

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK  
ANABİLİM DALI  
TIBBİ BİYOLOJİ BİLİM DALI

163722

***Echinococcus granulosus*'un İN VİTRO ÇOĞALMA  
ÖZELLİKLERİ VE PROTOSKOLEKSLERDEKİ AKTİN  
GEN İFADESİ İLE AKTİN GEN ÇOKYAPILILIĞININ  
(POLİMORFİZM) ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

HİLAL ARIKOĞLU

**Danışman**

Yrd. Doç. Dr. A. Bülent TURHAN

**İkinci Tez Danışmanı**

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN

KONYA-2005

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK  
ANABİLİM DALI  
TIBBİ BİYOLOJİ BİLİM DALI

***Echinococcus granulosus*'un İN VİTRO ÇOĞALMA  
ÖZELLİKLERİ VE PROTOSKOLEKSLERDEKİ AKTİN  
GEN İFADESİ İLE AKTİN GEN ÇOKYAPILILIĞININ  
(POLİMORFİZM) ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

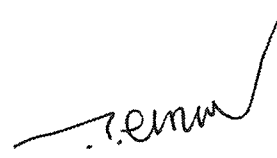
**HİLAL ARIKOĞLU**

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 07/04/2005 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir. (S.B.E. Yön. Kur. Karar tarih ve No: )

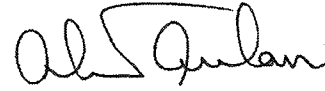
**Tez Jürisi:** Jüri Başkanı Prof.Dr. Ferhan PAYDAK



Danışman Yrd. Doç.Dr. A. Bülent TURHAN



İkinci Tez Danışmanı (Üye) Prof. Dr. Ahmet ARSLAN



Üye Prof. Dr. Mahmut BAYKAN



Üye Yrd. Doç. Dr. Tülin ÇORA



**İÇİNDEKİLER**

<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR BİLGİ .....</b>	<b>3</b>
2.1. <i>Echinococcus granulosus</i> Parazitinin Biyolojisi .....	3
2.1.1. <i>Echinococcus granulosus</i> parazitinin yaşam döngüsü .....	4
2.1.1.1. <i>Echinococcus granulosus</i> onkosferinin morfolojisi ve ultra yapısı .....	7
2.1.1.2. <i>Echinococcus granulosus</i> larvasının (metasestod) morfolojisi ve ultra yapısı .....	8
2.1.1.3. <i>Echinococcus granulosus</i> protoskoleksinin morfolojisi ve ultra yapısı.....	10
2.1.2. İn vitro koşullarda kist (metasestod) gelişimi .....	13
2.1.2.1. İn vitro koşullarda onkosferden kist yönünde gelişim .....	13
2.1.2.2. İn vitro koşullarda protoskoleksten kist yönünde gelişim.....	14
2.1.2.2.A. Veziküler protoskoleksten kist gelişimi .....	15
2.1.2.2.B. Arka keseli protoskoleksten kist gelişimi.....	16
2.1.2.2.C. İn vitro koşullarda minyatür kistin oluşumu süresince ultra yapıda görülen değişiklikler.....	17
2.2. <i>Echinococcus granulosus</i> Parazitinin Moleküler Biyolojisi .....	19
2.2.1. Genomik yapının karakterizasyonu ile ilgili moleküler çalışmalar .....	19
2.2.1.1. Metabolizma ile ilgili gen çalışmaları .....	19
2.2.1.2. Gelişme ile ilgili gen çalışmaları .....	21
2.2.1.3. Türler arası ve tür içi genetik çeşitliliğin araştırılmasına yönelik çalışmalar .....	22
2.2.1.3.A. Tekrarlayan DNA dizileri.....	22
2.2.1.3.B. Mitokondrial genom çalışmaları .....	23
2.2.2. Tanıya yönelik moleküler çalışmalar .....	25
2.2.3. Rekombinant aşı geliştirme çalışmaları .....	26
2.3. Aktin Genleri ve Fonksiyonları .....	28
2.3.1. Aktin proteini ve fonksiyonları .....	28
2.3.1.1. Hücre iskeleti.....	28
2.3.1.1.A. Mikrofilamentler .....	28
2.3.1.1.B. Mikrotübüller.....	28
2.3.1.1.C. Orta kalınlıktaki (Intermediate) filamentler .....	29

2.3.1.2. Aktin monomerlerinin yapısı ve filamentlerin oluşum mekanizması .....	29
2.3.1.3. Aktin izoformları.....	30
2.3.1.4. Aktin bağlanma proteinleri (ABP) .....	30
2.3.2. Aktin genleri.....	31
2.3.2.1. Aktin genlerinin gelişme ve farklılaşma olaylarındaki fonksiyonları .....	31
2.3.3. <i>Echinococcus granulosus</i> parazitinin aktin genleri.....	32
2.3.3.1. <i>EgactI</i> ve <i>EgactII</i> genlerinin nükleotid dizileri .....	32
2.3.3.2. <i>EgactI</i> ve <i>EgactII</i> genlerinin promotor bölgeleri .....	33
<b>3. MATERYAL ve METOT.....</b>	<b>37</b>
3.1. Materyallerin Temin Edilmesi ve Depolanması.....	37
3.2. Protoskolekslerin İn Vitro Kültürü.....	38
3.2.1. Solüsyonlarının hazırlanması .....	38
3.2.2. Protoskolekslerin toplanması ve kültüre edilmesinde gerekli olan gereçler .....	39
3.3. Protoskolekslerin ve germinatif membranın morfolojisi ve nükleer organizasyonu .....	39
3.3.1. Protoskolekslerin ve germinatif membranın kültüre edilmesi ve fiksasyonu .....	39
3.3.2. Solüsyonların hazırlanması .....	39
3.4. Nükleik Asitlerin İzolasyonu .....	40
3.4.1. RNA İzolasyonu .....	40
3.4.1.1. Solüsyonların ve malzemelerin hazırlanması ve DEPC ile muamele edilmesi.....	41
3.4.1.2. Total RNA'nın izolasyonu .....	42
3.4.2. DNA İzolasyonu .....	44
3.4.2.1. DNA izolasyonu için gerekli solüsyonların hazırlanması .....	44
3.4.2.2. Fenol faz ve interfazdan DNA izolasyonu .....	44
3.5. Reverse Transcriptase - Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR).....	45
3.5.1. Örneklerin DNaz enzimi ile muamele edilmesi .....	45
3.5.2. Reverse transcriptase (RT) enzim reaksiyonu .....	45
3.5.3. PZR reaksiyonu karışımının hazırlanması .....	46
3.5.4. PZR reaksiyon koşulları .....	46
3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu – Restriksiyon Enzim Kesimi (PZR-RFLP).....	47
3.6.1. <i>EgactI</i> ve <i>EgactII</i> genlerinin PZR ile çoğaltılması .....	47

3.6.1.1. PZR reaksiyonu karışımının hazırlanması .....	47
3.6.1.2. PZR reaksiyon koşulları .....	47
3.6.2. PZR ile çoğaltılan <i>EgactI</i> ve <i>EgactII</i> aktin genlerinin enzim kesimi reaksiyonları .	48
3.6.2.1. PstI enzim kesimi reaksiyonu.....	48
3.6.2.2. AluI enzim kesimi reaksiyonu.....	48
3.6.2.3. TaqI enzim kesimi reaksiyonu .....	48
3.7. Jel Elektrofrezisi .....	49
3.7.1. Jelin hazırlanması ve örneklerin jele yüklenmesi .....	49
3.7.2. Jel elektrofrezde kullanılan solüsyonların hazırlanması .....	50
3.7.3. Nükleik asitlerin izolasyonu, RT-PZR, PZR-RFLP ve elektrofrez için gerekli olan gereçler .....	50
3.8. Primer Tasarımı.....	50
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>56</b>
4.1. İn Vitro Kist Gelişimi.....	56
4.2. Protoskoleks ve germinatif membranın nükleer organizasyonu .....	65
4.3. RNA izolasyonu ve RT-PZR tekniği ile <i>E. granulosus</i> <i>EgactI</i> ve <i>EgactII</i> genlerinin protoskolekslerde ifadesi .....	68
4.4. DNA izolasyonu ve PZR-RFLP tekniği ile <i>E. granulosus</i> <i>EgactI</i> ve <i>EgactII</i> genlerinin çok yapıllığının (polimorfizmin) araştırılması .....	69
4.4.1. <i>EgactI</i> ve <i>EgactII</i> gen bölgelerinin PstI enzim kesimi sonuçları .....	70
4.4.2. <i>EgactI</i> ve <i>EgactII</i> gen bölgelerinin AluI enzim kesimi sonuçları .....	71
4.4.3. <i>EgactI</i> ve <i>EgactII</i> gen bölgelerinin TaqI enzim kesimi sonuçları .....	73
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>75</b>
<b>6. ÖZET .....</b>	<b>85</b>
<b>7. SUMMARY.....</b>	<b>88</b>
<b>8. LİTERATÜR LİSTESİ .....</b>	<b>91</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>106</b>
<b>10. TEŞEKKÜR .....</b>	<b>107</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 2.1:** *E. granulosus*' un dünyadaki coğrafik dağılımı (McManus ve ark 2003) ..... **3**
- Şekil 2.2:** *Echinococcus granulosus* parazitinin yaşam döngüsü. 1-erişkin parazit (son konağın ince bağırsağında), 2-yumurta, 3-onkosfer, 4-larva (ara konak ve insanların çeşitli organlarında), 5-invagine protoskoleks, 6- evagine protoskoleks (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/echinococcosis.htm>)... **5**
- Şekil 2.3:** Erişkin *E. granulosus* parazitinin görünümü ([mypage.bluewin.ch/dr\\_gabuzzi/parassiti/echino.jpg](http://mypage.bluewin.ch/dr_gabuzzi/parassiti/echino.jpg)) ..... **6**
- Şekil 2. 4:** *E. granulosus* protoskoleksinin tegümentinin yapısı (Morseth 1967)..... **12**
- Şekil 2.5:** Protoskoleksin skoleks ve soma bölgelerinin şematize edilmiş görünümü, mt : mitokondri, kh: kas hücreleri, th: tegümental hücreler (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989). ..... **12**
- Şekil 2.6:** *Echinococcus granulosus* (G1 genotipi) mitokondrial genomunun yapısı (McManus ve ark 2004). ..... **24**
- Şekil 2.7:** Aktin monmerinin atomik yapısı. a)  $\alpha$ -heliks ve  $\beta$ -kıvrımlı polipeptid katlantıları ve Mg-ATP yerleşim merkezi, b) aktin monomerinin yüzeyel görünümü (Pollard ve Earnshaw 2002). ..... **29**
- Şekil 2.8:** Aktin filamentinin yapısı. A) aktin filamentinin elektron mikroskopik görünümü, B) çift zincirin sadece bir zinciri ve yanda genişletilmiş görünümü, C) atomik modelin yüzeyel görünümü (Pollard ve Earnshaw 2002)..... **30**
- Şekil 2.9:** *EgactI* ve *EgactII* aktin genlerinin gen bölgelerinin nükleotid dizisi. İki gen arasında homoloji gösteren nükleotidler nokta ile gösterilmiştir. ATG ve TAA kırmızı renkte gösterilmiştir. Mavi renkte görülen diziler ise poliadenilasyon sinyalleridir. Nükleotid eklenmeleri \* ile gösterilmiştir. 1 nolu nükleotid, *EgactI* dizisinin ATG başlama kodonunun A nükleotidi olarak kabul edilmiştir, b) *EgactII* aktin geninin intron bölgesinin nükleotid dizisi. İtron bölgesinin gen içindeki pozisyonu ise ok ile gösterilmiştir (Silva ve ark 1993). ..... **35**
- Şekil 2.10:** *EgactI* ve *EgactII* aminoasit dizileri. Aynı aminoasitler noktalı gösterilmiştir (Silva ve ark 1993) ..... **35**

**Şekil 2.11:** *E. granulosus* *EgactI* (A) ve *EgactII* (B) aktin genlerinin 5' uç bölgelerinin nükleotid dizileri. Başlama kodonu (ATG) +1 olarak gösterilmektedir. Diğer numaralar da buna göre düzenlenmiştir. Trans-kripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri altı çizili olarak gösterilmektedir. Çoklu (dT) alanları ise altı noktalı gösterilmiştir. Kodlama bölgeleri, altı çift çizgili olan ATG başlama kodonundan başlayarak koyu karakterli harflerle yazılmıştır (Gimba ve ark 2000)..... **36**

**Şekil 3.1:** *EgactI* ve *EgactII* aktin genlerinin kodlama bölgeleri üzerinde primerlerin yerleşimi. *EgactI* ileri ve geri primerleri pembe renkte, *EgactII* ileri ve geri primerleri mavi renkte gösterilmektedir..... **53**

**Şekil 3.2:** (1) Aktin I (*EgactI*) hedef gen bölgesi (487 bç), AluI enzim tanıma bölgeleri altı çizili olarak gösterilmiştir, (2) TaqI enzim tanıma bölgeleri altı çizili olarak gösterilmiştir, ileri ve geri primerler koyu renkte görülmektedir ..... **54**

**Şekil 3.3:** (1) Aktin II (*EgactII*) hedef gen bölgesi (394 bç), AluI enzim tanıma bölgeleri altı çizili olarak gösterilmiştir, (2) TaqI enzim tanıma bölgeleri altı çizili olarak gösterilmiştir, ileri ve geri primerler koyu renkte görülmektedir..... **55**

## RESİM LİSTESİ

- Resim 2.1.** *E. granulosus* yumurtasının mikroskopik görünümü (cal.vet.upenn. edu/ paraav/labs/echino.htm) ..... 8
- Resim 2.2.** a) Kist hidatiğin yapısı, içte germinatif membran (ince ok) ve dışta laminar membranın (kalın ok) ışık mikroskobu ile görünümü (Arıkoğlu 1996), b) Germinatif membrana bağlı ve içleri protoskoleks dolu olan çimlenme kapsüllerinin ışık mikroskobu ile görünümü (Arıkoğlu 1996)..... 9
- Resim 2.3.** a) Protoskolekslerin baş (skoleks) kısımlarındaki rostelyum bölgesi ve üzerindeki iki sıra halinde dizili çengeller, b) çengellerin görünümü ([http://www.cdfound.to.it/\\_atlas.htm](http://www.cdfound.to.it/_atlas.htm)). ..... 10
- Resim 2.4.** a) Evagine protoskoleks (baş kısmı dışa doğru çıkmış), b) invagine protoskoleks (baş kısmı vücut bölgesine gömülü), çengeller iç kısımda belirgin bir şekilde görülmekte ([http://www.cdfound.to.it/\\_atlas.htm](http://www.cdfound.to.it/_atlas.htm)) .... 15
- Resim 4.1.** Multikistik yapıdaki kist hidatikli koyun karaciğerinin görünümü ..... 56
- Resim 4.2.** a ve b) Multikistik yapıdaki hidatik kistlerden hazırlanan kesitte kistlerin yapısı ve birbirleriyle olan bağlantıları ..... 57
- Resim 4.3.** Kültürün ilk günündeki evagine ve invagine protoskolekslerin görünümü, çimlenme kapsüllerine bağlı protoskolekslerin görünümü (ok), çk:çimlenme kapsülü, ip:invagine protoskoleks, ep: evagine protoskoleks, vp: veziküler protoskoleks, oklar: arka kese ..... 58
- Resim 4.4.** Çimlenme kapsülüne bağlı protoskolekslerin görünümü, ip: invagine protoskoleksler, ep: evagine protoskoleksler, vp: veziküler protoskoleks, ok: arka kese ..... 59
- Resim 4.5.** a) Kültürün 2. gününde şişmeye başlayan bir protoskoleks. veziküller ve iç kısımdaki çengeller belirgin durumda, b) invagine bir protoskoleksin arka kısmında kese oluşumu ..... 59
- Resim 4.6.** Kültürün ilk günlerinde görülen protoskoleksler, a) evagine protoskoleks, b) arka keseli evagine protoskoleks, c) invagine protoskoleks, d) arka keseli invagine protoskoleks (arka kese formu) ..... 60
- Resim 4.7.** Tamamen yuvarlak görünüm almış veziküler protoskoleksler (X20). ..... 60



<b>Resim 4.8.</b> Veziküler protoskoleksin daha yakından görünümü, internal vakuolizasyon gerçekleşmiş (X40). .....	61
<b>Resim 4.9.</b> Mikrokist öncesi veziküler protoskoleksde vantuzlarının görünümü (X 40) .....	62
<b>Resim 4.10.</b> Mikrokist öncesi veziküler protoskoleksde vantuzların görünümü (X 20).....	62
<b>Resim 4.11.</b> a) Mikrokistin görünümü, laminar membran gelişmiş ve mikrokisti tamamen çevrelemiş (X 40).....	63
<b>Resim 4.12.</b> Mikrokistin yakından görünümü (X 20).....	63
<b>Resim 4.13.</b> a) pH değişikliğinde çengellerini atan bir protoskoleks ve çengelleri (X40), b) çengellerin yakından görünümü (X100).....	64
<b>Resim 4.14.</b> a) İnvagine durumdaki protoskoleksin görünümü. Çengeller vücut kısmına gömülü halde, çekirdekler ise mavi renkte görülmekte, b) evagine durumdaki protoskoleksin görünümü, vantuzlar dışarı doğru çıkmış ve çekirdekler mavi renkte görülmekte (X40). .....	65
<b>Resim 4.15.</b> a) İnvagine durumdaki protoskoleks (X10), b) evagine durumdaki protoskoleks (X20), c) İnvagine durumdaki protoskoleksler, d) evajine durumdaki protoskoleks (X20).....	66
<b>Resim 4.16.</b> a) Evagine protoskoleks, çengeller hariç tüm tegüment hücreden oluşmakta (X40), b) protoskoleksin daha yakından görünümü (X100), c ve d) çengellerin daha yakından görünümü (X100).....	66
<b>Resim 4.17.</b> a) Rostelyum bölgesinde çift sıra halinde dizili çengellerin üstten görünümü (X100), b) çengellerin ortasındaki boşluk genişlemiş durumda (X100), c ve d) rostelyumdan kopmuş çengeller dağınık halde görülüyor (X100) .....	67
<b>Resim 4.18.</b> a ve b) Germinatif membran, hücreler görülmemekte (X40), c ve d) yer yer görülen hücresel odaklar (X40).....	68
<b>Resim 4.19.</b> <i>EgactI</i> ve <i>EgactII</i> genlerinin RT-PZR sonuçlarının agaroz jel elektroforezde görünümü, M: marker (pUC18 msp1 kesimi). .....	69
<b>Resim 4.20.</b> <i>EgactI</i> gen bölgesinin PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezde görüntüsü, M: marker (pUC 18 DpnI kesimi).....	70
<b>Resim 4.21.</b> <i>EgactII</i> gen bölgesinin PZR ürünlerinin jel elektroforezde görüntüsü, M: marker (pUC 18 DpnI kesimi). .....	70
<b>Resim 4.22.</b> <i>Egact1</i> hedef gen bölgesinin Pst1 enzim kesimi sonrasındaki agaroz jel elektroforez görüntüsü , M: marker (pUC18 DpnI kesimi), K: kontrol....	71

- Resim 4.23.** *EgactI* hedef gen bölgesinin PstI enzim kesimi sonrasındaki agaroz jel elektroforez görüntüsü, M: marker (pUC18 DpnI kesimi), K: kontrol..... 71
- Resim 4.24.** Aktin 1 geni hedef bölgesinin ilk 20 DNA örneğinin AluI kesimi sonrası elektroforez görüntüleri, b) ilk 12 örneğin büyütülmüş görünümü, M: marker (pUC 18 MspI kesim), K: kontrol..... 72
- Resim 4.25.** a) Aktin 2 gen bölgesinin AluI enzim kesimi ürünlerinin jel elektroforez görünümü, b) bu kesim ürünlerinin büyütülmüş görünümü, M: marker (pUC 18 MspI kesimi), K: kontrol..... 73
- Resim 4.26.a)** Aktin 1 gen bölgesinin TaqI enzim kesimi sonrasında yapılan jel elektroforez görüntüleri, b) 21-30 nolu örneklerin büyütülmüş görüntüsü, M:marker (pUC18 DpnI kesimi), K: kontrol. .... 74
- Resim 4.27.** a) Aktin 2 gen bölgesinin TaqI enzim kesimi sonrasında yapılan jel elektroforez görüntüleri, b) ilk 10 örneğin büyütülmüş görüntüsü, M: marker (pUC 18 MspI kesimi), K: kontrol..... 74

## 1. GİRİŞ

Kistik ekinokokkozis, *Echinococcus granulosus* parazitinin larval formunun sebep olduğu bir hastalıktır. Dünya çapında pek çok ülkede insan sağlığı bakımından olduğu kadar ekonomik bakımdan da tehdit oluşturan bu hastalığın kesin tedavisi de olmadığı için hala önemini ve güncelliğini korumaktadır. *E. granulosus* parazitinin erişkin formu, son konak olan köpek ve diğer etçillerde, larval formu ise koyun, sığır gibi otoburlarda ve insanda yaşamını sürdürür. *E. granulosus* paraziti, hayat döngüsünü farklı konaklarda sürdürdüğü için sağlık ve ekonomik bakımdan oldukça geniş bir kitleyi etkilemektedir. Hidatidozis, Türkiye'nin özellikle Doğu ve Orta Anadolu Bölümündeki kırsal alanlarda ciddi oranlarda görülmektedir. Türkiye'de 1964-1994 yılları arasında Sağlık Bakanlığı tarafından rapor edilen hidatidozis vakası 48620 dir. Ayrıca 1961-2000 tarihleri arasında Türkiye Tıp Literatüründe 11820 unilokular ve 259 multilokular kist vakası bulunmuştur. Bu datalara göre hidatidozisin yıllık görülme oranı yaklaşık 100 000 kişide 4'dür (Özçelik 2001).

Hidatidozlu hastalarda halen başlıca tedavi yöntemi olarak kabul edilen cerrahi yöntemde mortalite, morbitide, kist yırtılması, kist sıvısının dağılması ve nüksün görülmesi gibi risklerin yanısıra tedavi masrafları da hastalara ağır bir ekonomik yük getirmektedir. Son yıllarda cerrahi yöntem alternatif olarak geliştirilen ve PAİR-PD denilen ultrasonografi klavuzluğunda kiste girilerek kist içeriğinin boşaltılması ve çeşitli kimyasalların kist içine verilmesini içeren bir tedavi yöntemi uygulanmaktadır. Ancak bu tedavi yönteminde ise anaflaktik şok ve kistin ruptur olması gibi problemler ortaya çıkabilmektedir. Üstelik bu yöntemde de kist tamamen ortadan kaldırılamadığı için bir süre sonra kistin yeniden büyümesi olasıdır. Diğer taraftan hidatidozlu hayvanlarda süt, et, yün kalitesindeki ve verimindeki düşüş hayvan yetiştiricileri için olduğu kadar ülke ekonomisi için de önemli bir kayıptır.

Hidatidozusu tamamen ortadan kaldırabilmek için kapsamlı projelerin geliştirilmesi, bu parazitin hayat döngüsünün kırılması, halkın ve çiftçinin uzmanlar tarafından bilinçlendirilmesi, kesimlerin veteriner kontrolünde yapılması, kistli organların mutlaka imha edilmesi gerekmektedir. Bu kontrol programlarında köpeklerin antihelmintik ilaçlarla aşılması ve koyun ile sığırların son yıllarda geliştirilen rekombinant aşılarla aşılması sağlanmalıdır. Ancak bu takdirde parazitin hayat döngüsünün kırılacağı ve insanlardaki görülme oranının azalacağı düşünülmektedir.

Yüksek lisans tezinde, insan ve koyun tutulumlu olan *E. granulosus* parazitinin kist hidatik adı verilen larval formunun histolojik olarak tanımlanması ve PAİR-PD tedavisinde kullanılan kimyasalların ve antihelmintik ilaçlardan albendazolün protoskolekslerin canlılığı üzerine etkileri çalışıldı (Arıkoğlu 1996).

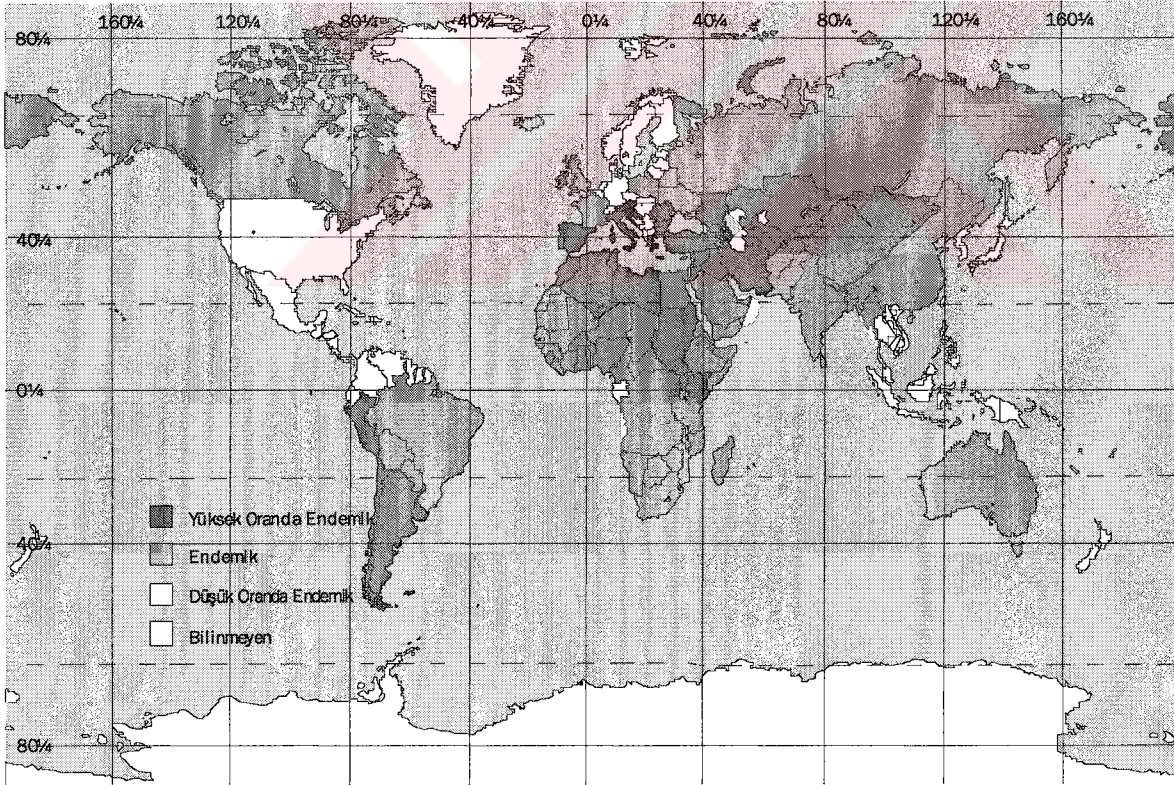
Doktora tez çalışmasında ise kist hidatiğin in vitro kültürde yetiştirilmesi ve kist oluşumu sürecinde gözlenen basamakların tespit edilmesi, *E. granulosus* protoskoleks ve germinatif membranın nüklear organizasyonunun tanımlanması, aktin genlerinin (*EgactI* ve *EgactII*) protoskolekslerdeki ifadesinin tespiti ile aktin genlerinin gen çokyapılılığının (polimorfizm) ortaya konulması hedeflendi.

*E. granulosus* protoskoleksinin çevresel koşullara göre gerek larval gerek erişkin parazit yönündeki gelişimlerinde bir çok morfolojik, fizyolojik ve metabolik değişiklik gerçekleşmektedir. Özellikle kistin germinatif membranından laminar membran sentezlenmesi ve protoskolekslerin üretilmesi olaylarında, germinatif membran hücrelerinde sürekli bir değişiklik, yeniden düzenlenme ve oluşum meydana gelmektedir. Aktin proteininin hücre iskeletinin ana bileşeni olması ve hücre iskeletinin de organizmaların gelişim ve farklılaşma süreçlerinde, hücrelerde meydana gelen her türlü morfolojik değişikliklerde anahtar rol oynaması nedeniyle aktin geni hedef gen olarak seçildi. Bu çalışma ile protoskolekslerdeki aktin gen profilinin çıkarılması ve bu genlerdeki gen çokyapılılığının tanımlanması ile kistin büyüme ve farklılaşma mekanizmalarının moleküler temelini ortaya konulmasında önemli bir adım atılmış olacağı düşüncesindeyiz

## 2. LİTERATÜR BİLGİ

### 2.1. *Echinococcus granulosus* Parazitinin Biyolojisi

*Echinococcus granulosus* hayat siklusunu iki konakta tamamlayan 2-7 mm uzunluğunda küçük bir parazittir. *E. granulosus*, Cestoda sınıfına ait *Echinococcus* cinsindedir. *Echinococcus* cinsinde taksonomik olarak kabul edilen dört tür bulunmakta olup bunlar *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. vogeli* ve *E. oligarthus*' dir (Thompson ve Lymbery 1988, Bowles ve McManus 1993a). *E. vogeli* ve *E. oligarthus* sadece kuzey ve güney Amerika'da görülmektedir. *E. granulosus* ve *E. multilocularis* ise dünya çapında görülen ve insan sağlığı bakımından önemli olan parazitlerdir (Bowles ve McManus 1993a). Özellikle *E. granulosus* tüm dünyada geniş bir coğrafi bölgeye yayılmıştır. Parazitin görülme oranının en yüksek olduğu bölgeler Asya, Avrupa, Afrika, Avustralya ve Güney Amerika'nın bazı bölgeleridir. Enfeksiyonun nadir görüldüğü bölgelerin de olduğu ve Grönland ile İzlanda' da ise parazite hiç rastlanılmadığı bildirilmiştir (Eckert 1996, Eckert ve ark 2000). *E. granulosus*' un dünyadaki coğrafi dağılımı şekil 2.1'de verilmiştir.

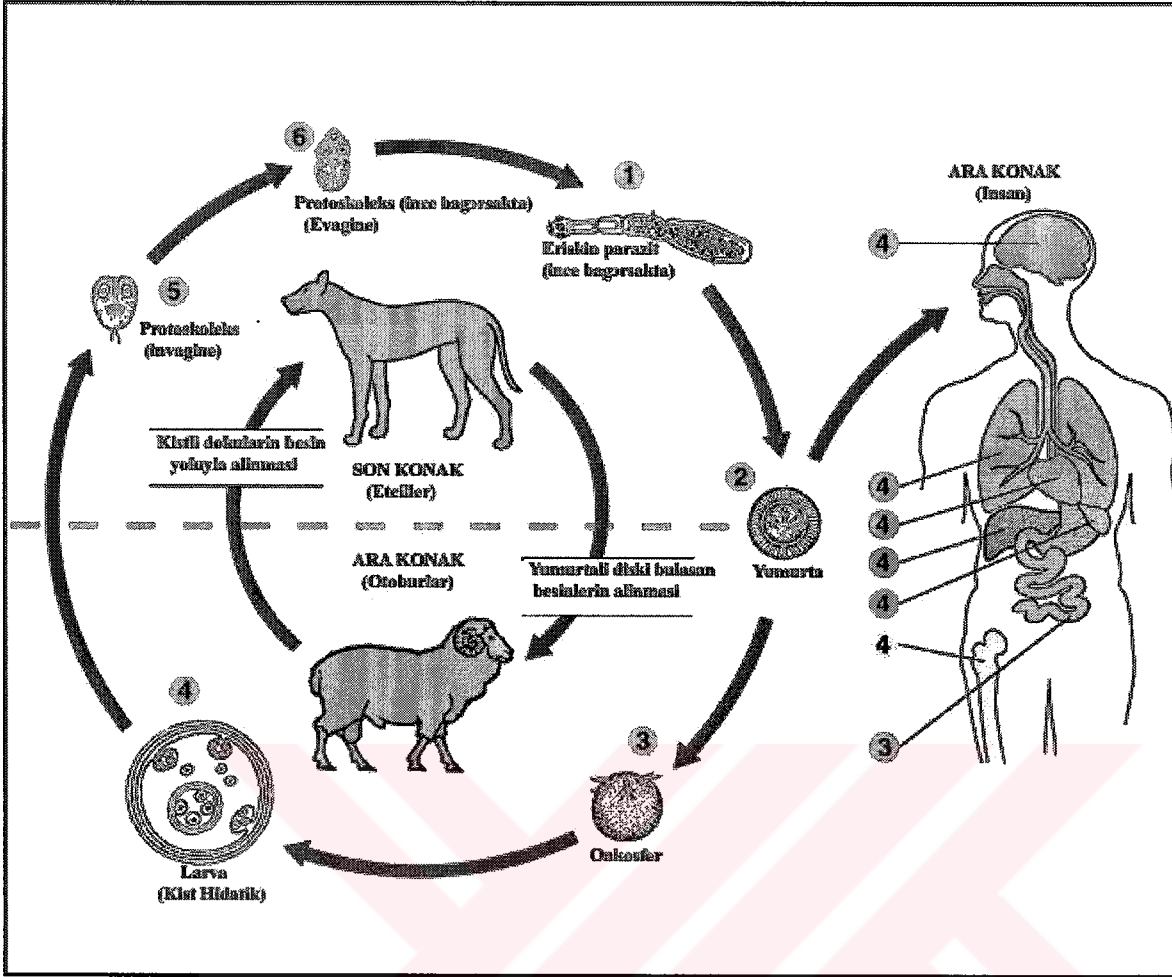


Şekil 2.1. *E. granulosus*' un dünyadaki coğrafi dağılımı (McManus ve ark 2003)

### 2.1.1. *Echinococcus granulosus* parazitinin yaşam döngüsü

Ekinokok yumurtaları ara konakçılara solunum veya beslenme yoluyla geçer (Şekil 2.2). Solunum yoluyla alınan yumurtalar direk akciğere geçip orada açılarak, beslenme yoluyla alınan yumurtalar ise bağırsakta açılarak onkosferi oluştururlar. Onkosferler mukozayı geçerek kan dolaşımına girerler. Kan dolaşımının yoğun olduğu karaciğer ve akciğer daha yaygın olmakla birlikte diğer iç organlarda da tutunarak olgun larval kistleri oluştururlar (Şekil 2). Bu kistlere “Ekinokokkozis” denir. *E. granulosus*’ un sebep olduğu bölgesel tutulumlu ekinokokkozise “Kistik Ekinokokkozis” (Hidatid Kist) hastalığı denir. Hidatid kist hastalığına yol açan *E. granulosus* onkosferleri, tutulum gösterdiği organda antijenik reaksiyona yol açarak o bölgeye nötrofil ve eozinofillerin yığılıp lamellar fibrozisin gelişmesini tetikler. Böylece fibrotik doku ile hapsedilmiş kistik yapı oluşur. *E. granulosus*’ un kistleri makroskopik olarak uniloküler ve multikistik olmak üzere iki tipte görülmektedir. Uniloküler tip kistler büyükçe bir keseden ibarettir. Kistik yapının ilk yılda büyüklüğü 5-10 cm. ye ulaşır. Takip eden yıllarda ise büyümesi 1 cm. yi geçmez. Kistin büyümesi kistin iç tabakası olan germinatif membranın canlılığına bağlıdır. Germinatif membran kist içinde eşeysiz tomurcuklanma yolu ile yeni kistler oluşturur. Bunlara yavru kistler veya kız veziküller denir (Şekil 2.2). Multikistik yapılar ise çok sayıda küçük kistlerin bir arada olmasıyla oluşur. Bu tip kistler çoğunlukla sığırlarda görülmektedir ve fertil değildir.

Kist hidatik formunda parazite ait iki tabaka bulunur. Bu tabakalar, en içte kist boşluğunu saran germinatif membran ve onun dışındaki laminar membrandır. Laminar membranın dışında ise konağın oluşturduğu fibroz kapsül bulunur. Germinatif membranın çevrelediği boşluk kist sıvısı ile doludur. Ayrıca germinatif membrana bağlı veya kist sıvısında serbest bulunan çimlenme kapsülleri (brood kapsül) mevcuttur. Çimlenme kapsülleri içinde ise bağlantı sapı denilen bir sapla kapsüle bağlı 3-10 protoskoleks bulunmaktadır. Bu protoskolekslerin skoleks kısımları vücut kısımlarına (soma) gömülü olarak (invagine) bulunmaktadır. Bu durumda apikal bölgede (skoleks) bulunan çekmen (vantuz), rostelyum ve çengeller mukopolisakkarit kaplı bir tabaka içine gömülüdür.

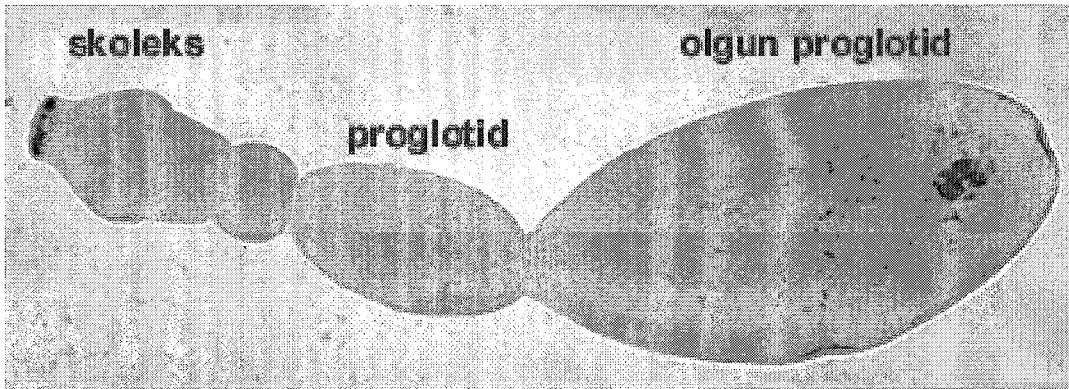


**Şekil 2.2.** *Echinococcus granulosus* parazitinin yaşam döngüsü. 1-erişkin parazit (son konağın ince bağırsağında), 2-yumurta, 3-onkosfer, 4-larva (ara konak ve insanların çeşitli organlarında), 5-invagine protoskoleks, 6- evagine protoskoleks (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/echinococcosis.htm>).

Parazitin normal hayat döngüsünde bu kistli organların son konak olan etçil hayvanlar özellikle de köpekler tarafından yenmesi ile döngü tamamlanır (Şekil 2.2). Kistli organlar köpeğin ağızda çiğneme esnasında parçalanırlar. Kist içinde bulunan kız veziküller, protoskoleksler açığa çıkarlar. Bu protoskolekslerin skoleks bölgeleri midede pepsinin etkisi ile ardından duodenumun üst bölümünde pH değişikliği ve safra ile etkileşimi sonucunda gömülü olduğu vücut (soma) kısmından dışarı doğru (evagine olurlar) çıkarlar (Şekil 2.2). Baş kısmı dışarı doğru çıkmış bu protoskoleksler çok aktiftirler. Çekmenleri ve çengelleri ile son konağın ince bağırsağına tutunurlar. Tutunamayanlar ise bağırsaklardan dışarı atılırlar. Daha sonra bu genç parazitler, türe ve konağın yatkınlığına bağlı olarak enfeksiyonu izleyen 4-6 hafta içinde seksüel olgunluğa erişerek erişkin parazite dönüşürler (Şekil 2.2). Parazit erişkin hale geçtiğinde ince barsağın belli bir bölgesine yerleşme eğilimi gösterirler. *E. granulosus* ince bağırsağın ¼

ön kısmına yerleşirken *E.multilocularis* ¼ arkasına yerleşir (Thompson ve Eckert 1983). Aynı bağırsakta tutunum gösteren erişkin parazitler aynı genetik yapıya sahip olmalarına rağmen morfolojik özellikleri bakımından farklılık gösterebilirler (Dubinsky ve ark 1998). Özellikle çengellerin yapı ve büyüklüklerinde görülen bu farklılıkların oluşmasında bağırsaktaki mikrohabitatların etkisinin olduğu rapor edilmiştir (Dubinsky ve ark 1998).

Son konakta erişkin parazitin gelişmesi germinal ve somatik değişimleri içermektedir. Birbirinden bağımsız olarak gerçekleşen bu gelişme evreleri sırasıyla proglotidlerin (halka) oluşması, olgunlaşma, büyüme ve segmentasyondur. Germinal farklılaşmasında, halkalar oluşur ve olgunlaşır. Somatik farklılaşmada ise parazit boyca büyür. Sestodlarda segmentasyon sürecinde birbirini izleyen halkalar arasında ayırıcı bir duvar yoktur. Proglotidlerin birbirinden ayrılması, tegümentin kıvrımları ve mikrotrikslerin birbirine yapışarak bu kıvrımları sabit hale getirmesi ile olur. Gelişimini tamamlayan erişkin ekinokoklarda 3-4 halka nadiren 5 halka bulunur (Thompson 1995). Son halka gebe, ondan bir önceki halka ise olgun halkadır. Olgun halkada dişi ve erkek üreme organları bulunurken, gebe halkada halka boyunca bir uterus ve içinde de yumurtalar bulunmaktadır. Erişkin ekinokoklar hermafrodittir ve kendi kendini dölleme (self-fertilizasyon) yetenekleri vardır. İki ayrı ekinokokun birbirini dölleme yeteneği (cross-fertilizasyon) de olmakla birlikte çok nadir görülür. Bir parazitin döllenme için diğer parazite rastlama ihtimali çok düşüktür (Thompson 1995). Döllenme olayının başlaması için son konağın bazı faktörlerine ihtiyaç vardır. Bu uyarılar olmadan döllenme gerçekleşmez (Thompson 1995).



Şekil 2.3. Erişkin *E. granulosus* parazitin görünümü (mypage.bluewin.ch/dr\_gabuzzi/parassiti/echino.jpg)

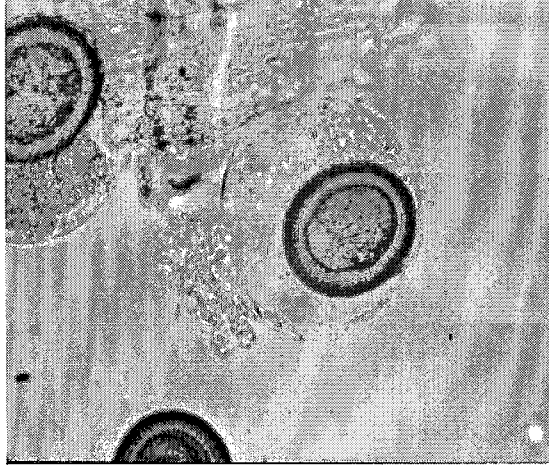


*E. granulosus*'da son konağın enfeksiyonunu takiben 34-58. günlerde yumurta üretimi başlar. *E. multilocularis*'de bu süre 28-35. günler arasındadır (Thompson ve Eckert 1982, Thompson ve ark 1984). Yumurta sayısı da türler arasında değişiklik göstermektedir. *E. granulosus*'da gebe halkada 200-800 yumurta bulunurken, *E. multilocularis*'de yumurta sayısı 250-400 arasındadır (Thompson 1995, Rommel ve ark 2000). Ekinokok türlerinde gebe halkaların 7-14 günde bir oluşup koştığı tahmin edilmektedir (Thompson 1995). Bir erişkin ekinokokun son konakta yaşam süresi ise iki yıl veya daha fazla olmaktadır (Deplazes ve Eckert 2001).

*E. multilocularis* metasetodunun sebep olduğu Ekinokokkozisin ikinci şekline "Alveolar ekinokokkozis" (alveolar veya multiloküler kist) hastalığı denir. *E. multilocularis* kistleri *E. granulosus* gibi eşeysiz olarak ancak farklı bir şekilde lateral tomurcuklanma yolu ile çoğalırlar. Bu kistik oluşumda fibrotik doku gelişmediğinden parazitik kist, tümör benzeri metastatik bir yayılım gösterir. Doğal siklusunda son konak genellikle tilki nadiren de köpek ve kedi olan *E. multilocularis*' in ara konakları ise kemiricilerdir. İnsanlar özellikle avcılar ara konak olabilmektedir. Alveolar kist, hidatid kiste göre çok daha az görülmekle birlikte çok daha ağır seyreder ve kesin bir tedavisi yoktur.

#### **2.1.1.1. *Echinococcus granulosus* onkosferinin morfolojisi ve ultra yapısı**

Olgun *E. granulosus* yumurtası yuvarlak ve oval şekilli olup 30-40µm büyüklüktedir (Resim 2.1). Yumurta en dışta kapsül ve onun altında embriyoyu koruyan keratin benzeri bir proteinden oluşmuş olan embriyofor tabakası ile çevrilidir. Daha içte embriyoyu kuşatan ince bir sitoplazmik tabaka olan onkosfer membranı bulunur. Altı çengelli onkosferin (embriyo) nükleus bölümü ise penetrasyon bezlerinin granülleri ile doludur. (Holcman ve Heath 1997). Bu bezler onkosferin penetrasyonu ile ilgilidir ve salgısı onkosferin tutunduğu bölgenin civarındaki konak dokusunun parçalanmasına neden olur (Holcman ve Heath 1997). Ayrıca laminar membran oluşumu süresince onkosferin konak hücrelerin ataklarına karşı korunmasında da görev yaptığı düşünülmektedir (Heath 1971, Holcman ve Heath 1997, Lethbridge 1980, Fairweather ve Threadgold 1981). Bu penetrasyon bezlerinin mikrovillusların oluşumuna katkısının bulunduğu da rapor edilmiştir (Haris ve ark 1989, Holcman ve ark 1994)

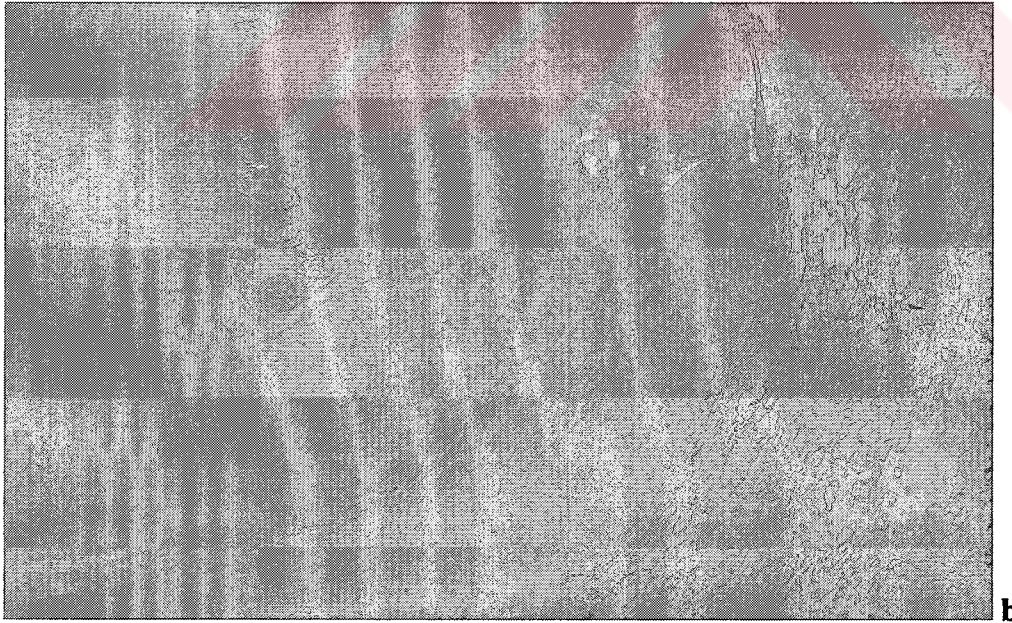
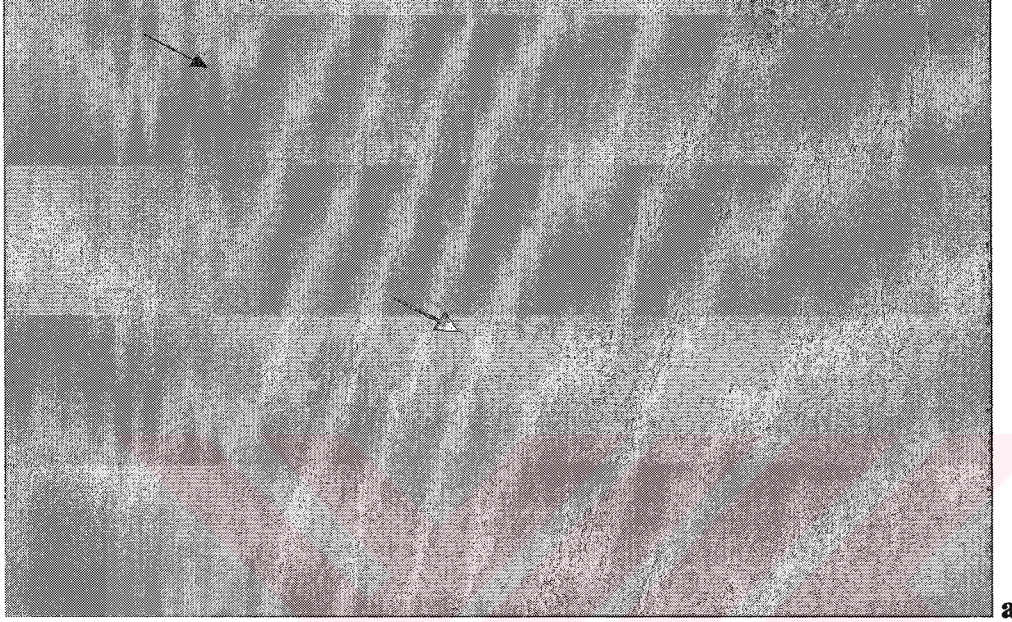


**Resim2.1.** *E. granulosus* yumurtasının mikroskopik görünümü ([cal.vet.upenn.edu/paraav/labs/echino.htm](http://cal.vet.upenn.edu/paraav/labs/echino.htm))

### **2.1.1.2. *Echinococcus granulosus* larvasının (metasestod) morfolojisi ve ultra yapısı**

Uygun ara konak tarafından alınan ekinokok yumurtalarının ince bağırsakta açılması ile aktif hale geçen onkosferler, kan dolaşımı yoluyla tutunduğu organda larval kistleri (metasestod) oluşturur. Larval kist genellikle unilokuler bir kist olup büyük bir hacme sahiptir. Kist boşluğu, parazit türevi moleküllerin ve konak türevi serum bileşenlerinin kompleks karışımı olan steril hidatid sıvısı ile doludur (Rickard ve Lightowers 1986, McManus ve Bryant 1995). Kist duvarı içte çok çekirdekli, ince germinatif membran ve dışta hücresiz, kalın laminar membrandan oluşur (Resim 2.2a). Çok sayıda laminasyondan oluşan laminar membran kiste destek olmasının yanı sıra konağın bağışık cevabından paraziti korumada da görevlidir (Coltorti ve Varela-Diaz 1975, Bartoletti ve Ferretti 1978, Richards ve ark 1983, Haris ve ark 1989, Rogan ve Richards 1989, Holcman ve ark 1994, Gottstein ve Felleisen 1995). Protein-polisakkarit kompleksinden oluşan laminar membranın karbonhidrat bileşenini glukoz, galaktoz, glukozamin ve galaktozamin oluşturur (Kilejian ve Schwabe 1971, McManus ve Bryant 1986, Leducq ve Gabrion 1992). Laminar membranın ultra yapısına bakıldığında elektron-yoğun agregatları içeren mikrofibrillar matrikse sahip olduğu görülür. Kistin canlılığını sürdürebilmesi için gerekli olan bu laminar membran, parazit kökenli olup germinal membran tarafından salgılanır (Bortoletti ve Ferretti 1978) Laminar membran ve germinal membran arasında her iki membranın sıkıca bir arada kalmasını sağlayan germinal membrandan laminar membrana doğru uzanan mikrotriaks adı verilen tegümenter çıkıntılar vardır. (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989). Germinatif membran proliferatif,

totipotansiyel tegümental hücrelerden oluşmuştur ve kist lümenine doğru çimlenme kapsullerini (brood capsule) üretir. (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989) (Resim 2.2b). Bu tegümental hücreler büyük nükleoluslu bir nükleus ve nüklear zarı boyunca yığılmış çok küçük kromatinden oluşmuştur. Tegümental hücrelerin sitoplazması çok sayıda yoğun alfa glukojen partikülleri ve/veya lipid damlacıkları ile doludur (Şekil 2.4).

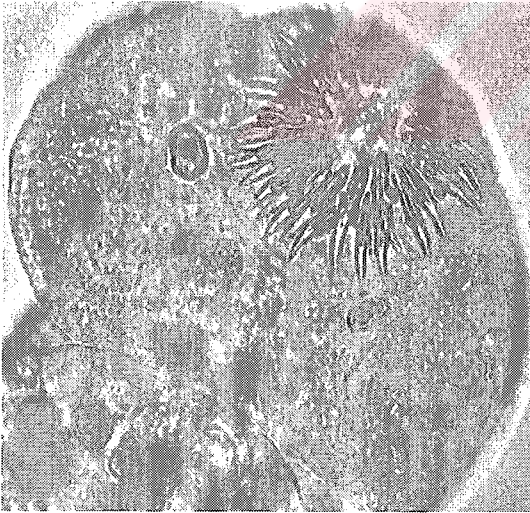


**Resim 2.2.** a) Kist hidatiğin yapısı, içte germinatif membran (ince ok) ve dışta laminar membranın (kalın ok) ışık mikroskobu ile görünümü, b) germinatif membrana bağlı ve içleri protoskoleks dolu olan çimlenme kapsüllerinin ışık mikroskobu ile görünümü (Arıkoğlu 1996).

Çimlenme kapsulleri genişlemiş, vakuolize olmuş ve bir sap ile germinal membrana bağlı kalmış durumdadır (Resim 2.2b). Çimlenme kapsullerinin içi, bu kapsullerin germinal membranlarının tomurcuklanması yoluyla oluşan protoskolekler ile doludur. Çimlenme kapsulleri, bir süre sonra germinal membrana bağlantısını sağlayan sapın kopmasıyla serbest hale geçerek hidatid sıvısında hidatid kumunu oluştururlar. Her bir protoskoleksin son konak tarafından alınıp sindirildiğinde erişkin paraziti oluşturma kapasitesi vardır.

### 2.1.1.3. *Echinococcus granulosus* protoskoleksinin morfolojisi ve ultra yapısı

Protoskolekslerin apikal bölgesinde, rostelyumları üzerinde iki sıra olacak şekilde dizili 30-36 adet çengelleri bulunmaktadır (Resim 2.3a ve b). Bazı protoskolekslerde üçüncü bir sıranın olduğu da bildirilmiştir (Smith ve Richards 1991). Yine bu bölgede dört adet çekmen (vantuz) bulunmaktadır. Bu organ veya organeller, parazitin son konağının bağırsağına yapışmasını sağlamaktadır. Çengeller mukoza epiteline çok derin girmemekle beraber morfolojik yapıları sebebiyle parazitin düşmesine engel olmaktadır. Çengeller, keratinden yapılmış olup sülfür ve eser miktarda fosfor içermektedir (Smith ve Richards 1991).



a



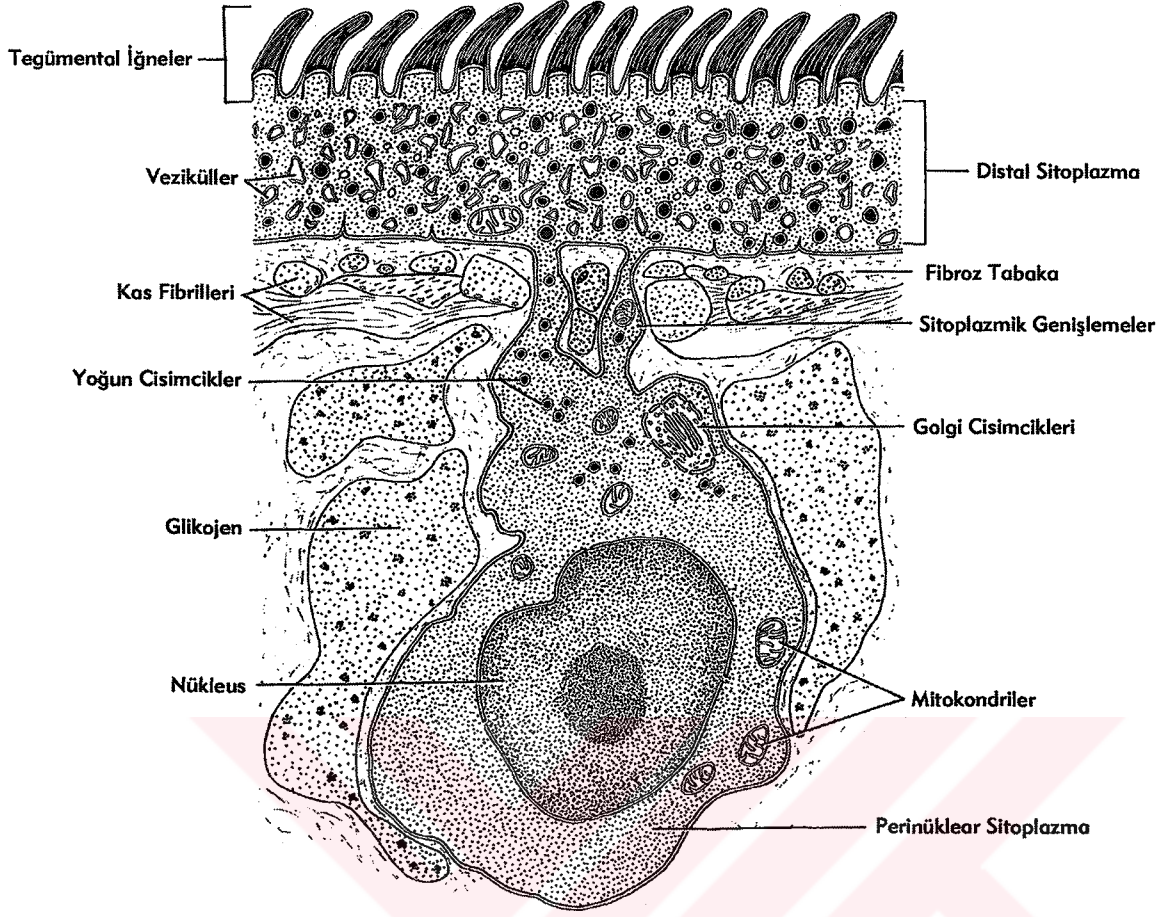
b

**Resim 2.3.** a) Protoskolekslerin baş (skoleks) kısımlarındaki rostelyum bölgesi ve üzerindeki iki sıra halinde dizili çengeller, b) çengellerin görünümü ([http://www.cdfound.to.it/\\_atlas.htm](http://www.cdfound.to.it/_atlas.htm)).

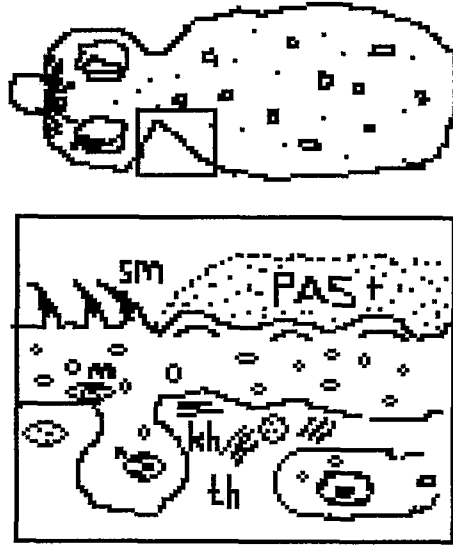
Protoskolekslerin en önemli özelliklerinden birisi de tegümentleridir (Şekil 2.4). Sestodların fizyolojisinde önemli bir yere sahip olan tegüment, besin alınımı, artık

maddelerin atılımı, iyon değişimi, konağın parçalayıcı enzim ve bağışıklık reaksiyonlarına karşı koruyucu bariyer olması gibi olaylarda iş görür (McManus ve Barret 1985, Casado ve ark 1994). Çok çekirdekli (sinsityal) tegüment, karmaşık glikokaliks yapısındadır. Tegüment, mikrotriiks adı verilen mikrovillar yüzey çıkıntılarına sahiptir (şekil 2.5). Elektron mikroskobu ile görülebilen mikrotriikslerin parazit yüzeyini 10-50 kat artırdığı ve böylece daha fazla besin alınımını sağladığı düşünölmektedir. *E.granulosus* tegümentinin bir diğer özelliği ise içerdıği veziköllerdir. Morfolojik olarak altı farklı veziköl (V1-V6) tespit edilmiştir (Bui ve ark 1999). Bu veziköllerin işlevleri de farklıdır. Veziköller, sinsityal tegümentlerin esas maddesinin yapımında, bağışıklığın baskılanmasında, mikrotriiks oluşumunda ve laminar membran sentezinde görev yapmaktadır (Holcman ve Heath 1997, Rogan ve Richards 1989).

*E.granulosus* protoskoleksinde tegüment yönünden farklı iki bölge dikkat çekmektedir: skoleks ve soma (şekil 2.5). Skoleks bölgesinde çok sayıda elektron-yoğun iğneli (sivri uçlu) mikrotriiks mevcutken, soma bölgesinde elektron-yoğun şapkalı küt yükselteler bulunmaktadır (Morseth 1967, Conder ve ark 1983, McManus ve Barret 1985, Rogan ve Richards 1986, Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989, Casado ve ark 1994). Skoleks bölgesinde sestodların karakteristiği olan sivri uçlu mikrotriikslerin yüzeyi, tüm vücut yüzeyini örten plazma membranı ile örtölüdür (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989, Casado ve ark 1994, Rogan ve Richards 1986). Soma bölgesinde ise skoleks bölgesinde görölmeyen, derin PAS(+) glikokaliks vardır (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989, Casado ve ark 1994, Rogan ve Richards 1986) (şekil 2.5). Protoskolekslerin her iki bölgesinde de mikrotriikslerin hemen altında daha uniform bir alan olan distal sitoplazma bulunur (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989). Distal sitoplazma soma bölgesinde skoleks bölgesine göre daha kalındır. Distal sitoplazmada veziköller, vakuoller, elektron-yoğun granöller ve mitokondri bulunur (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989). Distal sitoplazmanın altında bazal membran uzanır. Bazal membranda ise fibröz doku, kas fibrilleri ve kalan tegümental hücreler bulunur. Alev hücreleri (flame cell) ise iç bölgede yer almaktadır ve salgı kanalı ile birlikte protoskoleksin salgı sistemini oluşturur (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989).



Şekil 2.4. *E. granulosus* protoskoleksinin tegümentinin yapısı (Morseth 1967).



Şekil 2.5. Protoskoleksin skoleks ve soma bölgelerinin şematize edilmiş görünümü, mt : mitokondri, kh: kas hücreleri, th: tegümental hücreler (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989).

### 2.1.2. İn vitro koşullarda kist (metasestod) gelişimi

İN vitro koşullarda kist gelişimi hem onkosferden hem de protoskoleksten olmak üzere her iki yolla da başarılmıştır. *E.granulosus* onkosferinden olgun kist gelişimine yönelik in vitro çalışmalar yumurtalarla çalışmak oldukça tehlikeli olduğu için daha sınırlı sayıdadır (Heath ve Smyth 1970, Heath ve Lawrence 1976, Holcman ve Heath 1997). Protoskoleksten olgun kist gelişimine yönelik in vitro çalışmalar ise daha çoktur (Smyth 1962, Benex 1968, Brundjak ve ark 1970, Heath ve Osborn 1976, Rogan ve Richards 1986, Rodriguez-Caabeiro ve Casado 1988, Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989, Gordo ve Bandera 1997, Ertabaklar ve Altuntaş 2002).

Bugüne kadar ekinokokların in vitro kültürü ile ilgili yapılan bu çalışmalar parazitin larval safhasına ışık tutması bakımından oldukça önemlidir (Hemphill ve ark 2002). İn vitro kültür çalışmalarının diğer avantajları şöyledir; konağa ait bileşenlerin olmaması ve sadece parazite ait dokuların elde edilmesi, çok sayıda larva (metasestod) sağlanabilmesi, farklı safhalardaki larvaların elde edilebilmesi ve böylece farklı safhalardaki protein ve immunolojik analizlerin yapılabilmesi, parazitin moleküler biyolojisinin çalışılması, gen ifadesi ve gen ürünlerinin yerleşim yerlerini belirleme çalışmalarının yapılabilmesi, safhaya özgü genlerin tespit edilmesi, parazitin büyüme ve farklılaşma faktörlerinin araştırılması, ilaç deneme çalışmalarının yapılabilmesine olanak sağlaması (Hemphill ve ark 2002).

#### 2.1.2.1. İn vitro koşullarda onkosferden kist yönünde gelişim

*E.granulosus'* un doğal döngüsünde ara konak tarafından alınan ekinokok yumurtaları ince bağırsakta açılırlar. Açılma embriyoforu oluşturan keratin blokların parçalanarak onkosfer zarının ortaya çıkması ve onkosferin aktif hale geçerek onkosfer zarını delmesi ile tamamlanır. Embriyoforun parçalanmasında pepsin ve pankreatin gibi protein eritici enzimler rol oynarken, onkosferin aktif hale geçmesinde safra tuzları rol oynamaktadır (Üner 1991). Onkosferin aktivasyonu in vitro olarak da başarılmıştır (Heath ve Smyth 1970, Heath ve Lawrence 1976, Heath ve Lawrence 1981, Holcman ve Heath 1997).

In vitro şartlarda onkosfer aktive olduğunda 16 µm. çapındadır (Haris ve ark 1989). Onkosfer sonrası gelişimde aktivasyonun 4. saatinde epitelyum, ince sitoplazmik katmandan penetrasyon bezi granülleri ile dolu, mitokondri ve golgi organellerini içeren

daha kalın bir tabakaya dönüşür (Haris ve ark 1989). Aktivasyondan dört saat sonra iki parçalı bir yapı oluşur. Çengeller daima daha küçük parçadadır (Haris ve ark 1989). Çengellerin bulunduğu bölgede üst üste katlanmış epitel vardır. Bu epitel açılarak tegümentin genişlemesini sağlar (Holcman ve Heath 1997).

Onkosfer sonrası gelişimin 2. gününden sonra mikrovillusların sayısı ve hacmi hızla artar (Holcman ve Heath 1997). 2. gün metasestodun sinsityal sitoplazması granül ve veziküllerce zengindir. Ayrıca 2. gün merkezi boşluk oluşmaya başlar (Holcman ve Heath 1997). Aktivasyonun üçüncü gününde metasestod sferik biçimini almış ve etrafını amorf bir tabaka çevreleyerek laminar membranı oluşturmuştur. Bu tabaka germinal membrandan oluşan serilerin ilkidir (Holcman ve Heath 1997, Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989). Uyarımın 3. gününde uzun mikrovilluslar kısa mikrotrikslerle yer değiştirmeye başlar ve bu işlem 5. gün tamamlanır (Holcman ve Heath 1997). Onkosferin aktivasyonundan 6 gün sonra mikrovillusların tamamen ortadan kalktığı ve mikrofilamentoz mikrotrikslerle yer değiştirdiği gözlenmektedir (Harris ve ark 1989, Holcman ve Heath 1997). Hücre iskeleti, veziküllerin taşınımında ve laminar tabaka oluşumundan sorumlu ekzositoz işleminde rol oynar (Holcman ve Heath 1997). Aktivasyonun 8. gününde ikinci laminasyonun da metasestodu çevrelediği görülür. Bu yeni tabakanın elektron yoğunluğu ilk laminasyona göre daha fazladır (Holcman ve Heath 1997).

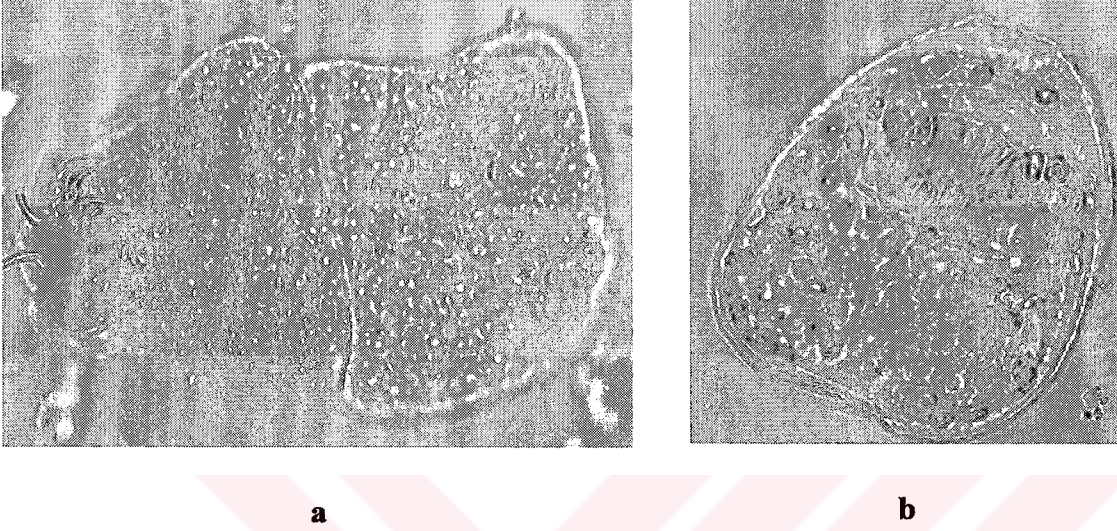
#### **2.1.2.2. İn vitro koşullarda protoskoleksten kist yönünde gelişim**

*E. granulosus*' un doğal döngüsünde son konak tarafından alınan kistli organlar, çiğneme sırasında parçalanırlarken protoskoleksler de açığa çıkarlar. İnvagine durumdaki bu protoskoleksler 6 saat ile 3 gün arasında değişen bir sürede evagine olurlar. Böylece vücut kısmına gömülü olan, vantuz ve çengelleri içeren apikal bölge dışarı çıkar. Protoskoleksler bu organel veya organları ile son konağın ince bağırsağına tutunurlar.

İn vitro koşullarda protoskoleksten kist yönündeki gelişimin erken safhalarında protoskoleksler veziküler ve arka keseli olmak üzere iki formda görülürler. Bazı protoskoleksler evagine olurken bazıları evagine olmayarak invagine durumda kalırlar (Resim 2.4a ve b). İnvagine protoskoleksler kısa sürede şişerek yuvarlaklaşmaya başlarlar ve veziküler form halini alırlar (Rodriguez-Caabeiro ve Casado 1988, Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989, Gordo ve Bandera 1997, Ertabaklar ve Altıntaş 2002). Evagine



olan protoskolekslerin ise kısa bir süre sonra posterior (arka) kısımlarında kese benzeri bir yapı oluşmaya başlar ve arka keseli form halini alırlar (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989, Ertabaklar ve Altıntaş 2002). Ancak her iki protoskoleks formundan da kist gelişimi gerçekleşir.



**Resim 2.4.** a) Evagine protoskoleks (baş kısmı dışa doğru çıkmış), b) invagine protoskoleks (baş kısmı vücut bölgesine gömülmü), çengeller iç kısmında belirgin bir şekilde görülmekte ([http://www.cdfound.to.it/\\_atlas.htm](http://www.cdfound.to.it/_atlas.htm))

#### 2.1.2.2.A. Veziküler protoskoleksten kist gelişimi

Vezikülasyon başladıktan sonra protoskolekslerin normal morfolojisi bozulur, hareketleri oldukça azalır veya kaybolur. Aynı zamanda eksternal veziküller gelişirken internal vakuolizasyon olur ve yuvarlak görünüm kazanır (Rodriguez-Caabeiro ve Casado 1988, Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989, Gordo ve Bandera 1997, Ertabaklar ve Altıntaş 2002). Veziküler formun ultra yapısında gözlenen ilk fark protoskoleksin soma bölgesini örten glikokaliksin kaybolmasıdır (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989, Rogan ve Richards 1989). Aynı zamanda bu alanda bulunan küt yükseltiler farklılaşmaya başlar ve metesestodun karakteristiği olan küt uçlu mikrotriksler oluşur (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989, Rogan ve Richards 1989). Bu aşamada, protoskolekslerin karakteristik özellikleri olan distal sitoplazma, bazal membran, fibröz doku, kas fibrilleri ve kalan tegümental hücreler hala gözlenmektedir (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989). Alev hücreleri ve salgı kanalları tegümentin en iç zonunda hala mevcuttur (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989). Ayrıca ışık mikroskobu ile gözlenen ve bu zonun karakteristiği olan açık renkteki sitoplazmik uzantıların veziküler protoskolekste meydana gelen vakuolizasyondan sorumlu oldukları düşünülmektedir (Casado ve ark 1994).

Kültürün 9. gününden itibaren laminar tabaka oluşmaya başlar (Rodriguez-Caabeiro ve Casado 1988, Gordo ve Bandera 1997). Mikrotrikslerin altında yer alan uniform distal sitoplazmada veziküller, elektron-yoğun granüller, diskoidal cisimler ve çok sayıda vakuoller ve mitokondri mevcuttur (Rodriguez-Caabeiro ve Casado 1988, Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989). Bazal membran çifttir ve germinal membranın internal bölgesindeki tegümental hücrelerin distal sitoplazmasına bağlı sitoplazmik uzantılarla kesintilidir. Mitokondriyer çoğunlukla bu uzantılarda bulunur. Bazal membranın altında dağınık halde retiküler fibrillerden oluşan fibroz doku vardır. Fibroz dokudan sonra kas hücreleri bulunur. Başlangıçta kist yüzeyine paralel uzanan kas fibrilleri daha sonra kist içine doğru girerler (Rodriguez-Caabeiro ve Casado 1988, Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989).

Germinal membranın maksimum gelişimi ise kültürün 95. gününden sonra olur ki bu dönemde çok çekirdekli evre başlamıştır (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989).

#### **2.1.2.2.B. Arka keseli protoskoleksten kist gelişimi**

İn vitro kültürün dördüncü gününe kadar serbest protoskolekslerin %20-40' ını evagine olmuş, oldukça aktif olan arka keseli protoskoleksler oluşturur (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989, Ertabaklar ve Altıntaş 2002). Arka keselerin büyüklüğü zaman içinde artar. Kesenin tegüment yüzeyi az sayıda küt uçlu mikrotriks içermektedir (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989). Ayrıca internal tegümental hücreleri olmamasına rağmen az da olsa sinsityum yetenekleri vardır (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989).

Kültürün 4. gününden itibaren büyüklükleri 20-80 µm. arasında değişen serbest küçük veziküllerin, arka keseli protoskolekslerden kopan keseler olduğu düşünülmektedir (Rogan 1986). Bu serbest veziküller ile arka keselerin ultra yapıları benzerdir. Kültürün 15-20. günleri arasında küçük serbest veziküllerin sayısı artarken arka keseli protoskolekslerin sayısının azalması da bu hipotezi desteklemektedir (Rogan ve Richards 1986).

Veziküler ve arka keseli protoskolekslerin her ikisinden de kist gelişimi gerçekleşmektedir. Ancak arka keseli formdan kiste doğru gelişim veziküler formun kistik gelişimine oranla daha yavaştır. Arka keselerin germinal membranında iç tegümental hücreler olmadığından sinsityum kabiliyeti sınırlı kaldığı için gelişim daha yavaş olmaktadır (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989).

### **2.1.2.2.C. İn vitro koşullarda minyatür kistin oluşumu süresince ultra yapıda görülen değişiklikler**

Kültürün erken döneminde ultra yapıda görülen ilk farklılık soma bölgesindeki PAS(+) glikokaliksin kaybolmasıdır (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989, Rogan ve Richards 1989). Diğer bir farklılık, tipik metasestod karakteristiği olan küt uçlu mikrotrikslerin gelişmeye başlamasıdır. Protoskolekslerin skoleks bölgesinde sivri (iğneli) uçlu mikrotriksler mevcutken tamamen gelişmiş hidatid kistte küt uçlu mikrotriksler vardır. Metasestoda gelişimin erken safhalarında görülen bu sivri uçlu mikrotriksler kültürün 95-125. günleri arasında yerlerini tamamen küt uçlu mikrotrikslere bırakırlar. Bu küt uçlu mikrotriksler sadece germinal membranda değil arka keselerde ve çimlenme kapsüllerinde de mevcuttur. Sivri uçlu mikrotrikslerden küt uçlu mikrotrikslere geçiş hakkında iki hipotez öne sürülmektedir (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989). Birincisi; sivri uçlu mikrotriksler küt uçlu mikrotrikslere dönüşmektedir. İkincisi; sivri uçlu mikrotriksler dökülmekte ve onların yerine yeniden küt uçlu mikrotriksler oluşmaktadır (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989). Tegümentin yapısı kistin fizyolojisinde oldukça önemli yere sahip olduğu için küt uçlu mikrotrikslerin oluşumu kistin gelişimindeki önemli basamaklardandır (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989). Skolosidal maddelerle muamele edilen protoskolekslerde mikrotrikslerin sayısının arttığı gözlenmiştir. Bu durum parazitin yaşamını sürdürmesi için gerekli şartlar değiştiğinde meydana gelen olumsuz koşullara karşı mikrotrikslerin koruma mekanizması olarak da işlev gördüğünü düşündürmektedir (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989, Casado ve ark 1994).

Kistin oluşumunda meydana sonraki değişiklik ise laminar membranın organizmayı tamamen saracak şekilde gelişmesidir. Bu tabaka kistin fizyolojisinde olduğu kadar konak dokuda canlılığının devamı için de önemlidir (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989, Holcman ve Heath 1997).

Kültür boyunca görülen bir diğer değişiklik ise mitokondrinin lokalizasyonundaki değişikliktir (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989). Kistin gelişiminin erken safhasında protoskoleksin distal sitoplazmasında çok sayıda mitokondri mevcuttur. Daha sonra tegümental sinsityum neticesinde mitokondri, distal sitoplazmadan tegüment hücrelerine hareket eder. Tamamen gelişmiş kistin mitokondrileri distal sitoplazmada asla gözlenmez (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989).

Kültür süresince kist oluşumunda meydana gelen bir diğer önemli değişiklik ise 95. günden sonra gözlenen çok çekirdekli evredir. Bu dönemde çok katlı lamellar sitoplazmaya sahip çok çekirdekli hücreler gelişir. Sakamoto ve Sugimura (1970) ve Mehlorn ve ark (1983) çimlenme kapsüllerinin oluşumunu, Morseth (1967) de protoskoleksten erişkin parazit yönünde in vitro gelişimi göstermişlerdir. Bu çalışmaların tümünde çok çekirdekli evre oluşumu rapor edilmiştir. Gelişme yolu ne olursa olsun çok çekirdekli yapının oluşması büyüme ve gelişmenin bir işareti olarak kabul edilmektedir (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989).

İn vitro kültürün 95. günden sonraki döneminde olan bir kistin ultra yapısı ile koyunlardan (Morseth 1967), farelerden (Lascano ve ark 1975), ve insandan (Bartoletti ve Ferretti 1973, Singh ve Lee 1979) alınan olgun kistlerin ultra yapılarının benzer olduğu gösterilmiştir (Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989).



## **2.2. *Echinococcus granulosus* Parazitinin Moleküler Biyolojisi**

Moleküler parazitoloji; parazitlerin sınıflandırılması, patofizyolojilerinin anlaşılması, moleküler epidemiyolojileri, teşhis için özgün ve hassas metodların geliştirilmesi, tedaviye yönelik kemoterapi çalışmalarında enzim ve almaç protein (reseptör) taramaları ve rekombinant aşı geliştirme çalışmalarında antijen taramaları gibi bir çok uygulama alanını kapsamaktadır.

Parazitlerin genomik yapılarının deşifre edilmesi, regülasyon mekanizmalarının anlaşılması özellikle *Echinococcosis* gibi major parazitik hastalıklara karşı kontrol stratejilerinin geliştirilmesi bakımından oldukça önemlidir.

Ekinokok türlerinden *E. granulosus* ve *E. multilocularis*' in dünya çapında yayılım gösteren önemli zoonozlar olmaları, *E. oligarthus* ve *E. vogeli*'ye kıyasla daha çok çalışılmalarına yol açmıştır. Ancak her iki parazit ile ilgili pek çok morfolojik, immunolojik ve epidemiyolojik çalışma bulunmasına rağmen moleküler biyolojik çalışmalar hala sınırlı sayıdadır. Ekinokok türlerinde yapılan moleküler çalışmaları, amacına göre 3 grupta toplamak mümkündür.

1. Genomik Yapının Karakterizasyonu İle İlgili Moleküler Çalışmalar
2. Tanıya Yönelik Moleküler Çalışmalar
3. Rekombinant Aşı Geliştirmeye Yönelik Moleküler Çalışmalar

### **2.2.1. Genomik yapının karakterizasyonu ile ilgili moleküler çalışmalar**

#### **2.2.1.1. Metabolizma ile ilgili gen çalışmaları**

Bu çalışmalar, ekinokokların yaşamlarını sürdürebilmeleri için kullandıkları metabolik yolların anlaşılması, bu yollarda kullanılan enzim, protein ve hormon gibi moleküllerden parazitte sentezlenen veya konaktan temin edilenlerin belirlenmesi, parazit-konak ilişkisinin ve hücre içi uyarı-ileti (sinyal) mekanizmalarının ortaya konması gibi moleküler çalışmaları içermektedir. Ekinokoklarda bugüne kadar malat dehidrogenaz (Rodrigues ve ark 1993), paramyosin (Mühlschlegel ve ark 1993), tioredoksin (Chalar ve ark 1999), myofilin (Martin ve ark 1997) ve laminin-bağlanma proteini (Zhang ve ark 1997) gibi enzimatik veya enzimatik olmayan proteinleri şifreleyen genlerin moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Bu proteinlerin her biri parazit için yaşamsaldır. Üstelik

parazitin hayatını sürdürebilmesi için konağın bağışık cevabından kaçması ve bağışık komponentlerinden korunması gerekmektedir. *E. granulosus*' da tanımlanan 12 kDa'luk antijenin konağın proteaz aktivitesini ve nötrofil kemotaksisini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Shepherd ve ark 1991). Parazitin konaktaki canlılığının devamı için bu fonksiyonun önemli olduğu düşünülmektedir (Shepherd ve ark 1991). Bunun yanısıra ekinokok larvalarının büyüme ve gelişmelerinin stimülasyonu için konakçı faktörlerine ihtiyaç duydukları da bildirilmiştir (Esteves ve ark 1993).

Son yıllarda ekinokoklarda yapılan almaç protein (reseptör) çalışmaları konak-parazit ilişkisine ışık tutması açısından önemlidir. Bu çalışmalar parazitin hücre içi uyarı-ileti mekanizmalarının anlaşılmasına ve konak uyarılarının parazit üzerindeki etkisinin gösterilmesine olanak sağlamaktadır. Ekinokoklarda tanımlanan ilk almaç protein (reseptör) tirozin kinaz reseptör ailesi üyesi olan insülin reseptörüdür (Konrad ve ark 2003). *E. multilocularis*'de tanımlanan bu reseptör (EmİR) diğer insülin reseptörleri (İR) gibi tirozin kinaz alanı ve L1-Cys-L2 alanı içermektedir (Konrad ve ark 2003). Tirozin kinaz alanı genellikle SH<sub>2</sub> bağlanma bölgesi olarak iş gören çeşitli otofosforilasyon bölgelerini içerir. EmİR' in tirozin kinaz alanında memeli İR'lerinden farklı olarak 172 aminoasitlik bir bölge bulunmuştur. Bu bölgenin diğer uyarı-ileti yolları ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Konrad ve ark 2003). Ayrıca EmİR'in jukstamembran bölgesinde NPxY motifinin varlığı memelilerdeki aşağıya doğru (downstream) uyar-ileti mekanizmasının *E. multilocularis*'de korunduğunu göstermektedir. EmİR ile memeli İR'nin homoloji gösterdiği diğer bölge ise sistince zengin L1-Cys-L2 bölgesidir. Reseptörün ekstraselüler kısmında bulunan bu alan uyarıcı (ligand) bağlanma bölgesidir. Bu da konağın insülin veya insülin-benzeri uyarılarının parazitin almaç proteinlerine (EmİR) bağlanabileceğini göstermektedir (Konrad ve ark 2003).

Ekinokokların uyarı-ileti mekanizmaları ile ilgili yapılan bir diğer çalışmada ise, TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) uyarı-ileti yolunun varlığı gösterilmiştir (Zavala-Gongora ve ark 2003). Sitokin ailesinin TGF- $\beta$  üyeleri ve almaç proteinleri, çoğalma ve farklılaşma işlemlerini düzenlemelerinin yanısıra parazitlerle konakları arasındaki iletişim mekanizmasında da rol oynarlar. Zavala-Gongora ve ark (2003) TGF- $\beta$  uyarı-ileti yolu üyesi olan Smad faktörlerinin *E. multilocularis*'de bulunduğunu tespit etmişlerdir. Smad faktörlerinin görevi hücre yüzeyi almaç proteinlerinden nükleusa uyarının taşınmasıdır.

### 2.2.1.2. Gelişme ile ilgili gen çalışmaları

Ekinokok türleri yaşamları boyunca farklı gelişim süreçlerinden geçerler: larval ve erişkin form olmak üzere. Bu safhalar hem biyokimyasal hem de moleküler yönden çok farklı olup, farklı konaklarda ve farklı çevresel koşullarda gerçekleşir. Ayrıca protoskolekslerin çevresel koşullara göre erişkin parazit ya da hidatid kisti oluşturma kapasitesine sahip olması gelişim ve farklılaşma süreçlerinin çalışılmasında mükemmel bir model olarak kabul edilmektedir.

*E. granulosus*'da gelişme ile ilgili olarak bulunan ilk gen EgDf1 genidir (Esteves ve ark 1993). Ekinokokların kendi lipidlerini, özellikle de uzun zincirli yağ asitlerini ve kolesterolü sentezleyemediği, bu nedenle konağın lipidlerini kullanmak zorunda olduğu bilinmektedir. EgDf1'in lipidlerin konaktan transferi ve bağlanması ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Esteves ve ark 1993). Daha sonra aktin 1 ve 2 genleri (Silva ve ark 1993), aktin filament fragment protein (Cortez-Herrera ve ark 2001), tropomyosin (Esteves ve ark 2003), *egM12*, *egM13*, *egM30* ve *egM34* (Zhang ve ark 2003c) genlerinin de gelişme ile ilgili olduğu ve safhaya özgü sentezlendiği rapor edilmiştir.

*E. multilocularis*'de ise ilk kez 14-3-3 geninin safhaya özgü ifade edildiği rapor edildi (Siles-Lucas ve ark 1998). Bu genin şifrelediği 14-3-3 proteininin hücre farklılaşması ve çoğalması olaylarında anahtar molekül olarak iş gördüğü düşünülmektedir (Siles-Lucas ve ark 1998). Bu genin *E. granulosus*'da da ifade edildiği ancak *E. multilocularis*'deki ifadesinin *E. granulosus*'a kıyasla dört kat fazla olduğu bildirildi (Siles-Lucas ve ark 2001). Bu nedenle 14-3-3 proteininin, *E. multilocularis*'in tümör benzeri büyümesi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Siles-Lucas ve ark 2001).

Ökaryotik genomda genler üzerinde kodlanan bilginin ürüne dönüşmesi sürecinde önce RNA'ya aktarılması, daha sonra oluşan mRNA'nın şapkalanma, kuyruklanma ve intronların ayıklanması (intron splicing) gibi bir dizi işlemde geçmesi gerekir. Ekinokoklarda ilk kez *E. multilocularis*'te, daha sonra *E. granulosus*'da bu mekanizmalardan trans-splicing mekanizması gösterilmiştir (Brehm ve ark 2000, Agoria ve ark 2003). Bu mekanizma ekinokokların gelişimi boyunca protein ifadesinde farklılıklar oluşmasına yol açmaktadır.

Ökaryotik genomda, genlerin başlangıç bölümlerinde, genlerin ifadesinde RNA polimeraz enzimlerinin geni tanıyıp bağlanabileceği, aktivatör ve repressör gibi gen

kontrol moleküllerinin etkileşim göstereceği korunmuş bölgeler olan promotorlar bulunur. İlk kez sestodlarda, *E. granulosus*'da aktin 1 ve 2 genlerinin promotor bölgelerinin yapısı ve fonksiyonel karakterizasyonu yapılmıştır (Gimba ve ark 2000).

Ekinokoklardaki bu çalışmalar gen ifadesinin kontrolü ile ilgili temel moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmakta ve ekinokokların kontrolü için hedeflerin belirlenmesine ışık tutmaktadır.

### **2.2.1.3. Türler arası ve tür içi genetik çeşitliliğin araştırılmasına yönelik çalışmalar**

#### **2.2.1.3.A. Tekrarlayan DNA dizileri**

Ökaryotik genom sadece genlerden ibaret değildir. Genomun önemli bir kısmını tekrarlayan DNA dizileri oluşturur. Bu diziler kısa ve uzun tekrar dizileri olabildikleri gibi genin içinde veya dışında da olabilirler. Tekrarlayan DNA dizileri, genel olarak ardışık (tandem repeat) tekrarlar ve genomda dağınık olarak bulunan (intersperse repeat) tekrarlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Ardışık tekrarlar uzunluklarına göre, mikrosatellit, minisatellit ve makrosatellitler olarak gruplandırılırlar. Mikrosatellitler, 1 kilobaz (kb)'ın altında genellikle AT ve AC nükleotidlerce zengin, 10-60 tekrar gösteren ve 30 kb'da bir bulunan ardışık tekrarlardır. Minisatellitler 1-30 kb uzunluğunda olup gen içinde tek bir kopya halinde bulunurlar. Makrosatellitler ise birkaç megabaz (mb) uzunluğunda olan telomerik ve sentromerik tekrar dizileridir. Genom içinde dağınık olarak bulunan tekrarlar ise genellikle bir kopya olarak bulunurlar. Bunlar, uzunluklarına göre ikiye ayrılırlar. Kısa olanları (SINES; Short Intersperse Repeats) , 500 baz çiftinin (bç) altında olup en yaygın tipi Alu dizileridir. Uzun olanları ise (LINES; Long Intersperse Repeats) 1.5-5 kb uzunluğunda olup Kpn dizilerini içermektedir.

Tekrarlayan DNA dizilerinin fonksiyonları hala tam olarak bilinmemesine rağmen filogenetik ilişkilerin ortaya konmasında, türler arası ve tür içi genetik çeşitliliği göstermede, genom organizasyonu çalışmalarında kullanılmaktadır. Özellikle türe özgü tekrarlayan DNA dizilerinden tanı amaçlı faydalanılmaktadır. Bugüne kadar ekinokoklarda ardışık tekrarlar (Rosenzvit ve ark 1997, Bartholomei-Santas ve ark 2003), orta uzunlukta tekrarlar (Marin ve ark 1993) ve mikrosatellitler (Nakao ve ark 2003) tanımlanmıştır. Ayrıca *E. granulosus*'a spesifik 186 bç uzunluğunda tekrarlayan DNA dizileri tanımlanmış ve bunların tür içinde çeşitlilik gösterdiği rapor edilmiştir (Rosenzvit ve ark 2001).



### 2.2.1.3.B. Mitokondrial genom çalışmaları

Hemen hemen tüm ökaryotlarda nükleer genomun dışında bir de mitokondrial (mt) genom bulunmaktadır. Mt genom, küçük, sirküler ve haploid yapıdaki DNA dizileridir. Maternal kalıtılır olması ve rekombinasyona uğramaması, populasyon genetiği ve filogenetik çalışmalar için mt genomu çekici hedef haline getirmiştir. Mt genom çalışmaları türler arası ve tür içi farklılıkların belirlenmesinde olduğu kadar taksonomi çalışmaları, türler arası akrabalığın belirlenmesi ve moleküler epidemiyoloji çalışmalarında da kullanılmaktadır.

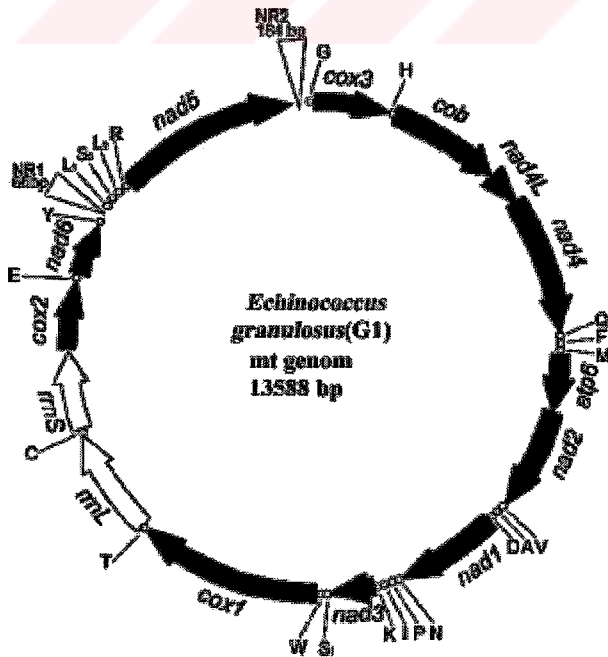
Bugüne kadar, nükleer ve mitokondrial genom çalışmaları sonucunda *E. granulosus*'un on genotipi (G1-G10) tanımlanmıştır (Tablo 2.1) (Bowles ve ark 1992, Bowles ve McManus 1993a, Bowles ve ark 1995, Thompson ve ark 1995, Eckert ve Thompson 1997, Scott ve ark 1997, Lavikainen ve ark 2003, Dinkel ve ark 2004) . Bu çeşitlilik, biyolojik ve immunolojik özelliklerde olduğu kadar konak tercihinde de farklılıklara yol açmaktadır (Bowles ve ark 1992, McManus ve ark 2002, Maizels ve Kurniawan-Atmadja 2002). Bu genotiplerden en yaygın bulunan ve insan enfeksiyonuna yol açanın G1 genotipi olduğu bilinmektedir (Dinkel ve ark 2004). Diğer genotiplerin nadiren insan enfeksiyonunun bulunduğu, bazılarının ise bugüne kadar insan enfeksiyonuna rastlanılmadığı bildirilmiştir (Bowles ve McManus 1993a, Dinkel ve ark 2004).

*E. granulosus*'un G1 ve G4 genotipleri ile *E. multilocularis*'in mitokondrial genomları tamamen tanımlanmıştır (Le ve ark 2002, McManus ve Thompson 2003). *E. granulosus*'un G1 genotipinin mt genomu 13588 bç uzunluğunda olup 12 protein-kodlayan gen içermektedir (Şekil 2.6). Bunlar; nikotinamid dehidrogenaz kompleksi (nad1-6 ve nad4L alt üniteleri), sitokrom c oksidaz kompleksi (cox1-3 alt üniteleri), sitokrom b (cob) ve adenozin trifosfataz 6 (atp6 alt ünitesi)'dir. Diğer metazoalarda bulunan atp8 bunlarda bulunmamaktadır. Ribozomal RNA (rRNA) alt ünitelerini şifreleyen iki gen ve transfer RNA (tRNA)'ları şifreleyen 22 genin bulunduğu da rapor edilmiştir (McManus ve ark 2004). Ayrıca mt genomda kodlanmayan 2 bölgenin (NRs) varlığı da bildirilmiştir. Bu bölgelerin uzunlukları genotipler arasında farklılık göstermektedir (McManus ve ark 2004).

**Tablo2.1.** Ekinokok türleri ve genotipleri (alttürleri)

Genotip	Enfekte Konak
G1	Koyun, insan, kangru, sığır, deve, domuz, keçi
G2	Koyun (Tazmanya)
G3	Bufalo (Hindistan)
G4 ( <i>E. equinus</i> )	At (İngiltere, İrlanda, İsviçre), eşek (İrlanda)
G5 ( <i>E. ortleppi</i> )	Sığır (İsviçre, Hollanda), bufalo (Hindistan)
G6	Deve (Kenya, Somali, Sudan), keçi (Kenya)
G7	Domuz (Polonya)
G8	Geyik (Kuzey Amerika)
G9	İnsan (Polonya)
G10	Geyik (Finlandiya)
M1	İnsan, kemirici (Çin, Kuzey Amerika)
M2	İnsan, kemirici (Avrupa)
V	Kemirici (Güney Amerika)
O	Kemirici (Panama)

G1-G10, *E.granulosus*; M1,M2, *E.multilocularis*, V, *E.vogeli*, O, *E.oligarthus*, Genotipler, mitokondrial sitokrom c oksidaz altünitesi 1 ve NADH dehidrogenaz 1 genlerine göre düzenlenmiştir (Dinkel ve ark 2004)



**Şekil 2.6.** Echinococcus granulosus (G1 genotipi) mitokondrial genomunun yapısı (McManus ve ark 2004).

Ekinokok mt genleri intron içermemekte ve birkaç nükleotidle birbirinden ayrılmaktadır. Genlerden sadece nad4 ve nad4L genlerinin çakıştığı tespit edilmiştir. Bütün genlerin aynı yönde transkribe edildiği de bilinmektedir. Ayrıca parazit mt genomundaki genetik kodlamanın, evrensel kodlamaya göre farklılık gösterdiği de rapor edilmiştir (Telford ve ark 2000, Le ve ark 2002, Nakao ve ark 2003).

### 2.2.2.Taniya yönelik moleküler çalışmalar

Kist hidatikde doğru ve güvenilir tanı, hem hastaya uygun tedavi verme hem de cerrahi ve farmakolojik tedaviden sonra hastanın takibinde önemlidir. Son yıllarda rekombinant antijenlerin ve immunojenik peptidlerin sentezi ile ekinokokların tanısında yeni ve optimal moleküler metodlar geliştirilmeye çalışılmaktadır (Zhang ve ark 2003a, Ferreira ve ark 1996).

Üreme kabiliyeti olan (fertil) ve olmayan (infertil) kistlerin majör antijen kaynakları kist sıvılarıdır. Ancak fertil kist sıvılarındaki antijen konsantrasyonu çok daha yüksektir. Kist sıvısında bulunan başlıca parazit antijenleri, ısıya dayanıklı bir lipoprotein olan Antijen B (AgB) ve ısıya dayanıksız bir lipoprotein olan Antijen 5 (Ag5)' dir. Bugüne kadar çeşitli AgB ve Ag5 cDNA'ları klonlanmış ve rekombinant proteinler olarak ifade edilmiştir (Shepherd ve ark 1991, Frosch ve ark 1994, Gonzales ve ark 2000). Bunlar serolojik tanıda kullanılmaktadır. Ancak özgül ve duyarlı olmamaları, diğer parazitlerle özellikle de tenya türleri ile çapraz reaksiyon vermeleri ve kullanım standardizasyonunda yaşanan sıkıntılar tanıda sorunlara yol açmaktadır (Lightowers ve Gottstein 1995, Liu ve ark 1993, Ortona ve ark 2000). Rekombinant DNA teknolojisi ve hibridizasyon yöntemleri ile pek çok alanda son derece özgül ve duyarlı, optimal tanı yöntemleri geliştirilmesine rağmen, kist hidatiğin tanısında rutin olarak uygulanan bir yöntem henüz bulunmamaktadır. Günümüzde yapılan, taniya yönelik çalışmalar da genellikle serolojik yöntemlerin iyileştirilmesi yönündedir. Ancak ekinokokların son konaktaki tanısı ile ilgili moleküler çalışmalarda ümit verici gelişmeler olmuştur. Bretagne ve ark (1993) tilkilerde *E. multilocularis* yumurtalarının tespitine yönelik PCR tanı yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde, *E. multilocularis* genomunda en az 50 kez tekrarlayan, U1 sRNA geninin kodlanmayan kısmına özgün primerler kullanılmıştır. Bu primerlerin *E. multilocularis*' e %100 spesifik olduğu ve *E. granulosus*' da dahil olmak üzere diğer sestodlara uygun olmadığı ve bu nedenle çapraz reaksiyona yol açmadığı rapor edilmiştir (Bretagne ve ark 1993).

### 2.2.3. Rekombinant aşı geliştirme çalışmaları

Ekinokokların konaklar arasındaki döngüsünü kırmak ve enfeksiyonu ortadan kaldırmak için geliştirilen kontrol programlarının en önemli basamağı aşı çalışmalarıdır. Son yıllarda moleküler yöntemler kullanılarak koruyucu antijenlerin belirlenmesi, bu antijenleri şifreleyen genlerin klonlanması ve rekombinant formlarının üretilmesi ile aşı geliştirme çalışmaları yoğunluk kazanmıştır.

*E. granulosus*'da ilk aşı çalışmaları Gemmell'in (1966) denemeleri ile başlamıştır. Gemmell *E. granulosus*'a karşı koyunların onkosferlerle bağışıklık kazanabileceği fikrinden yola çıkarak canlı onkosferleri deri altına enjekte etmiş ve bağışıklığın geliştiğini göstermiştir (Gemmell 1966, Gemmell ve Soulsby 1968). Bunu izleyen diğer çalışmalarla da onkosferal antijenlerin bağışık cevabın gelişmesine yol açtığı tespit edilmiştir (Heath ve ark 1981, Osborn ve Heath 1982, Heath 1991, Lightowlers ve ark 1992).

Lightowlers ve ark (1992)'nin yaptığı çalışmada onkosferal cDNA kütüphanelerinden seçilen cDNA klonları, *Escherichia coli*'de glutatyon S-transferaz (GST) ile füzyon proteini olarak ifade edildi. Bu klonlardan bağışıklığı en yüksek düzeyde uyaran klonun Eg95 klonu olduğu belirlendi. Bu klon, *E. granulosus*'a karşı aşılama çalışmalarında başarıyla kullanıldı. Eg95 aşısının Saponin, Quil A ve ISA 70 olmak üzere üç farklı adjuvanla formüle edilerek kullanılması ile başarının % 96-98'lere yükseldiği rapor edildi (Lightowlers ve ark 1996).

Chow ve ark (2001)'nin yaptığı çalışmada, EG95 proteinini şifreleyen genin en az yedi üyeden oluşan bir gen ailesine ait olduğu tespit edildi. Bunlardan aşıda kullanılan genin Eg95-1 olduğu ve diğer üç gen ile aynı proteini şifreledikleri belirlendi. Eg95-5 ve 6 genlerinin şifreledikleri proteinlerin ise farklı olduğu tespit edildi. Ancak bu proteinlerin bağışıklığı uyarıp uyarmadıkları tam olarak bilinmemektedir. Eg95-7 geninin ise bir yalancı gen (pseudogen) olduğu bildirilmiştir (Chow ve ark 2001).

Eg95-1 ve aynı proteini şifreleyen diğer üç genin genomik yapılarının yüksek derecede korunmuş olduğu tespit edilmiştir. Bu üç gen ile Eg95-1 geni arasında nükleotid farklılıkları bulunmaktadır. Ancak bu farklılıklar genlerin kodlanmayan bölgelerindedir. Eg95-4 geninin ekzon 3'ünde tespit edilen nükleotid yer değiştirmelerinin ise şifreledikleri proteinde herhangi bir değişikliğe yol açmadığı görülmüştür (Chow ve ark 2001).

*E. granulosus*'un farklı genotiplerinin bulunduğu bilinmektedir (Thompson 1995). Bu genotiplerde, Eg95 geninde olabilecek herhangi bir çeşitliliğin EG95 bazlı aşının etkinliğini azaltabileceği düşünülmüştür (Chov ve ark 2001). Ancak farklı coğrafik bölgelerde uygulanan Eg95 aşısının yüksek düzeyde koruma sağladığı rapor edilmiştir (Lightowers ve ark 1999) Ayrıca Zhang ve ark (2003b)'nın yaptığı çalışmada EG95 proteininin yüksek derecede korunmuş olduğu ve çeşitliliğin çok sınırlı olduğu tespit edilmiştir. Böylece Eg95 aşısı, kist hidatiğin endemik olarak görüldüğü bölgelerde etkin bir biçimde kullanılmaya devam edecektir.

Hidatid kontrol programlarında Eg95 aşısının başarıyla uygulanması ile insan ekinokokkozis prevalansının da düşmesi beklenmektedir. Ayrıca Eg95 aşısının insanlarda kullanım potansiyeline sahip olduğu ve çalışmaların bu yönde devam ettiği de rapor edilmiştir (Lightowers ve ark 1996, Zhang ve ark 2003a).

*E. multilocularis*'de, EG95'e benzerlik (homoloji) gösteren EM95 proteini tanımlanmıştır (Gauci ve ark 2002). EM95 proteininin aminoasit dizilerinin *E. granulosus*'un EG95-1 ve EG95-6 proteinlerinin aminoasit dizilerine, sırasıyla %80 ve %84 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. EM95 proteininin, farelerde *E. multilocularis* yumurtaları ile enfeksiyona karşı önemli ölçüde (%78.5-82.9) bağışıklığı uyardığı gözlenmiştir (Gauci ve ark 2002).

Aşı çalışmalarının bir diğer hedefi ise son konaklardır. Bu yöndeki çalışmalar da ümit verici olup, denemeler devam etmektedir. *E. granulosus* protoskolekslerinin kullanımına dayalı aşı çalışmaları sonucunda köpeklerin bağırsağındaki parazitlerin sayısında azalma olduğu ya da gelişimlerinin durduğu gözlenmiştir (Movsesijan ve Mladenovic 1970, Aminzhanov 1980). Protoskoleksler veya protoskoleks antijenleri parazitlerin gelişimini baskılamaktadır (Gemmell 1962, Zhang ve ark 1999). Kist sıvısı (Aminzhanov 1980), kist zarları (Gill 1969) ve erişkin ekstraktı (Gemmell 1962) gibi diğer antijen kaynaklarının da bağışıklığı uyardığı bildirilmiştir. Ayrıca Eckert ve ark (2001)'nin yaptığı çalışmada, tilkilerin de *E. multilocularis*'e karşı bağışıklık kazandıkları rapor edilmiştir.

## **2.3. Aktin Genleri ve Fonksiyonları**

### **2.3.1. Aktin proteini ve fonksiyonları**

Aktin proteini, mantar ve protistalardan memelilere kadar tüm ökaryotik hücrelerde bulunur. Aktin proteini hücre iskeletinin ana bileşenidir. Hücre iskeleti, tüm ökaryotik hücrelerde aynı olup altünitelerin oluşturduğu polimerlerden meydana gelen uzun liflerden oluşmuştur. Bu liflerin başlıca işlevleri hücre şeklini sağlamak, mekanik güç kazandırmak, devinim (lokomosyon), mitoz ve mayozda kromozomların hareketi ile organellerin ve veziküllerin hücre içi taşınımıdır ([http://www.biology.arizona.edu/cell\\_bio/tutorials/](http://www.biology.arizona.edu/cell_bio/tutorials/)).

#### **2.3.1.1. Hücre iskeleti**

Hücre iskeletini oluşturan filamentler; mikrofilament, mikrotübül ve orta kalınlıkta (intermediate) liflerdir ([http://www.biology.arizona.edu/cell\\_bio/tutorials/](http://www.biology.arizona.edu/cell_bio/tutorials/), Pollard ve Earnshaw 2002).

##### **2.3.1.1.A. Mikrofilamentler**

Çapları 3-8 nm. olup, hücre iskeletinin en ince lifleridir. Kontraktıl protein olan aktinden oluşmaktadır. Aktin hücrede en bol bulunan proteindir. Mikrofilamentler, hücreye mekanik güç sağlamak, hücre yüzey reseptörleri gibi zarlar arası proteinlerle sitoplazmik proteinler arasında bağlantı sağlamak, mitoz ve mayoz sırasında sentrozomların zıt kutuplarda tutunumunu sağlamak gibi fonksiyonlara sahiptir. Ayrıca sitoplazmik akış, kasılma ve sitokinez gibi hücre hareketlerinin yapılmasında da iş görürler. Bu fonksiyonların yanı sıra, aktin iskeletinin hücre-hücre etkileşimleri ve yerel yapışmayı (fokal adhezyonlar) düzenlediği de bilinmektedir

(<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/>).

##### **2.3.1.1.B. Mikrotübüller**

20-25 nm. çapında silindirik tüplerdir. Tubulin proteininin, alfa ve beta olarak isimlendirilen altünitelerinden oluşmuştur. Mikrotübüller hücrenin şeklinin oluşmasını sağlayan yapı iskeleleridir. Ayrıca organellerin ve veziküllerin hareket ettikleri yollardır. Mikrotübüller, mitoz esnasında kromozomların tutunabilmesi için gerekli olan iğ ipliklerinin oluşmasını da sağlarlar

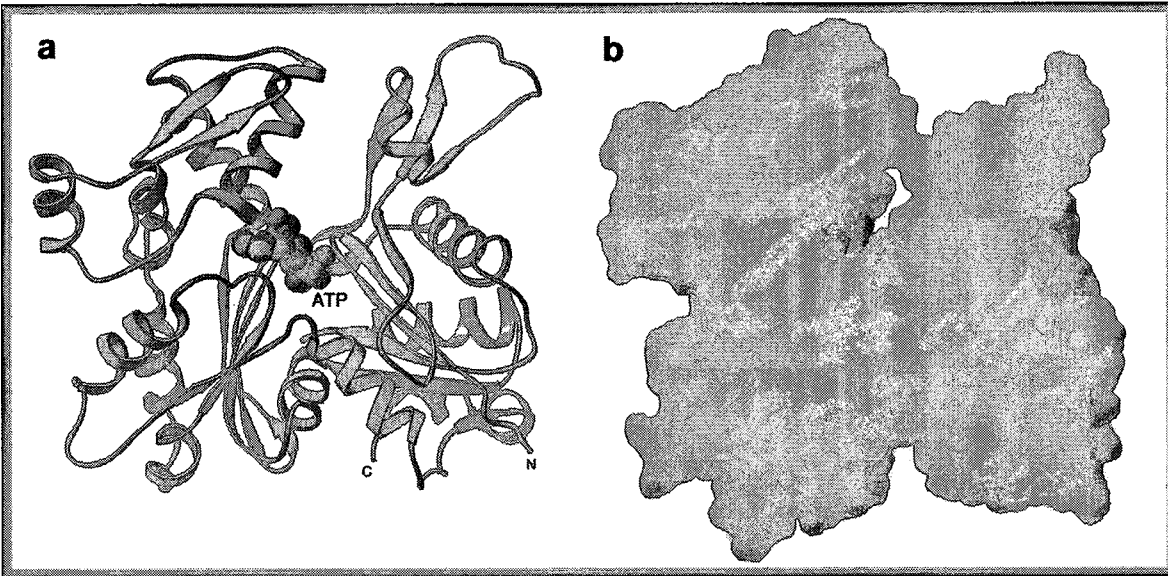
([http://www.biology.arizona.edu/cell\\_bio/tutorials/](http://www.biology.arizona.edu/cell_bio/tutorials/)).

### 2.3.1.1.C. Orta kalınlıktaki (Intermediate) filamentler

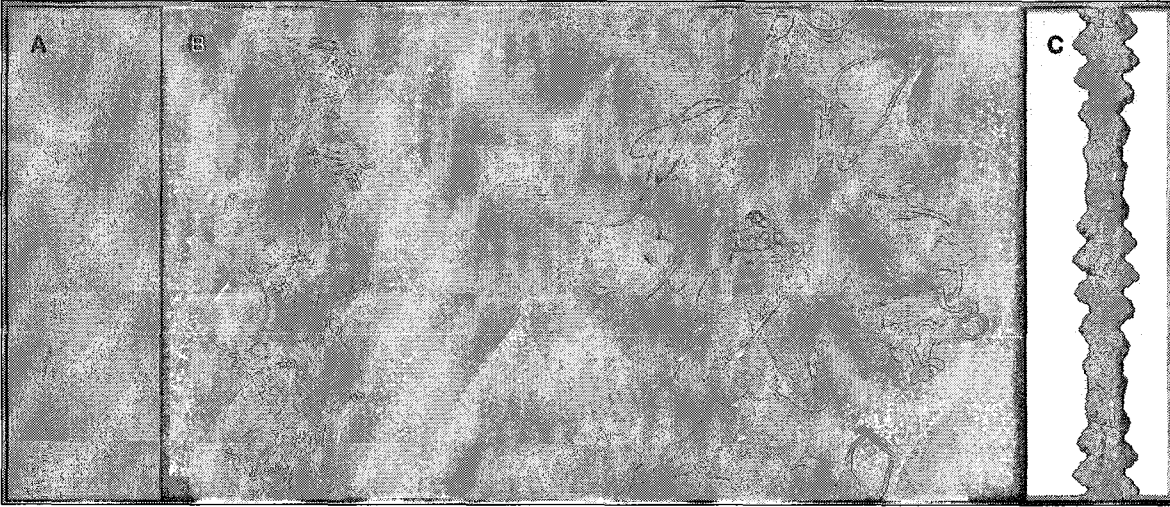
Yaklaşık 10 nm. çapında olan ve hücrenin dayanıklılığını sağlayan filamentlerdir. Dezmozomlar yoluyla bitişik hücrelerin ilişki kurmasını sağlarlar ([http://www.biology.arizona.edu/cell\\_bio/tutorials/](http://www.biology.arizona.edu/cell_bio/tutorials/)).

### 2.3.1.2. Aktin monomerlerinin yapısı ve filamentlerin oluşum mekanizması

Aktin molekülü iki domain ve bunlar arasında kalan bir adenin nükleotidinden oluşmuştur (Şekil 2.7) (Pollard ve Earnshaw 2002). Bu monomer 375 rezidüden oluşmuş bir polipeptiddir. Hem adenin trinükleotid fosfat (ATP) hem de adenin dinükleotid fosfat (ADP) ile bağlanabilirler. Ancak ATP' ye olan çekiciliği ADP' ye oranla daha yüksektir. Aktin monomerleri (Globular actin, G-actin) sürekli birbirleriyle birleşme ve filament (filament aktin, F-actin) oluşturma eğilimindedirler (Şekil 2.8). Sadece düşük tuz konsantrasyonlarında monomer olarak izole edilebilirler (Pollard ve Earnshaw 2002). Aktin filamentleri her iki uçtan da altünitelerin eklenmesi ve çıkarılması ile uzarlar ve kısalırlar. Ancak her iki ucun polimerizasyon hızı aynı değildir. Hızlı polimerize olan uca artı (+) uç veya kancalı (barbed) uç ve yavaş polimerize olan uca ise eksi (-) uç veya sivri (pointed) uç denir. Alt ünitelerin ayrılması ise her iki uçta da aynı orandadır (Pollard ve Earnshaw 2002).



Şekil 2.7. Aktin monomerinin atomik yapısı. a)  $\alpha$ -heliks ve  $\beta$ -kıvrımlı polipeptid katlantıları ve Mg-ATP yerleşim merkezi, b) aktin monomerinin yüzeyel görünümü (Pollard ve Earnshaw 2002).



**Şekil 2.8.** Aktin filamentinin yapısı. A) aktin filamentinin elektron mikroskopik görünümü, B) çift zincirin sadece bir zinciri ve yanda genişletilmiş görünümü, C) atomik modelin yüzeyel görünümü (Pollard ve Earnshaw 2002).

### 2.3.1.3. Aktin izoformları

Memeli aktin proteinlerinin üç izoelektrik formu bulunmaktadır. İlk iki form sitoplazmik  $\beta$ - ve  $\gamma$ - formu olup tüm hücre tiplerinde bulunur. Üçüncü ise asidik olan  $\alpha$ -aktindir.  $\alpha$ -aktin genellikle kas hücrelerinde bulunmaktadır. Üç izoformun aminoasit dizileri mukayese edildiğinde kas aktininin ( $\alpha$ -aktin) N terminal dizilerinin sitoplazmik aktin ( $\beta$ - ve  $\gamma$ -) N terminal dizilerinden farklı olduğu görülmektedir (Pollard ve Earnshaw 2002).

### 2.3.1.4. Aktin bağlanma proteinleri (ABP)

Tüm ökaryotlarda aktin iskeletinin organizasyonu, aktin bağlanma proteinlerinin (ABP) düzenleyici işlevlerine bağlıdır. Bu işleme iştirak eden bir çok ABP tanımlanmıştır. Bunlardan yüksek ökaryotlardaki gelsolin, villin (Yin ve Stossel 1979, Bretscher ve Weber 1979), *Physarum polycephalum*'daki fragmin (Hasegava ve ark 1980, Jampens ve ark 1997), *Dictyostelium discoideum*'daki severin (Brown ve ark 1982) proteinleri aktin filament fragment proteinler (AFFP) grubuna dahillerdir. Severin ve diğer AFFP'ler aktin filamentlerinin uzama ve kısalma olaylarını düzenlerler. Ayrıca hücredeki aktin konsantrasyonu ve AFFP'lere aktinin oranı, filamentlerin boylarının uzama veya kısalmasını belirleyici faktörlerdir (Wen ve ark 1996).



### 2.3.2. Aktin genleri

Aktin proteinleri, metazoalarda multi gen ailesi tarafından ifade edilirken çoğu protistalarda organizmaların gelişimleri süresince, geçici olarak veya sürekli ifade edilirler (Firtel 1981). Mayada sadece tek bir aktin geni bulunurken, *Drosophyla*' da 6 ve *Dictyostelium discoideum*' da 17 üyeden oluşan aktin gen ailesi bulunmaktadır (Kindle ve Firtel 1978). Bu aktin genleri memeli sitoplazmik aktin genlerine benzemektedir (Firtel 1981). *Caenorhabditis elegans*'da 4 aktin geni, *Schistosoma mansoni*'de 2 aktin geni tanımlanmıştır (Schriefer ve ark 1994, Oliveira ve ark 1998). İnsanlarda ise yaklaşık 20 aktin geni bulunmaktadır (Humphries ve ark 1981).

Aktin genlerinin içerdiği intronların sayısında türler arasında çeşitlilik göstermektedir. Maya ve *Drosophyla*'da bir tane intron bulunurken, *Dictyostelium*'daki aktin genlerinin hiçbirinde intron bulunmamaktadır. *C.elegans*'ın aktin genlerinde 2-3 intron olduğu rapor edilmiştir (Schriefer ve ark 1994).

#### 2.3.2.1. Aktin genlerinin gelişme ve farklılaşma olaylarındaki fonksiyonları

Aktin proteinleri, hücre iskeletini oluşturma ve kas hücrelerinde kasılma işlevine sahip olmasının yanı sıra organizmaların gelişme olaylarında da etkin rol oynamaktadır (Howell ve Smyth 1995, Oliveira ve ark 1998, Gimba ve ark 2000, Mykles ve ark 2000, Cortez-Herrera ve ark 2001). Gelişme ve farklılaşma olaylarında hücrelerde bir çok morfolojik, fizyolojik ve metabolik değişiklikler meydana gelmektedir. Bu değişiklikler gen düzeyinde meydana gelen değişiklikler ve düzenlemeler sonucu gerçekleşmektedir (McKeown ve ark 1982, Oliveira ve ark 1998, Cortez-Herreira ve ark 2001). Organizmaların bu gelişim ve farklılaşma süreçlerinde, hücrelerde meydana gelecek her türlü morfolojik değişikliklerde hücre iskeleti etkin rol oynar (Gimba ve ark 2000, Mykles ve ark 2000, Cortez-Herreira ve ark 2001). Bu nedenle bugüne kadar pek çok organizmada, gelişim süreçlerinde aktin genlerinin ifadeleri çalışılmıştır (Firtel 1981, McKeown ve ark 1982, Matsumoto ve ark 1988, Silva ve ark 1993, Schriefer ve ark 1994, Oliveiro ve ark 1998, Ambrosio ve ark 1998, Mykles ve ark 2000, Cortez-herreira ve ark 2001, Zhang ve ark 2003c).

*D. discoideum*' un 17 üyeden oluşan aktin gen ailesinden en az dokuzunun ifade edildiği ve bu genlerin gelişme ile ilgili oldukları rapor edilmiştir (McKeown ve ark 1982). *C.elegans*' ın ise aktin genlerinin çok güçlü promotörlere sahip olduğu ve bu nedenle erken

embriyogenez olaylarında anahtar rol oynayabileceği rapor edilmiştir (Schriefer ve ark 1994).

*Schistosoma mansoni* parazitinin gelişim süreci de çok sayıda morfolojik, davranışsal ve metabolik değişikliklerle ilintilidir (Oliveira ve ark 1998). *S. mansoni* memeli konağa penetre olduktan sonra schistosomula'ya dönüşür. Bu aşamada kuyruk ve vücudu çevreleyen glikokaliks kaybolur (Oliveira ve ark 1998). Daha sonra parazitin tegümentinde bir takım değişiklikler meydana gelir. Üç katlı laminar tegüment altı katlı tegümente dönüşürken tegümenter çıkıntılar (iğne) da kaybolur ancak bu çıkıntılar penetrasyonun 14. gününden itibaren yeniden oluşmaya başlar (Hockley 1973). Bu değişikliklere paralel olarak aktin genlerinin transkripsiyonal aktivitesinde de değişiklikler olduğu tespit edilmiştir (Oliveira ve ark 1998). *S. mansoni* paraziti ile ilgili yapılan bir başka çalışmada ise parazitin tegümenter yapısının aktin ve paramiyosinden oluştuğu belirtilmiştir (Matsumoto ve ark 1988). Bu çalışmada tegümenter yüzey çıkıntılarının aktin filamentlerinin parakristalin yapısından meydana geldiği de rapor edilmiştir (Matsumoto ve ark 1988).

### **2.3.3. *Echinococcus granulosus* parazitinin aktin genleri**

İlk kez Silva ve arkadaşları (1993) tarafından *E. granulosus* aktin genleri tanımlanmıştır. Actin 1 (*EgactI*) ve aktin 2 (*EgactII*) olmak üzere iki aktin geni bulunmaktadır. *E. granulosus'* da bu genlere yüksek derecede benzerlik gösteren bir cDNA klonu da tespit edilmiş ve bunun her iki aktin geninden farklı olan bir başka aktin genine ait olabileceği belirtilmiştir (Silva ve ark 1993). Ayrıca *E. granulosus* aktin cDNA'larının prob olarak kullanılması ve farklı enzim kesimleri uygulanması ile yapılan Southern Blot çalışmalarında, *E. granulosus'* da en az 8 aktin ile ilgili gen olduğu da tespit edilmiştir (Silva ve ark 1993).

#### **2.3.3.1. *EgactI* ve *EgactII* genlerinin nükleotid dizileri**

*EgactI* ve *EgactII* genleri sırasıyla 375- ve 376- aminoasitlik polipeptidleri şifrelemektedir. *EgactI* geni intron içermezken *EgactII* geninin 591 bç uzunluğunda bir intron içerdiği tespit edilmiştir. Her iki genin kodlama bölgelerinin birbirine olan benzerliği, nükleotid düzeyinde %79.6 ve aminoasit düzeyinde %85.3' dür (Şekil 2.9 ve 2.10) (Silva ve ark 1993).

*EgactI* geni en yüksek benzerliği nükleotid düzeyinde *Taenia solium* AT6 geni (%80.3), aminoasit düzeyinde *Bombyx mori* aktin A3 dizisiyle (%90.6) ve *Drosophyla melanogaster* act5C dizisiyle göstermektedir. *EgactII* geni ise nükleotid düzeyinde *T. solium* AT6 geni (%77.8), aminoasit düzeyinde *Cyprinus carpio*' nun  $\beta$ cy geni (%89.8) ile göstermektedir (Silva ve ark 1993). *E. granulosus* aktin genlerinin her ikisinin de aminoasit dizisi memeli sitoplazmik aktin aminoasit dizisine benzemektedir (Silva ve ark 1993).

*EgactI* ve *EgactII* nükleotid dizileri şekil 2.9' da gösterilmektedir. *EgactI* ve *EgactII* dizilerinin stop kodonlarının 3' tarafında, 56 ve 58 nt. uzağında poli (A) (Proudfoot ve Brownlee 1976) dizileri bulunmaktadır. *EgactI* ve *EgactII* genlerinin şifreledikleri aminoasit dizileri de şekil 2.10'da görülmektedir (Silva ve ark 1993).

### 2.3.3.2. *EgactI* ve *EgactII* genlerinin promotor bölgeleri

İlk kez sestodlardan *E. granulosus*' da, *EgactI* ve *EgactII* aktin genlerinin özendirici bölgelerinin (promotor) yapısal ve işlevsel tanımlanması yapılmıştır (Gimba ve ark 2000). ATG başlama kodonundan sırasıyla 935- ve 524-bp uzaklıkta, 5' uç bölgesinde (upstream) promotor alanları tanımlanmıştır (Gimba ve ark 2000). Şekil 2.11' de görüldüğü gibi E-dizisi (E-box), SRE ve Sp1, Ap1, MEF-2 ve YY1 bağlanma bölgeleri mevcuttur ( Lemercier ve ark 1998, Browning ve ark 1998, Pugh ve Tjian 1990, Paradis ve ark 1996, Akkila ve ark 1997, Shi ve ark 1997, Gimba ve ark 2000). *EgactI* geninin nükleotid -87' de korunmuş TATA dizisi (TATA-box) mevcutken, *EgactII* geninin 5' uç bölgesinde -60' da TATA dizisi ile ilgili dizinin bulunduğu tespit edilmiştir. *EgactII*' nin 5' uç bölgesinde çok sayıda dT elementi de mevcuttur (Gimba ve ark 2000). Bu düzenleyici elementlerin fonksiyonel olarak aktin geninin düzenlenmesi ile ilgili olduğu, bu nedenle transkripsiyonel kontrolde rol oynadığı düşünülmektedir. *EgactI* geninin promotor bölgesindeki -525' den -101' e kadar olan bölgesi ve *EgactI* geninin -524' den -129' a kadar olan bölgesinin negatif düzenlenme ile ilgili olduğu rapor edilmiştir (Gimba ve ark 2000). Ökaryotik hücrelerde YY1 proteininin  $\alpha$ -aktin geninin düzenlenmesinde baskılayıcı rol oynadığı bilinmektedir (Lee ve ark 1992, McLellan ve ark 1994, Bushel ve ark 1995, Chen ve Schwartz 1997, Gimba ve ark 2000). *E. granulosus* aktin genlerinin promotorlarındaki YY1 dizilerinin korunmuş olması, YY1 proteininin ökaryotlardaki gibi DNA'ya bağlanarak aktin geninin ifadesini negatif etkilediğini göstermektedir (Gimba ve ark 2000).

a) *Egact1* CCG AAT ACT GAC ACG TTA CTT ACA GTC ATC AGT AAT AAA CTC GTA GAG TA -750

ATT ACA TGG TAT GCC ACA GCC ATG AAT TGC CAG AAG ATC GGG TGA TTC GTT TAC ATA AGG GAA GT -690

CTA AAG TGC GCA GTC CCT AGA CGT TGA GTA GTT CCG CAT ATT TTC TGC TAG TGT TGA AAA GGG GC -625

GTG AGG CTG GTT TGC CTT GTG CCA ACA TTC TAA CAG GTG ACT ACA TTG TTT CCT GAA TAA CGA CT -560

GCC ATG TTT AAC GAA ATG GTG AGT AAT AAT TTC CTG TGT AAT ACT TCA TTC ACA AAG AGG GAT GT -495

TCA CTA CGA ATC GAC CTA AAG TCT AAA TGC CTA GAA AAA CTT TGC CTT TAT AAA GGA AAC TTG TA -430

CTA CTA CCA CCT ATA ATC TAT CAC AGG ACT TTT TGT GCT TAA TTC AAA TAA GCA TAT GTA ATA GT -365

AAA TCC TAA AAC TCT TTG CCA GAC TCA AAT TCC ACA AAT ACC TTC ATA TAA TGT ACC AAA TAT CT -300

CTT TTT CAA AGG TTA AAA CCA GAA TCT GGG TAA TCT CGT CAG TTA AAT TTC AAG GGA TAA GTA GA -235

TTA CTC TCA TAA GAG GGT GCT GGA GCT CGA GTG CAG TGC ATC ACA ATC CAC CCC AGT GAA TGC AT -170

CTG CTC TTC ATG CGT TTA GAC CAA TGT CAC GCA GCT AAA GAG GCG CCA AGA GAT GAT GAT ACC CA -105

TCT CAT AGG CTA CCT GCC TGC AGT GAC GAT ATA AAA GCC CTA GAA ATC ACT AGA AGG ATC ACT TT -40

*Egact2* G AGT AAG CAT ATA TTT TAC GTC GAA ACG GT

GGT TGA GTG CAG TAG AGA AGA CAA ATC CTT TGG TGA GCC **ATG** GCT GAA GAA ATA ACT **\*\*\*** CCT CT 23

GAA ACG TGG CAT TTG GAT TTT ACT CTT GCT AGC CTC TCG **ATG** ..G ..C ..G GAC ..C GCA G.. ..

TGT TGT GGA CAA TGG TTC GGG TAT GTG CAA GGC TGG CTT CGC TGG CGA TGA CTC CCC TCG CGC TG 83

G.. GA. A.. ... C.. C.. T.. ... .. A.. C.. ... T.. ... T.. C.. TG. T.. ... T.. C.

TTT TCC CTT CTC TCG TCG GTC GTC CAC GTC AGC AGA GCA TCA TGG TTG GCA TGG GCA ACA AAG AC 158

.C. ... .C. .A ... .G. ... ..A .A. .TC AGG .AG .G. ... ..T. ... .AC .A. ... ..

AGC TAC GTA GGT GAT GAG GCT CAA TCG AAA AGA GGC ATC CTT ACT CTC AAA TAC CCC ATT GAA CA 218

... ..C ..G ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C

CGC CAT CGT GAC CAA TTG GGA TGA CAT GGA GAA GAT CTG GCA TCA CAC CTT CTA CAA CGA ACT AC 283

... ..C ..G ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C

GTG TGG CGC CTG AGG AGC ATC CAG TCC TCC TCA CTG AGG CTC CAC TCA ATC CAA AAG CCA ATC GT 348

... ..C ..G ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C

GAG AAG ATG ACA CAA ATC ATG TTT GAG ACT TTC AA\* TGT CCG GGC GAT GTA TGT AGC TAT CCA GGC 413

... ..C ..G ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C

AGT GCT CTC GCT CTA CGC TTC CGG TCG TAC TAC GGG CAT TGT GCT CGA CTC GGG CGA CGG AGT GA 478

... ..C ..G ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C

GCC ACA CTG TAC CGA TCT ACG AGG GTT ACG CTC TAC CGC ACG CAA TTC TGC GGC TTG ATT TGG CT 593

C.. .T. ... .C. .C. ... ..A. ... .T. .G. .T. .T. .T. .C. ... .A. .T. ... .C. .A. .G

GGT CGC GAT CTC ACC GAC TGG CTA ACA AAG CTA CTG ACA GAG CGT GGC TAT GCA TTC ACC ACT AC 608

..C ..A ... T.A ..A ... CAC ..T GTC ... A.C A.. ..T ... ..C AAC ..T ..T ... ..

AGC GGA GCT GGA AAT CGT GCG AGA CAT CAA GGA GAA GTT GTG CTA TGT GGC ACT CGA CTT TGA GA 673

... A.. ..G C.. ... A.C T.. C.. ... A.. ... ..C. C.. ... C.. A.. ... ..T.. C.. .C

ACG AAA TGG CTA CCG CTG CCA CTA GCT CCT CTC TGG AGA AGA CTT ATG AAC TGC CCG ACG GTC AA 738

.G. ... .A TA. .GT .AA .TT ... .TG ..A T.T ... .AC GCT ... ..A. .T. ... ..

GTA ATC ACA GTT GGC AAC GAA CGT TTC CGT TGT CCT GAA GCC CTC TAT CAA CCC AGT TTC CTC GG 803

C.G ..T ..C A.. ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C

TCT GGA GTG CAA TGG TAT CCA CGA GAC TAC CTA CAA CTC CAT CAT GAA GTG CGA TCT CGA CAT CA 868

... A.. AGC A.C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C

GGA AGG ACC TCT ATT CAA ACG TGG TCT TGT CTG GTG GAT CCA CCA TGT ACC CTG GTA TTG CTG AC 933

.A. .A. ... .A. ... .C. ..A CA. .GC .C. .G. ... .T. ... .T. ... T.. AG. .C. ... .A. .A

CGT ATG AAC AAG GAC CTC ACT GCC CTC GCG CCA ACC ACC ATG AAG ATC AAG ATC ATT GCT CCA CC 998

... ..C.G CG. ..G A.T T.G T.T ..A ..A ..G ..A ..A G.. ... ..G. ..T GC. ... ..

GGA ACG CAA ATA CTC TGT CTG GAT TGG TGG TTC CAT CCT GGC CTC ATT GTC CAC TTT CCA ACA GA 1063

T.. ... ..G.. ... C.. G.. ... ..T.. T.. T.. .C. T.. ... C.. ... G.. ..

TGT GGA TCA CCA AAC AGG AGT ACG ACG AGT CCG GAC CCA GCA TTG TTC ATC GCA AAT GCT TCT **AA** 1128  
... ..T .G. .GG T.. .A. ... .G. .AA T.. .T. ... .T. ... .A. .C. .A. ... .T. .T. ..

ATC TAC CCT CTT CTC CCC TTG TCT TTT TGT CTG TTT CTT GCC TCC AAA TTA TTC CAA TAA ATT TA 1193  
CTA ATC CGC GGC TCA TCT TTC CTC CCA TGT TAT TTC GCA CCG TCT GTA TGG TCA GTA AAT AAA TG

CTT ACA TGA ACG TCA AGA ATT TCT ATT TTA AAG GTT AAG GAC GAT TTA CAC CAA GGG TTA ATC TG 1258  
ATC AAA CTA AGC CTC GTT TTT GGC TTG CAA ATA TCC ATT CTA CCT GTT ATT TGT TTG TTA CCG GC

AAA ATA TGG CGT TCA CAA TCT CCA ATT TGA CGT GTC TTT TTG TCT AAG ACT AAG TCA CCT TTG CC 1323  
TCA GAA AGG TGA GGA TAG TCA ATC GAC CCC CGC AGA AGT ATG GAA AAA GTG GTG GTA GTA CCG CA

TTA CCA AAT TTT GGT TGT CAT TCT CGT GGC GTG TTA CGA TTT ATT AAC GAT TCC CTA CAT TAG TT 1388  
TTG AGG TGA AGG TAG CAT TTG CAC GTA GTT TTG CGT TTC ATC ATC C== == == == == == ==

ATT TTG TAA TAA GCT T 1404  
== == == == == =

b)  
gtagttggataggtaggcagtggtttcagccgcaccggaactggtaccaactagtggaaccaattt  
tctcaataagagacagaaatggtttgctctcatgcactaaatgtaggtgaagaagtccgcttt  
tcatctaactagataggcatgattagtggtgagtcagtctctctttagagtcgacctctgag  
ggcagcttttcattttcgccctgtgacaactgacattccgaaataatctttgcgcaacaagcac  
taatttcattagaacatatcaattgtgattaccaggataaaccttttgcaccgacaatgctta  
ctttgacttccccgtcagtagggtgtacagagaaactcaaaagacatatttaaaaatttagtg  
ttggcagtcctatccttccctattcgtcctggcggtcttcttaattccaacagtaaatgcata  
catgctgggtcaacacaaattacttctgtccataatattcagtagatgacagaatctctttctc  
cctaatacggcgacatttatgtcccctttgaatgggtcctttaagtggtaaataaagcatattaa  
atttcag

**Şekil 2.9.** a) *Egact1* ve *Egact2* aktin genlerinin gen bölgelerinin nükleotid dizisi. İki gen arasında homoloji gösteren nükleotidler nokta ile gösterilmiştir. ATG ve TAA kırmızı renkte gösterilmiştir. Mavi renkte görülen diziler ise poliadenilasyon sinyalleridir. Nükleotid eklenmeleri \* ile gösterilmiştir. 1 nolu nükleotid, *Egact1* dizisinin ATG başlama kodonunun A nükleotidi olarak kabul edilmiştir. B) *Egact2* aktin geninin intron bölgesinin nükleotid dizisi. İtron bölgesinin gen içindeki pozisyonu ise ok ile gösterilmiştir (Silva ve ark 1993).

*Egact1* MAEEITP-LVVDNNGSGMCKAGFAGDDSPRAVFPSPVGRPRQOSIMVGMGNKDSYVGDEAQS 60  
*Egact2* ..D.D.AA..I.....A.....I.....H.GV.....Q.....

KRGILTLKYPiEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMT 120  
.....

QIMFETFNVRAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSDGVSHTVPIYEGYALPHAILRLDL 180  
.....CP.....V.....T.....

AGRDLTDWLTKLLTERGYAFTTTAELEIVRDIKEKLCYVALDFENEMATAATSSSLEKTY 239  
.....H.V.IM.....N.....R..A.....Q..I.STS.AI..RS.

ELPDGQVITVGNFRFCPEALYQPSFLGLECNHETTYNSIMKCDLDIRKDLYSNVVLS 299  
.....L..I.....F..G.....AT.....V.....T...

GGSTMYPGIADRMNKDLTALAPTMMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWITKQ 359  
.....FQ...E..QREISS.....V..R.A.....S.V

EYDESGPSIVHRKCF 374  
..E.I.....

**Şekil 2.10.** *Egact1* ve *Egact2* aminoasit dizileri. Aynı aminositler noktalı gösterilmiştir (Silva ve ark 1993)

A<sub>5m</sub>↓

CARARTTTAAACACACGAAACAGCCACAAAGCTAGAGTGTGGGATACCAACGT -886

CAGTTATTTTTTAAACCTTAGGTACTTTTTTGCCAAATTAAGATATTTTA -836

Sp1 YY1

CTTACCTCAGAGCTTCTGCACCGRATACTGCACGTTACTTACAGTCACTC -786

YY1 YY1

AGTAATAAATCGTAGAGTAATTACATGGTATGCCACAGCCATGAATTGC -736

-717 ↓ YY1 Sp1

CAGAAGTTCGGGTGATTTCGTTTACATAAGGGGAAGTCTAAAGTCCGCAGTC -686

Apl Sp1

CCTAGACGTTGAGTAGTCCGCATATTTTCTGCTAGTGTGAAAAGGGGC -636

YY1 E-box Apl

GTGAGGCTGGTTTGCCTTGTGCCAATCTAACAGGTGACTACATGTGT -586

YY1 YY1

TCCTGATAACGACTGCCATGTTAACGAAATGTTGAGTAATAATTCCT -536

-525 ↓ YY1 YY1

GTGTAATACTTCATTACAAAGAGGGATGTTCACTACGAATCGACCTAAA -486

SRE

GTCTAATGCCTAGAAAACCTTTCCTTTATAAAGGAARCTTGTACTACT -436

E-box/YY1

ACCACCTATAATCTATCACAGGACTTTTTGTGCTTAATTCRAATAAGCAT -386

ATGTAATAGTAAATCCTAAAACCTTTGCCAGACTCAAATTCACAAATA -336

YY1 YY1

CCTTCATATAATGTACCAATATCTCTTTTCAAAGGTTAAAACAGAAAT -286

YY1

CTGGGTAATCTCGTCAGTTAAATTTCAAGGGATAAGTAGATTACTCTCAT -236

-233 ↓

AAGAGGCTGCTCGAGCTCGAGTGCAGTGCATCACAAATCCACCCAGTGAA -186

E-box

TGCATCTGCTCTTCATGCGTTTAGACCAATGTCCAGCAGCTAAAGAGGCG -136

YY1 YY1 -100 ↓

CCAAGAGATGATGATACCATCTCATAGGCTACCTGCCTGCAGTGACGATA -86

TFIID

TAAAAGCCCTAGAAATCACTAGAAGGATCACTAGAAGGATCACTTTGGTT -36

-14 ↓ +1

GAGTGCAGTAGAGAAGCAAATCCTTTGGTGAGCCATGCTGAAGAAATA +15

ACTCCTCTTCTTGTGGACAATGGTTCGGGTATGTCCA

B<sub>5m</sub>↓ YY1 YY1 SRE YY1

CTCATATTGAAGAGGGCATTTTATGTGGTCTTAATCCCTTGCATGRAGAAC -475

TATAGAAGTGGTGTATTCTCTGTATAATTAAGTGGATAGAGTTATTGACG -425

-387 ↓ YY1/SRE

GAACAAGATCCACTGCACCCTTCAGAGGTCCAGGCCACATATGATATCAGG -375

Sp1

ACAGCCCTCTTCTAAAATTAGCAACAAAAGAAATTTGTAACGAGACTTAC -325

↓-288

TACATCAAAGCTCTGAAAAAAGTCTTTAAACAATTAAGACGTAAAGCAT -275

YY1 poly-dT MRF-2

TATTACCTAAAAGTTCATTTCTTTCTTTTAAATAAAAGTCCCAA -225

Sp1 YY1

AAGTCTCGGTTTTACTTGAACGCCCTCAGGATGGTTAACACTCGAATTCC -175

YY1 Apl ↓-128

TCAACTAGGCATTTTGCAGCCACCTAGTCACTCAGGTAGTTTCCGACCCC -125

TTCGATGAGGTTAAAATCTCATCACTGACGACATCAACGGAAAGAAATTG -75

TFIID YY1/E-Box

CGGACTTGTAAAGCAATATTTTACGTCGAAACGGTGAACGTGGCCATTG -25

+1

GATTTTACTCTTGTAGCCTCTCGATGGCCGACGAGGACACCAGCTCT +26

GGTGATAGACAACGGCTCTGGTAT

↑+50

Şekil 2.11. *E. granulosus* *Egcl* (A) ve *EgactII* (B) aktin genlerinin 5' uç bölgelerinin nükleotid dizileri. Başlama kodonu (ATG) +1 olarak gösterilmektedir. Diğer numaralar da buna göre düzenlenmiştir. Transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri altı çizili olarak gösterilmektedir. Çoklu (dT) alanları ise altı noktalı gösterilmiştir. Kodlama bölgeleri, altı çift çizgili olan ATG başlama kodonundan başlayarak koyu karakterli harflerle yazılmıştır (Gimba ve ark 2000).

### 3. MATERYAL ve METOD

#### 3.1. Materyallerin Temin Edilmesi ve Depolanması

*E. granulosus* kistleri, Konya Konet (Konya Et ve Balık Kurumu) mezbahasında ve Konya Karapınar mezbahasında kesimi yapılan koyun ve sığırların karaciğer ve akciğerlerinden ve Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Cerrahi Anabilim dalında yapılan operasyon sonrasında insan karaciğerinden temin edildi. İn vitro kültür çalışması ile moleküler çalışmaların bir bölümü Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Kombassan Araştırma ve Uygulama Merkezinde gerçekleştirildi. Moleküler çalışmaların bir bölümü ise Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalında gerçekleştirildi.

Mezbahadan alınan kistli organlar birkaç saat içerisinde laboratuvara getirildi. Protoskoleksler kistlerden steril enjektör yardımı ile, germinatif membranlar ise steril pens yardımı ile toplanarak 50 ml.'lik steril falkon tüplerinde biriktirildi. Toplanan protoskoleksler 20-30 dk. oda ısısında bekletilerek dibe çökmesi sağlandı. Bu süre sonunda tüplerin protoskoleks içermeyen üst kısmındaki kist sıvısı steril pastör pipet yardımıyla atıldı. Akabinde tüplerin dip kısmında bulunan protoskolekslerin yıkama işlemine geçildi. Bu esnada germinatif membranların toplandığı tüpler, ara sıra spatula yardımıyla karıştırıldı veya nazikçe santrifüje tabi tutuldu. Böylece germinatif membrana bağlı protoskolekslerin kist sıvısına dökülmeleri sağlandı. Daha sonra dip kısımdaki protoskoleksleri dağıtmadan üst kısımdaki germinatif membranlar temiz bir tüpe aktarıldı. Altta biriken protoskoleksler steril pastör pipeti ile diğer protoskoleks tüpüne ilave edildi.

Protoskolekslerin ve germinatif membranın yıkama işlemleri Hank's solüsyonu veya fosfat tampon solüsyonu (Phosphate buffer saline, PBS) ile yapıldı. Yıkama işleminde, protoskolekslerin ve germinatif membranların üzerine 10-15 ml. yıkama solüsyonu ilave edilip karıştırıldıktan sonra 15-20 dk. bekletilerek üstteki sıvı kısım atıldı. Bu işlem 2-3 kez tekrarlandıktan sonra protoskoleksler ve germinatif membranlar pepsin ile muamele edildi. Materyaller, ortamdaki artık maddelerin ve protoskoleksleri germinatif membrana bağlayan bağlantı sapsularının parçalanması amacı ile pepsin solüsyonunda 37 °C' de 40-60 dk inkübe edildi. Bu işlem sonrasında tekrar aynı yıkama solüsyonu ile 2-3 kez yıkama işlemi yapıldı. Böylece materyaller pepsinden tamamen arındırıldı. Yıkama işlemleri tamamlanan protoskolekslerin bir kısmı kültür için ayrılırken kalan protoskoleksler ve germinatif membranlar daha sonra RNA ve DNA izolasyonunda

kullanılmak üzere -80° C’ de saklandı. Bunun için 1 ml’lik ependorf tüpler kullanıldı. Depolanan materyallerde fazla sıvı kalmamasına dikkat edildi.

### **3.2. Protoskolekslerin İn Vitro Kültürü**

Yıkama işlemi tamamlanan protoskoleksler in vitro kültür için inverted mikroskop altında incelendi. Bu incelemede şu kriterlere dikkat edildi; protoskolekslerin normal morfolojik görünümüne (tegümentin düzgünlüğü), genel kontraktıl hareketlere ve alev hücresi aktivitesine sahip olması ve eosin-Y boyası ile %90-95 oranında canlılığın tespit edilmesi (Smyth ve Davies 1974, Howell 1986, Smyth 1990, Gordo ve Bandera 1997). Besiyeri içeren her bir kültür kabına (flask) 2000-2500 protoskoleks ilave edildi. Flasklar 37° C’ de inkübasyona bırakıldı. Besiyerleri ortalama on günde bir değiştirildi. Besiyeri değişimi yapılırken dik duruma getirilen flasklar 15-20 dk. bekletildi. Daha sonra üst kısımdaki eski besiyeri steril pastör pipet yardımı ile alınarak yerine taze besiyeri eklendi. Tüm işlemler steril şartlarda, biyolojik emniyet kabininde (laminair flow) ve alev yanında gerçekleştirildi. Kültür süresince protoskolekslerin gelişimi inverted mikroskopla takip edilerek görüntülendi.

#### **3.2.1. Solüsyonlarının hazırlanması**

##### ***Hank’s solüsyonu:***

Hank’s salt base (01-085-1A, Biological Industries).....100 ml.  
Gentamisin.....0.2 ml.

Solüsyon hazırlandıktan sonra +4°C’ de saklanır.

***Fosfat tampon solüsyonu (Phosphate Buffer Saline, PBS):*** (02-023-1A, Biological Industries)

##### ***Pepsin solüsyonu (%0 2’ lik):***

Hank’s salt base veya fosfat tampon solüsyonu.....100 ml.  
Pepsin ( P700, Sigma).....0.2 gr.

Solüsyon hazırlandıktan sonra +4°C’ de saklanır.

##### ***Besiyerinin hazırlanması:***

RPMI 1640 (0.1-106-1A, Biological Industries).....80 ml.



Foetal calf serum (0.4-001-1A, Biological Industries).....20 ml.

Penisilin (500 i.u./ml)-streptomisin (500µm/ml)(P-4333, Sigma).....1 ml.

İyice karıştırıldıktan sonra steril flaskların her birine 20 ml. olacak şekilde dağıtılır ve -20°C’ de saklanır.

### **3.2.2. Protoskolekslerin toplanması ve kültüre edilmesinde gerekli olan gereçler:**

Mikropipet (Medispec-plus), santrifüj (Nüve, NF 1000R), karıştırıcı (Nüve, NM 110), manyetik karıştırıcı (electro-mag), bünzenbek, hassas terazi (Sartorius), pH metre (InoLab), buzdolabı (Arçelik, 5040 NF), derin dondurucu (Nuair, -85°C Ultralow Freezer), biyolojik emniyet kabini (laminair flow) (Nuair, Class II), koruyucu gözlük, inkübatör (Nüve Jouan, EC 150), inverted ışık mikroskobu (Olympus CK2), fotoğraf makinesi

### **3.3. Protoskolekslerin ve germinatif membranın morfolojisi ve nükleer organizasyonu**

#### **3.3.1. Protoskolekslerin ve germinatif membranın kültüre edilmesi ve fiksasyonu**

Protoskoleksler toplanıp yıkama solüsyonları ile yıkandıktan sonra 4ml besiyeri bulunan tüplerin her birine 100-200 protoskoleks olacak şekilde ekim yapıldı. Tüpler 37 °C etüvde 16 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında 1500 devirde 7 dk. santrifüj edildi. Dibe çöken protoskolekslere dokunmadan üst kısım atıldı. Protoskolekslerin üzerine 2 ml hipotonik ilave edildi ve 1 saat 37 °C etüvde inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda tüpler 1500 devirde 7 dk. santrifüj edildi. Bunu takiben protoskoleksler 3 kez fiksatiften geçirilerek tespit edildi. Örnekler lamlara damlatıldıktan sonra kurumaya bırakıldı. Preparatlar çekirdek boyası olan %5 Giemsa boyası ile boyandı.

Germinatif membranlar ise yıkama solüsyonunda yıkanmadan önce bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldı ve aynı işlemler tabii tutuldu.

#### **3.3.2. Solüsyonların hazırlanması**

##### ***Besiyerinin hazırlanması***

RPMI 1640 (0.1-106-1A, Biological Industries).....100 ml.

Foetal calf serum (0.4-001-1A, Biological Industries).....20 ml.

Fitohemaglutinin(12-006-1H, Biological Industries)..... 2 ml

Penisilin (500 i.u./ml)-streptomisin (500µm/ml)(P-4333, Sigma).....1 ml.

İyice karıştırıldıktan sonra steril tüplerin her birine 4 ml. olacak şekilde dağıtılır ve -20°C' de saklanır.

### **Hipotonik (0.075 M)**

KCl (31,012-3, Sigma).....0.559 gr

dH<sub>2</sub>O.....100 ml

### **Fiksatif (3:1)**

Metanol (K31251807-242, Merck).....30 ml

Asetik asit (K33545356-430, Merck).....10 ml

Taze hazırlanır.

### **%5 Giemsa boyası**

Giemsa (Gibco).....4 ml

Sörensens tamponu.....80 ml

## **3.4. Nükleik Asitlerin İzolasyonu**

### **3.4.1. RNA İzolasyonu**

Konya ve çevresi ile Karapınar olmak üzere farklı bölgelerden toplanan koyun tutulumlu 38 kist ve insan tutulumlu 1 kistden elde edilen protoskolekslerden ribonükleik asit (RNA) izolasyonu gerçekleştirildi.

RNA eldesine geçmeden önce ortamın sterilizasyonu ve malzemelerin RNaz'lerden uzaklaştırılması çalışmaları yapıldı. Özellikle RNA çalışılırken RNA'ların RNaz'lar tarafından yıkılmaması için bir çok önlem alınması gerekmektedir. RNaz'ların RNA'ları parçalamak için kofaktöre ihtiyaç duymamaları ve havada, solüsyonlarda, araştırmacının cildinde veya tükrüğünde bol miktarda bulunmaları RNA izolasyonunun güçleşmesine yol açmaktadır. Bu nedenle RNA ile çalışırken mutlaka eldiven giymek ve sık sık eldiven değiştirmek RNaz'lerden korunmak için en önemli önlemdir. Ayrıca araştırmacının çalışırken mümkün olduğunca konuşmaması önerilir. Üstelik bu enzimin inaktive edilmesi çok zor olduğu için tüm solüsyonlar, plastikler ve cam malzemeler RNaz inhibitörleri ile muamele edilmeli, otoklavlanmalı ve diğer laboratuvar malzemelerinden ayrı muhafaza edilmelidirler. Diethyl pyrocarbonate (DEPC) kullanılan en yaygın RNaz inhibitörüdür.

DEPC çok toksik olduğu için çeker ocakta çalışılır ve tris solüsyonlarında asla kullanılmaz.

### 3.4.1.1. Solüsyonların ve malzemelerin hazırlanması ve DEPC ile muamele edilmesi

#### **DEPC' li su:**

dH<sub>2</sub>O.....1000 ml.

DEPC (15,922-0, Aldrich-Sigma).....1 ml.

Oda ısısında 2 saat karıştırılır ve 30 dk. otoklavlanır. RNaz'sız olarak etiketlenilip özel çekmeceye kaldırılır.

#### **Pipet uçları ve ependorf tüpler:**

Bir gece DEPC' li suda bırakılır. Ertesi gün sıvı boşaltılarak 30 dk. otoklav yapılır.

#### **Makas, cam şişe, homojenizatör başlığı:**

İki-üç kez DEPC' li sudan geçirilir. Ve temiz kağıt peçete ile kurulanır.

#### **Elektroforez jel tankları ve tarakları:**

NaOH/SDS ile 15 dk. muamele ettikten sonra DEPC' li suda 2 saat-bir gece bekletilir.

#### **Etanol (% 75) :**

%96 etanol..... 78 ml

Su (DEPC' li) ..... 100 ml' ye

tamamlanır.

RNaz'sız olarak etiketlenilip özel çekmeceye kaldırılır.

#### **0.2 M NaOH:**

NaOH (1310-73-2, Sigma) ..... 4 gr

Su (DEPC' li) ..... 500 ml' ye

tamamlanır. RNaz'sız olarak etiketlenilip özel çekmeceye kaldırılır.

#### **%20 SDS:**

SDS (0227-100G, Ambresco) ..... 20 gr

Su (DEPC' li) ..... 90 ml

SDS iyice çözüntüncüye kadar 68°C' de ısıtılır. Toplam hacim distile su ile 100 ml' ye tamamlanır. RNaz'sız olarak etiketlenir ve özel çekmeceye kaldırılır.

### **0.8 M Sodyum sitrat**

Sodyum sitrat (6132-04-3, Sigma) ..... 23.52 gr

Su (DEPC' li) ..... 100 ml.'ye

tamamlanır. RNaz'sız olarak etiketlenir ve özel çekmeceye kaldırılır.

### **1.2 M Sodyum klorür**

Sodyum klorür (7647-14-5, Sigma) ..... 7.012 gr

Su (DEPC' li) ..... 100 ml.'ye

tamamlanır. RNaz'sız olarak etiketlenir ve özel çekmeceye kaldırılır.

### **3.4.1.2. Total RNA'nın izolasyonu**

Protoskoleks ve germinatif membranlardan total RNA izolasyonu TRIzol reagent (15596, Gibco BRL) kullanılarak üretici firmanın önerdiği yöntemle gerçekleştirildi. Bu yöntem Chomczynski ve Sacchi (1987) tarafından geliştirilen tek basamakta RNA izolasyon metodunun modifiye edilmiş şeklidir. TRIzol reagent guanidine isothiocyanate ve fenol içeren oldukça toksik bir solüsyondur. Bu nedenle trizolle çalışılırken çeker ocakta çalışılması, mutlaka eldiven ve koruyucu gözlük takılması gerekmektedir.

#### **1. Homojenizasyon**

RNA izolasyonunda materyalin hızlı ve etkin bir biçimde homojenize edilmesi önemlidir. Bu çalışmada havan ve tokmak kullanılarak protoskolekslerin homojenizasyonu gerçekleştirildi. Homojenizasyona başlamadan önce havan, tokmak ve spatula dH<sub>2</sub>O ile yıkandıktan sonra 3 kez DEPC'li sudan geçirilerek temiz kağıt havlu ile kurulandı. Aliminyum folyoya sarılan bu malzemeler -80°C dondurucuda 30 dk-1 saat bekletildi. Daha sonra oldukça hızlı bir şekilde protoskolekslerin çözünmesine izin vermeden soğuk havanda tokmakla ezmek suretiyle protoskoleksler pudra haline getirildi. Pudra halindeki protoskoleksler spatula yardımıyla temiz ependorflara alındı ve derhal üzerine TRIzol solüsyonu eklendi (100 µl protoskolekse 1 ml trizol olacak şekilde). Oda ısısında 5 dk bekletilerek nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrılması sağlandı.

Germinatif membranların homojenizasyonu da aynı şekilde yapıldı. Homojenizasyon sonrasında her 50-100 mg. dokuya 1 ml. trizol ilave edilerek izolasyona devam edildi.

## **2. Faz oluşumu**

İnkübasyon sonrasında tüplere 200 µl. kloroform ilave edilir (1 ml trizol için 0.2 ml. kloroform). Tüpler hızlı bir biçimde 30 sn. elle sallanır ve 2-3 dk daha oda ısısında tutulur. İnkübasyondan sonra 10000 devirde 15 dk +4 °C'de santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında tüplerde 3 faz gözlenir. Bunlar; en üstte RNA' nın bulunduğu renksiz aqua faz, altta kırmızı renkte fenol-kloroform faz ve iki fazın ortasında bir ara fazdır.

## **3. RNA presipitasyonu**

Aqua faz dikkatlice temiz bir tüpe alınır. Organik faz ise DNA izolasyonu için +4°C' de saklanır. RNA'nın bulunduğu aqua fazın üzerine 500 µl. isopropil alkol ilave edilir (Başlangıçtaki her 1 ml trizol için 0.5 ml isopropil alkol). Tüpler 10-15 dk oda ısısında bekletilir. Sonra 10000 devirde 10 dk +4 °C' de santrifüj edilir. Santrifüj sonrası tüpün dibinde jelimsi RNA pelleti gözlenir.

Germinatif membrandan RNA izolasyonunda ise membranın yoğun polisakkarit yapısından dolayı ek işlemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Başlangıçtaki her 1 ml. trizol için 0.25 ml. isopropil alkol ve 0.25 ml. yüksek tuz presipitasyon solüsyonu (0.8 M sodyum sitrat ve 1.2 M sodyum klorür ) ilave edilir.

## **4. RNA' nın yıkanması**

Pelletin üzerindeki süpernatant dikkatlice atılır ve pelletin üzerine 1-2 ml. %75' lik alkol ilave edilerek bir kez yıkanır (Başlangıçtaki bir 1 ml trizol için en az 1 ml %75' lik etanol). Vorteks yapılır. 4000 devirde 5 dk. +4 °C'de santrifüj edilir.

## **5. RNA' nın çözünmesi**

RNA pelleti yaklaşık 5-10 dk kurumaya bırakılır. Pelletin tamamen kurumasına asla izin verilmez. RNA pelletin üzerine 50-100 µl DEPC' li su ilave edilir. Gerekirse hafifçe pipetaj yapılır. Tüpler 10 dk 55-60 °C'de inkübe edilir. Tamamen çözünen RNA - 80°C' de depolanır.

### 3.4.2. DNA İzolasyonu

#### 3.4.2.1. DNA izolasyonu için gerekli solüsyonların hazırlanması

##### *% 10 etanolde 0.1 M sodyum sitrat*

Sodyum sitrat (6132-04-3, Sigma).....	2.941 g
Etanol.....	10 ml
dH <sub>2</sub> O.....	90 ml

Oda ısısında saklanır.

##### *%75 etanol*

%96 etanol.....	78 ml
dH <sub>2</sub> O.....	100ml'ye

tamamlanır. Oda ısısında saklanır.

##### *8 mM NaOH*

NaOH (36717-6, Sigma-Aldrich).....	0.032 g
H <sub>2</sub> O.....	100ml'ye

tamamlanır. Oda ısısında saklanır

##### *0.1 M HEPES*

HEPES (101926, ICN Biomedicals Inc).....	2.383
H <sub>2</sub> O.....	100 ml' ye

tamamlanır. Oda ısısında saklanır.

#### 3.4.2.2. Fenol faz ve interfazdan DNA izolasyonu

Protoskoleks ve germinatif membran DNA'sı, RNA izolasyonundan kalan ve +4 °C 'de depolanan interfaz ve fenol fazdan elde edilir.

##### **1. DNA presipitasyonu**

Fenol faz ve interfazın üzerine 300µl. etanol eklenir (Başlangıç homojenizasyonunda kullanılan 1ml trizol reagent için 0.3 ml etanol). Tüpler alt üst edilerek tamamen karıştırılır ve oda ısısında 2-3 dk inkübe edilir. Daha sonra 1500 devirde 5 dk. +4 °C'de santrifüj edilir ve DNA pelleti gözlenir. (DNA presipitasyonuna

başlamadan önce fenol faz-interfazın üzerinde aqua fazın kalıp kalmadığı kontrol edilir. Aqua faz varsa uzaklaştırılır. Bu aşama DNA' nın kalitesi için önemlidir.)

## 2. DNA' nın yıkanması

DNA pelleti iki kez %10' luk etanoldeki 0.1 M sodyum sitrat solüsyonunda yıkanır. Her yıkamada DNA pelleti yıkama solüsyonunda 30 dk bekletilir. Bu sürede tüpler periyodik olarak alt üst edilir. İnkübasyon sonrasında tüpler 1500 devirde 5 dk 4-25 °C 'de santrifüj edilir. Pellet büyükse ek yıkama yapılır.

## 3. DNA' nın çözünmesi

DNA pelletinden etanol uzaklaştırılır. Pellet havada kurutulur. 100-200 µL. 8 mM NaOH ilave edilir ve nazikçe pipetaj yapılarak DNA' nın çözünmesi sağlanır. DNA' nın uzun süreli depolanması için örneklerin HEPES ile pH 7-8'e ayarlanması gerekmektedir. Bunun için 1 ml 8 mM NaOH için 117 µl. 0.1 M HEPES ilave edilir. pH' sı ayarlanan DNA örnekleri +4 °C'de veya -20 °C'de saklanabilir.

## 3.5. Reverse Transcriptase - Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

mRNA' dan reverse transcriptase enzimi ile önce cDNA'nın sentezlenmesi ve oluşan cDNA' nın amaca uygun primerler kullanılarak PZR tekniği ile çoğaltılması esasına dayanır. RNA ile yapılan tüm deneylerde olduğu gibi RNaz kontaminasyonunu engellemek için gerekli önlemler alınmalıdır. Bu teknikte kaliteli ve DNA ile kontamine olmamış RNA ile çalışmak oldukça önemlidir. Bu nedenle RNA örnekleri önce DNaz ile muamele edildikten sonra RT-PZR çalışmasına geçilir.

### 3.5.1. Örneklerin DNaz enzimi ile muamele edilmesi

RNA örnekleri muhtemel DNA kontaminasyonuna karşı RT-PZR işlemine geçmeden önce DNaz enzimi ile muamele edildi. RNA örneklerinden 10 µl. temiz tüplere alındı. Üzerine 3 µl. DNaz (1 u/µl,1000 u)(EN0521, Fermentas) ilave edilerek 37 °C' de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra RT işlemine geçildi.

### 3.5.2. Reverse transcriptase (RT) enzim reaksiyonu

1. RNaz' sız tüp içine aşağıdaki örnekler konur.

RNA ..... 10 µl.

Oligo (dT) primer (70 µM)(0-4387, Sigma) .....2 µl.

Dikkatlice karıştırılır ve 3-5 sn santrifüj edilir.

2. 70 °C sıcaklıkta 5 dk bırakılır. Derhal buza alınır.

3. Buz üzerinde aşağıdaki reaktifler konur.

5x reaksiyon tamponu ((M-MuLV RT, 1201, Fermentas).....	8 µl.
dNTP(2mM) (R0241, 8001,Fermentas).....	2 µl.
dH <sub>2</sub> O.....	19 µl.

4. Karışım 37 °C' de 5 dk bırakılır.

5. Karışıma, Reverse transcriptase (M-MuLV, EP0441, 0623, Fermentas)....1 µl ilave edilir.

6. 42 °C' de 60 dk inkübe edilir. 70 °C'de 10 dk inkübe edilerek enzim inhibe edilir.

7. İnkübasyon sonrasında tüpler buza alınır ve PZR yapıncaya kadar buzda bekletilir.

### 3.5.3. PZR reaksiyonu karışımının hazırlanması

1. Reaksiyon karışım oranları her bir örnek için toplam 15 µl. olacak şekilde aşağıdaki gibi hazırlandı.

dH <sub>2</sub> O.....	12.795 µl.
10x tampon (7300, Fermentas).....	1 µl.
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)( 5300, Fermentas).....	0.4 µl.
dNTP (10 mM)(D-7295, Sigma).....	0.6 µl.
İleri primer (MWG-Biotech.AG).....	0.08 µl.
Geri primer (MWG-Biotech.AG).....	0.08 µl.
Taq polimeraz enzimi (5µ/ µl, 500 u)( 4617, Fermentas).....	0.1 µl.

2. Tüplerin her birine 10 µl cDNA ilave edildi.

3. Tüpler PZR cihazına yerleştirilerek programlandı.

### 3.5.4. PZR reaksiyon koşulları

İlk denatürasyon .....	94 °C.....	5 dk.
Denatürasyon.....	94 °C.....	30sn.
Bağlanma.....	59.0°C (act 1).....	30sn.
	59.3 °C (act 2)	
Uzama.....	72 °C.....	30sn.
35 TEKRAR		
Son uzama .....	72 °C.....	2 dk.



### 3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu – Restriksiyon Enzim Kesimi (PZR-RFLP)

Hedeflenen gen bölgesinin uygun primerlerle çoğaltılması ve akabinde kesim enzimleri ile muamele edilerek gen çok yapılılığının (polimorfizm) tespit edilmesi tekniğine PZR-RFLP (PCR-RFLP; Polimerase chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism) tekniği denir. Bu çalışmada farklı bölgelerden temin edilen 39 skoleks DNA'sının *EgactI* ve *EgactII* gen bölgeleri PZR tekniği ile çoğaltıldı. Daha sonra her iki gen bölgesinin PstI, AluI ve TaqI enzimleri ile kesimleri yapıldı. Kesimi yapılan örnekler elektroforezde yürütülerek UV görüntüleme cihazında görüntülendi.

#### 3.6.1. *EgactI* ve *EgactII* genlerinin PZR ile çoğaltılması

##### 3.6.1.1. PZR reaksiyonu karışımının hazırlanması

Reaksiyon karışım oranları her bir örnek için toplam 100 µl. olacak şekilde aşağıdaki gibi hazırlandı.

dH <sub>2</sub> O.....	70.45 µl.
10x tampon (7300, Fermentas).....	10 µl.
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)( 5300, Fermentas).....	4 µl.
dNTP (10mM)(D-7295, Sigma).....	6 µl.
İleri primer (MWG-Biotech.AG).....	0.8 µl.
Geri primer (MWG-Biotech.AG).....	0.8 µl.
Taq polimeraz enzimi (5µ/ µl, 500 u)( 4617, Fermentas).....	1 µl.

2. Tüplerin her birine 7.5 µl DNA ilave edildi.

3. Tüpler PZR cihazına yerleştirilerek programlandı.

##### 3.6.1.2. PZR reaksiyon koşulları

İlk denatürasyon .....	94 °C.....	5 dk.
Denatürasyon.....	94 °C.....	30sn.
Bağlanma.....	59.0°C (act 1).....	30sn.
	59.3 °C (act 2)	
Uzama.....	72 °C.....	30sn.
	35 TEKRAR	
Son uzama .....	72 °C.....	2 dk.



### ***Reaksiyon karışımının hazırlanması***

dH <sub>2</sub> O.....	1.9 µl
Enzim tamponu.....	2.5 µl
Enzim (ERTAQ100,Qbiogene).....	0.6 µl
PZR ürünü.....	20 µl

Toplam hacim 25 µl. olacak şekilde tüpler hazırlandı. Tüpler 65 °C’de bir saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında 85 °C’ de 20 dk. bırakılarak enzim inaktive edildi.

### **3.7. Jel Elektroforezi**

#### **3.7.1. Jelin hazırlanması ve örneklerin jele yüklenmesi**

##### ***Jelin Hazırlanması (%2)***

Agaroz (A-6877, Sigma).....	2 gr.
1xTAE.....	100 ml.

Mikrodalga fırında agaroz iyice eriyinceye kadar tutulur. Daha sonra jelin sıcaklığı 60 °C’ ye düşünce 4 µl. ethidium bromur (1239-45-8, Sigma) eklenir. Bu işlem ethidium bromur kanserojenik olduğu için çeker ocakta yapılmalıdır. Jel tanka dikkatlice dökülür ve varsa hava kabarcıkları uzaklaştırılır. Jel 30 dk. donmaya bırakılır.

##### ***Örneklerin jele yüklenmesi***

6xYükleme boyası (R0611, 9701, Fermentas).....	4 µl.
DNA .....	10 µl.

Bantların büyüklüklerini tespit etmek için, ticari olarak alınan ve büyüklüğü bilinen bir marker kullanılır. Bu çalışmada marker olarak pUC 18 DpnI kesimi (D6683, Aldrich-Sigma) ve pUC 18 MspI kesimi (D4797, Aldrich-Sigma) kullanıldı.

##### ***Örneklerin jelde yürütülmesi***

Örnekler jelde 100 volt (V)’ da 1-1.5 saat yürütülür.

##### ***Görüntüleme***

Jel, UV görüntüleme cihazında değerlendirilir ve fotoğraflanır.

### 3.7.2. Jel elektroforezde kullanılan solüsyonların hazırlanması

#### 50xTAE Tamponu

Tris baz (194856, ICN Biomedicals Inc).....	24.2 gr
Glasiel asetik asit (K31358056-243, Merck).....	5.71 ml
0.5 M EDTA (pH 8).....	10 ml
Su (DEPC'li).....	100 ml'ye

tamamlanır.

#### 1xTAE tamponu

50xTAE tamponu.....	10 ml
Su (DEPC' li).....	490 ml

#### 0.5 M EDTA

EDTA2H <sub>2</sub> O (K31678818-308, Merc).....	18.6 gr
Su (DEPC' li).....	80 ml
NaCl (7647-14-5, Sigma) .....	2 gr

Karıştırılır ve NaOH ile pH 8' e ayarlanır. Otoklavla steril edilir.

### 3.7.3. Nükleik asitlerin izolasyonu, RT-PZR, PZR-RFLP ve elektroforez için gerekli olan gereçler

Mikropipet (Eppendorf), karıştırıcı (Nüve , NM110), soğutmalı santrifüj (Nüve, NF 1000 R), hassas terazi (Sartorius), pH metre(InoLab), manyetik karıştırıcı, su banyosu (Electro-mag), mikrodalga fırın (Arçelik, MD 581), derin dondurucu (Nuair, -85°C ultralow freezer), elektroforez güç kaynağı ve tankı (E-C Apparatus Corporation, EC105), PZR cihazı, biyolojik emniyet kabini (Nuair, classII), çeker ocak (sanayi yapımı), koruyucu gözlük , UV görüntüleme cihazı, fotoğraf makinesi .

### 3.8. Primer Tasarımı

*E. granulosus* parazitinin *EgactI* ve *EgactII* aktin gen ürünlerinin tespiti ve bu genlerdeki polimorfik yapının çalışılması amaçlandığı için bu genlerin nükleotid dizilerine uygun primerler dizayn edildi. *EgactI* ve *EgactII* aktin genlerinin nükleotid dizileri <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer> adresinden temin edildi. Her iki genin birbirine yüksek homoloji göstermeleri nedeniyle yanlış bağlanmalara yol açmamak için özellikle birbirine homoloji göstermeyen bölgelerden primer tasarımı yapılmaya çalışıldı. Şekil

3.1’de *EgactI* ve *EgactII* gen dizileri üzerinde primerlerin yerleşimi görülmektedir. Primer tasarımı yapılırken; ileri ve geri primerlerin en az 20 bç uzunluğunda olmasına, GC oranlarının %50’ nin üzerinde olmasına ve erime sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına dikkat edildi (Tablo 3.1). Primerlerin kendi içinde bağlanma yapması ve istediğimiz gen bölgesi dışında farklı bir bölgeye bağlanması gibi istenmeyen durumları önlemek için bu hususlar da dikkate alındı. Ayrıca her iki gen bölgesinin PZR ürünlerinin büyüklüğü farklı olacak şekilde tasarım yapıldı.

**Tablo 3.1.** Tasarımı yapılan *EgactI* ve *EgactII* gen primerleri

Gen	Primer(İleri primer (İP)) (Geri primer (GP))		Erime sıcaklığı (°C)	Ürün büyüklüğü (bç)
	5'→3'			
<i>EgactI</i>	İP	AAA TAC CCC ATT GAA CAC GG	57.3	487
	GP	CGG TAG CCA TTT CGT TCT CA	58.3	
<i>EgactII</i>	İP	GGC TCC ACT CAA TCC AAA AG	57.1	394
	GP	GCG TTC CAA AAT GGC ACT AG	58.1	

Primerler temin edildikten sonra primer optimizasyonu yapıldı. *EgactI* geni için 59.0 °C ve *EgactII* geni için 59.3 °C sıcaklığının ideal sıcaklık olduğu tespit edildi. PZR reaksiyonlarında primerlerin bağlanma sıcaklığı olarak bu sıcaklıklar kullanıldı.

*EgactI*:168 tgaggctcaatcgaaaagaggcatccttactctc**aaatacccattgaacaoggc**atcgt  
 227 ||||| || ||||||||||||||| |||||||||||||||||||||  
*EgactII*:61 tgaggcccagtcgaaaagaggcatcctcactctc**aaatacccattgaacaoggc**atcgt  
 120  
  
*EgactI*:228 gaccaattgggatgacatggagaagatctggcatcacaccttctacaacgaactacgtgt  
 287 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
*EgactII*:121 gaccaattgggatgacatggagaagatctggcatcacaccttctacaacgaactacgtgt  
 180  
  
*EgactI*:288 ggcgcctgaggagcatccagtcctcctcactgaggctccactcaatccaaaagccaatcg  
 347 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
*EgactII*:181 ggcgcctgaggagcatccagtcctcctcactg**aggtccactcaatccaaaagccaatcg**  
 240  
  
*EgactI*:348 tgagaagatgacacaaatcatgtttgagactttcaatgtccggcgatgtatgtagctat  
 407 |||||||||||||||||||||||||||| | ||||||||||||| ||  
*EgactII*:241 tgagaagatgacacaaatcatgtttgagactttcaactgtccggcgatgtatgtagccat  
 300  
  
*EgactI*:408 ccaggcagtgctctcgctctacgcttccggctcgtactacggcattgtgctcgactcggg  
 467 ||||||||||||| | ||||| || ||||||||| || | || || ||||| ||  
*EgactII*:301 ccaggcagtgctctcgttgtacgcctctggtcgtactactggagtcgtactggactctgg  
 360  
  
*EgactI*:468 cgacggagtgagccacactgtaccgatctacgagggttacgctctaccgcacgcaattct  
 527 ||||| |||| ||| ||||| || ||||||||| ||||| || || || || || |||||  
*EgactII*:361 tgacgggtgtagccatactgtcccactctacgaaggttatgacgcttctcatgccattct  
 420  
  
*EgactI*:528 gcggttgatttggtggtcgcatctcaccgactggctaacaaagctactgacagagcg  
 587 || ||||| || || || || || || || || || || || || || || || |||||  
*EgactII*:421 acgtcttgacttagcgggcccagatattaacagaccaccttgcaagatcatgactgagcg  
 480  
  
*EgactI*:588 tggctatgcattcaccactacagcggagctggaatcgtagcagacatcaaggagaagtt  
 647 ||||| || || || ||||| |||| ||||| | || ||||| ||||| || |  
*EgactII*:481 tggctacaactttactactacagcagagcgcgaaatagctcgcgacataaaggagaagct  
 540  
  
*EgactI*:648 gtgctatgtggcactcgactt**tgagaacgaaatgggtaccg**ctgccactagctcctctct  
 707 ||||| || ||||||||| || |||| | ||||| || | | ||||| || | |  
*EgactII*:541 ctgctacgtagcactcgatttcgagcaggaaatgataacgtcaactt**ctagtgccatttt**  
 600  
  
*EgactI*:708 ggagaagacttatgaactgcccagcggcagtaatacacagttggcaacgaacgtttccg  
 767 ||| ||||||||||||| || ||||| | || || ||||||||||||| |||||  
*EgactII*:601 **ggaacgct**cttatgaactgccagatgggtcaactgattaccattggcaacgaacgcttccg



(1)

tgaggctcaatcgaaaagaggcatccttactctcaaat**acc**ccattgaac**acgg**catcgt  
gaccaattgggatgacatggagaagatctggcatcacaccttctacaacgaactacgtgt  
ggcgctgaggagcatccagtcctcctcactgaggctccactcaatccaaaagccaatcg  
tgagaagatgacacaaatcatgtttgagactttcaatgtccgggcgatgtatgtagctat  
ccaggcagtgctctcgctctacgcttccgggtcgtactacgggcatgtgtcgcactcggg  
cgacggagtgagccacactgtaccgatctacgagggttacgctctaccgcacgcaattct  
gcggttgatttggtggtcgcgatctcaccgactggctaacaaagctactgacagagcg  
tggctatgcattcaccactacagcggagctggaaatcgtgcgagacatcaaggagaagtt  
gtgctatgtggcactcgactt**tgagaacgaaatgggtaccg**ctgccactagctcctctct

(2)

tgaggctcaatcgaaaagaggcatccttactctcaaat**acc**ccattgaac**acgg**catcgt  
gaccaattgggatgacatggagaagatctggcatcacaccttctacaacgaactacgtgt  
ggcgctgaggagcatccagtcctcctcactgaggctccactcaatccaaaagccaatcg  
tgagaagatgacacaaatcatgtttgagactttcaatgtccgggcgatgtatgtagctat  
ccaggcagtgctctcgctctacgcttccgggtcgtactacgggcatgtgtcgcactcggg  
cgacggagtgagccacactgtaccgatctacgagggttacgctctaccgcacgcaattct  
gcggttgatttggtggtcgcgatctcaccgactggctaacaaagctactgacagagcg  
tggctatgcattcaccactacagcggagctggaaatcgtgcgagacatcaaggagaagtt  
gtgctatgtggcactcgactt**tgagaacgaaatgggtaccg**ctgccactagctcctctct

**Şekil 3.2.** (1) Aktin I (*EgactI*) hedef gen bölgesi (487 bç), AluI enzim tanıma bölgeleri altı çizili olarak gösterilmiştir, (2) TaqI enzim tanıma bölgeleri altı çizili olarak gösterilmiştir, ileri ve geri primerler koyu renkte görülmektedir.



(1)

ggcgctgaggagcatccagtcctcctcactgag**ggctccactcaatccaaaag**ccaatcg  
tgagaagatgacacaaatcatgtttgagactttcaactgtccggcgatgtatgtagccat  
ccaggcagtgctctcgttgtagcctctggtcgtactactggagtcgtactggactctgg  
tgacggtgtgaccataactgtcccatctacgaaggttatgcgcttcctcatgccattct  
acgtcttgacttagcgggccgagatttaacagaccaccttgtcaagatcatgactgagcg  
tggtacaactttactactacagcagagcgcgaaatagctcgcgacataaaggagaagct  
ctgctacgtagcactcgatttcgagcaggaaatgataacgtcaactt**ctagtgccatttt**  
**ggaacgct**cttatgaactgccagatggtcaactgattaccattggcaacgaacgcttcg

(2)

ggcgctgaggagcatccagtcctcctcactgag**ggctccactcaatccaaaag**ccaatcg  
tgagaagatgacacaaatcatgtttgagactttcaactgtccggcgatgtatgtagccat  
ccaggcagtgctctcgttgtagcctctggtcgtactactggagtcgtactggactctgg  
tgacggtgtgaccataactgtcccatctacgaaggttatgcgcttcctcatgccattct  
acgtcttgacttagcgggccgagatttaacagaccaccttgtcaagatcatgactgagcg  
tggtacaactttactactacagcagagcgcgaaatagctcgcgacataaaggagaagct  
ctgctacgtagcactcgatttcgagcaggaaatgataacgtcaactt**ctagtgccatttt**  
**ggaacgct**cttatgaactgccagatggtcaactgattaccattggcaacgaacgcttcg

**Şekil 3. 3** (1) Aktin II (*EgactII*) hedef gen bölgesi (394 bp), AluI enzim tanıma bölgeleri altı çizili olarak gösterilmiştir, (2) TaqI enzim tanıma bölgeleri altı çizili olarak gösterilmiştir, ileri ve geri primerler koyu renkte görülmektedir.

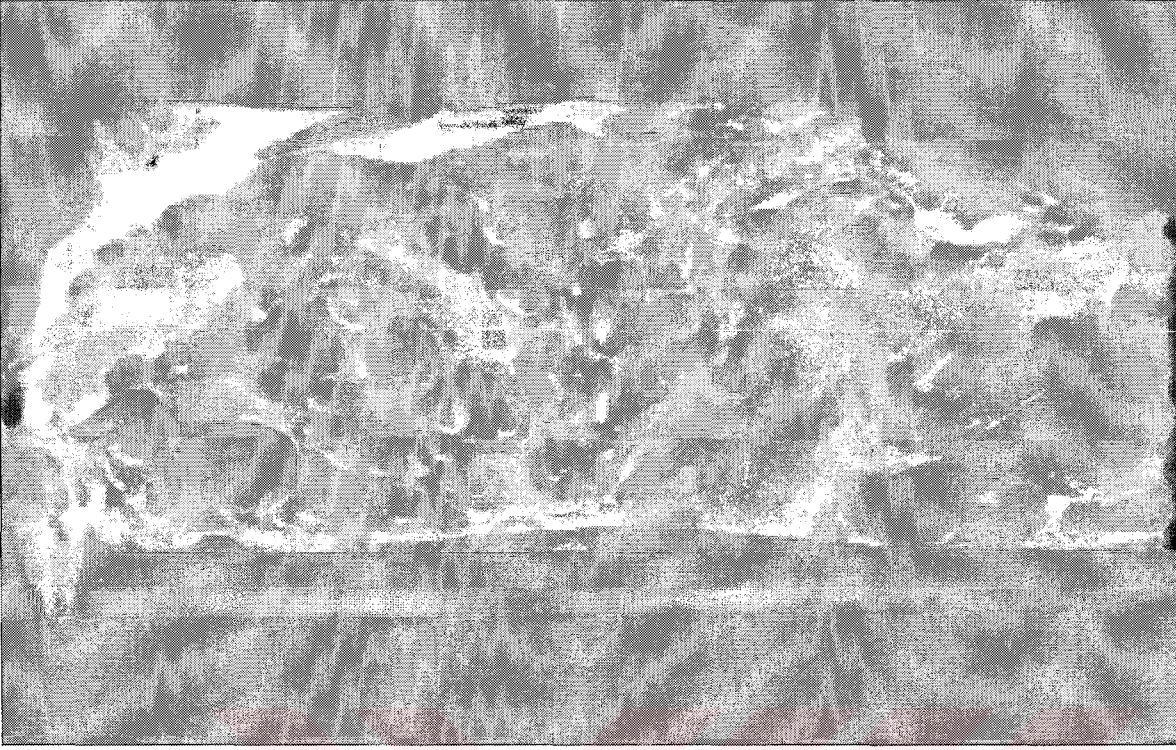
## 4. BULGULAR

### 4.1. İn Vitro Kist Gelişimi

Farklı bölge ve konaklardan temin ettiğimiz *E.granulosus* metasestodları (kist hidatik) farklı görünüm ve yapıdaydı. Bu kistlerin bir kısmı oldukça büyük ve çok miktarda sıvı içeren uniloküler özellik gösterirken, bir kısmı daha küçük, çok odalı ve odalar arasında bağlantılı olan multikistik özellikteydi (Resim 4.1 ve 2). Koyunlarda gözlenen bu multikistik yapılar fertil olup yüksek miktarda protoskoleks içerirken sığırlardan temin edilen kistlerin tamamı multikistik olup infertildi. Sadece dört farklı kistte kız kistler mevcuttu. Bazı kistlerin membranları oldukça kalın, bazıları tamamen kalsifiye olmuş bazıları da çok az sıvı içeren kistlerdi. Oldukça küçük yapıda, çok az protoskoleks içeren ve kist boşluğu membran parçacıkları ile dolu olan kistler de vardı.



**Resim 4.1** . Multikistik yapıdaki kist hidatikli koyun karaciğerinin görünümü



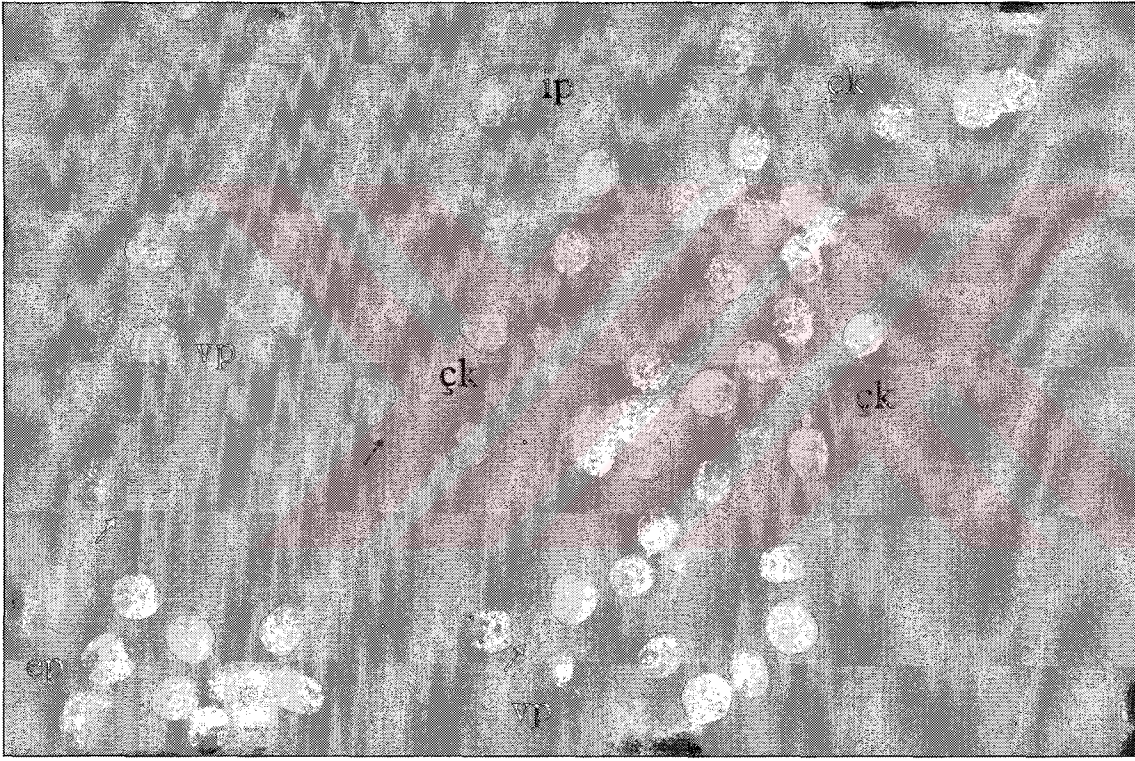
**a**



**b**

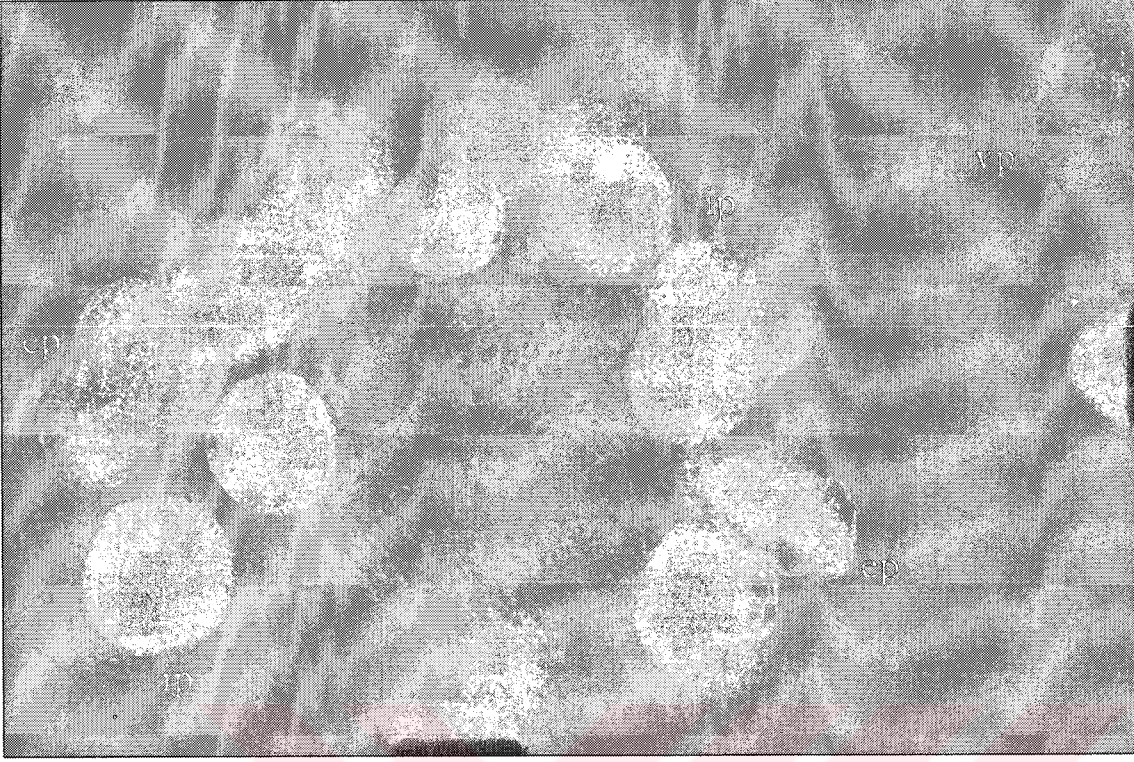
**Resim 4.2.** a ve b) Multikistik yapıdaki hidatik kistlerden hazırlanan kesitte kistlerin yapısı ve birbirleriyle olan bağlantıları

Kültürün ilk günü protoskolekslerin yaklaşık %50' sinin baş (skoleks) bölgesinin gömülü oldukları vücut (soma) bölgesinden dışarı doğru çıkmış (evagine) olduğu gözlenmiştir (Resim 3). Kalan protoskoleksler ise hala içe doğru çökmüş (invagine) durumdadır. Protoskoleksler, özellikle evagine olmuş protoskoleksler, oldukça hareketlidir. Morfolojik görünüşleri normal, alev hücresi aktivitesi belirgindir. Kültürün ilk gününde evagine olan protoskolekslerin arka kısımlarında keselerin oluşmaya başladığı (arka keseli protoskoleks) da gözlenmiştir. Ayrıca kültürde çimlenme kapsülüne bağlı protoskoleksler de tespit edilmiştir (Resim 4.3 ve 4.4). Bu protoskolekslerin bazılarının evagine olurken bazılarının invagine durumda kaldığı da gözlenmiştir.



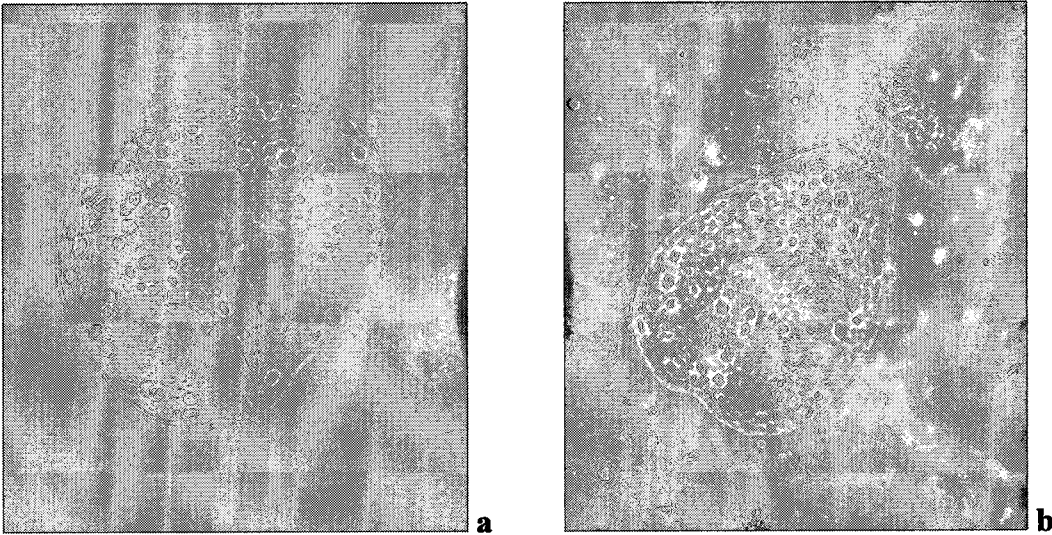
**Resim 4.3.** Kültürün ilk günündeki evagine ve invagine protoskolekslerin görünümü, çimlenme kapsüllerine bağlı protoskolekslerin görünümü (ok) çk: çimlenme kapsülü, ip: invagine protoskoleks, ep: evagine protoskoleks, vp: veziküler protoskoleks, oklar: arka kese

Kültürün ikinci gününden sonra vezikülasyonun başladığı yani evagine olmayan protoskolekslerin şişerek yuvarlaklaşmaya (veziküler protoskoleks) başladıkları gözlendi (Resim 4.4 ve 4.5). Bu veziküler protoskolekslerin sitoplazmik hareketleri ve veziküllerinin hareketi net bir biçimde görülmekteydi. Kültürde bazı veziküler protoskolekslerin arka kısımlarında da kese oluştuğu (arka kese formu) tespit edildi (Resim 4.3 ve Resim 4.6).

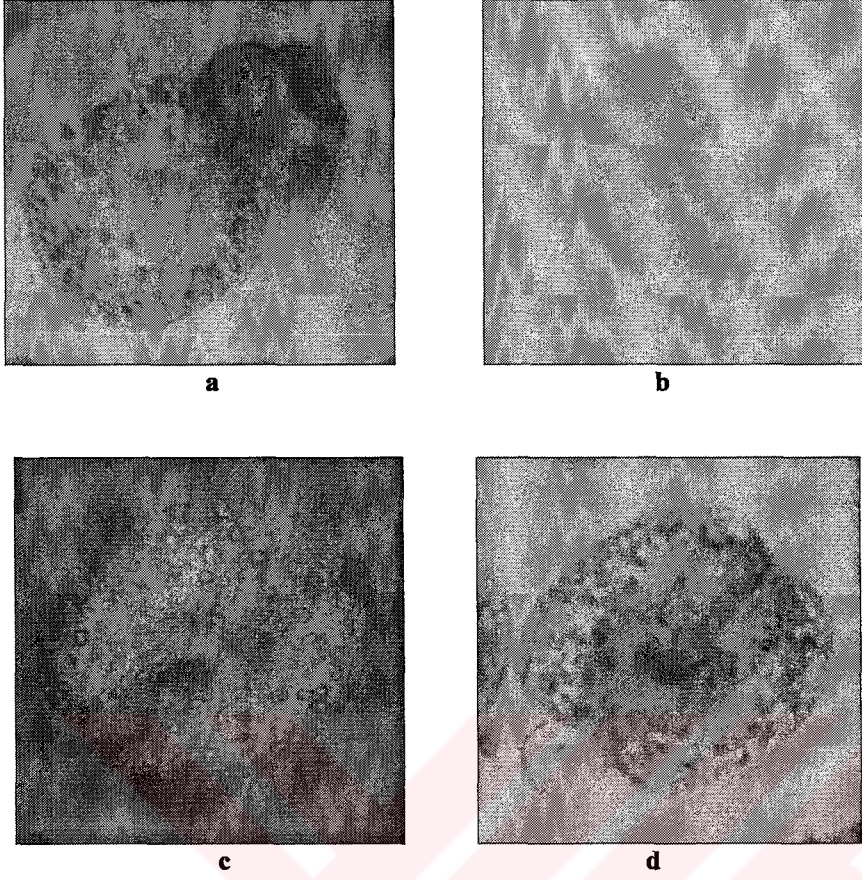


**Resim 4.4.** Çimlenme kapsülüne bağlı protoskolekslerin görünümü, ip: invagine protoskoleksler, ep: evagine protoskoleksler, vp: veziküler protoskoleks, ok: arka kese

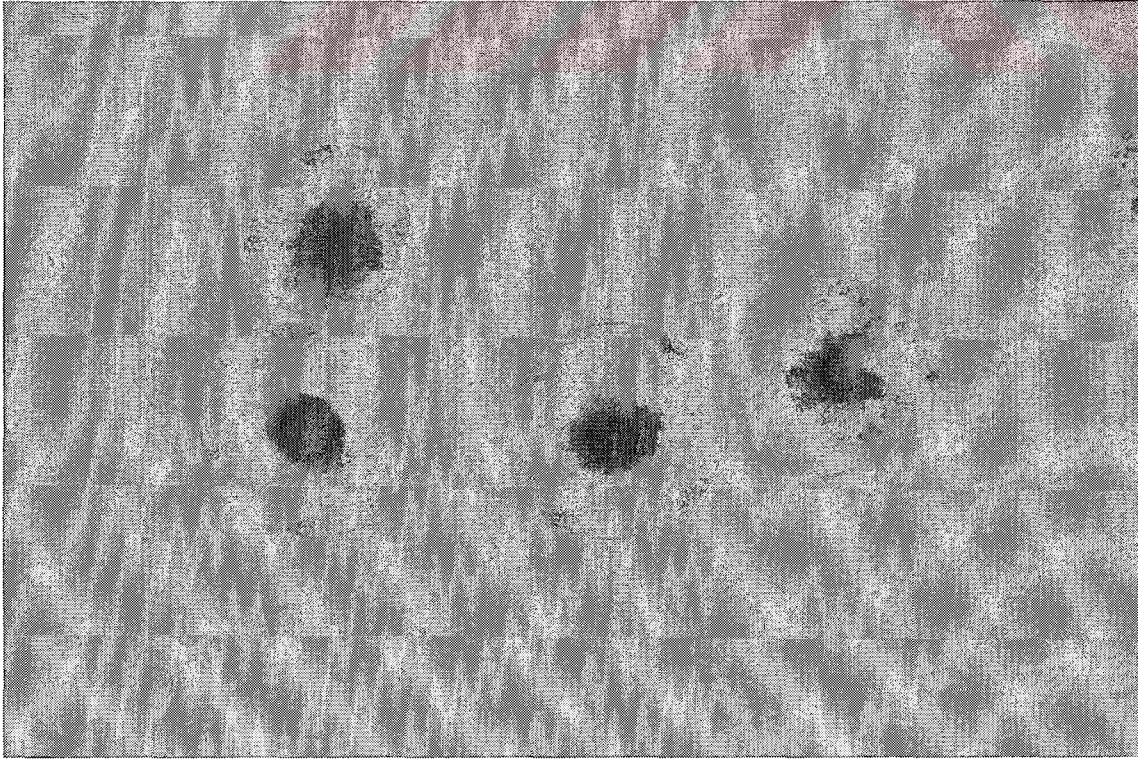
Protoskolekslerin normal morfolojilerinin 3. günden sonra kaybolmaya başladığı ve internal vakuolizasyonun olduğu gözlemlendi (Resim 4.7 ve 4.8). Bununla birlikte protoskolekslerin hareketlerinin de yavaşlamaya başladığı tespit edildi. Evagine olmuş arka keseli protoskolekslerin ise veziküler forma göre çok hareketli oldukları belirlendi.



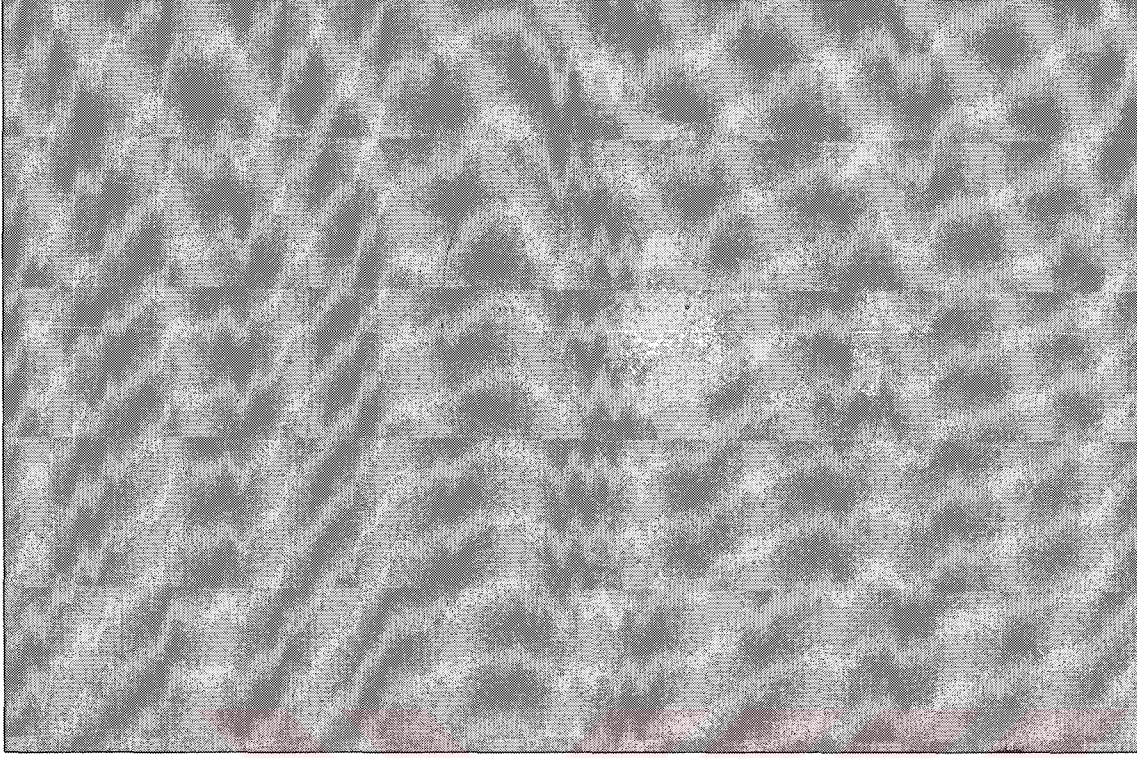
**Resim 4.5.** a) Kültürün 2. gününde şişmeye başlayan bir protoskoleks. veziküller ve iç kısımdaki çengeller belirgin durumda, b) invagine bir protoskoleksin arka kısmında kese oluşumu



**Resim 4.6 :** Kültürün ilk günlerinde görülen protoskoleksler, a) evagine protoskoleks, b)arka keseli evagine protoskoleks, c) invagine protoskoleks, d) arka keseli invagine protoskoleks (arka kese formu)



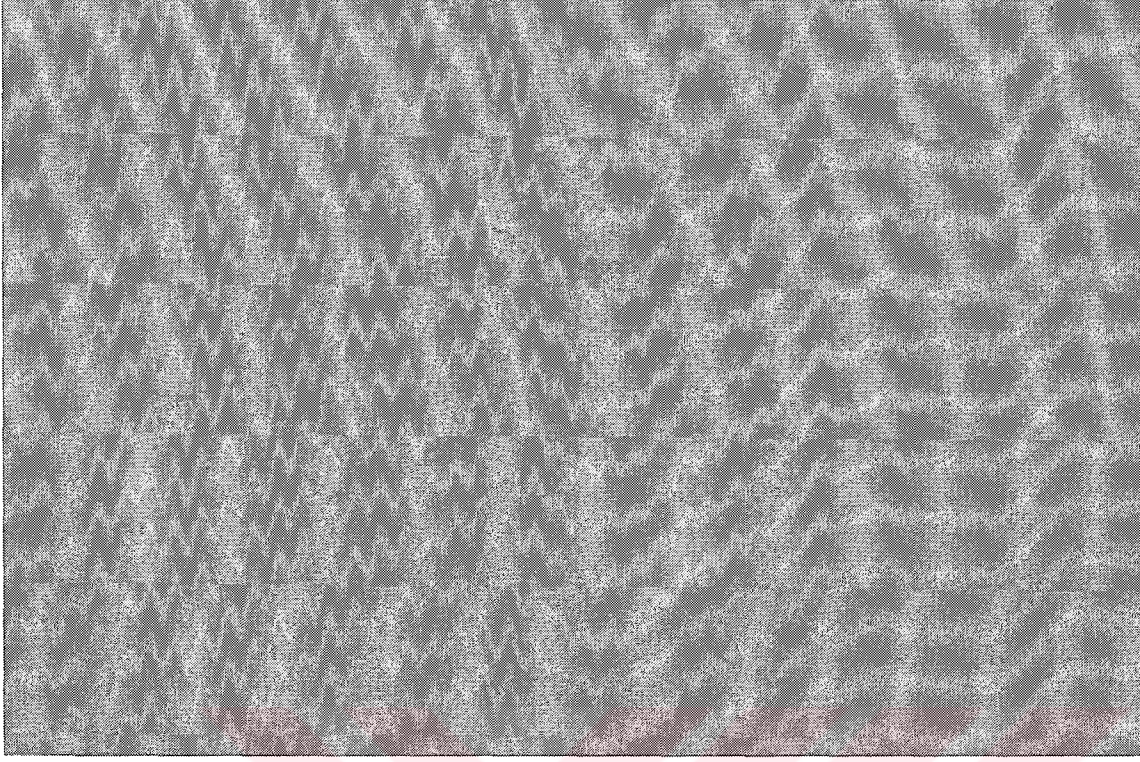
**Resim 4.7.** Tamamen yuvarlak görüntü almış veziküler protoskoleksler (X20).



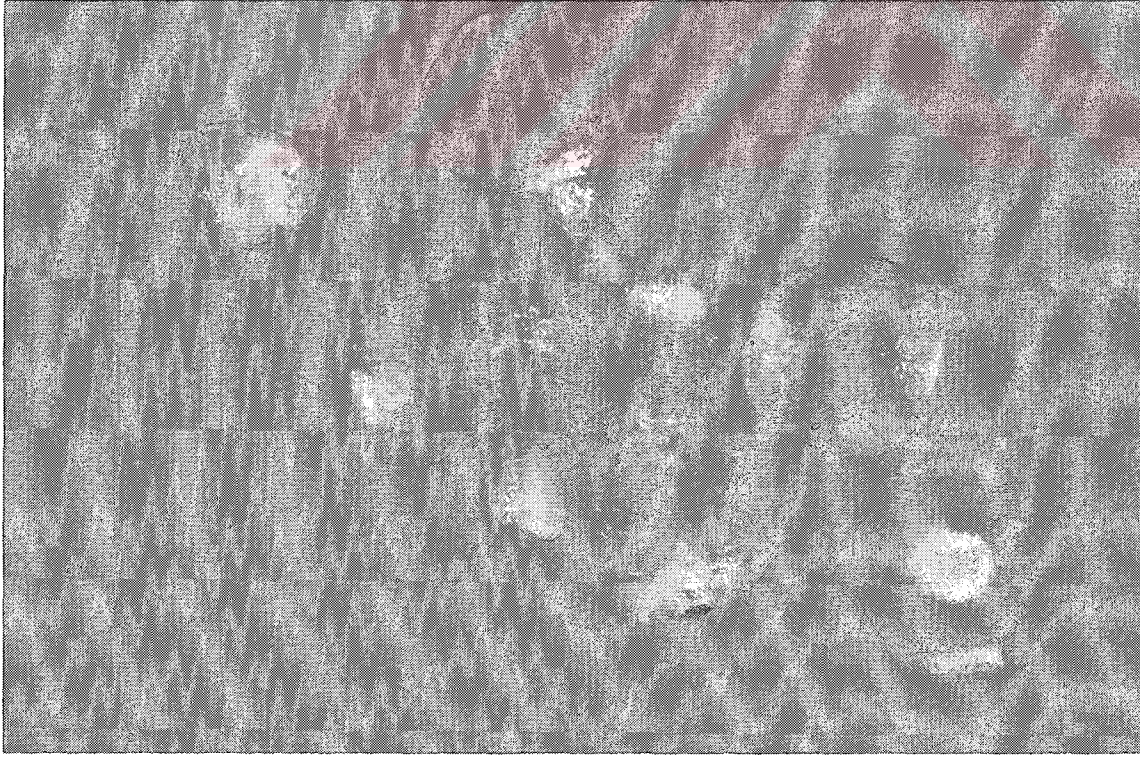
**Resim 4.8.** Veziküler protoskoleksin daha yakından görünümü, internal vakuolizasyon gerçekleşmiş (X40).

Kültürün 6-25. günleri arasında veziküler protoskolekslerin tamamen yuvarlaklaştığı ve vakuolize olduğu, sadece vantuzların hala gözlenebildiği mikrokist öncesi formlar tespit edildi. (Resim 4.8 ve 4.9). Mikrokist öncesi aşamada hareketin hemen hemen hiç olmadığı, sitoplazmik hareketin de oldukça yavaş olduğu belirlendi. Bu safhadaki tamamen şişmiş veziküler protoskolekslerin büyüklüklerinin farklı olduğu da tespit edildi.

Kültürün 20-35. günlerinde laminar membran oluşumunun başladığı tespit edildi. Laminar membranın kisti çevrelediği yani mikrokistlerin olduğu bu safhada (Resim 4.11 ve 12) sitoplazmik hareketin hemen hemen hiç kalmadığı tespit edildi. Bu mikrokistlerin büyüklüklerinin birbirine göre farklılık göstermekte olduğu da gözlemlendi. Kültürün ilerleyen dönemlerinde (30-70. günlerinde) laminar membranın daha fazla geliştiği ve birkaç kat olacak şekilde mikrokisti çevrelediği ve böylece olgun mikrokistlerin olduğu görüldü. Kültürde çimlenme kapsülüne bağlı olarak canlılığı devam eden protoskolekslerde ise yuvarlak görünüm ve vakuolizasyon olmasına rağmen laminar membran gelişimi olmadığı tespit edildi (Resim 4.10).

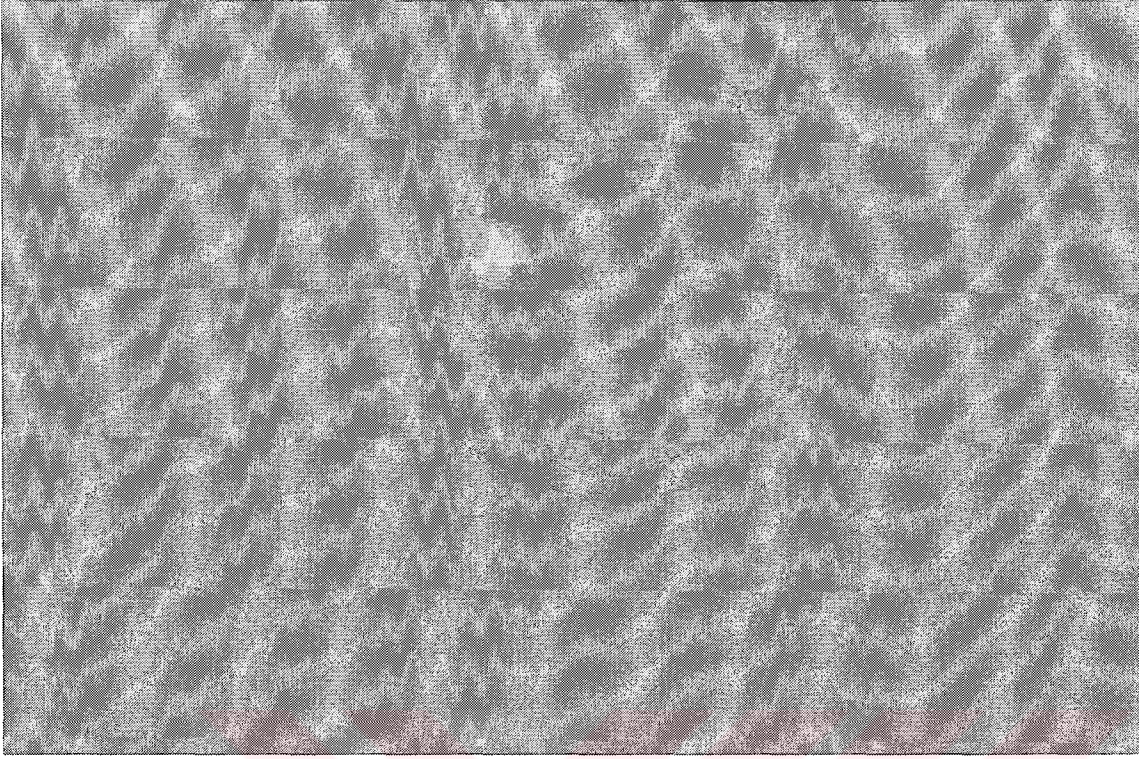


**Resim 4.9.** Mikrokist öncesi veziküler protoskoleksde vantuzlarının görünümü (X 40)

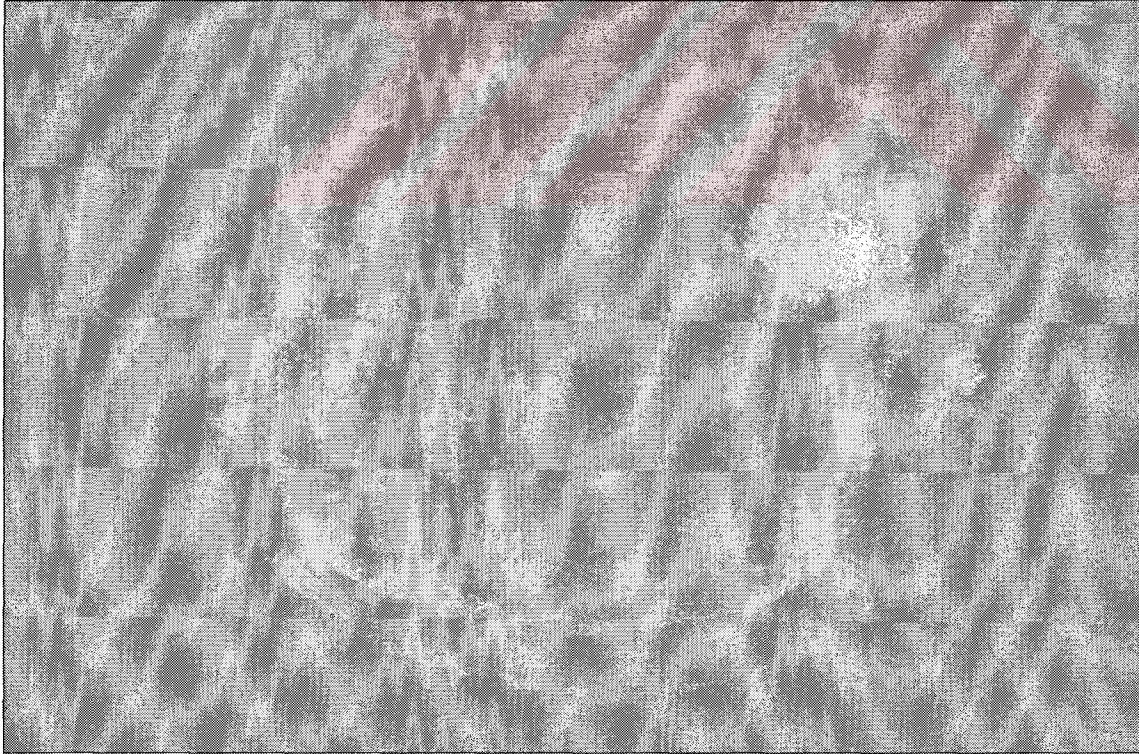


**Resim 4.10:** Çimlenme kapsülüne bağlı veziküler protoskoleksler (X 20)





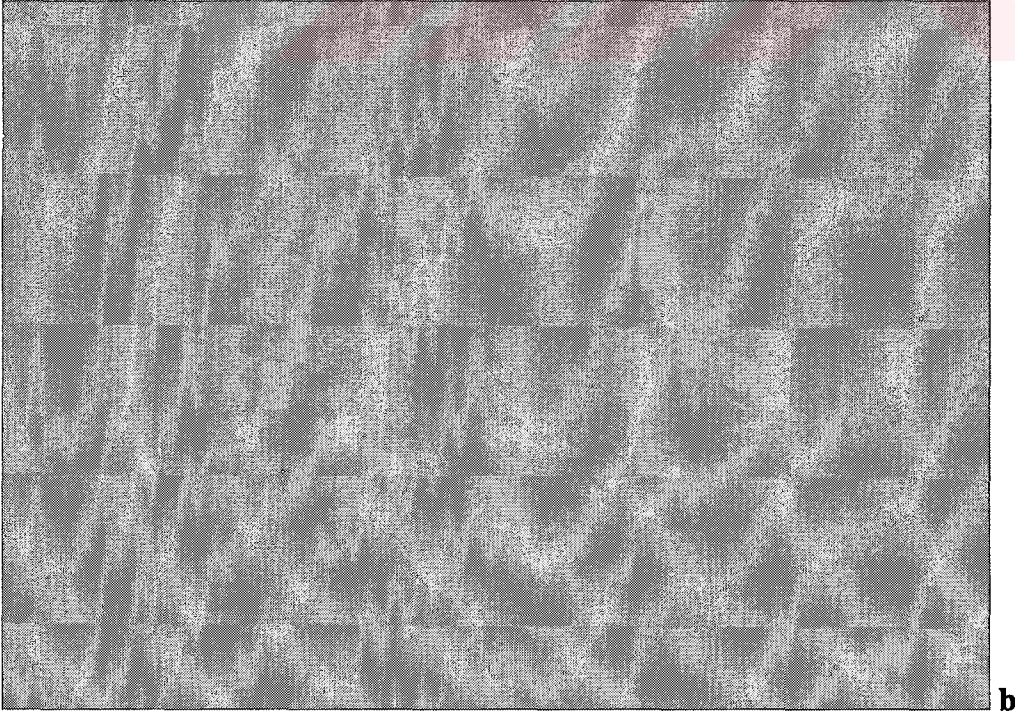
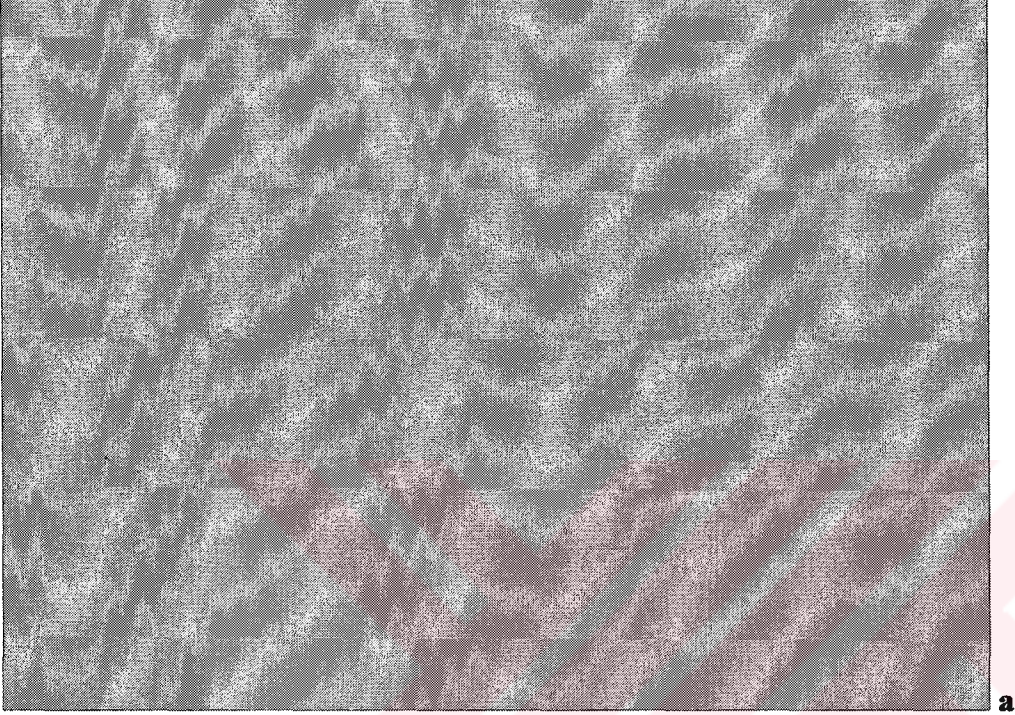
**Resim 4.11.** Mikrokinin görünümü, laminar membran gelişmiş ve mikrokinisti tamamen çevrelemiş (X 20).



**Resim 4.12.** Mikrokinin yakından görünümü (X 40).

Kültür süresince kontaminasyon, pH değişikliği gibi olumsuz koşulların protoskolekslerin gelişimini yavaşlattığı ve genellikle protoskolekslerin canlılıklarını

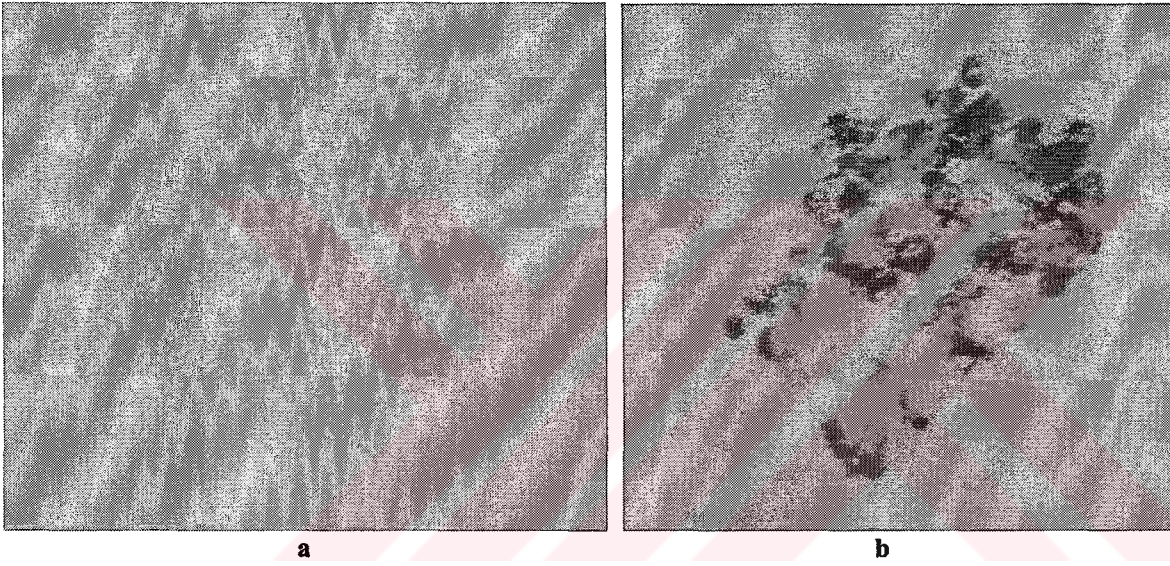
kaybetmelerine yol açtığı gözlemlendi. Böyle durumlarda protoskolekslerin çengellerinin koparak protoskoleksten ayrıldığı tespit edildi (Resim 4.13). Ancak bu tür olumsuz koşullara maruz kalan mikrokistlerin daha dayanıklı olduğu ve canlılığının devam ettiği belirlendi.



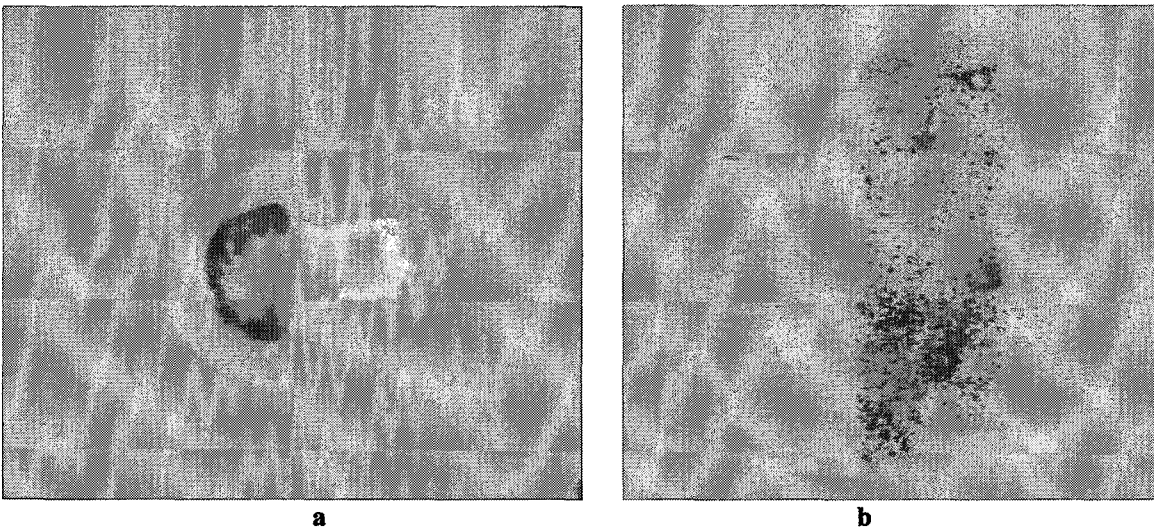
**Resim 4.13.** a) pH değişikliğinde çengellerini atan bir protoskoleks ve çengelleri (X40), b) çengellerin yakından görüntüsü (X100)

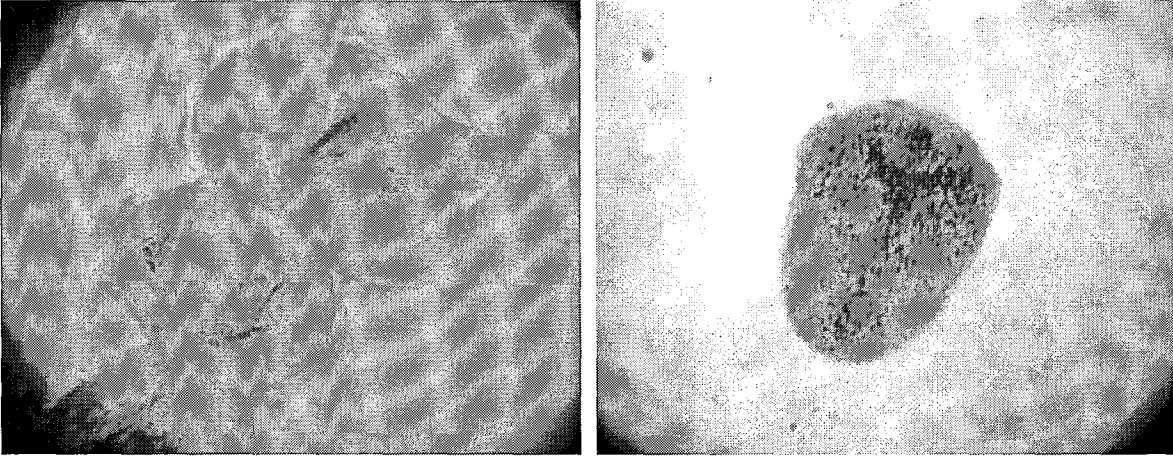
## 4.2. Protoskoleks ve germinatif membranın nüklear organizasyonu

Protoskolekslerin ve germinatif membranın nüklear organizasyonunu belirlemek için yapılan kültür çalışmasında protoskolekslerin büyük bir kısmının evagine olduğu, az sayıda protoskoleksin ise invagine durumda kaldıkları gözlemlendi (Resim 4.14 ve 4.19). Protoskolekslerin çengeller hariç tüm tegümentinin hücrelerden oluştuğu tespit edildi (Resim 4.14 ve 4.15). Çengeller hücresel olmayıp rostelyum üzerinde çift sıra halinde bulunmaktadır (Resim 4.16 ve 4.17)

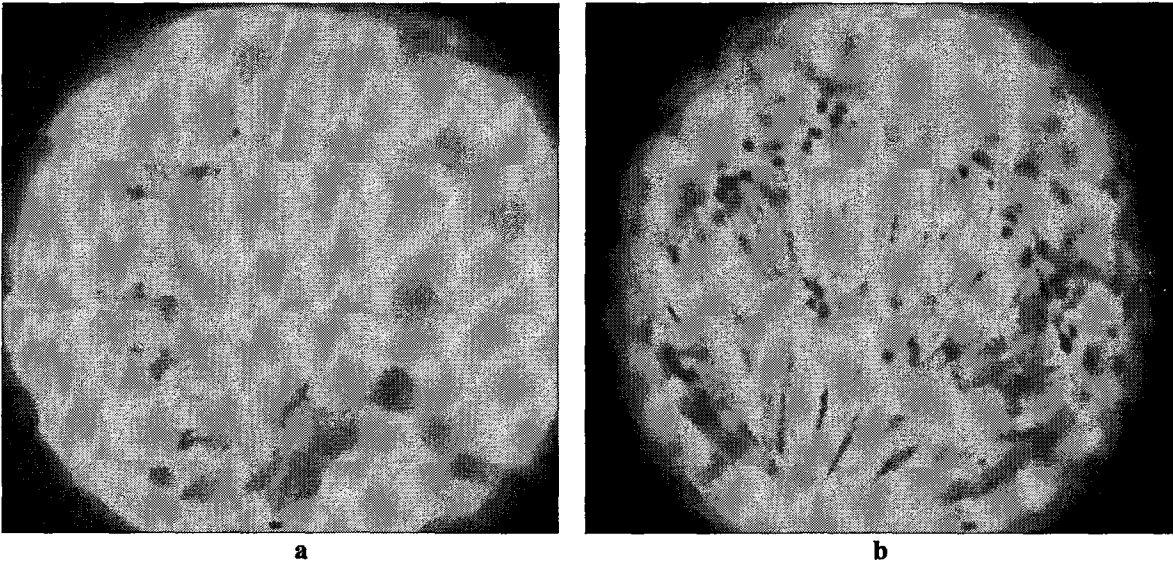
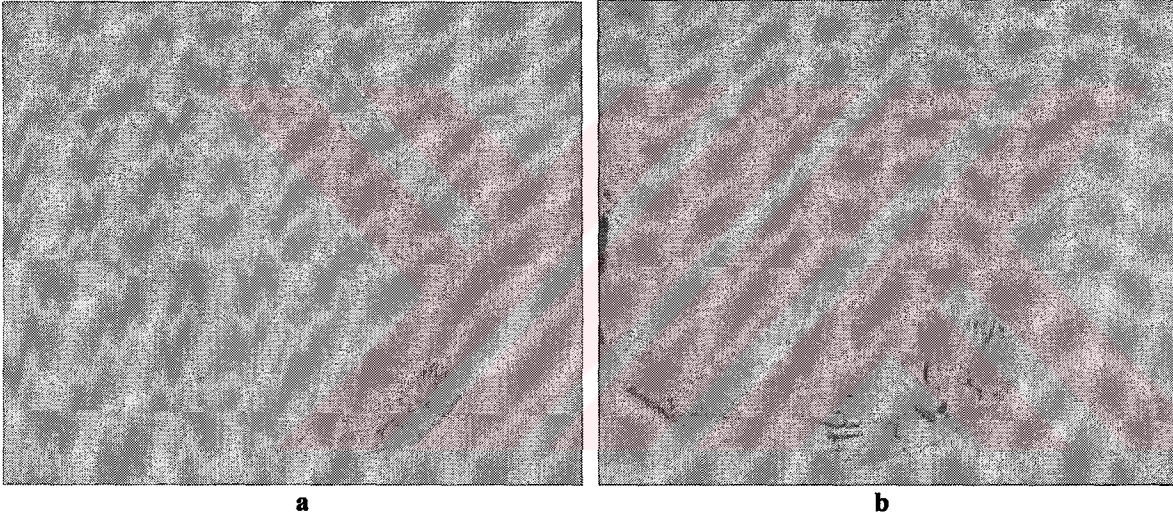


**Resim 4.14.** a) İnvagine durumdaki protoskoleksin görünümü, çengeller vücut kısmına gömülü halde, çekirdekler ise mavi renkte görülmekte, b) evagine durumdaki protoskoleksin görünümü, vantuzlar dışarı doğru çıkmış ve çekirdekler mavi renkte görülmekte (X40).





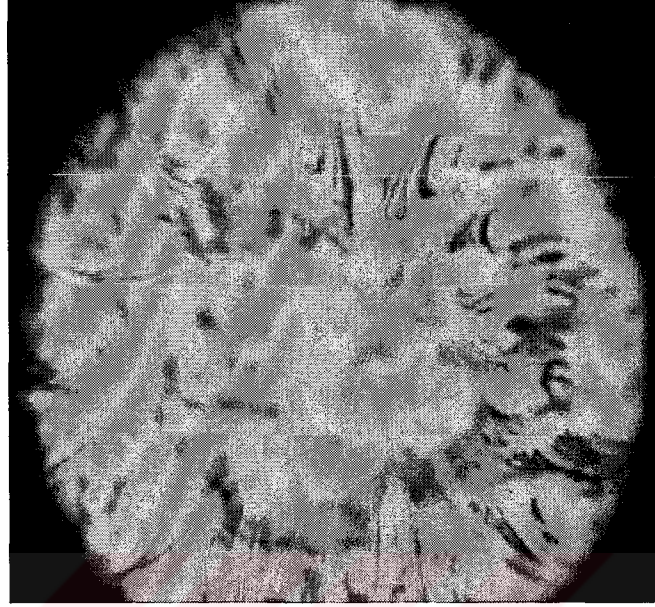
**Resim 4.15.** a) İnvagine durumdaki protoskoleks (X10), b) evagine durumdaki protoskoleks (X20), c) invagine durumdaki protoskoleksler, d) evagine durumdaki protoskoleks (X20)



**Resim 4.16.** a) Evagine protoskoleks, çengeller hariç tüm tegüment hücreden oluşmakta (X40), b) protoskoleksin daha yakından görünümü (X100), c ve d) çengellerin daha yakından görünümü (X100)



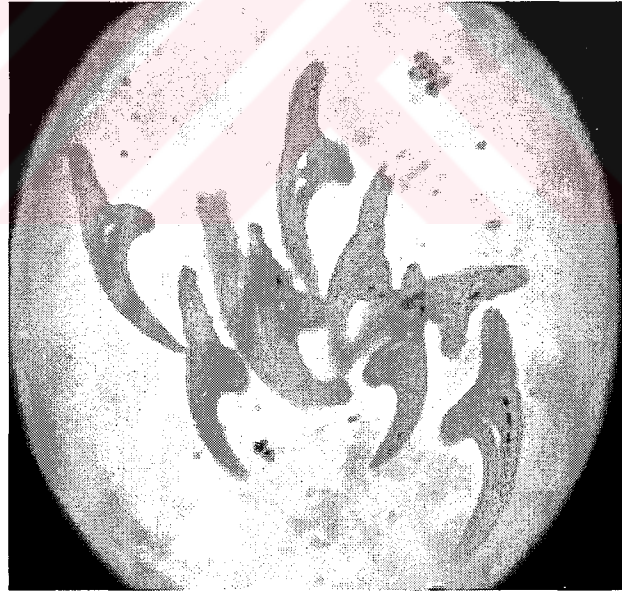
a



b



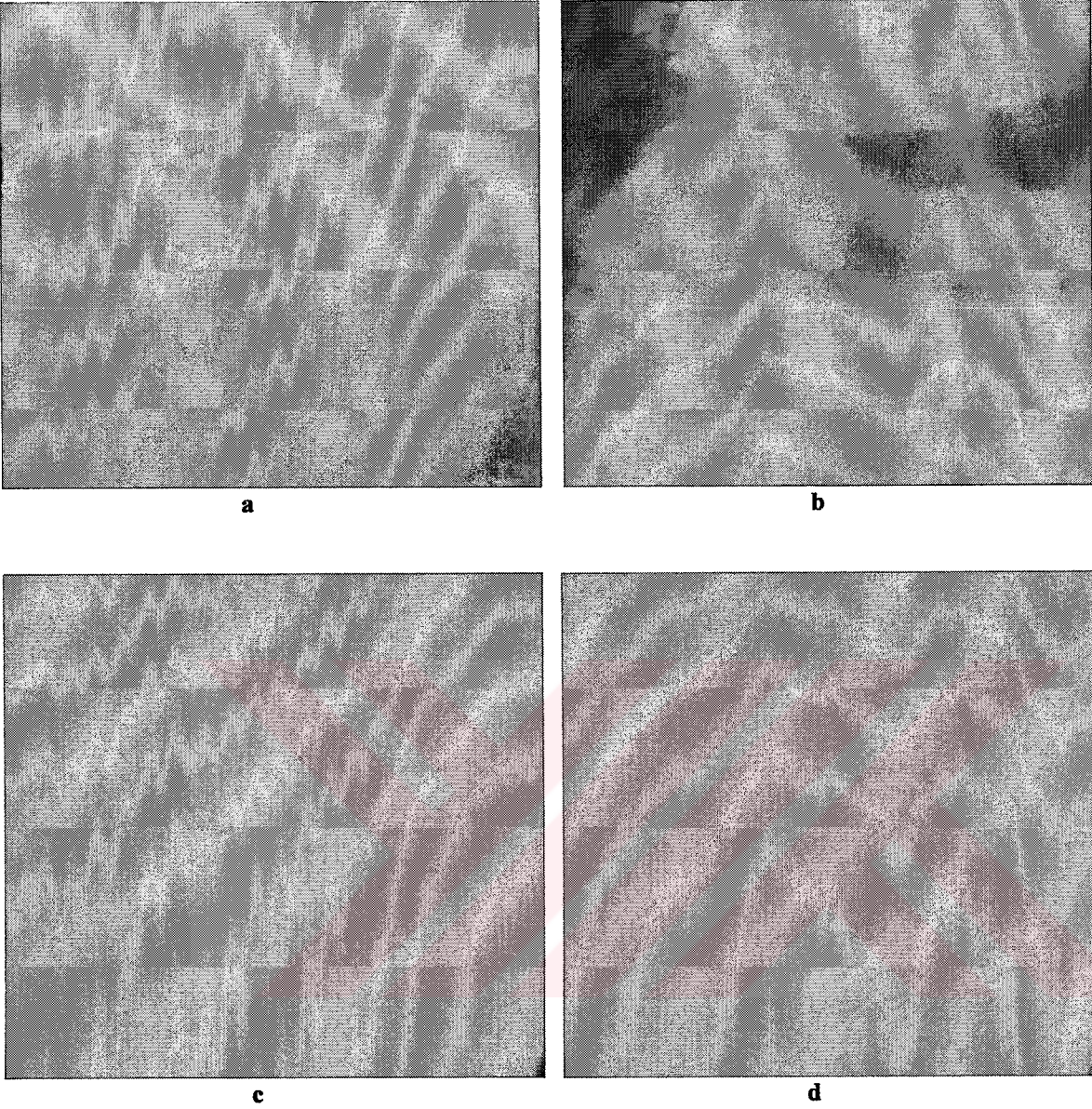
c



d

**Resim 4.17.** a) Rostelyum bölgesinde çift sıra halinde dizili çengellerin üstten görünümü (X100), b) çengellerin ortasındaki boşluk genişlemiş durumda (X100), c ve d) rostelyumdan kopmuş çengeller dağınık halde görülüyor (X100).

Germinatif membranın kültür çalışmasında ise nükleusların tüm yüzeyde görülmediği ancak yer yer hücresel odakların olduğu gözlemlendi (Resim 18).

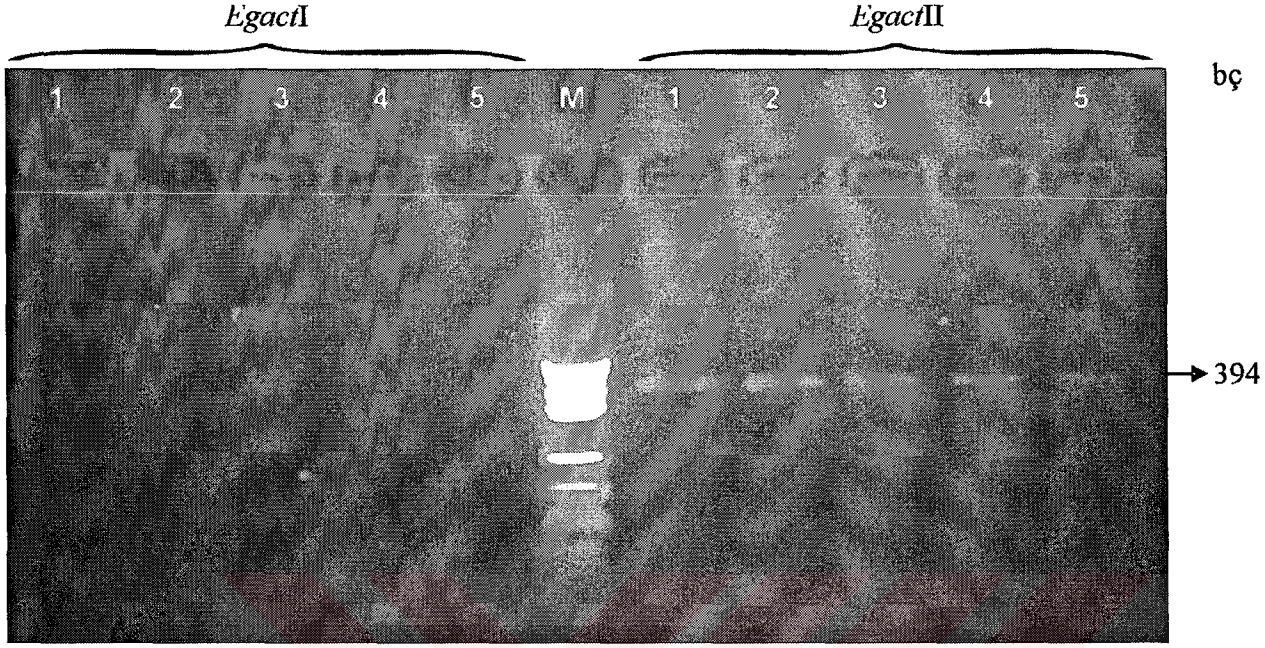


**Resim 4.18.** a ve b) Germinatif membran, hücreler görülmemekte (X40), c ve d) yer yer görülen hüresel odaklar (X40)

#### **4.3. RNA izolasyonu ve RT-PZR tekniği ile *E. granulosus* *EgactI* ve *EgactII* genlerinin protoskolekslerde ifadesi**

*E. granulosus* protoskolekslerinden total RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen total RNA' lardan RT-PZR yöntemi ile önce cDNA sentezlendi. Bu yöntemde mRNA' nın poly A kuyruğuna uygun oligo dT primerler kullanılarak reverse transcriptase enzimi ile mRNA' nın cDNA' ya sentezi gerçekleştirildi. Akabinde bu cDNA' lardan aktin 1 ve 2 gen bölgelerine uygun primerler kullanılarak bu hedef gen bölgeleri çoğaltıldı. RT-PZR'ı takiben yapılan agaroz jel elektroforez sonucunda, protoskolekslerde actin 2 geninin

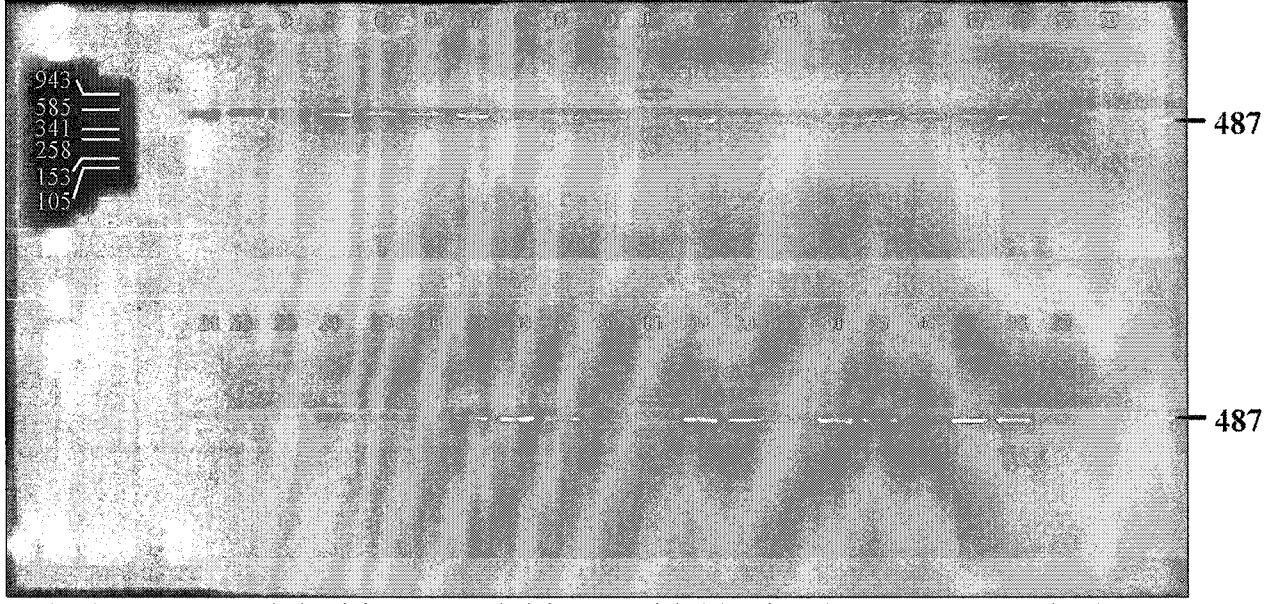
ifade edildiği tespit edildi. Actin 1 geninin ürünü ise gözlenmedi (Resim 4.19). Germinatif membrandan RNA izolasyonu ise başarısız oldu.



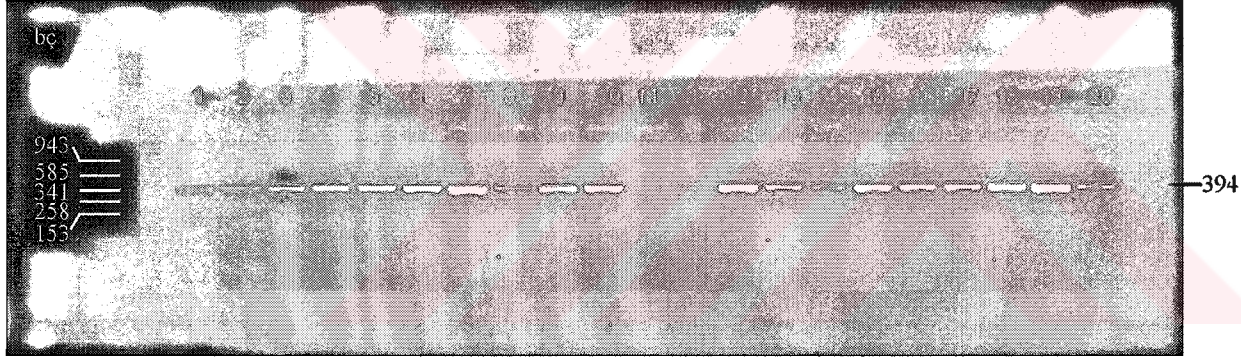
**Resim 4.19.** *EgactI* ve *EgactII* genlerinin RT-PZR sonuçlarının agaroz jel elektroforezde görünümü, M: marker (pUC18 msp1 kesimi).

#### 4.4. DNA izolasyonu ve PZR-RFLP tekniği ile *E.garnulosus* *EgactI* ve *EgactII* genlerinin çok yapıllığının (polimorfizmin) araştırılması

Konya ve çevresi ile Karapınar' dan temin edilen koyun tutulumlu 38 farklı kiste ait protoskoleks ile S.Ü.Meram Tıp Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalında ameliyat sonucu temin edilen insan tutulumlu 1 kiste ait protoskolekslerden DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen DNA' lardan aktin 1 ve 2 genlerine uygun primerler kullanılarak hedef gen bölgeleri PZR tekniği ile çoğaltıldı. PZR ürünlerinin jel elektroforezde yürütülmesi sonucu tüm örneklerde her iki gen bölgesinin de mevcut olduğu tespit edildi (Resim 4.20 ve 4.21). Aktin 1 ve 2 gen bölgelerindeki çok yapıllığın belirlenebilmesi için PZR ürünleri PstI, AluI ve TaqI enzimleri ile kesildi ve kesim ürünleri agaroz jel elektroforezde yürütülerek sonuçlar değerlendirildi.



**Resim 4.20.** *EgacI* gen bölgesinin PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezde görüntüsü, M: marker (pUC 18 DpnI kesimi).

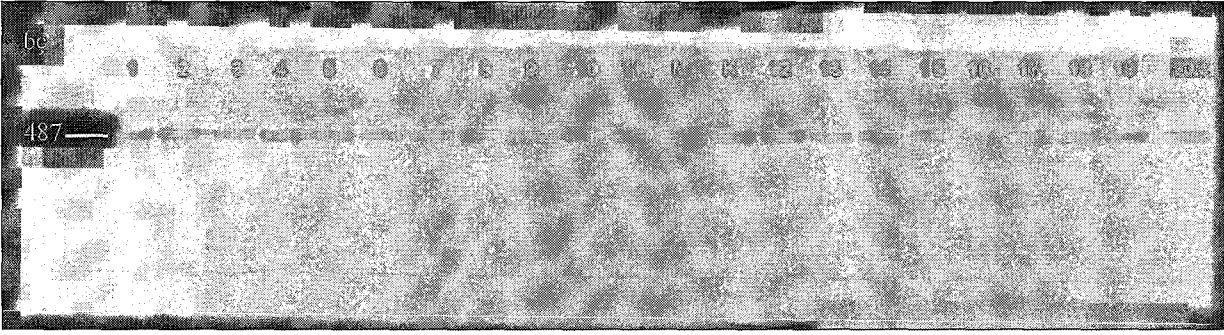


**Resim 4.21.** *EgacII* gen bölgesinin PZR ürünlerinin jel elektroforezde görüntüsü, M: marker (pUC 18 DpnI kesimi).

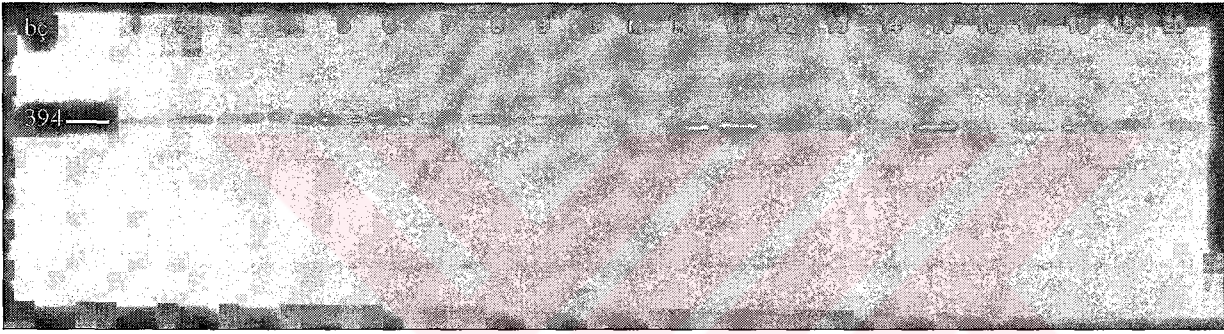
#### 4.4.1. *EgacI* ve *EgacII* gen bölgelerinin *PstI* enzim kesimi sonuçları

Aktin 1 ve 2 genlerinin hedef bölgeleri *PstI* enzim kesim bölgesi içermemektedir. Ancak olası bir değişiklik sonucu *PstI* enzim kesim bölgesinin oluşabileceği ihtimali düşünülerek tüm DNA örnekleri *PstI* enzim kesimine tabi tutuldu. Enzim kesimi sonrasında yapılan agaroz jel elektroforezinde tüm DNA örneklerinin kesilmediği gözlemlendi. Bu sonuca göre hedeflenen gen bölgelerinde herhangi bir değişiklik sonucu *PstI* enzim kesim bölgesinin oluşmadığı belirlendi (Resim 4.22 ve 4.23).





**Resim 4.22.** *EgactI* hedef gen bölgesinin PstI enzim kesimi sonrasındaki agaroz jel elektroforez görüntüsü , M: marker (pUC18 MspI kesimi), K: kontrol.

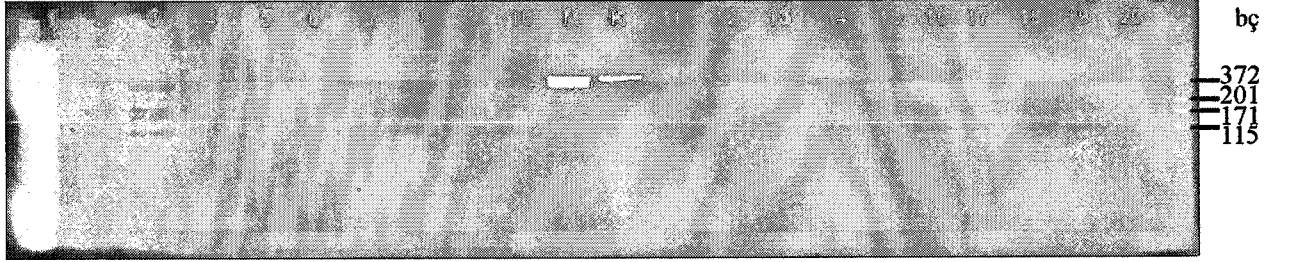


**Resim 4.23.** *EgactII* hedef gen bölgesinin PstI enzim kesimi sonrasındaki agaroz jel elektroforez görüntüsü, M: marker (pUC18 DpnI kesimi), K: kontrol

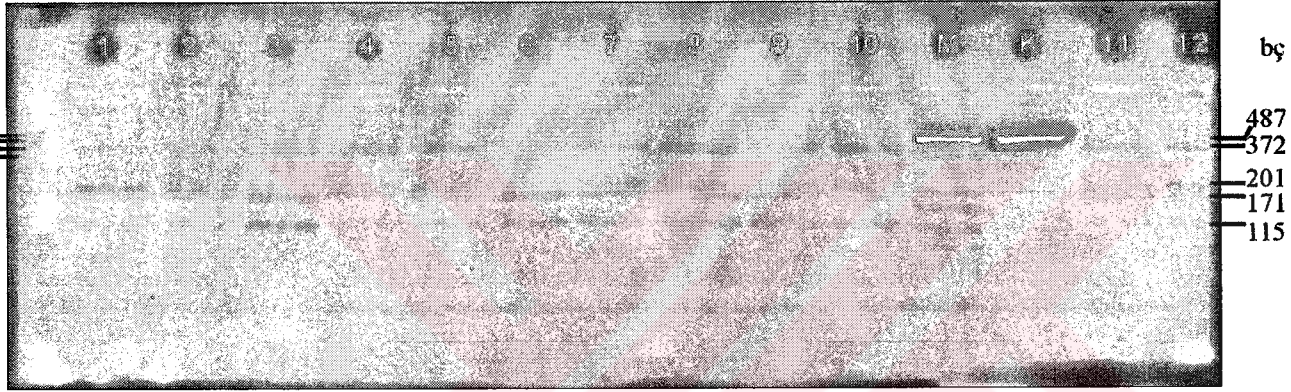
#### 4.4.2. *EgactI* ve *EgactII* gen bölgelerinin AluI enzim kesimi sonuçları

Aktin 1 geni hedef bölgesinde AluI enziminin 3 kesim bölgesi bulunmaktadır. Buna göre AluI enzim kesimi sonrasında 201,171, 42 ve 73 bç büyüklüğünde dört ürün oluşması beklenmektedir. Aktin 1 geni AluI enzim kesimi sonrasında yapılan agaroz jel elektroforezinde ise farklı sonuçlar gözlenmiştir (Resim 4.24). Bu sonuçlara göre tüm DNA örneklerinde 42 ve 73 bç büyüklüğünde iki ürünün oluşmadığı onun yerine 115 bç büyüklüğünde bir bantın oluştuğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, 3. kesim bölgesinin olmadığını veya tüm DNA örneklerinde bu bölgede nükleotid değişikliğinin olduğunu göstermektedir. Üstelik sonuçlara göre 1,3,4,5,7,8,9,10,11,12,13, 14,15,19,20,25, 26, 28, 30, 33 ve 36. DNA örneklerinde beklenen 202 ve 170 bç büyüklüğündeki bantların yanı sıra daha yukarıda yaklaşık 370 bç büyüklüğünde beklenmedik bir bant daha görülmüştür. Bu bant 201 ve 171 bç büyüklüğündeki bantların toplamına denk gelmektedir. Bu sonuçlar aktin 1 geninin iki allelinin olduğunu ve yukarıda belirtilen DNA örneklerinde, allelin

birinde 1. kesim bölgesinin mevcut iken diğer allelde bu kesim bölgesinde nükleotid yer değişmelerinin olabileceğini ve böylece bu kesim bölgesinin ortadan kalkmış olabileceğini göstermektedir.



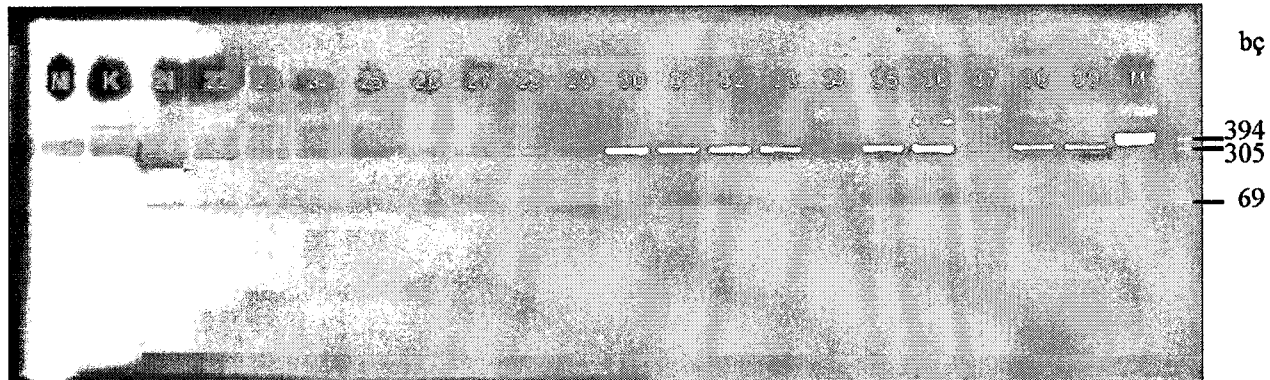
a



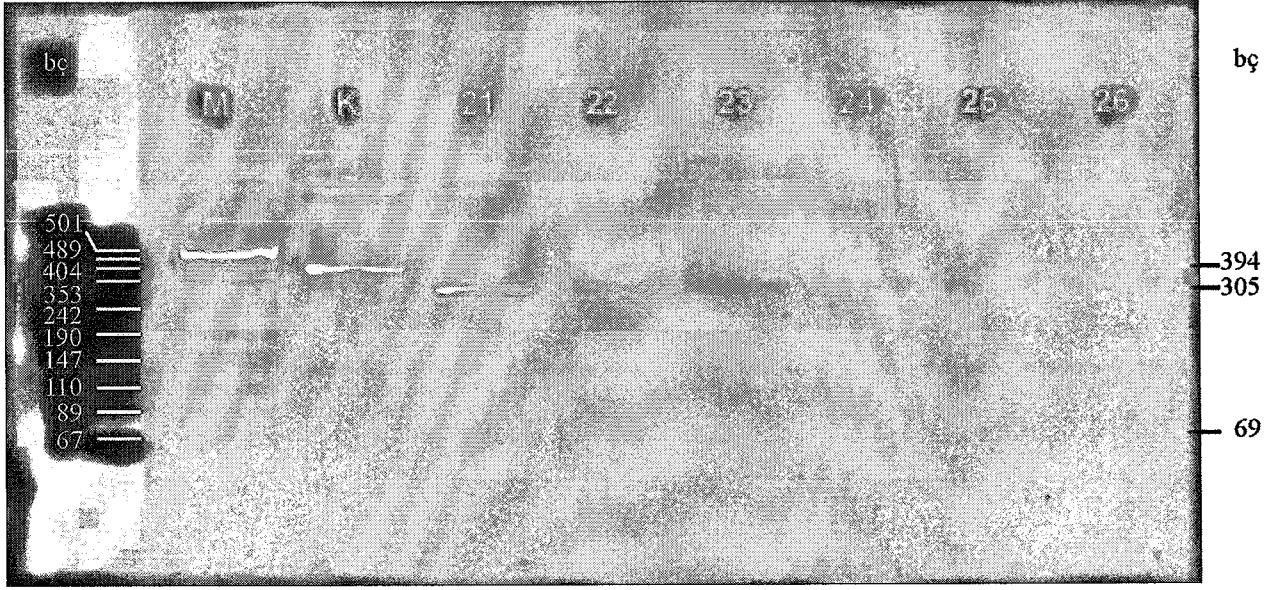
b

**Resim 4.24.** a) Aktin 1 geni hedef bölgesinin ilk 20 DNA örneğinin AluI kesimi sonrası elektroforez görüntüleri, b) ilk 12 örneğin büyütülmüş görünümü, M: marker (pUC 18 MspI kesim), K: kontrol.

Aktin 2 gen bölgesinde ise AluI enziminin 2 kesim bölgesi bulunmaktadır. Buna göre AluI enzim kesimi sonrasında 305, 20 ve 69 bç büyüklüğünde 3 ürünün oluşması beklenmektedir. Aktin 2 geni AluI enzim kesimi sonrasında yapılan agaroz jel elektroforezinde tüm DNA örneklerinde beklenen büyüklükteki ürünler gözlenmiştir (Resim 4.25).



a

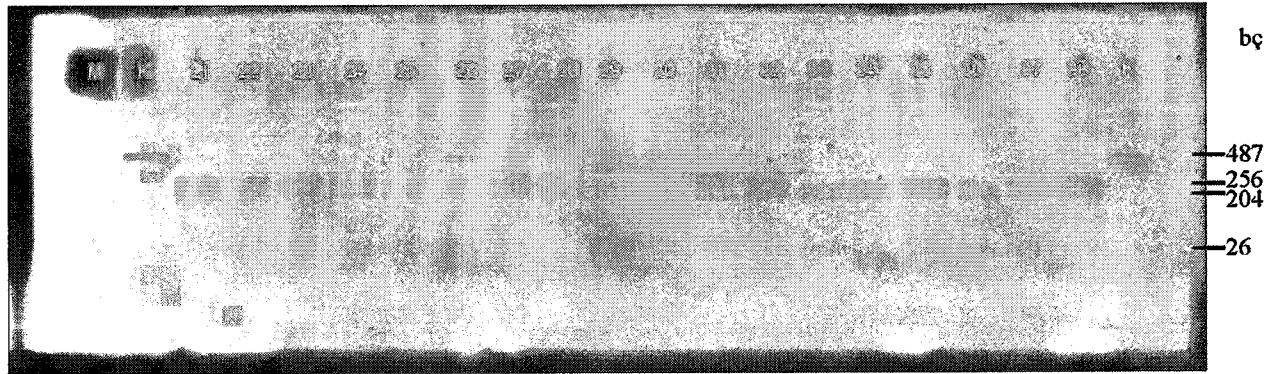


b

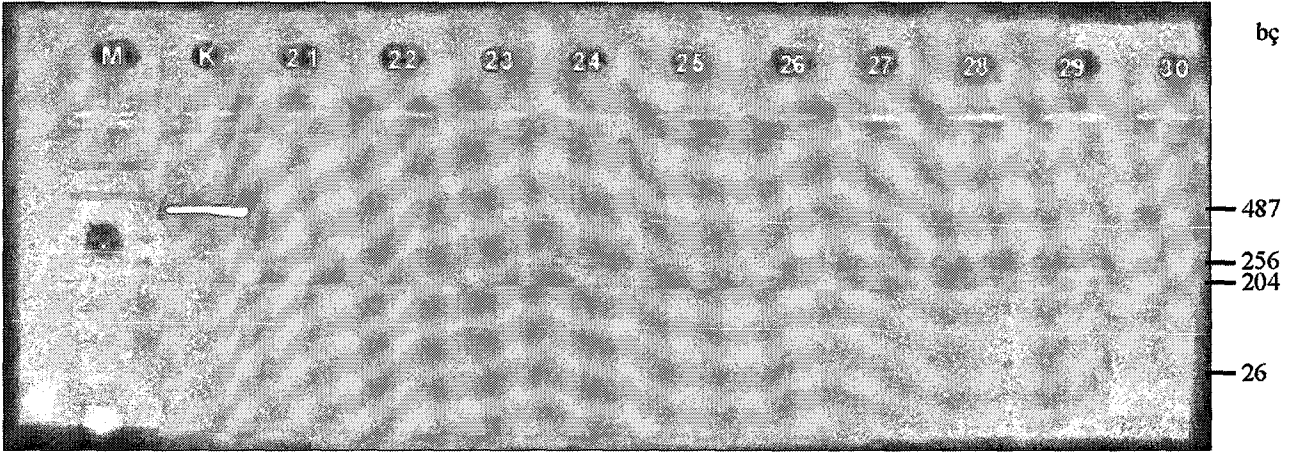
**Resim 4.25.** a) Aktin 2 gen bölgesinin AluI enzim kesimi ürünlerinin jel elektroforez görünümü, b) bu kesim ürünlerinin büyütülmüş görünümü, M: marker (pUC 18 MspI kesimi), K: kontrol.

#### 4.4.3. *EgactI* ve *EgactII* gen bölgelerinin TaqI enzim kesimi sonuçları

Aktin 1 gen bölgesinde TaqI enziminin 2 kesim bölgesi bulunmaktadır. Buna göre TaqI enzim kesimi sonrasında 258, 204 ve 25 bç büyüklüğünde üç ürün oluşması beklenmektedir. Aktin 1 geni TaqI enzim kesimi sonrasında yapılan agaroz jel elektroforezinde tüm PZR ürünlerinin beklenen kesim ürünlerini verdiği sadece 30 nolu DNA örneğinde kesim olmadığı gözlemlendi (Resim 4.26). Üstelik bu örneklerden 26 nolu örnekte heterozigotluğun olduğu da tespit edildi (Resim 4.26).

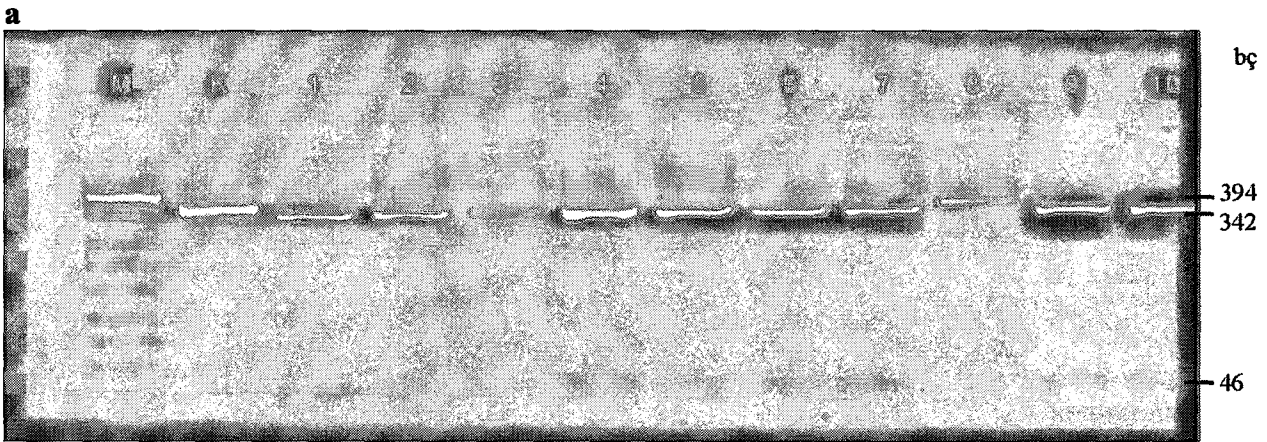
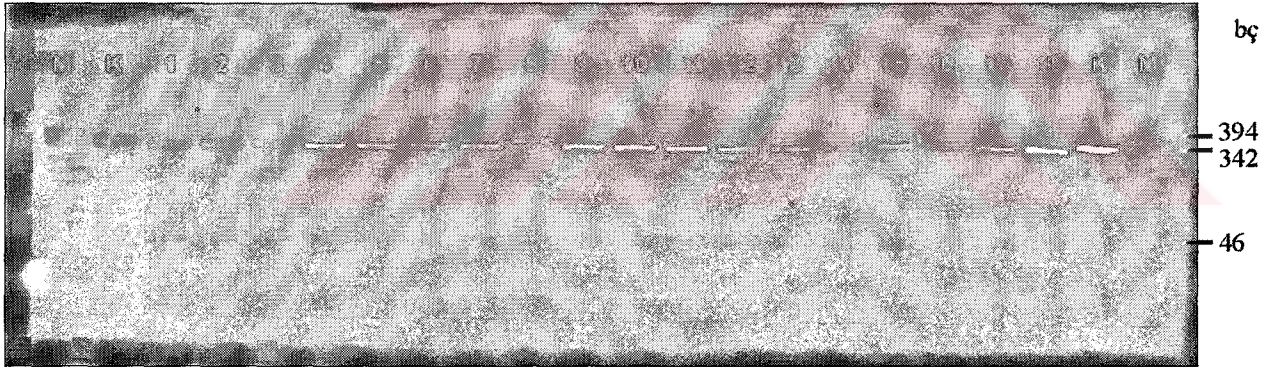


a



**b**  
**Resim 4.26.** a) Aktin 1 gen bölgesinin TaqI enzim kesimi sonrasında yapılan jel elektroforez görüntüleri, b) 21-30 nolu örneklerin büyütülmüş görüntüsü, M:marker (pUC 18 DpnI kesimi), K: kontrol.

Aktin 2 gen bölgesinde TaqI enziminin 2 kesim bölgesi bulunmaktadır. Buna göre TaqI enzim kesimi sonrasında 342, 6 ve 46 bp büyüklüğünde üç ürün oluşması beklenmektedir. Aktin 2 geni TaqI enzim kesimi sonrasında yapılan agaroz jel elektroforezinde tüm PZR ürünlerinin beklenen kesim ürünlerini verdiği sadece 8 nolu DNA örneğinde kesim olmadığı gözlemlendi (Resim 4.27).



**a**  
**b**  
**Resim 4.27.** a) Aktin 2 gen bölgesinin TaqI enzim kesimi sonrasında yapılan jel elektroforez görüntüleri, b) ilk 10 örneğin büyütülmüş görüntüsü, M: marker (pUC 18 MspI kesimi), K: kontrol.

## 5. TARTIŞMA

İn vitro kültür şartlarında *E. granulosus*' un protoskoleksten mikrokist yönündeki gelişimi başarıyla tamamlandı. Bu gelişim boyunca gözlemlenen başlangıç, vakuolizasyon, mikrokist öncesi ve mikrokist safhaları literatürle uyumlu bulundu (Gordo ve Bandera 1997, Ertabaklar ve Altıntaş 2002). Kistik yapıyı tamamen kuşatan laminar membran gelişiminin, kültürün 20-35. günlerinde olduğu tespit edildi. Literatürde laminar membran oluşumunun kültürün daha erken döneminde genellikle 9-18. günleri arasında başladığı belirtilmiştir (Rodriguez-Caabeiro ve Casado 1988, Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989, Gordo ve Bandera 1997). Sunulan çalışmada literatürde belirtilenden farklı olarak kültürün %5 CO<sub>2</sub> olmadan sadece 37 °C' de inkübe edilmesinin kist gelişimini yavaşlatan bir etmen olabileceği düşünülmektedir.

Protoskolekslerin canlılık oranlarının ve morfolojilerinin kültür gelişimini etkilediği tespit edildi. Protoskolekslerin kültür edilmeden önce uzun süre buzdolabında veya derin dondurucuda bekletilmelerinin normal morfolojilerini bozduğu özellikle tegümentin yapısını etkilediği ve böylece kültür gelişiminin sağlanamadığı ve protoskolekslerin kısa bir sürede canlılıklarını yitirdikleri yapılan denemelerde gözlenmiştir. Bu nedenle protoskolekslerin bekletilmeden kültüre edilmeleri kültürün devamlılığı için önemlidir.

Literatürde kültür süresince 3-4 günde bir besiyeri değişiminin yapıldığı bildirilmektedir (Rodriguez-Caabeiro ve Casado 1988, Casado ve Rodriguez-Caabeiro 1989, Gordo ve Bandera 1997). Yaptığımız denemelerde 7-10 günde bir besiyeri değişimi yapmanın yeterli olduğu ancak gerek görüldüğü takdirde daha erken besiyeri değişimi yapılabileceğini tespit ettik. Çalışmalarımızda 3-4 günde bir besiyeri değişimi yapıldığında alınan sonuç ile 7-10 günde bir hatta bazen 15 günde bir ile besiyeri değişimi yaparak alınan sonuçlar birbirine yakındı. Daha geç besiyeri değiştirmenin hem kontaminasyon riskinin azalması bakımından hem de daha az malzame sarfiyatı bakımından önemlidir.

Kültür süresince oluşabilen olumsuz şartlar (kontaminasyon, pH değişikliği gibi) karşısında protoskolekslerin ve mikrokist öncesi yapıların çok çabuk etkilenerek canlılıklarını kaybettikleri halbuki laminar membranı gelişmiş mikrokistlerin etkilenmediği gözlemlendi. Böyle olumsuz koşullarda mikrokistlerin canlılığını devam ettirmelerinin laminar membranın koruyucu özelliğinden kaynaklandığı anlaşılmaktadır. İn vivo koşullarda paraziti konağın bağışık sisteminden koruyan ve yaşamını sürdürmesinde önemli rol

oynayan laminar membranın in vitro koşullarda da paraziti koruduğu ve adeta bir bariyer oluşturduğu anlaşılmaktadır.

Parazitlerin in vitro kültür çalışmaları, özellikle konak dokusu olmadan sadece paraziti gözlemlemek ve gelişimini daha iyi anlamak bakımından önemlidir. *E. granulosus* paraziti ile ilgili yaptığımız geniş kapsamlı çalışmamızın bu bölümünde parazitin morfolojisi, gelişimi ve kist oluşumu ile ilgili daha detaylı bilgi edinerek paraziti daha ayrıntılı tanınması mümkün oldu. Gelişmenin farklı aşamalarında kültürü durdurmak ve bu aşamalarda sentezlenen genleri çalışabilmek, ilaç etkinliği çalışmaları, aşı geliştirme çalışmaları ve gelişmeyi kontrol eden mekanizmalara müdahale edebilme şansı *E. granulosus* kültürünün ileriki çalışmalarda da etkin bir şekilde kullanılacağını göstermektedir.

*E. granulosus* protoskoleks ve germinatif membranın çekirdek (nükleer) organizasyonu on altı saatlik kültür ve tespit (fiksasyon) çalışmaları ile tanımlandı. Parazitin morfolojisini daha iyi anlayabilmek için yapılan bu çalışmada protoskolekslerin vantuzlar da dahil olmak üzere tüm vücut yüzeyini kaplayan tegümentin tamamen hücrelerden oluştuğu, çengellerin ise hücresele bir yapısının olmadığı gözlemlendi. Ayrıca, 16 saat kültüre tabi tutulan protoskolekslerin %70-80' inin skoleks kısımlarının vücut kısımlarından dışa doğru çıktığı (evagine) belirlendi. Bu sürede arka kese oluşumu tespit edilmedi. Germinatif membran kültür çalışması sonucunda ise hücrelerin çok yoğun olmadığı ancak yer yer hücresele odakların bulunduğu gözlemlendi. Germinatif membranda hücresele odakların görülmesi bu bölgelerden protoskolekslerin tomurcuklanması yönünde bir hazırlık olabileceğini düşündürmektedir.

*E. granulosus* protoskoleksinin çevresel koşullara göre gerek larval gerek erişkin parazit yönündeki gelişimlerinde bir çok morfolojik, fizyolojik ve metabolik değişiklik meydana gelmektedir (Eckert ve Thompson 1988, Thompson ve Lymbery 1988, Bowles ve ark 1992, Bowles ve McManus 1993a, Thompson ve Lymbery 1996, Eckert ve Thompson 1997, McManus ve ark 2002, Maizels ve Kurniawan-Atmadja 2002, Kamanetzky ve ark 2002, Dinkel ve ark 2004). Özellikle kistin germinatif membranının laminar membran ve protoskoleksleri üretmesi sırasında, germinatif zar hücrelerinde ve hücre iskeletinde sürekli bir değişiklik, yeniden düzenlenme ve oluşum meydana gelmektedir. Bu değişiklikler gen düzeyinde meydana gelen değişiklikler ve düzenlemeler sonucu gerçekleşmektedir. Bu çalışmada aktin genini seçmemizin sebebi; aktin proteininin

hücre iskeletinin ana bileşeni olması ve hücre iskeletinin de organizmaların gelişim ve farklılaşma süreçlerinde, hücrelerde meydana gelen her türlü morfolojik değişikliklerde anahtar rol oynamasıydı. Bu nedenle bugüne kadar pek çok organizmada, gelişim süreçlerinde aktin genlerinin ifadeleri çalışılmıştır (Firtel 1981, McKeown ve ark 1982, Matsumoto ve ark 1988, Silva ve ark 1993, Schriefer ve ark 1994, Oliveiro ve ark 1998, Ambrosio ve ark 1998, Mykles ve ark 2000, Cortez-herreira ve ark 2001, Zhang ve ark 2003c). Ancak *E. granulosus*' da şimdiye kadar sadece Zhang ve ark (2003c) erişkin parazitin farklılaşması ile ilgili yaptıkları bir çalışmada aktin 1 (*EgactI*) geninin ifadesini çalışmışlardır. Bugüne kadar Aktin 2 (*EgactII*) geninin gelişim sürecindeki ifadesi ise çalışılmamıştır.

Hücrelerde gen ifadelerinin tespit edilebilmesi öncelikle o hücrelerdeki mRNA'ların elde edilmesi ile mümkündür. mRNA'nın eldesinde amaca uygun yöntem kullanmak, RNaz kontaminasyonunu en aza indirmek, hızlı ve etkin homojenizasyon yapmak, mRNA'nın kalitesi bakımından önemlidir. Bu çalışmada parazitten RNA eldesinde sıkça kullanılan ve tavsiye edilen TRIzol reagent kullanıldı. Yöntem, üreticinin önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Protoskolekslerin homojenizasyonu, doku parçalayıcısı (politron) olmadığı için, Zhang'ın önerdiği şekilde -80°C' de soğutulmuş havan ve tokmak kullanılarak ezme suretiyle gerçekleştirildi (kişisel görüşme). RNaz kontaminasyonundan kaçınmak için steril şartlarda, güvenlik kabini ve RNaz inhibitörü olan DEPC ile muamele edilen malzeme ve solüsyonlar kullanılarak çalışıldı.

Hedeflenen gen bölgesinin ifadesini ortaya koyabilmek için elde edilen mRNA'nın cDNA'ya çevrilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada protoskolekslerdeki aktin genlerinin ifadesinin tespitinde, mRNA'dan cDNA'nın sentezi ve elde edilen cDNA'ların çoğaltılması esasına dayanan RT-PZR tekniği kullanıldı. Bu teknik etkin ve spesifik olması bakımından tercih edildi. Zhang ve ark (2002)'nin yaptığı çalışmada ilk kez sestodlardan *E. granulosus*'da safhaya özgü genlerin ifadesinin tespitinde RT-PZR tekniği kullanılmıştır. Bu çalışmada RT-PZR ile alınan sonuçların Northern blot tekniği ile desteklendiği ve bu tekniğin safhaya özgü genlerin çalışılmasında etkin bir yöntem olduğu kabul edilmiştir (Zhang ve ark 2003c).

Sunulan çalışmada RT-PZR analizlerini takiben yapılan agaroz jel elektroforez sonuçlarına göre protoskolekslerde aktin 2 (*EgactII*) geninin ifade edildiğini tespit edildi. Aktin 1 (*EgactI*) geninin ise protoskolekslerde ifade edilmediği görülmüştür. Silva ve ark.

(1993) yaptıkları çalışmada *E. granulosus* aktin genlerini (*Egact1* ve *Egact2*) tanımlamışlar ve bunlardan aktin 1 geninin (*EgactI*) protoskolekslerde ifade edildiğini aktin 2 geninin (*EgactII*) ise protoskolekslerde ifade edilmediğini rapor etmişlerdir. Zhang ve ark (2002) *E. granulosus*' un onkosfer, protoskoleks, olgunlaşmamış ve olgunlaşmış erişkin formlarında *egM12*, *egM13*, *egM22*, *egM26*, *egM30* ve *egM34* genlerinin ifadelerindeki farklılıklara bakarak safhaya özgün genleri tespit etmeye çalışmışlar ve kontrol olarak da aktin 1 genini kullanmışlardır. Bu çalışma sonucunda tüm safhalarda aktin 1 geninin ifade edildiğini rapor etmişlerdir (Zhang ve ark 2003c). Çalışmamızda protoskolekslerden aktin 1 geninin PZR ürünü elde edilmesine rağmen ifadesinin tespit edilememesi yani cDNA elde edilememesi RNA izolasyon aşamasında total RNA' nın tam olarak elde edilememiş olabileceğini veya aktin 1 mRNA' sının parçalanmış olabileceğini düşündürse de, bu çalışmanın yapıldığı protoskolekslerde aktin 1 geninin ifade edilmediği anlaşılmaktadır .

Literatürde belirtildiği gibi protoskolekslerde aktin 1 geni de sentezleniyorsa, bu her iki genin de aynı anda protoskolekslerde sentezlenebileceğini göstermektedir. Oliveira ve ark (1998)' nin yaptıkları çalışmada *S. mansoni*' nin iki aktin geninin bulunduğu ve in vitro gelişiminin ilk yedi günlük süresince her iki aktin geninin (aktin izoformları) de ifade edildiği rapor edilmiştir. Files ve ark (1983) *C. elegans*' ın dört aktin geninin olduğunu ve parazitin gelişimi süresince bu genlerden üçünün ifade edildiğini tespit etmişlerdir. Silva ve ark (1993) yaptıkları çalışmada *E. granulosus*' da tanımladıkları iki aktin geninden farklı olarak bir başka aktin genine ait cDNA' nın da tanımlamasını yapmışlar ve bu genin de protoskolekslerde ifade edildiğini belirtmişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada, aktin cDNA' sını prob olarak kullanarak yaptıkları Southern Blot ve enzim kesimi çalışmaları sonucunda *E. granulosus* parazitinde en az 8 aktin ile ilgili gen bölgesinin olduğu da rapor edilmiştir (Silva ve ark 1993). Protoskolekslerde farklı aktin genlerinin aynı anda ifade edilmesi de mümkündür ve bu sonuç aktin genlerinin ifade ettiği aktin proteinlerinin birbirinden farklı işlev yaptığını göstermektedir.

Bugüne kadar *E. granulosus*' da ve farklı organizmalarda yapılan bir çok çalışmada, Aktin proteinlerinin gelişme ve farklılaşma olaylarında olduğu kadar yapısal işlevlerinde de aktif rol oynadıkları rapor edilmiştir. Ambrosio ve ark (1998) yaptıkları çalışmada sestodlardan *T. solium*' da florosan işaretlemeye aktin proteininin mevcudiyetini göstermişlerdir. Bu çalışmada aktin proteini invagine skolekste, kas zonunda ve çekmenlerde gözlenmiştir (Ambrosio ve ark 1998). Yapılan bu çalışma ile ilk kez aktin



proteininin sestodlardaki dağılımı ortaya konmuştur (Ambrosio ve ark 1998). Matsumoto ve ark (1988) tegümentin bağışık cevapta ve parazit homeostazisinde önemli rol oynadığını ve tegümental bileşenlerin aşı ve ilaç geliştirilmesinde kullanılabileceğini rapor etmiştir. İmmunoelektron mikroskopi çalışmasıyla, *S. mansoni*' nin tegümental yapısının aktin ve paramyosinden oluştuğu ve yüzey çıkıntılarının (iğne) aktin filamentlerinin parakristalin yapısından meydana geldiği bildirilmiştir (Matsumoto ve ark 1988). Yine bu çalışmada aktinin hasarlı alanlarda mevcut olduğu ve tegümental tamirde bu yapısal proteinin önemli rol oynadığına işaret edilmiştir (Matsumoto ve ark 1988). *E. granulosus*' da protoskolekslerin tegümentinde ve germinatif membranın laminar membrana bağlanma bölgesinde sitoplazmik uzantılar olan mikrotriksler bulunmaktadır. Tegüment, parazitin beslenmesi, konağın immunolojik ve enzimatik ataklarına karşı korunması ve iyon değişimi gibi önemli işlevlere sahiptir (McManus ve Barrett 1985, Casado ve ark 1994). Tegümentin yüzeyi mikrotriksler vasıtasıyla artmaktadır ve mikrotrikslerin olumsuz çevre koşullarında sayılarının artması bu oluşumların aynı zamanda parazitin savunma sistemi için de önemli olduğunu göstermektedir (Casado ve ark 1994). Mikrotriks adı verilen bu sitoplazmik çıkıntılarının oluşmasında aktin proteinlerinin de rol oynadığı düşünülebilir.

Aktin genleri ve onların ifade ettikleri aktin proteinlerinin hem hücrelerin gelişimi ve farklılaşmasında hem de yapısal işlevlerinde önemli yere sahip olmaları, bu gen ve proteinlerinin organizmalar için yaşamsal olduğunu göstermektedir. İlaç ve aşı çalışmalarında aktin gen veya proteinlerinin hedeflenmesi ve bunların inhibe edilebilmesi bu parazitin gelişmesini engelleyeceği gibi oluşan kistlerin gelişimini de durduracak ve cerrahi operasyon veya PAİR-PD' ye gerek kalmadan kist etkisiz hale gelebilecektir. Bu hedefe ulaşabilmek için mevcut problemler öncelikle çözümlenmelidir. Bu problemler kistin farklı gelişim aşamalarında aktin gen ifadesinin profilini çıkarmak, aktin ile ilgili diğer gen bölgelerini tanımlamak ve türler arasında ve tür içinde aktin gen çokyapılılığını tamamen ortaya koymaktır. Sunulan çalışma ile protoskolekslerde aktin 1 ve 2 genlerinin ifadesi ve bu aktin genlerindeki gen çokyapılılığı (polimorfizm) çalışılmıştır.

Bugüne kadar bir çok bilim adamı konak tercihi, morfolojik, immunolojik, fizyolojik, biyokimyasal farklılıkların parazitlerin genetik çeşitliliği ile ilgili olduğu konusunda birleşmiştir (Thompson 1986, Eckert ve Thompson 1988, Thompson ve Lymbery 1988, McManus ve Rishi 1989, Thompson ve Lymbery 1991, Bowles ve ark 1992, Bowles ve McManus 1993a, Thompson ve Lymbery 1996, Eckert ve Thompson 1997, McManus ve ark 2002, Maizels ve Kurniawan-Atmadja 2002, Kamanetzky ve ark

2002, Dinkel ve ark 2004). Bu genetik farklılıkların parazitin tanısı, ilaç ve aşı tasarımı ve geliştirilmesi gibi yaklaşımlar için önemli olduğu düşünülmektedir (Bowles ve ark 1992, Eckert ve Thompson 1997, Thompson and McManus 2001, McManus ve Thompson 2003, Maizels ve Kurniawan-Atmadja 2002, Kamanetzky ve ark 2002). Son yıllarda *E. granulosus* parazitinin tür içi çeşitliliğini ortaya koymaya yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Çekirdek ve mitokondriyal genom çalışmaları sonucunda *E. granulosus*' un on genotipi (alt tür) tanımlanmıştır (Bowles ve ark 1992, Bowles ve McManus 1993a, Thompson ve ark 1995, Eckert ve Thompson 1997, Scott ve ark 1997, Zhang ve ark 1998, McManus ve ark 2002, Lavikainen ve ark 2003, Dinkel ve ark 2004). Yapılan çalışmalarla bazı genotipler arasında tespit edilen genetik farklılıkların türler arasındaki farklılıklar kadar fazla olduğu da belirtilmiştir (Bowles ve McManus 1993a, Bowles ve McManus 1993b, McManus ve ark 2002). Bu nedenle genetik özellikler dikkate alınarak yeniden taksonomi çalışmalarının yapılması gerektiği de ifade edilmiştir (Bowles ve McManus 1993a, Bowles ve McManus 1993b, Bowles ve ark 1995, Lymbery 1995, Thompson ve ark 1995, Eckert ve ark 1997). *E. granulosus*' un Türkiye' deki genotiplendirilmesi ise henüz yapılmamıştır. Burada sunulan bulgular Türkiyede yapılan ilk çalışmadır.

Parazitin gelişme ve farklılaşma olayları sürecinde görülen her alandaki farklılık sadece alt türler arasındaki genetik farklılıktan değil, bu alt türlerin kendi içinde gösterdikleri gen çok yapılılığından da kaynaklanmaktadır. Ancak bugüne kadar parazitlerdeki gen çok yapılılığı ile ilgili elde edilen bilgiler oldukça azdır. Oysa gen çokyapılılığı özellikle aşı olmaya aday genlerde önemlidir (Maizels ve Kurniawan-Atmadja 2002 ).

Bowles ve ark (1992) 56 farklı kistten topladıkları *E. granulosus* protoskolekslerinin CO1 geninde 76 farklı pozisyonda nükleotid yer değiştirmesi tespit etmişlerdir. Yine bu çalışmada *E. multilocularis* CO1 geninde çok düşük değişim olduğunu bildirmişlerdir. Mari ve ark (1993) ise *E. granulosus*' un tekrarlayan DNA dizilerinde çok yapılılığın olduğunu belirtmişlerdir. Haag ve ark (1998b) yaptıkları çalışmada farklı coğrafik bölgeden (Avustralya, Avrupa, Güney Brezilya) ve konaklardan (sığır, at, koyun) topladıkları 110 *E. granulosus* ve yine farklı coğrafik bölgelerden (Asya, Avrupa, Kuzey Amerika) ve konaklardan (tilki, insan, kemirgen) topladıkları 33 *E. multilocularis* ile 1 *E. vogeli* kistlerinden elde ettikleri protoskolekslerde PZR-SSCP analizi ile kodlanan ve kodlanmayan toplam dört gen bölgesinde, türler arasında farklılıklar olduğunu bildirmişlerdir. Kodlanmayan bölge olan Hbx2 bölgesinin yüksek derecede korunmuş

olduğu (monomorfik) ve AgB/1 nükleer kodlama bölgesi ile *EgactII* intron kodlanmayan bölgesinin ise çeşitlilik gösterdiği rapor edilmiştir (Haag ve ark 1998b). Yine bu çalışmada en çok çeşitliliğin mitokondrial ND1 geninde olduğu da ifade edilmiştir. Gonzales ve ark (2003) *E. granulosus*' un İspanya' da çok yaygın görüldüğü orta bölgesinde yaptıkları çalışmada, 53 farklı kiste ait protoskoleksde, *Eg8*, *Eg9* ve *Eg16* gen bölgelerinin PZR-RFLP analizleri sonucunda farklılıkların bulunduğunu ifade etmişlerdir. Bartholomei-Santos ve ark (2003) ise yaptıkları çalışmada tek bir hidatid kistten topladıkları protoskolekslerde gen çok yapıllılığının olmadığını belirtmişlerdir. Nakao ve ark (2003) yaptıkları moleküler filogenetik çalışmada ise *E. granulosus*' un *E. multilocularis*' e oranla daha yüksek değişim gösterdiğini rapor etmişlerdir.

*E. granulosus* protoskolekslerinde gen çokyapılılığı üzerinde yapılan çalışmaların çok sınırlı düzeyde olmasının sebebi hidatid kist hastalığının gelişmiş batı ülkelerinde yaygın olmamasından kaynaklanmaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda allelik polimorfizm ve heterozigotluğun çok nadir görüldüğü rapor edilmiştir (Lymbery ve Thompson 1988, Haag ve ark 1997 ve 1998a, Nakao ve ark 2003). Haag ve ark (1998b) ikisi kodlanan ve ikisi kodlanmayan dört gen lokusunda allelik polimorfizme rastlamadıklarını rapor etmişlerdir. Lybery ve Thompson (1988) yaptıkları çalışmada iki gen lokusunda allelik polimorfizmin bulunduğunu ancak bu polimorfik lokuslarda heterozigotlara rastlanmadığını belirtmişlerdir. Nakao ve ark (2003) ise yaptıkları çalışmada mikrosatellit allellerinde heterozigosite bulduklarını ifade etmişlerdir. Smyth ve Smyth (1964) *E. granulosus*' un üremesinde self-fertilizasyon (kendi kendini dölleme) modelinin yaygın olduğunu ve bunun da mutant genlerin ifade edilmesine yol açtığını rapor etmişlerdir. Smyth ve Smyth (1964)' in bu modeline göre ifade edilen bu mutasyonlar protoskolekslerin aseksüel üremeleri ile binlerce protoskolekse aktarılırlar ve böylece genetik çeşitlilik oluşur (Lymbery ve Thompson 1988). Bu modele alternatif olarak Rauch ve ark (1985)' nin sunduğu modelde ise *E. granulosus*' un üremesinde cross-fertilizasyon (çapraz dölleme) olduğu ileri sürülmüştür (Lymbery ve ark 1997). Self-fertilizasyonun homozigotluğu artırırken cross-fertilizasyonun heterozigotluğu artırdığı bilinmektedir (Lymbery ve Thompson 1988, Lymbery ve ark 1990 ve 1997). *E. granulosus* parazitinin yaygın olarak self-fertilizasyonla çoğaldığı, cross-fertilizasyonun da bulunduğu ancak çok nadir görüldüğü ve bunun da *E. granulosus* türleri arasında heterozigotluğun ortadan kalkması ile sonuçlandığı rapor edilmiştir (Lymbery ve Thompson 1988, Lymbery ve ark 1990 ve 1997, Haag ve ark 1999). Nakao ve ark (2003) homozigotluğun yaygın

olarak görülmesinde, protoskolekslerin aseksüel çoğalmalarının da etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Yaptığımız çalışmada PZR-RFLP analizleri sonucunda, aktin 1 ve 2 gen bölgelerinde (*EgactI* ve II) gen çok yapılılığının bulunduğunu (polimorfizm) tespit ettik. Aktin 1 geninin TaqI enzim kesimi sonrasında 30 nolu DNA örneğinde ve aktin 2 geninin TaqI enzim kesimi sonrasında 8 nolu DNA örneğinde DNA' lar kesilmemiştir. Bu sonuca göre, belirtilen DNA örneklerindeki aktin 1 ve 2 genlerinin TaqI enzimini tanıma bölgesinde nükleotid yerdeğiştirmelerinin olduğunu düşünmekteyiz. Bu DNA örneklerinin ait olduğu kistler, multikistik yapıda olan kistlerdi. Bunlardan 8 nolu kistin protoskolekslerinin canlılık oranının düşük olduğu da gözlenmişti.

PZR-RFLP analizi ile *EgactI* geninde allelik gen çok yapılılığının (allelik polimorfizm) olduğunu da ortaya koyduk. *EgactI* geninin AluI enzim kesimi sonrasında yaptığımız agaroz jel elektroforezinde bazı DNA örneklerinin beklediğimiz kesim ürünlerini verirken bazı DNA örneklerinin hem beklediğimiz kesim ürünleri hem de farklı kesim ürünlerini verdiğini tespit ettik. Böylece *EgactI* geninin iki allelinin olduğu belirledik. Bu beklenmedik kesim ürünlerinin büyüklüğünün, 1 ve 2. kesim ürünlerinin büyüklüklerinin toplamına denk gelmesi bu allelde AluI enziminin 1. tanıma bölgesinin kaybolduğunu göstermekteydi. Allelin birinde AluI enzimi tanıma bölgeleri korunurken diğer allelde bu tanıma bölgelerinden ilkinde nükleotid yer değiştirmelerinin olduğu düşünülmektedir. Allelik polimorfizm gösteren bu DNA' ların ait olduğu kistler genellikle uniloküler kistlerdi. Ayrıca insan tutulumlu, 26 nolu kistin de allelik polimorfizm gösterdiği tespit edildi. Sonuçlarımıza göre sadece bir DNA örneği hariç tüm DNA örneklerinin *EgactI* ve *EgactII* geni bakımından homozigot olduğu tespit edildi. Bu sonuçlar, literatürde belirtilen *E. granulosus*' da self-fertilizasyon ile heterozigotluğun ortadan kalktığı ve homozigotluğun hakim olduğu görüşünü desteklemektedir. Ayrıca *EgactI* geninin AluI enzimi ile kesimi yapılan tüm bu DNA örneklerinde 3. kesim bölgesinin olmadığını ve bu nedenle 42 ve 73 bp büyüklüğünde beklediğimiz ürünler yerine 115 bp büyüklüğünde tek bir ürünün oluştuğunu gözledik. Bu sonuç, tüm DNA örneklerinin *EgactI* gen bölgesinde AluI enziminin 3. tanıma bölgesinin olmadığını göstermektedir. Bu genomik yapının Anadolu koyun türüne ait olabileceğini ve Gen Bankasında mevcut olan diziden farklı bir genomik yapı gösterdiğini düşündürmektedir. Aktin 2 gen bölgesinin AluI enzim kesimi sonrasında yapılan agaroz jel elektroforezinde

ise tüm DNA örneklerinde beklenen büyüklükteki ürünler gözlenmiş ve gen çok yapılılığına rastlanmamıştır.

*E. granulosus* parazitinin gelişme ve farklılaşma ile ilgili olan aktin genlerindeki gen çok yapılılığının araştırılmasında PZR-RFLP tekniği başarıyla kullanılmıştır. Bu yöntemin türler arasında ve tür içindeki çeşitliliğin ortaya konmasında etkin ve güvenilir bir yöntem olduğu diğer çalışmalarda olduğu gibi (Bowles ve McManus 1993b, Dinkel ve ark 2004, Gonzales ve ark 2003, McManus ve ark 2002, Zhang ve ark 1998) buradaki çalışmalarda da gözlenmiştir. Farklı çevre ve konaklardan toplanan kistlerin görünümünde ve organ tutulumlarında çeşitliliğin olduğunu gözlemledik. Kistlerin morfolojisi ve gelişimindeki bu çeşitlilikte aktin gen çok yapılılığının da etkisi olabilir. Bu konunun açıklığa kavuşması için gelişme ve farklılaşma ile ilgili genler ve gen ürünleri üzerinde çalışmaların devam etmesi gerekir, klinik çalışmalara paralel olarak moleküler çalışmaların başlayabilmesi için deneysel tecrübe kazanılmıştır.

Ekinokokkus parazitinin yol açtığı hidatid kist hastalığının insan sağlığına olumsuz etkileri, kaliteli yaşamı zorlaştırması yanı sıra hayvancılığın yapıldığı bulaşmış bölgelerde sosyal ve ekonomik zararlarına rağmen kistik büyümenin moleküler mekanizması henüz çözülememiştir. Olgun parazit yumurtalarına karşı geliştirilmiş olan rekombinant EG95 ve EM95 aşuları, yayılmış yumurtalarının insan ve hayvan vücuduna girip kan dolaşımına katılıp çimlenmesine karşı bağışık cevabın oluşmasında etkin olan aşılardır. Bulaşmış bölgelerde parazitin tamamen ortadan kaldırılması programında da başarılı sonuçlar alınmıştır (Heath ve Holcman 1997, Lightowers ve ark 1996, Woollard ve ark 1998, Gauci ve ark 2002). Büyükbaş otçul ara konakçılarda yumurta çimlenmesine rağmen oluşan germinatif zar tomurcuklanamamakta ve kist oluşmamaktadır (Zhang ve 2003a). Bu çalışma daha önce germinatif membrana karşı geliştirilebilecek aşı için bir alt yapı çalışması olarak tasarlanmıştır. Larval protoskolekslerin skolosidal ajanlara karşı çok hassas olduğu daha önce çalışılmıştı (Arıkoğlu ve ark 2000). Larval parazitin kist oluşumunun zayıflatılmasının mekanizması anlaşıldıktan sonra germinatif membrana karşı etkin bir aşı geliştirilmesi mümkün olacaktır. Bu sayede hidatid kist tutulumlu hastaların bu aşı sayesinde herhangi bir cerrahi müdahaleye gerek kalmadan tedavileri mümkün olacaktır. Ekinokokkus türlerinin seksüel ve somatik yolla çoğalma ve farklılaşma özelliği bakımından germinatif membran, kök hücre kümeleri olarak düşünülebilir ve farklılaşma ve büyüme mekanizmalarının moleküler temelini ortaya koymada ideal bir model olabilir.

Dolayısıyla, kanser gelişiminin kontrol altına alınmasında pek çok bilgilerin kazanılmasına da yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Sonuçlarımızın ışığında, gelişme ve farklılaşmadan sorumlu olan aktin genlerinin aşı geliştirme çalışmaları için aday gen olabileceğinin yanı sıra, epidemiyolojik çalışmalarda türler arası ve tür içi genetik çeşitliliğin belirlenmesinde moleküler belirleyiciler olarak da kullanılabileceğini düşündürmektedir.



## 6. ÖZET

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Tıbbi Biyoloji Bilim Dalı  
DOKTORA TEZİ / KONYA-2005

Hilal ARIKOĞLU

### ***Echinococcus granulosus*'un İn Vitro Çoğalma Özellikleri ve Protoskolekslerde Aktin Gen İfadesi ile Aktin Gen Çokyapılılığının (Polimorfizm) Araştırılması**

Kistik ekinokokkozis veya hidadit kist hastalığı, *Echinococcus granulosus* parazitinin larval formunun sebep olduğu bir hastalıktır. Dünya çapında pek çok ülkede insan sağlığı bakımından olduğu kadar ekonomik bakımdan da tehdit oluşturan bu hastalığın kesin tedavisi de olmadığı için hala önemini ve güncelliğini korumaktadır. Sunulan çalışmada *E. granulosus* parazitinin in vitro koşullarda larval gelişiminin tanımlanması, protoskoleks ve germinatif membranın hücrel organizasyonunun ortaya konulması, aktin genlerinin (*EgactI* ve II) protoskolekslerdeki ifadesinin tespiti ile aktin genlerinin gen çokyapılılığının (polimorfizm) ortaya konulması hedeflendi. Aktin proteininin hücre iskeletinin ana bileşeni olması ve hücre iskeletinin de organizmaların gelişim ve farklılaşma süreçlerinde, hücrelerde meydana gelen her türlü morfolojik değişikliklerde anahtar rol oynaması nedeniyle aktin geni hedef gen olarak seçildi. Aktin genlerindeki olası çeşitliliğin kist gelişimi, farklılaşması, patogenezi ve konak tercihi gibi özelliklerde farklılıklara yol açabileceği düşünüldüğü için bu genlerdeki çok yapıllığın ortaya konulması planlandı. Çalışmada Konya ve çevresi ile Karapınar' dan temin edilen koyun tutulumlu 38 farklı kiste ait protoskoleks ile S.Ü.Meram Tıp Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalında ameliyat sonucu temin edilen insan tutulumlu 1 kiste ait protoskoleksler çalışıldı. Protoskoleksler 3-4 kez yıkama solüsyonları ile yıkandı ve ışık mikroskopunda canlılık oranı araştırıldı. Canlılık oranı %80-100 arasında tespit edilen protoskolekslerin bir kısmı kültüre edildi kalan kısmı ise -80°C 'de kullanılıncaya kadar depolandı. Kültür süresince protoskolekslerin gelişimi inverted ışık mikroskobu ile takip edildi ve fotoğraflandı. Protoskolekslerin ve germinatif membranların hücrel

organizasyonunu ortaya koymada ise ışık mikroskobu kullanıldı. DNA ve RNA izolasyonları -80°C’de depolanan protoskolekslerden TRizol reagent (Gibco, BRL) kullanılarak başarıldı. Primerler, Gen Bankasından (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer>) temin edilen *EgactI* ve II genlerinin nükleotid dizileri dikkate alınarak tasarlandı. RT-PZR tekniği kullanılarak hedef genlerin protoskolekslerdeki ifadeleri tespit edildi. PZR-RFLP tekniği ile bu gen bölgeleri çoğaltıldı ve PstI, AluI ve TaqI enzimleri kullanılarak olası çeşitlilik araştırıldı. Kesim ürünleri agaroz jel elektroforezde yürütülerek sonuçları değerlendirildi. İn vitro kültür şartlarında *E. granulosus*’ un protoskoleksten mikrokist yönündeki gelişimi başarıyla tamamlandı. Bu gelişim boyunca gözlemlenen başlangıç, vakuolizasyon, mikrokist öncesi ve mikrokist safhaları literatürle uyumlu bulundu. Parazitlerin in vitro kültür çalışmaları, özellikle konak dokusu olmadan sadece paraziti gözlemek ve gelişimini daha iyi anlamak bakımından önemlidir. Gelişmenin farklı aşamalarında kültürü durdurmak ve bu aşamalarda sentezlenen genleri çalışabilmek, ilaç etkinliği çalışmaları, aşı geliştirme çalışmaları ve gelişmeyi kontrol eden mekanizmalara müdahale edebilme şansı *E. granulosus* kültürünün önemini ve etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada *E. granulosus* protoskoleks ve germinatif membranın hücrel organizasyonu da tanımlandı. Parazitin morfolojisini daha iyi anlayabilmek için yapılan bu çalışmada protoskolekslerin vantuzlar da dahil olmak üzere tüm vücut yüzeyini kaplayan tegümentin tamamen hücrelerden oluştuğu, çengellerin ise hücrel bir yapısının olmadığı gözlemlendi. Germinatif zar hücrelerinin çok yoğun olmadığı ancak yer yer hücrel odakların bulunduğu tespit edildi. Hücrel odakların bulunması, bu bölgelerden protoskolekslerin tomurcuklanması yönünde bir hazırlık olabileceğini düşündürmektedir. Sunulan çalışmanın diğer bölümünde, RT-PZR analizlerini takiben yapılan agaroz jel elektroforez sonuçlarına göre protoskolekslerde aktin 2 (*Egact2*) geninin ifade edildiği ve Aktin 1 (*EgactI*) geninin ifade edilmediği tespit edildi. PZR-RFLP analizleri sonucunda ise *EgactI* ve *EgactII* genlerinde iki örnekte nükleotid değişikliği olduğu ve sadece bir örnekte heterozigotluğun bulunduğu tespit edildi. *E. granulosus*’ da kendi kendine döllenme (self-fertilizasyon) sisteminin yaygın olması, tür içinde homozigotluğun hakim olmasına ve heterozigotluğun kaybolmasına yol açmaktadır. Ayrıca çalışılan tüm örneklerde aktin I genindeki AluI enzimi tanıma bölgelerinden birinin olmadığı tespit edildi. Bu çalışmada analizi yapılan protoskolekslerdeki genomik yapının Anadolu koyun türüne özgün olabileceği ve Gen Bankasında mevcut olan diziden farklı bir genomik yapı gösteriyor olabileceği düşünülmektedir. Üstelik bu çalışmada aktin I gen bölgesinin allelik gen çokyapılılığı



gösterdiği de tespit edilmiştir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda *E. granulosus*'da allelik gen çokyapılılığının çok nadir olduğu rapor edilmişti. Hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasında etkin rol oynadığı bilinen aktin genlerinde görülen bu çeşitlilik ve allelik gen çokyapılılığının, kist hidatiğin büyüme ve gelişmesini etkileyebileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçların ışığında *E. granulosus* aktin genlerinin, aşı geliştirme çalışmaları için aday gen olabileceği ve epidemiyolojik çalışmalarda türler arası ve tür içi genetik çeşitliliğin belirlenmesinde moleküler belirleyici olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.



## 7. SUMMARY

Hilal ARIKOĞLU

### **In Vitro Proliferation Features of *Echinococcus granulosus* and Determination the Expression of Actin Genes and their Polymorphisms in Protoscoleces**

Cystic Echinococcosis, caused by the larval satage of the tapeworm *Echinococcus granulosus*, is a global zoonotic infection which has adverse economical impact and constitutes a threat to public health in many countries. *E. granulosus* requires an intermediate and a definitive host to complete its life cycle. The adult worm lives in the small intestine of dogs and other canids and the metacestode or hydatid cyst develops in the intermediate host viscera which can be ovine, bovine or humans, producing protoscoleces by asexual multiplication. The development of the hydatid cyst and prduction of protoscoleces involve important changes in cell morphology and physiology. Actin genes are certainly important targets of such differentiation processes, since actin-coordinated cell movements are essential in cell growth and differentiation. In this study we aimed to describe the larval development of *E. granulosus* in the laboratory conditions and the cellular organization of the protoscoleces and germinative membrane, and the detection for transcriptional activity and associated polymorphisms of two actin genes from *E. granulosus*, namely *EgactI* and *EgactII*. The genetic heterogeneity is common within species of the genus *Echinococcus* and that these intraspecific variants or strains may play an important role with regard to epidemiology, control, pathogenicity, and some other related aspects. To date, ten strains (G1-G10) of *Echinococcus granulosus* have been identified using genetic data. The G1 group represents the predominant and well recognized 'sheep' strain of *E. granulosus*. Hydatid cysts were obtained from the liver and lungs of infected sheeps from central slaughterhouses of Konya and Karapınar and from infected humans surgical specimens obtained from General Surgery Department, Meram Medical Faculty, Selçuk University. Protoscoleces and germinative membrans were removed from the cysts aseptically. These materials were washed in Hank's solution or PBS (phosphate buffer solution) supplemented with gentamicin, and artificially digested in a pepsin solution at 37°C, for 40-60 minutes. Prior to culturing, the viability of protoscoleces were determined using staining test with eosinY. Cultures were maintained at 37°C and examined under inverted microscope. Cell organizations of protoscoleces and germinative membranes were obtained in the growth medium for 16 hour incubation. After

the incubation, the samples were suspended for 30 min in hypotonic solution and fixed in methanol:acetic acid (3:1). Preparations were stained with 5% Giemsa and observed by light microscope. For the molecular analysis, total RNA and genomic DNA were extracted from protoscoleces obtained 39 different cysts using TRIzol Reagent (Gibco, BRL) according to the manufacturers instructions. Differences in mRNAs of *EgactI* ve *EgactII* genes were determined using RT-PCR techniques. The PCR analysis was carried out using specific primers which were designed according to nucleotide sequence of *EgactI* and *EgactII* genes obtained from the GenBank™ through the National Center for Biothecnology Information (NCBI). Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of this target genes was performed using the restriction enzymes PstI, AluI and TaqI. Restriction products were analysed by agarose gel electrophoresis. As a result, in vitro larval development from protoscoleces to microcyst was succesfully completed. We observed four different stage; initial, vacuolization, premicrocyst and microcyst. In vitro cultures has been a useful and very advantagous approach such as determine the parasite tissue without host tissue, investigate stage-specific gene expression and localization of gene products, applications of chemotherapeutcs. In this study we determined the cellular organization of protoscoleces and germinative membranes. We observed all the tegumental surface of the protoscoleces is composed of cells and the germinative membranes are cell clusters. We suggest that the protoscoleces can be emerge from the cellular clusters of germinal layer. In this study the results of the RT-PCR analyses indicate that *EgactII* was expressed in protoscoleces but *EgactI* was not. As a result, we detect the nucleotide variations at two loci for the actinI and II genes within the sheep strain. The variations of G1 strain lead to the lowest intermediate host specificity and the wider geographic distribution. In this study we observed the heterozygosity at only one loci. An increase in homozygosty and loss of heterozygosity within populations of *E. granulosus* is well explained by self-fertilization. In *E. granulosus* populations, both selfing and outcrossing fertilization is occur but cross-fertilization is rare. In our study we detected the loss of one of the AluI enzyme recognition sites of the actin I genes in all samples. We concluded that this genomic structure may be spesific to Anatolian sheep strain and genetically distinct from other existing gene in the GenBank™ database. In this study allelic polymorphism was also found in the actin I gene although the degree of allele polymorphism detected within strains of *E. granulosus* was low in the previous studies. It's known that the actin proteins are suggested to act as key molecules in the process of cell differentiation and proliferation. This nucleotide variation and allelic polymorphism of actin genes may affect

the morphology and the development of cyst hydatid to give Anatolian strain. As a result, the actin genes can be used as molecular markers for epidemiologic studies and strain identification.



## 8. LİTERATÜR LİSTESİ

- Ambrosio J, Hernandez H, Reynoso O, Cruz M, Flisser A (1998)** *Tissular distribution and purification of Taenia solium actin in cysticerci*, Symposium on Environmental Adaptation of Echinococcus, pp, 33.
- Agoria A, Chalar C, Cardozo S, Salinas G (2003)** *Alternative mRNAs arising from trans-splicing code for mitochondrial and cytosolic variants of Echinococcus granulosus thioredoxin glutathione reductase*, Journal of Biological Chemistry, 278, 12920-8.
- Akkila WM, Chambers RL, Ornatsky OI, McDermott JC (1997)** *Molecular cloning of up-regulated cytoskeletal genes from regenerating skeletal muscle: potential role of myocyte enhancer factor 2 proteins in the activation of muscle-regeneration-associated genes*, Biochemical Journal, 325, 87-93.
- Aminzhanov M (1980)** *Immunoprophylaxis of hydatidosis in animals*, Tr Uzbek Nauchno-Issled Inst Vet, 30, 15-18.
- Arıkoğlu H (1996)** *Çeşitli organ tutulumlu kist hidatiğin histolojik yapısı ve perkütan drenaj çözeltilerinin skolekslerin canlılığına etkilerinin histolojik olarak değerlendirilmesi*, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Arıkoğlu H, Arslan A, Ödev K, Paksoy Y, Baykan M, Turhan AB, Dik B, Çiftçi K (2000)** *Skolosidal maddelerin in-vitro şartlarda Echinococcus granulosus skolekslerinin canlılığına etkileri ve bu maddelerin hidatid kistlerinde perkütan yolla kullanılmasının klinik değerlendirilmesi*, VI. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, , Denizli, pp 187-188.
- Bartholomei-Santos ML, Heinzelman LS, Oliveira RP, Chemale G, Gutierrez AM, Kamanetzky L, Haag KL, Zaha A (2003)** *Isolation and characterization of microsatellites from the tapeworm Echinococcus granulosus*, Parasitology, 126(6), 599-605.
- Benex J (1968)** *Considerations experimentales nouvelles sur l'évolution in vitro en milieu liquide des larves d'Echinococcus granulosus*, Annales de Parasitologie, 43, 561-72.
- Bortoletti G and Ferretti G (1978)** *Ultrastructural aspects of fertile and sterile cysts of Echinococcus granulosus developed in hosts of different species*, Int J Parasitol, 8, 421-431.
- Bortoletti G and Ferretti G (1973)** *Investigation on larval forms of Echinococcus granulosus with electro microscope*, Riv Parasitol, 34, 89-110.

- Bowles J, Blair D, McManus DP (1992)** *Genetic variants within the genus Echinococcus identified by mitochondrial DNA sequencing*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 54, 165-174.
- Bowles J, Blair D and McManus DP (1995)** *A molecular phylogeny of the genus Echinococcus*, *Parasitology*, 110, 317-328.
- Bowles J and McManus DP (1993a)** *Molecular variation in Echinococcus*, *Acta Tropica* 53, 291-305.
- Bowles J and McManus DP (1993b)** *Rapid discrimination of Echinococcus species and strains using a PCR-based RFLP method*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 57, 231-239.
- Brehm K, Jensen K, Frosch M (2000)** *mRNA trans-splicing in the human parasitic cestode Echinococcus multilocularis*, *The Journal of Biological Chemistry*, 275(49), 38311-38318.
- Bretagne S, Goillou JP, Morand M, Houin R (1993)** *Detection of Echinococcus multilocularis DNA in fox faeces using DNA amplification*, *Parasitology*, 106, 193-199.
- Bretscher A and Weber K (1979)** *Villin: the major microfilament associated protein of the intestinal microvillus*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 2321-2325.
- Brown SS, Yamamoto K and Spudich J (1982)** *A 40 000-dalton protein from Dictyostelium discoideum affects assembly properties of actin in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner*, *Journal of Cell Biology*, 93, 205-210.
- Browning CL, Culbertson DE, Aragon IV, Fillmore RA, Croissant JD, Schwartz RJ, Zimmer WE (1998)** *The developmentally regulated expression of serum response factor plays a key role in the control of smooth muscle-specific genes*, *Developmentally Biology*, 194, 18-37.
- Brundjak J, cvetnic S, Wikerhauser T (1970)** *Cystic development of the protoscoleces and brood capsules of Echinococcus granulosus in cell cultures and cell-free media*, *Veterinarski Arhiv*, 40, 292-6.
- Bui LT Stenzel DJ, Jones MK (1999)** *Reappraisal of vesicular types in the syncytial tegument of the Echinococcus granulosus protoscolex*, *Parasitol Res*, 85, 35-40.
- Bushel P, Kim JH, Chang W, Catino JJ, Ruley HE, Kumar CC (1995)** *Two serum response elements mediate transcriptional repression, of human smooth alpha-actin promoter in ras-transformed cells*, *Oncogene*, 10, 1361-1370.

- Casado N and Rodriguez-Caabeiro (1989)** *Ultrastructural study of in vitro larval development of Echinococcus granulosus protoscoleces*, International Journal for Parasitology, 19(1), 21-28.
- Casado N, Perez-Serrano J, Denegri G, Rodriguez-Caabeiro F (1994)** *Development of truncated microtriches in Echinococcus granulosus protoscolices*, Parasitol Res, 80, 355-357.
- Chalar C, Martinez C, Agorio A, Salinas G, Soto J, Ehrlich R (1999)** *Molecular cloning and characterization of a thioredoxin gene from Echinococcus granulosus*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 262, 302-307.
- Chen CV and Schwartz RJ (1997)** *Competition between negative acting YY1 versus positive acting serum response factor and tinman NKx-2.5 regulates cardiac alpha-actin promoter activity*, Molecular Endocrinology, 11, 812-822.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987)** *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*, Anal Biochem, 162, 156-159.
- Chow C, Gauci CG, Cowman AF, Ligtowlers MW (2001)** *A gene family expressing a host-protective antigen of Echinococcus granulosus*, Mol and Bioc Parasitology, 118(1), 83-88.
- Coltorti EA and Varela-Diaz VM (1975)** *Penetration of host IgG molecules into hydatid cyst*, Z Parasitenkd, 48, 47-51.
- Conder GA, Marchiondo AA, Williams F and Andersen FL (1983)** *Freeze-etch characterization of the teguments of three metacestodes: Echinococcus granulosus, Taenia crassiceps and Taenia taeniaformis*, J Parasitol, 69, 539-548.
- Cortez-Herreira E, Yamamoto RR, Rodrigues JJS, Farias SE, Ferreira HB, Zaha A (2001)** *Echinococcus granulosus: Cloning and functional in vitro characterization of an actin filament fragmenting protein*, Experimental Parasitology, 97(4), 215-225.
- Deplazes P and Eckert J (2001)** *Veterinary aspects of alveolar echinococcosis—a zoonosis of public health significance*, Vet. Parasitol., 98, 65-87.
- Dinkel A, Njoroge EM, Zimmermann A, Walz M, Zeyhle E, Elmahdi IE, Mackenstedt U, Roming T (2004)** *A PCR system for detection of species and genotypes of the Echinococcus granulosus-complex, with referenceto the epidemiological situation in eastern Africa*, International Journal for Parasitology, 34(5), 645-653.
- Dubinsky P, Stefancikova A, Turcekova L, Macko JK, Soltys J (1998)** *Development and morphological variability of Echinococcus granulosus*, Parasitol. Res. 84, 221-229.

- Eckert J and Thompson RCA (1988)** *Echinococcus strains in Europe: a review*, Tropenmed. Parasitol., 39: 1-8.
- Eckert J, Thompson RCA (1997)** *Intraspecific variation of Echinococcus granulosus and related species with emphasis on their infectivity to humans*, Acta Trop, 64, 19-34
- Eckert J (1996)** *Echinococcus multilocularis alveolar echinococcosis in Europe (except parts of eastern Europe)*, In *alveolar echinococcosis, Strategy for eradication of alveolar echinococcosis of the liver*, Eds. Uchino J, Sato N, Fuji Shoin, Sapporo, 27-43.
- Eckert J, Conraths FJ, Tackmann K (2000)** *Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis*, Inter. J. Parasitol, 30, 1283-94.
- Eckert J, Deplazes P, Craig PS, Gemmell M, Gottstein B, Heath D, Jenkins DJ, Kamiya M, Lightowers M (2001)** *Echinococcosis in animals: clinical aspects, diagnosis and treatment*, p. 72-99. In J. Eckert, Ma Gemmell, F-X Meslin, and ZS Pawlowski (ed), WHO/OIE manual on *Echinococcosis: in humans and animals: a public health problem of global concern*, World Organization for Animal Health, Paris, France.
- Ertabaklar H ve Altıntaş N (2002)** *Echinococcus granulosus protoskolekslerinin in vitro larval gelişiminin Gözlenmesi*, Türkiye Parazitoloji Dergisi, 26(2), 183-185.
- Esteves A, Dallagiovanna B, Ehrlich R (1993)** *A developmentally regulated gene of Echinococcus granulosus codes for a 15.5-kilodalton polypeptide related to fatty acid binding proteins*, Mol And Bioc Parasitology, 58, 215-222.
- Esteves A, Senorale M, Ehrlich R (2003)** *A tropomyosin gene is differentially expressed in the larval stage of Echinococcus granulosus*, Parasitology Research, 89(6), 501-502.
- Fairweather I and Threadgold LT (1981)** *Hymenolopis nana: the fine structure of the 'penetration gang' and nevre cells within the oncosphere*, Parasitol, 82, 445-448.
- Fernandez C, Gregory WF, Loke P, Maizels RM (2002)** *Full-length-enriched cDNA libraries from Echinococcus granulosus contain separate populations of oligo- capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences*, Mol and Bioc Parasitology, 122, 171-180.
- Ferreira HB, Rodrigues JJS, Zaha A (1996)** *Echinococcus granulosus recombinant antigens*, Ciencia e Cultura, 48, 370-376.
- Files JG, Carr S, Hirsh D (1983)** *Actin family of C. Elegans*, J. Mol. Biol., 164(3), 355-75
- Firtel RA (1981)** *Multigene families encoding actin and tubulin*, Cell, 24, 6-7.
- Frosch P, Hartmann M, Muhlschlegel F, Frosch M (1994)** *Sequence heterogeneity of the echinococcal antigen B*, Mol Biochem Parasitol, 64, 171-175.



- Gauci C, Merli M, Muller V, Chov C, Yagi K, Mackenstedt U, Ligetowers MW (2002)** *Molecular cloning of a vaccine antigen against infection with the larval stage of Echinococcus multilocularis*, *Infect Immun*, 70, 3969-3972.
- Gemmell MA (1962)** *Natural and acquired immunity factors interfering with development during the rapid growth phase of Echinococcus granulosus in dogs*, *Immunology* 5, 496-503.
- Gemmell MA (1966)** *Immunological responses of the mammalian host against tapeworm infections. IV. Species specificity of hexacanth embryos in protecting sheep against Echinococcus granulosus*, *Immunology*, 11, 325-335.
- Gemmell MA, Soulsby E JL (1968)** *The development of acquired immunity to tapeworms and progress towards active immunization with special reference to Echinococcus spp*, *Bulletin WHO*, 39, 45-55.
- Gill HS (1969)** *Vaccination trials against Echinococcus granulosus infection in dogs*, *J Commun Dis*, 1, 258-261.
- Gimba ERP, Chemale G, Farias SS, Zaha A (2000)** *Cloning and characterization of Echinococcus granulosus (cestode) EgActI and EgActII actin gene promoters and their functional analysis in the NIH3T3 mouse cell line*, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33(11), 1283-1292.
- Gonzales G, Spinelli P, Lorenzo C, Hellman U, Nieto A, Willis A, Salinas G (2000)** *Molecular characterization of P-29, a metacestode-specific component of Echinococcus granulosus which is immunologically related to, but distinct from, antigen 5*, *Mol Biochem Parasitol*, 105, 177-184.
- Gonzales LM, Daniel-Mwambete K, Montero E, Rosenzvit MC, McManus DP, Garate T, Cuesta-Bandera C (2003)** *Further molecular discrimination of Spanish strains of Echinococcus granulosus*, *Experimental Parasitology*, 102(1), 46-56.
- Gordo FP and Bandera CC (1997)** *Echinococcus granulosus: characterization of the Spanish strains using in vitro vesicular development*, *Journal of Helminthology*, 71, 61-67.
- Gottstein B and Felleisen R (1995)** *Protective immune mechanism against the metacestode of Echinococcus multilocularis*, *Parasitol Today*, 11, 320-326.
- Haag KL, Zaha A, Araujo Am, Gottstein B (1997)** *Reduced genetic variability in coding and non-coding regions of Echinococcus multilocularis genome*, *Parasitology*, 115, 521-530.

- Haag KL, Araujo AM, Gottstein B, Siles-Lucas M, Thompson RCA, Zaha A (1998a)** *Breeding system in Echinococcus granulosus (Cestoda: Taeniidae); selfing or outcrossing?*, Parasitology, 118, 63-71.
- Haag KL, Araujo AM, Gottstein B, Zaha A (1998b)** *Selection, recombination and history in parasitic flatworm (Echinococcus) inferred from nucleotide sequences*, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 93 (5), 695-702.
- Haag KL, Araujo AM, Gottstein B, Sile-Lucas M, Thompson RC, Zaha A (1999)** *Breeding systems in Echinococcus granulosus (Cestoda; Taeniidae): selfing or outcrossing*, Parasitology, 118(1), 63-71
- Haris A, Heath DD, Lawrence SB, Shaw RJ (1989)** *Echinococcus granulosus: ultrastructure of epithelial changes during the first 8 days of metacestode development in vitro*, International Journal for Parasitology, 19(6), 621-629.
- Hasegava T, Takahashi S, Hayashi H and Hatano S (1980)** *Fragmin: a calcium ion sensitive regulatory factor on the formation of actin filaments*, Biochemistry, 19, 2677-2683.
- Heath DD (1971)** *The migration of the oncosphere of Taenia psiformis, T. serialis and Echinococcus granulosus within the intermediate host*, J Parasitol, 1, 145-152.
- Heath DD (1991)** *A vaccine to protect grazing animals against hydatid disease. Is there a role for such a vaccine?* Int Arch Hydatid, 30, 343-349.
- Heath DD and Lawrence SB (1976)** *Echinococcus granulosus: development in vitro from to immature hydatid cyst*, Parasitology, 73, 417-423.
- Heath DD and Lawrence SB (1981)** *Echinococcus granulosus: early development in vitro in the presence of serum from infected sheep*, Int J Parasitol, 11, 261-266.
- Heath DD and Osborn PJ (1976)** *Formation of Echinococcus granulosus laminated membrane in a defined medium*, International Journal for Parasitology, 6, 467-71.
- Heath DD and Smyth JD (1970)** *In vitro cultivation of Echinococcus granulosus, Taenia hydatigena, T. ovis, T. psiformis and T. serialis from oncosphere to cystic larva*, Parasitology, 61, 329-43.
- Heath DD and Holcman B (1997)** *Vaccination against echinococcus in perspective*, Acta Trop, 67 (1-2), 37-41.
- Heath DD, Parmeter SN, Osborn PJ, Lawrence SB (1981)** *Resistance to Echinococcus granulosus infection in lambs*, J Parasitol, 67, 797-799.

**Hemphill A, Stettler M, Walker M, Siles-Lucas M, Fink R, Gottstein B (2002)** *Culture of Echinococcus multilocularis: an alternative to animal use*, Trends in Parasitology, 18(10), 445-451.

**Hockley DJ (1973)** *Ultrastructure of the tegument of Schistosoma*, Adv. Parasitol, 11, 233-305.

**Holcman B, Heath DD and Shaw RJ (1994)** *Ultrastructure of oncosphere and early stages of metacystode development of Echinococcus granulosus*, Int J Parasitol, 24, 623-635.

**Holcman B and Heath DD (1997)** *The early stages of Echinococcus granulosus development*, Acta Tropica, 64(1-2), 5-17.

**Howell MJ (1986)** *Cultivation of Echinococcus species in vitro*, In: Thompson RCA (ed) *The biology of Echinococcus and hydatid disease*, George Allen and Unwin, London, 143-163.

**Howell and Smyth (1995)** *Maintenance and cultivation of Echinococcus species in vivo and in vitro*. In *Echinococcus and Hydatid Disease* (RCA Thompson and AJ Lymbery, Eds) pp.201-232. Allen and Unwin, London.

<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages>

[http://www.biology.arizona.edu/cell\\_bio/tutorials/](http://www.biology.arizona.edu/cell_bio/tutorials/)

<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/echinococcosis.htm>

[http://www.cdfound.to.it/\\_atlas.htm](http://www.cdfound.to.it/_atlas.htm)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer>

**Humphries SE, Whitall R, Minty A, Buckingham M, Williamson R (1981)** *There are approximately 20 actin genes in the human genome*, Nucleic Acids Research, 9(19), 4895-4908.

**Jampens DT, Meerschaert K, Constantin B, Bailey J, Cook IJ, De Corte V, De Mol H, Goethals M, Van Damme J, Vandekerckhove J and Gettemans J (1997)** *Molecular cloning, over-expression, developmental regulation and immunolocalization of fragminP, a gelsolin related actin-binding protein from Physarum polycephalum plasmodia*, Journal of Cell Science, 110, 1215-1226.

**Kamanetzky L, Gutierrez AM, Canova SG, Haag KL, Guarnera EA, Parra A, Garcia GE, Rosenzvit MC (2002)** *Several strains of Echinococcus granulosus infect livestock and humans in Argentina*, Infection, Genetics and Evolution 2, 129-136

- Kilejian A and Schwabe CW (1971)** *Studies on the polysaccharides of the Echinococcus granulosus cyst, with observations on a possible mechanism for laminated membrane formation*, *Comb Biochem Physiol*, 40B, 25-36.
- Kindle KL and Firtel RA (1978)** *Identification and analysis of Dictyostelium actin genes, a family of moderately repeated genes*, *Cell*, 15 (3), 763-778.
- Konrad C, Kroner A, Spiliotis M, Zavala-Gongora R, Brehm K (2003)** *Identification and molecular characterization of a gene encoding a member of the insulin receptor family in Echinococcus multilocularis*, *Int Jour For Parasitology*, 33(3), 301-312.
- Lascano EF, Coltorti EA and Varela-Diaz VM (1975)** *Fine structure of the germinal membrane of Echinococcus granulosus cysts*, *J Parasitol*, 20, 27-37.
- Lavikainen A, Lehtinen MJ, Meri T, Hirvila-Koski V, Meri S (2003)** *Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of Echinococcus granulosus*, *Parasitology*, 127, 207-215.
- Le TH, Blair D, McManus DP (2002)** *Mitochondrial genomes of parasitic flatworms*, *Trends Parasitol*, 18, 206-213.
- Leducq R and Gabrion C (1992)** *Developmental changes of Echinococcus multilocularis metacestodes revealed by tegumental ultrastructure and lectin-binding sites*, *Parasitol*, 104, 129-141.
- Lee T, Shi Y, Schwartz RJ (1992)** *Displacement of BrdUrd-induced YY1 by serum response factor activates skeletal  $\alpha$ -actin transcription in embryonic myoblasts*, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 89, 9814-9818.
- Lemercier C, To RQ, Carrasco RA, Konieczny SF (1998)** *The basic helix-loop-helix transcription factor Mist1 functions as a transcriptional repressor of MyoD*, *EMBO Journal*, 17, 1412-1422.
- Lethbridge RC (1980)** *The biology of the oncosphere of cyclophyllidean cestodes*, *Helminth Abstr Series*, A49, 59-71.
- Lightowers MW, Gemmell MA, Harrison GB, Heath DD, Rickard MD, Roberts MG (1992)** *Control of tissue parasites. II. Cestodes*. In: Young, WK (Ed), *Animal Parasite Control Utilizing Biotechnology*, CRC Pres, pp.165-191.
- Lightowers MW, Gottstein B (1995)** *Echinococcosis / hydatidosis: aetiology, immunological and molecular diagnosis*, p. 355-410., In RCA Thompson and AJ Lymbery (ed), *The biology of echinococcus and hydatid disease*, CAB International, Wallingford, United Kingdom.

- Lightowlers MW, Lawrence SB, Gauci CG, Young J, Ralston MJ, Maas D, Heath DD (1996)** *Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen*, *Parasite Immunology* 18, 457-462.
- Lightowlers MW, Jensen O, Fernandez E, Iriarte JA, Woollard DJ, Gauci CG, Jenkis DJ, Heath DD (1999)** *Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep*, *Int J Parasitol*, 29, 531-534.
- Liu D, Rickard MD, Lightowlers MW (1993)** *Assessment of monoclonal antibodies to Echinococcus granulosus antigen 5 and antigen B for detection of human hydatid circulating antigens*, *Parasitology*, 106, 75-81.
- Lymbery AJ (1995)** *Genetic diversity and differentiation*, In *Echinococcus and Hydatid Disease* (Thompson RCA and Lymbery AJ eds), CAB International, Wallingford, Oxon, pp. 51-87.
- Lymbery AJ and Thompson RCA (1988)** *Electrophoretic analysis of genetic variation in Echinococcus granulosus from domestic hosts in Australia*, *Int. J. Parasitol*, 18, 803-811
- Lymbery AJ, Connstantine CC, Thompson RCA (1997)** *Self-fertilization without genomic or population structuring in a parasitic tapeworm*, *Evolution*, 51, 289-294.
- Lymbery AJ, Thompson RCA, Hobbs RP (1990)** *Genetic diversity and genetic differentiation in Echinococcus granulosus(Batsch 1786) from domestic and sylvatic hosts on the mainland of Australia*, *Parasitology*, 101, 283-289.
- Maizels RM, Kurniawan-Atmadja A (2002)** *Variation and polymorphism in helminth parasites*, *Parasitology*, 125, 25-37.
- Marin M, Garat B, Petterson U, Ehrlich R (1993)** *Isolation and characterization of a middle repetitive DNA element from Echinococcus granulosus*, *Mol and Bioc Parasitology*, 59, 335-338.
- Martin RM, Csar Xf, Gasser RB, Felleisen R, Lightowlers MW (1997)** *Myophilin of Echinococcus granulosus: isoforms and phosphorylation by protein kinase C*, *Parasitology*, 115(2), 205-11.
- Matsumoto Y, Perry G, Levine RJC, Blanton R, Mahmoud AAF, Aikawa M (1988)** *Paramyosin and actin in schistosomal teguments*, *Nature*, 333, 76-78.
- McKeown M, Hirth KP, Edwards C, Firtel RA (1982)** *Examination of the regulation of the actin multigene family in Dictyostelium discoideum*, *Prog Clin Biol Res*, 85, 51-78.

- McLellan WR, Lee T, Schwartz RJ, Schneider MD (1994)** *Transforming growth factor- $\beta$  response elements of the skeletal  $\alpha$ -actin gene. Combinatorial action of serum response factor, YY1, and SV40 enhancer-binding protein, TEF-1*, Journal of Biological Chemistry, 269, 16754-16760.
- McManus DP and Bryant C (1995)** *Biochemistry, physiology and molecular biology of Echinococcus*, In Echinococcus and Hydatid Disease (Thompson RCA and Lymbery AJ eds), CAB International, Wallingford, 135-181.
- McManus DP and Barret NJ (1985)** *Isolation, fractionation and partial characterization of the tegumental surface from protoscoleces of the hydatid organism, Echinococcus granulosus*, Parasitology, 90, 111-129.
- McManus DP and Rishi AK (1989)** *Genetic heterogeneity within Echinococcus granulosus: isolates from different hosts and geographical areas characterized with DNA probes*, Parasitology, 99, 17-29.
- McManus DP, Le TH, Blair D (2004)** *Genomics of parasitic flatworms*, Int J For Parasitology, 34, 153-158.
- McManus DP and Thompson RC (2003)** *Molecular epidemiology of cystic echinococcosis*, Parasitology, 127, 37-51.
- McManus DP, Zhang L, Castrodale LJ, Le TH, Pearson M, Blair D (2002)** *Short Report: Molecular genetic characterization of an unusually severe case of hydatid disease in Alaska caused by the cervid strain of Echinococcus granulosus*, Am J Trop Med Hyg, 67(3), 296-298.
- McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB (2003)** *Echinococcosis*, Lancet, 362, 1295-304.
- Mehlorn H, Eckert J, Thompson RCA (1983)** *Proliferation and metastases formation of larval Echinococcus multilocularis II. Ultrastructural investigations*, Zeitschrift für Parasitenkunde, 69, 749-763.
- Morseth DJ (1967)** *Fine structure of the hydatid cyst and protoscolex of Echinococcus granulosus*, J Parasitol, 53, 312-325.
- Movsesijan M and Mladenovic (1970)** *Active immunisation of dogs against Echinococcus granulosus*, Vet Glas, 24, 189-193.
- [mypage.bluewin.ch/dr\\_gabuzzi/parassiti/echino.jpg](http://mypage.bluewin.ch/dr_gabuzzi/parassiti/echino.jpg)**
- Mühlschlegel F, Sygulla L, Frosch P, Massetti P, Frosch M (1993)** *Paramyosin of Echinococcus granulosus: cDNA sequence and characterization of a tegumental antigen*, Parasitol Res, 79, 660-666.

- Mykles DL, Haire MF and Skinner DM (2000)** *Immunocytochemical localization of actin and tubulin in the integument of land crab (Gecarcinus lateralis) and lobster (Homarus americanus)*, Journal of Experimental Zoology, 286: 329-342.
- Nakao M, Sako Y, Ito A (2003)** *Isolation of polymorphic microsatellite loci from the tapeworm Echinococcus multilocularis*, Akira pp, 159-163.
- Oliveira G, Solange B, Correa-Oliveira R (1998)** *Transcription levels of two actin genes (SmAct and SmAct2), cytochrom C oxidase subunit II (SmCOXII), triosephosphateisomerase (TPI) and a putative translation regulatory protein EIF-5 during the first seven days of in vitro development of Schistosoma mansoni Schistosomula*, Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 93(1), 215-217.
- Ortona E, Rigano R, Margutti P, Notargiacomo S, Ioppolo S, Vaccari S, Barca S, Buttari B, Profumo E, Teggi A, Siracusano A (2000)** *Native and recombinant antigens in the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis*, Parasite Immunol, 22, 553-559.
- Osborn PJ, Heath DD (1982)** *Immunisation of lambs against Echinococcus granulosus using antigens obtained by incubation of oncospheres in vitro*, Research in Veterinary Science, 33, 132-133.
- Özçelik S (2001)** *Cystic Echinococcosis and Echinococcosis in Turkey*, Uluslararası Hidatidoloji Kongresi, Kuşadası, Türkiye
- Paradis P, MacLellan WR, Belaguli NS, Schwartz RJ, Schneider MD (1996)** *Serum response factor mediates AP-1-dependent induction of the skeletal  $\alpha$ -actin promoter in ventricular myocytes*, Journal of Biological Chemistry, 271, 10827-10833.
- Pollard TD and Earnshaw WC (2002)** *Actin and actin-binding proteins*, Cell Biology (Schmitt WR ed), Elsevier Science, 557-577.
- Proudfoot NJ and brownlee GG (1976)** *3'non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA*, Nature, 263(5574), 211-4
- Pugh BF ve Tjian R (1990)** *Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators*, Cell, 61, 1187-1197.
- Rausch RL (1985)** *Parasitology: retrospect and prospect*, J. Parasitol. , 71, 139-151.
- Richards KS, Arme C and Bridges JF (1983)** *Echinococcus granulosus equinus: an ultrastructural study of the laminated layer, including changes on incubating cysts in various media*, Parasitology, 86, 399-405.

- Rickard MD and Lightowers MW (1986)** *Immunodiagnosis of hydatid disease*, In *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease* (Thompson RCA ed), Allen and Unwin, London, 217-249.
- Rodriguez-Caabeiro F and Casado N (1988)** *Evidence of in vitro germinal layer development in Echinococcus granulosus cysts*, *Parasitology Research*, 74(6), 558-62.
- Rodrigues JJS, Ferreira HB, Zaha A (1993)** *Molecular cloning and characterization of an Echinococcus granulosus cDNA encoding malate dehydrogenase*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 60, 157-160.
- Rogan MT and Richards KS (1986)** *In vitro development of hydatid cysts from posterior bladders and ruptured brood capsules of equine Echinococcus granulosus*, *Parasitology*, 92, 379-390.
- Rogan MT and Richards KS (1989)** *Development of the tegument of Echinococcus granulosus (cestoda) protoscoleces during cystic differentiation in vivo*, *Parasitol Res*, 75, 299-306.
- Rommel M, Eckert J, Kutzer E, Körting W, Schinieder T (2000)** *Veterinärmedizinische parasitologie*, 5. Vollst Neuarb Aufl, Parey Buchverlag, Berlin, P, 545-567.
- Rosenzvit MC, Canova SG, Kamanetzky L, Ledesma BA, Guenera EA (1997)** *Echinococcus granulosus : Cloning and characterization of a tandemly repeated DNA element*, *Experimental Parasitology*, 87, 65-68.
- Rosenzvit MC, Canova SG, Kamanetzky L, Guenera EA (2001)** *Echinococcus granulosus: intraspecific genetic variation assessed by DNA repetitive element*, *Parasitology*, 123(4), 381-8.
- Sakamoto T and Sugimura M (1970)** *Electron microscopical observations on histogenesis of larval echinococcus multilocularis*, *Jpn J Vet Res*, 18, 131-144.
- Schriefer LA, Waddle JA, Robert H (1994)** *Identification and characterization of (III), a new conventional actin gene in C. Elegans*, *Worm Breeder's Gazette*, 13(2), 55
- Scott JC, Stefaniak J, Pawlowski ZS, McManus DP (1997)** *Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of Echinococcus granulosus*, *Parasitology*, 114, 37-43.
- Shepherd JC, Aitken A, McManus DP (1991)** *A protein secreted in vivo by Echinococcus granulosus inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis*, *Mol Biochem Parasitol*, 44, 81-90.



- Shi Y, Lee JS, Galvin KM (1997)** *Everything you ever wanted to know about Ying Yang 1*, Biochimica et Biophysica Acta, 1332, F49-F66.
- Siles-Lucas M, Felleisen RSJ, Hemphill A, Wilson W, Gottstein B (1998)** *Stage-specific expression of the 14-3-3 gene in Echinococcus multilocularis*, Molecular and Biochemical, Parasitology, 91, 281-293.
- Siles-Lucas M, Nunes CP, Zaha A (2001)** *Comparative analysis of the 14-3-3 gene and its expression in Echinococcus granulosus and Echinococcus multilocularis metacestodes*, Parasitology, 122(3), 281-7.
- Silva CMD, Ferreira HB, Picon M, Gorfinkiel N, Ehrlich R, Zaha A (1993)** *Molecular cloning and characterization of actin genes from , Echinococcus granulosus*, MolAnd Bioc Parasitology, 60, 209-220.
- Singh G and Lee RE (1979)** *Ultrastructure of the hydatid cyst*, Arch Pathol Lab Med, 103, 459-462.
- Smith SA and Richards KS (1991)** *Ultrastructure and microanalyses of the protoscolex hooks of Echinococcus granulosus*, Parasitology, 103, 267-274.
- Smyth 1962** *Studies on tape worm physiology. X. Axenic cultivation of the hydatid organism, Echinococcus granulosus: establishment of a basic technique*, Parasitology, 52, 331-457.
- Smyth JD (1990)** *Cestoda*. Pp. 77-154 in Smyth JD (ed) *In Vitro Cultivation of Parasitic Helminths*, Boca Raton, Florida, CRC Pres.
- Smyth JD and Davies Z (1974)** *In vitro culture of the strobilar stage of Echinococcus granulosus (sheep strain): a review of basic problems and results*, Int J Parasitol, 4, 631-644.
- Smyth JD and Smyth MM (1964)** *Natural and experimental hosts of Echinococcus granulosus and E. multilocularis, with comments on the genetics of speciation in the genus Echinococcus*, Parasitology, 54, 493-514
- Telford MJ, Herniou EA, Russell RB, Littlwood DTJ (2000)**, *Proc Changes in mitochondrial genetic codes as phylogenetic characters: two examples from the flatworms*, Natl Acad Sci USA, 97, 11359-11364.
- Thompson RCA (1986)** *The biology of Echinococcus and Hydatid disease*, Allen and Unwin, London

- Thompson RCA (1995)** *Biology and systematics of Echinococcus*. In: RCA. Thompson and AJ. Lymbery, Editors, *Echinococcus and Hydatid disease*, CAB International, Oxon, pp. 1-50.
- Thompson RCA and Eckert J (1982)** *The production of eggs by Echinococcus multilocularis in the laboratory following in vivo and in vitro development*, *Z. Parasitenkd*, 68, 227-234
- Thompson RCA ve Eckert J (1983)** *Observations on Echinococcus multilocularis in the definitive host*, *Z. Parasitenkd*, 69, 335-345
- Thompson RCA, Kumaratilake LM, Eckert J (1984)** *Observations on Echinococcus granulosus of cattleorigin in Switzerland*, *Int. J. Parasitol.*, 14, 283-291.
- Thompson RCA and Lymbery AJ (1988)** *The nature, extent and significance of variation within the genus Echinococcus*, *Adv Parasitol*, 27, 209-258.
- Thompson RCA and Lymbery AJ (1991)** *The epidemiological significance of biological variation in Echinococcus*, *Arch. Hydatid* 30,195-200.
- Thompson RCA, Lymbery AJ, Constantine CC (1995)** *Variation in Echinococcus: towards a taxonomic revision of the genus*, *Adv Parasitol*, 35, 145-176.
- Thompson RCA and Lymbery AJ (1996)** *Genetic variability in parasites and host-parasite interactions*, *Parasitology*, 112: 57-522
- Thompson RCA and McManus DP (2001)** *Aetiology: parasites and life-cycles*, In: Eckert J, Gemmell MA, Melsin FX, Pawlowski ZS (eds), *WHOO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals, A Public Health Problem of Global Concern*, pp. 1-19.
- Üner A (1991)** *Ekinokokların sistematiği ve biyolojisi*, Unat ve ark Ed.ler, İnsanlarda ve Hayvanlarda Kist Hidatik(*Echinococcosis*), T Parasitol Dern Yay No: 10, EÜ ofset basımevi, Bornova-İzmir, p.13-28.
- Wen D, Corina K, Chow EP, Miller S, Janmey PA and Pepinsky B (1996)** *The plasma and cytoplasmic forms of human gelsolin differ in disulfide structure*, *Biochemistry*, 35, 9700-9709.
- Woollard DJ, Gauci CG, Heath DD, Lightowlers MW (1998)** *Epitope specificities and antibody responses to the EG95 hydatid vaccine*, *Parasite. Immunol.*, 20, 535-540.
- Yin HL and Stossel TP (1979)** *Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein*, *Nature*, 281, 581-586.

- Zavala-Gongora R, Kroner A, Wittek B, Knaus P, Brehm K (2003)** *Identification and characterisation of two distinct Smad proteins from the fox-tapeworm Echinococcus multilocularis*, Int Jour For Parasitology, 33(14), 1665-1677.
- Zhang L, Eslami A, Hosseini SH, McManus DP (1998)** *Indication of the presence of two distinct strains of Echinococcus granulosus in Iran by mitochondrial DNA markers*, Am. J. Trop. Med. Hyg, 59(1), 171-174.
- Zhang L, Leggat GR, Kalinna BH, Piva TJ, McManus DP (1997)** *Cloning and expression of a cDNA encoding a nonintegrin laminin-binding protein from Echinococcus granulosus with localization of the laminin-binding domain*, Mol And Bioc Parasitology, 87, 183-192.
- Zhang W, Li J, McManus DP (2003a)** *Concepts in Immunology and diagnosis of hydatid disease*, Am Soc for Microbiology, 16(1), 18-36.
- Zhang W, Li J, You H, Zhang Z, Turson G, Loukas A, McManus DP (2003b)** *Echinococcus granulosus from Xinjiang, PR China: cDNAs encoding the EG95 vaccine antigen are expressed in different life cycle stages and are conserved in the oncosphere*, Am J Trop Med Hyg, 68(1), 40-3.
- Zhang W, Li J, You H, Zhang Z, Turson G, Loukas A, McManus DP (2003c)** *A gene family from Echinococcus granulosus differentially expressed in mature adult worms*, Mol. And Bioc. Parasitology, 126 (1), 25-33
- Zhang WB, Zhang ZZ, Chi PS (1999)** *Vaccination of dogs against Echinococcus granulosus using soluble antigens of protoscoleces*, Chin J Vet Sci Technol, 29, 21-22.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Konya’da doğdu. İlkokul öğrenimini 1977-1982 yılları arasında Konya 19 Mayıs İlkokulunda yaptı. Ortaokul öğrenimini 1982-1985 yılları arasında Konya Karma Ortaokulunda ve lise öğrenimini 1985-1988 yılları arasında Konya Atatürk Kız Lisesinde tamamladı. Üniversite öğrenimine 1988 yılında birincilik derecesi ile girdiği Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümünde başladı. 1992 yılında üniversite eğitimini tamamlayarak 1993 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. 1996 yılında yüksek lisans eğitimini tamamlayarak doktora eğitimine başladı. 1998 yılında aynı anabilim dalına Sağlık Bilimleri Enstitüsüne bağlı Araştırma Görevlisi olarak atandı. Evli ve iki çocuk annesidir.

## 10. TEŞEKKÜR

Anabilim Dalımız başkanı Sayın Prof. Dr. Ferhan PAYDAK'a, in vitro kültür çalışmasında deneyimlerini paylaşan Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji ABD başkanı Sayın Prof. Dr. Nazmiye ALTINTAŞ'a, kültür çalışmalarımın fotoğraflanması aşamasında yardımcı olan Veterinerlik Fakültesi Viroloji ABD başkanı Sayın Prof. Dr. Sibel YAVRU ve öğretim elemanı Doç. Dr. Atilla ŞİMŞEK'e ve tüm laboratuvar çalışanlarına, laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Prof. Dr. Hasan ACAR'a, laboratuvar cihazlarını kullanmamda gösterdikleri ilgiden dolayı Doç. Dr. Kaan KARABULUT'a, kimyasal temininde yardımcı olan Gaziantep üniversitesi Öğretim üyesi Doç. Dr. Celalettin Camcı ve moleküler çalışmalarında yardımcı olan Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı elemanlarından Bülent GÖĞEBAKAN, Sibel OĞUZKAN, Şenay GÖRÜCÜ ve Mehri CANTÜRK'e tüm içtenliğim ile teşekkür ederim.

Tez süresince manevi desteğini esirgemeyen arkadaşım Melda AKSOY'a, yazım aşamasındaki yardımlarından dolayı arkadaşım Dr. Murat KAYNAK'a, sabır ve desteklerinden dolayı eşime, çocuklarıma, anneme ve babama teşekkürü bir borç bilirim.

Materyal temininde yardımcı olan Konet Mezbahası Veteriner Hekimlerine, Meram Tıp Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Mustafa Şahin'e, Karapınar mezbahasından materyal temin etmemde yardımcı olan Dr. Nuri SEZER'e teşekkürlerimi sunarım.