

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

***Fasciola hepatica*'ya karşı aşı adayı olabilecek rekombinant cathepsin L
proteininin elde edilmesi**

TSY-11-3334

Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Salih KUK

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi/Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı

Araştırmacının Adı Soyadı
Birimi/Bölümü

Prof. Dr. Süleyman YAZAR

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi/Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. İzzet ŞAHİN

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi/Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı

Berna HAMAMCI

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi/Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı

Ülfet ÇETİNKAYA

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi/Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı

Süheyla GÜCÜYETMEZ

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi/Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı

Mayıs 2012
KAYSERİ

TEŞEKKÜR

“*Fasciola hepatica*’ya karşı aşı adayı olabilecek rekombinant cathepsin L proteininin elde edilmesi” isimli projemiz TSY-11-3334 kodu ile Erciyes Üniversitesi bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
Morfoloji	5
Yaşam Döngüsü	5
Epidemiyoloji	6
Patoloji ve klinik	7
Tanı	8
İmmünoloji	8
Tedavi	9
Korunma ve kontrol	9
<i>Fasciola hepatica</i> 'nın moleküler yapısı	10
Proteazlar	10
Cathepsin proteazlar	10
Rekombinant protein aşılı	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM	12
<i>Fasciola hepatica</i> 'ların elde edilmesi	12
<i>F. hepatica</i> 'dan Toplam RNA izolasyonu	12
Primerlerin oluşturulması	12
Tersine Transkripsiyon ile kopya DNA (cDNA) elde edilmesi	13
<i>F. hepatica</i> cathepsin L1 geninin PCR ile çoğaltılması	13
Cathepsin L1 geninin pET TOPO vektörüne yerleştirilmesi	14
Klonlama reaksiyonunun kompetant <i>E.coli</i> hücrelerine transformasyon	14
PCR Screening	14
Rekombinant FhCL1 plazmit DNA'sının elde edilmesi	15
Rekombinant plazmidin BL21 <i>E. coli</i> hücrelerine transformasyonu	15
Rekombinant protein ekspresyonu	15
Rekombinant protein analizi	16
Rekombinant füzyon proteininin saflaştırılması	17
Proteininin miktarının hesaplanması	18
4. BULGULAR	20
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	27
6. KAYNAKLAR	29

***Fasciola hepatica*'ya karşı aşı adayı olabilecek rekombinant cathepsin L proteininin elde edilmesi**

ÖZET

Fasciola hepatica sıklıkla sığır ve koyunlarda nadiren de insanlarda fasciolosise neden olan bir karaciğer trematodudur. İnsanlarda ve hayvanlarda infeksiyon, metaserkarya ile kontamine olmuş su veya bitkilerin ağız yoluyla alınımından kaynaklanmaktadır. *F. hepatica*'nın ES antijenlerinden olan Cathepsin L1 parazitin dokulara penetrasyonda, immun yanıtta kaçmasında ve beslenmesinde önemli rolü olan bir enzimdir. Bu projemizde *Fasciola hepatica* patogeneğinde önemli rol oynayan cathepsin L proteininin rekombinant DNA teknolojisiyle elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla erişkin *F. hepatica*'dan toplam RNA izolasyonu yapılarak tersine transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile cathepsin L1 DNA amplikonları oluşturulmuştur. Cathepsin L1 genine özgü primerler kullanılarak 981 bp'lık gen bölgesi çoğaltılmıştır. Daha sonra, cathepsin L1 geni pET TOPO vektörüne klonlanmıştır. Rekombinant vektör kompetant *E. coli* hücrelerine transforme edilmiş ve plazmit DNA'sı miniprep ile elde edilmiştir. Cathepsin L1 geninin varlığı DNA dizi analizi yaptırılarak doğrulanmıştır. Plazmit DNA'sı BL21 *E. coli* hücrelerine transforme edilerek rekombinant protein ekspresyonu sağlandı ve protein saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış protein Lowry yöntemine göre hesaplandı ve toplamda 675 mikrogram protein saf olarak elde edilmiştir. Elde edilen cathepsin L1 proteini aşı adayı olarak ve tanı amacıyla serolojik testlerde kullanılabilecektir.

Anahtar Kelimeler: *Fasciola hepatica*, Cathepsin L, Rekombinant DNA teknolojisi

ABSTRACT

The liver fluke *Fasciola hepatica* is the causative agent of fasciolosis that is common sheep and cattle and is occasionally found in humans. Infection in humans and animals arises from ingestion of vegetable matter or consumption of water contaminated with metacercariae. Cathepsin L1 is one of the major molecules in the excretory-secretory products of *F. hepatica* and is involved in tissue penetration, immune evasion and feeding and therefore may be used in vaccination and serological diagnosis. The aim of this study was to obtain that cathepsin L protein to plays an important role in the pathogenesis of *F. hepatica* by recombinant DNA technology. For this purpose, total RNA was extracted from adult *F. hepatica*. Cathepsin L1 DNA amplicons were obtained with the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The 981 bp gene region was amplified using specific primers to the cathepsin L1 gene. Then, the cathepsin L1 gene was cloned into the pET TOPO vector. Recombinant vector were transformed into competent *E. coli* cells. Plasmid DNA was obtained by miniprep. The presence of the cathepsin L1 gene was confirmed by DNA sequence analysis. Plasmid DNA was transformed into BL21 *E. coli* cells and The Cathepsin L1 recombinant protein was expressed. Recombinant fusion proteins were purified. The purified protein was calculated according to the Lowry method and a total of 675 micrograms of pure protein per reaction was obtained. The cathepsin L1 protein can be used as a vaccine candidate and serological tests for diagnostic purposes.

Keywords: *Fasciola hepatica*, Cathepsin L, Recombinant DNA technology

GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Fasciola hepatica insan ve hayvanlarda fasciolosise neden olan bir karaciğer trematodu olup Digenea alt sınıfından Fasciolidea ailesinde yer almaktadır. *F. hepatica*'nın son konağı genellikle sığır ve koyun gibi geviş getiren hayvanlardır. *F. hepatica*, ortalama 20-30 mm boyunda ve 4-15 mm enindedir (Unat, 1995; Garcia and Bruckner, 1997; Saygı, 1998). *F. hepatica* yumurtaları safra yolu ile duodenuma oradan da dışkı ile dışarı atılmaktadır. Isı, nem ve pH gibi birçok fiziksel ve kimyasal faktör embriyon (mirasidyum) gelişiminde önemli olmaktadır. Mirasidyumlar, bulundukları suda ara konak olan *Lymnea* türü salyangozlara penetre olduktan sonra salyangozun lenf kanallarında tüylerini kaybederek sporokiste, sporokistlerden yavru sporokistler veya rediler oluşmaktadır. Redilerin her birinden 10-20 serkarya gelişmektedir. Salyongozu terkeden serkarya su bitkilerine yerleşir ve burada kuyruğunu kaybeden serkaryalar, metaserkarya haline gelmektedir (Graczyk ve Fried B, 1999). Son konağa bulaşma, metaserkarya ile infekte bitki ve suların alınmasıyla olmaktadır. Fasciolosis tüm dünyada çok geniş bir coğrafyada görülmektedir. Özellikle insan fasciolosisi için endemik olan Fransa'da 1950-1983 yılları arasında 3.297 olgu tespit edilmiştir (Mas-Coma ve ark., 1999). *F. hepatica* infeksiyonuna karşı doğal bağışıklık söz konusu değildir etkenle karşılaşan her insanda infeksiyon oluşur. Bu nedenle tüm sosyal sınıf ve meslek grubundan insanı etkilemektedir. Kırsal alanlarda yaşayanlarda kentlerde yaşanlara göre daha sık görülmektedir (Mas-Coma ve ark., 1999). Fasciolosis kliniği iki dönemde incelenebilmektedir; birinci dönem parazitin vücuda girişi ile safra yollarına yerleşmesi arasında geçen larval dönem veya prepatent dönem, ikinci dönem parazitin karaciğer ve safra yollarına yerleşme dönemi veya kronik dönemdir (Unat, 1995). Hastalığın şiddeti genel olarak alınan parazitin sayısına ve parazitin yerleştiği organdaki dağılım şekline bağlı olarak değişmektedir. İnfeksiyonun tanısı klasik olarak dışkıda *F. hepatica* yumurtalarının görülmesi ile konulmaktadır (Unat, 1995; Garcia and Bruckner, 1997; Mas-Coma ve Bargues, 1999). Fakat kişi infekte olmasına rağmen birçok nedenlerden dolayı dışkıda yumurta görülmeyebilir. Bu nedenle de dışkı incelemesi tek başına tanı için yeterli olmayabilir (Mas-Coma ve Bargues, 1999). İnsan fasciolosisinin tedavisinde bithinol, praziquantel, mebendazol, triklabendazol gibi ilaçlarla değişik derecede başarı sağlanmıştır. *F. hepatica*'nın endemik olduğu bölgelerde koruyucu halk sağlığı eğitimi verilmesi, sağlık çalışanlarının bilgilendirilmesi ve su bitkilerinin pişirilmeden yenmemesi önerilmektedir. Parazit konak ilişkisinde rol alan moleküllerden ilk tanımlananı ve aşı denemelerinde en çok kullanılanı cathepsin L1'dir. Cathepsin L1 parazitin E/S proteinlerinin %60-80'lik bir kısmını

oluşturmaktadır ve ayrıca parazitin migrasyonunda, dokulara penetrasyonunun kolaylaştırılmasında, beslenmesinde, safra yollarında ülserasyon oluşumunda ve immün yanıtta kaçışında rol oynamaktadır.

“*Fasciola hepatica*’ya karşı aşı adayı olabilecek rekombinant cathepsin L proteininin elde edilmesi” başlıklı proje ile *Fasciola hepatica* patogeneğinde önemli rol oynayan ve aşı amacıyla kullanılabilecek cathepsin L proteininin rekombinant DNA teknolojisiyle saflaştırılmış olarak elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla *F. hepatica*’nın erişkin şekli Kayseri bölgesindeki kesimhanelerde kesimi yapılan doğal olarak infekte koyun ve sığır karaciğerinin safra yollarından toplanmış ve bu erişkinlerden RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA’dan Tersine Transkripsiyon ile elde edilen kopya DNA’lardan, dizayn edilen uygun primerler ile cathepsin L1 geni PCR ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan cathepsin L1 geni pET TOPO vektörüne yerleştirilerek rekombinant vektör oluşturulmuştur. Oluşturulan rekombinant vektör kompetan *E. coli* hücrelerine transforme edilmiş ve miniprep plazmit DNA’sı elde edilmiştir. Elde edilen rekombinant pFhCL1 plazmit DNA’sı BL21 *E. coli* hücrelerine transforme edilerek rekombinant protein ekspresyonu ve saflaştırılmasıyla projede amaçlanan hedefe ulaşılmıştır.

GENEL BİLGİLER

Fasciola hepatica ruminantlarda ekonomik olarak önemli bir hastalık olan ve aynı zamanda insanlarda da önemi artan fasciolosise neden olan bir karaciğer trematodudur (Unat, 1995; Garcia and Bruckner, 1997; Saygi, 1998). *F. hepatica* hakkında ilk bilgi 1379 yılında Brie tarafından verilmiş olup yaşam döngüsü 1881 yılında Leuckart ve Thomas tarafından aydınlatılmıştır (Andrews, 1999).

Morfoloji

Fasciola hepatica, ortalama 20-30 mm boyunda ve 4-15 mm enindedir. Görünümü yaprak şeklinde olup parazitin baş kısmı vücudun ön bölgesinde ve koni şeklindedir. Vücudunun kenarları koyu esmer, orta kısmı sarı turuncu renkte ve besinlerle dolu olan çekum bölgesi siyah olarak görülür. Vücut yüzeyi kütikül ile kaplı olup üzerinde sert kitinden yapılmış dikenler bulunur. Parazitin, sinir sistemi, bağırsak sistemi, üreme sistemi ve salgı sistemi gibi kompleks sistemleri vardır. *F. hepatica*, hermafrodit olup son konakta kendi kendini fertilize ederek yumurta oluşturmaktadır. Kapaklı olan yumurtalar, sarı kahverengimsi renkte, oval, 130-150 µm boyunda ve 60-90 µm enindedir ve dışkı ile atıldıklarında içlerinde henüz embriyon gelişmemiştir (Unat, 1995; Garcia and Bruckner, 1997; Saygi, 1998).

Yaşam Döngüsü

Fasciola hepatica'nın yaşam döngüsü beş aşamada gerçekleşmektedir (Andrews, 1999). Birinci dönem; yumurtaların son konaktan çevreye atılması ve yumurtaların çevrede gelişmesi. Bu dönemde yumurtalar safra yolu ile duodenuma oradan da dışkı ile dışarı atılmaktadır. Yumurtalar dışkıda 3 haftadan birkaç aya kadar canlı kalabilmektedir. Isı, nem ve pH gibi birçok fiziksel ve kimyasal faktör embriyon (mirasidyum) gelişimini etkilemektedir. İkinci dönem; mirasidyumların oluşması ve onların ara konak salyangozları (genellikle *Lymnea* türü) bulması ve penetrasyonudur. Üçüncü dönem; ara konakta parazitin gelişimidir. Bu dönemde salyangozlara penetre olan mirasidiumlar salyangozun lenf kanallarında tüylerini kaybederek sporokiste dönüşmektedirler. Salyangozun lenf kanallarında 7. günden sonra sporokistlerden yavru sporokistler veya rediler oluşmaktadır. Göç eden redilerin her birinden 10-20 serkarya gelişmektedir. Dördüncü dönem; ara konaktan serkaryanın çıkışı ve enkistasyonudur. Bu dönemde serkaryalar aktif olarak salyangozu terk eder ve su bitkilerine yerleşir. Burada kuyruğunu kaybeden serkaryalar, metaserkarya haline

gelmektedir. Beşinci dönem; son konak tarafından infektif metasekaryanın alınması ve olgun parazitin gelişmesidir (**Andrews, 1999; Graczyk ve Fried, 1999**).

Metasekaryanın alınmasından 1 saat sonra, konağın bağırsak duvarında, ductus coledochus'un açılma deliğinin altında, eksistasyon başlamakta 2 saat içinde ise bağırsak duvarını delerek abdominal boşluğa geçmektedir. Yeni eksiste olan genç parazit periton duvarından geçerek karaciğere ulaşmakta, safra yollarına yerleşmekte ve erişkin formu gelişmektedir. Burada seksüel olarak da olgunlaşan parazit yumurtlamaya başlamaktadır (**Andrews, 1999; Fairweather ve ark., 1999**).

Larvanın migrasyonu safra yollarına olmakla birlikte nadiren diğer organlara da yerleşim olmaktadır. İnsan vücudunda nadir olarak deri altında, lenf nodlarında, venlerde, apendiks apselerinde, midede, dalakda, pankreasda, timusda, akciğerde, plevral kavitede, iskelet kaslarında, kalpte, genitoüriner yollarda, gözde, beyinde parazit yerleşimine rastlanması periton dışında dolaşım sistemleri ile yayılım olabileceğini düşündürmektedir. Endemik bölgelerde çiğ yenen karaciğerdeki erişkin formlar faringeal mukozaya tutunarak halzoan sendromuna sebep olabilmektedirler (**Unat, 1995; Garcia and Bruckner, 1997; Saygı, 1998; Mas-Coma ve Bargues, 1999**).

Epidemiyoloji

Fasciolosis, hayvanlarda dünyada yaygın olarak gözlenirken insanlarda nadiren rastlanmaktadır. Dünya sağlık örgütünün 1995 yılında yaptığı bir çalışma dünyada 61 ülkede 2-5 milyon kişinin bu parazit ile infekte olduğunu ve 180 milyon kişinin de risk altında olduğunu göstermiştir (WHO, 1995). İnsan fasciolosisinin epidemiyolojisinde 1998 yılında yeni bir sınıflandırma önerilmiş ve endemik bölgeler üçe ayrılmıştır. Prevalansın %1'den az olduğu bölgeler hipoendemik, prevalansın %1–10 arası olan bölgeler mezoendemik, prevalansın %10'dan fazla olduğu bölgeler ise hiperendemik bölge olarak sınıflandırılmıştır (**Mas-Coma ve Bargues, 1999**). Fasciolosis tüm dünyada çok geniş bir coğrafyada görülmektedir. Özellikle insan fasciolosisi için endemik olan Fransa'da 1950-1983 yılları arasında 3.297 olgu tespit edilmiştir (**Mas-Coma ve Bargues, 1999**). *F. hepatica* infeksiyonuna karşı doğal bağışıklık söz konusu değildir etkenle karşılaşan her insanda infeksiyon oluşur. Bu nedenle tüm sosyal sınıf ve meslek grubundan insanı etkilemektedir. Kırsal alanlarda yaşayanlarda kentlerde yaşanlara göre daha sık görülmektedir (**Mas-Coma ve Bargues, 1999**).

Patoloji ve klinik

Fasciolosiste hastalığın şiddeti genel olarak alınan parazitin sayısına ve parazitin yerleştiği organdaki dağılım şekline bağlı olarak değişmektedir. Fazla sayıda alınan parazit bacaklarda ve vücutta ödem ve kaşeksiye hatta ölüme neden olabilir. Fakat bu durum nadir olup genellikle az sayıda alınan parazite bağlı olarak yıllarca süren kronik bir tablo gelişmektedir (Unat, 1995; Behm CA and Sangster, 1999).

Genel olarak fasciolosis kliniği iki dönemde incelenebilmektedir; birinci dönem parazitin vücuda girişi ile safra yollarına yerleşmesi arasında geçen larval dönem veya prepatent dönemdir. Bu dönemde değişik şiddette bazı lokal ve sistemik belirtiler oluşmasına rağmen genellikle asemptomatik seyretmektedir. Hastalık iştahsızlık, mide-bağırsak şikâyetleri ve ishal şeklinde başlayabilmektedir. Tabloya düzensiz ve uzun süren ateş, terleme ve baş ağrısı şikâyetleri eklenebilmektedir. Ateş, karaciğer büyümesi ve karaciğere uyan bölgelerde ağrı şikâyetleri hastalığı düşündürülen en önemli bulgulardır. Larvanın salgıladığı toksinlere bağlı olarak safra yollarında hiperplazi oluşur. Dışkıda yumurtaların görülmediği bu dönemde allerjiye bağlı olarak ürtiker, eozinofilili akciğer infiltrasyonları ile pnomoni, plevral effüzyon, ve ödem gibi akciğer tutulumuna bağlı bulgular görülebilmektedir (Unat, 1995; Mas-Coma ve Bargues, 1999; Behm CA and Sangster, 1999; Hillyer, 1999). İkinci dönem parazitin karaciğer ve safra yollarına yerleşme dönemi veya kronik dönemdir. Bu dönem genellikle asemptomatiktir. Safra yolları ve karaciğerde meydana gelen hasarın şiddeti alınan parazitin sayısına bağlıdır. Safra yolları epitel hiperplazisi, portal veya total safra yollarında fibroze sıkça rastlanmaktadır. Ayrıca parazitin karaciğer parankimine invazyonu ile de abse oluşmaktadır. Kronik dönemde zayıflık, sindirim sistemi bozuklukları, ateş, karaciğer bölgesinde ağrı ve karaciğer büyümesi, bazen sarılık gibi belirtiler gözlenmektedir. (Unat, 1995; Behm CA and Sangster, 1999).

Fasciolosis, komplikasyon olarak kanama, subkapsüler hematom, hematobilia, hematemez, melena ve bilier siroz görülebilmektedir. Enfeksiyonun seyri sırasında inflamasyon ve safra yolları epitelinin hiperplazisi ve hipertrofisi ile periduktal fibrozis oluşabilmektedir. Ölüme sebep olabilecek ciddi bir komplikasyon ise multipl ekstrahepatik venöz trombozudur. Hastalığa bağlı çok az ölüm bildirilmiş olup ölümün daha çok safra yolları tıkanıklığı sonucunda gelişen tablodan kaynaklandığı tespit edilmiştir (Mas-Coma ve Bargues, 1999).

Tanı

İnfeksiyonun tanısı klasik olarak dışkıda *F. hepatica* yumurtalarının görülmesi ile konulmaktadır (Unat, 1995; Garcia and Bruckner, 1997; Mas-Coma ve Bargues, 1999). Son konak tarafından alınan parazitin olgunlaşıp yumurtlaması için 3-4 ay gerekirken olup bu dönemde dışkıda parazit yumurtası bulunmamaktadır. Parazitin seksüel olarak olgun olmasına rağmen yumurtlamaması, yumurtaların dışkıya belirsiz aralıklarla atılması ve dışkıdaki yumurta sayısının az olması gibi nedenlerle dışkı incelemesi tek başına tanı için yeterli olamamaktadır (Mas-Coma ve Bargues, 1999). *F. hepatica* ile infekte koyun ve sığır karaciğerlerinin yenilmesi durumunda dışkıda parazit yumurtaları görülebilmektedir. Bu nedenle dışkı incelemesinde yumurta saptanan durumlarda yalancı parazitliği ekarte etmek gereklidir. Ülkemizde görüldüğü rapor edilmemiş ise de *F. hepatica* yumurtaları ile benzer görünüm ve büyüklükte olan *Fasciolopsis buski* ve *Echinostoma ilocanum* yumurtalarını dışkı bakışı ile birbirinden ayırt edebilmek oldukça zor olduğundan tanıda güçlük çekilebilmektedir. Bu nedenlerle, dışkıda *F. hepatica* yumurtalarının görülmesi kuvvetle fasciolosisi düşündürmekle birlikte tanının klinik ve laboratuvar testleri ile desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca, ektopik yerleşimin olduğu durumlarda dışkıda parazit yumurtası saptanmamakta ve tanı klinik ve laboratuvar testleri ile konulmaktadır (Mas-Coma ve Bargues, 1999).

ELISA, Counterelektroforez ve IHA gibi serolojik yöntemler ve radyolojik yöntemlerde fasciolosisde tanıya yardımcı olabilmektedir.(Hilyer, 1999; Camilla ve ark., 2001; Price ve ark., 1993; Pulpeiro ve ark., 1991). Fasciolosis tanısı için karaciğer biyopsisine gerek duyulmamaktadır. Ancak biyopsi yapılırsa, örneklerde nekroz alanları, ray benzeri parankimal harabiyet, bol eozinofili ile birlikte polimorfonükleer infiltrasyon, Charcot Leyden kristalleri, granuloamlar, fibrosis ve safra yolu proliferasyonu görülebilmektedir. Biyopsi örneklerinde nadiren olgun parazit veya parazit yumurtalarına rastlanabilmektedir (Camilla ve ark., 2001).

İmmünoloji

Bağıışıklık sistemi doğal ve edinsel olarak ikiye ayrılmaktadır. Organizma doğal anatomik ve fizyolojik yollarla mikroorganizmayı engellemeye çalışmaktadır. Mikroorganizma bu engelleri aştığında edinsel bağışık yanıt gelişmektedir. *F. hepatica*'ya karşı doğal yanıtta bağırsak epiteli, periton ve mide pH'ı gibi faktörler rol oynamaktadır (Mulcahy ve ark.,

1999). Fakat parazite karşı edinsel cevap daha önemlidir. Edinsel immünite, antikorların sentez ve salınımı düzenleyen sıvısal immünite, sitokinler salgılayarak immün yanıtı düzenleyen hücreyel immünite olarak ikiye ayrılmaktadır. Hücreyel immünite de CD4⁺ T hücreleri ve CD8⁺ T hücreleri rol oynamaktadır (Roitt ve ark., 1983). Birçok helmintik parazitoza karşı oluşan immün yanıtta Th2 cevabının ön planda olduğunu ve IgE düzeyinin arttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte *F. hepatica* enfeksiyonu sırasında meydana gelen immün cevap hakkındaki bilgilerimiz sınırlıdır (Mulcahy ve ark., 1999).

Fasciolosisli insanlarda, semptomlara ek olarak sistemik bir eozinofili, IgM, IgG ve IgE yanıtı gözlenmektedir. Enfekte insanlarda anti-*Fasciola hepatica* IgE antikorları hastaların %48'inde tespit edilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile parazitin E/S antijenlerine ve cathepsin L1'e karşı konak IgG1 ve IgG4 yanıtının daha baskın olduğu bildirilmiştir (Mulcahy ve ark., 1999).

Tedavi

İnsan fasciolosisinin tedavisinde bithinol, praziquantel, mebendazol, triklabendazol gibi ilaçlarla değişik derecede başarı sağlanmıştır. Önceleri praziquantel denenmiş fakat olumlu sonuçlar alınmamıştır (Fairweather ve Boray, 1999). Fasciolosisli olguların tedavisinde 30 mg/kg/gün 5 gün bithionol kullanımı sonrası hastaların yaklaşık %20-30'un da ikinci bir kür tedavisi gerekmiştir (Fairweather ve Boray, 1999; Bacq ve ark., 1991). İyi tolere edilebilen ve kolay uygulanabilen bir ilaç olan triklabendazol 1983'den beri veteriner parazitolojide hem erişkin hem de genç parazite karşı kullanılmaktadır. Triklabendazol ile tedavi başarısının bithinol, praziquantel ve mebendazole göre daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Triklabendazolün 10 veya 20 mg/kg dozlarda, tek doz veya 12-24 saat arayla iki doz gibi farklı doz ve uygulama şekilleri bulunmaktadır. Tek doz şeklinde uygulamanın tedavi başarısı %79.4, iki doz uygulamanın %92.2-93.9 düzeyinde olduğu bildirilmektedir (Kaplan ve ark. 2002; el-Karaksy ve ark., 1999; Laird ve Boray, 1992; Sönmez A ve ark. 2001).

Korunma ve kontrol

Fasciola hepatica'nın endemik olduğu bölgelerde koruyucu halk sağlığı eğitimi verilmesi, sağlık çalışanlarının bilgilendirilmesi ve su bitkilerinin pişirilmeden yenmemesi önerilmektedir. Korunma ve kontrol çalışmalarında, laboratuvarlarda çalışan teknik personelin fasciolosisin tanısı için eğitilmesi, üniversiteler ile araştırma merkezleri arasında koordinasyonun sağlanması, enfeksiyonun varlığı ve yaygınlığının tespit edilmesi ve insan

olgularının tedavisi için ilaçlar temin edilmesi önerilmektedir. Ayrıca hastalığın kontrolü ve önlenmesi için Sağlık bakanlığı ve ilgili sektörler arasında ulusal bir programın uygulanması gerekmektedir (Spithill TW et al. 1999).

***Fasciola hepatica*'nın moleküler yapısı**

Fasciola hepatica'nın moleküler yapısı hakkında çok az şey bilinmekte olup bu konudaki bilgiler henüz başlangıç aşamasındadır. Yaşam döngüsü boyunca *F. hepatica* farklı gelişim dönemlerinden geçmekte ve bu dönemlerde antijenik yapısı değişmektedir. *F. hepatica* populasyonları arasında genetik çeşitlilik görülmektedir. Bu genetik çeşitliliğin mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Panaccio ve Trudgett, 1999).

Proteazlar

Proteazlar proteinlerin hidrolizini katalizleyen bir enzim grubudur. Proteazlar katalizlediği reaksiyonun tipi, katalizledikleri bölgenin kimyasal yapısı, etkinlik gösterdikleri bölge gibi değişik kriterlere göre sınıflandırılmaktadır. Ekili oldukları bölgeye göre endopeptidaz ve ekzopeptidaz şeklinde iki büyük gruba ayrılmaktadırlar. Ekzopeptidazlar, substratların amino veya karboksi uçlarındaki peptid bağlarını kırarken endopeptidazlar substratların orta kısımlarındaki peptid bağlarını kırmaktadırlar. Proteazlar ilave olarak etkinlik gösterdikleri bölgedeki fonksiyoner gruplara bağlı olarak serin proteazlar, aspartik proteazlar, sistein proteazlar ve metalloproteazlar şeklinde dört gruba ayrılabilirler (Rao ve ark., 1998).

Tüm proteazlar hücreleri kontrolsüz yıkımlardan korumak için sinyal peptid ve propeptidden oluşan bir proregion bölge ile birlikte sentezlenmektedir. Proregion bölge matür enzimin güçlü ve selektif bir inhibitörüdür (Roche ve ark., 1999). Matür enzimin son şeklini alması için, ilk oluştuğu yerden sinyal peptidi aracılığı ile endoplazmik retikuluma geçmesi, burada glikozilasyona uğraması, golgi kompleksine geçerek mannoz rezidülerinin fosforilasyona uğraması ve lizozomlarda proregion bölgesinin kesilmesi gerekmektedir. Proregion bölgesindeki propeptid proteinin katlanarak üç boyutlu yapısının oluşmasına da yardımcı olmaktadır (Alberts ve ark., 1994).

Cathepsin proteazlar

Cathepsin B ve cathepsin L, sistein proteazlar içinde en iyi tanımlananlardır (Heussler ve Dobbelaere, 1994). Bu enzimler hemoglobini, immünoglobulinleri ve fibrinojeni

parçalamaktadırlar. Parazitin hem olgun hem genç dönmelerinde oluşan cathepsin L, IgG ve IgM'i parçalamakta ve eozinofillerin tutunmasını önleyerek immün yanıtı kaçırmaya yardımcı olmaktadır. Cathepsin L proteaz'ın önemli bir proteolitik özelliği de fibrinojeni parçalaması ve pıhtı oluşumudur. Kollejenolitik aktivite ile hücre duvarı yapısında bulunan fibronektin ve lamininin parçalanmasını da sağlamaktadır (**Berasain P et al. 2000; Smith ve ark., 1993**).

Cathepsin L parazitin E/S proteinlerinin %60-80'lik bir kısmını oluşturmaktadır. Ayrıca parazitin migrasyonunda, dokulara penetrasyonunun kolaylaştırılmasında, beslenmesinde, safra yollarında ülserasyon oluşumunda ve immün yanıtı kaçırmada rol oynamaktadır. Cathepsin L1 ve cathepsin L2 proteinazların her ikisi de hücre dışı matriks proteini, kollagen, laminin, fibronektin, tip IV kollagen gibi birçok proteini parçalamaktadır (**Rao ve ark., 1998; Halton, 1997**). Cathepsin L1 protein, eozinofillerin yeni eksiste olan parazite tutunmasını önlemektedir (**Carmona ve ark., 1993**). Ayrıca immünoglobulinleri parçalayıp parazite tutunmasını engelleyerek parazitin immün sistemden kaçmasına yardımcı olmaktadır (**Berasain P et al. 2000; Smith ve ark., 1993**).

Rekombinant protein aşıları

Fasciola hepatica'ya karşı ticari bir aşı bulunmamaktadır. Hastalığın kontrol ve önlenmesinde etkin bir aşının geliştirilmesi önemli konulardan biridir.

Fasciolosis tedavisinde kullanılan triclabendazole, erken ve erişkin parazitleri öldürerek etki göstermektedir. Fakat Avrupa ve Avustralya'da triclabendazol'a dirençler bildirilmiştir (**Moll ve ark., 1998; Lane, 1998**) hastalığın kontrolünde aşı çalışmalarına hız verilmesine sebep olmasına rağmen etkin bir anti-*Fasciola hepatica* aşı geliştirilmesi çalışmaları devam etmekle birlikte yavaş ilerlemektedir.

Aşı çalışmalarında birçok molekül kullanılmasına karşın en fazla ümit verici sonuçlar sistein proteinaz ile yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Fasciolosis patogeneğinde önemli rolü olduğu tespit edilen sistein proteazlar ile ilgili çalışmalar rekombinant protein aşısı çalışmalarının önemli bir kısmını oluşturmaktadır (**Smith ve ark., 1993; Dowd ve ark., 1993**).

GEREÇ VE YÖNTEM

***Fasciola hepatica*'ların elde edilmesi**

Fasciola hepatica'nın erişkin şekli Kayseri bölgesindeki kesimhanelerden kesimi yapılan doğal olarak infekte koyun ve sığır karaciğerinin safra yollarından elde edilmiştir. Parazit şüpheli karaciğerler bistürü ile kesilerek safra yollarındaki *F. hepatica*'lar toplanmıştır. Parazit, serum fizyolojik ile 5-6 kez yıkanarak fosfatla tamponlanmış tuzlu su (PBS= 8 gr NaCl, 0.2 gr KH₂PO₄, 2.3 gr Na₂HPO₄12H₂O, 0.1 gr MgSO₄7H₂O, 0.132 gr CaCl₂) içine alınarak vakit kaybetmeden laboratuvara ulaştırılmıştır. Toplam RNA izolasyonu işlemi başlatılıncaya kadar parazitler, PBS içerisinde 37°C'de bekletilmiştir.

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

RNA izolasyonu steril koşullarda yapılmıştır. PBS içerisinde canlı olarak çıkartılan üç erişkin *F. hepatica* tartıldı ve PBS ile birkaç kez yıkanarak homojenitörde homojenize edilmiştir. Mikrosantrifüj tüplerine konulan örneğin her 50-100 mg'ına 1ml TRI reagent eklenerek, 10 dk +4°C'de 13.500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Üst sıvı pipetle yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Tüp üzerine, kullanılan TRI reagent'in her ml'si için 0.2 ml kloroform eklenmiş ve 15 sn elle hafifçe çalkalandıktan sonra oda ısısında 10 dk süreyle bekletilmiştir. 15 dk süreyle +4°C'de 13.500 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası tüpte oluşan ve üstten alta doğru sırasıyla RNA, protein ve DNA tabakalarından RNA içeren üst sıvı tabakası pipetle yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Üzerine başlangıçta kullanılan TRI reagent'in her ml'si için 0.5 ml isopropanol eklenerek 10 dk oda ısısında bekletilmiştir. Tüpler 10 dk +4°C'de 13.500 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Üst sıvı atılmış ve çöküntü üzerine başlangıçtaki TRI reagent'in her bir ml'si için en az 1 ml olacak şekilde %70'lik soğuk etanol eklenmiştir. 5 dk +4°C'de 13.500 rpm'de santrifüj edilen örneklerin üst sıvı uzaklaştırılarak, hafifçe kurutulmaya bırakılan RNA peleti, içinde 1 µl RNasin bulunan 100 µl steril dH₂O ile sulandırılıp -80°C'de stok örnek olarak saklanmıştır.

Primerlerin oluşturulması

Rekombinant protein aşısı çalışmasında hedef DNA olarak cathepsin L geninden yararlanılmıştır. Primer oluşturulmasında Wijffels ve arkadaşları tarafından izole edilen ve Genbank L33771'de tanımlanan izolattan yararlanılarak FhP F (5'- CACC ATG AGA_TTG

TTC ATA T -3') ve FhP R (5'- TCA CGG AAA TCG TGC -3') primerleri oluşturulmuştur. PCR ürününü TOPO klonlama vektörüne klonlamak için FhPF primerine CACC dizisi eklenmiştir.

Tersine Transkripsiyon ile kopya DNA (cDNA) elde edilmesi

Tersine Transkripsiyon (TT) işlemi aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

2 µg stok RNA ile 20 pmol FhP1 ve FhP2 primerleri bir mikrosantrifüj tüpünde birleştirilerek 70°C'de 5 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüpler oda ısısına gelinceye kadar soğutulmuştur. Bu ürünün 10 µl'si ile aşağıda belirtilen 15 µl TT karışımı başka bir tüpte birleştirilerek 37°C'de 1 saat inkübe edilerek cDNA elde edilmiştir.

TT karışımı

1µl	Moloney-Murine	Leukemia	Virus	Reverse
	Transcriptase			
1µl	Reverse Transcriptase Buffer			
1µl	RNasin			
4µl	dNTP			
8 µl	dH ₂ O			

***F. hepatica* cathepsin L1 geninin PCR ile çoğaltılması**

PCR reaksiyonlarında 12.5µl 2x Master mix (Vivantis)'ten, 2µl FhPF ve FhPR primerinden, 1µl genomik cDNA'dan ve 9.5 µl distile sudan oluşan 25 µl'lik karışım 0.5 ml'lik tüpler içerisinde hazırlanmıştır. Tüpler thermalcycler (SENSQUEST) cihazına yerleştirilerek amplifikasyona tabi tutulmuştur. FhPF ve FhPR primerleri için PCR şartları; 95°C 2 dakikalık ön ısıtma ile başlayan döngü, 94°C 1 dakika, 50°C 1 dakika, 72°C 1 dakika 35 döngüyü takiben 72°C 10 dakikalık son uzama şeklindeydi. PCR ile amplifikasyon sonucunda elde edilen ampikonlar %1,5'luk agoroz jelde 120 V'da 30 dk jel elektroforeze tabi tutulmuş ve sonuçlar Gel Logic 212 Pro Jel görüntüleme cihazı (Carestream) ile görüntülenmiştir. Çoğaltılan Cathepsin L1 geni pET TOPO vektörüne yerleştirilmeden önce agoroz jelden Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) kiti kullanılarak üretici firma önerisine göre saflaştırılmıştır

Cathepsin L1 geninin pET TOPO vektörüne yerleştirilmesi (rekombinant vektörün oluşturulması)

Klonlama reaksiyonu aşağıdaki gibi yapılmıştır.

<u>Klonlama reaksiyonu</u>	
PCR ürünü	2 µl
Tuz solüsyonu	1 µl
Steril su	2 µl
TOPO vektör	1 µl
Total volüm	6 µl

Klonlama reaksiyon karışımı oda ısısında 5 dakika inkübe edilerek rekombinant vektör oluşturulmuştur

Klonlama reaksiyonunun kompetant *E.coli* hücrelerine transformasyon

Bu işlem için yukarıdaki şekilde elde edilen klonlama reaksiyonunun 3 µl'si kullanılmıştır. Buz üzerinde ısıtılan 50 µl kompetan *E. coli* (İnvitrogen) hücresi içerisine ile 3 µl klonlama reaksiyon ürünü eklenmiş ve buz üzerinde 30 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra 42 °C'de 30 saniye bekletilerek sonrasında tekrardan buz üzerine transfer edilmiştir. Transformasyon karışımı üzerine 250 µl SOC medium eklenmiş ve karıştırıcı üzerinde 37 °C'de 1,5 saat inkübe edilmiştir. Transformasyon ürününün 100-200 µl'si ısıtılmış Agar plate ekilerek 37 °C'de 1 gece inkübe edilmiştir.

Kolonilerdeki rekombinant FhCL1 plazmitinin PCR Tarama (PCR Screening) ile gösterilmesi

Agar playtinde oluşan her bir koloni, koloni kaybı olmaması için önce çoğaltılmıştır. Sonrasında rekombinant plazmitin varlığı PCR ile doğrulanmıştır. Bu işlem için aşağıda belirtilen PCR karışımına kürdan ile alınan koloniler ilave edilmiştir.

<u>PCR karışımı</u>	
2X PCR Master mix	12.5 µl
20 pmol FhPF, R primerleri	2 µl
Distile su	10.5 µl
Toplam volüm	25 µl

Rekombinant FhCL1 plazmit DNA'sının elde edilmesi

PCR Screening ile pozitif olarak belirlenen koloniler ampisilin içeren 10 ml LB sıvı besi yerine ekilerek 37°C’de bir gece inkübe edilmiştir. Rekombinant plazmit DNA’sı High Pure Plasmid isolation Kiti (Roche) kullanılarak üretici firma önerisine göre aşağıdaki gibi elde edilmiştir. Elde edilen ürünün DNA dizisinin doğruluğu DNA dizi analizi yaptırılarak doğrulanmıştır.

Plazmit DNA’sının izolasyonu: İzolasyona başlamadan önce kit içerisinde yer alan Binding Buffer buz üzerine yerleştirilmiştir. 4 ml *E.coli* kültürü 6000 g’de 30 sn santrifüj edilmiştir. Pelet üzerine 250 µl Suspensiyon Buffer + RNase ile süspansiyon edilmiştir. Resüspanse edilmiş bakteri peleti üzerine 250 µl Lysis Buffer eklenerek 5-6 kez ters-düz edilmiştir. Oda ısısında 5 dakika inkübe edilen örnekler üzerine 350 µl soğuk Binding Buffer eklenerek buz içerisinde 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 10 dakika 13500 rpm’de santrifüj edilerek üst sıvı kit içerisinde yer alan kolum üzerine aktarılmıştır. 13500 rpm’de 1 dk santrifüj edilen filtre Wash buffer I ve II ile birer kez yıkanmıştır. Steril bir tüpe aktarılan kolum üzerine 100 µl Elution buffer eklenerek oda ısısında 2 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 13500 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir.

Rekombinant plazmidin BL21 *E. coli* hücrelerine transformasyonu

Buz üzerinde ısıtılan 50 µl BL21 star *E. coli* hücrelerine (İnvitrogen) 5 µl plazmit DNA’sı eklenmiş ve buz üzerinde 30 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra 42 °C’de 30 saniye bekletilerek sonrasında tekrardan buz üzerine transfer edilmiştir. Transformasyon karışımı üzerine 250 µl SOC medium eklenmiş ve karıştırıcı üzerinde 37 °C’de 1,5 saat inkübe edilmiştir. Transformasyon ürününü Carbecilline içeren 10 µl LB’ye ekilerek bir gece 37 °C’de inkübe edilmiştir.

Rekombinant protein ekspresyonu

Rekombinant plazmidin BL21 star *E. coli* hücrelerine transformasyon ürününden 500 er µl alınarak iki farklı 10 ml’lik LB’ye ekilmiştir. 37 °C’de OD₆₀₀ 0.5-0.8 olana kadar yaklaşık 2 saat inkübe edilmiş ve kültürler 4 adet beşer ml’lik kültüre bölünmüştür. Kültürlerden birine son konsantrasyonu 0.5mM, ikincisine 1mM, üçüncüsüne ise 2 mM olacak şekilde IPTG eklenmiştir. Dördüncü tüpe ise IPTG eklenmemiştir. Dolayısıyla IPTG ile farklı konsantrasyonlarda indüklenmiş ve indüklenmemiş kültürler elde edilmiştir. İndüklemeyen önce kültürlerden 500 µl alınarak bir mikrosantrifüj tüpüne konularak 13 000 rpm’de 1 dk

santrifüj edildi ve pelet -20°C 'de saklanmıştır. Bu tüp 0. dk. Olarak işaretlenmiştir. 37°C 'de inkübasyona devam edilerek, inkübasyonun 2,5-4 ve 5,5. Saatlerinde her bir kütlüden örnek alınarak ekspresyon analizi yapılmıştır.

Rekombinant protein analizi

Rekombinant protein ekspresyonu sonucu elde edilen örnekler SDS-PAGE'de yürütülmüştür. Polyacrylamide jel coomassie blue ile boyanarak beklenen büyüklükteki rekombinant protein gözlemlenmiştir. Ayrıca örneklerden Western blot yapılarak rekombinant protein ekspresyonu tespit edilmiştir.

Polyacrylamide jelin coomassie blue ile boyanması

İndükleme esnasında alınan örnekler üzerine 100 μl gel-loading buffer eklenerek vortekslenmiştir. Boya ile birlikte iki dakika kaynatılan örneklerin 20 μl 'si jele yüklenmiştir. 120 V'ta 4 saat elektroforez sonrasında jel Fiksatif solüsyonu (50:10:40= Methanol: Asetik asit: distile su) ile 30 dk oda ısısında shakerda inkübe edilmiştir. Bu işlemden sonra fiksatif solüsyonu dökülerek jel distile su ile birkaç kez yıkanmıştır. Yıkanan jel üzerine aşağıda tarif edildiği şekilde hazırlana coomassie blue boyası dökülerek 4 saat oda ısısında shakerda inkübe edilmiştir.

Stok boyanın hazırlanışı: 12 gr Brilliant Blue G (SERVA) 300 ml methanol içinde çözdürüldü ve üzerine 60 ml asetik asit eklenmiştir.

Boyanın hazırlanışı: 500 ml methanol+ 400 ml distile su+100 ml asetik asit içerisinde 30 ml stok boyası çözdürülmüştür.

İnkübasyon sonrası boya dökülerek jel birkaç kez distile su ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra jel üzerine Destain solüsyonu (45:10:45= Methanol: Asetik asit: distile su) dökülerek boyanın fazlası uzaklaştırılmıştır. Bu işlem 16 saat devam ettirilmiş ve birkaç kez solüsyon değiştirilmiştir.

Western blot

İndükleme esnasında alınan örnekler üzerine 100 μl gel-loading buffer eklenerek vortekslenmiştir. Boya ile birlikte iki dakika kaynatılan örneklerin 20 μl 'si jele yüklenmiştir. 120 V'ta 4 saat elektroforez sonrasında jel üzerindeki proteinler nitroselüloz membrana

transfer edilmiştir. Blotlama sonrasında nitroselüloz membran blocking buffer (500 ml PBS+ 250 µl Tween 20+ 25 gr yağsız süt tozu) içerisine atılarak 3 saat oda ısında shakerda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında membran 5 kez 5'er dakika yıkama solüsyonu (500 ml PBS+ 250 µl Tween 20) ile yıkanmıştır. Yıkama sonrasında blocking buffer ile 1:5000 oranında sulandırılan Anti- HisG-HRP antikoru (İnvitrogen) membran üzerine dökülerek 1 gece oda ısında shakerda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında membran 5 kez 5'er dakika yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır. Yıkama sonrasında bantlar aşağıda tarif edildiği şekilde hazırlanan DAB tablet ile görüntülenmiştir.

DAB tablet hazırlanışı: 15 ml 50 mM pH:7,5 tris içerisinde 1 dab tablet çözdürülmüştür. Solüsyon 0,2µm porluk flitreden süzülerek 20 µl 30'luk H₂O₂ eklenmiştir.

Rekombinant füzyon proteininin saflaştırılması

Rekombinant füzyon proteininin saflaştırılması ProBond purifikasyon system (İnvitrogen) kullanılarak üretici firma önerisine göre aşağıdaki gibi yapılmıştır.

- **Örneklerin elde edilmesi:** 50 mlt kültürden hücreler 4000rpm de 10 dk santrifüj yapılarak elde edilmiştir. Hücreler 8 mlt pH'ı 7,8 olan Guanidinium Lysis Buffer ile süspanse edilerek 5-10 dk oda ısında yavaş bir şekilde ters-düz edilerek inkübe edilmiştir. Sonrasında buz üzerinde sonikatör kullanılarak (1 dakika, %30 cycle, %100 power) parçalanmıştır. Karışım 4000 rpm de 15 dk santrifüj edilerek üst sıvı yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- **Kolumun Hazırlanması:** Şişe içerisindeki rezin ters-düz edilerek homojen hale getirilmiştir. Kit içerisinde yer alan 10 ml'lik prüfikasyon kolumun içine **2ml** resin eklenerek 5-10 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. Bu şekilde resinin koluma tam anlamı ile yerleşmesi sağlanmıştır. 500 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırılmıştır. Kolum ilk olarak 6 ml distile su yıkanmış, daha sonra ise 6 ml Denaturing Binding buffer eklenerek resinin resüspanse olması sağlanmıştır. Tekrardan santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırılmıştır. Bu basamak 2 kez tekrarlanmıştır.
- **Proteinin saflaştırılması:** Hazırlanmış olan 8 ml lizat kolum içerisine dökülerek oda ısında 30 dk shakerda inkübe edilmiştir. Sonrasında 500 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırılmıştır. 4 ml Denaturing Binding buffer eklenerek resinin

resüspanse olması sağlanmıştır. Tekrardan santrijüj edilerek üst sıvı uzaklaştırılmıştır. Bu basamak 2 kez tekrarlanmıştır. Kolum üzerine 4 ml pH'ı 6 olan Denaturing Wash buffer eklenerek resinin resüspanse olması sağlanmıştır. Santrijüj edilerek üst sıvı uzaklaştırılmıştır. Bu basamak 2 kez tekrarlanmıştır. Kolum üzerine 4 ml pH'ı 5,3 olan Denaturing Wash buffer eklenerek resinin resüspanse olması sağlanmıştır. Santrijüj edilerek üst sıvı uzaklaştırılmıştır. Bu basamak 3 kez tekrarlanmıştır. Kolumun alt tarafındaki kapak kopartılmış ve steril bir tüpe yerleştirilmiştir. Üzerine 5 ml Denaturing Elution buffer eklenerek proteinin elüsyonu sağlanmıştır.

Proteininin miktarının hesaplanması

Protein miktarı Lowry yöntemine göre hesaplanmıştır. Bu yöntem için kullanılan stok solüsyonlar aşağıda verilmiştir.

Stok solüsyonlar

Lowry A: %2'lik Na_2CO_3 (0,1 M NaOH ile hazırlanmıştır).

Lowry B: %1'lik CuSO_4

Lowry C: %2'lik $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Lowry Stock Reagent:

4,9 ml Lowry A + 50 µl Lowry B + 50 µl Lowry C

Albumin hazırlanışı: 15 ml distile su içerisinde 15 mg Albumin çözdürülmüştür.

Standartlar: Standartlar tablo 1'de verildiği şekilde hazırlanmıştır.

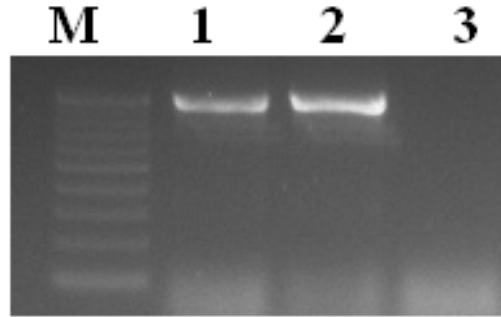
Tablo 1: Standartların hazırlanışı		
Protein (mg)	Albumin (µl)	PBS (µl)
0	0	100
10	10	90
20	20	80
30	30	70
50	50	50
75	75	25
100	100	0

Protein ölçümü:Yukarıda tarif edildiği şekilde toplamı 100 µl olacak şekilde hazırlanan standartlar ve saflaştırılmış proteinin 100 µl'si üzerine 1 ml Lowry Stock Reagent eklenerek örnekler 30 dk oda ısısında karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında her örneğe 100 µl Folin's reagent (1:1 sulandırılan) eklenerek örnekler 30 dk oda ısısında karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örnekler 595 nm dalga boylu filtrede okunmuştur. Standartlardan grafik çizilerek örnekteki protein miktarı hesaplanmıştır.

BULGULAR

***Fasciola hepatica*'ların elde edilmesi, RNA izolasyonu, cDNA elde edilmesi ve cathepsin L1 geninin PCR ile çoğaltılması**

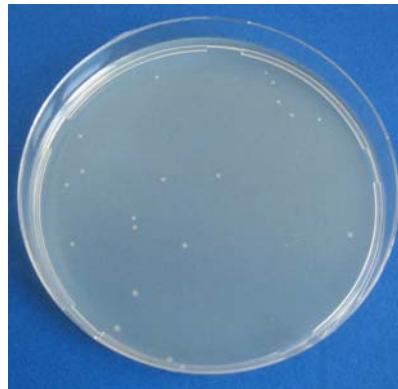
Doğal infekte hayvanlardan elde edilen *F.hepatica*’lardan RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNA ile cDNA’lar elde edilmiştir. cDNA’lardan FhPF, R primerleri ile yaklaşık 981 bp büyüklüğündeki gen fragmentini amplifiye edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1: Cathepsin L1 geninin PCR ile çoğaltılması.
M-100 bp’lik marker (Vivantis),
1 ve 2-Pozitif örnek, 3-Negatif kontrol

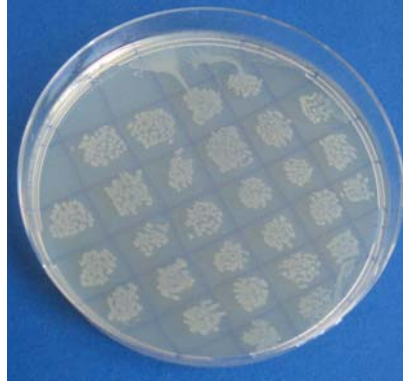
Cathepsin L1 geninin pET TOPO vektörüne yerleştirilmesi, Transformasyon, Rekombinant plazmidin varlığının doğrulanması, elde edilmesi ve DNA dizisinin kesinleştirilmesi

PCR ile çoğaltılan Cathepsin L1 geni pET TOPO vektörüne yerleştirilmiştir. Oluşan klonlama reaksiyonunun 3 µl’si kompetan *E. coli* hücresi içerisine transforme edilmiştir. Transformasyon ürünü agar plate ekilerek 37 °C’de 1 gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kolonilerin oluşumu gözlenmiştir (Şekil 2).



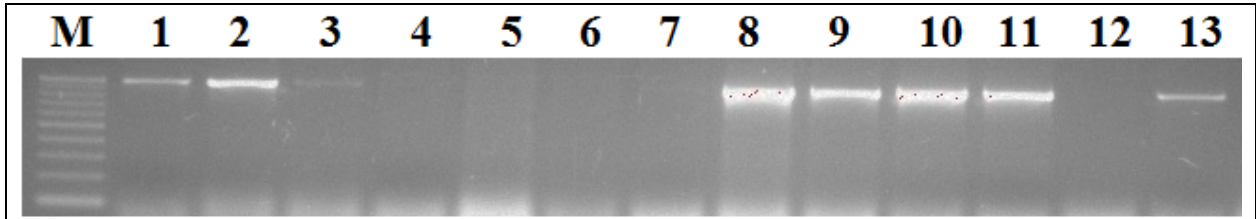
Şekil 2: Transformasyon sonucunda oluşan koloniler

Koloni kaybı olmaması için kolonilerin yeni besiyerine aktararak 37 °C’de 1 gece inkübe edilmiştir (Şekil 3).



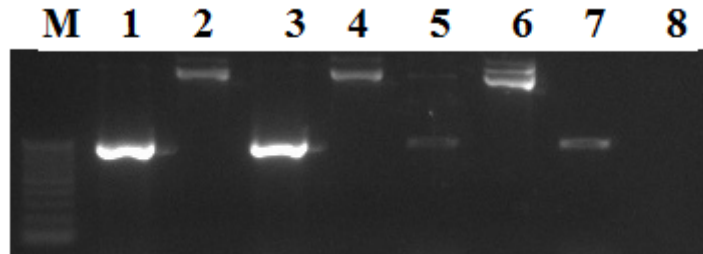
Şekil 3: Çoğaltılan koloniler

Oluşan kolonilerden PCR ile Rekombinant plazmidin varlığı doğrulanmıştır. Oluşan kolonilerden 23 koloniden 16'sı PCR Screening ile pozitif bulunmuştur (Şekil 4).



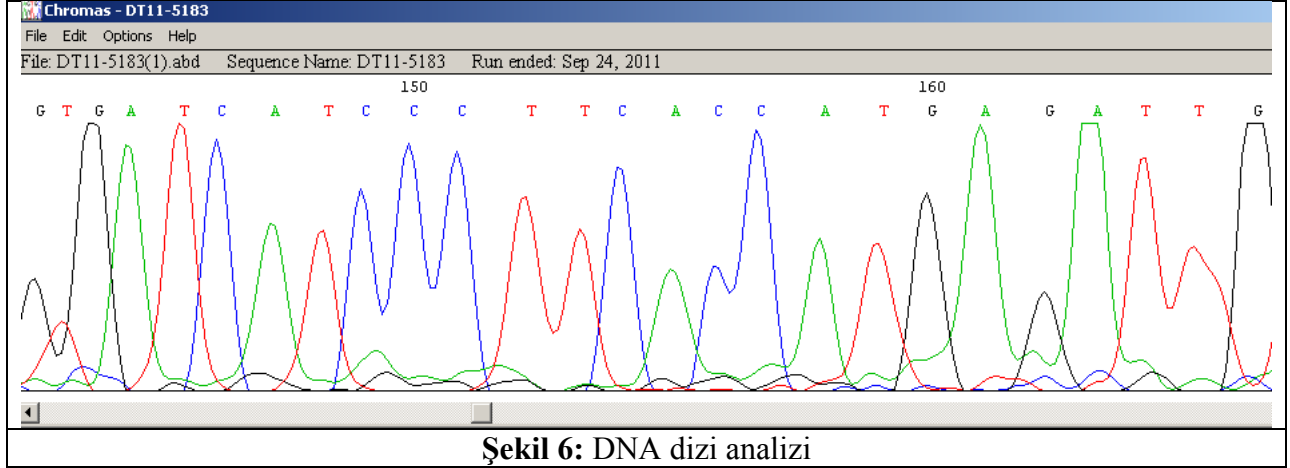
Şekil 4: PCR Screening. M-100 bp'lik marker (Vivantis), 1-2-3-8-9-10-11-13-Pozitif örnekler, 4-5-6-7-12- Negatif örnekler

PCR Screening ile pozitif olarak belirlenen koloniler ampisilin içeren 10 ml LB sıvı besi yerine ekilerek 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Rekombinant plazmit DNA'sı High Pure Plasmid isolation Kiti (Roche) kullanılarak üretici firma önerisine göre elde edilmiştir. Elde edilen plazmit DNA'larından yeniden PCR kurularak rekombinant plazmit DNA'sının varlığı doğrulanmıştır (Şekil 5).



Şekil 5: Rekombinant plazmit DNA'sının PCR ile doğrulanması. M-100 bp'lik marker, 2-4-6-Plazmit DNA'sı, 1-3-5-Plazmit DNA'sından yapılan PCR ürünü, 7-Pozitif kontrol, 8-Negatif kontrol

Elde edilen ürüne DNA dizi analiziyle cathepsin L1 geninin varlığı ve doğru oryantasyonu tespit edilmiştir. (Şekil 6, Tablo 2).



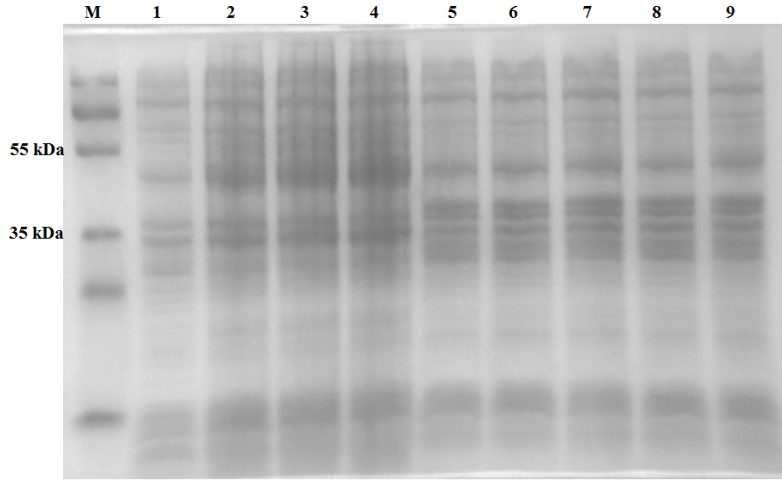
Şekil 6: DNA dizi analizi

Tablo 1: DNA dizi analizi

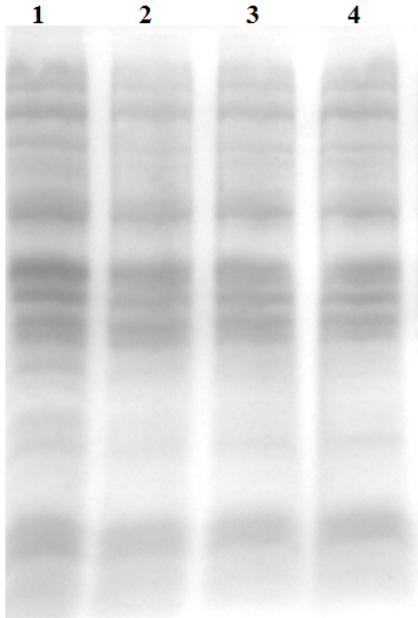
```
CGGTATCCTCCCAATATTATGTTTAACTTTAAGAAGGAGATCATAACATATGCG
GGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGC
AAATGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGTGATCATCCCTTCACCAT
GAGATTGTTTCATATTAGCCGTCCTCACAGTCGGAGTGCTTGGCTCGAATGATG
ATTTGTGGCACTCAGTGGAAGCGAATGTACAACAAAGAATACAATGGGGCTG
ACGATCAGCACAGACCGAAATATTTGGGAAAAGAATGTGAAACATATCCAAT
GAACATAACCTAAGTCACAGATCTCGGCCTCGTCACCCTACACATTGNGGACT
GAACCAATACACTGATATGACAATTCAGAGGA
```

Rekombinant plazmidin BL21 *E. coli* hücrelerine transformasyonu, Rekombinant protein ekspresyonu, Rekombinant protein analizi ve Rekombinant füzyon proteininin saflaştırılması

Doğru oryantasyonda olduğu belirlenen plazmit DNA'sı BL21 star *E. coli* hücrelerine transfer edilmiştir. Carbecilline içeren 10 ml LB besiyerine ekilerek bir gece 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında Rekombinant plazmidin BL21 star *E. coli* hücrelerine transformasyon ürününden 500 er µl alınarak iki farklı 10 ml'lik LB'ye ekilmiştir. 37 °C'de OD₆₀₀ 0.5-0.8 olana kadar yaklaşık 2 saat inkübe edilmiş ve kültürler 4 adet beşer ml'lik kültüre bölünmüştür. Kültürler 0.5mM, 1mM ve 2 mM IPTG eklenmiştir. Dördüncü tüpe ise IPTG eklenmemiştir. Tüplerden indüklenmeden önce alınan örnekler 0. dk. olarak işaretlenmiştir. 37 °C'de inkübasyona devam edilerek, inkübasyonun 2,5-4 ve 5,5. Saatlerinde her bir kütlüden örnek alınarak SDS-PAGE ile ekspresyon analizi yapılmıştır (Şekil 7 ve 8).

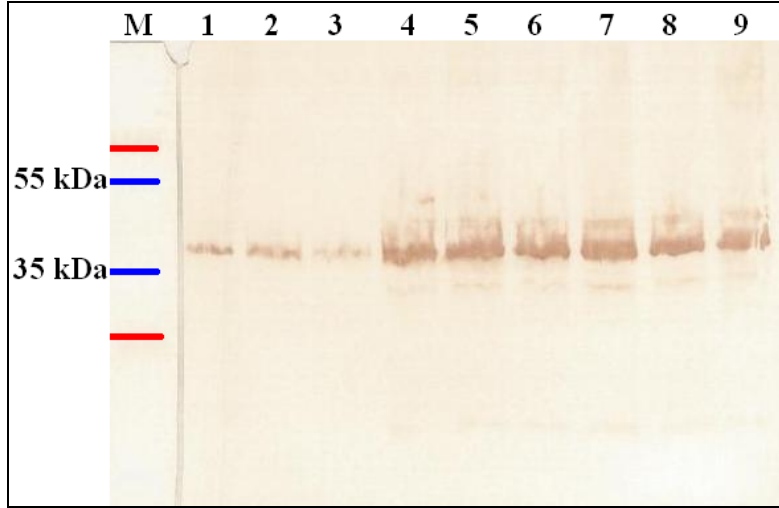


Şekil 7: Farklı konsantrasyonlarda indüklenmiş olan örneklerin farklı saatlerdeki protein ekspresyonu. M-SDS marker(Thermo scientific), 1-Sıfırıncı dakikada alınan örnek, 2-IPTG'siz 2,5 saat inkübe edilen örnek, 3- IPTG'siz 4 saat inkübe edilen örnek, 4- IPTG'siz 5,5 saat inkübe edilen örnek 5-0.5 mM IPTG ile 2,5 saat indüklenen örnek, 6-0.5 mM IPTG ile 4 saat indüklenen örnek, 7- 0.5 mM IPTG ile 5,5 saat indüklenen örnek, 8-1 mM IPTG ile 2,5 saat indüklenen örnek, 9-1 mM IPTG ile 4 saat indüklenen örnek.



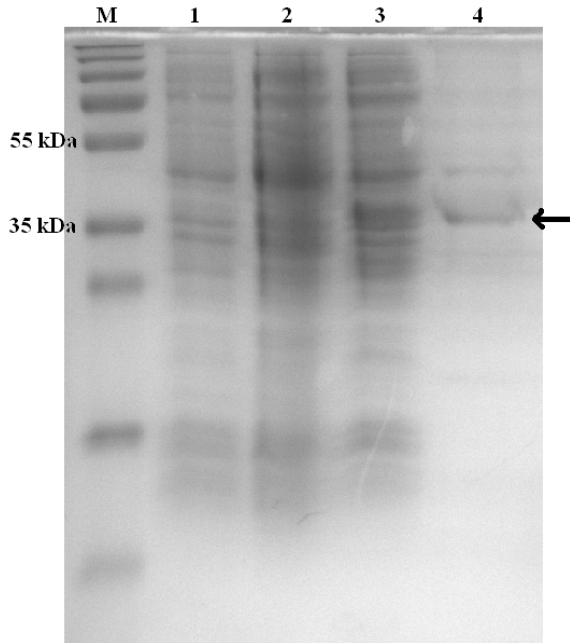
Şekil 8: Farklı konsantrasyonlarda indüklenmiş olan örneklerin farklı saatlerdeki protein ekspresyonu. 1-1 mM IPTG ile 5,5 saat indüklenen örnek, 2- 2 mM IPTG ile 2,5 saat indüklenen örnek, 3-2 mM IPTG ile 4 saat indüklenen örnek, 4- 2 mM IPTG ile 5,5 saat indüklenen örnek.

Ekspresyon analizi sonucunda uygun yerde bant tespit edilmiştir. Proteinimizin doğru protein olduğu Western blot ile doğrulanmıştır (Şekil 9).



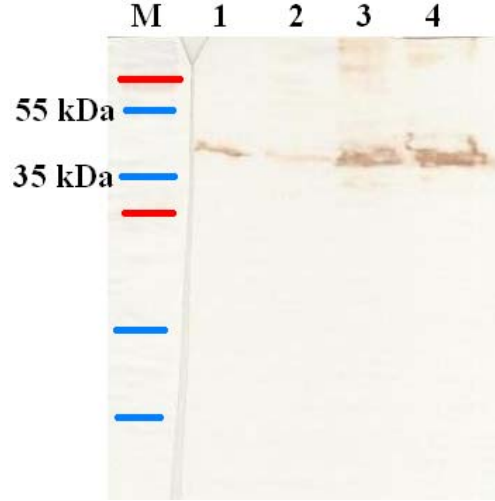
Şekil 9: Western blot sonucu. M- SDS marker (Thermo scientific), 1-Sıfırıncı dakikada alınan örnek, 2-IPTG'siz 2,5 saat inkübe edilen örnek, 3- IPTG'siz 5,5 saat inkübe edilen örnek, 4-0.5 mM IPTG ile 2,5 saat indüklenen örnek, 5-0.5 mM IPTG ile 5,5 saat indüklenen örnek, 6-1 mM IPTG ile 2,5 saat indüklenen örnek, 7-1 mM IPTG ile 5,5 saat indüklenen örnek, 8-2 mM IPTG ile 2,5 saat indüklenen örnek, 9-2 mM IPTG ile 5,5 saat indüklenen örnek

Rekombinant protein analizi sonucunda 1 mM IPTG ile 5,5 saat indüklediğimiz örnekten rekombinant füzyon proteininin saflaştırılmasına karar verilmiştir. Rekombinant füzyon proteininin saflaştırılması ProBond purifikasyon system kullanılarak füzyon proteini saflaştırılmıştır (Şekil 10, 11).



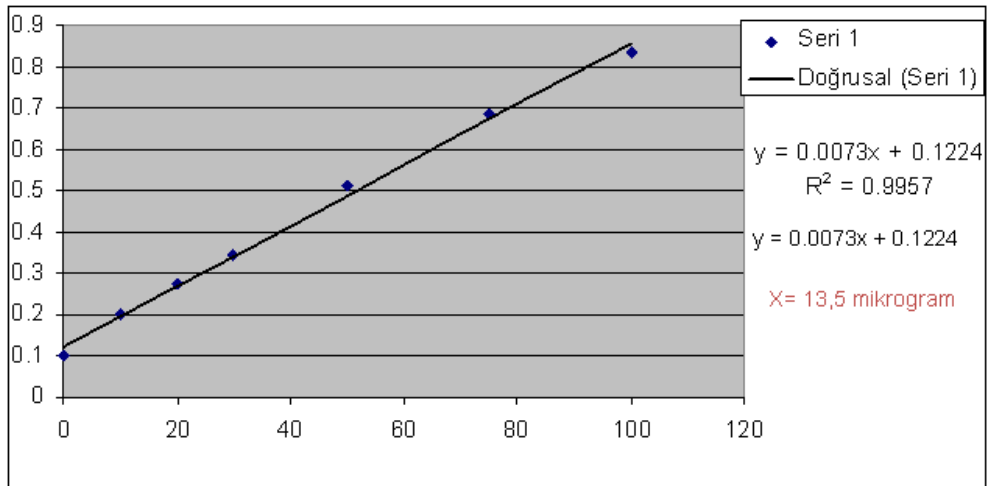
Şekil 10: Saflaştırılmış proteinden yapılan SDS-PAGE sonuçları. M-SDS marker (Thermo scientific), 1-Sıfırıncı dakikada alınan örnek, 2-IPTG'siz 5,5 saat inkübe edilen örnek, 3-1 mM IPTG ile 5,5 saat indüklenen örnek, 4-Saf protein

Şekil 11: Saflaştırılmış proteinden yapılan Western blot sonuçları. M-SDS marker (Thermo scientific), 1-Sıfırıncı dakikada alınan örnek, 2-IPTG'siz 5,5 saat inkübe edilen örnek, 3-1 mM IPTG ile 5,5 saat indüklenen örnek, 4-Saf protein



Saflaştırılan protein Lowry Yöntemine göre hesaplandı ve 100 µl proteinimiz içerisinde 13,5 µg protein olduğu tespit edildi (Grafik 1).

Grafik 1: Lowry Yöntemi ile protein miktarının ölçümü



TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma da *Fasciola hepatica* patogeneğinde önemli rol oynayan cathepsin L proteininin rekombinant DNA teknolojisiyle elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, Kayseri bölgesindeki kesimhanelerde kesimi yapılan doğal olarak infekte sığır karaciğerinden elde edilen *F. hepatica*'dan toplam RNA ve RNA'lardan catapsin L1 cDNA'sı elde edilmiş, cathepsin L1 geni PCR ile çoğaltılmış ve cathepsin L1 proteininin Champion pET100 Directional TOPO Expression kiti ile ekspirasyonu gerçekleştirilmiştir.

Paraziter hastalıklarda olduğu gibi diğer enfeksiyöz hastalıklarda da en önemli konulardan ikisi hastalığın tanısı ve korunma önlemlerinin alınmasıdır. Gelişen rekombinant DNA teknolojisiyle birlikte hastalıkların tanısı ve aşı çalışmaları için hedef proteinlerin üretilmesi sağlanmaktadır. Bu projede de rekombinant DNA teknolojisiyle elde edilen cathepsin L1 proteini parazitlerle mücadele ve kontrol çalışmalarında aşı adayı olarak ve ayrıca parazite karşı tanı amacıyla serolojik deneylerde (örneğin ELISA'da) de kullanılabilecektir. Yapılan çalışmalarda da cathepsin L1 proteini kullanılarak geliştirilen ELISA kitlerinde başarı sağlandığı bildirilmiştir (**Rokni ve ark., 2002; Strauss ve ark., 1999**).

F. hepatica patogenezinde önemli rol alan cathepsin L1 parazit konak ilişkisinde önemli olan moleküller içerisinde ilk tanımlananı, aşı denemelerinde en çok kullanılanı ve bu konuda en ümit verici olan moleküldür. Golden ve arkadaşları (Golden ve ark., 2010) Cathepsin L1 ile ilgili yaptıkları bir çalışmada fascioliosisin kontrolünde etkili olabileceğini bildirmişlerdir. Yapılan diğer çalışmalarda, bu molekülün sığır ve koyunlar da parazit yükünün %50-72 oranında azalmasına neden olduğu gösterilmiştir. Parazit yükünün azalmasına ek olarak aşılanmış hayvanlarda kontrollere göre daha az parazitin olgunlaştığı ve yumurta üretiminin de belirgin oranda azaldığı bildirilmiştir. Jayaraj ve arkadaşları (Jayaraj ve ark., 2009) fascioliose karşı aşı geliştirmek amacı ile yaptıkları bir çalışmada Cathepsin B ve Cathepsin L5 kombinasyonu ile aşıladıkları grupta %83 koruma olduğunu bildirmişlerdir. Bu proje ile geliştirilen rekombinant protein, aşı adayı olarak kullanılabilir. Günümüze kadar *F. hepatica* dâhil hiç bir parazite karşı ticari bir aşının geliştirilememiş olması bu konudaki her türlü çalışmayı önemli kılmaktadır. Dolayısıyla bu proje ile *F. hepatica*'ya karşı aşı adayı olarak kullanılabilir rekombinant proteinlerin elde edilmesi ülkemiz için ilk çalışma olmuştur.

Sonuç olarak: “*Fasciola hepatica*'ya karşı aşı adayı olabilecek rekombinant cathepsin L proteininin elde edilmesi” başlıklı proje ile cathepsin L proteininin rekombinant DNA teknolojisiyle elde edilmesi amaçlanmış olup planlanan süre içerisinde proje amacına ulaşmıştır.

Bu proje sonrasında; çalışmadan elde edilen sonuçlarla makale yazma çalışmasına başlanmış olup proje ile geliştirilen rekombinant protein iki farklı amaçla kullanılabilir. İlk olarak rekombinant protein, protein aşısı olarak kullanılabilir. Bu amaçla “Ratların farklı adjuvantlarla kombine rekombinant sistein proteazla (cathepsin L1) *Fasciola hepatica*'ya karşı aşılama” başlıklı 193.190 TL bütçeli TÜBİTAK projesi desteklenmesi amacıyla sunulmuştur.

İkinci olarak olarak ELISA ve Western blot tanı geliştirilmesi çalışmaları. Bundan sonraki proje çalışmalarında ELISA kiti ve Western blot kiti geliştirilmesi ve Türkiye'den elde edilen *F. hepatica* izolatından elde edilen bu rekombinant proteine patent alınma çalışmaları yapılacaktır.

KAYNAKLAR

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 3. Baskı, New York & London: Garland Publishing, 1994: 551–599.

Andrews SJ The Life Cycle of *Fasciola hepatica*, In *Fasciolosis*, Ed: Dalton J. P., Vol: 1, CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK, 1999. Pp: 1–30.

Bacq Y, Besnier JM, Duong TH, Pavie G, Metman EH, Choutet P. Successful treatment of acute fascioliasis with bithionol. *Hepatology* 1991; 14: 1066–1069.

Behm CA, Sangster NC Pathology, Pathophysiology and Clinical Aspects. In *Fasciolosis*, In *Fasciolosis*, Ed: Dalton J. P., Vol: 1, CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK, 1999. Pp: 185–224.

Berasain P, Carmona C, Frangione B, Dalton JP, Goni F. *Fasciola hepatica*: parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses: determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced. *Exp Parasitol* 2000; 94: 99–110.

Camilla SG, Sharon BB, Peter FW. Imported *Fasciola hepatica* infection in the United States and treatment with triclabendazole. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1–5.

Carmona C, Dowd AJ, Smith AM, Dalton JP. Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 62: 9–17.

Dowd AJ, Smith AM, McGonigle S, Dalton JP. Purification and characterisation of a second cathepsin L proteinase secreted by the parasitic trematode *Fasciola hepatica*. *Eur J Biochem* 1994; 223: 91–98.

el-Karaksy H, Hassanein B, Okasha S, Behairy B, Gadallah I. Human fascioliasis in Egyptian children: successful treatment with triclabendazole. *J Trop Pediatr* 1999; 45: 135–138.

Fairweather I, Boray JC Mechanisms of Fasciolicide action and drug resistance, In *Fasciolosis*, In *Fasciolosis*, Ed: Dalton J. P., Vol: 1, CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK, 1999.Pp: 47–111.

Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. 3. Baskı, Washington: ASM Press, 1997: 363–364.

Golden O, Flynn RJ, Read C, Sekiya M, Donnelly SM, Stack C, Dalton JP, Mulcahy G, Protection of cattle against a natural infection of *Fasciola hepatica* by vaccination with recombinant cathepsin L1 (rFhCL1), Vaccine 2010; 28(34): 5551–5557.

Graczyk TK, Fried B. Development of *Fasciola hepatica* in the Intermediate Host, In *Fasciolosis*, Ed: Dalton J. P., Vol: 1, CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK, 1999. Pp: 31–46.

Halton DW. Nutritional adaptations to parasitism within the platyhelminthes. Int J Parasitol 1997; 27: 693–704.

Heussler VT, Dobbelaere DA. Cloning of a protease gene family of *Fasciola hepatica* by the polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol 1994; 64: 11–23.

Hillyer GV Immunodiagnosis of Human and Animal Fasciolosis, In *Fasciolosis*, In *Fasciolosis*, Ed: Dalton J. P., Vol: 1, CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK, 1999.Pp: 435–447.

Jayaraj R, Piedrafita D, Dynon K, Grams R, Spithill TW, Smooker PM, Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens, Vet Parasitol 2009; 160(3-4): 230–236.

Kaplan M, Kuk S, Kalkan A. Fasciolosis: Olgu sunusu. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2002; 26: 393–395.

Laird PP, Boray JC. Human fasciolosis succesfully treated with triclabendazole. Aust N Z J Med 1992; 22: 45–47.

Lane G. Anthelmintic resistance. The Veterinary Record 1998;143(8):232.

Mas-Coma S, Bargues MD, Esteban JG. Human Fasciolosis, In *Fasciolosis*, In *Fasciolosis*, Ed: Dalton J. P., Vol: 1, CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK, 1999.Pp: 411–434.

Moll L, Gaasenbeek CPH, Vellema P, Borgsteede FHM. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. Veterinary Parasitology 2000; 91(1–2): 153–158.

Mulcahy G, Joyce P, Dalton JP. Immunology of *Fasciola hepatica* infection. In *Fasciolosis*, In *Fasciolosis*, Ed: Dalton J. P., Vol: 1, CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK, 1999. Pp: 341–375.

Panaccio M, Trudgett A Molecular Biology. In *Fasciolosis*, In *Fasciolosis*, Ed: Dalton J. P., Vol: 1, CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK, 1999.Pp: 449–464.

Price TA, Tuazon CU, Simon GL. Fascioliasis: case reports and review. Clin Infect Dis 1993; 17: 426,430.

Pulpeiro JR, Armesto V, Varela J, Corredoira J. Fascioliasis: findings in 15 patients. Br J Radiol 1991; 64: 798–801.

Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62: 597–635.

Roche L, Tort J, Dalton JP. The propeptide of *Fasciola hepatica* cathepsin L is a potent and selective inhibitor of the mature enzyme. Mol Biochem Parasitol 1999; 25: 271–277.

Roitt IM, Brostoff J, Male DK. Immunology. Rook G (editor). Cell-Mediated Immune Reactions. London: Mosby-Year book Europe Limited, 1983: 81–8.15.

Rokni MB, Massoud J, O'Neill SM, Parkinson M, Dalton JP. Diagnosis of human fasciolosis in the Gilan province of Northern Iran: application of cathepsin L-ELISA. Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 44(2): 175–179.

Saygı G. Temel Tıbbi Parazitoloji. 1. Baskı, Sivas: Esnaf Ofset Matbaacılık, 1998: 131-134.

Smith AM, Dowd AJ, Heffernan M, Robertson CD, Dalton JP. *Fasciola hepatica*: a secreted cathepsin L-like proteinase cleaves host immunoglobulin. *Int J Parasitol* 1993; 23: 977–983.

Sönmez A, Mas MR, Aras E, Uygun A, Tanyüksel M. *Fasciola hepatica*: Karaciğerde nadir bir kitle sebebi. *Türk Gastroenteroloji Dergisi*. 2001; 12: 145–148.

Spithill TW, Smooker PM, Copeman DB. *Fasciola gigantica*: Epidemiology, Control, Immunology and Molecular Biology, In *Fasciolosis*, In *Fasciolosis*, Ed: Dalton J. P., Vol: 1, CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK, (1999).Pp:465-525.

Strauss W, O'Neill SM, Parkinson M, Angles R, Dalton JP. Short report: Diagnosis of human fascioliasis: detection of anti-cathepsin L antibodies in blood samples collected on filter paper. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60(5): 746-748.

Unat EK. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. 5. Baskı, İstanbul: Cerrahpaşa Tıp Fak. Vakfı Yayınları, 1995: 379-387.