

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

***TOXOPLASMA GONDII* DNA AŞISI İÇİN MIC-3 GENİNİN
KLONLANMASI**

**Hazırlayan
Bora ÖZKAN**

**Danışman
Prof. Dr. Salih KUK**

Doktora Tezi

**Ocak 2016
KAYSERİ**

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

***TOXOPLASMA GONDII* DNA AŞISI İÇİN MIC-3 GENİNİN
KLONLANMASI**

(Doktora Tezi)

**Hazırlayan
Bora ÖZKAN**

**Danışman
Prof. Dr. Salih KUK**

**Ocak 2016
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Bora ÖZKAN

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"TOXOPLASMA GONDII DNA AŞISI İÇİN MIC-3 Geninin Klonlanması " adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Bora ÖZKAN

Danışman

Prof. Dr. Salih KUK

Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Süleyman YAZAR

KABUL ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Salih KUK danışmanlığında **Bora ÖZKAN** tarafından hazırlanan "**TOXOPLASMA GONDII** DNA AŞISI İÇİN MIC-3 GENİNİN KLONLANMASI" adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Anabilim Dalında **DOKTORA Tezi** olarak kabul edilmiştir.

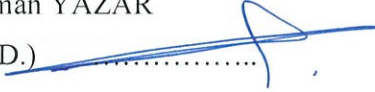
19 / 01 / 2016

JURİ :

Danışman : Prof. Dr. Salih KUK
(ERÜ Tıp Fak Parazitoloji AD.)



Üye : Prof. Dr. Süleyman YAZAR
(ERÜ Tıp Fak Parazitoloji AD.)



Üye : Prof. Dr. Hatice ÖZBİLGE
(ERÜ Tıp Fak Mikrobiyoloji AD.)



Üye : Prof. Dr. Çiler AKISÜ
(DEÜ Parazitoloji AD.)



Üye : Prof. Dr. Erol AYAZ
(AİBÜ Parazitoloji Anabilim Dalı)

**ONAY:**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... / / 2016

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora dönemim ve tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerini esirgemediği aktararak desteğini hep yanımda hissettiğim, sorularıyla zaman zaman sıkıttığım, tez danışmanım ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Salih KUK'a teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim ve tez çalışmam süresince değerli emeklerini ve katkılarını esirgemeyen hocalarım Sayın Prof. Dr. Süleyman YAZAR'a ve Sayın Prof. Dr. İzzet ŞAHİN'e laboratuvar çalışmalarım sırasındaki katkılarından dolayı bölümdeki tüm doktora ve yüksek lisans öğrencilerine, çalışmalarım süresince değerli emeklerini ve katkılarını esirgemeyen Erciyes Üniversitesi Parazitoloji Anabilim Dalı personeline teşekkür ederim.

Doktora süreci boyunca ayrı kalmak durumunda kaldığım eşime ve oğluma, anlayış ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bora ÖZKAN

Şubat 2015, KAYSERİ

TOXOPLASMA GONDII DNA AŞISI İÇİN MIC-3 GENİNİN KLONLANMASI**BORA ÖZKAN**

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Parazitoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Ocak 2016
Danışman: Prof. Dr. Salih KUK**

ÖZET

Toxoplasma gondii tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de görülen bir parazittir. Mortaliteye de sebep olabilen bu parazit gebelerden transplasental yolla bebeklere geçişi sebebiyle oldukça önemli bir halk sağlığı sorunu olarak görülmektedir. İnsanlarda bradizoit ve takizoit formu bulunan parazitin oluşturduğu toxoplasmosisin patogenezinde bir çok faktör rol oynamaktadır. Patogeneizde parazite ait faktörler parazitin tanısının konulması ve parazitten korunmak için aşı geliştirilmesi çalışmalarında önemlidir. MIC3 proteini hastalığın patogenezinde önemli olan ve parazitin her üç döneminde de salgılanan bir proteindir. Bu çalışmada MIC3 geninin DNA aşısı için klonlanması amaçlanmıştır.

Toxoplasma gondii takizoitlerinden Genomik DNA izolasyonu, QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) prosedürü modifiye edilerek yapılmıştır. Genomik DNA'dan MIC3 genini hedef alan primerler kullanılarak PCR ile MIC3 geni çoğaltılmıştır. Çoğaltılan MIC3geni DNA aşısı amacıyla kullanılabilecek pcDNA3,1 plazmitine klonlanmış ve rekombinant plazmit, kompetan *E.coli* hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyon sonrası oluşan kolonilerdeki rekombinant plazmit varlığı PCR Screening ile doğrulanmıştır. Saflaştırılan rekombinant plazmitlerdeki MIC3 geninin varlığı ve DNA dizisi, DNA dizi analizi ile doğrulanmıştır.

Bu çalışma sonrasında MIC3 geni tanısal amaçla kullanılabileceği gibi parazite karşı aşı geliştirme çalışmalarında tek başına olabileceği gibi, diğer aday moleküllerle birlikte multiantijenik aşı çalışmalarında da kullanılabilecektir.

Anahtar Kelimeler: *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmosis, MIC3 Geni, Klonlama, DNA Aşısı

CLONING MIC3 GENE FOR *TOXOPLASMA GONDII* DNA VACCINE

Bora ÖZKAN

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Parasitology

Doctorate Thesis, January 2016

Supervisor: Prof. Salih KUK

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an apicomplexan parasite that is found more prevalent in our country, as well as all over the world. This parasite can cause mortality and also it is an important public health problem because of engaging babies from pregnant women. Many factors play a role in the pathogenesis of Toxoplasmosis that is caused by the tachyzoites and bradyzoites, stage of parasites which are present in human. At pathogenesis, interference factors of the parasite are important to diagnosis and protective vaccine development studies. MIC3 protein released from tachyzoites, bradyzoites, oocysts which is stage of *T.gondii*, is important at pathogenesis of disease.

Genomic DNA was isolated from tachyzoites of *T.gondii* using modified QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN) by manufacture's suggestion. MIC3 gene was amplified with primers which is specific that target sequence using PCR technique. That amplified MIC3 gene cloned into pcDNA3.1. vector according to kit procedure and recombinant plasmid was transformed into kit competent *E.coli* cells. After that, the presence of plasmid was confirmed in the cells after cloning *E.coli* by PCR screening. That recombinant plasmid which cloned into *E.coli* cells, was purified High Pure Plasmid Isolation Kit. After purification of plasmids the presence of MIC3 gene on the plasmid was confirmed PCR technique and sequence analysis.

After this study MIC3 gene can be used for diagnostic purposes and can also be used in the development of multiantigenic vaccines against the parasite.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmosis, MIC3 Gene, Cloning, DNA Vaccine

İÇİNDEKİLER

TOXOPLASMA GONDII DNA AŞISI İÇİN MIC-3 GENİNİN KLONLANMASI

İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	iii
KABUL ONAY SAYFASI.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	x
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.TOXOPLASMOSİS VE <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	3
2.1.1.Tarihçe	3
2.1.2.Sınıflandırma	4
2.1.3.Morfoloji.....	4
2.1.4.Hayat Döngüsü	7
2.1.5.Epidemiyolojisi.....	10
2.1.6.Patogenez ve İmmunolojisi.....	13
2.1.7. Klinik	15
2.1.8. Tanı	16
2.1.9. Tedavi	19
2.1.10. Korunma	19
2.2.AŞI ÇALIŞMALARI	21
2.3.ADJUVANLAR	24

2.3.1. Alüminyum Tuzları.....	25
2.3.2.Emülsiyonlar (MF59)	26
2.3.3. Lipozom ve virozomlar.....	26
2.3.4. Toll-like reseptör agonistleri.....	27
2.3.5.Saponinler (Quil A)	28
2.3.6.İmmun stimüle edici kompleksler	28
2.4.TOXOPLASMA GONDII YÜZEY ANTİJENLERİ.....	28
2.5.ADEZYON MOLEKÜLLERİ VE MİKRONEM PROTEİNLER	30
2.6.MIC3'ÜN MOLEKÜLER YAPISI.....	32
2.7. MIC SEKRESYONLARININ DÜZENLENME MEKANİZMASI.....	34
2.8. MIC3 PROTEİNLERİN KATLANMASI VE HİDROLİZİ.....	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1.MATERYAL	36
3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	36
3.2. METOD.....	37
3.2.1. Total Genomik DNA İzolasyonu	37
3.2.2.Toxoplasma gondii MIC3 Gen Primerleri ve PCR.....	39
3.2.3.PCR Ürününün Agaroz Jelden Saflaştırılması	39
3.2.4.MIC3 Geninin pcDNA3.1 Plazmitine Yerleştirilmesi.....	40
3.2.5.Rekombinant Plazmitin Kompetan E.coli Hücrelerine Transformasyonu	41
3.2.6. Klonlamanın Doğrulanması.....	42
3.2.6.1. PCR Tarama ile Doğrulama	42
3.2.6.2. Miniprep ve PCR ile Doğrulama	42
3.2.6.3. DNA Dizi Analizi ile Doğrulama	43
4. BULGULAR	44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	54
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ.....	75

KISALTMALAR

µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
AIDS	: Edinilmiş Bağışıklık Yetersizliği Sendromu
ASH	: Antijen sunan hücreler
CFT	: Kompleman Fiksasyon Testi
CTL	: Sitotoksik T-lenfosit
DAT	: Direkt Aglütinasyon Testi
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	: Enzim Bağlı İmmunosorban Yöntem
FDA	: U.S. Food and Drug Administration
GP	: Glikoprotein
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
IFAT	: İndirekt Floresan Antikor Testi
IFN	: İnterferon
IgG	: İmmunglobulin G
IgM	: İmmunglobulin M
IHAT	: İndirekt Hemaglutinasyon Testi
IL	: İnterlökin
LAT	: Lateks Aglutinasyon Test
LPG	: Lipofosfoglikan
LPS	: Lipopolisakkarit
M.Ö.	: Milattan önce
MAT	: Modifiye Aglutinasyon Test
MHC	: Major Histokompabilite Kompleksi
MİCs	: Mikronem Protein

ml	: Mililitre
NK	: Natural killer cells
NNN	: Novy, MacNeal ve Nicolle Besiyeri – 3N Besiyeri
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribo Nükleik Asit
SAG1	: Surface Antigen Gene1
SFT	: Sabin-Feldman Test
<i>T.gondii</i>	: <i>Toxoplasma gondii</i>
TH	: Yardımcı T Hücresi
TLR	: Tool Benzeri Reseptörler

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Tablo 2.1. <i>Toxoplasma gondii</i> hayat döngüsünde bulunan farklı hayat evrelerindeki değişiklikler.....	15
Tablo 2.2. Takizoit ve bradizoitte bulunan <i>T.gondii</i> yüzey antijenlerinin gen ve proteinleri	29
Tablo 2.3. <i>Toxoplasma gondii</i> mikronem proteinlerinin özellikleri.....	31
Tablo 3.1. Tez çalışması için kullanılan cihazlar.	36
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan malzemeler	37
Tablo 3.3. pcDNA3.1 klonlama reaksiyonu	40
Tablo 4.1. DNA dizi analizi ile elde edilen <i>T.gondii</i> MIC3 genine ait DNA dizisi	49
Tablo 4.2. DNA dizi analizi ile elde edilen <i>T.gondii</i> MIC3 geninin kodladığı aminoasit dizisi	50
Tablo 4.3. Çalışmadan elde edilen DNA dizisi GenBANK veri tabanındaki mevcut <i>T.gondii</i> DNA dizileri ile karşılaştırılması.....	51
Şekil 2.1. <i>Toxoplasma gondii</i> trofozoiti	5
Şekil 2.2. Fare beyinde bulunan doku kisti içindeki bradizoitler	6
Şekil 2.3. <i>Toxoplasma gondii</i> ookisti	7
Şekil 2.4. <i>Toxoplasma gondii</i> 'nin hayat döngüsü	9
Şekil 2.5. Gebelerde <i>T.gondii</i> antikor serolojisinin yorumlanması	18
Şekil 3.1. Mikroskop altında görüntülenen <i>T.gondii</i> takizoitleri (100×).....	38
Şekil 3.2. pcDNA3.1 Vektör Haritası.....	41
Şekil 4.1. <i>Toxoplasma gondii</i> 1080 bp uzunluğundaki PCR ürününün %1,5'lik agaroz jeldeki görüntüsü	44
Şekil 4.2. <i>Toxoplasma gondii</i> 1080 bp uzunluğundaki Clean up PCR ürününün %1,5'lik agaroz jelde görüntülenmesi.....	45
Şekil 4.3. Transformasyon işlemi sonunda üreyen koloniler	46
Şekil 4.4. Nokta ekim sonucu üreyen koloniler	46

Şekil 4.5. PCR Screening ürünleri. 1; negatif kontrol 2-5; Sırasıyla 4., 6., 7. ve 9. kolonilerden hazırlanan PCR görüntüleri.....	47
Şekil 4.6. M;100 bç Ladder, 1-2; Miniprep sonrası 1080 bç'lik <i>T.gondii</i> MIC3 Rekombinant plazmit ürünleri 3. Negatif Kontrol	48
Şekil 4.7. <i>T.gondii</i> MIC3 proteinin 3 boyutlu görünümü.....	53

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Toxoplasma gondii, dünya çapında yaygın bir dağılım gösteren zorunlu intrasellüler bir parazittir (1). Çok farklı ve geniş konak dağılımı gösteren *T. gondii* insanları enfekte etmesinin yanı sıra, memelilerden kuşlara kadar tüm sıcakkanlı hayvanları enfekte etme yeteneğine sahiptir (2).

Transplasental bulaş sonucunda insanlarda ve hayvanlarda ölü doğum, düşük ve fetal anomalilere, immun sistemi baskılanmış ya da zayıf bireylerde birçok organ tutulumundan meningoensefalit tablosuna kadar hayatı tehdit eden durumlara neden olmaktadır. Bu özellikler *T.gondii*'yi sağlık ve ekonomik açıdan önemi yüksek bir parazit yapmasının yanında, aşı çalışmaları kapsamına alınan bir parazit olmasına neden olmaktadır (3).

Günümüzde *T.gondii*'ye bağlı gelişen fetal anomalilerin tedavisinde her yıl milyarlarca ABD doları harcanırken, bu anomalilerin oluşmaması ve azaltılabilmesi için hala yüz milyonlarca dolarla ifade edilen araştırma kaynakları harcanmaktadır (2).

Eşeysiz üremenin görüldüğü insanda, takizoit ve bradizoit formu görülürken, eşeyli üremenin görüldüğü kedi ve kedigillerde ise üç enfektif form olan ookist, takizoit ve bradizoit formları da görülmektedir. Hastalığın patogenezinde önemli olan bu formlarda bulunan proteinler toxoplasmosisin tanısında kullanılmasının yanında aşı çalışmalarında da hedef bölgeler olarak kullanılmaktadır (2, 4).

Mikronem proteinleri hastalığın patogenezinde önemli bir yeri olup takizoit, bradizoit ve ookist formlarının her üçünde de bulunan, özellikle adezyon ve invazyon mekanizmaları için önem arz eden sekretuar tip proteindir (5).

Mikronemlerden salınan mikronem proteinler *T.gondii*'nin konak hücreyi tanımada, adezyonunda ve invazyonunda görev alan temel proteinlerdir. *T.gondii* ve konak hücre

arasında oluşan temasın erken dönemlerinde MIC'ler takizoitin apeksinden salınan ilk proteindir. Bu sekretuar proteinler konak hücre membranında bulunan reseptörlerin tanınması yoluyla adezyonu kolaylaştırır (6).

Böylece konak hücreye invazyonun erken döneminde anahtar bir rol üstlenirler. 2015 yılı itibariyle tespit edilen Mikronem proteinlerden 19 tanesi bilinmektedir (7).

Çalışmamızda toxoplasmosisin serolojik tanısında ve aşı çalışmalarında kullanılan ve ümit vadeden mikronem3 proteinin DNA aşı adayı olarak hazırlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.TOXOPLASMOSİS VE *TOXOPLASMA GONDII*

2.1.1.Tarihçe

İlk kez 1900 yılında bir kuş türü olan java serçesinin hemotopoetik sisteminde görülen *Toxoplasma gondii*, *Haemamoeba danilewskyi*'nin çoğalan bir formu sanılmıştır (4).

Charles Nicolle ve L. Manceaux isimli iki araştırmacı tarafından ilk kez 1908 yılında tanımlanan *T.gondii*, Kuzey Afrika'da Tunus'ta yaşayan *Ctenodactylus gundii* isimli bir kemirgenin karaciğer, dalak, kemik iliğinde saptanmıştır. Parazitin cins isminde geçen toxon kelimesi yunanca yay anlamına gelmektedir. Parazit yay şekline benzediği için parazitin isimlendirilmesi bu şekilde yapılmıştır (8). İlk insan olgusu yaklaşık bir yaşında olan bir bebeğin gözünde 1923'te Prag'ta Janku tarafından saptanmıştır. 1937'de Cowen ve Wolf tarafından ilk yenidoğan ensefaliti bildirilmiştir. 1945'te ilk defa asemptomatik kişilerde *T.gondii*'ye bağlı doku kistleri Kean ve Grocott tarafından gösterilmiştir. 1949'da Sabin ve Feldman tarafından toxoplasmosis tanısında kullanılan sensitivitesi ve spesifitesi yüksek bir test olan dye testi kullanılmaya başlanmıştır. Remington, Jacobs ve Melton 1960 yılında *T.gondii*'nin hayvan etinden de insana bulaşabileceğini göstermişlerdir. Ülkemizde ilk insan olgusu Unat ve arkadaşları tarafından 1953 bildirilmiştir (8, 9).

2.1.2.Sınıflandırma

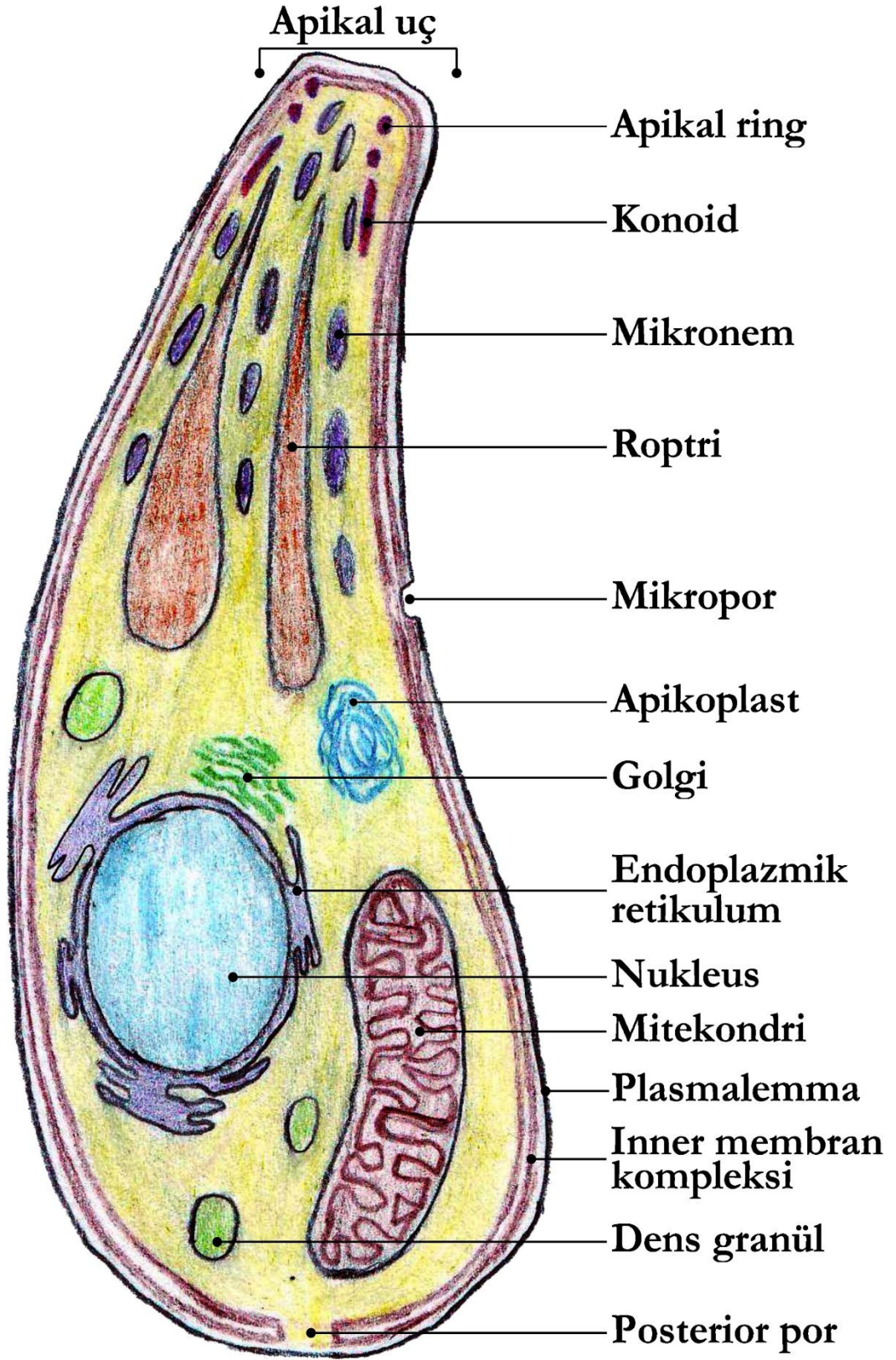
Toxoplasma gondii'nin taksonomik sınıflandırması şu şekildedir (6).

Bölüm	:	Eukaryota
Alem	:	Protozoa
Şube	:	Mizozoa
Alt Şube	:	Apicomplexa
Sınıf	:	Conaidasida
Alt Sınıf	:	Coccidiasina
Takım	:	Eucoccidiasina
Alt Takım	:	Eimeriorina
Aile	:	Sarcocytidae
Alt Aile	:	Toxoplasmatinae
Tür	:	<i>Toxoplasma gondii</i>

2.1.3.Morfoloji

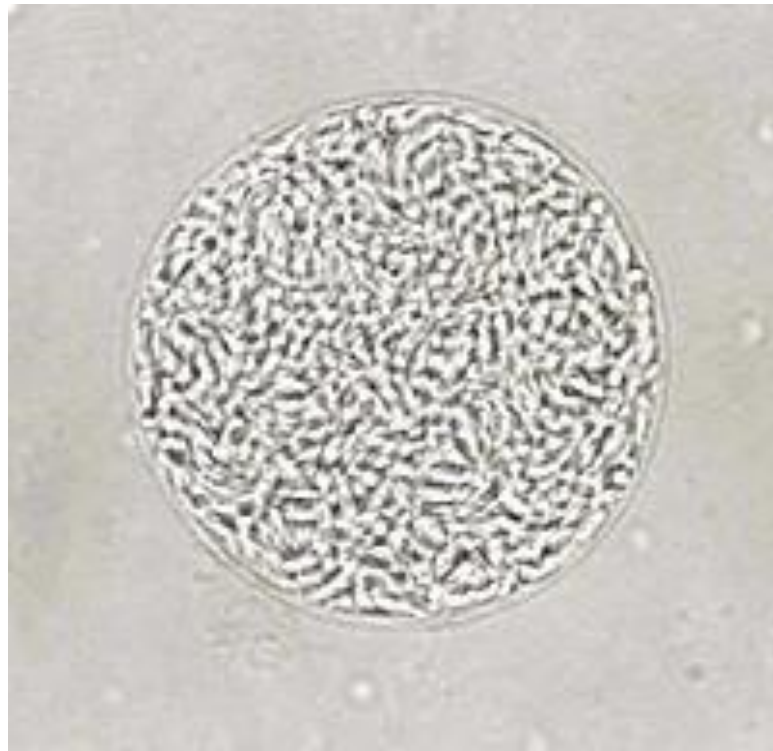
Toxoplasma gondii'nin 3 enfektif dönemi vardır. Bunlar hızlı bölünen invaziv takizoit, doku kistlerinin içinde yaşayan ve yavaş bölünen bradizoit ve ookistin içinde korunmuş halde bulunan sporozoittir (10).

Takizoitler (trofozoitler, hızlı çoğalan form), hilal veya muz şeklinde olup uzunluğu 4-8 µm, eni 2-3 µm'dir. Bir ucu yuvarlak iken diğer uç daha incedir. İnce olan kısım sivri olmayıp daha çok ucu kesilmiş gibi düz bir şekilde sonlanır. Giemsa veya Wright boyası ile boyanan örneklerde çekirdek kırmızı – mor renkte boyanırken, sitoplazma ise mavi renkte boyanır. Bu form serolojik testlerde (Sabin-Feldman Testi, Fluoresan Antikor Testi gibi) sıklıkla kullanılmaktadır. *T.gondii* ökaryot canlıların ortak özelliği olan nükleus, mitokondri ve golgi cisimciğine sahip olmasının yanında bazı özelleşmiş organelleri de bulunmaktadır. Bu organeller yaygın olarak parazitin apikal ucunda bulunurken daha çok invazyon mekanizmasında görev alırlar. Bu organellerden bazıları sekretuar tiptedir. Bunlar mikronemler, roptriler ve dens granüllerdir. Bazıları da daha çok parazitin iskeletini oluşturan yapısal organellerdir. Bunlar apikoplast ve konoittir. Apikoplast 4 kat membranla kaplı özel bir organel olup, konoid, tubulin ve polar ring gibi birçok elemandan oluşmaktadır. Plazma membranı boyunca uzanan mikrotübül denen yapı parazitin yaklaşık 2/3'ü kadardır (Şekil 2.1.). Parazit kendisine karakteristik şeklini veren inner membranla çevrelenmiştir (1, 2).



Şekil 2.1. *Toxoplasma gondii* trofozoiti (1).

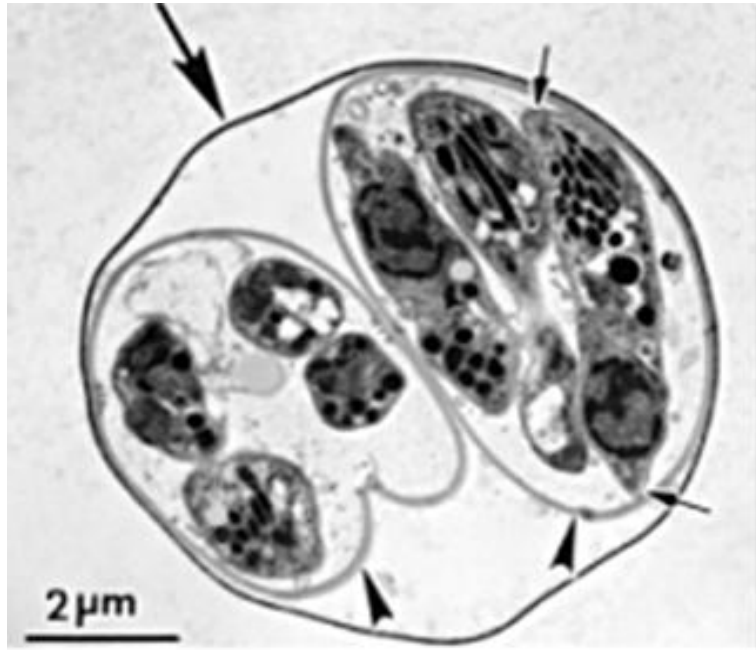
Bradizoitler (kistler veya doku kistleri), *Toxoplasma gondii*'nin hücre içine girdikten sonraki dönemde hücresel immün cevabın oluşmasını takiben oluşan doku kistlerinin içinde yavaş çoğalan formu bradizoit olarak adlandırılmaktadır. Bu kistler birçok doku ve organa yerleşebilirken daha çok beyin ve kasları tercih etmektedirler. Bu kistler beyinde daha ovalimsi iken kas dokusunda ise ince ve uzun bir hal alır. Kistlerin boyutları çok değişkendir. Genç kistler 10 μm iken, daha yaşlı olan kistler ise 100 μm 'ye kadar çıkabilmektedirler (Şekil 2.2.). Bu kistlerin içinde yüzlerce bazen binlerce bradizoit bulunabilmektedir (11). Kist içinde bulunan bradizoitler endodiyogeni ile çoğalırlar. Doku kisti şeklinde alınan bradizoitler sindirim sisteminden asit pepsine karşı olan dirençleri sayesinde yapısı bozulmadan geçerler. Periodic-acid-schiff boyası (PAS), Wright-Giemsa, Gomori'nin methenamine silver ve immunoperoksidaz boyaları ile boyanırlar (4).



Şekil 2.2. Fare beyinde bulunan doku kisti içindeki bradizoitler (8).

Ookistler (kedi dışkılarındaki form), *Toxoplasma gondii*'nin kedi ve kedigillerin bağırsaklarında eşeyli üremenin sonucunda oluşan ve dışkıyla dışarıya atılan enfektif bir formudur. Ookistler oval, 11-14 μm x 9-11 μm boyutundadır. Her bir ookist 2 sporokist içerir. Her sporokistte 4 adet sporozoit içermektedir. Ookist duvarı sağlam, güçlü çok katlı tabakalardan oluşmaktadır (Şekil 2.3.). Bu yapı onu çevresel faktörlerden

korunmasına katkı sağlamaktadır (12). Kedi dışkısıyla dışarıya atılan form henüz enfektif değildir. Enfektif olabilmesi ve olgunlaşabilmesi için uygun hava ve nem koşullarına gereksinim duyar. Bu olgunlaşma sürecine sporulasyon adı verilmektedir. Bu süreç ortamın ısı nem ve oksijen miktarına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Sporulasyonun, 24°C’de 2-3 gün, 15°C’de 8 gün, 11°C’de 14-21 gün sürdüğü, 4°C’nin altında veya 37°C’nin üstünde ise oluşmadığı gösterilmiştir. Olgunlaşan ookistler uygun şartlarda toprakta 1 yıl kadar canlılığını koruyabilmektedir. Ookistlerin klorlamaya ve bazı dezenfektanlara da dirençli olduğu bilinmektedir (13).



Şekil 2.3. *Toxoplasma gondii* ookisti (8).

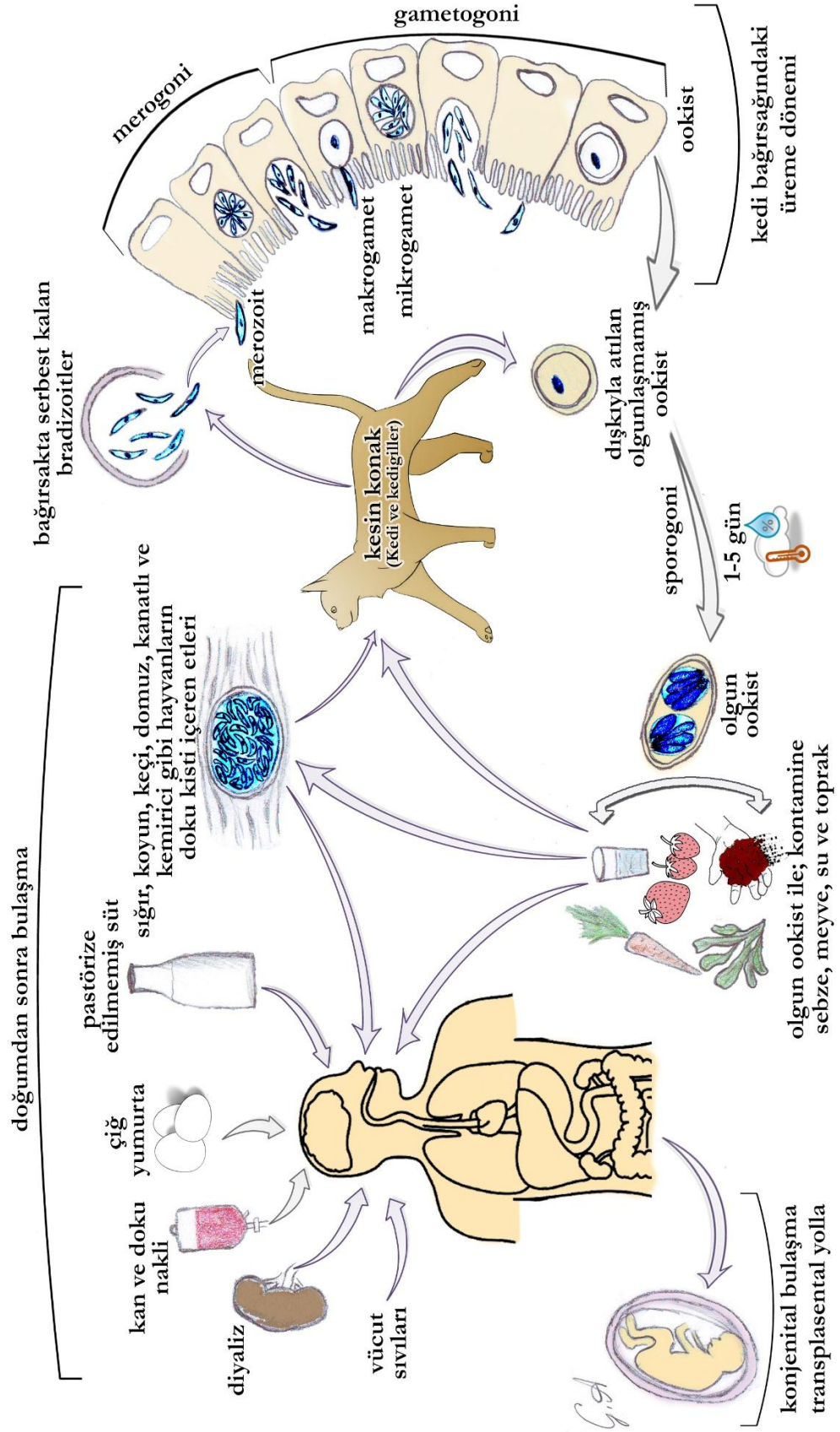
2.1.4. Hayat Döngüsü

Toxoplasma gondii’nin hayat döngüsünde kedi ve kedigiller ile ilgili olan kısmı 3 dönemde meydana gelir. Bu dönemler enterik ve ekstraintestinal fazların birbirini takip etmeleri sonucunda oluşur. Aseksüel dönemde merogoni ile merozoitler, gametogoni ile gametler oluşurken, seksüel dönemde de sporogoni ile de ookistler meydana gelir. Seksüel dönem ise sadece kedi ve kedigillerde oluşmaktadır. Parazitin neslinin devamında kedi anahtar bir rol oynamaktadır (14). Son konak olan kedinin beslenmesi esnasında parazitin herhangi bir formunu alması sonucunda parazit, kedinin incebağırsak epitel hücrelerine girer. Bu döneme enterik ya da enteroepitelyal faz denir ve sadece kedigillerde gerçekleşir. Alınan sporozoitler bağırsak epitel hücresine

girerken etrafında parazitoforik vakuol oluşur. Bu vakuol içinde sporozoitler trofozoite dönüşür. Oluşan bu trofozoitler de endodiyogeni ile bölünerek çoğalmaya başlar. Bir hücre içinde bir trofozoitten yaklaşık 2-40 kadar merozoit oluşur. Enfeksiyondan birkaç gün sonra sayıları artan merozoitler hücreyi parçalayarak yeni hücreleri enfekte etmeye başlarlar (15). Yeni hücrelere giren bu merozoitlerden mikrogametosit ve makrogametosit oluşur. Oluşan her bir mikrogametositte de 12 mikrogamet meydana gelir. Mikrogametlerin bulundukları hücreyi parçalamasının ardından makrogamet içeren hücreye girerler. Hücre içinde bulunan mikrogamet, makrogameti döllemesi sonucunda zigot oluşur. Oluşan zigotta ookiste dönüşür ve kedigillerin bağırsak lümenine atılır. Kedinin dışkılaması ile dışarıya atılan ookist uygun ısı, nem ve oksijen varlığında sporlanır ki, bu döneme sporulasyon denir. Bu dönemde her bir ookist içinde 2 sporokist, her bir sporokist içinde de 4 sporozoit meydana gelir. Bu aşamaları geçiren ookist artık enfektif hale gelmiştir (1, 4, 16).

Kedilerin dışkılarında bulunan ookistleri çıkarana dek geçen süre parazitin hangi formunu aldığı ile yakınan ilişkilidir. Eğer paraziti bradizoit şeklinde almış ise yaklaşık 3 gün, trofozoit şeklinde almış ise yaklaşık 10 gün sonra olgunlaşmamış ookistleri çıkarmaya başlar. Olgunlaşmamış ookist atılım süresi 20 gün kadar devam etmektedir. Bu süre zarfında her bir dışkılama esnasında yaklaşık 100 milyon ookist çıkarmaktadırlar. Kediler ookistlerle de enfekte olabilmektedir ancak diğer formlara göre daha az etkili olan bir formdur (17, 18).

Kediler dışında kalan diğer canlılarda intestinal faz olmayıp sadece ekstraintestinal faz meydana gelmektedir. Kedi dışında kalan canlılarda enfeksiyon ookistlerle, doku kisti içeren gıdalarla veya tüm vücut sıvılarıyla bulaşabilmektedir. Oral yolla alınan ookistlerin içindeki sporozoitler serbest kaldığında her biri intestinal epitel hücreleri içine girerek çoğalmaya başlar. Epitel hücrelerini aşan parazit makrofajlar tarafından fagosit edilerek, immun sistemden kaçıp, vücudun her yerine hatta bazı organlarda özelleşmiş halde bulunan bariyerleri de geçip enfeksiyon oluşturabilme yeteneğine sahiptirler (19) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. *Toxoplasma gondii* 'nin hayat döngüsü (1).

Yeni atılan ve henüz sporule olmayan olgunlaşmamış ookistler dışarıya atılır. Ara konaklar bu ookistleri farklı yollarla alır. Alınan bu ookistler ara konağın vücudunda hızlıca takizoite dönüşüp, savunma sisteminin deveye girmesiyle dokularda bradizoit içeren doku kistleri haline dönüşürler. Vücutlarında doku kisti bulunduran ara konakların, kedi tarafından yenmesi ile de kediler enfekte olurlar. Doku kisti içeren etlerin çiğ ya da az pişmiş yenmesiyle, kontamine ookistlerle, kan, kemik iliği ve organ nakli esnasında enfekte olunabilir. Anneden bebeğe transplasental yolla bulaş da olabilmektedir.

Boyalı biyopsi örneklerinde doku kistleri görülebilse de bu her zaman mümkün olmadığından tanı genellikle seroloji ile konur. Konjenital enfeksiyon tanısında amnion sıvısında *T.gondii* DNA'sı PCR ve Real-Time PCR gibi moleküler yöntemlerle tespit edilebilmektedir.

2.1.5.Epidemiyolojisi

Toxoplasma gondii zoonotik bir parazittir. Bu parazit kediler ile yakın ilişkili olduğundan kozmopolit bir dağılım göstermektedir. İnsanlarda ve diğer sıcakkanlı canlılarda, hatta bazı soğukkanlı hayvanlarda da eritrositler hariç tüm çekirdekli hücreleri enfekte etme kabiliyetine sahiptir (20).

Enfeksiyon etkeninin insanlara çok farklı yollar ile bulaşabildiği; akut dönemde tüm vücut sıvılarıyla, pastörize olmamış sütle, hemodiyaliz ile olabileceği gibi daha çok kist barındıran besinlerin çiğ veya az pişirilip yenmesi ve ookist barındıran yiyeceklerin alınması yolu ile olur. Enfeksiyonun dağılımında en büyük etken kedi dışkılarıyla kontamine ookistlerin alınması ile olmaktadır. Ayrıca bu ookistlerin yayılımında bazı böcek ve sinekler de mekanik vektör olarak görev almaktadır. Kedilerin dışkılama alışkanlığında dışkının toprağa gömülmesi de parazit neslinin devamı açısından önem arz etmektedir (1).

Son yıllarda organ transplantasyonlarının ve kemik iliği naklinin artması, kanserli ve AIDS hastalarındaki artış sebebiyle *T.gondii*, giderek önemi artan bir parazit olmuştur. Konjenital enfeksiyonda, hidrocefali intrakranial kalsifikasyonlar, korioretinit, mikrosefali gibi tablolara neden olabildiğinden bu konuda ciddi çabalar sarf edilmektedir (21-24).

Toxoplasma gondii seroprevalansı dünya çapında çok farklı oranlarda bulunmaktadır. %10 gibi düşük oranlarda olabileceği gibi, %80 civarında da görülebilmektedir. Dünya nüfusunun yaklaşık % 30'unun *T.gondii* ile enfekte olduğu varsayılmaktadır (18, 23). *T.gondii* prevalansı, Güneydoğu Asya, Kuzey Amerika, Kuzey Avrupa ve Afrika sahil ülkelerinde %10-30 civarlarında bulunurken, Orta ve Güney Avrupa ülkelerinde orta derecede %30-50 olduğu belirtilmiştir. Tropikal Afrika ve Latin Amerika ülkelerinde ise yüksek prevalans bildirilmiştir. Bu oranlar ülkeden ülkeye değişebileceği gibi aynı ülkedeki farklı toplumlarda da değişkenlik gösterebilmektedir. Bu değişikliğin nedenleri arasında iklim faktörü yer alır. Zira, iklim koşullarının çevrede canlı kalma süresini etkilemektedir. Tropikal iklimlerde, nemli topraklarda ve sıcak havanın olduğu bölgelerde yüksek seroprevalans görülürken, kurak ve soğuk bölgelerde bu oranın daha düşük olduğu görülmüştür (2).

İklim faktörünün yanı sıra toplumların antropogenetik özellikleri de bu prevalansta önemli bir yer tutmaktadır. Örneğin diyet alışkanlıkları (pişirme metotları, el yıkama alışkanlıkları, tüketilen etin cinsi, sebze-meyve yıkama alışkanlığı), ekonomik, sosyal, kültürel seviye, kullanılan suyun temizliği ve diğer sağlık koruma faktörleri bu oranların oluşmasında yer almaktadır (2).

Maksimum *T.gondii* seroprevalansı kötü hijyen koşulları altında yaşayan çocuklarda gösterilmiştir. Bu durumun muhtemelen su kaynaklı olabileceği üzerinde durulmuştur.

Brezilya'nın kuzeyinde yapılan bir çalışmada, aynı yaş grupları içinde düşük düzeyde sosyo-ekonomik seviyesi olanlarda *T.gondii* seroprevalansının %84 olduğu, orta düzeyde sosyo-ekonomik seviyeye sahip bireylerde %62, yüksek sosyo-ekonomik seviyesine sahip olan bireylerin ise *T.gondii* seroprevalansının %23 olduğu gösterilmiştir. Sosyoekonomik seviyesi düşük olan, *T.gondii* seroprevalansının %84 olduğu bireyler incelendiğinde çoğunun 15 yaş altında olduğu gösterilmiştir. Yüksek sosyoekonomik seviyeye sahip bireylerin çoğunun enfeksiyonu 20 yaşından sonra geçirdiği, yaşı 20-29 olanların seroprevalansının %20, yaşları 40-49 arasında değişen bireylerin seroprevalansının ise % 70 olduğu gösterilmiştir (25).

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi'nde 1 Ocak - 31 Aralık 2012 tarihleri arasında anti *T. gondii* IgG ve IgM antikorlarının tespiti amacıyla

serum örnekleri retrospektif olarak incelenmiştir. 3899 serum örneğinde anti-*T.gondii* IgM, 2942 serum örneğinde ise anti-*T.gondii* IgG retrospektif olarak bakılmıştır. Anti-*T.gondii* IgM antikorları 3899 örneğin 106'sında pozitif olarak tespit edilmiştir. Anti-*T.gondii* IgG antikorları ise 2942 hastanın 954 ünde pozitif olarak tespit edilmiştir. IgG avidite testi çalışılan serum örneklerinden 8 hastada düşük avidite, 88 hastada ise yüksek avidite tespit edilmiştir (26).

2010-2011 tarihleri arasında Afyon bölgesinde 20. gebelik haftasının altındaki gebelerde *T.gondii* seroprevalansının retrospektif olarak incelendiği bir çalışmada; *T.gondii* IgM antikorlarındaki pozitiflik oranı %1,6 (n=9) olarak tespit edilirken, IgG pozitifliği %22,7 (n=119) olarak saptanmıştır. *T.gondii* IgM'si pozitif 9 hastanın 7'sinde ve ara değer olarak tanımlanan 7 hastanın IgG antikorları pozitif olarak değerlendirilmiştir (27).

2011 -2013 yılları arasında yaşları 16-45 arasında değişen gebelerin ilk trimesterinde *T.gondii* seroprevalansının retrospektif olarak değerlendirildiği bir çalışmada; serum örneklerinin *T.gondii* IgG pozitiflik oranı %37,2 (n=602) olarak bulunurken, *T.gondii* IgM pozitiflik oranını %0,9 (n=17) olarak tespit etmişlerdir (28).

Orta Karadeniz Bölgesi'nde yaşayan gebelerde *T. gondii* seroprevalansını tespit etmek amacıyla yapılan bir çalışmada; Eylül 2009 ve Şubat 2012 tarihleri arasını kapsayan dönemde gebelik takibi için başvuran 3162 gebenin serum örneklerinde *T.gondii* antikorlarına retrospektif olarak bakılmıştır. Gebelerin %32'sinde (n=1011) *T.gondii* IgG pozitif, %2'si (n=63) sınır değerde, %66'sı (n=2088) *T.gondii* IgG negatif olarak tespit edilmiştir. *T.gondii* IgM antikorlarına bakıldığında ise; 3162 hastanın 3121'nde (%98,7) negatif, 5 hastada sınır değerde (%0,2), 36 hastada (%1,1) pozitif olarak bulunmuştur (29).

2012-2013 yılları arasında Kahramanmaraş yöresindeki Suriyeli mülteci gebelerle yerel Türk gebelerin *T.gondii* seroprevalansının retrospektif olarak karşılaştırıldığı bir çalışmada; Suriyeli mültecilerde *T.gondii* IgM seropozitiflik oranı 2012 yılı için %4,76 iken bu oran 2013'de %4,84 olarak tespit edilmiştir. *T.gondii* IgG seropozitiflik oranına bakıldığında ise 2012 yılı için %80, 2013 yılı için %62,6 olarak görülmüştür. Çalışmanın diğer kısmını oluşturan yerleşik Türk halkında ise 2012 yılı için *T.gondii* IgM seropozitiflik oranı %1,96 iken bu oran 2013 yılı için %2,34 olarak saptanmıştır.

T.gondii IgG seropozitiflik oranına bakıldığında ise 2012 yılı için %49,7, 2013 yılı için %45,7 olarak belirlenmiştir (30).

2.1.6.Patogenez ve İmmunolojisi

Toxoplasma gondii'nin oluşturduğu patolojinin temelinde enfekte ettiği hücreyi parçalamasıyla meydana gelen hücre hasarı vardır. *Toxoplasma gondii*'nin çok geniş konak yelpazesine sahip olmasında, invazyon yeteneğinin önemi vardır. Bu invazyon mekanizması önceden bilinenin aksine aktif bir mekanizmadır. Bu mekanizmada parazitin aktif motilitesi ve sekretuar organellerden (mikronem, roptri, dense granül) salınan proteinler görev almaktadır. İnvazyon için öncelikle adezyon yani konak hücreye tutunma gerekmektedir. Bunun için mikronemlerden salınan mikronem proteinleri gerekir ve bu olay kalsiyum bağımlı bir mekanizma ile gerçekleşir. Mikronemlerin konak hücre yüzeyindeki reseptörlerle olan ilişkisi parazitin oryantasyonunu gerçekleştirmesine katkıda bulunurken, adezyonunu da güçlendiren bir mekanizmadır. İnvazyon, konak hücre yüzeyi ile parazit arasındaki kompleks bir ilişkiye dayanır. Bu dinamik olay parazitin hücre iskelet yapısında bulunan aktin-miyozin etkileşmesi ile karmaşık bir lineer motor sistem kurularak hücre içine girmesi sağlanır. Bu mekanizmaya “gliding motility” adı verilmektedir. Bir başka deyişle parazit hücre içine kayma hareketine benzer bir hareketle girmektedir (5).

Hücre içine giriş yakın zamana kadar bilinenin aksine, endositik bir aktivite olmayıp, parazitin apikal tarafı ile konak hücre membranı arasında kurulan tight junctionlar sayesinde adına moving junction denilen bir mekanizma ile gerçekleşmekte ve parazit sadece 15 ile 30 saniye arasında hücre içine girmektedir. Moving junction mekanizması ile hücreler arasındaki köprüler sayesinde parazitin önce apikal tarafı sonra da diğer ucu hücre içine girmekte ve parazitin etrafını parazitoforik vakuol çevrelemektedir. Bu sistemde görevli olan diğer yapılar ise parazitin apikal uçunda bulunan apikal membran antijeni, mikronemler, roptriler, roptri neck proteinleridir. Parazitoforik vakuolün devamlılığını sağlayan ise roptrilerden salınan proteinlerdir. ROP2 ve ROP18, parazitoforik vakuolün sitozolik tarafı ile ilişki içinde olup protein kinaz aktivitesine sahiplerdir. Bu aktivite sayesinde parazitin büyümesine ve virülansına katkı sağlarlar (31). İnvazyonda görevli diğer bir roptri proteini de ROP16 olup, konak hücre gen ekspresyonunu etkileyip, interlökin salınımına neden olmaktadır (32).

İnvazyonda ROP proteinlerinin yanında, dense granüller de görev almaktadır. Bu katkıyı invazyondaki ilk bir saatte oluşan parazitoforik vakuolün şekillenmesine katkıda bulunarak sağlamaktadır. Oluşan parazitoforik vakuol paraziti lizozomal enzimlerden ve sitoplazmik veziküllerden korumaktadır. Dens granüllerden salınan sekresyonların parazitoforik vakuol membranından gelişen membran tübülleri ve vakuoler lümenin oluşumuna katkı sağladığı, oluşan bu tübül ve lümen yapısının parazit ve konak hücre arasında madde alışverişine katkı sağladığı, parazitin konak hücre sitozolünden besinleri alırken, parazitin sentezlediği bazı lipid yapılı bileşikler ve proteinleri de konak hücreye aktarımında rol aldığı gösterilmiştir (33).

Toxoplasma gondii için hayati öneme sahip olan parazitoforik vakuol yapısı konak hücre mitokondrisi ile de ilişkilidir. Bu da parazitin metabolizması için gereken enerji kaynağını karşılama açısından önem arz etmektedir. Parazitoforik vakuol yapısı içinde endodiyogeni ile çoğalan takizoitler ortalama 6 ya da 9 döngüden sonra sayıları yaklaşık olarak 64 veya 128 oluncaya kadar bu vakuol yapısı içinde kalmaya devam ederler. Bu sayıya ulaşan parazitin içinde bulunduğu hücre içi kalsiyum artışıyla tetiklenen mekanizma, takizoitlerin hücreyi parçalayıp serbest kalması ile sonuçlanır. Serbest kalan parazitler komşuluk yoluyla yeni hücreleri enfekte edebileceği gibi, kan ve lenf yolu ile taşınıp uzak organ ve dokuları da invaze edebilir (34).

Meydana gelen bu hücre ölümlerinin artmasıyla beraber hastalığın patolojisi de belirgin hale gelmeye başlar. Farklı organ ve dokularda farklı histopatolojik belirtiler oluşur. Örneğin lenf bezleri büyür ve şişerken kimi zaman bu duruma ateş de eşlik edebilmektedir. Hepatosplenomegali, akciğerlerde hiperemi, bağırsak duvarının kalınlaşma ve ödem “akut toxoplasmosis” in kliniğinde görülebilecek durumlardır. Çoğu zaman hastanın immun sisteminin devreye girmesiyle, eğer immun sistemi baskılayan herhangi bir durum söz konusu değilse hastalık hafif grip benzeri semptomlarla ya da asemptomatik olarak geçirilebilmektedir (2, 4, 34, 35).

“Kronik toxoplasmosis” te ise kist içinde yavaş şekilde çoğalan bradizoitlerin hücreleri harap etme yetenekleri çok sınırlı olduğundan, klinik belirtiler genellikle görülmemektedir. Ancak immun sistemin baskılandığı durumlarda kistlerin içinde bulunan bradizoitler serbest hale geçip takizoit forma dönüşebilirler. Genellikle bu durum çok ağır ve öldürücü olabilmektedir (23, 24).

Tablo 2.1. *Toxoplasma gondii* hayat döngüsünde bulunan farklı hayat evrelerindeki değişiklikler.

	Takizoit	Bradizoit	Merozoit	Sporozoit
Nukleus	Merkezi	Bazal	Merkezi	Bazal
Mikronem	Az	Çok	Az	Çok
Roptri Sayısı	5-12	5-10	3-5	5-10
Roptri Görünüm	Labirent	Solid	Solid	Labirent
Yoğun Granüller	Çok	Çok	Az	Çok
Polisakkarit Granülleri	Az	Çok	Yok	Çok

2.1.7. Klinik

Toxoplasma gondii enfeksiyonun kabaca 2 gruba ayrılabilir.

1. Konjenital enfeksiyon
2. Postnatal enfeksiyon

Postnatal enfeksiyonu da kendi arasında immun sistemi sağlam bireyler ve immun sistemi baskılanmış bireylerde olmak üzere görülen toxoplasmosis şeklinde iki kısımda incelenebilir.

Konjenital enfeksiyonun olduğu durumlar, genellikle gebenin hamile kalmadan önce parazitle bu süreçten önce karşılaşmadığı durumlarda, gebede parazite karşı immun yanıtın oluşmadığı durumlarda meydana gelmektedir. Eğer anne adayını hamileliğinden önce bu parazitle karşılaşmış ve ona karşı immun yanıt oluşturmuş ise gebeliği süresince bu parazitle karşılaşsa bile anne ve bebek açısından riski bir durum ön görülmemektedir (22).

Gebelik döneminden daha önce parazit ile karşılaşmamış bireyler, eğer parazit ile karşılaşır, *T.gondii* plasenta aracılığı ile bebeğe geçebilmektedir. Aslında plasenta ciddi bir bariyerdir. Fakat *T.gondii*'nin monosit ve makrofajların içine girip, immun sistemden kaçmayı başarabildiği için bu bariyerleri rahatlıkla geçebilmektedir (2).

Bebekte meydana gelen klinik tablonun ciddiyeti enfeksiyon ajanıyla hangi dönemde karşılaşıldığıyla yakından ilişkilidir. Eğer bu dönem ilk üç aylık periyotta ise parazitin bebeğe geçme oranı %10 iken, bu oran ikinci üç aylık dönemde %30, son dönemde ise %70'lere kadar çıkabilmektedir. Fakat oluşan klinik tablonun şiddetiyle, parazitin

bebeğe geçtiği trimester ters orantılıdır. Yani ne kadar erken dönemde bebeğe geçiş olursa bebekte meydana gelen hasar o denli şiddetli olmaktadır (22, 36). Bebeğe geçiş son trimesterde olduğunda, vakaların %80'den fazlasında klinik tablo oluşmayıp asemptomatik seyretmektedir. Fakat parazitin bebeğe geçişi ilk trimesterde oluşursa çok ağır tablolar oluşabilmektedir. *T.gondii* nörotrop bir parazit olduğundan beyin ve göze yerleşebilmekte ve buralarda ilk trimesterde çok ağır tablolara neden olabilmektedir. Santral sinir sisteminde özellikle beyaz cevheri tutup bu bölgelerde inflamasyon odakları ve ardından nekrotik odaklar oluşturmaya başlar. Bunun neticesinde nekrotik odakların aqua ductus sylvius'un tıkanmasına, lateral ventriküllerde dilatasyona ve hidrocefali tablosuna sebep olmaktadır. Bu nekrotik odaklara kalsiyumun çökmesi neticesinde kalsifikasyon odakları oluşmakta ve oluşan odaklar X ray veya transfontanelekografi ile de görüntülenebilmektedir. İlk trimesterde oluşan majör sekeller, mental retardasyon, epileptik nöbetler, mikrocefali, hidrocefali, sağırılık ve motor gelişim geriliğidir (37).

İlk trimesterde hasarın şiddetli olduğu diğer bir organ da gözdür. Gözde de mikrooftalmi, katarakt, artmış intraoküler basınç, strabismus, optik nörit ve retinal nekroz odakları, retinokoroidit, üveit, ve oluşan nekrotik odaklar maküla densa'yı etkiler ise körlük oluşabilmektedir (38).

2.1.8. Tanı

Toxoplasmosiste tespit edilen klinik bulgular sadece *T.gondii*'ye ait spesifik semptom ve bulgular olmadığından, oluşan klinik tablo birçok enfeksiyon ajanının oluşturduğu durumlarla ve bazı klinik tablolarla benzerlik gösterebilmektedir. Bu sebeple hastalığın tanınması, diğer hastalıklarla karıştırılmaması ve oluşan tabloların ciddiyetinden ötürü önem arz etmektedir.

Günümüzde parazitin tanınmasında çok farklı metotlar kullanılmakta ve yeni tanı metotları geliştirilmeye devam etmektedir. Yapılan bu işlemler iki ana başlık halinde sınıflandırabilmektedir.

1. Direkt tanı yöntemleri
2. İndirekt tanı yöntemleri

Direkt tanı yöntemleri arasında bulunan etkene yönelik tanıda, *T.gondii*'nin farklı hayat formlarından herhangi birinin etkenin içinde bulunduğu doku veya organlardan

hazırlanmış preparatlarda gösterilmesi temeldir. Ayrıca *T.gondii*'ye ait şüpheli materyaller deney hayvanlarına intraperitoneal veya intrakranial olarak verilmesini takiben, hayvanların 3 ila 7 gün bekletildikten sonra periton sıvılarından ya da beyin dokusundan alınan örneklerde parazit varlığının tespiti ile de etkene yönelik tanı konulabilmektedir. Bu yöntemlerin dışında parazit farklı hücre hatlarına da ekilerek kültüre edilebilmektedir (1).

Bir diğer direk tanı yöntemi de PCR'dır. Bu yöntem toxoplasmosisin tanısında kullanılan duyarlılığı ve hassasiyeti yüksek bir testtir. Klinik örneklerden izole edilen *T.gondii* DNA'sının hedef gen bölgelerinin çoğaltılıp görüntülenmesi esasına dayanan bir metottur. Bu sistemin daha da geliştirilmiş, sensitivite ve spesifitesi yüksek olan bir diğer test ise Real-Time PCR'dır.

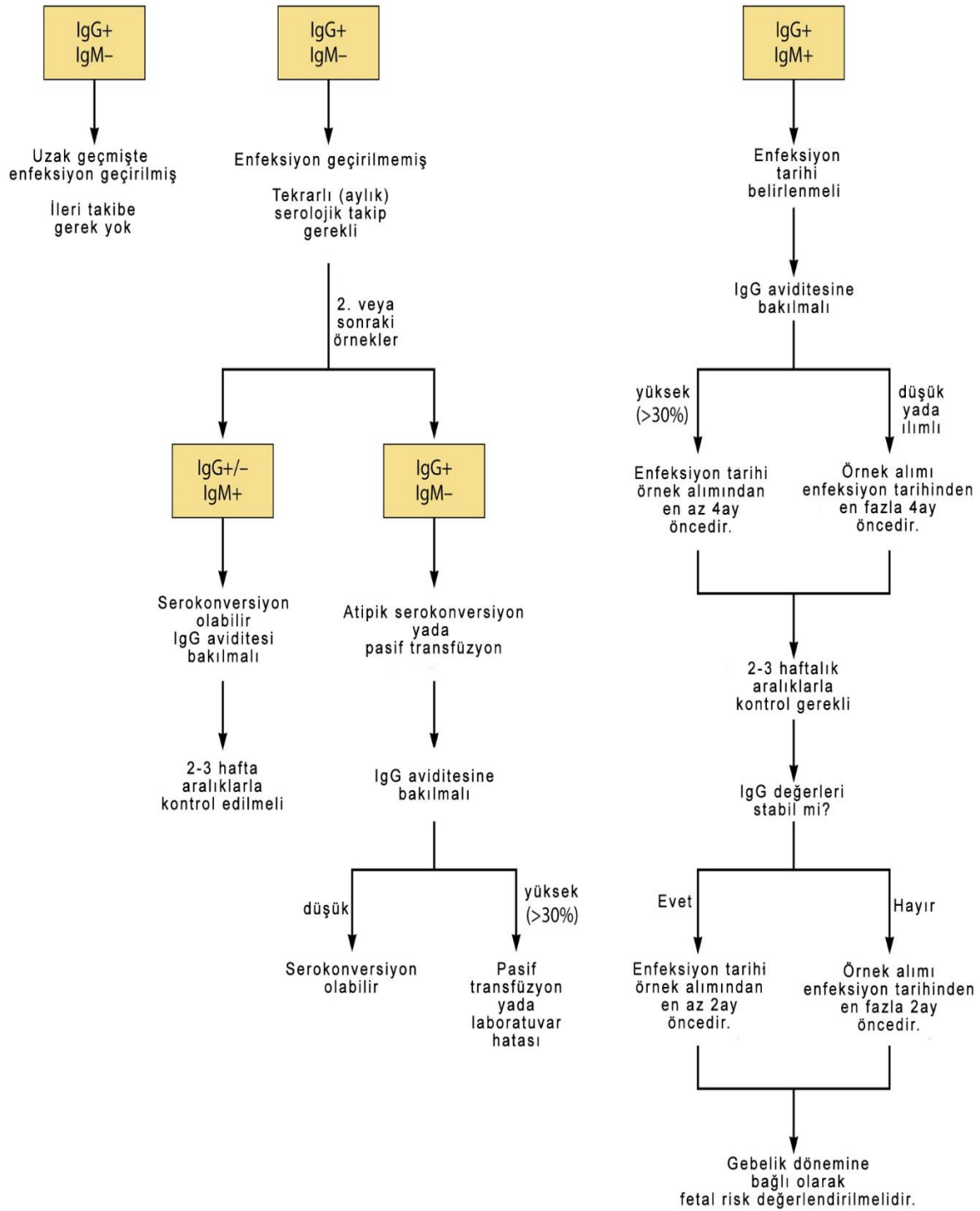
İndirekt testler günümüzde daha çok serolojik metotların kullanıldığı bir dizi testten oluşmaktadır. Bu serolojik testlerin temelinde hasta serumunda bulunan *T.gondii*'ye karşı oluşmuş IgM, IgG, IgA, IgE tipi antikorların tespiti yatmaktadır. Mevcut serolojik yöntemler arasında Sabin-Feldman Test (SFT), Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA), İndirekt Fluoresan Antikor Testi (IFAT), Modifiye Aglutinasyon Test (MAT), İndirekt Hemaglutinasyon Testi (IHA), Kompleman Fiksasyon Testi (CFT), Lateks Aglutinasyon Test (LAT) bulunmakla birlikte günümüzde referans laboratuvar dışında kalan rutin laboratuvarlarda daha çok ELISA ve IFAT kullanılmaktadır (2).

Günümüzde daha çok gebelik ve öncesini kapsayan dönemde kullanılan bu testler, immün sistemi baskılanmış bireylerin takibinde de yoğun olarak kullanılmaktadır.

Akut enfeksiyonun serolojik tanısında en sık kullanılan antikor IgM tipi antikorlardır. Ancak kullanılan bu antikorlar bazı protozoon parazitler ve bazı inflamatuvar romatizmal hastalıklarda da yükseldiğinden çapraz reaksiyon oluşturup yanlış pozitif sonuç verebilmektedir.

Gebeliğin ilk trimesterinde ve gebelik döneminden önce belirlenen IgG antikorlarının negatif olması, bebek ve anne açısından riskli bir durum oluşturabileceğinden anne adaylarının bu konuda bilgilendirilmesi gerekmektedir. IgG pozitifliği gebelerde anne adayının daha önce *T.gondii* ile karşılaşmış olduğunu gösterirken, enfeksiyonu ne zaman geçirdiği hakkında bilgi vermemektedir. Bunun için avidite testine ihtiyaç vardır. Düşük IgG aviditesi enfeksiyonun yakın bir zamanda, yaklaşık 3-4 ay içinde geçirilmiş

olabileceğini gösterdiğinden bebek açısından riskli bir durum oluşturmaktadır. Yüksek avidite ise enfeksiyonun 3-4 aydan daha uzun bir süre önce geçirildiğini göstermektedir. Bu bilgilerin bilinmesi tedaviyi yönlendirmenin yanında bebeğin kürete edilme kararının verilmesinde de belirleyici olacaktır (2) (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Gebelerde *T.gondii* antikor serolojisinin yorumlanması (2).

Gebelerde enfeksiyonun hangi evresinde olduğunu tespit etmek için kullanılan bir diğer yöntem ise Differential aglütinasyon testidir.

Gelecekte kullanılmasına umutla bakılan yeni bir yöntem ise “IFN- γ release assay” dir. Bu yöntem konjenital enfeksiyonun, postnatal dönemdeki tanısına yönelik bir testtir (39). Bu yöntem IFN- γ konsantrasyonunun ölçümüne dayanmaktadır. Tam kan hücrelerinin *T.gondii* antijenleriyle invitro ortamda stimülasyonu sonucunda ortaya çıkan IFN- γ miktarının ELISA ile ölçülmesine dayanan bir testtir. Bu yöntem sadece toxoplasmosisin değil *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonunun tanısında da kullanılmaktadır (40).

2.1.9. Tedavi

Toxoplasmosisin kiniği, hastanın yaşı, immun durumu, cinsiyeti vb. gibi birçok duruma bağlı olduğundan, tedavisinde de farklılıklar bulunmaktadır. Hastalar enfeksiyonu çoğu zaman asemptomatik olarak geçirmekte olduğundan bu bireylerde tedaviye gereksinim duyulmamaktadır. Tedavi için asıl önemli olan kitle gebeler ve immun sistemi zayıflamış bireylerdir (41).

İmmun sistemi baskılanmış bireylerde hastalık çok ağır bir tablo ile karakterizedir. Özellikle AIDS hastalarında oluşan ensefalit tablosunda genellikle birden fazla ilacın kombine kullanımı söz konusudur. Genellikle primethamine ve sulfadiazine, folinik asit eklenmesi ile oluşan tedavi protokolü uygulanmaktadır. Eğer kişinin sülfonamidlere olan toleransında bir bozulma meydana gelirse klindamisin bir diğer seçenektir. Akut toxoplasmosisli hastada primethamine sulfadiazine yerine atovaquone kullanılır. AIDS hastalarında ise primethamine/sulfadiazine kombinasyonunun yerine trimetoprim sulfametaksazol kombinasyonu tercih edilmektedir (1, 4, 14).

2.1.10. Korunma

Hastalıktan korunmada öncelikle etkenin hayat döngüsünün ve bulaş yollarının iyi bilinmesi gerekmektedir. Alınması gereken önlemleri enfeksiyon kaynağına göre 3 ana başlık halinde sınıflandırabiliriz.

Enfeksiyon kaynağının kedi dışkılarındaki ookist olduğu durumlar; kedi dışkısı çevreye atıldıktan yaklaşık 2-3 gün sonra enfektif hale gelebilmektedir. Ookist atılımı kedinin hayatı boyunca sadece bir kere olup, yaklaşık 2 hafta boyunca atılım devam etmektedir. Oluşan ookistler 55 °C ısıtılmakla yaklaşık 1-2 dakika içinde ölmektedir. Fakat bu ookistler sodyum hipokloride dirençlidir. Bu bilgiler ışığında kedilerle temastan sonra ellerin yıkanması, kedi dışkısının bulunduğu eşyaların sık sık 60 °C'nin üzerindeki sularla yıkanması, kedi dışkısının bulunduğu eşyaların temizliği yapılırken eldiven giyilmesi, kedi besleyen kişilerin kedileri konserve ve çiğ olmayan besinlerle beslemesi bu alanda alınacak önlemler arasında sıralanabilmektedir (42, 43).

Enfeksiyon kaynağının, çevreye dağılmış halde bulunan ookist olduğu durumlar; bu tip bulaşmada oluşan riskli durumlar, genellikle bahçe işleriyle uğraşıldığı, açık alanda yapılan çeşitli aktiviteler esnasında toprakla temas esnasında oluşabilmektedir. Ookistler çevre ısısının 4 °C olduğu durumlarda yaklaşık 1 yıl, -10 °C olduğu durumlarda 106 gün, 35 °C olduğu durumlarda 32 gün, 40 °C olduğunda ise 9 gün canlı kalabilmekte ve enfektivitesini korumaktadır. Ayrıca çevrede bulunan arıtılmamış sularda, kuyu sularının yüzey kısmında bulunabilmektedir. Toprakla herhangi temastan sonra, ellerin, özellikle tırnakların fırçayla yıkanması ve bahçe işlerinde eldiven kullanılması, alınacak önlemler arasındadır. Ookistler, suda uzun süre canlılığını kaybetmeden yaşayabilmekte, dondurulmaya, klorlanmaya, ozon uygulanmasına dirençlidirler. Kabuklu deniz canlılarında, çiğ sebze ve meyvelerin dış yüzeylerine ookist bulaşabileceğinden, midye, istakoz, yengeç gibi kabuklu deniz canlılarının pişirilmeden yenmemesi, deniz ve nehirlerde yapılan aktivitelerde suların yutulmamasına dikkat edilmesi, açıkta bulunan suların içilmemesi, yere yakın yetişen sebze ve meyvelerin çok iyi yıkanmadan yenilmemesi bu alanda alınacak önlemler arasındadır(18, 44).

Enfeksiyon kaynağının doku kisti olduğu durumlar; açık alanda organik olarak üretilen koyun, keçi, domuz gibi hayvanların yakınında en riskli grubun yaban hayvanlarının, et tüketiminin ve kesim işlemlerinin yapıldığı hallerdir. Doku kistleri 67 °C'de ısıtılmak ile ölmekte iken, -12 °C'de en az 3 gün beklemesi gerekmektedir. Doku kistleri buzdolabında 3 hafta, 60 °C'de 10 dakika, 50 °C'de 10 dakika, -6,7 °C'de 11 gün canlılığını korumakta olup, bu değerler doku kistinin içinde bulunduğu etin kalınlığına bağlı olarak da değişmektedir. Bu durumlarda alınacak önlemler arasında etlerin iyi

pişirilmesi, az pişmiş et yenmemesi, pişirme esnasında mikrodalga fırın kullanılmaması, etlerin buzdolabında -20°C 'de en az 15 gün bekletilmesi ve et kesim işlemlerinde kullanılan bıçakların iyi yıkanması sıralanabilir (45).

2.2.AŞI ÇALIŞMALARI

Toxoplasma gondii'nin oluşturduğu tablonun ciddiyeti, seroprevalansının yüksek oluşu, hem sağlık açısından, hem de ekonomik açıdan kayıplara yol açması nedeniyle parazitin oluşturduğu hastalıkların tedavisi önem arz etmektedir. Kullanılan ilaçların hem maliyet hem de yan etkisi, klinik tablonun ciddiyeti, tedavideki yetersizlikler nedeniyle günümüzde kullanılan ilaçların tedavide eksik kaldığı görülmektedir. Bu sebeple günümüzde aşı çalışmalarına hız verilmiştir.

Toxoplasma gondii'nin farklı hayat evrelerindeki değişik antijenik yapılardan kaynaklanan nedenlerle aşı çalışmalarında bazı zorluklar yaşanmaktadır. Antijenik yapıdaki çeşitlilik, parazitin farklı hayat dönemleri ve konak farklılıkları aşı çalışmaları sırasında karşılaşılan zorluklardandır. İnsanlarda canlı ve atenué aşıların kullanımında bazı yan etkiler ve etik problemler olurken, hayvanlarda canlı ve atenué aşıların kullanımı günümüzde mevcuttur (46).

Aşı çalışmalarında hedef olarak parazitin hayat döngüsünde görülen özellikle 3 farklı dönem üzerinde durulmuştur. İnsanlarda enfeksiyonun önlenmesi, klinik semptomların giderilmesi, kedilerde ookist oluşumunun engellenmesi, hayvanlarda doku kistlerinin oluşumunun engellenerek insana geçişin azaltılması hedeflenen amaçlar arasında gösterilmektedir (47).

Kedilerde ookist atılımını önlemek için yapılan aşı çalışmalarının büyük bir kısmı canlı aşılarından oluşmaktadır. Canlı aşıların ise bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu dezavantajlar arasında aşıların canlı olduğu için sınırlı raf ömrü olması ve enfeksiyonu kendimizin oluşturma ihtimalidir. Koyunlar için geliştirilen ve canlı bir aşı olan Toxovax, *T.gondii*'nin S48 suşu ile hazırlanmıştır. Koyunlarda bu aşının kullanımının doku kisti oluşumunu azalttığı görülmüştür. Her ne kadar koyunlar için geliştirilmiş olsa da kedilerde kullanıldığında *T.gondii*'nin kedideki eşeyli üremesini inhibe ettiği görülmüştür (48).

Bu konuda yapılan başka bir canlı mutant aşı ise; *T.gondii*'nin T-263 suşu ile hazırlanan aşıdır. Yapılan alan çalışmaları domuz çiftliklerinde yürütülmüştür. Domuz çiftliklerinde yaşayan kediler toplanıp, aşılandıktan sonra serbest bırakılmıştır. Daha sonra domuzlardan alınan serum örneklerinde *T.gondii* seroprevalansının düşük olduğu görülmüştür. Bu çalışma ile; çevrenin ookistlerle kontaminasyonunun azaltılmasının domuzlarda enfeksiyon riskinin azalması anlamına geldiği sonucuna varılmıştır (48).

Kedilerde kullanılan aşı türlerinde, *T.gondii* suşları radyoaktif yöntemlerle, kimyasal ajanlarla, rekombinant antijenler ile veya yeni bir sistem olan feline herpes virüs type 1 aracılığı ile verilmiştir. Kullanılan bütün yöntemlerde kedilerde belli bir seviyede immunité oluşmuştur. Fakat bu yaklaşımın insanlarda uygulanması uygun bulunmamıştır (47-50).

İnsanlarda DNA aşılarının canlı bakteriyel komponentlerle birlikte kullanılması etik açıdan tartışma oluşturmaktadır. Buna rağmen bu tip aşılarla ilgili çalışmalar günümüzde sürdürülmektedir. Gebeler için geliştirilen bir stratejide, gebe kalmadan önce anne adaylarının aşılınması ve gebeliğin sonuna kadarki sürede *T.gondii*'ye karşı koruyucu bir immunité gelişmesini amaçlamıştır. Bunun için hücre içermeyen fakat *T.gondii*'nin sekrete ettiği antijenik proteinlerin ekzosomlar aracılığı ile verilmesi denenmiştir. Bu metodun farelerde işe yaradığı görülmüş ve insanlar içinde bir umut olabileceği düşünülmüştür. Ekzosomların bunu hangi mekanizma ile yaptığı hala tam olarak açıklanamamıştır. Bu konuda daha çok sayıda ve ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Profilaktik aşı ile; insan enfeksiyonunu önlemesi, en azından klinik tablo oluşturacak hastalıkları azaltabilmesi, hayvanlardaki enfeksiyonu önleyerek insanlara geçişin azaltılması, kedilerdeki zoonotik döngüyü engelleyerek çevreye yayılan ookistlerin azaltılması amaçlanmıştır (49).

İmmün sağlıklı bireyler enfeksiyonu geçirmeleri halinde ömür boyu bağışıklık oluşmaktadır. Konjenital bulaşmanın söz konusu olduğu durumlarda enfeksiyonun oluşturduğu klinik tablo ilerleyici karakterdedir. Bu durum doğumdan hemen sonra olduğu gibi bazen yıllar sonra da oluşabilmektedir. Böylesi durumlarda en çok hasar retinada meydana gelir. Konjenital enfeksiyonun hamilelik sürecinde ilk kez enfekte

olan anne adayından bebeğe geçtiği zannedilirdi. Fakat nadir de olsa kronik enfeksiyonlu gebelerden de bebeğe enfeksiyonun geçtiğini gösteren kanıtlar bulunmaktadır (46). Çalışmalar toplumdaki genel popülasyonun %0,1'den daha azının konjenital olarak enfekte olduğunu göstermiştir (47).

Toxoplasma gondii'ye karşı oluşan koruyucu immunitede, var olan ve oluşan $CD4^+$ T-lenfosit, sitotoksik $CD8^+$ T-lenfositlerin rolü olduğu tespit edilmiştir. $CD4^+$ T-lenfosit ve sitotoksik $CD8^+$ T-lenfositleri birbirine sinerjik etki gösterdiği, $CD4^+$ T-lenfositlerin Th1 sitokinler aracılığıyla sitotoksik $CD8^+$ T-lenfositlerinin faaliyetlerini düzenlediği gösterilmiştir. Anti $CD4^+$, anti $CD8^+$ antikorlarının *T.gondii*'ye karşı oluşmuş direnci zayıflattığı, bu durumun *T.gondii*'ye karşı oluşmuş immunitenin $CD4^+$ ve sitotoksik $CD8^+$ T-lenfositleri ile oluştuğunun bir göstergesi olmuştur (51, 52).

DNA aşılarının kuvvetli bir sitotoksik T hücre yanıtı oluşturduğu bilinmektedir. Akut enfeksiyonda ve aşılama ile gelişen immunitede $CD4^+$ T-lenfositlerin rolü olduğu, kist oluşumunun engellenmesinde ve immun cevabın devamlılığında ise sitotoksik $CD8^+$ T-lenfositlerinin görev aldığı bilinmektedir (52, 53).

Protein aşılarında B hücre cevabının indüklendiği gösterilmiştir. DNA aşılarının ise kuvvetli bir $CD8^+$ T-lenfosit yanıtını uyardığı, bunu yaparken de Th1 yanıtını kullandığı bilinmektedir (7).

Toxoplasma gondii'ye yönelik aşı adaylarının büyük bir kısmı, adezyon ve invazyonda görevli olan moleküller hedef alınarak geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu hedef moleküller salgısal ve yüzey proteinlerdir. Bu sebeptendir ki, adezyonda ilk salınan proteinlerden olan ve parazitin apikal kısmında bulunun bir organel olan mikronemlerden salınan MIC proteinleri, hedef moleküller arasında yoğun olarak çalışılan bir grubu oluşturmaktadır. *T.gondii* ekstraktlarından hazırlanan mikronem proteinleriyle yapılan çalışmalarda sıçan ve farelerde yüksek oranda sağ kalım görülürken, beyinlerinde oluşan doku kisti miktarında da büyük oranda azalma olduğu tespit edilmiştir (54).

Yoğun olarak çalışılan bir diğer hedef molekül SAG1 antijenidir. SAG1 antijeni toplam takizoit proteinlerinin %5'lik kısmını oluşturmaktadır. SAG1, *T.gondii* ile konak hücre

birleşmesi esnasında temas edilen bölgeden hücre dışına doğru salınmaktadır. SAG1'in farklı adjuvanlarla kombine edilerek uygulanan aşı çalışmalarında farelerde yüksek oranda sağ kalım ve beyin parazit yükünde azalmalar olduğu tespit edilmiştir (55).

Başka bir antijen olan GRA ve ROP'lar ile yapılan çalışmalarda da *T.gondii*'ye karşı gelişen immun yanıt oluşturduğu ve bu oluşan immun yanıtın enfeksiyona karşı kısmi koruma sağladığı görülmüştür (56).

Efektif bir rekombinant aşı hem seksüel hem de aseksüel döngüye etkili olabilmeli ve *T.gondii*'nin her üç hayat evresinde de etkili olabilmelidir.

Hayvanlarda oluşan kist formunu önlemek amacıyla hedef alınan bölge beyin olmalıdır. Beyin doku kistlerini önlemek için yapılacak çalışmalarda kullanılacak ajanların beyinde çözünen tipte olması ve bunun da oral yoldan uygulanması gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda; en az iki farklı *T.gondii* izolatının kullanılması ve çalışmanın paralel yapılması, *T.gondii*'ye karşı oluşmuş immunitenin etkinliğinden bahsedebilmemiz için oluşan immunitenin genotip2 dışında kalan izolatlarda da etkili olabilmesi gerekmektedir. İmmünizasyon işleminde kullanılacak fareler tercihen BALB/c, C57BL/6 veya C3H/HeN olmalıdır. Bu farelerin dışında aşının insan için etkili olup olmadığını anlamak için outbred fareler kullanılmalıdır. Zira, bu fareler genetik yapı olarak insan genetiği ile benzerlik taşımaktadır (47).

2.3.ADJUVANLAR

Aşılamada amaç, enfeksiyon ve/veya hastalığa karşı etkin patojen spesifik immun yanıtın uyarılması ve bu yanıtın uzun süreli olmasıdır. Bu, çoğu zaman istenildiği ölçüde başarılamamaktadır. Özellikle kompleks hayat döngüsüne sahip sıtma etkeni *Plasmodium*'lar ve büyük vücut yapılı *F.hepatica* gibi helmintlere karşı aşı çalışmalarında istenilen başarılar elde edilememiştir. Pek çok viral etkene karşı ticari aşı olmasına karşın bugün insanlara uygulanabilen parazitlere karşı etkin bir ticari aşı bulunmamaktadır. Bu nedenle, aşı etkinliğini arttırmak için çeşitli arayışlar içerisine girilmiştir. Yaklaşık yüz yıl önce aşı formüllerine ilave edilen ve “adjuvant” olarak adlandırılan alüminyum tuzları bu konuda önemli bir kilometre taşı olmuştur. 1920 yılında Gaslon Ramon tarafından adjuvant özelliği olan maddelerin keşfedilmesinden

sonra Glenny tarafından veteriner difteri aşısı kombinasyonunda alüminyum tuzları kullanılmıştır. Freund adjuvantının insanlarda reaksiyon vermesi yeni arayışlara yol açmış ve yeni nesil adjuvantlar oluşturularak 20 yıldır kullanılmıştır. Son yıllarda aşısı teknolojisindeki gelişmelerle DNA aşısı ve canlı vektör aşısının kullanımına ilaveten adjuvant kullanımı açısından da gelişmeler olmuştur. Adjuvantların yan etkileri düşük seviyelerde olması yanında stabil, kullanımı kolay ve enjeksiyona uygun olması gerekmektedir. Hem antijen spesifik bağışık yanıtı güçlendirmek hem de optimal tipte immunité uyarımıyla koruma sağlamak için gerekli olan adjuvantlar özetle üç grupta incelenebilmektedir(57).

Klasik adjuvantlar	Yeni nesil adjuvantlar	Adjuvant sistemleri
Alüminyum Tuzları	Toll-like reseptör agonistleri	Klasik+Yeni nesil
Emülsiyonlar	Saponinler	
Lipozom ve virozomlar	İmmün stimüle edici kompleksler	

Geleneksel adjuvantlar çoğunlukla karmaşıktırlar. Bu konuda en iyi tanımlananlar; yüzey-aktif bileşikler, mikrobiyal bileşenler ve/veya çeşitli polimerler ile lipidlerdir.

2.3.1. Alüminyum Tuzları

Alüminyum tuzları 80 yıldan daha uzun süredir aşılarda yaygın bir şekilde adjuvant olarak kullanılmakla birlikte etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (58). Daha önceleri alüminyum tuzlarının enjeksiyon bölgesinde (antijen ısırası) depo formasyonu (depot formation) şeklinde etki gösterdiği ve antijen sunan hücreler (ASH)'in o bölgeye migrasyonunu ve alımını arttırdığı düşünülmekteydi. Yapılan çalışmalar neticesinde alüminyum tuzlarında absorbe edilen antijenlerin multivalent formda sunuldukları ve bunun antijenlerin ASH'lerde daha etkili şekilde internalize olmalarını sağladığı öne sürülmüştür (59). Üstelik daha son zamanlarda alüminyum tuzlarının, pro-imflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β ve IL-18 gibi) üretim ve salınmasında öncül olan “inflammasom” kompleksini (PRR'lerin Nod benzeri ailesinin bir üyesi) aktive ettiği gösterilmiştir. Th-1 tipi cevapta sınırlı etkileri olan alüminyum tuzları, Th-2 antikor cevabında birinci derecede rol oynamaktadır (60). Bu tür adjuvantların kullanıldığı aşılara örnek olarak; Hepatit A aşısı, Hepatit B aşısı, insan

papillomavirus aşıları, *Sreptococcus pneumoniae* aşısı ve pediatrik difteri, tetanos ve pertussis (DTaP) aşıları verilebilir (57).

2.3.2.Emülsiyonlar (MF59)

Önceleri water-in-oil emülsiyon (w/o) adjuvantların (Freud'un incomplete/complete) insanlarda çok reaktogenik olması nedeniyle kullanımına son verilmiştir. Sonraki aşılar da w/o emülsiyonların daha yüksek saflıktaki yeni versiyonları kullanılmıştır. Bunlardan biri Mountainide emülsiyonlarıdır ve klinik denemelerde önemli sonuçlar alınmıştır. Bu adjuvantlar; prostat kanseri, ovaryum kanseri ve non-small-cell akciğer kanseri aşılarında kullanılmıştır (61-63). W/o emülsiyonlarına ek olarak, o/w (oil-in-water) emülsiyonları da geliştirilmiştir. O/w emülsiyonlarının etki mekanizması tam olarak anlaşılmamakla birlikte doğuştan gelen inflamatuvar cevaplarla ilgili olduğuna, ASH'lerin oluşumu ve aktivasyonunu, enjeksiyon bölgesinde antijen varlığının devam ettirilmesi ve immun-komponent hücrelere sunulması ve sitokinlere farklı materyallerin teminini sağladığına inanılmaktadır (58). Reaktogenik özelliğe sahip o/w emülsiyonlar, w/o emülsiyonlarla karşılaştırıldıklarında; lisanslı aşılar da daha başarılı olarak kullanılmışlardır. Bir o/w emülsiyonu olan MF59 adjuvantı, mevsimsel influenza aşısında kullanılmaktadır. MF59 Th2 aracılığıyla humoral cevabı stimüle etmektedir (64).

2.3.3. Lipozom ve virozomlar

Lipozomlar klasik adjuvantların üçüncü tipi olan sentetik nanoküreciklerdir. Antijenleri çevreleyen lipid katmanlar taşırlar ve antijen sunum görevi yaparlar. Lipozomlar aktif olmamalarına rağmen, ana fonksiyonlarının antijen sunumu olduğu düşünülmektedir. Lipozom içermeyen fakat virozom içeren ve influenza virüslerinin boş zarflarını taşıyan lisanslı ürünler lipozomları örnek almaktadır. Fonksiyonel viral zarf glikoproteinleri hücrenin uyarılmasını ve antijenin membrandan hedef hücrelere füzyonunu sağlamaktadır. Hepatit A ve influenza aşılarında virozomlar adjuvant olarak kullanılmaktadır. Tüm yaş gruplarında güvenle kullanılabilen influenza aşısındaki virozomların iyi tolere edildiği ve ileri derecede immunojenik olduğu bildirilmiştir (65, 66).

2.3.4. Toll-like reseptör agonistleri

Toll-like reseptörler (TLR) immun sistem tarafından patojene ait moleküler yapıların tanımlanmasında kullanılmaktadır. TLR'lerin keşfi ile; doğuştan ve kazanılmış bağışık yanıt arasındaki ilişkinin tanımlanmasıyla paralel yeni nesil adjuvantların/immun uyarıcıların (immunoenhancer) gelişimi sağlanmıştır. Immunoenhancerlar adjuvant fonksiyonlarını monositler, makrofajlar ve dendritik hücrelerde olduğu gibi direkt stimülasyon yoluyla göstermektedirler.

Önemli immunostimulatörlerden biri ve TLR-4 agonisti MPL, *Salmonella minnesota* bakterisinin ana lipopolisakkaritinin (LPS) kimyasal detoksifike edilmiş formudur. MPL, TLR-4'e bağlanma yeteneğine sahiptir ve doğuştan gelen immun hücrelere LPS'nin mekanizmasıyla aynı şekilde etki etmektedir. MPL, yardımcı stimulatör moleküllerin ve sitokin salınımını stimule etmekte ve böylece kaliteli ve kantitatif olarak hem humoral hem de hücrel bağışıklıkta antijene bağlı immun yanıtı arttırmaktadır (67-69).

Diğer Toll-like reseptör agonistleri arasında mikrobiyal DNA'nın immunostimulatör sequences (ISS)'leri yer almaktadır. Aynı zamanda ISS taşıyan bileşiklerin iyi tolere edilebildiğinin de bulunması bu konudaki çalışmalarının artışına sebep olmuştur. TLR'ler tarafından tanınan ISS'ler doğuştan gelen immun yanıtı izleyen adaptif immun yanıtın amfilikasyonunu sağlamaktadırlar. Biyolojik aktivitesi olmayan ISS'lerin kullanımının aşı antijenlerine karşı humoral ve hücrel immun yanıtı arttırdığı gösterilmiştir. Bu durum kanser ve alerji aşılarda olduğu gibi, enfeksiyon hastalıklarına karşı kullanılan çeşitli aday aşılarda (Hepatit B, Sıtma, HPV ve HIV gibi) gözlemlenmiştir. TLR-9'un agonisti ve pre-inflamatuar sitokinlerin uyarıcısı olan CpG DNA, şu anda kanser terapisinde kullanılan ISS'lere bir örnektir. Ön klinik çalışmalarda; CpG'lerin Th-1 immunitesini ve sitotoksik T lenfositlerinin yanıtını artırma yeteneğinde olduğu gösterilmiştir (70).

TLR-7 ve TLR-8'e bağlı imidazoquininler de aday adjuvantlar arasındadır. Bu sentetik organik bileşikler (Imiquimod ve resiquimod gibi), RNA bağlanmasındaki aynı immun yanıtı indükleyerek güçlü anti-viral aktivite gösterirken, bunu doğal TLR reseptör ligandlarını taklit ederek yapmaktadırlar. Imidazoquininler, HIV gibi viral enfeksiyonlara karşı T hücre cevabının gösterilmesini sağlamış ve farelerde antiviral immunitayı arttırmışlardır (71, 72).

2.3.5.Saponinler (Quil A)

Aşı adjuvantı olarak geliştirilmeye çalışılan bitkisel kökenli en önemli madde; doğal saponin olan Quil A'dır. Quil A, Güney Amerika'da bir ağaç olan *Quillaja saponaria*'dan ekstrakte edilmiş ve ilk olarak veteriner aşılarda kullanılmıştır (73). Ancak, insanlardaki reaktogenik etkisinden dolayı kullanımına izin verilmemiştir. Quil A'nın QS21 denilen pürifiye edilmiş bir parçası güçlü bir adjuvant özelliği gösterdiği ve hayvan modellerinde hem Th1 hem de Th2 sitokin salınmasını uyardığı bildirilmiştir (74)

2.3.6.İmmun stimüle edici kompleksler

ISCOMs lipidler, kolesterol, antijen ve Quil-A'dan oluşan kafes benzeri bir komplekstir. Bu adjuvantın fonksiyonu; hidrofobik etkileşimler, protein antijeni yakalamak ve endositoz yoluyla ASH tarafından tutulmasını sağlamaktır. ISCOMATRIX, ISCOM'ların ticari olarak bulunan diğer bir versiyonudur. Esas olarak ISCOM'ların yapısına benzemekle birlikte antijenle incorpore değildir. ISCOMATRIX son yıllarda HCV, influenza ve kansere karşı aşı adayı olarak kullanılmıştır (75). Adjuvant sistemleri, birden fazla adjuvantın antijenle kombine edilmesiyle oluşturulmuş sistemlerdir. Bunlar doğuştan immün cevabın sonradan kazılan immün cevabı modüle etme yaklaşımına dayanmaktadır. Bu amaçla; MPL, QS21 gibi adjuvantlar klasik adjuvantlarla (alüminyum tuzları emülsiyonlar ve lipozomlar) kombine edilmişlerdir. Bu şekilde oluşturulmuş AS01, AS02, AS03, AS04 ve AS15 başta sıtma olmak üzere; tüberküloz, H5N1, mevsimsel influenza, hepatit B, Human papillomavirus, Herpes simplex virüs, kanser immunoterapisi ve melanomada kullanılmaktadır (76).

2.4.TOXOPLASMA GONDII YÜZEY ANTİJENLERİ

Toxoplasma gondii bradizoit ve takizoitlerinin glikosilfosfatidilinositol (GPI) ile ilgili antijenlerle kaplı olduğu tespit edilmiştir. Bu antijenlerinden en önemlisi SAG antijenidir. Bu yüzey molekülleri konak hücrenin adezyonu ve invazyonu esnasında görev alırlar. *T.gondii* patogenezinin anlaşılabilmesi için bu yüzey moleküllerinin tanımlanması gerekmektedir. Tanı kitlerinde ve aşı çalışmalarında ve hedef molekül olarak bu proteinlerden bazıları yoğun olarak kullanılmıştır (77) (Tablo 2.2.).

Tablo 2.2. Takizoit ve bradizoitte bulunan *T.gondii* yüzey antijenlerinin gen ve proteinleri (78).

Gen	Aminoasit sayısı	Protein	Takizoit	Bradizoit	GenBANK
SAG1	319	P30	+	-	X14080
SRS1	420		+	-	U77677
SRS2	372		+	-	AF012276
SRS3	345	P35	+	-	AF012275
SRS4	396		Bilinmiyor	Bilinmiyor	AF078678
SRS5	NA ^C		-	-	AF233651
SRS6	393		Bilinmiyor	Bilinmiyor	AF233650
SRS7	Bilinmiyor		Bilinmiyor	Bilinmiyor	AF335545
SRS8	Bilinmiyor		Bilinmiyor	Bilinmiyor	AF335546
BSR4	398	P36	-	+	AF015290
SAG2A	186	P22	+	-	M33572
SAG2B	190		+	Bilinmiyor	AF108751
SAG2C	365		-	+	AF108752
SAG2D	373		-	+	AF108753
SAG2E	340		Bilinmiyor	Bilinmiyor	AF312720
SAG3	385	P43	+	+	L21720
SAG4A	172	P18	-	+	Z693373
SAG4B	180		Bilinmiyor	Bilinmiyor	AF015715
SAG5A	362		-	+	AF013968
SAG5B	367		+	-	AF017268
SAG5C	367		+	-	U64517

2.5.ADEZYON MOLEKÜLLERİ VE MIKRONEM PROTEİNLER

Toxoplasma gondii gelişmiş, kompleks, iyi koordine edilmiş bir sisteme sahiptir. *T.gondii*, veziküllerden salınan sekretuar proteinlerin, içinde bulunduğu duruma göre salınım sırasını ve çeşidini düzenlemektedir. Bu sekretuar maddeleri adezyon esnasında immun regülasyon mekanizmaları, gliding motility, protein ihtiyacı, besin gereksinimi için kullanırken, konak hücre içi invazyondan sonra da hayatta kalma, çoğalma fonksiyonlarının devamı ve sonunda da hücreyi parçalamak için kullanmaktadır. Elektron mikroskobunda *T.gondii*'nin hücreye invazyon süreci tam olarak izlenip kayıt edilmiş olup, bu invazyon mekanizmanın diğer intrasellüler patojenlerden farklı olduğu gözlenmiştir. Birçok intrasellüler patojen fagositoz ile pasif olarak hücre içine alınırken, *T.gondii* hücre içine aktin ve miyozin birimlerinin kullanıldığı enerji bağımlı bir mekanizma olan, gliding motility aktivitesiyle gerçekleşen aktif bir mekanizma ile hücre içine girmektedir (79-83). Adezyon ve invazyon mekanizmalarının gerçekleşme süreci, farklı organellerden spesifik zamanlarda salınan maddelerin fonksiyonuna bağlı olarak gerçekleşmektedir. Bu organeller arasında Mikroneme (MIC), Rhoptry (ROP) ve Yoğun Granül Antijeni (GRA) bulunmaktadır (84). Bu organeller arasında bulunan mikronemlerden salınan mikronem proteinler *T.gondii*'nin konak hücreyi tanınmasında, adezyonunda ve invazyonunda görev alan temel proteinlerdir. *T.gondii* ve konak hücre arasında oluşan temasın erken dönemlerinde MIC'ler takizoitin apeksinden salınan ilk proteindir. Bu sekretuar proteinler konak hücre membranında bulunan reseptörlerin tanınması yoluyla adezyonu kolaylaştırırlar (6). Böylece konak hücreye invazyonun erken döneminde anahtar bir rol üstlenirler. 2015 yılı itibariyle tespit edilen 19 adet Mikronem protein bilinmektedir (7) (Tablo 2.3.).

Tablo 2.3. *Toxoplasma gondii* mikronem proteinlerinin özellikleri (7).

MIKRONEM PROTEİNLERİ	MOLEKÜLER AĞIRLIKLARI (kDa)	DOMAİNLERİ	ÖNEMLİ GÖREVİ
MIC3	38	1 CBL ve 5 EGF	Adezyon
MIC8	75	1 CBL, 10 EGF-like ve 1 TM	Eşlik eden protein
TLN4	256		Bilinmiyor
PLP1	124		Sitoliz
SPATR	47	1 Trombomodulin, EGF	Protein yönlendirilmesi
ROM1	28	Rhomboid	Proteoliz
SUB1	85	Subtilaz ve GPI	Proteoliz
M2AP	35	Beta ve coil	Transport ve katlanma
AMA1	60	Sistein zengin bölge	Rhoptrilerden sekresyonların inhibisyonu
MIC12	234	31 EGF, 4 TSR ve 1 transmembran	Bilinmiyor
MIC11	22		Bilinmiyor
MIC10	23		Bilinmiyor
MIC9	32	3 EGF ve 1 Transmembran	Bilinmiyor
MIC7	36	5 EGF-like ve 1 Transmembran	Bilinmiyor
MIC6	37	3 EGF -like	Eşlik eden protein
MIC5	20	Parvulin-like	Sub1'in baskılanması
MIC4	63	6 Apples	Adezyon
MIC2	83	1 Integrin, 5 TSRS	Transport ve adezyon
MIC1	49	2 TSRS	Transport ve katlanma

Şimdiye kadar tespit edilen 19 mikronem proteinden 10'u (MIC1, MIC2, MIC3, MIC4, MIC6, MIC7, MIC8, MIC9, MIC12, SPATR) ökaryotik hücrelerde de bulunan adezyon moleküllerine benzer yapılar olan; integrin like domain, trombospodin type1 repeat

(TSR), epidermal growth factor (EGF)-like domain, chitin binding-like (CBL) domain ve apple domain adlı birbirinden farklı domain bölgeleri bulunmaktadır. Bu proteinler, parazitin konak hücreyi tanınması ve adezyonu sürecinde rol alırlar (85).

2.6.MIC3'ÜN MOLEKÜLER YAPISI

MIC3 çok çeşitli konak hücre reseptörlerine bağlanabilmekte, bunu da yapısında bulundurduğu yapısal ligand domain bölgeleri sayesinde gerçekleştirmektedir. Bu sayede parazitin virulansında önemli bir rol üstlenmektedir. MIC3 takizoit, bradizoit ve sporozoitlerin her üçünde de bulunduğu için önemli bir immun etki oluşturmaktadır. Bu sebeptendir ki, MIC3 serolojik ve moleküler yöntemlerin kullanıldığı aşı çalışmalarında yoğun ilgi çekmiştir (85-105).

MIC3 geni, 1080 bp uzunluğunda olup 359, aminoasitlik bir protein yapısındadır. Ağırlığı 38 kDa'dır. MIC3, single copy gene denilen intron içermeyen bölgelerden oluşmuştur. Ökaryotik hücrelerde DNA'nın 5' ucunda, promotor bölge denilen kısımda TATA, CCAAT dizileri bulunmaktadır. Bu yapılar herhangi bir aminoasit (aa) kodlamamaktadır. Bu yapılardan hiçbiri MIC3'te bulunmayıp ATG ile başlayan kodon ile devam etmekte ve 359 aa. kodlamaktadır. Bu aminoasitler 34 adet sistein rezidüsü içermektedir. N terminal ucunda hidrofobik signal peptidi içermektedir. N terminal ucu transmembran protein domain bölgeleri içermemektedir. Bir adet potansiyel glikolizasyon alanı, 12 adet fosforilasyon alanı bulunmaktadır. *T.gondii*'nin farklı suşlarında bile MIC3'ün aminoasit sekans benzerliği %98,3'ten fazla olduğu görülmüştür. Bu durum diğer apicomlexan parazitlerde oldukça düşüktür. MIC3'ün yapısında 5 adet kısmi olarak çakışan EGF-like domain bulunmaktadır. Bunlardan 3'ü ardışık olarak tekrar eden kısım, diğer 2'si ise ardışık tekrar eden kısımlarla çakışan domain bölgelerinden oluşmaktadır. Çakışan bu kısımların bazıları CBL domain bölgeleri ile de çakışmaktadır (91). CBL domain bölgesi protein-protein ve protein-karbonhidrat etkileşimleri içermektedir.

MIC3, 90-kDa ağırlığındaki bir dimerin içinde bulunan 40-kDa ağırlığındaki bir prekürsörün proteolitik sindirimi sonucu oluşan 38-kDa ağırlığındaki bir monomerdir. Bu spesifik yapı MIC3'ün fonksiyonuyla yakından ilişkilidir. Dimer yapısı adezyon fonksiyonu için son derece önemli ve gerekli bir yapıdır (7).

EGF-like domain bölgesi birçok proteinde bulunmaktadır. Bu proteinler, membran bağlı proteinlerin veya sekrete edilen proteinlerin ekstrasellüler kısmında dağılmış halde bulunurlar (7). Bunların fonksiyonu günümüzde tam olarak anlaşılamamıştır.

Mikronem proteinleri sekresyon, salınım ve transport aşamalarında birbirleri ile ilişki içindedirler ve bu aşamalarda kompleks yapılar oluşturabilmektedirler. Şimdilerde MICs kompleks olarak bilinen yapılar;

MIC1/4/6 kompleks,

MIC3/8 kompleks,

MIC2/M2AP kompleks,

AMA1/RON2/RON4/RON5/RON8 dir.

Bu kompleks yapılardan en az biri sitoplazmik kuyruk ve transmembran domain bölgeleri içermektedir. Sitoplazmik kuyrukta bulunan sorting signal denilen bir sınıflama sinyali içermektedir. Mevcut sorting signal endoplazmik retikulumda oluşan kompleks proteinin transportu esnasında görev almaktadır. Oluşan bu protein yapısı escorter olarak adlandırılmıştır (6, 106). Bu yapı ise bir transmembran protein içinde yer alır. Örneğin MIC3/8 kompleksinde MIC8 escorter olarak görev yapmaktadır ve MIC3, MIC8'in eşliğinde uygun mikronemlere ulaşmaktadır. Uygun yerlerine ulaşan bu mikronem proteinler konak hücrenin adezyon ve invazyonu esnasında parazitin dış yüzeyine salınmaktadır (91). Bu proteinler çözülebilir yapıdadır. Kompleks proteinlerden herhangi birinde oluşabilecek hasar diğer yapıların da tam fonksiyon yapamamasıyla sonuçlanacaktır. Oluşan bu kompleks proteinlerin işlev görebilmesi için doğru katlanmış olması gerekmektedir. Aksi halde oluşan kompleks zarar görür. Buna örnek; MIC1'in partneri MIC4 ve MIC6 dır. MIC1'in yapısında bozulma meydana gelirse MIC4 ve MIC6'nın golgi kompleksinde biriktiği görülmüştür. Başka bir örnekte *T.gondii*'nin m2ap geni knock out yapıldığında, MIC2'nin golgi kompleksinde biriktiği ve MIC ekspresyon seviyelerinin önemli ölçüde düştüğü görülmüştür (94, 106). Bu kompleks yapıların birbiriyle etkileşimleri çok önemli olmakla birlikte bazı istisnai durumlar da vardır. Örneğin, *T.gondii*'nin MIC3 geni knock out edildiğinde MIC8'in mikronemlere transportu ve sekresyonlarının etkilenmediği görülmüştür (89).

2.7. MIC SEKRESYONLARININ DÜZENLENME MEKANİZMASI

Mikronemler *T.gondii*'nin apikal uçuunda yer alan, sekresyon yapmakla görevli organellerdir. MIC'ler granüllü endoplazmik retikulumda sentez edilip golgi aparatı yoluyla Mikronem organeline transportu sağlandıktan sonra, konak hücre ile temas anında hücre yüzeyine sekrete edilir. Genel olarak kabul edilen görüş *T.gondii*'nin MIC'lerinden sekrete edilen proteinlerin salınımındaki düzenleme sadece parazitin intrasellüler kalsiyum iyonu artışı ile düzenlenmekte olduğudur (107). Normal şartlarda *T.gondii* takizoitleri çok az miktarda MIC sekrete ederler. İntrasellüler kalsiyum seviyesindeki artış neticesinde çok az sekrete edilen proteinler normalin 10 katı bazı durumlarda 100 katına kadar ulaştığı görülmüştür (108). Kalsiyum iyon seviyesindeki dengesizlikler sekresyonların azalmasını tetiklemektedir.

İntrasellüler kalsiyum miktarını nötralize eden bazı ajanların kullanılmasının mikronemlerden salınan MIC sekresyonunu güçlü bir biçimde inhibe ettiği görülmüştür. Parazitin intrasellüler bölgesindeki küçük bir kalsiyum iyon artışı mikronemlerden MIC'lerin salınımına neden olur. Bu olayın meydana gelmesi için yüksek miktarda kalsiyuma gereksinin duyulmamaktadır. MIC seviyelerinin araştırılmasına dayalı olarak gerçekleştirilen bir çalışmada; 2 tip mikronemin olduğu tespit edilmiştir. Bunlardan birincisi; küçük miktarlarda bile intrasellüler kalsiyum iyon artışından etkilenen ve bu değişikliğe hızlıca cevap veren, neticesinde de MIC sekresyonunun artışı ile sonuçlanan mikronemlerdir. İkincisi ise; sekresyonların sürekli olarak bazal bir seviyede devam ettiği mikronemlerdir (109). Günümüze kadar tespit edilen bu 2 tip mikronemin dışında da farklı mikronemlerin olup olmadığını belirlemek için geniş ve ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu, bu konuda çalışan insanların ortak fikridir (7).

2.8. MIC3 PROTEİNLERİN KATLANMASI VE HİDROLİZİ

Yeni sentezlenen proteinlerin fonksiyon kazabilmesi için bazı yapısal değişikliklere ihtiyaç vardır. Bu yapısal değişikliklerin meydana geldiği organel *T.gondii* için endoplazmik retikulumdur. Yeni sentezlenen mikronem proteinleri salınmadan önce bir dizi katlanmaya ve konformasyonel değişikliğe ihtiyaç duyarlar. Bu değişikliklere uğramayan, hatalı katlanan veya eksik katlanan proteinler endoplazmik retikulumdan

salınmayıp hücre içinde birikmeye başlar ve sonunda bu biriken hatalı proteinler hücre içi enzimler yardımı ile degrade olurlar (6, 106, 110-112).

Chaperonlar ve protein katlanmasında görevli olan bazı enzimler endoplazmik retikulumda bulunmaktadır. Bu enzimler proteinlerin doğru katlanmasında ve immatür proteinlerin bir araya getirilmesinde görev alırlar (112).

Endoplazmik retikulumda, hatalı veya eksik katlanan immatür proteinleri tanıma işlevi farklı katlanma sensörleri sayesinde gerçekleşir. Hatalı katlanan proteinlerin yüzeyinde bulunan N-glycanlar, endoplazmik retikulumda bulunan calretikulin ve calnexin tarafından tanınıp yıkıma uğratılırlar (113).

Hatalı katlanan proteinleri tanımada kullanılan bir başka tanıma mekanizması da thiol bağımlı protein tanıma sistemidir. Hatalı veya eksik katlanan proteinlerde bazı sistein rezidüleri bulunur. Bu sistein rezidülerini de endoplazmik retikulum membranında bulunan thiol oksidoredüktazlar sayesinde tanınıp parçalanırlar (113).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.MATERYAL

Tez ile ilgili olarak çalışmaya başlamadan önce konu ile literatür taraması yapıldı. Tez çalışması için kullanılacak makine, teçhizat ve sarf malzemeler tespit edildi. Çalışma için uygun altyapı şartları sağlandı. Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından onaylandıktan sonra Erciyes Üniversitesi ÖYP Kurum Koordinatörlüğü'nün desteklemesi ile başladı.

3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Yapılan bu tez çalışmasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarında aşağıda listesi verilen cihaz ve malzemeler kullanılmıştır. (Tablo 3.1. ve Tablo 3.2.).

Tablo 3.1. Tez çalışması için kullanılan cihazlar.

Cihaz/Adı
Santrifüj aleti (Hettich 32R, Germany)
Chemidoc Mp Jel görüntüleme cihazı (Bio-Rad ,ABD)
Güç kaynağı (Bio-Rad ,ABD)
Vorteks Bencmixer (Bencmark ,ABD)
PCR cihazı (Sensoquest, Almanya)
Spectrometre nanodrop 2000c (thermo scientific, ABD)
Su banyosu Jeio tech BS-06 (Jeiotech, Kore)
İnkübatörlü shaker Jeio tech SI-300 (Jeiotech, Kore)
PCR cihazı T100 (Bio-Rad, ABD)
Kuru Isı Blogu, Digital heat blog (Bencmark ,ABD)
Mikrodalga fırın, MD 554 (Arçelik, Türkiye)
Manyetik karıştırıcı, MK 418 (Nüve, Türkiye)
-20 Derin dondurucu (Siemens, Germany)
-80 Derin Dondurucu (Panasonic, Japonya)
+4 buzdolabı (Uğur, Türkiye)
Yatay elektroforez cihazı (Bio-Rad ,ABD)

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan malzemeler

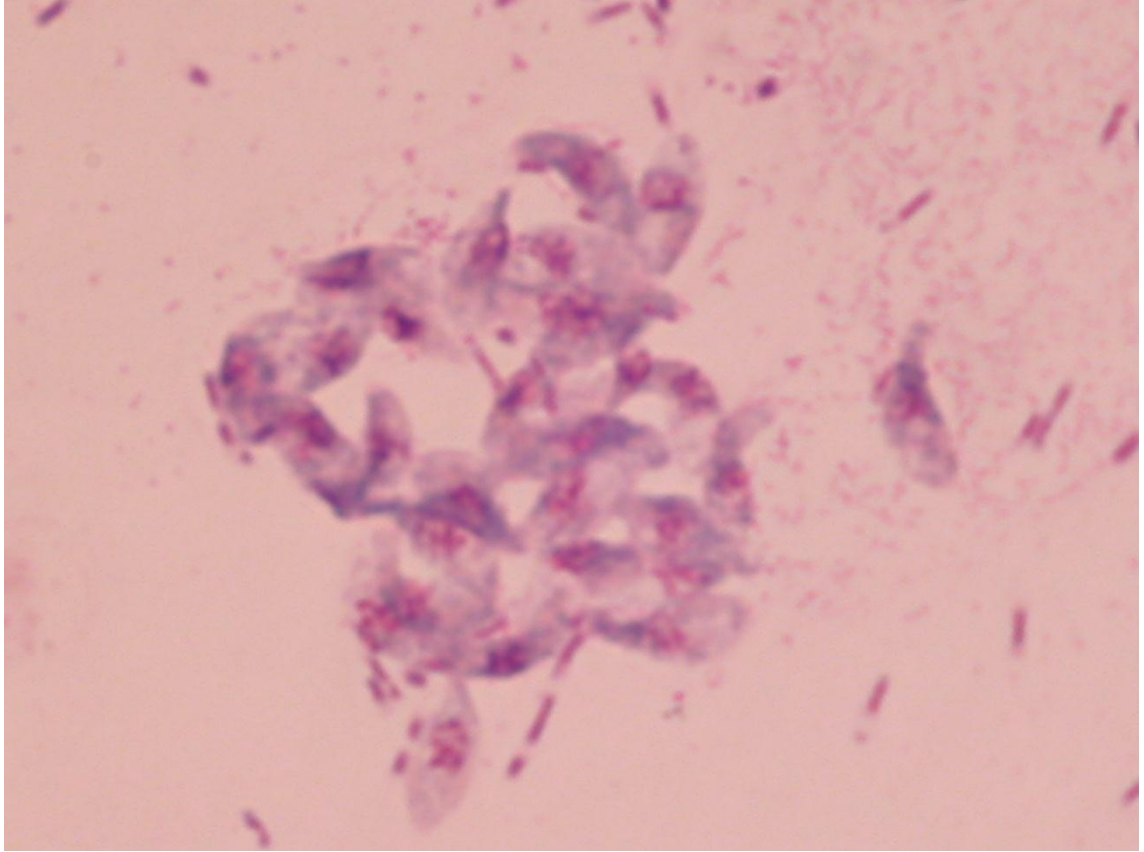
Tanımı/Adı
<i>Toxoplasma gondii</i> takizoitleri
NNN besiyeri
RPMI-1640 Medium
LB katı besiyeri
SOC sıvı besi yeri
LB sıvı besiyeri
Ampisilinli LB besiyeri
Penicillin-Streptomycin100X Solution (5000 units) (Invitrogen, ABD)
25 cm ³ culture flask
QIAamp tissue kit (QIAGEN, ABD)
TgMIC3 F: (5'-GAA CCA TGC GAG GCG -3')
TgMIC3 R:(5'-CTG CTT AAT TTT CTC ACA CG -3')
Agaroz jel
100 bp Marker (SolisBioDyneFIREPol, Estonya)
PCR master mix (SolisBioDyneFIREPol, Estonya)
500 bp Marker (SolisBioDyneFIREPol, Estonya)
pcDNA3,1 His TOPO Expression Kit (Invitrogen, ABD)
OneShot TOP10 ChemicallyCompetent <i>E.coli</i> hücreleri (Invitrogen, ABD)
Wizard gel clean up (Promega, ABD)

3.2. METOD

3.2.1. Total Genomik DNA İzolasyonu

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'ndan alınan fare periton sıvısı örneğinden bir kısım alınıp santrifüj edilerek pellet kısmından bir miktar lam üzerine yayılmış ve Giemsa ile boyanarak içindeki *Toxoplasma gondii* takizoitleri mikroskop altında görüntülenmiştir. (Şekil 3.1.)

Fare peritonunda pasajı yapıp üretilmiş *T.gondii* (Ankara suşu) takizoitleri bir tüp içerisinde laboratuvarımıza getirilmiş ve total genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla QIAamp Tissue Kit (QIAGEN, ABD) test prosedürüne göre kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Mikroskop altında görüntülenen *T.gondii* takizoitleri (100×)

Fare periton boşluğunda üretilip uygun şartlarda transferi yapılarak laboratuvarımıza getirilen *Toxoplasma gondii* takizoitleri Thoma lamında sayılmış ve μl 'de yaklaşık 100 adet *Toxoplasma gondii* takizoitleri bulunduğu tespit edilmiştir. Takizoitlerin bulunduğu sıvıdan 500 μl 'lik örnek alınmış ve üzerine 500 μl ATL buffer eklenmiştir. Bu karışımın homojenizasyonu sağlanıp santrifüj edildi. Santrifüjden sonra oluşan iki fazın üst sıvı kısmı alındıktan sonra kit prosedürüne uygun olarak DNA izolasyonuna başlandı.

Örnekten total genomik DNA'nın elde edilmesi için öncelikle RNA'dan arındırılması gerekmektedir. Bu işlem için öncelikle 4 μl RNase (100mg/ml) 1.5 ml. lik tüpe eklendi. 15 saniye vortekslendikten sonra 2 dk. oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 8000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edilen tüpün üzerine 200 μl AL Buffer eklendikten sonra yaklaşık 15 saniye vortekslendi. Daha sonra mevcut tüp 70 °C'de 10 dk. inkübasyona bırakıldı ve sonrasında 15 saniye vortekslendi. Vortekslenen tüpe 200 μl %100 etanol eklenerek 15 saniye daha vortekslendi. Tüp içeriği kısa süren bir santrifüj işleminden sonra filtrasyon kolonuna aktarıldı. 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj işleminden sonra filtrasyon kolonu başka bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve dip

kısımındaki süzüntü atıldı. Filtrasyon kolonu üzerine 500 µl AW1 buffer eklendikten sonra 8.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Tüpün dibine çöken süzüntü atıldı ve filtrasyon kolonu yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Filtrasyon kolonunun üstüne 500 µl AW2 buffer eklendikten sonra 14.000 rpm'de 3 dk. santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra tüpün dip kısmına çöken süzüntü atılarak filtrasyon kolonu yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Filtrasyon kolonunun içinde bulunduğu bu yeni tüp 14.000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edilerek geriye kalan rezidüdeki AW2 buffer filtrasyon kolonundan elimine edildi. Filtrasyon kolonu koleksiyon tüpüne aktarıldıktan sonra üzerine 200 µl AE buffer eklendi. Oda sıcaklığında 1 dk. bekletildikten sonra 8.000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edildi. En son yapılan basamak 1 kez daha tekrarlandıktan sonra tüpün dip kısmına çöken süzüntü içerisindeki total genomik DNA örneği PCR işlemi için -20 °C'de saklandı.

3.2.2. *Toxoplasma gondii* MIC3 Gen Primerleri ve PCR

PCR reaksiyonu için kullanılan primerler aşağıda gösterilmiştir:

TgMIC3 F: (5'-GAA CCA TGC GAG GCG -3')

TgMIC3 R:(5'-CTG CTT AAT TTT CTC ACA CG -3')

PCR reaksiyonunda; 12,5 µl'si Master mix (SolisBioDyne FIREPol, Estonya), 2 µl'si genomik DNA, 1 µl'si TgMIC3 F (20 pmol) ve 1µl'si TgMIC3 R (20 pmol) primeri olmak üzere toplam 25 µl'lik karışım hazırlandı. 95 °C de 5 dk.'lık ön ısıtma sonrası sırasıyla 94 °C de 1 dk. denatürasyon, 55 °C de 1.30 dk. bağlanma, 72 °C de 2 dk. uzamadan oluşan 35 döngü sonrası 72 °C'de 30 dk.'lık son uzama ile biten PCR programı kullanıldı. PCR ürünü, etidyum bromidle boyanmış %1.5'luk agaroz jelde 120V'da 400 mA'de 45 dk. elektroforez edildi ve Gel Logic 212 Pro Jel (Carestream, ABD) ve Bio-Rad chemidoc Mp Jel (ABD) görüntüleme cihazlarıyla görüntülendi.

3.2.3. PCR Ürününün Agaroz Jelden Saflaştırılması

Elektroforez sonrası oluşan non-spesifik bantların yok edilmesi, istenilen PCR ürününün saflaştırılması amacıyla Wizard gel clean up (Promega, ABD) kiti kullanıldı. Kit prosedürüne göre elektroforez sonrası agaroz jelde istenilen 1080 baz

büyükluğündeki kısım jelden bistüri yardımı ile kesilerek 1.5ml mikrosantrifüj tüpü içerisine konulup hassas terazi ile tartıldı. Her 10 miligram jel için 10 µl membran bağlama solüsyonu eklenerek vortekslendi. Jel tamamen çözünene kadar 65 °C’de kuru ısı bloğunda inkübe edildi. Karışım kit içerinden çıkan mini column içerisine aktarıldı. Mini column da collection tüpüne yerleştirildi. Bir dk. oda sıcaklığında bekletildi. 16.000 g’de 1dk. santrifüj edildikten sonra, collection tüp atılarak minicolumn yeni collection tüpüne yerleştirildi. Minicolumn üzerine 700 µl yıkama solüsyonu eklendi. 16.000 g’de 1dk. santrifüj edildikten sonra collection tüp atılarak minicolumn yeni collection tüpüne yerleştirildi. Minicolumn üzerine 500µl yıkama solüsyonu eklendi. 16.000 g’de 5dk. santrifüj edildi. Yıkama basamaklarından sonra kalan resüdü etanolü uzaklaştırmak için mikrosantrifüj tüpü kapağı açık bir şekilde 1 dk. santrifüj edildi. Minicolumn steril 1.5 ml mikrosantrifüj tüpü içerisine yerleştirildi. Minicolumn üzerine kit içerisinden çıkan elüsyon solüsyonundan 50 µl eklendi. Oda sıcaklığında 1 dk. inkübe edildikten sonra 16.000 g’de 1dk. santrifüj edildi. Minicolumn içindeki örneğin 1.5ml mikrosantrifüj tüpüne geçmesi sağlandı. Minicolumn atılarak örnek -20 °C’de saklandı.

3.2.4.MIC3 Geninin pcDNA3.1 Plazmitine Yerleştirilmesi

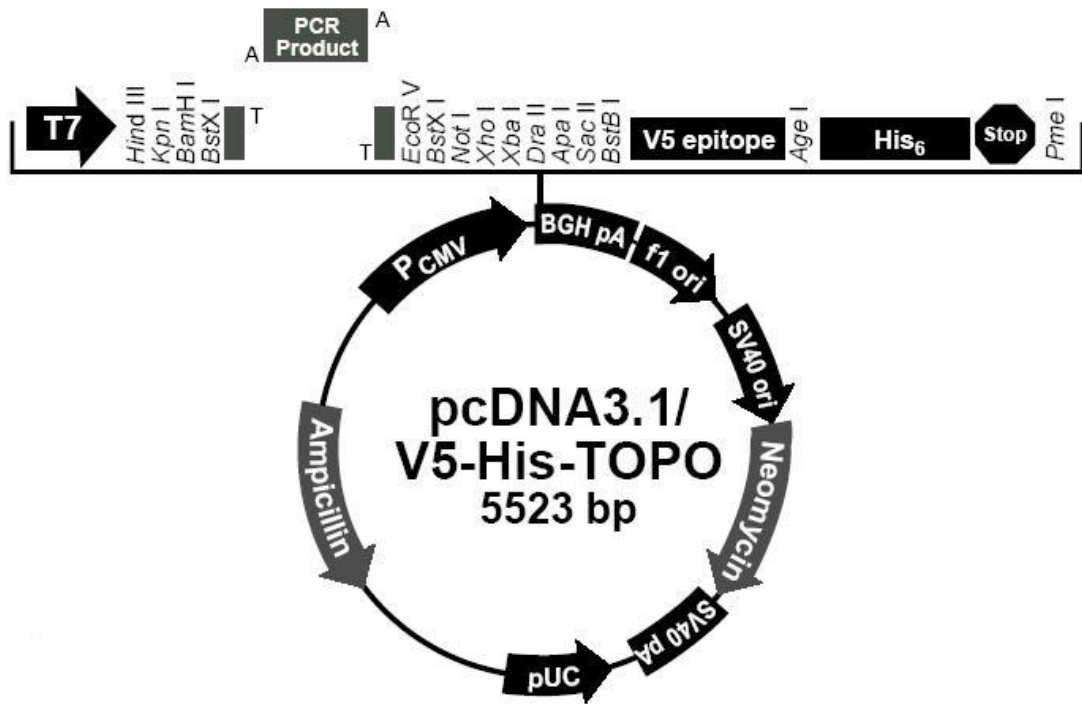
PCR ürününü DNA aşısı için kullanılacak pcDNA3.1 (invitrogen) vektörüne yerleştirilmiştir.

Bunun için: PCR ürününden 1 µl, TOPO vektörden 1 µl kullanılarak toplam miktar distile su ile 5 µl’ye tamamlandı (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. pcDNA3.1 klonlama reaksiyonu

	Miktar
PCR ürünü	1 µl
Tuz solüsyonu	1 µl
Steril su	2 µl
TOPO vektör	1 µl
Toplam	5 µl

Elde edilen karışım oda sıcaklığında (22-23 °C) 30 dk. inkübe edildi. 5 µl'lik ligasyon ürünü buzlu suda bekletilen 100 µl TOP10 *E.coli* kompetan hücrelerine (Invitrogen, ABD) eklenerek 30 dk buz üzerinde inkübe edildi. Karışım sırasıyla 42 °C'de 1 dk ve buzlu suda 10 dk bekletildikten sonra üzerine 250 µl S.O.C. besiyeri (Invitrogen, ABD) eklendi. 200 rpm 37 °C'de sallayıcı üzerinde 1.5 saat inkübe edilen transformasyon karışımı LB katı besiyerine ekilerek bir gece inkübe edildi.



Şekil 3.2. pcDNA3.1 Vektör Haritası

3.2.5.Rekombinant Plazmitin Kompetan *E.coli* Hücrelerine Transformasyonu

Transformasyon için 5 µl'lik ligasyon ürünü, buzlu suda bekletilen 100 µl OneShot TOP10 Chemically Competent *E.coli* hücrelerine (Invitrogen, ABD) eklendi ve buzlu suda 30 dk. inkübe edildi. Karışım 42 °C'de 1 dk. bekletildikten sonra tekrar buzlu suya alınarak burada 1 dk. bekletilip rekombinant plazmitin transformasyonu sağlandı. Daha sonra üzerine 37 °C'ye ısıtılmış 250 µl SOC sıvı besiyeri eklendi. Elde edilen karışımı 37 °C'de çalkalayıcı üzerinde 1.5 saat inkübe edildi. Transformasyon ürünü LB katı besiyere ekilerek 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. LB katı besiyerinde koloni gelişimi gözlemlendikten sonra besiyerdeki koloniler numaralandırılarak yeni bir besiyerine aktarıldı. Besiyeri 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.

3.2.6. Klonlamanın Doğrulanması

3.2.6.1. PCR Tarama ile Doğrulama

Katı besiyerine ekim sonucu oluşan kolonilerin rekombinant plazmit içerip içermediğini belirlemek amacıyla PCR tarama yapıldı. Katı besiyerinde oluşan 12 koloniden 4 adeti seçilerek PCR tarama için her biri 5 µl Master mix (SolisBioDyneFIREPol, Estonya), 1 µl TgMIC3 F ve 1 µl TgMIC3 R primeri içeren karışım bulunan numaralandırılmış PCR tüplerine steril pipet ucu yardımıyla konularak PCR içeriği hazırlandı. Hazırlanan karışımlar üzerine distile su ekleyerek 25 µl'ye tamamlandı. Bölüm 3.2.3 deki protokol kullanılarak PCR yapıldı. PCR ürünü, etidyum bromidle boyanmış %1,5'luk agaroz jelde yürütüldü ve Gel Logic 212 Pro Jel görüntüleme cihazı (Carestream, ABD) ve Bio-Rad chemidoc Mp Jel görüntüleme cihazı (ABD) ile görüntülendi.

3.2.6.2. Miniprep ve PCR ile Doğrulama

Rekombinant plazmitin kolonilerdeki varlığını gösterebilmek için miniprep yapıldı. Daha sonra miniprep ürününden PCR kuruldu. Bu işlem için High Pure Plazmit Isolation Kit'i (Roche Applied Science, Almanya) kullanıldı. PCR tarama ile rekombinant plazmitin pozitif tespit edildiği koloniler 5 ml'lik ampisilinli LB sıvı besiyerlerine ekilerek 37 °C'de bir gece çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. Bu işlem sonrasında mevcut tüpler 8000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edildi. İki faza ayrılan tüplerin sıvı üst kısımları ayrıldıktan sonra dipte kalan pellet üzerine 250 µl suspension buffer/RNase ve 250 µl lysis buffer ilave edildi. Nazikçe karıştırılarak oda sıcaklığında 5 dk. inkübe edildi. İnkübe edilen karışımın üzerine 350 µl soğuk binding buffer eklendikten sonra buzlu su içerisinde 5 dk. inkübasyona bırakıldı. Yapılan bu işlemin ardından 13.000 rpm.'de 10 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan supernatant kısım kit içerisindeki filtrasyon kolonuna aktarıldı. Filtrasyon kolonu bir mikrosantrifüj tüpünün içine konulduktan sonra 13.000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüpün dip kısmında oluşan süzüntü atılıp filtrasyon kolonu yeni steril bir tüpe aktarıldı. Tüpün içinde bulunan filtrasyon kolonunun üzerine 500µl washing buffer I eklendikten sonra 1 dk. boyunca 13.000 rpm.'de santrifüj edildi ve tüpün dip kısmında kalan süzüntü atıldı. Filtrasyon kolonu yeni steril bir tüpe aktarıldı ve üzerine 700 µl washing buffer II konuldu. 1 dk. boyunca 13.000 rpm.'de santrifüj edilen tüpün dip

kısmına çöken süzöntü atıldıktan sonra filtrasyon kolonu yeni steril bir tüpe aktarıldı. Filtrasyon kolonunun üzerine 50 µl elution buffer eklendikten sonra 1 dk. boyunca 13.000 rpm.'de son bir kez santrifüj edilerek rekombinant plazmitin tüpün filtrasyon kolonundan ayrılarak dip kısma geçmesi sağlandı.

Miniprep yapılarak elde edilen rekombinant plazmit DNA, NanoDrop 2000c spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) ile ölçüldü. Miniprep ile elde edilen rekombinant plazmit DNA'nın 5'er µl'si alınıp etidyum bromidle boyanmış %1.5'luk agaroz jelde yürütüldükten sonra Gel Bio-Rad chemidoc Mp Jel görüntüleme cihazında (ABD) görüntülendi.

Görüntülenen rekombinant plazmitlerin MIC3 geninin bulunup bulunmadığını tespit etmek için daha önce kullanılan bölüm 3.2.3 deki protokol ile PCR yapıldı. PCR işlemi gerçekleştirilirken miniprep ürünü olan rekombinant plazmit template olarak kullanıldı. PCR ürünü, etidyum bromidle boyanmış %1,5'luk agaroz jelde yürütüldü ve Jel görüntüleme cihazında görüntülendi.

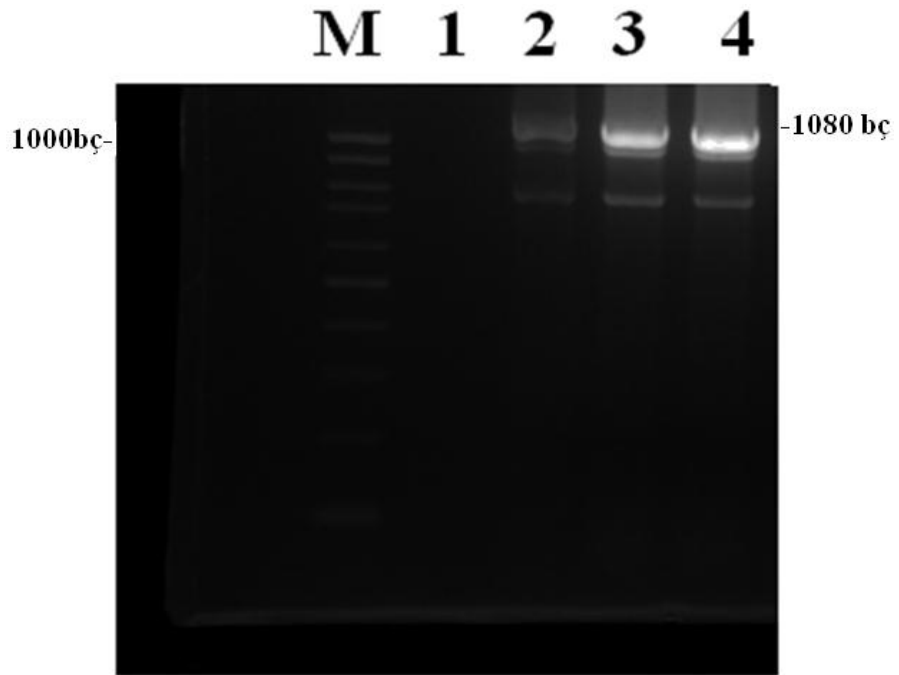
3.2.6.3. DNA Dizi Analizi ile Doğrulama

Saflaştırılan rekombinant plazmitlerdeki klonlanan genin varlığı ve dizisi, DNA dizi analizi ile doğrulandı. DNA dizi analizi için pcDNA3.1 Forward Sequencing Primer, (5'-GAA CCA TGC GAG GCG-3') pcDNA3.1 Reverse Sequencing Primer, (5'-CTG CTT AAT TTT CTC ACA CG -3') primerleri ve Bigdye Cycle Sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems, ABD) kullanıldı. PCR ürününe ait DNA dizi analizi, BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Sti. (Ankara) firmasına hizmet satın alma yolu yaptırıldı.

DNA dizi analizi sonucu Chromas v.1.45 (ConorMcCarty School of Science Griffith University, Australia) programı ile incelendikten sonra <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> internet adresinde yer alan web tabanlı BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programına girildi. Çalışmadan elde edilen DNA dizisi GenBANK veri tabanındaki mevcut *T.gondii* DNA dizileri ile karşılaştırıldı.

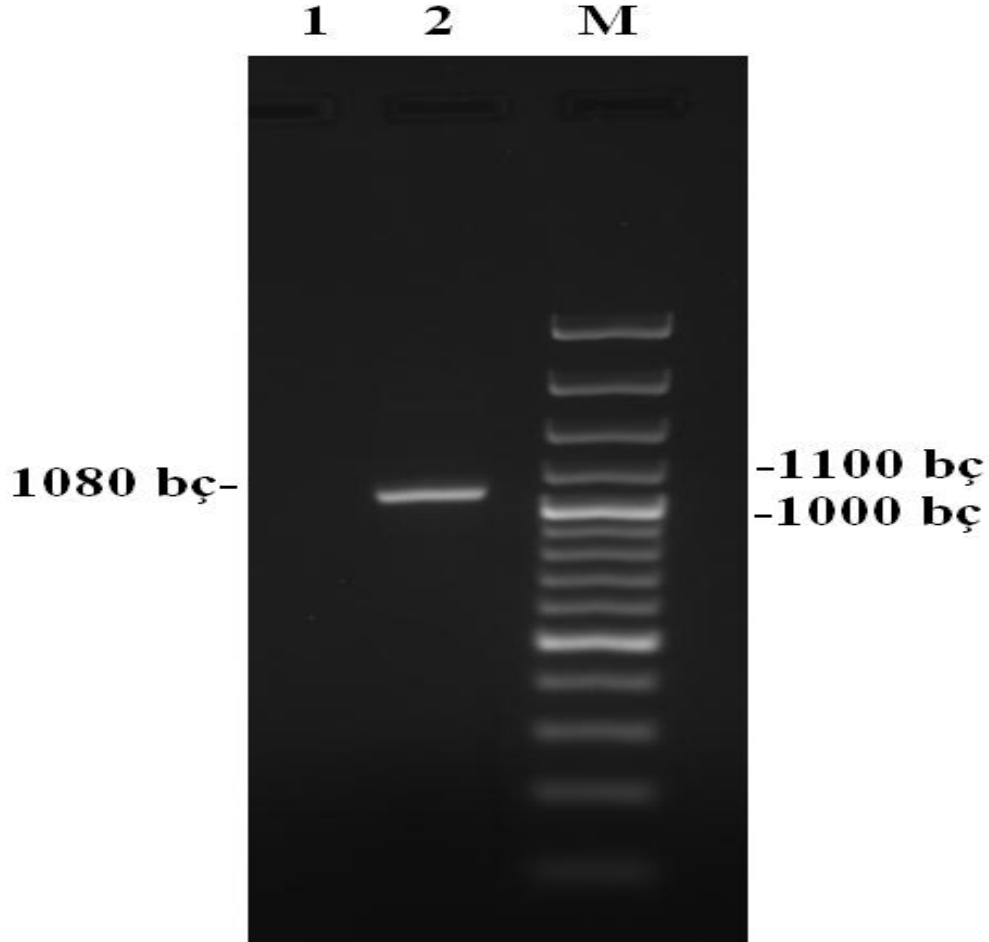
4. BULGULAR

Total genomik DNA izolasyonu *Toxoplasma gondii* takizoitlerinden, QIAamp tissue kit (QIAGEN, ABD) prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi. PCR için, total genomik DNA ve *T.gondii* MIC3 genine özel primerler dizayn edilerek kullanıldı. PCR işlemi sonrasında oluşan ürün, 100 bç'lik markerle (SolisBioDyneFIREPol, Estonya) beraber etidyum bromidle boyanmış %1.5'luk agaroz jelde 45 dk boyunca 120 voltta 400 mA'de yürütüldü ve 1080 baz çiftlik PCR ürünü Bio-Rad chemidoc Mp Jel (ABD) görüntüledi (Şekil 4.1.).



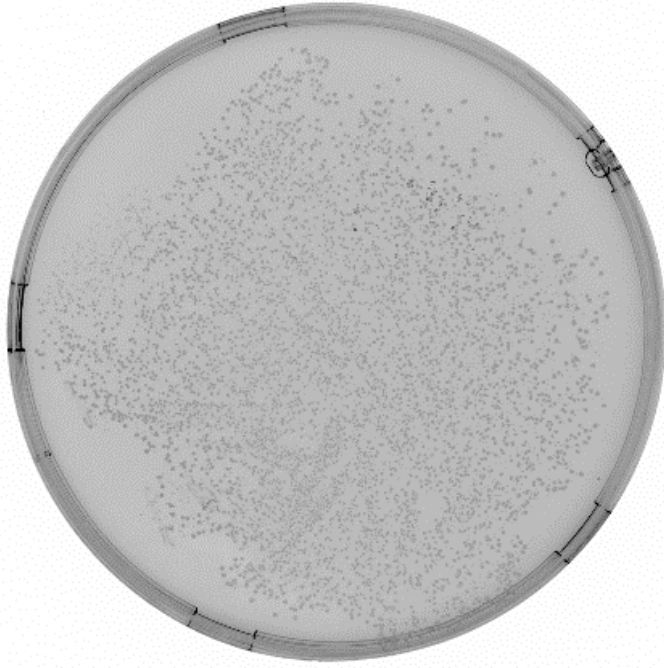
Şekil 4.1. *Toxoplasma gondii* 1080 bç uzunluğundaki PCR ürününün %1,5'luk agaroz jeldeki görüntüsü. M;100 bç Ladder , 1: Negatif kontrol, 2: gDNA miktarı 1µl, 3:gDNA miktarı 3µl, 4; gDNA miktarı 5µl

Elektroforez sonrası oluşan ince ve zayıf non-spesifik bantların yok edilmesi, istenilen PCR ürününün saflaştırılması amacıyla Wizard gel clean up (Promega, ABD) kiti kullanıldı. Oluşan non-spesifik bantlardan arındırılmış ürün elektroforezde yürütüldü (Şekil 4.2.)



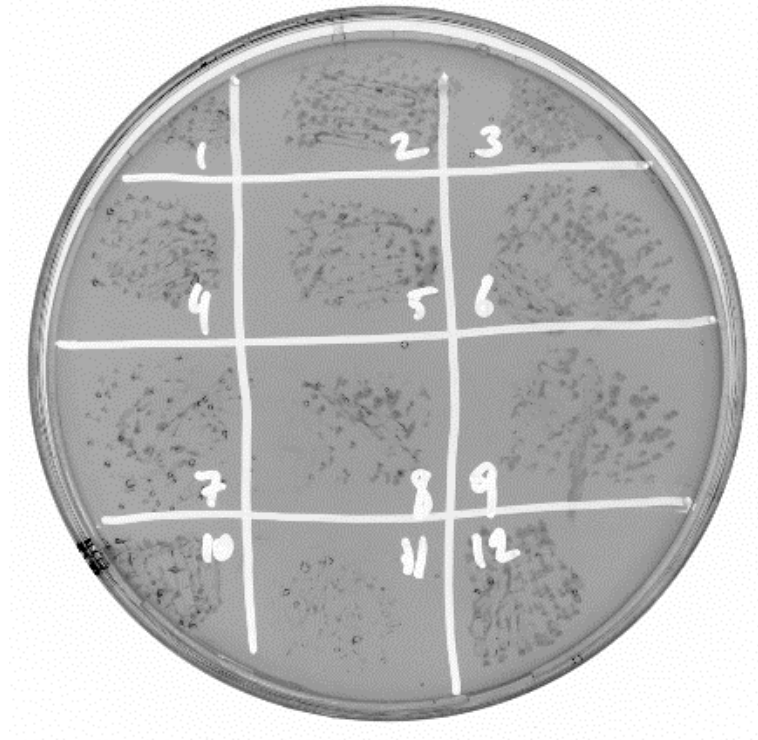
Şekil 4.2. *Toxoplasma gondii* 1080 bç uzunluğundaki Clean up PCR ürününün %1,5'luk agaroz jelde görüntülenmesi. 1: Negatif kontrol, 2: Clean up ürünü, M;100 bç Ladder.

1080 bç'lik PCR ürünü pcDNA3,1 His TOPO Expression Kit klonlama kiti kullanılarak pcDNA3.1 klonlama vektörüne yerleştirildi. Ligasyon ürünü OneShot TOP10 Chemically Competent *E.coli* kompetan hücrelerine transforme edildi. Bir gece inkübasyon sonrası oluşan koloniler tespit edildi (Şekil 4.3.).



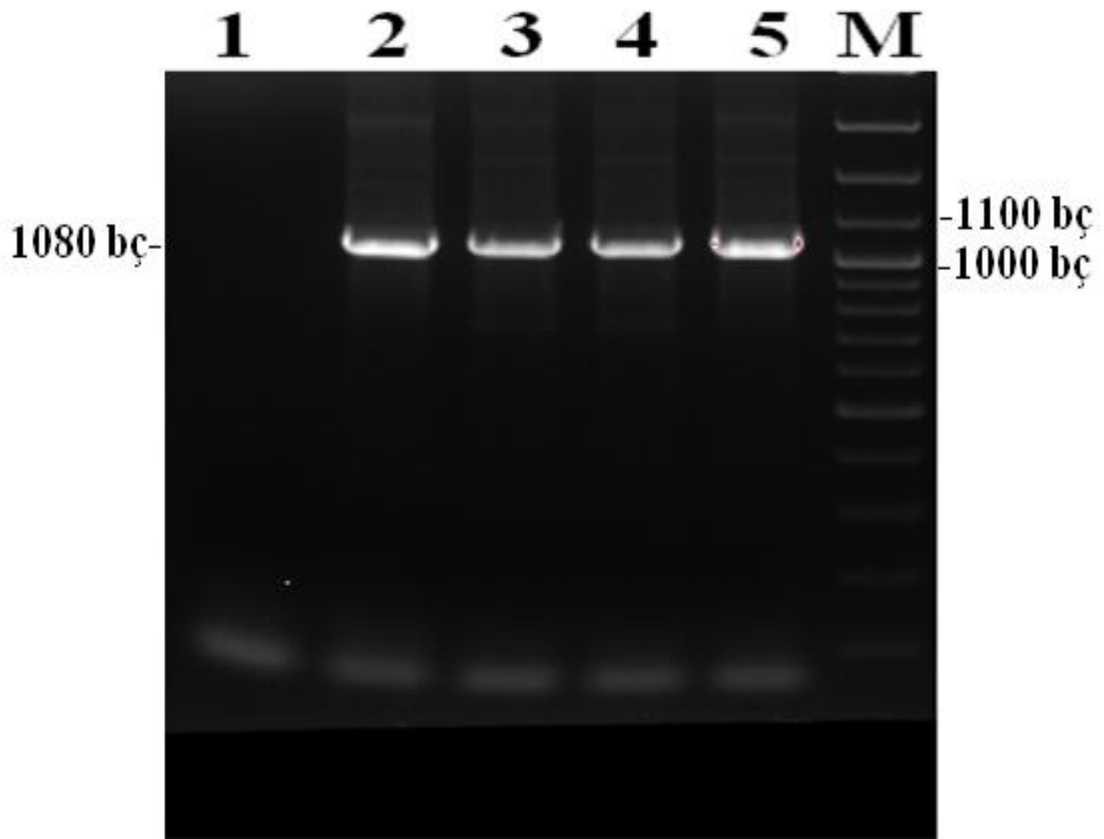
Şekil 4.3. Transformasyon işlemi sonunda üreyen koloniler

Transformasyon sonrası oluşan kolonilerden 12 farklı koloni seçilerek steril bir kürdan yardımıyla tek nokta ekimi yapıldı (Şekil 4.4.)



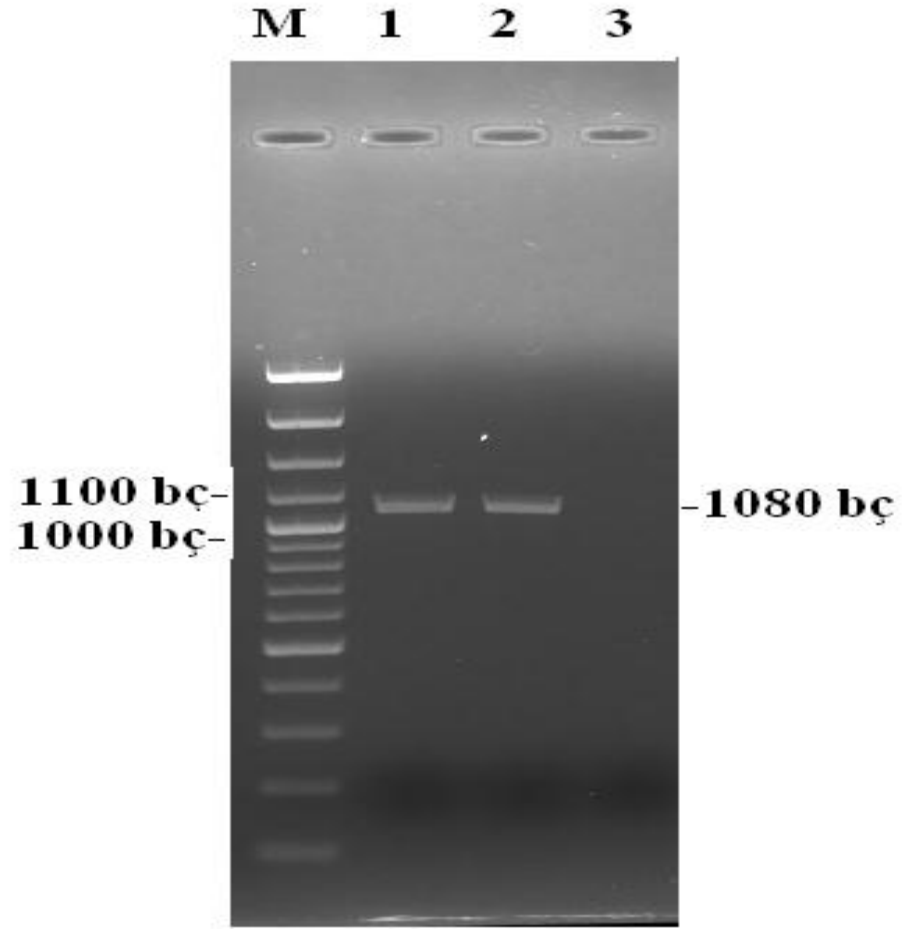
Şekil 4.4. Nokta ekim sonucu üreyen koloniler

Transformasyon işleminin ardından izlenen kolonilerin rekombinant plazmiti taşıyıp taşımadıklarını anlamak için PCR tarama yapıldı. Katı besiyerinden seçilen kolonilerin rekombinant plazmiti içerdiği PCR tarama ile 1080 baz çiftlik PCR ürünü gösterildi (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. PCR Screening ürünleri. 1; negatif kontrol 2-5; Sırasıyla 4., 6., 7. ve 9. kolonilerden hazırlanan PCR görüntüleri; M; 100 bp Ladder.

Rekombinant plazmitin mevcut olduğu tespit edilen iki koloniden miniprep yapılarak rekombinant plazmitler saflaştırıldı. Rekombinant plazmitin Tg MIC3 genini içerdiği PCR ile gösterildi. Miniprep ile saflaştırılan rekombinant plazmit, pcDNA3.1. Tg-MIC3 olarak isimlendirildi (Şekil 4.6.)



Şekil 4.6. M;100 bç Ladder, 1-2; Miniprep sonrası 1080 bç'lik *T.gondii* MIC3 Rekombinant plazmit ürünleri 3. Negatif Kontrol

Klonlamanın doğruluğunu kesinleştirmek için PCR ürününe ait DNA dizisi BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Sti. (Ankara) firmasına hizmet satın alma yolu ile yaptırıldı. (Tablo 4.1).

Tablo 4.1.DNA dizi analizi ile elde edilen *T.gondii* MIC3 genine ait DNA dizisi

1	10	20	30	40	50	60	70	80
ATGCGAGGCG	GGACGTCCGC	GCTGTTGCAC	GCGCTCACCT	TCAGTGGGGC	CGTGTGGATG	TGCACCCAG	CGGAGGCTTT	
90	100	110	120	130	140	150	160	
GCCGATTGAG	AAGTCTGTGC	AGCTGGGCAG	CTTTGACAAA	GTTGTGCCGA	GCCGCGAAGT	CGTCTCTGAG	AGTCTTGCTC	
170	180	190	200	210	220	230	240	
CGTCTTTTCG	GGTGAAGTGC	ACTCACTCGT	CTGTGCAATC	CCCCAGCAAG	CAGGAGACGC	AACTCTGTGC	TATCTCGAGT	
250	260	270	280	290	300	310	320	
GAAGGCAAGC	CATGTCGAAA	CCGTCAAGTTG	CACACTGACA	ACGGGTACTT	CATCGGGGCC	AGTTGCCCA	AGAGCGCTTG	
330	340	350	360	370	380	390	400	
CTGCAGCAAG	ACCATGTGCG	GCCCCGGCGG	CTGCGGAGAA	TTCTGCTCCA	GCAACTGGAT	TTTTTGCAGC	AGTTCGCTCA	
410	420	430	440	450	460	470	480	
TCTACCATCC	TGACAAAAGC	TATGGAGGAG	ACTGCAGCCG	TGAAAAGCAG	GGCCATCGGT	GCGACAAAAA	CGCAGAAATG	
490	500	510	520	530	540	550	560	
GTCGAAACT	TGGACGCGGG	TGGGGGTGTG	CACTGCAAGT	GCAAAGACGG	CTTCGTCGGC	ACTGGGTGTA	CTTGCTCCGA	
570	580	590	600	610	620	630	640	
GGATCCTTGT	TCAAAAAGAG	GGAACGCCAA	GTGCGGACCC	AACGGGACGT	GCATCGTCGT	CGATTGAGTC	AGCTACACAT	
650	660	670	680	690	700	710	720	
GCACCTGCGG	CGACGGCGAA	ACTCTAGAGA	ACCTCCCGGA	AGGGGGACAA	GGATGCAAGA	GGACTGGATG	TCATGCCTTC	
730	740	750	760	770	780	790	800	
AGGGAGAACT	GCAGCCCTGG	TAGATGTATT	GATGACGCCT	CGCATGAGAA	TGGCTACACC	TGCGAGTGCC	CCACAGGGTA	
810	820	830	840	850	860	870	880	
CTCAGTGAG	GTGACTTCCA	AGGCGGAGGA	GTCGTGTGTG	GAAGGAGTCG	AAGTCACGCT	GGCTGAGAAA	TGCGAGAAGG	
890	900	910	920	930	940	950	960	
AATTCGGCAT	CAGCGCGTCA	TCCTGCAAAAT	GCGATAACGG	ATACTCCGGA	TCTGCTTCCG	CAACCTCCCA	CCATGGGAAA	
970	980	990	1,000	1,010	1,020	1,030	1,040	
GGAGAATCGG	GGTCCGAGGG	GAGCTTGAGT	GAAAAAATGA	ATATTGTCTT	CAAGTGCCCC	AGTGGCTACC	ATCCAAGATA	
1,050	1,060	1,070	1,080					
CCATGCCAC	ACCGTGACGT	GTGAGAAAAT	TAAGCAGTGA					

DNA dizi analizi sonucu Chromas v.1.45 programı ile incelendikten sonra <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> internet adresinde yer alan web tabanlı BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programına girildi. (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. DNA dizi analizi ile elde edilen *T.gondii* MIC3 geninin kodladığı aminoasit dizisi

1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
ATGCGAGGCG	GGACGTCCGC	GCTGTTGCAC	GCGCTCACCT	TCAGTGGGGC	CGTGTGGAATG	TGCACCCCAAG	CGGAGGCTTT	GCCGATTACAG	
M R G	G T S A	L L H	A L T	F S G A	V W M	C T P	A E A L	P I Q	
100	110	120	130	140	150	160	170	180	
AAGTCTGTGC	AGCTGGGCAG	CTTTGACAAA	GTTGTGCCGA	GCCGCGAAGT	CGTCTCTGAG	AGTCTTGCTC	CGTCTTTCCG	GGTGACTGAG	
K S V	Q L G S	F D K	V V P	S R E V	V S E	S L A	P S F A	V T E	
190	200	210	220	230	240	250	260	270	
ACTCACTCGT	CTGTGCAATC	CCCCAGCAAG	CAGGAGACGC	AATCTGTGTC	TATCTCGAGT	GAAGGCAAGC	CATGTCGAAA	CCGTCAGTTG	
T H S	S V Q S	P S K	Q E T	Q L C A	I S S	E G K	P C R N	R Q L	
280	290	300	310	320	330	340	350	360	
CACACTGACA	ACGGGTACTT	CATCGGGGCC	AGTTGCCCCA	AGAGCGCTTG	CTGCAGCAAG	ACCATGTGCG	GCCCCGGCGG	CTGCGGAGAA	
H T D	N G Y F	I G A	S C P	K S A C	C S K	T M C	G P G G	C G E	
370	380	390	400	410	420	430	440	450	
TTCTGCTCCA	GCAACTGGAT	TTTTTGCAGC	AGTTCGCTCA	TCTACCATCC	TGACAAAAGC	TATGAGGAG	ACTGCAGCCG	TGAAAAGCAG	
F C S	S N W I	F C S	S S L	I Y H P	D K S	Y G G	D C S R	E K Q	
460	470	480	490	500	510	520	530	540	
GGCCATCGGT	GCGACAAAAA	CGCAGAATGC	GTCCGAAAAC	TGGACGCGGG	TGGGGGTGTG	CACTGCAAGT	GCAAGACCGG	CTTCGTCGGG	
G H R	C D K N	A E C	V E N	L D A G	G G V	H C K	C K D G	F V G	
550	560	570	580	590	600	610	620	630	
ACTGGGTTGA	CTTGCTCCGA	GGATCCTTGT	TCAAAAAGAG	GGAACGCGAA	GTGCGGACCC	AACGGGACGT	GCATCGTCGT	CGATTACGTC	
T G L	T C S E	D P C	S K R	G N A K	C G P	N G T	C I V V	D S V	
640	650	660	670	680	690	700	710	720	
AGCTACACAT	GCACCTGCGG	CGACGCGGAA	ACTCTAGAGA	ACCTCCCGGA	AGGGGGACAA	GGATGCAAGG	GGACTGGATG	TCATGCCTTC	
S Y T	C T C G	D G E	T L E	N L P E	G G Q	G C K	R T G C	H A F	
730	740	750	760	770	780	790	800	810	
AGGGAGAACT	GCAGCCCTGG	TAGATGTATT	GATGACGCCT	CGCATGAGAA	TGGCTACACC	TGCGAGTGCC	CCACAGGGTA	CTCACGTGAG	
R E N	C S P G	R C I	D D A	S H E N	G Y T	C E C	P T G Y	S R E	
820	830	840	850	860	870	880	890	900	
GTGACTTCCA	AGGCGGAGGA	GTCGTGTGTG	GAAGGAGTCG	AAGTCACGCT	GGCTGAGAAA	TGCGAGAAGG	AATTCGGCAT	CAGCGCGTCA	
V T S	K A E E	S C V	E G V	E V T L	A E K	C E K	E F G I	S A S	
910	920	930	940	950	960	970	980	990	
TCCTGCAAAAT	GCGATAACGG	ATACTCCGGA	TCTGCTTCCG	CAACCTCCCA	CCATGGGAAA	GGAGAATCGG	GGTCCGAGGG	GAGCTTGAGT	
S C K	C D N G	Y S G	S A S	A T S H	H G K	G E S	G S E G	S L S	
1,000	1,010	1,020	1,030	1,040	1,050	1,060	1,070	1,080	
GAAAAAATGA	ATATTGTCTT	CAAGTGCCCC	AGTGGCTACC	ATCCAAGATA	CCATGCCCCAC	ACCGTGACGT	GTGAGAAAAAT	TAAGCAGTGA	
E K M	N I V F	K C P	S G Y	H P R Y	H A H	T V T	C E K I	K Q *	

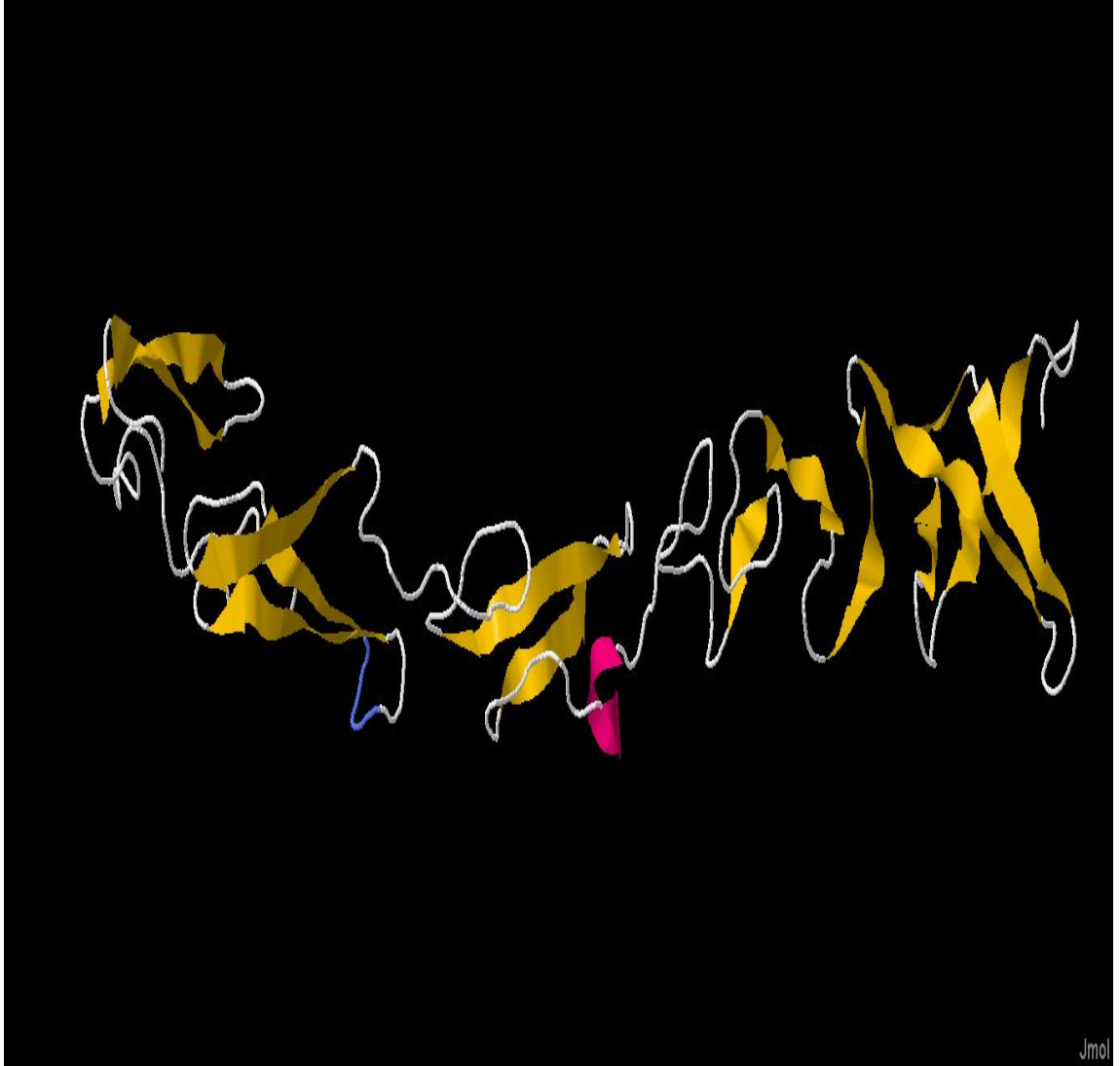
DNA dizi analizi sonucu Chromas v.1.45 programı ile incelendikten sonra <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> internet adresinde yer alan web tabanlı BLAST programına girildi. Çalışmadan elde edilen DNA dizisi GenBANK veri tabanındaki mevcut *T.gondii* DNA dizileri ile karşılaştırıldı (Tablo 4.3.). Sonuç olarak EU522718 ile ürünümüzün %100 benzer olduğu, GU121670 ve AJ132530 ile sırası ile %99.7 ve %99.4 oranında benzerlik gösterdiği tespit edildi.

Tablo 4.3. Çalışmadan elde edilen DNA dizisi GenBANK veri tabanındaki mevcut *T.gondii* DNA dizileri ile karşılaştırılması.

Consensus	1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100	ATGGGAGGCGGGACGTCGGGGTGTCACCGCTCACCTTCAGTGGGGCGGTGGATGTGACCCACGCGGAGGCTTGGCGATTCAGAACTCTGTGAGCTGGG
1. EU572718		
2. Sekans Sonuç		
Consensus	110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210	AGCTTTGACAAAGTGTGCGGAGCGGAACTGGTCTCTGAGAGTCTTCTCGGTCTTTGGGGTGACTGAGACTCACTGGTCTGTCAATCCCCAGCAAGCAGGAG
1. EU572718		
2. Sekans Sonuç		
Consensus	220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320	ACGCAACTCTGTCTATCTCGAGTGAAGGCAAGCCATGTGAAACCGTCAGTGCACACTGACAAAGGTTACTTCATCGGGGCCAGTTGCCCCAGAGCGGTGTGTGTG
1. EU572718		
2. Sekans Sonuç		
Consensus	330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430	AGCAAGACCATGTGGGCCCGGGGGCTGGGAGATTCTGGTCCAGCAACTGGATTCTTTGACAGCTTGGTCACTACCATCCAGCAAAAGCTATGGAGGAGAC
1. EU572718		
2. Sekans Sonuç		
Consensus	440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540	TGCAGCGGTGAAAGCAGGGCCATCGGTGGCAAAAAACCAAGATGGTGGAAACTTGGACGTGGGTGGGGGTGTGTCACTGCAAGTGCAAAGCAGGCTTGTGTGGG
1. EU572718		
2. Sekans Sonuç		
Consensus	550 560 570 580 590 600 610 620 630 640	ACTGGGTGACTTGTCTCGAGGATCCCTGTCTAAAAAGAGGAAAGCGAAGTGGGACCCAAACGGGACGTGCATCGTCTGTGATTCAGTCAGCTACACATGCACCTGC
1. EU572718		
2. Sekans Sonuç		
Consensus	650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750	GGCGAGCGCGAAACTCTAGAGAACCTCCCGAAGGGGGCAAGGATGCAAGAGGACTGGATGTCAATGCCCTCAGGGAGAACTGCAGCCCTGGTAGATGTATTGAAGAC
1. EU572718		
2. Sekans Sonuç		
Consensus	760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860	GCTTCGCATGAGAAATGGGTACACCTGCGAGTGGCCCAAGGGTACTCACTGAGGTGACTTCCAAGCGGAGGAGTGGTGTGGAAAGATCGAAGTCAAGCTGGCT
1. EU572718		
2. Sekans Sonuç		
Consensus	870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970	GAGAAATGCGAGAGGAAATTCGGATACGGCGTCAATCCGCAAAATGCGATAACGGATACTCCGGATCTGCTCCGCAACCTCCACCATGGGAAAGGAGATCGGGG
1. EU572718		
2. Sekans Sonuç		
Consensus	980 990 1,000 1,010 1,020 1,030 1,040 1,050 1,060 1,070 1,080	TCCGAGGGGAGCTTGAGTGAATAATGATCTCAAGTGGCCAGTGGCTACCATCCAGATACCATGCCACACCTGACGTGTGAGAAAAATTAAGCAGTGA
1. EU572718		
2. Sekans Sonuç		

Consensus	1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 A T G C G A G G C G G G A C G T C C G G C T G T G C A G C G C T C A C C T T C A G T G G G G C C G T G T G G A T G T G C A C C C A C C G R A G G C T T T G C C A T T C A G A G T C T G T G C A G T G G G C A
1. GU121670	A.....
2. Sekans Sonuç	G.....
Consensus	110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 G C T T T G A C A A G T T G T G C C G A C C G C A A G T C G T C T G A G A G T C T T G T C C G T C T T T C G T G G T G A C T G A G A C T C A C T G T C T G C A A T C C C C C A G C A A G C A G G A G C
1. GU121670	
2. Sekans Sonuç	
Consensus	220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 G C A A C T C T G T A T C T C A G T G A A G G C A A G C C A T G T C G A A C C G T C A G T G C A C A C T G A C A C G G G T A C T C A T C G G G C C A G T G C C C C A A G A G C G C T T G T G C A G C
1. GU121670	
2. Sekans Sonuç	
Consensus	330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 A A G A C C A T G T G G G C C C C G G G C T G C G G A A T T C T G C T C A G C A A C T G G A T T T T T T G C A G C A G T T G C T C A T C A C C A T C C T G A C A A A G C T A T G G A G G A G A C T G C A
1. GU121670	
2. Sekans Sonuç	
Consensus	440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 G C T G T G A A A A G C A G G T C C A T C G G T G C A C A A A A G C A G A A T G G T C G A A A C T T G G A C G G G G T G T G G G G T G T C C A C T G C A A G T G C A A A G A G G T T C G T C G G C A C T G
1. GU121670	..G.....G.....
2. Sekans Sonuç	..G.....G.....
Consensus	550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 G G T T G A C T T G C T C G A G T A T C C T N N K T C A A A A G A G G G A A C G A A G T C G G A C C C A C G G G C G T G C A T C G T C G T C G A T T C A G T C A G C T A C A C A T G C A C T T C G G G C A
1. GU121670	..G.....G.....G.....
2. Sekans Sonuç	..G.....G.....G.....G.....
Consensus	660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 C G G C G A A A C T C A G T G A A C C T C C G C A A G G G G A C A A G G A T G C A A G A G A C T G G A T G T C A T C C T T C A G G G A A C T G C A G C C T G G T A G A T G T A T G A T G A C G C C T C G
1. GU121670	G.....
2. Sekans Sonuç	G.....
Consensus	770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 C A T G A G A A T G G T A C A C C T G C G A G T C C C C A C A G G G T A C T C A G T G A G G T G A C T T C C A A G C G G A G G A G T C G T G T G G A A G G A G T C G A A G T C A C C T G G C T C A G A A A T
1. GU121670	
2. Sekans Sonuç	
Consensus	880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 G G A G A A G G A A T T C G G C A T C A G G C G T C A T C C T G C A A A T G C G A T A A C G G A T A C T C C G A T C T G C T C C G C A C C T C C C C A T G G G A A A G G A A A T C G G G T C C G A G G G
1. GU121670	A.....
2. Sekans Sonuç	G.....
Consensus	990 1,000 1,010 1,020 1,030 1,040 1,050 1,060 1,070 1,081 G A G C T T G A G T G A A A A A A T G A A T A T T G T C T T C A A G T G C C C C A G T G G C T A C C A T C C A A G A T A C C A T G C C C A C A C C G T G A C G T G T G A G A A A A T T A A G C A G T G A
1. GU121670	
2. Sekans Sonuç	

DNA dizi analiz sonuçlarına göre *T.gondii*'ye ait MIC3 proteinlerinin üç boyutlu yapıları <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index> web adresinde bulunan Phyre2 Protein Homology/Analogy Recognition Engine V 2.0 programı ile, görüntülenmesi ise Jmol: An open-source Java viewer programı kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7.*T.gondii* MIC3 proteinin 3 boyutlu görünümü

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Toxoplasma gondii'nin hayat döngüsünde; sporozoit, bradizoit ve takizoit formu olmak üzere üç enfektif dönemi vardır. MIC3 geni, bu üç dönemde de bulunmaktadır. MIC3 antijeni, insanda hem hücresel hem de humoral immunité oluşturmaktadır. Bu sebeple gerek *Toxoplasma gondii*'nin tanısında gerekse de aşı çalışmalarında kullanılan hedef antijen olmuştur. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda MIC3 gen tabanlı DNA aşlarının hem humoral hem de hücresel cevabı uyardığı *T.gondii*'ye karşı kısmi koruma sağladığı gösterilmiştir. MIC3 geni tek başına veya diğer aday antijenlerle birlikte kullanılarak *T.gondii*'ye karşı geliştirilecek aşının etkinliği, koruma süresi, arttırılmaya çalışılmıştır (7).

İnsanda *T.gondii* enfeksiyonu tanısında birçok zorlukla karşılaşmaktadır. Bu zorluklardan bir kısmını tanı testlerinin sensitivite ve spesifitesinin düşüklüğü oluşturmaktadır. Bunun yanında tanı için değerlendirilecek örneğin kan, idrar, BOS, balgam gibi değişik materyallerin olması farklı zorlukları da karşımıza çıkarmaktadır .

Son zamanlarda yürütölen çalışmalarda insanda toxoplasmosis enfeksiyonunun tanısında kullanılabilecek *T.gondii*'de bulunan bir çok antijen *Escherichia coli*'de üretilmiştir. Bunlar; mikronem proteinleri (rMIC2, rMIC3, rMIC4, rMIC5), GRA antijenleri (rGRA1, rGRA2, rGRA4, rGRA6, rGRA8) roptri proteinleri (rROP1, rROP2), yüzey proteinleri (rSAG1 ve rSAG2), matrix protein rMAC1'dir. Bu proteinlerden MIC3 rekombinant proteini içeren tanı testlerinden, yüksek spesifitesi ve sensitivite sonuçları elde edilmiştir. MIC3 proteini, tanı çalışmalarında tek başına kullanıldığı gibi farklı antijenlerden oluşan rekombinant proteinlerle kombine edilerek de kullanılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır (86-94).

Toxoplasma gondii'nin MIC3 tabanlı immunolojik tanısında kullanılan testler arasında Indirekt Fluoresan Antikor Testi (IFAT), Latex Agglütinasyon Testi (LAT), Enzyme-

Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Polymerase Chain Reaction (PCR) bulunmaktadır (114).

Toxoplasma gondii'nin MIC3 antijeninin rekombinant olarak kullanıldığı LAT'te, *Toxoplasma gondii* dışında farklı patojenlerle enfekte hastalarının, pozitif serum örneklerinden yapılan çalışmada, çapraz reaksiyonun görülmediği, domuzlardan elde edilen *Toxoplasma gondii*'ye karşı oluşmuş antikorların bulunduğu serum örneklerinde de çok güçlü bir çökme olduğu tespit edilmiştir (114).

Rekombinant SAG1'in antijen olarak kullanıldığı ELISA ile karşılaştırıldığında, rekombinant MIC3'ün kullanıldığı LAT metodu ile aynı oranda pozitif sonuç verdiği görülmüştür. Bu oran her iki test için %92,8 olarak bulunmuştur. Ayrıca *Toxoplasma gondii* takizoitleri ile deneysel olarak enfekte edilmiş domuz yavrularında, enfeksiyondan sonraki 8. günden 42. güne kadar alınan serum örneklerinde *Toxoplasma gondii* spesifik antikorları MIC3 tabanlı LAT ile pozitif olarak tespit edilebilmiştir (115).

ELISA'nın dışında, avidite testlerinde de rekombinant MIC3 proteini başarılı bir şekilde kullanılarak farklı tanı kitleri geliştirilmiştir. Rekombinant MIC3'ün antijen olarak kullanıldığı IgG avidite testinde, primer enfeksiyondan sonraki ilk 2 ay içinde toplanan serum örneklerinde yapılan çalışmalarda; düşük aviditeli IgG antikorlarını tespit edebildiği görülmüştür. rMIC3 antijenine karşı oluşan düşük aviditeli IgG antikorlarının varlığının tespit edilmesi halinde, bu enfeksiyonun yakın bir tarihte geçirildiğini, enfeksiyon ajanının vücuda giriş zamanının üzerinden 8-9 haftalık bir süre geçtiğini düşündürmektedir (115).

Bazı araştırma grupları tarafından yapılan ileri çalışmalarda akut toxoplasmosisli hastaların serum örneklerinde dikkat çekecek bir şekilde yüksek yoğunlukta MIC3'ün özel bir peptidine karşı oluşmuş antikorların (MIC3-282:GVEVLAEKCEKEFGI; MIC3-191:SKRGNAKCGPNGTCIV) varlığı gösterilmiştir. Akut enfeksiyonlu hastalarda MIC3 özel peptidi yüksek yoğunlukta tespit edilirken, latent enfeksiyonlularda düşük yoğunlukta olduğu tespit edilmiştir. İnsan akut toxoplasmosisi tanısında kullanılmak için yapılacak olan testlerde MIC3 özel peptidinin aday olarak kullanılabilirliği ümit vaad eden bir durum olarak gösterilmiştir (116).

Gebelikte karşılaşılan ciddi problemler arasında *Toxoplasma gondii* enfeksiyonunun geçirilme zamanı hakkındaki belirsizlikler vardır. Bu belirsizliklerin en aza indirmek için enfeksiyonun geçirilme zamanının bilinmesi önem arz etmektedir. Gebelik dönemi boyunca meydana gelebilecek bir durum olan akut toxoplasmosisin tanısında kullanılabilecek, yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip bir marker olarak MIC3 özel peptidi karşımıza çıkmaktadır.

MIC3 serolojik testlerde marker olarak kullanılması yanında, *Toxoplasma gondii*'nin moleküler tanısında da güçlü bir hedef olarak kullanılmıştır. Toprakta *Toxoplasma gondii* varlığını araştırmak için kullanılan loop mediated isothermal amplification assay metodunda MIC3 geninin hedef alındığı, spesifik primerlerin kullanıldığı çalışmalarda yüksek sensitivite ve spesifite değerlerine ulaşılmıştır. MIC3 gen bölgesinin hedef olarak alındığı bu yöntemde, 0,5 gr topraktaki 5 adet *Toxoplasma gondii* ookistini bile tespit edebildiği görülmüştür (117, 118).

Toxoplasma gondii'ye karşı suisidal DNA aşısının koruyucu etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada; MIC3 geni suisidal vektör olan pSCA1 ve konvensiyonal vektör pcDNA3.1'e klonlanmıştır. Oluşan rekombinant plazmitler (pSCA/MIC3 ve pcDNA3.1/MIC3), BHK-21 hücrelerine transfekte edilmiştir. MIC3'ün BHK-21 hücrelerinde ekspresyonunun olup olmadığına RT-PCR ve immunofluoresence test ile bakılmıştır. Doğrulama işleminin ardından BALB/c fareleri, pSCA/MIC3 ve pcDNA3.1/MIC3 ile immunize edilmiştir. Oluşan anti-Tg-MIC3 antikorları indirekt ELISA yöntemiyle tespit edilmiştir. Hücresel immun yanıt ise lenfosit proliferasyon assay ve RT-PCR yöntemiyle değerlendirilmiştir. pSCA/MIC3 ve pcDNA3.1/MIC3 ile immunize edilen grupta elde edilen sonuçlara göre anti-Tg-MIC3 antikor seviyesi, lenfosit proliferasyon stimülasyon index cevabı ve IFN- γ miktarı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde yükseldiği görülmüştür. Plazmitlerin tek başına kullanılarak immunize edilen fare gruplarındaki IL-4 seviyesinin ise kontrol grubu ile kıyaslandığında daha düşük olduğu tespit edilmiştir. pSCA/MIC3 ve pcDNA3.1/MIC3 ile immunize edilen gruba letal doz *T.gondii* verilmiş, hayatta kalma süreleri kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlarda, immunize edilen gruptaki BALB/c farelerinin yaşam sürelerinin önemli ölçüde uzadığı görülmüştür. pSCA/MIC3 ve pcDNA3.1/MIC3'ün ayrı ayrı kullanılarak immunize edilen farelerde iki ayrı vektörün koruyucu etkinliğine de bakılmış, fakat çıkan sonuçlarda istatistiksel

anlamda bir farkın olmadığı görülmüştür. pSCA/MIC3 ve pcDNA3.1/MIC3'ün *T.gondii*'ye karşı kullanılacak aşı çalışmalarında iyi birer aday oldukları vurgulanmıştır (119).

Yapılan başka bir çalışmada farelerde konjenital toxoplasmosise ve kronik toxoplasmosise karşı geliştirilen aşının etkinliği araştırılmıştır. Deney için geliştirilen aşı *T.gondii*'nin RH suşunun MIC1-3 geni knock out yapılarak hazırlanmıştır. OF1 fareler MIC1-3 geni knock out yapılmış takizoitler ile immunize edildikten sonra *T.gondii* 76K suşu ile oral yoldan enfekte edilmiştir. Kronik enfeksiyonda beyinde oluşan doku kist yükü, konjenital enfeksiyonda ise transplasental geçiş, yaşam süreleri, vücut ağırlıkları kontrol grubuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. MIC1-3 geni knock out edilmiş takizoitlerin humoral ve hücrel immunitiyi güçlü bir biçimde uyardıkları tespit edilmiştir. Kronik enfeksiyon modeli oluşturulmuş farelerin beyinlerinde oluşan kistleri %96 oranında azalttığı tespit edilmiştir. Aşılanmış farelere hamilelik dönemleri esnasında *T.gondii* takizoitleri verilerek enfekte edilmiş ve aşılanmamış grupla kıyaslandığında enfeksiyonun fetüse geçiş oranının oldukça düşük olduğu görülmüştür. Fetüse enfeksiyon ajanının geçiş oranı aşılanmış grupta sadece %4.6 iken, aşılanmamış grupta %33.3 olduğu tespit edilmiştir (120).

Çalışmamızda, yapılan çalışmalardan farklı olarak RH suşu yerine ülkemizde bulunan Ankara suşu kullanılmıştır. Üretilen aşının oluşturduğu yanıtın gücü, koruyuculuk süresi kullanılan suşa bağlıdır. Oluşan immun yanıtın daha etkili olması amacıyla ülkemizde sık görülen suşların hedef alınarak çalışılması gerekmektedir. Aşı çalışmasında kullandığımız plazmit yukarıda yapılan çalışmada kullanılan suisidal plazmite göre biogüvenlik açısından üstünlük sağlamaktadır. Bunun yanı sıra toxoplasmosisin tanısında kullanılacak mikronem tabanlı tanı kitlerinde ülkemizde sık görülen suşların kullanılması sensitivite ve spesifite açısından önem arz etmektedir. Çalışmamızda dünyada ve ülkemizde ilk kez Ankara suşu kullanılarak hazırlanan rekombinant mikronem3 tabanlı aşı adayı klonlanmıştır.

Yapılan bir çalışmada immatür MIC3 proteini kullanılarak hazırlanan plazmit DNA aşısı CBA/J farelerine intramusküler olarak uygulanmıştır. İmmunize edilen bütün farelerde yüksek titrelerde IFN γ , IL2, IgG2a, anti-MIC3 immunglobulin seviyesinde artış tespit edilmiştir. Oluşan yanıtı ek olarak daha güçlü bir humoral yanıt oluşturmak

için pMIC3 ile birlikte pGM-CSF inokule edilmiştir. *T.gondii* 76K suşu ookistleri, önceden immunize edilen farelere oral yoldan verilmiş ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında immunize edilen farelerdeki beyin kistlerinin önemli oranda azaldığı görülmüştür (121).

Çalışmamızda, yapılan çalışmadan farklı olarak mikronem protein 3'ün immatür formu yerine matür formu kullanılmış olup klonlamanın doğrulanmasında polimeraz zincir reaksiyonunun yanında DNA dizi analizinde yapılarak yapılan işlemin doğruluğu kanıtlanmıştır.

Holec-garsior ve arkadaşlarının MIC3'ün matür formunun etkinliğini araştırdıkları başka bir çalışmada; MIC3'ün matür formunu kodlayan DNA'yı plazmit aracılığı ile lipozomlar kullanılarak koyunlara intramusküler olarak 2 kez uygulanmıştır.

Kontrol gruplarındaki koyunlardan bazıları boş vektör verilerek aşılanırken, bazıları ise hiç aşılanmamıştır. Aşılanan koyunlarda 1. ve 2. aşılanmanın ardından kan örnekleri alınıp, IFN γ ve diğer antikor seviyelerindeki değişim izlenmiştir. Kontrol gruplarındaki koyunlar ile kıyaslandığında IgG1, IgG2 ve IFN γ serum seviyesinin önemli ölçüde arttığı ve *T.gondii*'ye karşı etkili bir cevap oluşturduğu gözlemlenmiştir (122).

Holec-garsior ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda prokaryotik ekspresyon sistemleri yerine ökaryotik memeli ekspresyon sistemleri olan pcDNA3.1. plazmiti kullanılmıştır. Bu sayede ürünümüz uygun adjuvanlarla kombine edilerek deney hayvanlarında kullanım alanı oluşturmaktadır.

Çalışmamızda MIC3 geni, *T.gondii* takizoitlerinden elde edilip, pc.DNA3.1'e aktarıldıktan sonra OneShot TOP10 Chemically Competent *E.coli* kompetan hücrelerine transforme edilip klonlanmıştır. Klonlama sonrasında oluşan ürün DNA dizi analizine gönderilip, doğrulama işlemi yapılmış, var ise farklılıklar tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında TC. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'ndan alınan *T.gondii* Ankara suşunda MIC3 geni baz alınıp bir çok farklı suş ile karşılaştırıldığında, herhangi bir mutasyonun söz konusu olmadığı, seçilen gen bölgesinin korunmuş olduğu, BLAST dizi analizi ile tespit edilmiştir.

Şuana kadar yapılan çalışmalar göstermiştir ki; MIC3'ün koruyucu etkisi bir çok faktör tarafından etkilenmektedir. Bu faktörlerden en önemlilerinden biri de MIC3'ün birlikte kullanıldığı adjuvantlardır. İmmunizasyonun etkinliğini ve oluşan immun cevabın süresini arttırmak için kullanılırlar. *T.gondii* enfeksiyonuna karşı olan savunmada daha çok tip1 hücresel cevabın ön planda olduğu ve sitotoksik T-lenfositlerden salınan IFN γ 'nın rol aldığı bilindiği için adjuvant seçiminde bu yapıların üzerinde pozitif etkisi olabilecek adjuvantların seçimi bu konuda çalışacakların dikkat etmesi gereken hususlardır.

MIC3'ün koruyuculuğuna etki eden bir diğer faktör de kullanılan plazmitlerin çeşididir. Çalışmamızda kullanılan pcDNA3.1. plazmiti güvenle kullanılan bir plazmittir. Çalışmamızdan elde edilen ürünler kullanılacak aşının etkinliğini arttırmak amacıyla farklı DNA plazmitleri ile de kullanılmasına olanak sağlamaktadır.

Çalışmamızdan elde edilen MIC3 geni; etkinliğinin değerlendirilmesi ve oluşan etkinin artırılması amacıyla, klasik veya yeni nesil adjuvantlarla kombine edilip DNA aşı çalışmalarında kullanılması mümkün olacaktır. Hazırlanan aşının etkinliği laboratuvar hayvan modellerinde kronik ve akut toxoplasmosise karşı koruyucu etkisinin, hücresel ve humoral immun cevabı oluşturmadaki yeterliliği açısından test edilebilecektir.

Sonuç olarak; toxoplasmosis günümüzde hala önemli mortalite ve morbidite sebebi olmaya devam etmektedir. Bu nedenle hastalığın tanı ve tedavisine yönelik çalışmaların yapılması ve gerekli yatırımlarda bulunulması gerekmektedir. Tanı amaçlı kullanılan testlerin başında serolojik yöntemler gelmektedir. Yaptığımız çalışmadan elde edilen ürünler protein ekspresyon sistemleri kullanılarak, MIC3 molekülü çoğaltılıp saflaştırıldıktan sonra antijen olarak kullanılabilir ve serolojik testlerin sensitivite ve spesifitesi değerlerinin yükselmesine katkı sağlayacaktır.

Koruyucu hekimlik açısından önemli olan; “hastalık oluşmadan önlem almak” tır. Böylece; karşılaşılabilecek iş gücü ve ekonomik kayıplar en aza indirgenebilecektir. Bu amaçla yapılabilecekler arasında aşı çalışmaları ön plana çıkmaktadır. Çalışmamızdan elde edilen pcDNA3.1.Tg-MIC3 olarak isimlendirdiğimiz ürün, tek başına kullanılabilir gibi oluşturması beklenen immun yanıtın artırılması amacıyla adjuvantlarla kombine edilerek deney hayvanlarında aşı çalışmaları planlanabilir.

Diğer taraftan, günümüzde aşılama metotları arasında prime-boost yaklaşımı yaygın olarak kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır. Bu yöntem ile MIC3 molekül tabanlı DNA ve protein aşıları birlikte kullanılma imkanı bulabilir ve oluşacak immun yanıtın hem etkisinin hem de süresinin arttırılması hedeflenebilir.

Başka bir seçenek olarak da; elde ettiğimiz pcDNA3.1.Tg-MIC3 multiantijenik aşının bir parçası olarak *T.gondii* yüzey antijenleriyle ve diğer adezyon molekülleriyle birlikte kullanılabileceği ve aşını koruyucu etkisinin arttırılmasına önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Yazar S., Kuk S., Miman Ö., Saygı G. Saygı'nın Temel Tıbbi Parazitolojisi, 1.Baskı, Erciyes Üniversitesi Basım Evi, Kayseri, 2015: ss104-113.
2. Robert-Gangneux F, Darde ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clinical microbiology reviews. 2012;25:264-96.
3. Ryan KJ RC. Sherris Medical Microbiology. New York: McGraw Hill Medical Publishing Division; 2004. 722 p.
4. Özcel MA. Tıbbi Parazit Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları İzmir, 2007: ss141-179.
5. Carruthers V, Boothroyd JC. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. Current opinion in microbiology. 2007;10:83-9.
6. Meissner M, Reiss M, Viebig N, Carruthers VB, Torsel C, Tomavo S, et al. A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorts. Journal of cell science. 2002;115:563-74.
7. Wang YH, Yin H. Research advances in microneme protein 3 of *Toxoplasma gondii*. Parasite Vector. 2015;8.
8. Nicolle C, Manceaux LH. On a leishman body infection (or related organisms) of the gondi. 1908. International journal for parasitology. 2009;39:863-4.
9. Dogan KB. Gebelerde *Toxoplasma gondii* Ve CMV Seropozitiflik, Serokonversiyon Ve Fetuse Geçiş Oranının Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2006 Malatya.
10. Roos DS, Crawford MJ, Donald RG, Kissinger JC, Klimczak LJ, Striepen B. Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid. Current opinion in microbiology. 1999;2:426-32.

11. Ferguson DJ. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. International journal for parasitology. 2004;34:347-60.
12. Mai K, Sharman PA, Walker RA, Katrib M, De Souza D, McConville MJ, et al. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2009;104:281-9.
13. DO H-Y. Human Toxoplasmosis: Oxford Medical Publishing; 1992.
14. Afonso E, Thulliez P, Gilot-Fromont E. Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (*Felis catus*). International journal for parasitology. 2006;36:1373-82.
15. Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. International journal for parasitology. 1998;28:1019-24.
16. Ferguson DJ. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? Trends in parasitology. 2002;18:355-9.
17. Dubey JP, Frenkel JK. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. The Journal of protozoology. 1972;19:155-77.
18. Jones JL, Dubey JP. Waterborne toxoplasmosis--recent developments. Experimental parasitology. 2010;124:10-25.
19. Duncanson P, Terry RS, Smith JE, Hide G. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. International journal for parasitology. 2001;31:1699-703.
20. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet. 2004;363:1965-76.
21. Derouin F, Devergie A, Auber P, Gluckman E, Beauvais B, Garin YJ, et al. Toxoplasmosis in bone marrow-transplant recipients: report of seven cases and review. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 1992;15:267-70.

22. Desmonts G, Couvreur J. Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. The New England journal of medicine. 1974;290:1110-6.
23. Leport C, Remington JS. [Toxoplasmosis in AIDS]. Presse medicale. 1992;21:1165-71.
24. Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 1992;15:211-22.
25. Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Orefice F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. Emerging infectious diseases. 2003;9:55-62.
26. Pektaş B. Toxoplasmosis Şüphesi İle Başvuran Hastaların Serolojik Açıdan Degerlendirilmesi. Türkiye Parazitoloji Dergisi. 2015;39.
27. Aşık G. Afyon bölgesinde gebelerde toxoplasma ve rubella seroprevelansı. Pamukkale Tıp Dergisi. 2013;6.
28. Keskin DD. İlk Trimester Gebelerde Toxoplasma seroprevelansları. Selçuk Tıp Dergisi. 2013;29.
29. Çeltekin NY. Türkiye'nin Orta Karadeniz Bölgesinde Gebelerde Rubella, CMV ve Toxoplasmosis Seroprevelansı. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2014;6.
30. Bakacak M. Kahramanmaraş Yöresindeki Yerleşik Türk Gebelerle Suriyeli Mülteci Gebeler Arasında *Toxoplasma* Seroprevelans Farklılıkları. Türkiye Parazitoloji Dergisi. 2015;39.
31. El Hajj H, Lebrun M, Arold ST, Vial H, Labesse G, Dubremetz JF. ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. PLoS pathogens. 2007;3:e14.

32. Laliberte J, Carruthers VB. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2008;65:1900-15.
33. Mercier C, Adjogble KD, Daubener W, Delauw MF. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? International journal for parasitology. 2005;35:829-49.
34. Sibley LD. How apicomplexan parasites move in and out of cells. Current opinion in biotechnology. 2010;21:592-8.
35. Rabaud C, May T, Lucet JC, Leport C, Ambroise-Thomas P, Canton P. Pulmonary toxoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus: a French National Survey. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 1996;23:1249-54.
36. Correa D, Canedo-Solares I, Ortiz-Alegria LB, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. Parasite immunology. 2007;29:651-60.
37. Roberts F, Mets MB, Ferguson DJ, O'Grady R, O'Grady C, Thulliez P, et al. Histopathological features of ocular toxoplasmosis in the fetus and infant. Archives of ophthalmology. 2001;119:51-8.
38. Delair E, Latkany P, Noble AG, Rabiah P, McLeod R, Brezin A. Clinical manifestations of ocular toxoplasmosis. Ocular immunology and inflammation. 2011;19:91-102.
39. Chapey E, Wallon M, Debize G, Rabilloud M, Peyron F. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by using a whole-blood gamma interferon release assay. Journal of clinical microbiology. 2010;48:41-5.
40. Kang YA, Lee HW, Hwang SS, Um SW, Han SK, Shim YS, et al. Usefulness of whole-blood interferon-gamma assay and interferon-gamma enzyme-linked

immunospot assay in the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *Chest*. 2007;132:959-65.

41. Grossman PL, Remington JS. The effect of trimethoprim and sulfamethoxazole on *Toxoplasma gondii* in vitro and in vivo. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1979;28:445-55.
42. Baril L, Ancelle T, Goulet V, Thulliez P, Tirard-Fleury V, Carme B. Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a case-control study in France. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 1999;31:305-9.
43. Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, et al. Sources of *toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *Bmj*. 2000;321:142-7.
44. Jones JL, Dargelas V, Roberts J, Press C, Remington JS, Montoya JG. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009;49:878-84.
45. Dubey JP. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with T gondii oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. *American journal of veterinary research*. 1988;49:910-3.
46. Jongert E, Roberts CW, Gargano N, Forster-Waldl E, Petersen E. Vaccines against *Toxoplasma gondii*: challenges and opportunities. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009;104:252-66.
47. Verma R, Khanna P. Development of *Toxoplasma gondii* vaccine: A global challenge. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2013;9:291-3.
48. Innes EA, Bartley PM, Maley S, Katzer F, Buxton D. Veterinary vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009;104:246-51.

49. Beauvillain C, Juste MO, Dion S, Pierre J, Dimier-Poisson I. Exosomes are an effective vaccine against congenital toxoplasmosis in mice. *Vaccine*. 2009;27:1750-7.
50. Elsaid MM, Vitor RW, Frezard FJ, Martins MS. Protection against toxoplasmosis in mice immunized with different antigens of *Toxoplasma gondii* incorporated into liposomes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999;94:485-90.
51. Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology*. 1994;153:2533-43.
52. Khan IA, Ely KH, Kasper LH. A purified parasite antigen (p30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Journal of immunology*. 1991;147:3501-6.
53. Bulow R, Boothroyd JC. Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. *Journal of immunology*. 1991;147:3496-500.
54. Lourenco EV, Bernardes ES, Silva NM, Mineo JR, Panunto-Castelo A, Roque-Barreira MC. Immunization with MIC1 and MIC4 induces protective immunity against *Toxoplasma gondii*. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2006;8:1244-51.
55. Velge-Roussel F, Marcelo P, Lepage AC, Buzoni-Gatel D, Bout DT. Intranasal immunization with *Toxoplasma gondii* SAG1 induces protective cells into both NALT and GALT compartments. *Infection and immunity*. 2000;68:969-72.
56. Vercammen M, Scorza T, Huygen K, De Braekeleer J, Diet R, Jacobs D, et al. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. *Infection and immunity*. 2000;68:38-45.

57. Leroux-Roels G. Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. *Vaccine*. 2010;28 Suppl 3:C25-36.
58. Allison AC, Byars NE. Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects. *Molecular immunology*. 1991;28:279-84.
59. Morefield GL, Sokolovska A, Jiang D, HogenEsch H, Robinson JP, Hem SL. Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro. *Vaccine*. 2005;23:1588-95.
60. Lambrecht BN, Kool M, Willart MA, Hammad H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Current opinion in immunology*. 2009;21:23-9.
61. Aucouturier J, Dupuis L, Deville S, Ascarateil S, Ganne V. Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. *Expert review of vaccines*. 2002;1:111-8.
62. Barve M, Bender J, Senzer N, Cunningham C, Greco FA, McCune D, et al. Induction of immune responses and clinical efficacy in a phase II trial of IDM-2101, a 10-epitope cytotoxic T-lymphocyte vaccine, in metastatic non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26:4418-25.
63. Feyerabend S, Stevanovic S, Gouttefangeas C, Wernet D, Hennenlotter J, Bedke J, et al. Novel multi-peptide vaccination in Hla-A2+ hormone sensitive patients with biochemical relapse of prostate cancer. *The Prostate*. 2009;69:917-27.
64. Pedroza A, Huerta JG, Garcia Mde L, Rojas A, Lopez-Martinez I, Penagos M, et al. The safety and immunogenicity of influenza vaccine in children with asthma in Mexico. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2009;13:469-75.
65. Aguilar JC, Rodriguez EG. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*. 2007;25:3752-62.

66. Moser C, Amacker M, Kammer AR, Rasi S, Westerfeld N, Zurbriggen R. Influenza virosomes as a combined vaccine carrier and adjuvant system for prophylactic and therapeutic immunizations. *Expert review of vaccines*. 2007;6:711-21.
67. Al-Attiah R, Mustafa AS, Abal AT, El-Shamy AS, Dalemans W, Skeiky YA. In vitro cellular immune responses to complex and newly defined recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical and experimental immunology*. 2004;138:139-44.
68. Brandt L, Skeiky YA, Alderson MR, Lobet Y, Dalemans W, Turner OC, et al. The protective effect of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine is increased by coadministration with the *Mycobacterium tuberculosis* 72-kilodalton fusion polyprotein Mtb72F in *M. tuberculosis*-infected guinea pigs. *Infection and immunity*. 2004;72:6622-32.
69. Harandi AM, Medaglini D, Shattock RJ, Working Group convened by E. Vaccine adjuvants: a priority for vaccine research. *Vaccine*. 2010;28:2363-6.
70. Higgins D, Marshall JD, Traquina P, Van Nest G, Livingston BD. Immunostimulatory DNA as a vaccine adjuvant. *Expert review of vaccines*. 2007;6:747-59.
71. Moser M, Leo O. Key concepts in immunology. *Vaccine*. 2010;28 Suppl 3:C2-13.
72. Zuber AK, Brave A, Engstrom G, Zuber B, Ljungberg K, Fredriksson M, et al. Topical delivery of imiquimod to a mouse model as a novel adjuvant for human immunodeficiency virus (HIV) DNA. *Vaccine*. 2004;22:1791-8.
73. Garcon N, Heppner DG, Cohen J. Development of RTS,S/AS02: a purified subunit-based malaria vaccine candidate formulated with a novel adjuvant. *Expert review of vaccines*. 2003;2:231-8.
74. Newman MJ, Wu JY, Gardner BH, Anderson CA, Kensil CR, Recchia J, et al. Induction of cross-reactive cytotoxic T-lymphocyte responses specific for HIV-1

- gp120 using saponin adjuvant (QS-21) supplemented subunit vaccine formulations. *Vaccine*. 1997;15:1001-7.
75. Duewell P, Kisser U, Heckelsmiller K, Hoves S, Stoitzner P, Koernig S, et al. ISCOMATRIX adjuvant combines immune activation with antigen delivery to dendritic cells in vivo leading to effective cross-priming of CD8⁺ T cells. *Journal of immunology*. 2011;187:55-63.
 76. Garcon N, Vaughn DW, Didierlaurent AM. Development and evaluation of AS03, an Adjuvant System containing alpha-tocopherol and squalene in an oil-in-water emulsion. *Expert review of vaccines*. 2012;11:349-66.
 77. Lekutis C, Ferguson DJ, Grigg ME, Camps M, Boothroyd JC. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *International journal for parasitology*. 2001;31:1285-92.
 78. Wu XN, Lin J, Lin X, Chen J, Chen ZL, Lin JY. Multicomponent DNA vaccine-encoding *Toxoplasma gondii* GRA1 and SAG1 primes: anti-*Toxoplasma* immune response in mice. *Parasitology research*. 2012;111:2001-9.
 79. Barragan A, Sibley LD. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends in microbiology*. 2003;11:426-30.
 80. Dobrowolski JM, Carruthers VB, Sibley LD. Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Molecular microbiology*. 1997;26:163-73.
 81. Dobrowolski JM, Sibley LD. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell*. 1996;84:933-9.
 82. Meissner M, Schluter D, Soldati D. Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science*. 2002;298:837-40.
 83. Soldati D, Meissner M. *Toxoplasma* as a novel system for motility. *Current opinion in cell biology*. 2004;16:32-40.

84. Carruthers VB, Sibley LD. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *European journal of cell biology*. 1997;73:114-23.
85. Dowse T, Soldati D. Host cell invasion by the apicomplexans: the significance of microneme protein proteolysis. *Current opinion in microbiology*. 2004;7:388-96.
86. Brecht S, Carruthers VB, Ferguson DJ, Giddings OK, Wang G, Jakle U, et al. The toxoplasma micronemal protein MIC4 is an adhesin composed of six conserved apple domains. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:4119-27.
87. Brossier F, Jewett TJ, Sibley LD, Urban S. A spatially localized rhomboid protease cleaves cell surface adhesins essential for invasion by *Toxoplasma*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102:4146-51.
88. Brydges SD, Sherman GD, Nockemann S, Loyens A, Daubener W, Dubremetz JF, et al. Molecular characterization of TgMIC5, a proteolytically processed antigen secreted from the micronemes of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology*. 2000;111:51-66.
89. Cerede O, Dubremetz JF, Soete M, Deslee D, Vial H, Bout D, et al. Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201:453-63.
90. Dowse TJ, Soldati D. Rhomboid-like proteins in Apicomplexa: phylogeny and nomenclature. *Trends in parasitology*. 2005;21:254-8.
91. Garcia-Reguet N, Lebrun M, Fourmaux MN, Mercereau-Puijalon O, Mann T, Beckers CJ, et al. The microneme protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite. *Cellular microbiology*. 2000;2:353-64.
92. Harper JM, Zhou XW, Pszenny V, Kafsack BF, Carruthers VB. The novel coccidian micronemal protein MIC11 undergoes proteolytic maturation by

- sequential cleavage to remove an internal propeptide. *International journal for parasitology*. 2004;34:1047-58.
93. Hoff EF, Cook SH, Sherman GD, Harper JM, Ferguson DJ, Dubremetz JF, et al. *Toxoplasma gondii*: molecular cloning and characterization of a novel 18-kDa secretory antigen, TgMIC10. *Experimental parasitology*. 2001;97:77-88.
 94. Huynh MH, Boulanger MJ, Carruthers VB. A conserved apicomplexan microneme protein contributes to *Toxoplasma gondii* invasion and virulence. *Infection and immunity*. 2014;82:4358-68.
 95. Huynh MH, Liu B, Henry M, Liew L, Matthews SJ, Carruthers VB. Structural basis of *Toxoplasma gondii* MIC2-associated protein interaction with MIC2. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290:1432-41.
 96. Huynh MH, Rabenau KE, Harper JM, Beatty WL, Sibley LD, Carruthers VB. Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. *The EMBO journal*. 2003;22:2082-90.
 97. Jewett TJ, Sibley LD. The toxoplasma proteins MIC2 and M2AP form a hexameric complex necessary for intracellular survival. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279:9362-9.
 98. Kafsack BF, Pena JD, Coppens I, Ravindran S, Boothroyd JC, Carruthers VB. Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. *Science*. 2009;323:530-3.
 99. Laliberte J, Carruthers VB. *Toxoplasma gondii* toxolysin 4 is an extensively processed putative metalloproteinase secreted from micronemes. *Molecular and biochemical parasitology*. 2011;177:49-56.
 100. Miller SA, Binder EM, Blackman MJ, Carruthers VB, Kim K. A conserved subtilisin-like protein TgSUB1 in microneme organelles of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:45341-8.

101. Mital J, Meissner M, Soldati D, Ward GE. Conditional expression of *Toxoplasma gondii* apical membrane antigen-1 (TgAMA1) demonstrates that TgAMA1 plays a critical role in host cell invasion. *Molecular biology of the cell*. 2005;16:4341-9.
102. Opitz C, Di Cristina M, Reiss M, Ruppert T, Crisanti A, Soldati D. Intramembrane cleavage of microneme proteins at the surface of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *The EMBO journal*. 2002;21:1577-85.
103. Rabenau KE, Sohrabi A, Tripathy A, Reitter C, Ajioka JW, Tomley FM, et al. TgM2AP participates in *Toxoplasma gondii* invasion of host cells and is tightly associated with the adhesive protein TgMIC2. *Molecular microbiology*. 2001;41:537-47.
104. Roiko MS, Carruthers VB. Functional dissection of *Toxoplasma gondii* perforin-like protein 1 reveals a dual domain mode of membrane binding for cytolysis and parasite egress. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288:8712-25.
105. Saouros S, Edwards-Jones B, Reiss M, Sawmynaden K, Cota E, Simpson P, et al. A novel galectin-like domain from *Toxoplasma gondii* micronemal protein 1 assists the folding, assembly, and transport of a cell adhesion complex. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280:38583-91.
106. Reiss M, Viebig N, Brecht S, Fourmaux MN, Soete M, Di Cristina M, et al. Identification and characterization of an escorter for two secretory adhesins in *Toxoplasma gondii*. *The Journal of cell biology*. 2001;152:563-78.
107. Kim K. Role of proteases in host cell invasion by *Toxoplasma gondii* and other Apicomplexa. *Acta tropica*. 2004;91:69-81.
108. Carruthers VB, Giddings OK, Sibley LD. Secretion of micronemal proteins is associated with *toxoplasma* invasion of host cells. *Cellular microbiology*. 1999;1:225-35.

109. Carey KL, Westwood NJ, Mitchison TJ, Ward GE. A small-molecule approach to studying invasive mechanisms of *Toxoplasma gondii*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004;101:7433-8.
110. Achbarou A, Mercereau-Puijalon O, Autheman JM, Fortier B, Camus D, Dubremetz JF. Characterization of microneme proteins of *Toxoplasma gondii*. Molecular and biochemical parasitology. 1991;47:223-33.
111. Carruthers VB, Hakansson S, Giddings OK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. Infection and immunity. 2000;68:4005-11.
112. Harper JM, Huynh MH, Coppens I, Parussini F, Moreno S, Carruthers VB. A cleavable propeptide influences *Toxoplasma* infection by facilitating the trafficking and secretion of the TgMIC2-M2AP invasion complex. Molecular biology of the cell. 2006;17:4551-63.
113. Cerede O, Dubremetz JF, Bout D, Lebrun M. The *Toxoplasma gondii* protein MIC3 requires pro-peptide cleavage and dimerization to function as adhesin. The EMBO journal. 2002;21:2526-36.
114. Jiang T, Gong D, Ma LA, Nie H, Zhou Y, Yao B, et al. Evaluation of a recombinant MIC3 based latex agglutination test for the rapid serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in swines. Veterinary parasitology. 2008;158:51-6.
115. Beghetto E, Buffolano W, Spadoni A, Del Pezzo M, Di Cristina M, Minenkova O, et al. Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. Journal of clinical microbiology. 2003;41:5414-8.
116. Maksimov P, Zerweck J, Maksimov A, Hotop A, Gross U, Pleyer U, et al. Peptide microarray analysis of in silico-predicted epitopes for serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in humans. Clin Vaccine Immunol. 2012;19:865-74.

117. Du F, Feng HL, Nie H, Tu P, Zhang QL, Hu M, et al. Survey on the contamination of *Toxoplasma gondii* oocysts in the soil of public parks of Wuhan, China. *Veterinary parasitology*. 2012;184:141-6.
118. Du F, Zhang Q, Yu Q, Hu M, Zhou Y, Zhao J. Soil contamination of *Toxoplasma gondii* oocysts in pig farms in central China. *Veterinary parasitology*. 2012;187:53-6.
119. Fang R, Nie H, Wang Z, Tu P, Zhou D, Wang L, et al. Protective immune response in BALB/c mice induced by a suicidal DNA vaccine of the MIC3 gene of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary parasitology*. 2009;164:134-40.
120. Ismael AB, Dimier-Poisson I, Lebrun M, Dubremetz JF, Bout D, Mevelec MN. Mic1-3 knockout of *Toxoplasma gondii* is a successful vaccine against chronic and congenital toxoplasmosis in mice. *The Journal of infectious diseases*. 2006;194:1176-83.
121. Ismael AB, Sekkai D, Collin C, Bout D, Mevelec MN. The MIC3 gene of *Toxoplasma gondii* is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis. *Infection and immunity*. 2003;71:6222-8.
122. Hiszczynska-Sawicka E, Li H, Boyu Xu J, Akhtar M, Holec-Gasior L, Kur J, et al. Induction of immune responses in sheep by vaccination with liposome-entrapped DNA complexes encoding *Toxoplasma gondii* MIC3 gene. *Polish journal of veterinary sciences*. 2012;15:3-9.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Bora ÖZKAN
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : 28.08.1981, HATAY / Antakya
Medeni Hali : Evli
E-mail : dr.bora31@hotmail.com
Yazışma Adresi : Mevlana mah. Feslegen sok. Eray Residans.Kat:6 No:54
Talas / KAYSERİ

Öğrenim Durumu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	YIL
Lisans	Tıp Fakültesi	Fırat Üniversitesi	2001- 2007
Doktora	Tıbbi Parazitoloji	Erciyes Üniversitesi	2012-2016

Doktora Tezi Başlığı ve Danışmanı: *Toxoplasma gondii* Adezyon Molekül Tabanlı
Aşı Çalışması

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Salih KUK

YABANCI DİL

İngilizce

Görevler:

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Öğrenci Konseyi Temsilcisi	Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi	2002-2006
TTB Öğrenci Kolları Başkanı	Elazığ	2005-2006
Doktor	Diyarbakır Eğil Merkez Sağlık Ocağı	2007-2008
Sorumlu Hekim	Diyarbakır Eğil Merkez Sağlık Ocağı	2008-2009
Başhekim	Diyarbakır Eğil İlçe Devlet Hastanesi	2010-2010
Araş.Gör.Dr.	Kocatepe Üniversitesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon	2010-2011
Araş.Gör.Dr.	MKÜ Tıbbi Parazitoloji AD.	2011-2012
Araş.Gör.Dr.	ERÜ Tıbbi Parazitoloji AD.	2013-2015

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:

Türkiye Parazitoloji Derneği

Türkiye Hidatidoloji Derneği

ESERLER**A. Ulusal ve Uluslararası Katılımlı Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri****Kitaplarında Basılan bildiriler:**

A1. Kuk S., Yazar S., Çetinkaya Ü., Ozkan B., Hamamci B., Gücüyetmez S., "Developing Of Enzymelinked Immunosorbent Assay Elisa Based On Recombinant Cathepsin Ll Protein For Diagnosis Of Fasciola Hepatica", ASTMH, NEW ORLEANS, ABD, 2-6 Kasım 2014, ss.34-34

A2. Uyar Y., Gülger A., Özkan B., Kuk S., Yazar S., "Petri Kutularına İşlenen Sanat", XVIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi, DENİZLİ, TÜRKİYE, 29 Eylül - 5 Ekim 2013, ss.90-90

A3. Yürük M., Çetinkaya Ü., Özkan B., Kuk S., Yazar S., "Fasciola Hepatica Tanısı İçin Rekombinant Cathepsin L1 Tabanlı Elisa Geliştirilmesi.", XVIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Denizli, Türkiye, 29 Eylül - 5 Ekim 2013, ss.103-103

A4. Yazar S., Erdoğan E., Mutlu F., Özkan B., "Molecular Characterization Of Echinococcus Granulosus In Turkey", The 25th World Congress of Echinococcosis , Khartoum, Sudan, 23-27 Kasım 2013, ss.10-10

A5. Erdoğan E., Ozkan B., Kuk S., Yazar S., Kayseri ve Çevresinde Farklı Konaklardan Elde Edilen Echinococcus Granulosus İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu 7.Ulusal Hidatidoloji Kongresi, ORDU, TÜRKİYE, 04-7 Eylül2014

A.6 Ozkan B., Erdoğan E., Kuk S., Yazar S., Kistik Ekinokokkozis ön Tanılı Hasta Serumlarının serolojik Olarak Degerlendirilmesi. 7.Ulusal Hidatidoloji Kongresi, Ordu, Türkiye, 04-7 Eylül,2014

A.7 Akşit A., Ozkan B., Erdoğan E., N.N. Akşit Kuk S., Yazar S., High Pressure Liquid Chromatography Analiysis Of Potential Antiparasitic Agent Thymol From Essential Oil Of Thymus Vulgaris and Nigella Sativa 9. Ectmih Basel, İsviçre, 6-10 Eylül 2015, ss.186

B. Aldığı Kurslar ve Katıldığı Eğitim Programları:

B1. Tübitak Proje Hazırlama Eğitimi, Kayseri,18-20 Ekim 2014

C. Katıldığı Bilimsel Toplantılar

C1. XVIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 28 Eylül-4 Ekim 2013, Denizli.

C2. VII.Ulusal Hidatidoloji Kongresi, 4-7 Eylül 2014 Ordu.

C3. ASTMH Kongresi, 2-6 Kasım 2014,New Orleans, ABD.

C4. IX. ECTMIH Kongresi, , 6-10 Eylül 2015, Basel, İSVİÇRE.