

Babesia bigemina* Kayseri/Türkiye suşunun *in vivo* ve *in vitro* izolatlarında apikal membran antijen-1 proteininin moleküler karakterizasyonu ve ekspresyonu

Arif ÇİLOĞLU, Abdullah İNCİ, Alparslan YILDIRIM, Zuhale ÖNDER, Önder DÜZLÜ

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye.

Özet: Bu çalışma, “*Babesia bigemina* Kayseri/Türkiye” suşundan *in vivo* ve *in vitro* kültürasyonu yapılarak ve pasajlanarak elde edilmiş olan izolatların AMA-1 proteinlerinin moleküler karakterizasyonu ve ekspresyonu ile söz konusu proteinin attenüasyona bağlı polimorfizm gösterip göstermediğini ortaya koymak amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, *Babesia bigemina* Kayseri/Türkiye suşuna ait, *in vivo* ve *in vitro* izolatlardan genomik DNA ve total RNA izolasyonu sonrasında hedef gen, PCR ile bütün olarak amplifiye edilmiş ve pürifiye ampikonlar uygun vektörlere klonlanmıştır. Klonlama sonrasında rekombinant plazmidler, sekanslanarak izolatları ait nükleotid dizilimleri GenBank’a kaydedilmiştir (KP000032-33). Nükleotid ve amino asit sekansların çoklu ve ikili hizalama analizleri yapılmış ve izolatların filogenileri araştırılmıştır. Elde edilen rekombinant plazmidler, *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine transforme edilerek IPTG ile indüklenmiş ve ekspresyonları sağlanmıştır. Ekspresyon ürünlerinde hedef proteinler SDS-PAGE ve Western Blot teknikleri ile analiz edilmiştir. Kayseri/Turkey IV1 ve Kayseri/Turkey IT2 izolatları nükleotid dizilimlerinin kendi aralarında %99.7 identiklik gösterdiği ve 103. nükleotiddeki mutasyona bağlı olarak amino asit diziliminde farklılık (%0.2) olduğu belirlenmiştir. SDS-PAGE ve Western Blot analizleri sonucu söz konusu iki izolata ait AMA-1 proteinlerinin 72 kDa moleküler ağırlıklarla farklı IPTG konsantrasyon düzeyleri ve zaman aralıklarında eksprese oldukları belirlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışma ile *Babesia bigemina* Kayseri/Türkiye suşunun *in vivo* ve *in vitro* pasajlarından elde edilmiş iki izolata ait AMA-1 nükleotid ve amino asit dizilimleri arasında mutasyonel farklılıkları gösteren attenüasyona bağlı polimorfik alanlar olduğu ortaya konulmuştur.

Anahtar sözcükler: Apikal membran antijen-1, *Babesia bigemina*, ekspresyon, moleküler karakterizasyon, protein.

Molecular characterization and expression of the apical membrane antigen-1 from *in vivo* and *in vitro* isolates of *Babesia bigemina* Kayseri/Turkey strain

Summary: This study was performed to molecular characterization and expression of AMA-1 protein molecules of *in vivo* and *in vitro* cultivated and passaged isolates from “*Babesia bigemina* Kayseri/Turkey” strain, and also to determine the possible polymorphisms of these molecules due to the attenuation of the isolates. For this aim, target gene was completely amplified by PCR after isolation of genomic DNA and total RNA from the *in vivo* and *in vitro* cultivated isolates which were obtained from *Babesia bigemina* Kayseri/Turkey strain. The isolates were cloned into suitable vectors after PCR analysis. The cloned isolates were sequenced and the obtained sequences were deposited in GenBank with accession numbers KP000032-33. Multiple and pairwise alignments of the sequences were performed and phylogenies were investigated. The obtained recombinant plasmids were transformed into *E. coli* BL21 (DE3) cells and expressed after induction with IPTG. The target proteins were analyzed by using SDS-PAGE and Western Blot techniques. Nucleotide sequences of Kayseri/Turkey IV1 and Kayseri/Turkey IT2 isolates showed 99.7% identity to each other and a difference (0.2%) was also determined in amino acid sequences of these two isolates due to a mutation in 103rd nucleotide. According to results of SDS-PAGE and Western Blot analyses, the BbigAMA-1 isolates were expressed with a molecular mass of 72 kDa in different IPTG concentration levels and time periods. In conclusion, attenuation-related polymorphic sites that indicate the mutational differences between AMA-1 nucleotide and amino acid sequences from *in vivo* and *in vitro* isolates of *Babesia bigemina* Kayseri/Turkey strain were revealed with this study.

Keywords: Apical membrane antigen-1, *Babesia bigemina*, expression, molecular characterization, protein.

* Bu çalışma “*Babesia bigemina* Kayseri/Türkiye suşlarının apikal membran antijen-1 (AMA-1) proteininin moleküler genotiplendirilmesi, ekspresyonu ve immunolojik karakterizasyonu” başlıklı doktora tezinden özetlenmiş olup, 5-10 Eylül 2015 tarihinde Sevilla-İspanya’da düzenlenen 7. European Congress of Protistology’de ve 5-9 Ekim 2015 tarihinde Erzurum’da düzenlenen 19. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Uluslararası Katılımlı Ekinokokkozis Sempozyumunda sırasıyla poster ve sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Giriş

Babesiosis, tropik ve subtropik iklim kuşağında yer alan ülkelerde, evcil ve yabani memeli hayvanlar ile insanlarda yaygın bir şekilde seyreden, hayvancılıkta büyük ekonomik kayıplara sebebiyet veren, veteriner hekimlikte kritik öneme sahip, kene kaynaklı ve zoonotik karakterli protozoer bir hastalıktır (18, 19, 49).

Sığırlarda babesiosise yol açan parazit türlerinden biri olan *Babesia bigemina* (Smith ve Kilborne, 1893), meydana getirdiği şiddetli klinik belirtiler ve sonrasında görülen ölümler nedeniyle özellikle et ve/veya süt üretimine dayalı sığır işletmelerinde büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır (4, 5, 46).

Türkiye’de *B. bigemina*’nın yayılışı ve epidemiyolojisi ile ilgili çok sayıda mikroskopik, serolojik ve moleküler çalışma yapılmıştır (18, 19). Türkiye’nin çeşitli coğrafik bölgelerinde yapılan bu çalışmalarda, *B. bigemina*’nın biotik ve abiotik faktörler ile vektör popülasyonuna bağlı olarak ülke genelinde farklı prevalans oranlarında oldukça yaygın bir şekilde seyrettiği bildirilmiştir (18, 19, 39).

Sığırlarda, babesiosise karşı etkin bir tedavi yöntemi bulunmasına karşın, gerekli korunma tedbirleri alınmadığı takdirde bu yöntem yetersiz kalmakta, aynı zamanda kullanılan etken maddenin oluşturduğu yan etkiler ve ilaç maliyeti de ekonomik anlamda zararlara yol açmaktadır (20, 21). Bu nedenle, babesiosis ile mücadele ve korunmada, aşı üretim ve geliştirilmesi önem kazanmıştır (7, 8).

Babesiosis ile mücadele ve korunma için genellikle attenüe suşlar aşı olarak kullanılmaktadır. Ancak bu suşlar ile aşılanan hayvanlar, doğal şartlardaki vahşi suşlara karşı direnç gösterememekte ve üretilen aşılarda hastalığa karşı yeterli koruyuculuğu sağlayamamaktadır (4, 7, 8). Bu amaçla son yıllarda yapılan araştırmalarda parazitin yüzey proteinlerinin moleküler ve immunolojik yapıları tanımlenerek babesiosise karşı etkin koruma sağlayabilecek rekombinant aşı adayları hedef proteinleri üzerine odaklanılmıştır (26, 28, 53). Bu kapsamda, özellikle parazitin konak hücreye invazyonunda önemli roller oynayan, apikal kompleks organelleri arasında yer alan, ropri ve mikronemler ile bunlardan salınan proteinler üzerinde yoğunlaşmış ve güvenilir bir hedef protein belirlenmeye çalışılmıştır (15, 28, 37).

Apikal membran antijen-1 (AMA-1), tüm apikopleksan parazit türlerinde tip I integral membran protein olarak bulunan mikronem ürünü bir transmembran proteindir (33, 48). Konak hücre invazyonunda rol oynayan en önemli proteinlerden biri olan AMA-1, korunmuş alanlara sahip olması nedeniyle, apikopleksan parazitlerin meydana getirdiği hastalıklara karşı aşı geliştirme çalışmalarında önemli bir hedef protein olarak belirlenmiştir (28, 33, 37).

Bu çalışmada, *B. bigemina* Kayseri/Türkiye suşunun *in vivo* (1. pasaj) (IV1) ve *in vitro* (1. pasaj) (IT2) izolatlarında AMA-1 proteininin, klonlanarak moleküler

karakterizasyonunun yapılması, ekspresyonunun sağlanarak her iki izolat arasında attenüasyona bağlı olası polimorfizmlerin ortaya konması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmanın materyalini, MEDLABAB INCO-003691 kodlu (Avrupa Birliği 6. Çerçeve Programı) proje kapsamında elde edilmiş, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı’nda sıvı nitrojen tankı içinde (-196 °C) muhafaza edilen, 288.07 kodlu ve 15.09.2007 tarihli *Babesia bigemina* Kayseri/Türkiye suşu ile enfekte edilmiş deney danasından ilk enfeksiyonu takiben 8. gün alınmış (*in vivo*: 1. pasaj, *B. bigemina* Kayseri/Turkey IV1), %4.1 *B. bigemina* parazitemesine sahip izolat ile aynı izolata *in vitro* olarak kültüre edilmiş ve %11 oranında parazitemesine sahip (*in vitro*: 1. pasaj, *B. bigemina* Kayseri/Turkey IT2) izolatı oluşturmuştur.

Genomik DNA izolasyonu: AMA-1 gen bölgesini kodlayan nükleotid dizilimlerinin belirlenmesi, belirlenen nükleotid dizilimlerinin intron içerip içermediğinin tespiti ve elde edilen sekansların ekspresyon analizleri öncesinde açık okuma çerçevesi (ORF) veri tabanında değerlendirilmesi amacıyla *B. bigemina* Kayseri/Turkey olarak isimlendirilen izolatlardan genomik DNA (gDNA) izolasyonu, ticari kit (AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit, USA) kullanılarak ve üreticinin belirlediği prosedür takip edilerek yapılmıştır. Elde edilen gDNA’lar analize tabi tutulana kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

PCR analizleri ve BbigAMA-1 geninin klonlanması: Her iki izolata ait gDNA’lar, *B. bigemina* apikal membran antijen-1’i (BbigAMA-1) kodlayan genin (1788 bp) bütün olarak amplifikasyonu amacıyla Bbig-AMA1Fb (5'-GCAGTGCATATTGAATAGGATTAC-3') ve Bbig-AMA1Rb (5'-TCAGTTGAGCTTAGTCAGGTGTACTG-3') primerleri (45) ile PCR analizine tabi tutulmuştur. PCR reaksiyon karışımı, 50 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 25 µl ticari master mix (Maxima Hot Start PCR Master Mix, Thermo Scientific, USA), 100 nM her bir primer ve 50 ng/µl template DNA olarak hazırlanmıştır. Amplifikasyon için protokol; ön denatürasyon: 95 °C’de 4 dk; denatürasyon: 95 °C’de 1 dk, bağlanma: 55.1 °C’de 30 s, uzama: 72 °C’de 90 sn, 35 siklus; final uzama: 72 °C’de 15 dk olacak şekilde dizayn edilmiştir. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) %1.5’lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, jel dökümantasyon sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir. Hedef baz aralığında görünen bantlar, ilgili genin klonlanması öncesinde ticari kit kullanılarak (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche, Germany) jelden pürifiye edilmiştir.

Jel pürifikasyonu yapılmış PCR ürünleri ticari klonlama kiti (CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Scientific,

USA) kullanılarak klonlanmıştır. Klonlama sonrası ürünler plazmid pürifikasyon kiti (AxyPrep Plasmid Miniprep Kit, Axygen, USA) kullanılarak saflaştırılmış ve rekombinant plazmidler elde edilmiştir.

BbigAMA-1 geninin sekans, filogenetik ve ORF analizleri: Klonlama sonucu elde edilmiş rekombinant plazmidlerin (her bir izolat için iki ayrı koloniden elde edilmiş iki rekombinant plazmid) sekanslanması Macrogen (The Netherlands) firmasında, klonlama kitinde mevcut olan pJET1.2 forward ve reverse primerleri ile çift yönlü olarak yapılmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen plazmidlere ait kromotogramlar Quality (Phred) skorlarına göre analiz edildikten sonra Geneious R10 (22) yazılımı ile izolatlara ait final dizilimler vektör DNA'sı içerisinde forward ve reverse dizilimlerin contig edilmesiyle belirlenmiştir. Elde edilen sekansların BLASTn (1) algoritması üzerinden analizleri yapıldıktan sonra Mega 7 (23) ve Geneious R10 (22) genetik analiz yazılımlarıyla GenBank'a kayıtlı diğer BbigAMA-1 izolatları ile çoklu ve ikili hizalamaları yapılarak filogenileri araştırılmış, intron içerip içermediği kontrol edilmiş ve moleküler karakterizasyonları ortaya konmuştur. Takiben, mevcut nükleotid dizilerinin GenBank kayıtları yapılmış ve erişim numaraları alınmıştır. Filogenetik yapılanmaların belirlenmesinde Bayesian analizleri uygulanmıştır. Bayesian analizlerinde uygun model belirlenmesinde jModelTest 0.0.1 (31) kullanılmış ve en düşük Bayesian Bilgi Kriteri (BIC) değerine sahip olan model, filogenetik ağacın oluşturulmasında kullanılmıştır. Bayesian analizleri, Geneious R10 (22) yazılımı üzerinden MrBayes 3.2.6 plugin (17) kullanılarak gerçekleştirilmiş, Markov Chain Monte Carlo taramaları 1.100.000 jenerasyon için 4 zincirle yapılmış ve ağaç örnekleme her 200 jenerasyonda bir (ilk 100.000 ağaç "burn in" olarak çıkarılmıştır).

Erişim numarası alınan ve GenBank tarafından tescil edilen izolatların protein dizilimleri; başlangıç ve bitiş sinyal kodonlarını belirlemek, BbigAMA-1 fraksiyonlarını göstermek amacıyla açık okuma çerçevesi (open reading frame, ORF) analizlerine tabi tutulmuş ve söz konusu analizler için web tabanlı ORF Finder (30) yazılımı kullanılmıştır.

BbigAMA-1 amino asit dizilimlerindeki tahmini antijenik peptidlerin varlığı Geneious R10 (22) yazılımı üzerinden EMBOSS Protein Analysis 6.5.7 plugin (35) yazılımı kullanılarak araştırılmıştır. Nükleotid ve amino asit dizilimlerindeki polimorfik alanlar ve haplotipler ise ProSeq3 (12) yazılımı kullanılarak belirlenmiştir.

Total RNA izolasyonu ve tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi: BbigAMA-1 proteinlerinin ekspresyonu için *B. bigemina* Kayseri/Turkey izolatlarından total RNA izolasyonu ticari kit (GeneJET RNA Purification Kit, Thermo Scientific, USA) kullanılarak yapılmıştır. Takiben, elde edilen RNA izolatlarından cDNA sentezi

(Maxima H Minus First Strand cDNA Syntesis Kit, Thermo Scientific, USA) gerçekleştirilmiştir.

PCR analizi ve ekspresyon vektörüne klonlama: Ekspresyon öncesinde her iki izolat için elde edilen cDNA'lar, BbigAMA-1 geninin plazmid vektörüne klonlanması amacıyla PCR işlemine tabi tutulmuştur. PCR analizinde kullanılacak primerler ticari ekspresyon kitinde (Champion™ pET Directional TOPO Expression Kit, Thermo Scientific, USA) önerilen şekilde ve ORF analiz sonuçlarına göre dizayn edilmiştir. PCR reaksiyon karışımı, 50 µl final konsantrasyonda; 5 µl 10X *Pfu* Buffer with MgSO₄ (Thermo Scientific, USA), 1 µM her bir primer, 2 mM dNTP mix (Thermo Scientific, USA), 1.25 U *Pfu* DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA) ve 50 ng/µl cDNA olarak hazırlanmıştır. Termal profiller üreticinin belirlediği prosedüre göre ayarlanmıştır. Amplifikasyon sonunda görüntülenen PCR ürünleri, jelden ekstrakte edildikten sonra kit prosedürüne göre, 6 adet Histidin (6xHis) proteinini bağlayan, ampisilin dirençli bir ekspresyon vektörü olan pET 100/D-TOPO ile ligasyona tabi tutulmuş ve takiben One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* hücrelerine (Thermo Scientific, USA) transformasyon gerçekleştirilmiştir. Klonlama sonrası ürünler plazmid pürifikasyon kiti (AxyPrep Plasmid Miniprep Kit, Axygen, USA) kullanılarak saflaştırılmış ve rekombinant plazmidler elde edilmiştir. Saflaştırılan rekombinant plazmidler (her bir izolat için dört ayrı koloniden elde edilmiş dört rekombinant plazmid) daha önce pJET1.2 vektörüne klonlanmış IV1 ve IT2'nin BbigAMA-1 geni sekanslarını doğrulamak ve BbigAMA-1'in N-C terminal uçlarının vektöre doğru oryantasyonda yerleşip yerleşmediğinin kontrolü amacıyla klonlama kitinde mevcut olan spesifik primerler ile sekans analizlerine tabi tutulmuştur. Daha sonra kit prosedürleri takip edilerek ekspresyon vektörüne doğru oryantasyonda insert olmuş BbigAMA-1 genlerini içeren rekombinant plazmidlerin BL21 Star (DE3) *E. coli* hücrelerine (Thermo Scientific, USA) transformasyonu gerçekleştirilmiştir.

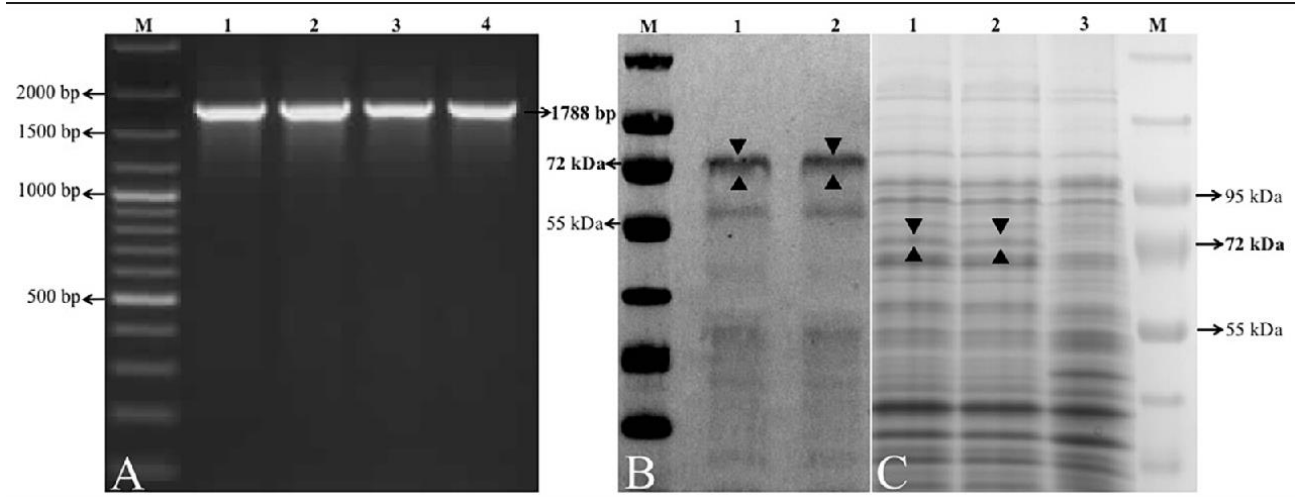
BbigAMA-1 proteinlerinin ekspresyonu, SDS-PAGE ve Western Blot analizleri: Öncelikle ideal bir ekspresyon için gerekli olan IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) miktarını ve optimum indükleme zamanını belirlemek için pilot ekspresyon denemeleri yapılmıştır. Denemelerden elde edilen sonuçlar doğrultusunda LB-Broth sıvı besi yerinde kültüre edilen ve OD₆₀₀ değerleri 0.5-0.6 ABS seviyesinde olan protein ürünleri; IV1 için final konsantrasyon 0.01 µM, IT2 için ise final konsantrasyon 0.01 mM olmak üzere IPTG ile indüklenerek sırasıyla 2. ve 5. saatte eksprese edilmiştir. Eksprese edilen bakteri pelletleri 1X SDS sample buffer ile karıştırılarak formülasyonları Laemmli (24) ve Sambrook ve Russell (38)'a göre hazırlanan SDS-PAGE analizlerine tabii tutulmuş ve Coomassie blue (Coomassie Brilliant Blue

R-250 Staining Solution, Bio-Rad, USA) ile boyanarak hedef bant profilleri analiz edilmiştir. Takiben, 6xHis ile işaretli hedef proteinin belirlenmesi ve ekspresyonun konfirme edilmesi amacıyla anti-his antikor (Anti-HisG-HRP Antibody, Thermo Scientific, USA) kullanılarak Terkawi ve ark. (43)'nın tarif ettikleri gibi Western Blot analizleri gerçekleştirilmiştir. Her iki analiz sonucu da görüntüleme sistemi (Fusion FX5, Vilber Lourmat, France) ile analiz edilmiştir.

Bulgular

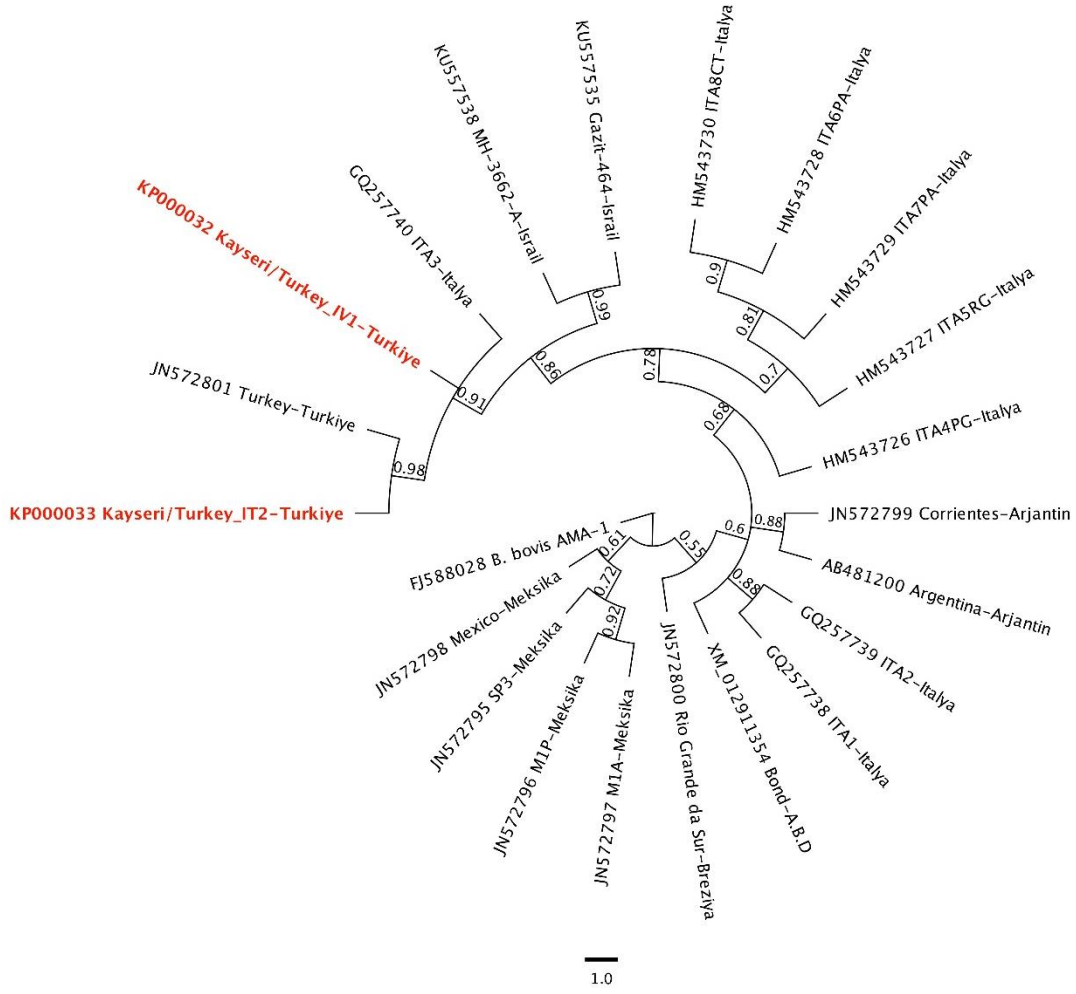
BbigAMA-1 geninin moleküler karakterizasyonu: *Babesia bigemina* IV1 ve IT2 izolatları gDNA'larının *BbigAMA-1* geninin PCR analizleri sonucunda, agaroz jel üzerinde 1788 bp büyüklüğünde amplifikasyon fragmentleri belirlenmiştir (Şekil 1A). Klonlanma sonrasında, rekombinant plazmidlerin çift yönlü sekans analizleri gerçekleştirilmiş, elde edilen nükleotid ve amino asit dizileri vektör sekansı ile hizalanarak *BbigAMA-1*'in final sekansları elde edilmiştir. Elde edilen sekanslar, PCR analizleri sırasında meydana gelebilecek hata paylarını elemine etmek amacıyla ekspresyon vektörüne klonlama sonrasında saflaştırılan rekombinant plazmidlerin sekanslarıyla ikili hizalama analizlerine tabi tutulmuş ve kontrol

edilmiştir. İkili hizalama analizleri sonucunda aynı izolatlara ait farklı plazmid sekanslarının kendi aralarında %100 identiklik gösterdiği belirlenmiştir. Böylece izolatlara ait sekansların hatasız olduğu teyit edilmiştir. Takiben, IV1 izolatının AMA-1 geni nükleotid dizisi (Kayseri/Turkey IV1) KP000032, IT2 izolatının AMA-1 geni nükleotid dizisi (Kayseri/Turkey IT2) ise KP000033 aksesyon numaraları ile GenBank'a kayıt edilmiştir. *BbigAMA-1* geni nükleotid dizilimlerinin çoklu ve ikili hizalama analizleri sonucunda, Kayseri/Turkey IV1 ve Kayseri/Turkey IT2 izolatlarının Dünya'dan GenBank kaydı yapılmış diğer izolatlar ile %97.4 - %99.9 oranlarında, kendi aralarında ise %99.7 oranında identiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun yanında, izolatların nükleotid dizilerinin intron içermediği de belirlenmiştir. *BbigAMA-1* geni amino asit dizilimlerinin çoklu ve ikili hizalama analizleri sonucunda ise Kayseri/Turkey IV1 ve Kayseri/Turkey IT2 izolatlarının Dünya'dan GenBank kaydı yapılmış diğer izolatlar ile %98.1 - %100.0 oranlarında, kendi aralarında %99.8 oranında identiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Söz konusu %0.2 oranındaki farklılığın, 103. nükleotidde meydana gelen mutasyon sonucu 35. amino asidin (IV1'de Phe³⁵ ve IT2'de Leu³⁵) farklılaşmasından kaynaklandığı belirlenmiştir.



Şekil 1. *Babesia bigemina* Kayseri/Türkiye suşunun *in vivo* (IV1) ve *in vitro* (IT2) izolatlarında *BbigAMA-1*'in PCR, Western Blot ve SDS-PAGE analizleri. A. *BbigAMA-1*'in PCR ile amplifikasyonu sonucu jel elektroforez görüntüsü. M: Marker; 1-2: *BbigAMA-1* IV1 (ikili yükleme); 3-4: *BbigAMA-1* IT2 (ikili yükleme). B. *BbigAMA-1*'in anti-his antikor ile Western Blot analizi. M: Marker; 1: IV1 *BbigAMA-1* ile transforme edilmiş BL21 Star (DE3) *E. coli* hücresi; 2: IT2 *BbigAMA-1* ile transforme edilmiş BL21 Star (DE3) *E. coli* hücresi. C. BL21 Star (DE3) *E. coli* hücrelerine ekspresye edilen *BbigAMA-1*'in SDS-PAGE görüntüsü. 1: IV1 *BbigAMA-1* BL21 Star (DE3) *E. coli* hücresi; 2: IT2 *BbigAMA-1* BL21 Star (DE3) *E. coli* hücresi; 3: Transforme edilmemiş BL21 Star (DE3) *E. coli* hücresi; M: Marker.

Figure 1. PCR, Western Blot and SDS-PAGE analyses of *BbigAMA-1* from *in vivo* (IV1) and *in vitro* (IT2) isolates of *Babesia bigemina* Kayseri/Turkey strain. A. PCR amplification of *BbigAMA-1* on gel electrophoresis. M: Marker; 1-2: *BbigAMA-1* IV1 (double loading); 3-4: *BbigAMA-1* IT2 (double loading). B. Western Blot analysis of *BbigAMA-1* with anti-his antibody. M: Marker; 1: BL21 Star (DE3) *E. coli* cell transformed with IV1 *BbigAMA-1*; 2: BL21 Star (DE3) *E. coli* cell transformed with IT2 *BbigAMA-1*. C. SDS-PAGE profile of BL21 Star (DE3) *E. coli* cells expressed with *BbigAMA-1*. 1: IV1 *BbigAMA-1* BL21 Star (DE3) *E. coli* cell; 2: IT2 *BbigAMA-1* BL21 Star (DE3) *E. coli* cell; 3: Untransformed BL21 Star (DE3) *E. coli* cell; M: Marker.



Şekil 2. BbigAMA-1 izolatlarının Bayesian filogenisi. Elde edilen izolatlar, kalın ve kırmızı ile belirtilmiştir. Kullanılan sekansların GenBank erişim numaraları, izolat isimleri ve orijinleri ağaçta gösterilmiştir. *B. bovis* BbigAMA-1 izolatı dış grup olarak kullanılmıştır. Branşların yanında gösterilen düğüm destek değerleri posterior olasılıkları ifade etmektedir (>0.5). Ölçek çizgisi tahmini uzaklıkları göstermektedir.

Figure 2. Bayesian phylogeny of BbigAMA-1 isolates. The obtained isolates are given in bold and red. GenBank accession numbers, isolate names and origins of used sequences are shown in the tree. *B. bovis* BbigAMA-1 isolate was used as outgroup. Nodal support values near branches indicate posterior clade probabilities (>0.5). The scale bar indicates estimated distance.

BbigAMA-1 geni nükleotid dizilimlerinin çoklu hizalama analizleri sonucunda elde edilen veriler, filogenetik yapılanmaların belirlenmesinde kullanılmıştır. Bayesian analizlerinde, sekans evrimi için en uygun model Hasegawa-Kishino-Yano+I+G (HKY+I+G) olarak belirlenmiş ve filogenetik ağaç bu modele göre oluşturulmuştur (Şekil 2). Filogenetik ağaç incelendiğinde, Kayseri/Turkey IV1 ve IT2 izolatlarının "Turkey" ve "ITA3" izolatlarıyla aynı filogenetik branşta yer aldığı ve bu branşa en yakın diğer branşın İsrail'den girilen izolatlar tarafından oluşturulduğu görülmüştür. Bununla birlikte, yapılan incelemelerde BbigAMA-1 izolatlarının bölgesel orijin bazında genellikle farklı branşlara ayrıldığı tespit edilmiştir.

Dünya'dan GenBank kaydı yapılmış BbigAMA-1 izolatlarının nükleotid dizilimlerinin polimorfik yapıları

ve haplotip sayılarının belirlenmesi amacıyla yapılan analizler sonucunda, dizilimler arasında 21 farklı haplotipi ortaya koyan 448 polimorfik alan olduğu tespit edilmiştir. Aynı birer haplotip olarak belirlenen Kayseri Turkey IV1 ve Kayseri Turkey IT2 izolatlarının ise 4 adet polimorfik alana sahip oldukları tespit edilmiştir.

BbigAMA-1 amino asit dizilimindeki tahmini antijenik peptidlerin araştırılması sonucunda her iki izolata 22 ayrı antijenik bölgeye sahip olduğu belirlenmiştir. En uzun tahmini antijenik bölgenin ise 496. ve 534. amino asitler arasında olduğu tespit edilmiştir.

Kayseri/Turkey IV1 ve Kayseri/Turkey IT2 izolatlarının amino asit dizilimlerinin ORF analizleri sonucunda belirlenen çerçeveler içerisinde, 1788 baz uzunluğuna sahip BbigAMA-1 geninin tamamını kodlayan +1 numaralı çerçevenin, ekspresyon analizleri için uygun başlangıç ve bitiş sinyal kodonlarını içerdiği tespit edilmiştir.

BbigAMA-1 geninin ekspresyonu: Her iki izolata ait cDNA'ların dizayn edilen primerler ile PCR analizleri sonucunda, agaroz jel üzerinde 1788 bp büyüklüğünde bant veren DNA fragmentleri tespit edilmiştir. Jel pürifikasyon sonrasında elde edilen ürünler ekspresyon vektörüne klonlanmış ve sonrasında saflaştırılan rekombinant plazmidler BL21 Star (DE3) *E. coli* hücrelerine eksprese edilmiştir. Ekspresyon sonucu elde edilen ürünlerin SDS-PAGE ve Western Blot analizleri sonucunda, her iki izolataın 72 kDa moleküler ağırlıklarla eksprese oldukları belirlenmiştir (Şekil 1B-C).

Tartışma ve Sonuç

Birçok apikompleksan parazit türünde, aşı geliştirme çalışmaları için hedef protein olarak gösterilen AMA-1, babesiosis karşı etkili bir mücadele yürütülebilmesi amacıyla yapılan aşı çalışmaları kapsamında; *B. bovis* (13, 37), *B. gibsoni* (53), *B. divergens* (27, 28), *B. orientalis* (15) ve *B. microti* (26)'de çalışılmıştır. Ancak özellikle sığır işletmelerinde büyük ekonomik kayıplara neden olan ve tüm Dünya'da yaygın olarak seyreden *B. bigemina*'da, AMA-1 ile ilgili oldukça sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır (45, 47). Çalışmamızda, apikompleksan parazit türlerinin hayat sikluslarında önemli bir rol oynaması, hemen hemen tüm apikompleksan parazit türlerinde rekombinant aşı üretimi için ideal bir hedef protein olarak gösterilmesine karşın *B. bigemina* için kapsamlı bir araştırmanın yapılmamış olması nedeniyle AMA-1 proteini, hedef protein olarak seçilmiştir.

AMA-1 geninin moleküler yapıları, birçok apikompleksan parazit türünde araştırılmış ve bazı parazit türlerinde ilgili gende intronların bulunduğu rapor edilmiştir (16, 52). Ancak ilginç olarak, *Babesia* soyunda bulunan türler üzerinde yapılan çalışmalarda, AMA-1 geninin intron içermediği bildirilmiştir (15, 27, 53). Sunulan çalışmada, *B. bigemina* Kayseri/Turkey IV1 ve IT2 izolatlarının AMA-1 genini kodlayan nükleotid dizilimleri, biyoinformatik programlarla analiz edilmiş ve AMA-1 geninin, diğer tüm *Babesia* türlerinde olduğu gibi *B. bigemina*'da da intron içermediği tespit edilmiştir.

AMA-1, birçok çalışmada, apikompleksan parazitlerin sebep olduğu hastalıklara karşı geliştirilen rekombinant aşılarda temel protein olarak görev almıştır (10, 15, 37, 44, 52). Ancak bazı çalışmalarda (9, 34), AMA-1'in yapısında yüksek derecede polimorfizm şekillenebileceği ve dolayısıyla bu polimorfizmin AMA-1 tabanlı aşılarda geliştirilmesine engel olabileceği bildirilmiştir. *Plasmodium falciparum*'da yapılan araştırmalar sonucunda, AMA-1'in yapısında bulunan amino asitlerin yaklaşık %10'unun polimorfik yapıda olduğu ve 200'ün üzerinde haplotipinin bulunduğu belirtilmiştir (6, 42). Bunun yanında, *P. vivax*'ın Brezilya suşlarında 13, Sri Lanka

suşlarında ise 34 polimorfik alan olduğu da farklı çalışmalarda rapor edilmiştir (14, 36). Fransa'nın 7 farklı bölgesinde, insan ve sığırlardan izole edilen 9 adet *B. divergens* izolata üzerinde yürütülen bir çalışmada (28) ise, AMA-1 gen sekansları karşılaştırılarak izolatlar arası polimorfizm olup olmadığı araştırılmış ve mevcut sekanslarda iki adet mutajenik bölge olduğu saptanmıştır. Öte yandan, *B. bigemina*'da yapılan bir çalışmada (45), 3 farklı suşa AMA-1 genine ait 32-54 adet mutasyon noktasının olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda, araştırmacıların sonuçlarına benzer şekilde, BbigAMA-1'i bütün olarak kapsayan *B. bigemina* nükleotid dizilimlerinin analizleri sonucunda, 21 farklı haplotipi ortaya koyan 448 polimorfik alan tespit edilmiştir. Araştırmamızın materyalini oluşturan *Babesia bigemina* Kayseri/Türkiye suşunun IV1 ve IT2 izolatlarının nükleotid sekans dizilimleri karşılaştırıldığında ise bu iki izolataın ayrı birer haplotip oldukları, 4 adet polimorfik alan içerdikleri ve kendi aralarında %99.7 oranında identiklik gösterdikleri tespit edilmiştir. Aynı izolatların amino asit dizilimleri karşılaştırıldığında bu oran %99.8 olarak belirlenmiştir. Amino asit dizilimlerindeki bu farklılığın, 103. nükleotiddeki mutasyon sonucu, izolatların 35. amino asitlerinde (IV1'de Phe³⁵, IT2'de Leu³⁵) meydana gelen değişiklikten kaynaklandığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kapsamında, analize dahil edilen BbigAMA-1 izolatlarında, tür içi birçok polimorfik alan olduğu dikkati çekmiştir. Ancak, bu polimorfik alanların protein yapılarında az sayıda mutasyona yol açtığı görülmüştür.

Paraziter enfeksiyonlara karşı DNA aşı üretiminde, etkili bir koruma sağlanabilmesi için parazit proteinlerinin antijenik bölgelerinin kombinasyonu oldukça önem arz etmektedir (2). Çalışmamızda, her iki izolat için farklılık gösterdiği saptanan 35. amino asidin, tahmini antijenik bölgede yer aldığı belirlenmiştir. Böylece, IV1 ve IT2 izolatlarında BbigAMA-1 proteinlerinde meydana gelen bu mutasyonun, antijenik bölgeyi etkilediği tespit edilmiş ve bu nedenle DNA tabanlı geliştirilecek aşılarda BbigAMA-1'in farklı koruyucu etkiler gösterebileceği düşünülmüştür. Ayrıca mutasyonun antijenik bölgede olması, her iki izolataın farklı patojenik etkilere sahip olabileceği ihtimalini de ortaya koymuştur. Nitekim daha önce aynı patojen türünün *in vivo* ve *in vitro* izolatları üzerine yapılan çalışmalarda (3, 25, 32, 50) bu farklılıklar rapor edilmiştir. Ancak bu konuda kesin bir sonuca ulaşabilmek için devamlılık gösteren kültürasyonlar ile deneysel çalışmaların yapılması ve elde edilen immunolojik sonuçların kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir.

AMA-1, *B. bigemina* başta olmak üzere diğer *Babesia* türlerinin teşhisinde sıklıkla hedef gen bölgesi olarak kullanılmasına rağmen, yapılan çalışmalarda (11, 29, 40, 41, 51), AMA-1 gen bölgesinin filogenetik analizler için yeterli genetik çeşitliliği sağlamadığı ve çoklu

hizalama analizlerinde yüksek benzerlik değerlerinin tespit edildiği rapor edilmiştir. Ancak söz konusu çalışmalar incelendiğinde, yapılan PCR analizlerinde AMA-1'in sadece 211 bp'lik bir bölgesinin amplifiye edildiği ve dolayısıyla moleküler filogenetik analizlerde sadece bu bölge üzerinden değerlendirmenin yapıldığı görülmüştür. Çalışmamızda, BbigAMA-1'in tamamının (1788 bp) amplifikasyonu yapılmış ve nükleotid dizilimlerinin hizalama analizleri sonrasında Kayseri/Türkiye IV1 ve Kayseri/Türkiye IT2 izolatlarının, Dünya'da mevcut diğer izolatlar ile %97.4 - %99.9 oranlarında identiklik gösterdiği belirlenmiştir. İzolatlar arası benzerlik oranlarının yüksek bulunması, diğer araştırmacıların sonuçlarıyla uyumluluk göstermiştir. Ancak nükleotid dizilimlere göre oluşturulan filogenetik ağaç incelendiğinde (Şekil 2), BbigAMA-1 izolatlarının genellikle bölgesel bazda farklı branşlarda kümelendikleri tespit edilmiştir. Dolayısıyla, bölgesel genetik çeşitliliğe bağlı farklılıkların araştırılmasında AMA-1'in yetersiz bir gen olduğu ifadelerinin (11, 51), filogenetik analizlerde ilgili gene ait sadece 211 bp'lik çok kısa bir fragmentin incelenmesinden kaynaklandığı anlaşılmıştır. Bu açıdan, AMA-1 tabanlı genetik çeşitlilik ve filogenetik çalışmalarında, ilgili genin bütün olarak analiz edilmesinin veya parsiyel gen bölgesi analizlerinin farklı gen bölgeleriyle kombinasyonlu bir şekilde çalışılmasının daha doğru sonuçlar verebileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışma ile *B. bigemina*'nın yaşam siklusunda, özellikle de konak hücreye invazyon aşamasında kritik rol oynayan AMA-1'in, Kayseri/Türkiye suşunun *in vivo* ve *in vitro* izolatlarında moleküler karakterizasyonu ve ekspresyonu yapılmış, moleküler ağırlığı hesaplanmış ve bu iki izolat arasında attenüasyona bağlı meydana gelen farklılıklar ortaya konmuştur. Geline bu noktada, birçok apikompleksan protozoona karşı aşı geliştirme çalışmalarında önemli bir protein olarak ifade edilen AMA-1'in, Türkiye'deki *B. bigemina* enfeksiyonlarıyla mücadelede aşı adayı olarak güvenilirliği ve etkinliğinin ortaya konması için, farklı coğrafik alanlardan izole edilecek çeşitli *B. bigemina* suşları ile moleküler düzeyde deneysel çalışmalara ihtiyaç bulunduğu görülmektedir.

Teşekkür

Araştırmacılar, TDK-2014-5030 kod numaralı doktora tez projesi desteği için Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür eder.

Kaynaklar

1. Altschul SF, Gish W, Miller W ve ark. (1990): *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol, **215**, 403-410.
2. Beghetto E, Nielsen HV, Del Porto P ve ark. (2005): *A combination of antigenic regions of Toxoplasma gondii microneme proteins induces protective immunity against oral infection with parasite cysts*. J Infect Dis, **191**, 637-645.
3. Biller L, Schmidt H, Krause E ve ark. (2009): *Comparison of two genetically related Entamoeba histolytica cell lines derived from the same isolate with different pathogenic properties*. Proteomics, **9**, 4107-20.
4. Bock R, Jackson L, De Vos A ve ark. (2004): *Babesiosis of cattle*. Parasitology, **129**, 247-269.
5. Brands SJ (2015): Taxon: species *Babesia bigemina*. Systema naturae 2000. The Taxonomicon. Available at <http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=1353&src=0>. (Accessed 15 Şubat 2017).
6. Chesne-Seck ML, Pizarro J, Vulliez-Le Normand B ve ark. (2005): *Structural comparison of apical membrane antigen 1 orthologues and paralogues in apicomplexan parasites*. Mol Biochem Parasitol, **144**, 55-67.
7. De Vos AJ, Bock RE (2000): *Vaccination against bovine babesiosis*. Ann N Y Acad Sci, **916**, 540-545.
8. De Waal DT, Combrink MP (2006): *Live vaccines against bovine babesiosis*. Vet Parasitol, **138**, 88-96.
9. Drew DR, Hodder AN, Wilson DW ve ark. (2012): *Defining the antigenic diversity of Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 and the requirements for a multi-allele vaccine against malaria*. Plos One, **7**, e51023.
10. Ellis RD, Sagara I, Doumbo O ve ark. (2010): *Blood stage vaccines for Plasmodium falciparum: Current status and the way forward*. Hum Vaccin, **6**, 627-634.
11. Elsify A, Sivakumar T, Nayel M ve ark. (2015): *An epidemiological survey of bovine Babesia and Theileria parasites in cattle, buffaloes, and sheep in Egypt*. Parasitol Int, **64**, 79-85.
12. Filatov DA (2009): *Processing and population genetic analysis of multigenic datasets with ProSeq3 software*. Bioinformatics, **25**, 3189-90.
13. Gaffar FR, Yatsuda AP, Franssen FJ ve ark. (2004): *Erythrocyte invasion by Babesia bovis merozoites is inhibited by polyclonal antisera directed against peptides derived from a homologue of Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1*. Infect Immun, **72**, 2947-55.
14. Gunasekera AM, Wickramarachchi T, Neafsey DE ve ark. (2007): *Genetic diversity and selection at the Plasmodium vivax apical membrane antigen-1 (PvAMA-1) locus in a Sri Lankan population*. Mol Biol Evol, **24**, 939-947.
15. He L, Fan L, Hu J ve ark. (2015): *Characterisation of a Babesia orientalis apical membrane antigen, and comparison of its orthologues among selected apicomplexans*. Ticks Tick Borne Dis, **6**, 290-296.
16. Hehl AB, Lekutis C, Grigg ME ve ark. (2000): *Toxoplasma gondii homologue of plasmodium apical membrane antigen 1 is involved in invasion of host cells*. Infect Immun, **68**, 7078-86.
17. Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001): *MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees*. Bioinformatics, **17**, 754-755.
18. İnci A, Yazar S, Tunçbilek AS ve ark. (2013): *Vectors and vector-borne diseases in Turkey*. Vet J Ankara Univ, **60**, 281-296.
19. İnci A, Yıldırım A, Duzlu O ve ark. (2016): *Tick-borne diseases in Turkey: A review based on one health perspective*. PLoS Neglect Trop D, **10**, e0005021.
20. Karaer Z, Nalbantoglu S (2005): *Protozoon hastalıklarında tedavi*. 1-19. In: A Burgu, Z Karaer (Eds),

- Parazit Hastalıklarında Tedavi. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, İzmir.
21. **Kaya S, Pirinççi İ** (2007): *Protozoonları etkileyen ilaçlar*. 562-565. In: S Kaya (Ed), Veteriner Farmakoloji. Medisan Yayın Serisi, Ankara.
 22. **Kearse M, Moir R, Wilson A** (2012): *Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data*. *Bioinformatics*, **28**, 1647-49.
 23. **Kumar S, Stecher G, Tamura K** (2016): *MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets*. *Mol Biol Evol*, **33**, 1870-74.
 24. **Laemmli UK** (1970): *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, **227**, 680-685.
 25. **Liu M, Vakharia VN** (2004): *VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence in vivo*. *Virology*, **330**, 62-73.
 26. **Moitra P, Zheng H, Anantharaman V ve ark.** (2015): *Expression, purification, and biological characterization of Babesia microti apical membrane antigen 1*. *Infect Immun*, **83**, 3890-01.
 27. **Montero E, Rodriguez M, Oksov Y ve ark.** (2009): *Babesia divergens apical membrane antigen 1 and its interaction with the human red blood cell*. *Infect Immun*, **77**, 4783-93.
 28. **Moreau E, Bonsergent C, Al Dybiat I ve ark.** (2015): *Babesia divergens apical membrane antigen-1 (BdAMA-1): A poorly polymorphic protein that induces a weak and late immune response*. *Exp Parasitol*, **155**, 40-45.
 29. **Ochirkhuu N, Konnai S, Mingala CN ve ark.** (2015): *Molecular epidemiological survey and genetic analysis of vector-borne infections of cattle in Luzon Island, the Philippines*. *Vet Parasitol*, **212**, 161-167.
 30. **ORF Finder** (2015): Open reading frame finder. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/> (Accessed 08 April 2015).
 31. **Posada D** (2008): *jModelTest: Phylogenetic model averaging*. *Mol Biol Evol*, **25**, 1253-56.
 32. **Ramsey KH, Sigar IM, Schripsema JH ve ark.** (2009): *Strain and virulence diversity in the mouse pathogen Chlamydia muridarum*. *Infect Immun*, **77**, 3284-93.
 33. **Remarque EJ, Faber BW, Kocken CH ve ark.** (2008): *Apical membrane antigen 1: A malaria vaccine candidate in review*. *Trends Parasitol*, **24**, 74-84.
 34. **Remarque EJ, Roestenberg M, Younis S ve ark.** (2012): *Humoral immune responses to a single allele PfAMA1 vaccine in healthy malaria-naive adults*. *Plos One*, **7**, e38898.
 35. **Rice P, Longden I, Bleasby A** (2000): *EMBOSS: The European molecular biology open software suite*. *Trends Genet*, **16**, 276-277.
 36. **Rodrigues MHC, Rodrigues KM, Oliveira TR ve ark.** (2005): *Antibody response of naturally infected individuals to recombinant Plasmodium vivax apical membrane antigen-1*. *Int J Parasitol*, **35**, 185-192.
 37. **Salama AA, Terkawi MA, Kawai S ve ark.** (2013): *Specific antibody to a conserved region of Babesia apical membrane antigen-1 inhibited the invasion of B. bovis into the erythrocyte*. *Exp Parasitol*, **135**, 623-628.
 38. **Sambrook J, Russell DW** (2001): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 39. **Sevinc F, Xuan X** (2015): *Major tick-borne parasitic diseases of animals: A frame of references in Turkey*. *Eurasian J Vet Sci*, **31**, 132-142.
 40. **Sivakumar T, Lan DT, Long PT ve ark.** (2013): *PCR detection and genetic diversity of bovine hemoprotozoan parasites in Vietnam*. *J Vet Med Sci*, **75**, 1455-62.
 41. **Sivakumar T, Tattiyapong M, Fukushi S ve ark.** (2014): *Genetic characterization of Babesia and Theileria parasites in water buffaloes in Sri Lanka*. *Vet Parasitol*, **200**, 24-30.
 42. **Takala SL, Coulibaly D, Thera M ve ark.** (2009): *Extreme polymorphism in a vaccine antigen and risk of clinical malaria: Implications for vaccine development*. *Sci Transl Med*, **1**, 2ra5.
 43. **Terkawi MA, Thekiso OM, Katsande C ve ark.** (2011): *Serological survey of Babesia bovis and Babesia bigemina in cattle in South Africa*. *Vet Parasitol*, **182**, 337-342.
 44. **Tonukari NJ** (2010): *Theileria parva apical membrane antigen-1 (AMA-1) shares conserved sequences with apicomplexan homologs*. *Int J Biotech Mol Biol Res*, **1**, 36-41.
 45. **Torina A, Agnone A, Sireci G** (2010): *Characterization of the apical membrane antigen-1 in Italian strains of Babesia bigemina*. *Transbound Emerg Dis*, **57**, 52-56.
 46. **Torina A, Caracappa S** (2007): *Babesiosis in Italy: An overview*. *Parasitologia*, **49**, 23-28.
 47. **Torina A, Cordaro A, Blanda V ve ark.** (2016): *A promising new ELISA diagnostic test for cattle babesiosis based on Babesia bigemina apical membrane antigen-1*. *Vet Ital*, **52**, 63-69.
 48. **Tyler JS, Treeck M, Boothroyd JC** (2011): *Focus on the ringleader: The role of AMA1 in apicomplexan invasion and replication*. *Trends Parasitol*, **27**, 410-420.
 49. **Uilenberg G** (2006): *Babesia-A historical overview*. *Vet Parasitol*, **138**, 3-10.
 50. **Xu L, Bao L, Zhou J ve ark.** (2011): *Genomic polymorphism of the pandemic A (H1N1) influenza viruses correlates with viral replication, virulence, and pathogenicity in vitro and in vivo*. *Plos One*, **6**, e20698.
 51. **Ybanez AP, Sivakumar T, Ybanez RH ve ark.** (2013): *Molecular survey of bovine vector-borne pathogens in Cebu, Philippines*. *Vet Parasitol*, **196**, 13-20.
 52. **Zhang H, Compaore MK, Lee EG ve ark.** (2007): *Apical membrane antigen 1 is a cross-reactive antigen between Neospora caninum and Toxoplasma gondii, and the anti-NcAMA1 antibody inhibits host cell invasion by both parasites*. *Mol Biochem Parasitol*, **151**, 205-212.
 53. **Zhou J, Yang J, Zhang G ve ark.** (2006): *Babesia gibsoni: An apical membrane antigen-1 homologue and its antibody response in the infected dogs*. *Exp Parasitol*, **114**, 329-333.
- Geliş tarihi: 16.02.2017 / Kabul tarihi: 15.06.2017
- Address for correspondence:**
Dr. Arif ÇİLOĞLU
 Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
 Parazitoloji Anabilim Dalı, 38039, Kayseri, Türkiye.
 e-mail: arifciloglu@gmail.com