeksiyonundan sonra hücrelerin lizisi ile elde edilen Rekombinant pGEM-T CL2 Vektörünün sekansanalizi sonucu elde edilen cathepsin L2 cDNA dizilemi Şekil 5’de, aminoasid dizilemi Şekil 6’da ve soyağacı şekil 7’de sunulmuştur.

CGCCTCGAAT	GACGATTTGT	GGCATCAATG	GAAACGAATA	TACAATAAAG	AATATAATGG
GGCTGACGAT	GAGCACAGAC	GAAATATTTG	GGGGAAAAAT	GTGAAACATA	TCCAAGAACA
CAACCTACGT	CACGATCTCG	GCCTCGTCAC	CTACAAGTTG	GGATTGAACC	AATTCACTGA
TTTGACATTC	GAGGAATTCA	AGGCCAAATA	TCTAATAGAA	ATCCCACGCT	CGTCTGAGTT
ACTCTCACGC	GGTATCCCGC	TATAAGGCGA	ACAAGCTTGC	CGTACCCGAG	AGCATTGACT
GGCGTGACTA	TTATTATGTG	ACTGAGGTGA	AAGATCAGGG	ACAATGTGGT	TCCTGTTGGG
CTTTCTCAAC	AACCGGTGCT	GTGGAGGGAC	AGTTTAGGAA	GAACGAAAGA	GCTAGTGCTT
CATTCTCTGA	GCAACAACCTG	TCGATTGTAC	CCGTGATTTT	GGCAATTATG	GTTGCGGTGG
AGGATATATG	GAAAACGCTT	ATGAATATTT	GAAACACAAC	GGATTCCAAA	CTGAGTCCTA
TTATCCATAC	CAGGCTGTGG	AAGGTCCGTG	TCAATACGAT	GGGCGGTTGG	CATATGCCAA
AGTGACTGGC	TACTATACTG	TGCATTCTGG	CGATGAGATA	GAATTAAAGA	ATTTGGTTCGG
TACCGAAGGA	CCTGCGGCGG	TCGCTTTGGA	TGCGGATTCT	GACTTCATGA	TGTACCAGAG
TGGTAGGGAG	CAGAGCCAAA	CTTGTTTACC	GGATCGCTTG	ACTCATGCAG	TCTTGGCTGT
CGGTTATGGA	TCACAAGATG	GTACTIONACTA	TTGGATTGTG	AAAAATAGTT	GGGGAACGTG
GTGGGGTGAG	GACGGTTACA	TTCGGTTTGC	CAGGAACCGA	GGTAATATGT	GTGGAATTGC
TTCTCTGGCC	AGTGTCCCGA	TGGTGGCACG	ATTTCCGTG		

Şekil 5. Cathepsin L2 cDNA dizilemi.

ASNDDLWHQW KRIYNKEYNG ADDEHRRNIW GKNVKHIQEH NLRHDLGLVT YKLGLNQFTD
LTFEEFKAKY LIEIPRSSEL LSRGIPYKAN KLAVPESIDW RDYYYYVTEVK DQGQCGSCWA
FSTTGAVEGQ FRKNERASAS FSEQQLVDCT RDFGNYGCGG GYMENAYEYL KHNGKETESY
YPYQAVEGPC QYDGRLAYAK VTGYTIVHSG DEIELKNLVG TEGPAAVALD ADSDFMMYQS
GIYQSQTCLP DRLTHAVLAV GYGSQDGDY WIVKNSWGTW WGEDGYIRFA RNRGNMCGIA
SLASVPMVAR FP

Şekil 6. Cathepsin L2 aminoasid dizilemi.



Şekil 7. Cathepsin L2 soyağacı. Çalışmamızın ürünü olan cathepsin L2 literatürdeki cathepsin L2 (genbank no: U62289) (29) ile %99, Cathepsin L like proteaz (genbank no: Z22764) (40) ile %98, Cathepsin L1 (genbank no: AY573569) (53) ile %85 benzerlik göstermektedir. Diğer *F. hepatica* cathepsin L veya L-like proteazlar [AF271385 (83), L33772 (38), S70380 (95), AB009306 (95), AF490984 (7), L33771 (94), AY277628 (51), AY029229 (14), AJ279092 (18), AY519972 (15), Z22769 (40), M93025 (74), AJ279091 (38), AJ279093 (39), Z22765 (40), Z22764 (40)] ile *Fasciola gigantica* cathepsin L proteazlar [AY428949 (60) AF239265, AF239266, AF239268, AF239264, AF239267, AF112566 (35), AF510856 (42), AB010923, AB010924 (96), AF419329 (84)] arasındaki benzerlik sırasıyla gösterilmiştir.

6. TARTIŞMA

Fasciolosis tüm dünyada özellikle hayvancılığın yaygın olduğu ülkelerde halen oldukça sık görülen paraziter bir hastalıktır. Her ne kadar koyun ve sığırların hastalığı olarak tanımlanmakta ise de insanlarda da sık olarak görülmekte ve hiperendemik olduğu bölgeler bulunmaktadır (12, 58, 93).

Bu çalışmada *F. hepatica* cathepsin L2 geni kompetan JM109 *E. coli* hücresinde açıklatılmıştır. Bu amaçla, doğal olarak infekte sığır karaciğerinden elde edilen *F. hepatica*'dan toplam RNA elde edilmiş ve RNA'dan cathepsin L2 cDNA oluşturulmuştur. PZR ile çoğaltılan cathepsin L2 cDNA pGEM-T Easy vektörüne yerleştirilmiştir. Oluşturulan ve pGEM-T CL2 olarak adlandırılan rekombinant vektör kompetan JM109 *E. coli* hücrelerine transfekte edilerek cathepsin L2 klonlanması tamamlanmış JM109 *E. coli* kolonilerinden PZR tarama ile elde edilen cathepsin L2 cDNA %1.lik agaroz jelde yürütülerek gösterilmiştir.

Çalışmada *F. hepatica* cathepsin L2 geni matür enzim yanı sıra proregion bölgesi ile birlikte klonlanmıştır. Proregion bölgesinin varlığı cathepsin L2 proteinin doğru katlanarak üç boyutlu yapısının şekillenmesi ve stabilizasyonu için gereklidir. Ayrıca endoplazmik retikulumdan çıkışta da rol aldığı bilinmektedir (2, 29, 75, 88).

Vektörlerde ekspresyon için promotor bölge bulunması da gerekmektedir. Bu amaçla genellikle sitomegalovirüs (SMV), Bovine papilloma virus (BPV), Simian virus 40 (SV40), Epstein Barr virus (EBV) gibi

viral ve T7 gibi bakteriyel promotorlar kullanılmaktadır. Promotor bölgeye bağılı olarak vektörler farklı düzeylerde ekspresyon özellikleri sergilemektedir. Bu çalışmada çok değişik hücre tiplerinde yüksek derecede ekspresyon oluşturma avantajı nedeniyle T7 promotoru içeren vektörler kullanılmıştır. Ligasyon işlemi için genellikle kesim enzimlerine gereksinim vardır. Diğer vektörlerden farklı olarak A kuyruğu içerdiği ve bu nedenle kesim enzimi gerektirmediği için bu çalışmada p-GEM T vektörü tercih edilmiştir. Bu vektörde A kuyruğu yanısıra kesim bölgelerinin de bulunması yerleştirilen gen bölgesinin değişik amaçlarla başka vektörlere aktarımı için enzimlerle kesilerek alınmasına da olanak sağlamaktadır (50).

Rekombinant vektörün hücre içine sokulması yani transfeksiyon için kalsiyum fosfat, DEAE-dekstran, elektroporasyon, mikroinjeksiyon ve lipozom kaynaklı yöntemler kullanılabilir. Yöntem seçimi çalışılan hücre tipine göre değişmektedir. Kalsiyum fosfat ve DEAE-dekstran yöntemleri uygulaması basit ancak her hücre türüne uygulanamayan yöntemlerdir. Mikroinjeksiyon yöntemi pahalı ve deneyim gerektiren bir yöntem, elektroporasyon yöntemi ise çalışılan hücreye zarar verme riski yüksek yöntemlerdir. Lipozom kaynaklı sentetik lipidler hücre zarı ile pozitif-negatif yük farkı sonucu nükleik asitler ile kompleks oluşmasına ve endositozla veya füzyonla hücrelere girişi kolaylaştırmaktadır (89). Lipozom kaynaklı yöntemler kolay ve çabuk sonuç vermesi, *in vitro* ve *in vivo* uygulanabilmesi ve farklı hücre türlerinde çalışılabilmesi gibi nedenlerle bu çalışmada tercih edilmiştir.

Transfekte hücrelerdeki rekombinant vektörün elde edilmesi için değişik fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılabilir. Yöntemin seçimi

laboratuvar olanakları ve çalışılan ürün özelliklerine göre yapılmaktadır. Bu çalışmada ticari Qiagen QIA Miniprep kiti kullanılmıştır.

Vektöre yerleştirilen genin varlığı, hücre lizisi ve hücrelerdeki rekombinant vektörün elde edilmesini takiben PZR, enzim kesim deneyleri, dizi analizi ve transforme hücrelerdeki rekombinant vektörün varlığını gösteren PZR-T ile yapılmaktadır. Transforme hücrelerdeki rekombinant vektörün varlığını göstermek için daha kısa sürede sonuç verdiği ve kolay uygulanabilir bir yöntem olduğu için PZR-T tercih edilmiş ve nükleotid dizi analizi ile de sonucu doğrulanmıştır.

Cathepsin L2 geninin hem PZR ürünü cDNA hem de rekombinant vektör aşamalarında nükleotid dizilemi ve aminoasid dizilemi belirlenmiştir. Çalışmamızdaki cathepsin L2 nükleotid dizilimi literatürde bildirilen ikinci *F. hepatica* cathepsin L2 nükleotid dizilimi olup Dowd ve ark. (29) tarafından bildirilen *F. hepatica* cathepsin L2 (gen bank no: U62289) ile %99 benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda 273 nükleotidten (91 amino asid) oluşan propeptid bölgesi ve 660 nükleotidten (220 amino asid) oluşan matür enzim bölgesi verilmiştir. Matür enzimin büyüklüğü 24 459 Da'dur.

Çalışmamızdaki cathepsin L2'nin Heussler ve Dobbelaere (40) tarafından bildirilen *F. hepatica* cathepsin L-like protease (gen bank no: Z22764) ile %98, Elazığ bölgesinde daha önce izole edilen *F. hepatica* cathepsin L1 (gen bank no: AY573569) ile %85 benzerlik gösterdiği de görülmüştür (53).

Ülkemizde fasciolosise geçmişte daha çok cerrahi girişimler sırasında tanı konmakta olduğu ve bu nedenle sporadik olgular şeklinde rastlandığı kanısı yaygın idi. Günümüzde ayırıcı tanıda daha sık düşünülmesi gerektiği, laboratuvar olanaklarının gelişmesi nedenleriyle sanılandan daha fazla görüldüğü ortaya konmuştur. Ancak fasciolosis insidansı ve prevalansı konusundaki çalışmalar hala oldukça az sayıdadır (45, 46, 79).

Kozmopolit bir parazit olan *F. hepatica*'ya tüm dünyada rastlanmaktadır. Son yıllarda dünyada *F. hepatica* enfeksiyonlarında bir artış olmuştur ve Dünya Sağlık Örgütü'nün 1995 yılında yaptığı bir çalışmada 61 ülkede 2.5 milyon kişinin enfekte olduğu ve 180 milyondan fazla kişinin de risk altında olduğu bildirilmiştir (22, 25, 93). Fasciolosis görülme sıklığı iklim, ara konakların dağılımı ve sosyokültürel yapıya bağlı olarak değişmekte ve dünyada hiperendemik olduğu bölgeler bulunmaktadır. Batı Avrupa (Portekiz, Fransa, İspanya), Güney (Peru, Ekvator, Bolivya) Amerika, Kuzey Afrika, Uzak Doğu (Japonya, Kore), Okyanusya ve komşumuz İran fasciolosisin endemik veya hiperendemik düzeyde görüldüğü bölgelerdir (24, 25, 31, 58).

Fasciolosisin klasik kesin tanısı, dışkıda *F. hepatica* yumurtalarının görülmesidir. Ancak inkübasyon dönemi ve hastalığın akut döneminde parazit henüz yumurta yapacak olgunluğa ulaşamadığı için dışkıda yumurta bulunmamaktadır. Olgunlaştıktan sonraki dönemde ise düzenli yumurtlamaması nedeniyle her zaman dışkıda yumurta görülmeyebilir. Dışkıda görülen yumurtaların başka parazitlerle karışabilmesi veya yalancı parazitöz gibi nedenlerle de dışkı bakısı tanıda tek başına yeterli olmamaktadır. Ayrıca laboratuvar tetkiklerinde sık rastlanan eozinofili ile radyolojik yöntemlerle

saptanan bulgular da ancak tanıyı destekleyebilir özellikle olup fasciolosis'e özgü değildir (13, 34, 36, 54, 56, 66, 80, 90, 91).

Bu durum fasciolosisin tanısında serolojik yöntemleri ön plana çıkarmaktadır. *F.hepatica*'ya özgü antikorların araştırıldığı IHA ve ELISA gibi serolojik yöntemler tanı ve epidemiyolojik çalışmalarda sık kullanılan yöntemlerdir ve ticari kitleri bulunmaktadır. Serolojik yöntemler her ne kadar mikroskopik bakıya göre duyarlı ve özgül ise de duyarlılık ve özgüllükleri kullanılan antijene göre değişmektedir (23). Geçmişte sık kullanılan somatik antijenler *Dicrocoelium dentriticum*, *Taenia saginata*, *Echinococcus granulosus*, *Ascaris suum*, *Schistosoma mansoni* ve *Trichinella spiralis* gibi helmint enfeksiyonları ile oldukça fazla çapraz reaksiyon vermeleri nedeniyle terkedilirken, daha sonra aynı amaçla ekskretuar-sekretuar (E/S) antijenlerin kullanılması ile çapraz reaksiyon görülme sıklığı azalmıştır (10, 41). Son zamanlarda pürüfiye E/S antijen ve rekombinant antijenlerin kullanıldığı çalışmalarda serolojik tanı yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin arttığı bildirilmektedir (22). Ancak henüz ticari olarak kullanıma sunulamamışlardır.

Fasciolosis tanısında rekombinant antijenle çalışmalar yağ asidi bağlayan protein, glutathione S-transferaz ve cathepsin proteazlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Ancak yağ asidi bağlayan protein ve glutathione S-transferaz *S. mansoni* antijenleri ile oldukça fazla benzerlik gösterdiği ve çapraz reaksiyonlar nedeniyle tanı için uygun görülmemektedir. Bu antijenlerle yapılan immünizasyon çalışmalarında *S. mansoni*'ye karşı değişik düzeylerde korunma sağlandığı görülmüştür. Cathepsin L1 ile yapılan çalışmalarda çapraz reaksiyonların görülmediği ve antijen olarak kullanıldığı ELISA yönteminde

özgüllüğün %96.5-100, duyarlılığın ise %98.9-100 arasında değiştiği bildirilmektedir (23). Ancak cathepsin L2'nin fasciolosis tanısındaki yeri konusunda henüz yeterli çalışma bulunmamaktadır.

Fasciolosisin bir başka önemli yönü özellikle besi hayvanlarında neden olduğu verim kaybı ve ölümler sonucu oluşturduğu ekonomik kayıplardır. Hayvancılığın yaygın olduğu ülkelerde her yıl milyarlarca dolarlık ekonomik kayba yol açmaktadır. Tüm dünyada fasciolosis nedeniyle oluşan yıllık ekonomik kaybın 2 milyar dolardan fazla olduğu (85), sadece İngiltere'de yıllık kaybın 50 milyon sterlin olduğu bildirilmiştir (3). Fasciolosisin ülkemiz ekonomisi için de önemli kayıplara neden olabildiği, fasciolosisin yaygınlığı ve ekonomik kayıpların boyutu ile ilgili yapılan çalışmalarda gösterilmektedir (47). Acil ve etkili bir korunma stratejisinin uygulanması gerektiği ortadadır. Ancak henüz yeterli düzeyde immünizasyon çalışması olmadığı görülmektedir.

Fasciolosisden korunmada uygulanabilecek hazır ticari bir aşı bulunmamaktadır. Ancak aşı geliştirme çalışmaları sürmektedir. *F. hepatica*'ya karşı aşı olarak cathepsin L1, cathepsin L2, lösin aminopeptitaz (LAP), glutatyon S-Transferaz (GST), hemoglobin, yağ asidi bağlayan protein (YABP) ve paromyosin gibi çeşitli moleküller aşı olarak denenmektedir (26).

Fasciolosis'e karşı aşı olarak kullanılan yağ asidi bağlayan proteinlerden sitoplazmik yağ asidi bağlayan proteinin (SYABP) koruyuculuğu farelerde %69-78, buzağılarda %55 olarak bulunmuştur. Ancak, sığırlarda koruma sağlamadığı gösterilmiştir. Glutatyon S-Transferaz ile sığırlarda ancak %69 başarı sağlanmış, *F.hepatica*'nın subtegümental proteini olan paramyosin ile koyunlarda parazit sayısı %45, sığırlarda %47 oranında azaltılabilmektedir. *F.*

hepatica hemoglobini ile aşılanan sığırlarda ise parazit sayısı %43.8 oranında azalmıştır (26, 86). Sistein proteinazlar ile yapılan aşı çalışmalarıyla koyunlarda %65, lösin aminopeptidazlar ile yapılan çalışmalarla ise %81 koruyuculuk sağlanmıştır (26, 70).

Fasciola hepatica'nın E/S ürünü sistein proteinazlardan cathepsin L1 ve cathepsin L2 tek başına veya birlikte aşı olarak denenmiş ve umut verici sonuçlar alınmıştır (26, 70). Cathepsin L1 ile yapılan çalışmalarda parazit sayısında koyunlarda %33-69 sığırlarda ise %42.5 azalma sağlandığı bildirilmiştir. Ayrıca yumurta çıkarmanın da %40-71 düzeyinde azaldığı görülmüştür (26). Sığırlarda cathepsin L1 proteini ve *F.hepatica* hemoglobini aşı olarak birlikte uygulandığında parazit sayısının %51.9 oranında atılan canlı yumurta sayısının ise %0-80 düzeylerinde azaldığı bildirilmiştir (26). 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 (20, 70, 94).

Tam bir korumadan uzak bu sonuçlar yeni arayışlara yol açmış ve DNA aşılarını gündeme getirmiştir (1, 52, 55). *F. hepatica* cathepsin L1 genini kodlayan cDNA ile 50 µg tek injeksiyon şeklinde aşı uygulanan bir çalışmada, aşının koruyuculuğu dişi sıçanlarda %74, erkek sıçanlarda ise %100 olduğu bildirilmiştir (51). Ancak henüz cathepsin L2 cDNA aşısı ile ilgili herhangi bir aşı çalışması bulunmamaktadır. Henüz çok yeni olan DNA aşıları konusunda ileri çalışmaların yapılmasına gereksinim vardır. Çalışmamızda oluşturulan cathepsin L2 cDNA'sının aşı çalışmalarında kullanılabileceği ve bu alandaki bilgi gereksinimine katkı sağlayabileceği kanısındayız.

Sonuç olarak, bu çalışmada *F. hepatica* cathepsin L2 genini kodlayan cDNA klonlanmış, kompetan JM109 *E. coli* hücresinde açıklanmıştır. *F. hepatica* cathepsin L2 nükleotid ve aminoasid dizilimi ortaya konarak bu konuda literatürdeki ikinci veri olarak sunulmuştur.

7. KAYNAKLAR

1. Abath FG, Montenegro SML, Gomes YM, (1998). Vaccines against human parasitic diseases : an overview. *Acta Tropica*; 71: 237-254.
2. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, (1994). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, New York & London: 3. Baskı, p 551-599.
3. Anonim (2006). <http://www.aber.ac.uk/parasitology/Edu/Digen/DigenTxt.html>
4. Apt W, Aguilera X, Vega F, Miranda C, Zulantay I, Perez C, et al. (1995). Treatment of human chronic fascioliasis with Triclabendazole: Drug Efficacy and Serologic Response. *Am J Trop Hyg*, 52: 532-535.
5. Bacq Y, Besnier JM, Duong TH, Pavie G, Metman EH, Choutet P, (1991). Successful treatment of acute fascioliasis with bithionol. *Hepatology*, 14: 1066-1069.
6. Balık-Turgut D, Çelik V, Moreton K, Brady LR, (2005). Overcoming Cloning Problems By Staining Agarose Gels With crystal Violet Instead Of Ethidium Bromide In Lactate Dehydrogenase Gene From Plasmodium Vivax And Plasmodium Falciparum. *Acta Biologica Hungarica* 56(3-4); 389-397.
7. Barrantes WI, Marroquim M, Lopez M, Ho PL, Romero-Ramos CR. Expression of active recombinant cathepsin L from *Fasciola hepatica* in *E. coli* system. Unpublished
8. Berasain P, Carmona C, Frangione B, Dalton JP, Goñi F, (2000). *Fasciola hepatica*: Parasite- Secreted Proteinases Degrade All Human IgG Subclasses: Determination of the Specific Cleavage Sites and Identification of the Immunoglobulin Fragments Produced. *Experimental Parasitology*, 94: 99-110.
9. Bogitsh BJ, Carter CE, Oeltmann TN, (2005). Parasite-host interactions. In: *Human Parasitology*. Elsevier Academic Pres. Third edition. p 20-28.
10. Bossaert K, Farnir F, Leclipteux T, Protz M, Lonneux JF, Losson B, (2000). Humoral immun response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 87: 103-123.
11. Bossaert K, Jacquinet E, Saunders J, Farnir F, Losson B, (2000). Cell-mediated immune response in calves to single-dose, trickle, and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol*, 88; 17-34.
12. Bousses SH, Meunier C, Durand P, Renaud F, (2001). Dynamics of host-parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Microbes and Infection*, 3: 841-849.
13. Camilla SG, Sharon BB, Peter FW, (2001). Imported *Fasciola hepatica* Infection in the United States and Treatment with Triclabendazole. *Clin Infect Dis*, 33: 1-5.
14. Carnevale S, Rodriguez MI, Guarnera EA, Carmona C, Tanos T, Angel SO, (2001). Immunodiagnosis of fasciolosis using recombinant procathepsin L cystein proteinase. *Diagn Microbiol Infect. Dis*, 41; (1-2), 43-49.

15. Castro AM, Magalhaes EM, Lopes A.S, Conceicao A, Martin Alonso J, Moradas Ferreira P, Para F, Correia da Costa J. Use of recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L-like protease in immunoprophylactic studies in mice. Unpublished
16. Coles GC, Stafford KA, (2001). Activity of oxyclozanide, nitroxynil, clorsulon and albendazole against adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Vet Rec*, 148: 723–724.
17. Coles GC,(2006). Treatment of Fascioliasis in Human Infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 100: 187-188.
18. Cornelissen JBWJ, Gaasenbeek CPH, Borgsteede FHM, Holland WG, Harmsen MM, Boersma WJA, (2001). Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L-like protease. *Int J Parasitol*, 31: 728-737.
19. Curtale F, Hassanein Y, Lorenzo S, (2005). Control of Human Fascioliasis by Selective Chemotherapy: Design, Cost and Effect of the First Public Health, School-Based Intervention Implemented In Endemic Areas of the Nile Delta, Egypt. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 99: 599- 609.
20. Dalton JP, McGonigle S, Rolph TP, Andrews SJ, (1996). Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infect Immun*, 64: 5066-5074.
21. Dalton JP, Neill SO, Stack C, Collins P, Walshe A, Sekiya M, Doyle S, Mulcahy G, Hoyle D, Khaznadji E, Moiré N, Brennan G, Mousley A, Kreshchenko N, Maule AG, Donnelly SM,(2003). *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int J Parasitol*, 33: 1173-1181.
22. Dalton JP. Fasciolosis. Behm CA, Sangster NC (editors). *Pathology, Pathophysiology and Clinical Aspects*.
<http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/ReadingRoom/0851992609.asp>: 185-224.
23. Dalton JP. Fasciolosis. Hillyer GV (editor). *Immunodiagnosis of Human and Animal Fasciolosis*. <http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/ReadingRoom/0851992609.asp>: 435-447.
24. Dalton JP. Fasciolosis. Malone JB, Yilma JM (editors). *Predicting outbreaks of Fasciolosis: fromollerenshaw to satellites*.
<http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/ReadingRoom/0851992609.asp>: 151-183.
25. Dalton JP. Fasciolosis. Mas-Coma S, Bargues MD, Esteban JG (editors). *Human Fasciolosis*.
<http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/ReadingRoom/0851992609.asp> : 411-434. 72
26. 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.

27. Donnelly S, O'Neill SM, Sekiya M, Mulcahy G, Dalton JP, (2005). Thioredoxin Peroxidase Secreted by *Fasciola hepatica* Induces the Alternative Activation of Macrophages. *Infect Immun*, 73: 166-173.
28. Dowd AJ, Smith McGonigle S, Dalton JP, (1994). Purification and characterisation of a second cathepsin L proteinase secreted by the parasitic trematode *Fasciola hepatica*. *Eur J Biochem*, 223: 91-98.
29. Dowd AJ, Tort J, Roche L, Ryan T, Dalton JP, (1997). Isolation of a cDNA encoding *Fasciola hepatica* cathepsin L2 and functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biochem Parasitol* 88: 163-174.
30. Espino AM, Rodriguez MJR, Hillyer GV, (2001). Isolation and immunological characterization of fatty acid bind protein isoforms from *Fasciola hepatica*. *J Parasitol*, 87: 1028-1033.
31. Esteban JG, Gonzalez C, Bargues MD, Angles R, Sanchez C, Naquira C, Mas-Coma S, (2002). High fascioliasis infection in children linked to a man-made irrigation zone in Peru. *Trop Med Int Health*, 7: 339-348.
32. Esteban JG, Gonzalez C, Curtale F, Muñoz-Antoli C, Valero MA, Bargues MD, El SAyed M, El Wakeel AAW, Abdel-Wahab Y, Montresor A, Engels D, Savioli L, Mas-Coma S, (2003). Hyperendemic Fascioliasis Associated with Shistosomiasis in Villages in the Nile Delta of Egypt. *Am J Trop Med Hyg*, 69: 429-437.
33. Farag HF, (1998). Human fascioliasis in some countries of the Eastern Mediterranean Region *East Mediter Health J*, 4; 156-160.
34. Garcia LS, Bruckner DA, (1997). *Diagnostic Medical Parasitology*. ASM Press, Washington: 3. Baskı. p 363-364.
35. Grams R, Vichasri-Grams S, Sobhon P, Upatham ES, Viyanant V, (2001). Molecular cloning and characterization of cathepsin L encoding genes from *Fasciola gigantica*. *Parasitol Int*, 50; (2), 105-114.
36. Gulsen MT, Savas MC, Koruk M, Kadayifci A, Demirci F, (2006). Fascioliasis: a report of five cases presenting with common bile duct obstruction. *Neth J Med*, 64 : 17-19. 7
37. Güçlü F, (2003). Ara Konaklar. Fasciolosis, ed: Tınar R, Korkmaz M. Meta Basım Bornova İzmir. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın no: 18. p 43-51.
38. Harmsen MM, Cornelissen JB, Buijs HE, Boersma WJ, Jeurissen SH, van Milligen FJ, (2004). Identification of a novel *Fasciola hepatica* cathepsin L protease containing protective epitopes within the propeptide. *Int J Parasitol*, 34; (6), 675-682.
39. Harmsen MM, Cornelissen JBWJ, van Milligen FJ, Buijs HECM, Jeurissen SH, Boersma W. The propeptide of a cathepsin L-like proteinase induces protection against *Fasciola hepatica* infection in rats. Unpublished
40. Heussler VT, Dobbelaere DA, (1994). Cloning of a protease gene family of *Fasciola hepatica* by the polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*, 64; (1), 11-23.

41. Hillyer GV, Galanes M, (1988). Identification of a 17-Kilodalton *Fasciola hepatica* Immunodiagnostic Antigen by the Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot Technique. *J Clin Microbiol*, 26: 2048-2053.
42. Irving JA, Spithill TW, Pike RN, Whisstock JC, Smooker PM, (2003). The evolution of enzyme specificity in *Fasciola* spp. *J Mol Evol*, 57; (1), 1-15.
43. Ishii Y, Uchiyama F, Nawa Y, (2002). A praziquantel-ineffective fascioliasis case successfully treated with triclabendazole. *Parasitology International*, 51: 205-209.
44. Kabil SM, Ashry EE, Ashraf NK, (2000). An Open-Label Study of Nitazoxanide in the Treatment of Human Fascioliasis. *Current Therapeutic Research*, 61: 339-345.
45. Kaplan M, Kuk S, Kalkan A, Demirdağ K, Özdarendeli A,(2002). Elazığ Yöresinde *Fasciola hepatica* Seroprevalansının Araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 36:337-342.
46. Kaplan M, Kuk S, Kalkan A, (2002). Fasciolosis: Olgu sunusu. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 26: 393-395.
47. Kaplan M, Kuk S,(2001). Elazığ ELET AŞ. Kesimhanesinde 1998-2000 yılları arasında kesilen hayvanlarda fasyoliyaz görülme sıklığı. 12. Ulusal Parazitoloji Kongresi Özet Kitabı, 149.
48. Khalil SS, Abou Shousha S, Farahat AA, Rashwan EA, (1999). Production of pro-inflammatory cytokines (GM-CSF, IL-8 and IL-6) by monocytes from fasciolosis patients. *J Egypt Soc Parasitol*, 29: 1007-1015.
49. Kim K, Yang HJ, Chung YB, (2003). Usefulness of 8 kDa protein of *Fasciola hepatica* in diagnosis of fascioliasis. *Korean J Parasitol*, 41: 121-123.
50. Kobs G, (1996). pGEM®-T Vector: Cloning of Modified Blunt-ended DNA Fragments. *Promega Notes Magazine Number 55*, p 28.
51. Kofta W, Mieszczanek J, Plucienniczak G, Wedrychowicz H, (2000). Successful DNA immunisation of rats against fasciolosis. *Vaccine*, 18: 2985-2990.
52. Kofta W, Wedrychowicz H, (2001). c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages. *Veterinary Parasitology*, 100: 3-12.
53. Kuk S, Kaplan M, Ozdarendeli A, Tonbak S, Felek S, Kalkan A, (2005). *Fasciola hepatica* cathepsin L1 from a Turkish isolate is related to Asiatic isolates. *Acta Parasitologica*, 50: (3), 244-248.
54. Lee SH, Cho SY, Seo BS, (1982). A human case of ectopic fascioliasis in Korea. *The Korean Journal of Parasitology*, 20: 191-200.
55. Liljeqvist S, Stahl S, (1999). Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *Journal of Biotechnology*, 73: 1-33.
56. Marcos L, Maco V, Samalvides F, Terashima A, Espinoza JR, Gotuzzo E, (2006). Risk factors for *Fasciola hepatica* infection in children: a case-control study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 100:158-166.

57. Martinez-Moreno A, Martinez-Moreno FJ, Acosta I, Gutierrez PN, Becerra C, Hernandez S,(1997). Humoral and cellular immune response to experimental *Fasciola hepatica* infections in goats. *Parasitol Res*, 83: 680-686.
58. Mas-Coma MS, Esteban JG, Bargues MD, (1999). Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bulletin of the World Health Organization*, 77: 340-346.
59. Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA, (2005). Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 35: 1255-1278.
60. Meemon K, Grams R, Vichasri-Grams S, Hofmann A, Korge G, Viyanant V, Upatham ES, Sobhon P. Molecular cloning of cathepsin L encoding genes from *Fasciola gigantica*. Unpublished
61. Millán JC, Mull R, Freise S, Richter J, (2000). The Efficacy and Tolerability of Triclabendazole in Cuban Patients with Latent and Chronic *Fasciola Hepatica* Infection. *Am J Trop Med Hyg*, 63: 264-269.
62. Moreno AM, Jiménez V, Martínez-Cruz MS, Martínez-Moreno FJ, Becerra C, Hernández S, (1997). Triclabendazole Treatment in Experimental Goat Fasciolosis : Antihelmintic Efficacy and Influence in Antibody Response and Pathophysiology of the Disease. *Veterinary Parasitology*, 68: 57-67.
63. Mulcahy G, O'connor F, Clery D, Hogan SF, Dowd AJ, Andrews SJ, Dalton JP, (1999). Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccines. *Research Vet Science*, 67: 27–33.
64. Nithiuthai S, Anantaphruti MT, Waikagul J, Gajadhar A, (2004). Waterborne Zoonotic Helminthiasis. *Veterinary Parasitology*, 126: 167-193.
65. O'neill SM, Parkinson M, Strauss W, Angles R, Dalton JP, (1998). Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* Infection (Fascioliasis) in a Human Population in the Bolivian Altiplano Using Purified Cathepsin L Cysteine Proteinase. *Am J Trop Med Hyg*, 58: 417-423.
66. Özer B, Serin E, Gümürdülü Y, Gür G, Yılmaz U, Boyacıoğlu S, (2003). Endoscopic extraction of living *Fasciola hepatica*: Case report and literature review. *Turk J Gastroenterol*, 14: 74-77.
67. Özkan AT, Babaoğlu A, Fidan I, (2003). İnsanlarda Bağışık Yanıt. *Fasciolosis*, ed: Tınar R, Korkmaz M. Meta Basım Bornova İzmir. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın no: 18. p 283-301.
68. 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. Unpublished
69. Phiri IK, Phiri AM, Harrison LJS, (2006). Serum Antibody Isotype Responses of *Fasciola*-Infected Sheep and Cattle to Excretory and Secretory Products of *Fasciola* Species. *Veterinary Parasitology*, 3647: 9-21.

70. Piacenza L, Acosta D, Basmadjian I, Dalton JP, Carmona C, (1999). Vaccination with Cathepsin L Proteinases and with Leucine Aminopeptidase Induces High Levels of Protection against Fascioliasis in Sheep. *Infect Immun*, 67: 1954-1961.
71. QIAGEN QIA Miniprep Handbook, (2003).Cat.No.27104 Germany, p 46.
72. QIAGEN, QIA Aquick Spin Handbook, (2002). Cat. No: 28704 Germany, p 34.
73. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV, (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62: 597-635.
74. Rice-Ficht AC, Dusek KA, Kochevar GJ, Waite JH, (1992). Eggshell precursor proteins of *Fasciola hepatica*, I. Structure and expression of vitelline protein B. *Mol Biochem Parasitol*, 54: (2), 129-141.
75. Roche L, Tort J, Dalton JP, (1999). The propeptide of *Fasciola hepatica* cathepsin L is a potent and selective inhibitor of the mature enzyme. *Mol Biochem Parasitol*, 25: 271-277.
76. Rossignol JF, Abaza H, Friedman H, (1998). Successful Treatment of Human Fascioliasis with Nitazoxanide. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 92: 103-104.
77. Ruiz A, Molina JM, González J, Martínez-Moreno FJ, Gutiérrez PN, Martínez-Moreno Á, (2003). Humoral response (IgG) of goats experimentally infected with *Fasciola hepatica* against cysteine proteinases of adult fluke. *Vet Res*, 34: 435-443.
78. Saba R, Korkmaz M, (2005). Human Fascioliasis. *Clinical Microbiology Newsletter*, 27: 27-34.
79. Saba R, Mamıkoğlu L, Korkmaz M, Ynan D, Erdaloğlu G, Kabaalioğlu A, (2001). Thirty-two cases of fascioliasis in Antalya and its surroundings. 11th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Özet Kitabı, p 1603.
80. Saygı G, (1998). Temel Tıbbi Parazitoloji. Esnaf Ofset Matbaacılık Sivas. 1. Baskı, p 131-134. 2
81. Schweizer G, Braun U, Deplazes P, Torgerson PR, (2005). Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Vet Rec*, 157: 188-193.
82. Sibille P, Tliba O, Boulard C, (2004). Early and transient cytotoxic response of peritoneal cells from *Fasciola hepatica*-infected rats. *Vet Res*, 35: 573-584.
83. Smooker PM, Whisstock JC, Irving JA, Siyaguna S, Spithill TW, Pike RN, (2000). A single amino acid substitution affects substrate specificity in cysteine proteinases from *Fasciola hepatica*. *Protein Science*, 9: 2567-2572.
84. Sobhon P, Meemon K, Grams R, Grams SV, Korge G, Hofmann A. Molecular cloning of cathepsin L encoding genes from *Fasciola gigantica*. Unpublished
85. Spithill TW, Dalton JP, (1998). Progress in Development of Liver Fluke Vaccines. *Parasitology Today*, 14: 224-227.
86. Spithill TW, Piedrafita D, Smooker PM, (1997). Immunological Approaches for the Control of Fasciolosis. *International Journal of Parasitology*, 27: 1221-1235.

87. Strauss W, O'Neill SM, Parkinson M, Angles R, Dalton JP, (1999). Short report: Diagnosis of human fascioliasis: Detection of anti-cathepsin L antibodies in blood samples collected on filter paper. *Am J Trop Med Hyg*, 60: 746-748.
88. Tao K, Stearns NA, Dong J, Wu QL, Sahagian GG, (1994). The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. *Arch Biochem Biophys*, 15: 19-27.
89. Transfast™ Transfection Reagent, (2000). Promega Technical Bulletin. TB260.
90. Unat EK, (1995). Unat'ın Tıp Parazitolojisi. Cerrahpaşa Tıp Fak. Vakfı Yayınları, İstanbul.: 5.Baskı, p 379-387.
91. Vurusaner C, (2003). Taksonomi ve Morfolojik Özellikler. Fasciolosis, ed: Tınar R, Korkmaz M. Meta Basım Bornova İzmir. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın no: 18: p 1-13.
92. Wahib AA, el-Nasr MS, Mangoud AM, el-Shazly AM, Morsy AT, (2006). The liver profile in patients with hepatitis C virus and/or fascioliasis. *J Egypt Soc Parasitol*, 36: 405-440.
93. WHO, (1995). Control of foodborne trematode infections. WHO Technical Report Series No: 849.
94. WijffelsGL, Panaccio M, Salvatore L, Wilson L, Walker ID, Spithill TW, (1994). The Secreted Cathepsin L-Like Proteinases of the Trematode, *Fasciola hepatica*, Contain 3-Hydroxyproline Residues. *Biochem J*, 299: 781-790.
95. Yamasaki H, Aoki T, (1993). Cloning and sequence analysis of the major cysteine protease expressed in the trematode parasite *Fasciola* sp. *Biochem Mol Biol Int*, 31: (3), 537-542.
96. Yamasaki H, Mineki R, Murayama K, Ito A, Aoki T,(2002). Characterisation and expression of the *Fasciola gigantica* cathepsin L gene. *Int J Parasitol*, 32: (8), 1031-1042.
97. Zhang WY, Moreau E, Hope JC, Howard CJ, Huang WY, Chauvin A, (2005). *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: Comparison of cellular response to experimental infection in sheep. *Experimental Parasitology*, 111: 154-159.

ÖZGEÇMİŞ

1969 yılında Elazığda doğdum. İlk orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. 1992 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldum. 1996 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Bakteriyojji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalında “Hastane Havasının Bakteriyel Kirliliği Ve Kirliliğe Neden Olan Faktörlerin Araştırılması” konulu Yüksek lisansımı tamamladım. 1995 tarihinden beri Fırat Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulunda Öğretim Görevlisi olarak görev yapmaktayım.