*Türkiye Parazitoloji Dergisi, 30 (1): 25-28, **2006***
© Türkiye Parazitoloji Derneği

Acta Parasitologica Turcica
© Turkish Society for Parasitology

Fasciola hepatica Cathepsin L1 Geninin Ökaryotik Hücrelerde Belirlenmesi

Salih KUK[1], Mustafa KAPLAN[1], Ahmet KALKAN[2], Aykut ÖZDARENDELİ[3]

Fırat Üniversitesi [1]Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, [2]Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, [3]Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, Elazığ

ÖZET: *Fasciola hepatica* sıklıkla sığır ve koyunlarda nadiren de insanlarda fasciolosise neden olan bir karaciğer trematodudur. Fasciolosis dünyada ve ülkemizde yaygın olarak bulunmakta ve özellikle hayvancılık sektöründe önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. *F. hepatica*'nın ES antijenlerinden olan Cathepsin L1 parazitin dokulara penetrasyonda, immun yanıttan kaçmasında ve beslenmesinde önemli rolü olan bir enzimdir. Özgül antijenik yapısı nedeniyle tanı yöntemlerinde ve korunma amacıyla immünizasyon çalışmalarında kullanılabilecek potansiyel bir moleküldür. Bu çalışmada *F. hepatica* cathepsin L1 geninin klonlanması ve ökaryotik hücrelerde belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla erişkin *F. hepatica*'dan toplam RNA izolasyonu yapılarak tersine transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (TT-PZR) ile cathepsin L1 DNA amplikonları oluşturuldu. Cathepsin L1 genine özgü primerler kullanılarak 981 bazlık cathepsin L1 geni kodlama bölgesi çoğaltıldı. Daha sonra, cathepsin L1 geni pCI-neo açıklama vektörüne klonlanarak PZR-T ve enzim kesim deneyleri ile genin varlığı doğrulandı. Oluşturulan rekombinant plazmit, pFhCL1 olarak adlandırıldı. Rekombinant pFhCL1 plazmiti Vero hücrelerine geçici olarak transfekte edilerek cathepsin L1 proteinin varlığı Western immuno blot tekniği ile gösterildi.

Anahtar Sözcükler: *Fasciola hepatica*, cathepsin L1, klonlama, protein belirlenmesi

Expression of the Cathepsin L1 Gene of *Fasciola hepatica* Eucaryotic Cells

SUMMARY: The parasitic trematode *Fasciola hepatica* is the causative agent of fasciolosis that is common in ruminants especially sheep and cattle and is occasionally found in humans. Fasciolosis has a worldwide distribution including Turkey and causes major economic losses in agricultural industry. Cathepsin L1 is one of the major molecules in the excretory-secretory products of F. hepatica and is involved in tissue penetration, immune evasion and feeding and therefore may be used in vaccination and serological diagnosis. The aim of this study was to evaluate cloning and expression of the cathepsin L1 gene of *F. hepatica* eucaryotic cells. For this purpose, total RNA was extracted from adult *F. hepatica*. Cathepsin L1 DNA amplicons were obtained with the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The 981 base-coding gene region of cathepsin L1 was amplified using specific primers to the cathepsin L1 gene. Then, the cathepsin L1 gene was cloned into the pCI-neo mammalian expression vector. The presence of the cathepsin L1 gene was confirmed by PCR screening and enzyme digestion assays. So, the resulting recombinant plasmid was named pFhCL1. Afterwards, the pFhCL1 vector was transiently transfected into Vero cells. The presence of the cathepsin L1 proteins was shown by Western immunoblotting.

Key Words: *Fasciola hepatica*, cathepsin L1, cloning, protein expression.

GİRİŞ

Fasciola hepatica, koyun, keçi ve sığır gibi besi hayvanlarında oldukça sık insanlarda ise nadir görülen fasciolsis etkeni olan bir karaciğer trematodudur. Dünyada ve ülkemizde yaygın olarak bulunmakta ve önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. İnsan infeksiyonlarında kesin tanı, dışkıda *F. hepatica* yumurtalarının görülmesiyle konur. Serolojik tanı yöntemlerinden ELISA en sık kullanılan yöntemdir (1-4).

Fasciola hepatica excretory-secretory (ES) antijenlerinden cathepsin L1 proteaz enziminin antijenik olarak daha özgül olduğu ve çapraz reaksiyonların çok daha az görüldüğü bildirilmektedir. Cathepsin L1 enzimi *F. hepatica*'nın dokulara penetrasyonunda, immun yanıtın gelişiminde ve fasciolosisin patogenezinde oldukça önemli görevler almaktadır (5, 6).

Fasciolosisin serolojik tanısı ve fasciolosisden korunma için aşı geliştirme çalışmaları yapılmış ve elde edilen sonuçların

Geliş tarihi/Submission date: 25 Ocak/25 January 2005
Düzeltme tarihi/Revision date: 28 Temmuz/28 July 2005
Kabul tarihi/Accepted date: 20 Eylül/20 September 2005
Yazışma /Correspoding Author: Salih Kuk
Tel: (+90) (424) 233 35 55 / 2174 Fax: (+90) (424) 238 76 88
E-mail: salihkuk@hotmail.com

Bu çalışma FÜBAP tarafından 721 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu çalışma, 13. Ulusal Parazitoloji Kongresi'nde (8-12 Eylül 2003, Konya) sunulmuştur

geliştirilmesi çalışmaları devam etmektedir. Klonlama ve protein açıklatılma çalışmaları parazitolojide yeni bir alan olup ülkemizde de henüz gelişme aşamasındadır. Bu çalışmalara katkı sağlamak amacıyla ülkemizin de önemli bir sorunu olan fasciolosis için ülkemiz olanaklarıyla benzer çalışmaları yapabilmek ve serolojik hızlı tanı testleri geliştirmek amacındayız.

Bu amaçla, doğal olarak infekte sığır karaciğerinden elde edilen *F. hepatica*'dan cathepsin L1 geninin elde edilmesi ve bu genin bir plazmite yerleştirilmesi ve bu rekombinant plazmitinde Vero hürelerine transfekte edilip cathepsin L1 proteininin belirlenmesi planlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

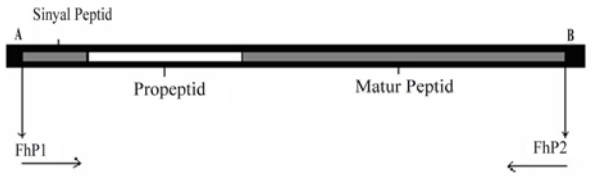
Parazit, Toplam RNA izolasyonu, Tersine Transkripsiyon ve PZR: Yetişkin *F. hepatica* bölge mezbahasında kesimi yapılan ve doğal olarak infekte sığır karaciğerinin safra yollarından elde edildi. Tersine Transkripsiyon, PZR ve klonlamada kullanılacak primerler, *F. hepatica* cathepsin L1 geninin gen kodlayan bölgesine uygun olarak Genbank EMBL L33771'den yararlanılarak dizayn edildi (Şekil 1) ve FhP1 primerine *Xho I* (altı çizili), FhP2 primerine *Sal I* (altı çizili) enzim kesim bölgeleri eklendi.

FhP1

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

FhP2

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



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

Parazitten toplam RNA izolasyonu ve PZR ile cathepsin L1 geninin çoğaltılması işlemi daha önce tanımladığımız metotlara göre yapıldı. Çoğaltılan cathepsin L1 DNA'sı agaroz jelde görüntülendi (3, 4, 7).

Cathepsin L1 geninin pCI-neo vektörüne yerleştirilmesi: Cathepsin L1 geninin pCI-neo vektörüne yerleştirilmesi amacıyla, cathepsin L1 DNA'sı ve pCI-neo vektörü *Xho I* ve *Sal I* enzimleriyle kesildi. Enzim kesimi sonucunda agaroz jelde görüntülenen cathepsin L1 DNA'sı ve pCI-neo vektörü jelden saflaştırıldı. Cathepsin L1 geninin pCI-neo vektörüne yerleştirilmesi işlemi T4 DNA Ligase kullanılarak 16^{o}C'de bir gece bekletilerek tamamlandı. Oluşturulan vektör *E. coli* hücrelerine transforme edildi ve LB katı besi yerine ekildi. Katı besi yerinde oluşan kolonilerdeki hücrelerin rekombinant vektörü içerip içermediğini anlamak için PZR Tarama işlemi yapıldı. Pozitif bulunan koloniler LB sıvı besi yerinde üretilerek, plazmit DNA'sı alkali lizis metoduna göre elde edildi. Rekombinant plazmitin varlığını doğrulamak için *Xho I* - *Sal I* ve *EcoRI* - *Sal I* enzim kesim deneyleri yapıldı (3, 4, 7, 8).

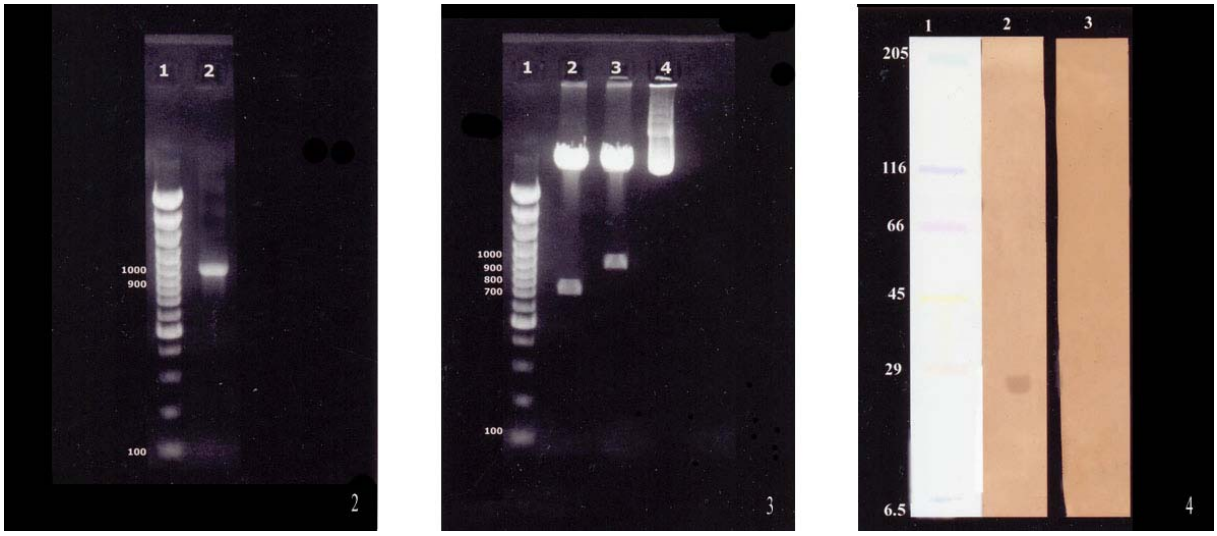
Rekombinant plazmitin Vero hücrelerine transfeksiyonu: Rekombinant pFhCL1 plazmitinin Vero hücrelerine transfeksiyonu geçici (transiet) transfeksiyonu TransFast Transfection Reagent (Promega Co. Madison, WI, ABD) kiti kullanılarak üretici firma önerisine göre yapıldı. Özetle; 25 cm^2'lik hücre üretim kabının % 80'i Vero hücreleri ile kaplandıktan sonra transfeksiyon işlemi yapıldı. Mikrosantrifüj tüpünde 1 µg rekombinant pFhCL1 plazmiti ile 3 µl TransFast Transfection Reagent karıştırılıp vortekslendi ve oda ısısında 15 dk. bekletildi. Sonra rekombinant plazmit ve TransFast karışımına 1 ml DMEM eklenerek hücre üretim kabına konuldu ve 37 ^{o}C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kabın içine 3.5 ml DMEM, 0.5 ml fötal sığır serumu eklenerek 37 ^{o}C'de 72 saat daha inkübasyona bırakıldı (9).

Cathepsin L1 proteininin Western Blot ile gösterilmesi: İnkübasyon sonunda hücre üretim kabı PBS ile yıkandı. Hücreler santrifüjlendi ve çöküntü, SDS yükleme solüsyonu ile sulandırılıp %10'luk SDS-PAGE'de yürütüldü. Jeldeki proteinler, nitroselüloz membrana smi dry sistemle aktarıldı. %5'lik yağsız süt tozu ile bloklama yapıldı. Membranlar PBS ile yıkandı ve ELISA'da pozitif ve negatif bulunan insan serumları ile 1/50 oranında sulandırılarak inkübe edildi. Yıkama solüsyonu ile yıkanan membran, 1/1000 oranında sulandırılan goat Anti human IgG Biotin konjuge (sigma) ile 37 ^{o}C'de 1 saat inkübe edildi. Tekrar yıkanan membran 1/1000 oranında sulandırılan Avidin-Horseradish Peroxidase (Sigma) ile 37 ^{o}C'de 1 saat inkübe edildi. Son yıkamayı takiben cathepsin L1'e özgü bantı gözlemek amacıyla membran, kromojen DAB solüsyonu içinde birkaç dk bekletildi. Membranlar dH_2O ile yıkanarak reaksiyon durduruldu (10).

BULGULAR

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile çoğaltılan 981 bazlık cathepsin L1 geninin %1,5'luk agaroz jeldeki görünümü Şekil 2'de sunulmuştur. Kompetan JM109 *E.coli* hücrelerinden alkali lizis metodu ile elde edilen plazmit DNA'ların enzimlerle kesilerek %1,5'luk agaroz jelde yürütülmesi sonucu elde edilen bantlar Şekil 3'de gösterilmiştir. pCI vektörü *Xho I* ve *Sal I* enzimleriyle kesilmiş ve böylece plazmitin klonlama bölgesindeki *EcoR I* enzim bölgesi ortadan kaldırılmıştır. *Xho I* - *Sal I* enzimleriyle kesilince 981 bazlık cathepsin L1 geni gözlenmiştir. Ayrıca rekombinant plazmitin *EcoRI* - *Sal I* enzimleriyle kesimi sonucunda 761 bazlık bant elde edilmiştir.

ELISA ile *F. hepatica*'ya karşı pozitif ve negatifliği kanıtlanmış serumlar kullanılarak gerçekleştirilen Western Blot deneyi sonucu elde edilen 27 kDa ağırlığındaki cathepsin L1 Şekil 4'te gösterilmiştir.



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

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

Şekil 4. Rekombinant cathepsin L1 proteinin Western blott'lama ile gösterilmesi. Sütun 1: Marker Sütun 2: 27 kDa ağırlığındaki cathepsin L1 proteini Sütun 3: *F. hepatica* negatif serumla yapılan Western blott sonucu Nitroseluloz membran

TARTIŞMA

Bu çalışma gelecekte fasciolosis tanısı için ELISA kiti geliştirilmesi ve korunma için DNA aşı çalışmalarına temel oluşturmak amacıyla yapılan bir çalışma olup *F. hepatica* cathepsin L1 geni ökaryotik Vero hücrelerinde açıklatılmıştır. Bu amaçla, doğal olarak infekte sığır karaciğerinden elde edilen *F. hepatica*'dan toplam RNA ve RNA'lardan catapsin L1 cDNA'sı elde edilmiş, cDNA PZR ile çoğaltılarak pCI-neo memeli ekspresyon vektörüne yerleştirilmiştir. Bu Rekombinant vektör Vero hücrelerine transfekte edilerek cathepsin L1 proteini elde edilmiş ve bu protein Western Blott ile doğrulanmıştır.

Çalışmada *F. hepatica* Catapsin L1 geni proregion bölgesi ile birlikte klonlanmış ve ökaryotik Vero hücrelerinde açıklatılmıştır. Proregion bölgesinin bulunması catapsin L1 proteinin doğru bir şekilde katlanması, stabilizasyonu, endoplazmik retikulumdan çıkışı ve son şeklini almasını sağlamıştır (8, 11).

Gen belirlenmesi çalışmalarında kullanılan vektörlerden promotor bölge ve poliadinilasyon bölgeleri bulunmaktadır. Bu çalışmada bir çok hücre tipinde yüksek derecede ekspresyon oluşturan SMV promotorunu ve erken SV40 poliadinilasyon bölgesine göre beş kat daha fazla RNA stabilizasyonu sağlayan geç SV 40 poliadinilasyon bölgesini içeren pCI-neo vektörü seçilerek etkin bir protein sentezinin oluşturulması amaçlanmıştır. Ayrıca protein sentezinin verimliliğinin artırılmasında ökaryotik genlerin kozak dizisi içermesi önemlidir. Bu nedenle çalışmada primer oluştururken kozak dizisi eklenmiştir (7, 8).

Bu çalışmada elde edilen cathepsin L1 proteini fasciolosis tanısında gereksinim duyulan özgül ve duyarlı serolojik testlerin geliştirilmesi ve üretilmesi çalışmalarımız için temel oluşturacaktır. ELISA tanı kiti geliştirilmesi ile ülkemizde tanı ve epidemiyolojik çalışmalar ile ilgili verilerin artacağı kanısındayız. Diğer yandan cathepsin L1 proteini ile geliştirilebilecek hasta başında uygulanabilecek hızlı tanı yöntemleri rutinde gereksinim duyulan bir eksikliği giderecektir. Ayrıca, bu çalışmada elde edilen rekombinant plazmit, hayvanlarda fascioloisise karşı immünizasyon için ileri çalışmaların yapılmasına olanak sağlayacaktır (12-14).

KAYNAKLAR

1- **Garcia LS, Bruckner DA,** 1997. *Diagnostic Medical Parasitology*. 3. Baskı, Washington: ASM Press, p.363-364.

2- **Kaplan M, Kuk S, Kalkan A**. 2002. Fasciolosis: Olgu sunusu. *T Parazitol Derg,* 26: 393-395.

3- **Kaplan M, Kuk S, Özdarendeli A, Bulut Y, Kalkan A,** 2002. *Fasciola hepatica* Cathepsin L1 Geninin Klonlanması ve Rekombinant Plazmitlerin Polimeraz Zincir Reaksiyon Taraması ile Belirlenmesi. *T Parazitol Derg,* 26: 388-392.

4- **Özdarendeli A, Kaplan M, Kuk S, Demirdağ K, Kalkan A,** 2003. *In vitro* Transkripsiyonla *Fasciola hepatica* Cathepsin L1 RNA'sının Elde Edilmesi (Ön çalışma). *T Parazitol Derg,* 27:27-30.

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

6- **Smith AM, Dowd AJ, McGonigle S, Keegan PS, Brennan G, Trudgett A, Dalton JP,** 1993. Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol,* 62: 1-8.

7- **Kozak M,** 1984. Compilation and analysis sequence upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res*, 12: 857-872.

8- pCI-Neo Mammalian expression vector. Promega Techinacal Bulletin. 2000. TB125.

9- Transfast^{TM} Transfection Reagent. Promega Technical Bulletin. 2000. TB260.

10- **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T,** 2001. In Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3. Baskı, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Pres, .

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

12- **Cornelissen JB, Gaasenbeek CP, Borgsteede FH, Holland WG, Harmsen MM, Boersma WJ,** 2001. Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L-like protease. *Int J Parasitol,* 31: 728-737.

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

14- **Spithill TW, Dalton JP,** 1998. Progress in Development of Liver Fluke Vaccines. *Parasitol Today*, 14: 224- 228.