

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

***TOXOPLASMA GONDII* BRADİZOİT VE TAKİZOİT
FORMLARINA ÖZGÜ ADJUVANTE MULTİVALAN
REKOMBİNANT PROTEİN AŞISININ
OLUŞTURDUĞU İMMUN YANIT VE KORUNMANIN
SAPTANMASI**

Yaprak GEDİK

Tez Danışmanı : Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN

İkinci Danışmanı : Prof. Dr. Adnan Yüksel GÜRÜZ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 612.01.00

Sunuş Tarihi : 21.08.2013

**Bornova-İZMİR
2013**

Yaprak GEDİK tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “*TOXOPLASMA GONDII* BRADİZOİT VE TAKİZOİT FORMLARINA ÖZGÜ ADJUVANTE MULTİVALAN REKOMBİNANT PROTEİN AŞISININ OLUŞTURDUĞU İMMUN YANIT VE KORUNMANIN SAPTANMASI” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 21.08.2013 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. S. İsmet Deliloğlu Gürhan

Raportör Üye: Prof. Dr. Adnan Yüksel Gürüz

Üye : Doç. Dr. Mert Döşkaya

Üye : Doç. Dr. Elif Esin Kocabaş

Üye : Yrd. Doç. Dr. Aylin Şendemir Ürkmez

ÖZET***TOXOPLASMA GONDII* BRADİZOİT VE TAKİZOİT
FORMLARINA ÖZGÜ ADJUVANTE MULTİVALAN
REKOMBİNANT PROTEİN AŞISININ OLUŞTURDUĞU İMMUN
YANIT VE KORUNMANIN SAPTANMASI**

GEDİK, Yaprak

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Bölümü
Tez Danışmanı: Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN
İkinci Danışmanı: Prof. Dr. Adnan Yüksel GÜRÜZ
Ağustos 2013, 93 sayfa

Toxoplasma gondii dünya üzerindeki pek çok canlı türünü enfekte edebilen, insanlarda da ciddi klinik tablolara yol açan bir protozoondur. *T. gondii*'ye karşı geliştirilecek aşının, parazitin hem bradizoit, hem de takizoit formlarına karşı koruma sağlaması, aşının etkinliği açısından önem taşımaktadır.

Bu amaçla bradizoitlerden salgılanan BAG1 ile bradizoit ve takizoitlerden salgılanan GRA1 proteinleri *E. coli*'de rekombinant olarak üretilmiş, saflaştırılmış, alum adjuvantı ile birleştirilerek farelere uygulanmıştır. Oluşan humoral ve hücrel immun yanıt Western Blot, rec-ELISA ve akış sitometrisi ile araştırılmıştır. Aşılanan fareler avirulan PRU suşu doku kistleri ile oral yoldan enfekte edilerek aşının koruyuculuğu değerlendirilmiştir. Beyin dokudaki kistlerin miktarı gerçek zamanlı PZR ve faz kontrast mikroskopisi ile değerlendirilmiştir.

Aşılama sonrası anti-BAG1 ve anti-GRA1 IgG antikor yanıtı olduğu, IgG₁ ve IgG_{2a} antikor yanıtlarının ve CD₄ hücrelerinin salgıladığı IFN- γ ve IL-4 ile CD₈ hücrelerin salgıladığı IFN- γ miktarının arttığı görülmüştür. Aşı grubu farelerin beyinlerindeki doku kist sayısının azaldığı saptamıştır. Sonuç olarak bu çalışmada geliştirilen multivalan rekombinant protein aşısının fare modelinde toksoplazmozise karşı koruyucu immun yanıtı uyardığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Rekombinant protein aşısı, BAG1 proteini, GRA1 proteini, *Toksoplasma gondii*, Toksoplazmozis

ABSTRACT**PROTECTION EFFICACY AND IMMUNITY OF AN
ADJUVANTED MULTIVALANT RECOMBINANT PROTEIN
VACCINE AGAINST BRADYZOITE AND TACHYZOITE FORMS
OF *TOXOPLASMA GONDII***

GEDİK, Yaprak

MSc in Bioengineering Department

Supervisor: Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN

Second Supervisor: Prof. Dr. Adnan Yüksel GÜRÜZ

August 2013, 93 pages

Toxoplasma gondii is a protozoan parasite, which infects most mammals in the world and causes serious clinical presentations on human. A vaccine developed against *T. gondii* that may confer against both bradyzoite and tachyzoite stages of the parasite could increase the efficacy of the vaccine.

Therefore, BAG1 protein secreted during bradyzoite stage and GRA1 protein secreted during bradyzoite and tachyzoite stages of the parasite were expressed recombinantly in *E. coli*, purified, adjuvanted with alum and administered to mice. Humoral and cellular immune responses were detected using Western Blot, rec-ELISA and flow cytometry. Mice were orally infected with avirulent tissue cysts of *T. gondii* PRU strain. The number of tissue cysts in brains were calculated using phase contrast microscopy and Real Time PCR.

Anti-GRA1 and anti-BAG1 IgG antibody response are elicited by vaccinations. IgG₁ and IgG_{2a} antibody responses and IFN- γ and IL-4 secreted by CD₄ cells and IFN- γ secreted by CD₈ cells were increased. The amount of brain cysts was reduced in mice group vaccinated with adjuvanted multivalent vaccine. In conclusion, the adjuvanted multivalent recombinant protein vaccine developed induced protective immune response against toxoplasmosis in mice.

Keywords: Recombinant protein vaccine, BAG1 protein, GRA1 protein, *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmosis

TEŞEKKÜR

Üniversite seçimimde önemli yeri olan, lisans ve yüksek lisans öğrenim hayatımda tez danışmanlığımı yaparak bilgi ve deneyimlerinden yararlanmamı sağlayan ve her türlü mesleki konuda bana ışık tutarak yolumu aydınlatan Sayın Prof. Dr. S. İsmet Deliloğlu Gürhana'a, beni yüksek lisans öğrencisi olarak kabul ederek Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Moleküler Laboratuvarı'nda tez çalışmalarımı yürütmeme olanak sağlayan, ikinci tez danışmanım Sayın Prof. Dr. A. Yüksel Gürüz'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca her türlü yardım ve desteği vererek beni yönlendiren, tezimin tamamlanmasında büyük emeği olan Sayın Doç. Dr. Mert Döşkaya'ya, çalışmalarım boyunca büyük bir özveriyle yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Ayşe Caner, Uzm. Dr. Aysu Değirmenci Döşkaya, Dr. Sultan Gülçe İz ve Hüseyin Can'a, çalışmalarımda kullandığım *T. gondii* PRU suşunu sağlayan Prof. Dr. Marie-Laure Dardé'ye, değerli bilgilerini benimle paylaşan ve laboratuvarlarının kapılarını açan Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, yüksek lisans tezime maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a (Proje no: 110S200) çok teşekkür ederim.

Ayrıca yüksek lisans öğrenimim boyunca sabır ve anlayışla beni destekleyen mesai arkadaşlarım ile tüm Ege Vet ve Ata Fen çalışanlarına teşekkür ederim.

Son olarak yaşamım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, daima yanımda olarak tüm kararlarımda varlıklarıyla bana güç veren babama, anneme, kardeşime ve Görkem Özvural'a en içten sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Yaprak Gedik
İzmir, Temmuz 2013

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
TABLolar DİZİNİ.....	xix
GRAFİKLER DİZİNİ.....	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Aşı Tarihi	3
2.2. Mikroorganizmalara Karşı Gelişen İmmun Yanıt	5
2.2.1. Hücresel immün yanıt.....	5
2.2.2. Humoral immün yanıt.....	8
2.3. İmmunolojik Adjuvantlar	9
2.4. Toxoplasma gondii	10
2.4.1. <i>T. gondii</i> 'nin yaşam döngüsü.....	12

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.4.2. Patogenez ve <i>T. gondii</i> antijenik proteinleri	14
2.5. Toksoplazmozis	18
2.6. <i>T. gondii</i> 'ye Karşı Gelişen İmmun Yanıt.....	20
2.7. <i>T. gondii</i> 'ye Karşı Yapılan Aşı Çalışmaları.....	23
2.7.1. DNA aşı çalışmaları	23
2.7.2. Rekombinant protein aşı çalışmaları.....	27
3. MATERYAL VE METOT	31
3.1. Araştırma Sırasında Kullanılan Deney Hayvanları.....	31
3.2. BAG1 ve GRA1 Geni İçeren Plazmitlerin BL21 Star (DE3) pLysS Hücrelere Klonlanması	31
3.3. <i>T. gondii</i> BAG1 ve GRA1 Rekombinant Proteinlerin Ekspresyonunun Optimizasyonu.....	33
3.4. Rekombinant BAG1 ve GRA1 Proteinlerinin Büyük Ölçekli Ekspresyonu	34
3.5. Rekombinant GRA1 ve BAG1 Proteinlerinin Saflaştırılması	36
3.5.1. Hücrelerin yıkılması.....	36
3.5.2. HiTrap Ni ²⁺ şelasyon HP kolonu ile saflaştırma (afinite kolonu)	36

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.5.3. Jel filtrasyon kolonu ile saflaştırma	37
3.6. Saflaştırma Sonrası Rekombinant GRA1 ve BAG1 Proteinlerinin Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western Blot Kullanılarak Gösterilmesi	38
3.6.1. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)	38
3.6.2. Western Blot	39
3.7. Rekombinant Proteinlerin Miktarlarının Kantitatif Ölçümü	40
3.8. Rekombinant Proteinlerin Endotoksin Seviyesinin Ölçümü	41
3.9. Multivalan Rekombinant Protein Aşısının Üretimi ve Aşılama	41
3.9.1. Multivalan rekombinant protein aşısının oluşturulması	41
3.9.2. Rekombinant protein aşısının uygulanması	42
3.10. Aşılanan Farelerin <i>T. gondii</i> PRU Suşu ile Enfekte Edilmesi	43
3.10.1. <i>T. gondii</i> PRU suşuna ait doku kistlerinin elde edilmesi	43
3.10.2. Aşılanmış farelerin <i>T. gondii</i> PRU suşuna ait doku kistleri ile enfekte edilmesi ve farelerde enfeksiyon sonrası oluşan doku kistlerinin sayılması	43

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.11. Fare Beyin Dokuda Bulunan <i>T. gondii</i> PRU Suşu DNA Miktarının Gerçek Zamanlı (<i>Real Time</i>) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Belirlenmesi	44
3.11.1. DNA ekstraksiyonu.....	44
3.11.2. Gerçek zamanlı PZR	45
3.12. İmmun Yanıtın İncelenmesi.....	46
3.12.1. Humoral immün yanıtın incelenmesi	46
3.12.2. Hücresel immün yanıtın belirlenmesi	51
3.13. İstatistiksel Analiz.....	55
4. SONUÇLAR	56
4.1. pET28a/GRA1 ve pET28a/BAG1 Plazmitlerinin Gösterilmesi	56
4.2. rGRA1 ve rBAG1 Proteinlerinin Ekspresyonunun Optimizasyonu	57
4.3. rBAG1 ve rGRA1 Proteinlerinin Saflaştırılması	58
4.4. Rekombinant Proteinlerin Endotoksin Seviyesi, Protein Konsantrasyonu ve Adjuvant Bağlanma Kapasitesinin Belirlenmesi.....	59
4.5. Humoral İmmün Yanıt	59

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.5.1. IgG antikor yanıtı.....	59
4.5.2. IgG ₁ ve IgG _{2a} antikor yanıtı.....	61
4.6. Hücresel İmmun Yanıt.....	63
4.6.1. CD ₄ hücrelerinin salgıladığı IFN- γ oranı.....	64
4.6.2. CD ₄ hücrelerinin salgıladığı IL-4 oranı	64
4.6.3. CD ₈ hücrelerinin salgıladığı IFN- γ oranı.....	65
4.7. <i>T. gondii</i> PRU Suşuna Karşı Oluşan Korunma	66
5. TARTIŞMA.....	68
6. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	77
ÖZGEÇMİŞ	91

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. 1801 yılında James Gillray tarafından hazırlanmış karikatür	3
2.2. <i>T. gondii</i> hayat döngüsü	14
2.3. <i>T. gondii</i> takizoitinin konak hücreye invazyonu	16
2.4. <i>T. gondii</i> 'ye karşı oluşan CD ₄ Th ₁ yanıtı	21
2.5. <i>T. gondii</i> 'ye karşı oluşan CD ₈ yanıtı	22
2.6. <i>T. gondii</i> 'ye karşı oluşan humoral immun yanıt	23
4.1. Plazmit ekstraksiyonu sonrası elde edilen agaroz jel görüntüsü	56
4.2. rBAG1 ve rGRA1 proteinlerinin optimizasyonuna ait Western Blot görüntüleri	57
4.3. rBAG1 ve rGRA1 proteinlerinin histidin bağlayan afinite ve jel filtrasyon kolonları kullanılarak saflaştırılmaları sonrası (A) SDS-PAGE ve (B) Western Blot görüntüleri	58
4.4. Aşılama sonrası rGRA1 proteini ve <i>T. gondii</i> Ankara suşu takizoitini eriyik antijeninde bulunan doğal GRA1 proteinine karşı oluşan IgG antikor yanıtının Western Blot ile gösterilmesi	60
4.5. Aşılama sonrası rBAG1 proteinine karşı oluşan IgG antikor yanıtının Western Blot ile gösterilmesi	61

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

4.6.	CD ₃ reseptörlü T hücre kümesi	63
------	---	----

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Aşıların sınıflandırılması	4
2.2. İmmunolojik adjuvant çeşitleri	10
2.3. <i>T. gondii</i> 'ye karşı geliştirilen DNA aşı çalışmaları	26
2.4. <i>T. gondii</i> 'ye karşı geliştirilen rekombinant protein aşı çalışmaları	30
3.1. Rekombinant BAG1 proteinin üretimini sağlayan pET28a/BAG1 vektörü gen (A) ve protein (B) sekansları	32
3.2. Rekombinant GRA1 proteinin üretimini sağlayan pET28a/GRA1 vektörü gen (A) ve protein (B) sekansları	32
3.3. Üretim besin ortamı içeriği	35
3.4. Deney hayvanlarında oluşturulan aşı ve kontrol grupları	42
3.5. Gerçek Zamanlı PZR testinde her örnek için kullanılan reaksiyon karışımı	45
3.6. Gerçek zamanlı PZR testinde her bir örnek için kullanılan protokol	46
3.7. T lenfosit yüzey reseptörlerine bağlanan floresan işaretli antikorlar	53
3.8. CD ₄ ve CD ₈ T hücrelerin salgıladığı hücre içi sitokinlerin belirlenmesinde kullanılan antikorlar	55

GRAFİKLER DİZİNİ

<u>Grafik</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. IgG ₁ ve IgG _{2a} antikor yanıtı.....	62
4.2. CD ₄ T lenfositlerin salgıladığı hücre içi IFN- γ oranı	64
4.3. CD ₄ T lenfositlerin salgıladığı hücre içi IL-4 oranı.....	65
4.4. CD ₈ T lenfositlerin salgıladığı hücre içi IFN- γ oranı	65
4.5. Mikroskopi sonucu kontrol grubu ve aşı grubu fare beyinlerinde bulunan ortalama doku kisti sayısı	66
4.6. Kontrol grubu ve aşı grubu fare beyin dokularından yapılan gerçek zamanlı PZR sonrası elde edilen CP _T değerleri.....	67

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
Ab	Antikor
Ag	Antijen
ADCC	Antikora bağımlı hücrel sitotoksiste
APC	Antijen sunan hücre
Ca ⁺²	Kalsiyum iyonu
BSA	Sığır serum albumini
GM-CSF	Granülosit monosit koloni stimüle edici faktör
GRA	Yoğun granül antijeni
HSP	Isı şok proteini
Ig	İmmunoglobulin
IL	İnterlökin
INOS	Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LB	<i>Luria Bertani</i>
Mg ⁺²	Magnezyum iyonu
MHC	Major histokompetibilite kompleks
MIC	Mikronem antijeni
mIg	Membran immunoglobulini
NK	Doğal öldürücü hücre
NO	Nitrik oksit
ROP	Rhoptry proteini
SAG	Yüzey antijeni
SOC	Katabolit represyonlu süper optimal besin ortamı
STAT	Sinyal dönüştürücü ve transkripyon aktivatörü
TAE	Tris asetat EDTA
TCR	T hücre reseptörü
Tc	Sitotoksik T hücresi
Th	Yardımcı T hücresi
TNF- α	Tümör nekroz faktörü-alfa

1. GİRİŞ

Günümüzde gelişen teknoloji ile birlikte rekombinant protein aşıları elde edilerek kullanıma sunulmuş ve güvenilir şekilde uygulamaya devam edilmektedir. Rekombinant protein aşıları, sadece hedef antijen ile, hem hücresel hem de humoral immun sistemi uyardığı, farklı üretim sistemlerinde büyük ölçekli olarak üretilbildiği için ön plana çıkmaktadır. 1980’li yılların başından itibaren kullanıma giren Hepatit B, difteri, tetanoz, HPV gibi rekombinant protein aşıları insanlarda güvenle kullanılmaktadır (Zafar; BVGH, 2012).

Toxoplasma gondii geniş konak çeşitliliğine sahip bir parazittir. Kesin konağı kedi ve kedigiller olan *T. gondii*, kedi dışkısı ile dış ortama atılan ookistlerinin su, gıda veya eller ile ağız yolundan alınması ile insanlara bulaşmaktadır. Doğal enfeksiyon sürecinde bağırsakta açılan doku kistlerinden serbestlenen bradizoitler, takizoitlere dönüşmekte ve konak hücreler hızla işgal edilmektedir. *T. gondii*’nin insanlarda neden olduğu toksoplazmozis özellikle hamileler ve yeni doğanlar açısından risk taşımaktadır. Hamilelikte geçirilen akut enfeksiyon düşüklere, yeni doğanlarda fetal anomalilere neden olurken immun yetmezliği olan kişilerde gelişen akut akkiz enfeksiyon veya reaktivasyon ciddi klinik tablolara yol açmaktadır. Etkin bir tedavisi olmayan bu hastalığa karşı insanlarda da kullanılmak üzere geliştirilmiş herhangi bir aşı bulunmamaktadır. Koyunlarda kullanılan atenüe aşı ise kısa raf ömrü, yan etkileri ve koruyuculuk süresinin kısa olması gibi nedenlerden dolayı istenilen etkinlikte değildir.

Toksoplazmozise karşı dünyanın pek çok ülkesinde aşı geliştirme çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmada, *Toxoplasma gondii* yaşam döngüsünde bradizoit evresinde salgılanan BAG1 ile hem bradizoit, hem de takizoit evresinde salgılanan GRA1 proteinleri rekombinant olarak elde edilmiş ve alum adjuvantına adsorbe edilerek rekombinant protein aşı modeli olarak denenmiştir. Çalışmada, insanlarda yaygın kullanılan alum adjuvantı seçilerek immun yanıtın belirgin şekilde uyarılması hedeflenmiştir.

Bu amaçla rekombinant BAG1 ve GRA1 antijenleri *Escherichia coli*’de üretilmiş ve üretilen proteinler homojenizasyon, santrifügasyon, filtrasyon ve

kromatografi yöntemleri ile saflaştırılmıştır. Saflıkları ve miktarları SDS-PAGE ve Western Blot yöntemleri ile belirlenen proteinler alum adjuvantı ile birleştirilerek rekombinant protein aşısı oluşturulmuş ve seçilen hayvan modellerine üçer hafta ara ile iki kez intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

Rekombinant protein aşısının farelerde oluşturduğu humoral ve hücresel immun yanıt ayrı ayrı araştırılmış ve aşının hastalığa karşı koruyuculuk sağlayıp sağlayamadığı incelenmiştir. Anti-GRA1 IgG ve anti-BAG1 IgG antikor yanıtları Western Blot ile, uyarılan IgG antikor yanıtının IgG₁ veya IgG_{2a} yönüne kutuplanması ise rekombinant ELISA ile araştırılmıştır. CD₈ hücrelerin salgıladığı IFN- γ oranı, CD₄ hücrelerin salgıladığı IFN- γ ve IL-4 oranı akış sitometrisi ile belirlenmiştir. Aşının koruyuculuğu da farelerin *T. gondii* PRU suşu ile enfekte edilmesiyle test edilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Aşı Tarihi

Bir canlıda enfeksiyona neden olan organizmanın ya da organizmaya ait immunojen kısımların, bir başka canlı vücuduna verilerek bağışıklık sisteminin uyarılmasına aşılama denilmektedir (Plotkin, 2008).

Aşı tarihinde ilk aktif denemelerin VII. yüzyılda Hintli budistlerin yılan zehiri içerek, yılanın zehirli etkilerine karşı dirençli hale gelmeleri ile başladığı belirtilmektedir (Plotkin, 2008). Daha sonra X. yüzyılda Çinlilerin çiçek hastalığına karşı aşılama denemeleri yaptıkları belirtilse de, bu konudaki yazılı belgelerin XVI. yüzyıla ait olduğu bilinmektedir. Bu uygulamada, hastaların derisinden alınan iltihaplı dokuların, sağlıklı kişilere burundan verildiğinden bahsedilmektedir (Aşı Danışma Merkezi, 2012).



Şekil 2.1. 1801 yılında James Gillray tarafından hazırlanmış karikatür, Edward Jenner tarafından uygulanan çiçek aşısının etkileri (Gillray, 1801).

Modern aşılamanın temellerini atan Edward Jenner tarafından, 1796 yılında geliştirilen çiçek aşısının aslında Türkler tarafından o zamanlarda kullanıldığı, bu

dönemde İstanbul’da bulunan Lady Montagu’nun çiçek aşılması sırasında kullanılan “variolizasyon” yöntemini gözlemlemleyerek İngiltere’ye döndüğünde bu yöntemi kullanan öncüler arasına adını yazdırdığı bilinmektedir (Şekil 2.1.) (Gillray, 1801). Yaklaşık 80 yıl sonra Louis Pasteur, tavuk kolerası ve şarbon üzerine hayvanlarda aşı çalışmaları yapmış ve 1885 yılında insanlara uygulanabilen ilk kuduz aşısını üretmiştir (Plotkin, 2008).

Kuduz aşısından sonra kızamık, kızamıkçık, kabakulak gibi zayıflatılmış (atenüe) canlı aşılar kullanıma sokulmuştur. Zayıflatılmış (atenüe) canlı aşılardan geliştirilmesi sonrası inaktif aşılardan geliştirilme süreci başlamıştır. Hastalığa neden olan organizmanın veya organizmanın toksin gibi antijenik kısımlarının kimyasal madde ya da ısı ile inaktive edilmesiyle inaktif aşılar elde edilmiştir. İnaktif aşılardan geliştirilmesi ile insanlığı tehdit eden difteri, tetanoz, kuduz, boğmaca, hepatit gibi birçok hastalığa karşı bağışıklama sağlanabilmiştir (Tablo 2.1.). Günümüzde teknoloji ve genetik biliminin hızla gelişmesiyle birlikte aşı geliştirme tekniklerinin sayısı da artmıştır (Tablo 2.1.) (Ilchmann et al., 2012; Sanchez-Vizcaino, 2001).

Tablo 2.1.Aşıların Sınıflandırılması (Ilchmann et al., 2012; Sanchez-Vizcaino, 2001)

Aşı grubu	Aşılama yöntemleri	Açıklama
1. Jenerasyon Aşılar	Canlı, Zayıflatılmış Aşı	Zayıflatılmış canlı organizma kullanılır.
	İnaktif (Ölü) Aşı	Ölü ya da çoğalamayan organizma kullanılır.
2. Jenerasyon Aşılar	Subunit Aşı	Organizmanın antijenik özellikteki kısımları kullanılır.
	Toksoid Aşı	Organizmaya ait toksinler inaktive edilerek kullanılır.
	Konjuge Aşı	Başka bir organizmanın antijenik kısımları ile patojen organizmaya ait antijenik özellikteki kısımları birleştirilerek kullanılır.
3. Jenerasyon Aşılar	DNA Aşısı	Antijen özellikteki proteinleri üretmek için DNA’nın ilgili gen bölgesi kullanılır.
	Rekombinant Protein Aşı	Bağışıklık sistemini uyarıcı özellikteki antijenler, uygun vektörler kullanılarak rekombinant olarak elde edilir ve kullanılır.
	Sentetik Peptit Aşı	Antijenik özellikteki peptitler sentetik olarak sentezlenir ve kullanılır.

2.2. Mikroorganizmalara Karşı Gelişen İmmun Yanıt

Mikroorganizmalara karşı, antijene özgü B ve T hücreleri devreye girerek humoral (sıvısal) ve hücrel immün yanıt oluşmaktadır. Aşılamada da benzer yanıtların uyarılması amaçlanmaktadır.

2.2.1. Hücrel immün yanıt

Vücuda giren antijenler, antijen sunan hücreler (APC, *antigen presenting cell*) tarafından alınıp, işlenip, bağlanacakları T lenfositlerine özgü membran proteinleri (MHC, *major histocompatibility complex*) yardımıyla sunulmaktadırlar. T lenfositler sunulan antijenleri, yüzeylerindeki glikoprotein reseptörler (CD₄ ve CD₈) ile tanımaktadırlar (Kindt et al., 2007).

Bu bölümde mikroorganizmalara karşı gelişen CD₄, Th (yardımcı T hücreleri, *T helper*), CD₈ ve doğal öldürücü (NK, *natural killer*) hücre yanıtları detaylı olarak incelenecektir.

2.2.1.1. Antijen sunucu hücreler

Miyeloid öncül hücreden gelişen monositik hücreler monositler (dolaşımda hareketli), makrofajlar ve dendritik hücreler olarak sınıflandırılmakta, makrofajlar, bulundukları dokulara göre özel adlar ile tanımlanmaktadır (böbrekte intraglomerüler mezengial hücre, beyinde mikrogliyal hücre, akciğerde alveolar makrofaj, karaciğerde Kupffer hücresi gibi). Bu hücrelerin fagositoz, antijen sunumu, sitokin üretimi [IL-1 (interlökin 1), IL-6, TNF- α (tümör nekroz faktörü-alfa), IL-12, IL-10, TGF- β (*transforming growth factor-beta*), IFN- γ (*interferon-gama*), GM-CSF(granülosit monosit koloni stimüle edici faktör)] ve antikora bağımlı hücrel sitotoksikite (ADCC, *antibody dependent cell cytotoxicity*) reaksiyonlarından sorumlu olduğu anlaşılmıştır (Pier et al., 2004).

2.2.1.2. CD₄ hücre yanıtı

Antijen sunan hücrelerin, fagositte ettiği mikroorganizmalar, fagazoma yapışan lizozomlar tarafından peptitlere parçalanmaktadır. Bunun yanında mikroorganizmalar tarafından dış ortama salgılanan antijen (Ag) molekülleri de endositoz ile makrofaj içine alınmaktadır. Bu antijenik peptitler MHC II molekülleri ile hücre içinde birleşip (MHC II-Ag) hücre yüzeyinden sunulmaktadır. MHC II-Ag kompleksinin, CD₃ TCR (T hücre reseptörü; *T cell receptor*) aracılığı ile CD₄ Th₀ hücreleri uyardığı belirtilmektedir. CD₄ Th₀ üzerinde bulunan CD₂₈ reseptörü, APC üzerindeki CD_{80/86} ile uyarılınca, CD₄ Th₀ hücreler daha da uyarılmaktadır. APC üzerinde bulunan CD₄₀ reseptörü, CD₄ Th₀ üzerinde bu reseptöre uygun CD_{40L} ligantı ile uyarıldığında APC'de CD_{80/86} ekspresyonu arttığı ve dolayısıyla CD₄ Th₀ hücrenin APC tarafından uyarımının da arttığı gözlemlenmiştir (Weiss and Kim, 2007; Gürüz ve Delibaş, 2007).

2.2.1.3. CD₄ Th₁ hücre yanıtı

Uyarılan CD₄ Th₀ hücrelerin STAT1 ve STAT4 (*signal transducer and activator of transcription*; hücre içinde DNA'ya bağlanıp sitokin salgılanmasını arttıran moleküller) sunumu artmasıyla, hücrede IL-12 üretiminin de arttığı bildirilmiştir. Bu artışın, CD₄ Th₀ hücrelerin, CD₄ Th₁ yönüne polarize olmalarını sağladığı anlaşılmıştır. CD₄ Th₁ hücreler salgıladıkları IFN- γ ile makrofajları uyarmakta, uyarılan makrofajlarda INOS (uyarılabilir nitrik oksit sentaz; *inducible nitric oxide synthase*) üretimi artmakta, IL-12 salgılanması da uyarılmaktadır. Makrofajlarda INOS artışı sonrası oluşan nitrik oksit mikroorganizmaların ölümüne sebep olmaktadır. Makrofajlardan artan IL-12 sentezi ise daha fazla CD₄ Th₁ oluşmasına yol açarak immun yanıtı kuvvetlendirmektedir (Gürüz ve Delibaş, 2007; Pier et al., 2004).

2.2.1.4. CD₄ Th₂ hücre yanıtı

Ortamda bulunan antijenler (daha çok helmint gibi hücre içine alınamayan canlılara ait antijenler) NK 1.1 hücreler, mast hücre, bazofil veya eozinofiller tarafından tanındığında, bu hücrelerden IL-4 salgısı artmaktadır. Artan IL-4, CD₄

Th₀ hücrelerin STAT 6 üzerinden CD₄ Th₂ yönüne polarize olmalarını sağlamaktadır. CD₄ Th₂ hücreler ise salgıladıkları sitokinler ile eozinofil (IL-5), mast hücre (IL-3, IL-4, IL-9) ve B lenfositleri (IL-4) uyarmaktadır. Uyarılan B lenfositleri insanlarda IgE ve IgG₄ antikoru, farelerde ise IgG₁ antikoru salgılanmasını sağlamaktadır. Bu sebeple farelerde yapılan aşı denemelerinde IgG₁ artışı, immun yanıtın CD₄ Th₂ yönüne polarize olduğunun dolaylı göstergesi olarak kabul edilmektedir. CD₄ Th₂ hücrelerden salgılanan IL-10 sitokininin CD₄ Th₁ yanıtını baskıladığı izlenmiştir (Weiss and Kim, 2007; Kindt et al., 2007).

CD₄ Th₂ hücrelerden salgılanan IL-10, artan IL-5 salgısını azaltarak eozinofillerin uyarılmasını olumsuz yönde etkilediği, sonuç olarak IL-10, bir yandan CD₄ Th₁ yanıtını engellerken, diğer yandan da CD₄ Th₂ yanıtının aşırı artıp konağa zarar vermemesini denetlediği anlaşılmıştır (Gürüz ve Delibaş, 2007; Pier et al., 2004).

2.2.1.5. CD₈ T hücre yanıtı

Enfekte hücreler (APC, eritrosit, v.b.) içinde bulunan mikroorganizma (parazitofor vakuolde bulunabilir) endojen antijenleri, konak hücreye ait proteozomlarca peptitlere parçalandıktan sonra MHC I ile birleşir. Oluşan MHC I-Ag kompleksinin CD₃ TCR aracılığı ile CD₈ hücreleri uyardığı belirtilmektedir. CD₈ üzerinde bulunan CD₂₈ reseptörü, APC üzerindeki CD_{80/86} ile uyarılınca, CD₈ hücrelerdeki uyarım daha da artmaktadır. Uyarılan CD₈ hücrelerden perforin (hedef hücre üzerinde porlar açarak hücrenin ozmotik yıkımına ve granzimlerin hücre içine girmesine sebep olan enzim), granzim (mikroorganizma ile enfekte hedef hücrede kaspaz kaskadını uyarak apoptozisi başlatan serin proteaz enzimi) ve IFN- γ salgısında artış olduğu görülmüştür. Artan IFN- γ , APC'de INOS salgılanmasını sağlayarak mikroorganizmaların ölümüne sebep olmaktadır. CD₈ ve APC ilişkisi sırasında CD₈ üzerinde bulunan FasL'nin (Fas ligandı), APC üzerindeki Fas reseptörünü uyarak, APC'de apoptozisi (hücre ölümü) tetiklediği anlaşılmıştır. Hedef aldığı hücrenin ölümüne sebep olduğundan CD₈ hücrelere sitotoksik T (T cytotoxic, T_C) tanımlaması da yapılmıştır (Weiss and Kim, 2007; Gürüz ve Delibaş, 2007; Gülmezoğlu ve Delibaş, 1994).

2.2.1.6. NK hücre yanıtı

Doğal öldürücü hücreler, doğal (*innate*; innat) immun yanıtın bir parçasıdır. Bu hücreler mikroorganizma ile enfekte hücreyi T_C hücreye benzer şekilde etkisiz hale getirmekte, hedef hücreyi MHC I-Ag uyarısı olmadan, perforin ve granzim salgıları ile öldürmektedirler (Pier et al., 2004).

2.2.2. Humoral immun yanıt

Humoral immun yanıtın başlıca aktörü olan B lenfositlerin aktive olması için iki farklı sinyal ile uyarılması gerektiği anlaşılmıştır. Bunlardan ilki APC hücrelerinin CD₄ Th lenfositleri ile bağlanmasıyla B hücrelerin aktive edilmesi, ikincisi ise B hücre üzerinde bulunan yüzey reseptörlerinin (mIg; *membrane immunoglobulin*) antijenleri bağlayarak hücre içine almalarıdır. Bu iki yolla uyarılan B lenfositler başlıca iki hücreye dönüşmektedir. Bunlardan ilki plazma hücreleri olup, bu hücrelerin bol miktarda antijene özgü antikor üretiminden sorumlu olduğu (başlangıçta bol miktarda IgM salgılamak, zamanla diğer antikorlar da salgılanmaktadır), ikinci hücre grubunun ise hafıza B hücreleri (*memory B cells*) olarak adlandırıldıkları ve antijenle ikinci karşılaşmada IgM hariç diğer antikorları (IgG, IgA, IgD, IgE) salgıladıkları bilinmektedir (Pier et al., 2004).

B hücrelerden salgılanan IgE antikorlarının mikroorganizmanın yüzeyini kaplayarak antikora bağımlı hücreler sitotoksikiteye (ADCC, *antibody dependent cell mediated cytotoxicity*) neden olduğu gözlemlenmiştir. ADCC sırasında IgE antikorlara bağlanan eozinofillerin çeşitli salgılar ile mikroorganizmada hasar oluşturduğu, B hücrelerden salgılanan IgM ve IgG antikorlarının ise kompleman sistemini klasik yoldan aktive ederek membran atak kompleksini oluşturup mikroorganizmanın yüzeyinde açtığı delikler ile ozmotik yıkıma yol açtığı bildirilmektedir (Weiss and Kim, 2007; Gürüz ve Delibaş, 2007).

2.3. İmmunolojik Adjuvantlar

Tek başına immunojen özelliği olmayan fakat aşı formüllerinde aşının immunojen özelliğini arttırabilen bileşenlere adjuvant tanımlaması yapılmıştır (Vogel and Hem, 2008). Alüminyum tuzlarının adjuvant özelliği 1926 yılında keşfedilmiştir (Glenny et al., 1926). İstenilen özgün immun yanıtın kuvvetli şekilde uyarılabilmesi için zamanla çeşitli adjuvantlar geliştirilmiştir (Tablo 2.2.). Adjuvantların yan etkileri (lokal: ağrı, enflamasyon, şişlik, nekroz, apse; genel: bulantı, ateş, alerji, anafilaksi, immunsupresyon ve otoimmun hastalıklar) insan ve hayvanlarda kullanılabilecek adjuvantların sınırlı sayıda kalmasına neden olmuştur. Alüminyum tuzları, yan etkilerinin çok az olması sebebiyle günümüzde lisanslı aşılarında en çok kullanılan adjuvant olarak tercih edilmektedir (Aguilar and Rodriguez, 2007; Vogel and Hem, 2008).

Adjuvantlar genel olarak ileri seviyede saflaştırılmış antijenlerin oluşturduğu hücresel immun yanıtı arttırmak, kısa zamanda güçlü ve uzun süreli immun yanıt oluşturmak, aşıda kullanılan antijen miktarını ya da aşılama sayısını azaltarak aşı maliyetini düşürmek gibi amaçlarla kullanılmaktadırlar (Singh and O'Hagan, 2002; Yurdakök ve İnce, 2008).

Alüminyum içeren adjuvantlardan sonra, insan ve hayvanlarda en sık kullanılan adjuvantlar yağ içeren emülsiyon adjuvantlardır. Enjeksiyon yerinde antijenin yavaş salınımını sağladıkları ve humoral immun yanıtı uyardıkları bilinmektedir. Freund ve Montanide adjuvantları yağ içinde su içeren adjuvantlardır. Yan etkilerinden dolayı insan aşılarında sık kullanılmamakla birlikte hayvan aşılarında ve yeni geliştirilmeye çalışılan aşılarında sıklıkla denenmektedir (Aguilar and Rodriguez, 2007).

Tablo 2.2. İmmunolojik adjuvant çeşitleri (Ada, 1999).

Adjuvant İçeriği	Çeşit	Örnek
Mineral tuz	Alüminyum hidroksit	Alhydrogel ^(TM) , Rehydragel®,
	Alüminyum fosfat	Adju-Phos ^(TM) , Rehydraphos ^(TM)
	Kalsiyum fosfat	Kalsiyum fosfat adjuvant
Mikroorganizma kaynaklı	Muramil dipeptit (MDP) analogları	Murabutide Treonil-MDP
	Bakteriyel ekzotoksinler	Kolera toksin (CT) <i>E.coli</i> ısı değişken toksin (LT)
	Bakteriyel endotoksinler	Monofosforil lipit A (MPL®)
	Bakteriyel DNA	CpG oligonükleotitleri
	Flagella	Flagellin komponenti FljB
	Mikoplazma türevli makrofaj aktive edici 2kDa lipopeptit	MALP-2
Partikül	Biyobozunur polimer mikropartikülleri	Poli laktit ko-glikolit partikülleri (PLG)
	İmmun stimule edici kompleksler (ISCOM)	ISCOMATRIX®
	Lipozom, virozom, proteozom	
Yağ emülsiyon ve sürfaktan temelli adjuvantlar	Freund adjuvanı	Montanide® ISA 51
	Matabolize edilebilir emülsiyonlar	MF59; SAF; Montanide® ISA 720
	Saponinler	QS-21
Sentetik	İyonik olmayan bloke kopolimerler	L121
	Polifosfazen	PCPP
	LPS türevli sentetik bileşimler	RC529; E5564
	İmidazokuinolin benzeri moleküller	Imiquimod; Resiquimod
	Sentetik polinükleotitler	Poly A:U, Poly I:C
Sitokinler	IL-2, IL-12, GM-CSF, IFN- γ	
Genetik	Sitokin genleri ve kostimüle edici molekülleri kodlayan genler	IL-12, IL-2, IFN- γ , CD40L/124,125

2.4. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii ilk defa 1908 yılında bir Afrika kemirgeni olan *Ctenodactylus gundii*'den, Nicolle ve Manceaux isimli iki araştırmacı tarafından izole edilmiştir. Cins ismi yay şekline benzeyen takizoitler sebebiyle Yunanca 'toxon' kelimesinden türemiştir (toxos=yay, plasma=yaşam). Aynı yıl Splendore isimli araştırmacı paraziti tavşandan izole etmiş, 1910 yılında da Mello, parazitin köpeklerde hastalığa neden olduğunu yayınlamıştır (Dubey, 1993; Altıntaş, 2002).

1923 yılında Prag'lı bir oftalmolog olan Janku, insan gözünde ilk defa *T. gondii*'yi izole ettiğini, 1937 yılında Wolf ve Cowen ilk konjenital olguyu tespit ettiklerini bildirmişlerdir. İnsanlardaki toksoplazmoz hastalığı Sabin tarafından 1942 yılında tam olarak tanımlanmıştır. 1952'de insan salgı bezlerinde bazı olgular saptanmış, *T. gondii*'nin koyunlarda düşüğe neden olduğu 1957'de Harvey ve Marshall tarafından gözlemlenmiştir. Beverley 1959 yılında farelerde tekrarlayan konjenital bulaşı gözlemlemiş, 1960'da Jacobs doku kistlerini tanımlamıştır. 1972 yılında Miller beş farklı *T. gondii* suşu izole etmiş, *T. gondii*'nin yaşam döngüsünde kedilerin önemi 1972'de Munday'ın çalışmaları ile netlik kazanmıştır (Dubey, 1993; Altıntaş, 2002).

Türkiye'den bildirilen ilk *T. gondii* izolasyonu 1950 yılında Akçay, Baran ve Pamukçu tarafından köpekten yapılmıştır. Unat, Alyanak ve Şahin 1953'te ilk kez insan olgusu bildirmişlerdir. Toksoplazmozis tanısında serolojik yöntemler 1967 yılında kullanılmaya başlanmıştır. Ekmen ve Altıntaş 1973 yılında ölen bir köpekten, bir yıl sonra da konjenital toksoplazmozisli bir bebekten paraziti izole etmişlerdir (*T. gondii* Ankara suşu) (Altıntaş, 2002; Döşkaya et al., 2013).

T. gondii'nin sınıflandırılması 1980 yılında Levine *et al.* tarafından yapılmıştır:

Phylum	: Protozoa
Subphylum	: Apikomplexa
Classis	: Sporozoa
Subclassis	: Coccidia
Ordo	: Eucoccidiida
Subordo	: Eimeriina
Familia	: Sarcocystidae
Genus	: <i>Toxoplasma</i>
Species	: <i>Toxoplasma gondii</i>

2.4.1. *T. gondii*'nin yaşam döngüsü

T. gondii'nin yaşam döngüsünde takizoit, bradizoit ve ookist olmak üzere üç enfektif formun bulunduğu, parazitin çeşitli yaşam dönemlerinde bu formların birbirlerine dönüşerek döngüyü tamamladıkları bilinmektedir (Beaman et al., 1995).

Takizoit (trofozoit); boyu 4-8 μ ve eni 2-4 μ boyutlarında, parazitin hızlı çoğalan, ara konakların nükleuslu hücrelerinde görülen form olarak bilinmektedir. Mikroskopta hilal şekilli olup, bir ucu sivri, diğer ucu yuvarlak olarak görünmektedir. Akut enfeksiyon sırasında görülen takizoitlerin endodiyogeni (uzunlamasına bölünme) ile çoğaldığı bilinmektedir. Aktif penetrasyon ya da kimyasal etkileşim ile hücre içine girdikten sonra, takizoitin kendini konak hücre duvarından oluşturduğu parazitofor vakuol içine alarak immun sistemden koruduğu anlaşılmıştır. Takizoitler her 4-6 saatte bir tekrarlanan endodiyogeni ile çoğaldığı, sayıları 64-128 olduğunda konak hücreyi patlattığı, serbest kalan takizoitler sağlam komşu hücreleri istila ederken, bazılarının da kan ve lenf yolu ile santral sinir sistemi, göz, iskelet, kalp kası, plasenta gibi dokulara yayıldığı bilinmektedir. İnsanlarda nazal, vajinal, göz salgıları, süt, tükürük, idrar sperm ve dışkıdan izole edilebilmişlerdir. Takizoitlerin primer enfeksiyon veya reaktivasyon sırasında saptanmaları durumunda aktif enfeksiyon kabul edilmektedir (Akisü ve Budak, 1998; Hökelek, 2012; Montaya and Remington, 2000).

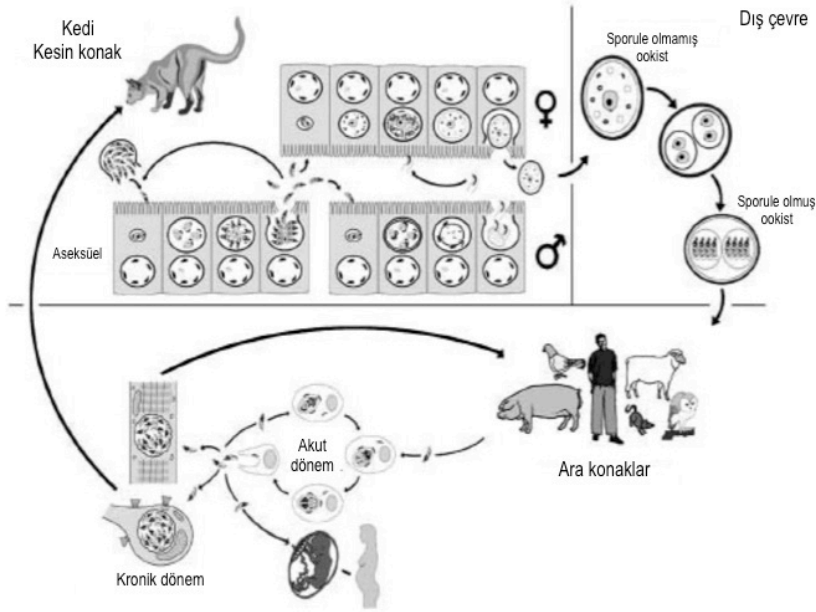
Bradizoit; parazitofor vakuol içerisinde doku kistlerini meydana getiren, takizoitlere göre daha yavaş çoğalan form olarak bilinmektedir. Doku kistleri 5-120 μ m aralığında çapa sahiptirler ve içlerinde ortalama 1000-3000 kadar bradizoit bulundurabilmektedir. Mikroskopta hilal şeklinde görülürler ve takizoitlere benzerler. Çekirdekleri geniş olan arka ucuna daha yakındır ve daha fazla sayıda glikojen taneciği bulundurlar. Hastalık başlangıcından yaklaşık 14 gün sonra hücre içindeki takizoitler, immun yanıt baskısı ile daha yavaş bölünen bradizoitlere dönüşmekte ve sonra da doku kistleri oluşmaktadır. Bradizoitlerin, ara konaklarda enfeksiyonun 8. günü gibi erken bir dönemde oluşabildiği ve çeşitli dokularda canlının yaşamı boyunca varlıklarını sürdürebildikleri

bilinmektedir. Bradizoitler özellikle çizgili kas, kalp kası, uterus ve santral sinir sisteminde bulunmakta, salgılarıyla ikinci bir çeper oluşturup yapılarını güçlendirdikleri belirtilmektedir (Dubey et al.,1998; Altıntaş, 2002; Mc Leod et al., 1995).

Ookist; son konak kedinin ince bağırsak epitel hücrelerinde oluşan formdur. 10-14 μm büyüklükte, oval yapıdadırlar. Kedinin bağırsaklarına yerleşen parazitler, seksüel ve aseksüel (şizogonik çoğalma) olarak çoğalabilmekte, şizogonik çoğalmada, sitoplazma bölünmesi olmaksızın ana hücrenin nükleusunun tekrarlayan bölünmeleri sonucu çok sayıda yavru hücre oluşmaktadır. Seksüel çoğalmada ise, zigotu oluşturacak makro ve mikrogametlere dönüşen makro ve mikrogametositler meydana gelmektedir. Gamet füzyonu ile döllenme gerçekleştikten sonra ookist içeren zigotlar oluşmaktadır. Bu ookistler epitel hücrelerin parçalanması durumunda bağırsak lümenine dökülmekte ve dışkı ile dış ortama atılmaktadırlar. Enfektif özellikte olmayan ookistler, uygun koşullarda sporule olarak enfektif özellik kazanmaktadırlar. Uygun nem koşullarında ve 24°C’de 2-3 gün, 15°C’de 8 gün ve 10°C’de ise 21 gün içinde sporulasyon tamamlanmaktadır. Sporulasyon sonrası enfektif özellik kazanınca ookistlerin içinde, 6-8 μm boyutlarında elips şekilli iki sporokist ve her bir sporokistin içinde de yarım ay şeklinde dört adet sporozoit bulunur. Sporozoitler ağız yoluyla konak tarafından alındıklarında takizoit forma dönüşerek konak hücreleri istila etmeye başlarlar. Ookistlerin 4° C’de bir yıl boyunca enfektif özelliklerini kaybetmedikleri ve 65°C üzerindeki sıcaklıklarda ise canlılıklarını yitirdikleri bilinmektedir (Dubey et al.,1998; Gürüz ve Delibaş, 2007; Mc Leod et al., 1995).

T. gondii’nin yaşam döngüsünde Şekil 2.2.’de görüldüğü gibi kedi ile kedigiller dışındaki sıcakkanlılar (ara konaklar) olmak üzere iki farklı döngü söz konusudur. *Toxoplasma gondi* fare, koyun, sığır, insan gibi ara konaklara girdikten sonra konak hücre içinde endodiyogeni ile kısa sürede çoğalarak enfeksiyonu başlatmaktadır. Seksüel döngü ise sadece son konak olan kedilerde gerçekleşmektedir. Seksüel döngü sonrasında dışarı atılan ookistler uygun sıcaklık ve nemde sporulasyon geçirerek enfeksiyöz özellik kazanırlar. Ookistlerin ara konak tarafından alınmasından sonra takizoit ve bradizoitler oluşmaktadır. Bu

şekilde *T. gondii*'nin yaşam döngüsü devam etmektedir (Dubey et al., 1998; Kasper and Boothroyd, 1993).



Şekil 2.2. *T. gondii* hayat döngüsü (Ferguson, 2002).

2.4.2. Patogenez ve *T. gondii* antijenik proteinleri

T. gondii'nin canlılarda oluşturduğu hastalık tablosu, konak hücreleri işgal ederken kullandığı antijenik yapıdaki yüzey proteinleri ve dış ortama salgıladığı proteinler sayesinde oluşmaktadır. Bu bölümde *T. gondii*'nin antijenik proteinleri ile gerçekleştirdiği hücre işgali anlatılacaktır.

2.4.2.1. Yüzey antijenleri

T. gondii'ye ait yüzey antijenleri hücre membranı üzerinde yer almaktadır. 1980'li yıllarda SDS-PAGE kullanılarak yapılan çalışmalarda *T. gondii*'ye ait beş adet yüzey antijeni tanımlanmıştır. SAG (*surface antigen*) olarak adlandırılan bu antijenler 22, 23, 30, 35 ve 43 kDa molekül ağırlığındadır (Sibley et al., 1991). Yüzey antijenlerinin görevleri konak hücreyi işgal etmek ve konak hücrede immun sistemi uyarmaktır (Lekutis et al., 2002).

Takizoit proteinlerinin % 5'ini oluşturan ve en baskın yüzey antijeni olan SAG1 antijeninin 30 kDa ağırlığında olduğu gösterilmiştir (Kasper et al., 1983). SAG1 ekspresyonu takizoit formunda çok yoğun olmasına rağmen, sporozoit döneminde çok az düzeyde eksprese edildiği gösterilmiştir (Radke et al., 2004). SAG1 antijeninin, *T. gondii* RH suşu ile enfekte farelerde immun yanıtı oldukça güçlü biçimde uyardığı, konak hücreye bağlantı aşamasında etkin görev aldığı anlaşılmıştır. SAG1, bu özellikleri nedeniyle aşı çalışmalarında da en sık hedeflenen protein olmuştur (Marti et al., 2001). SAG1 antijeni ile yapılan aşı denemelerinde, antijenin yetişkinlere lipozom içinde veya IL-12 adjuvantı ile birlikte verildiğinde CD4 Th₁ immun yanıtı uyardığı ve toksoplazmozis hastalığına karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (Couper et al., 2003).

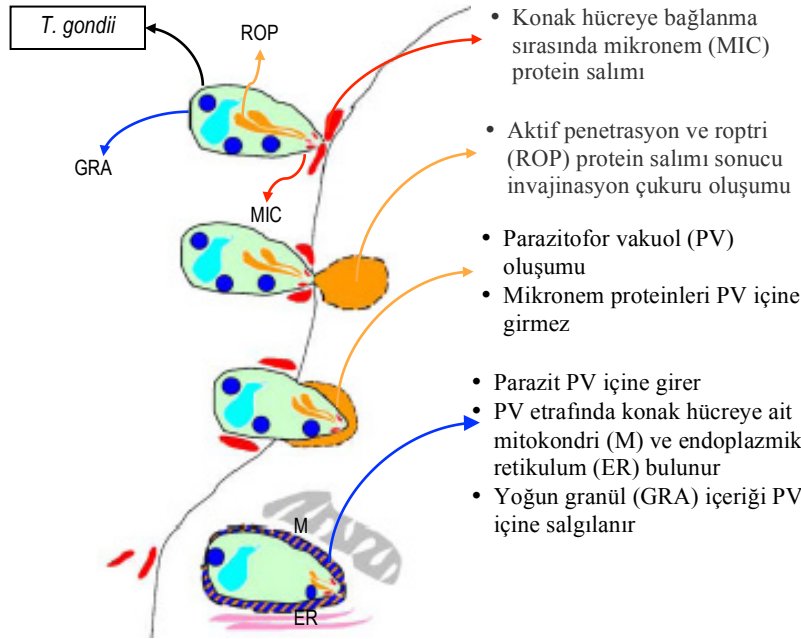
SAG2 antijeninin konak hücreye tutunma ve invazyon aşamalarında rol oynadığı, 22 kDa molekül ağırlığında bir protein olduğu bilinmektedir. SAG1 ve SAG2 eksikliğinde konak hücre invazyonun yetersiz kaldığı ve enfeksiyonun oluşmadığı görülmüştür (Lekutis et al., 2001).

43 kDa molekül ağırlığındaki SAG3 antijeninin konak hücreye bağlanmada görevli olduğu düşünülmekte, fakat görevi tam olarak bilinmemektedir. SAG3 eksikliği olan mutant *T. gondii* suşlarının daha az virulan olduğu ve SAG3'ün parazitin tüm yaşam döngüsündeki formlarda salgılandığı belirtilmiştir. SAG4 ve SAG5 yüzey antijenleri sırasıyla 36 kDa ve 23 kDa molekül ağırlığında olup fonksiyonları açığa kavuşturulamamıştır (Lekutis et al., 2001).

2.4.2.2. Diğer antijenler

T. gondii'nin yaşam döngüsü sırasında dış ortama salgılanan çok sayıda antijen bulunmaktadır. *T. gondii*'de özellikle hücre invazyonu için gerekli olan antijenlerin sentezlenmesi ve depolanması, endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı organelleri dışında, yoğun granüller, mikronem ve rhoptri adı verilen özelleşmiş organel yapılarında gerçekleşmektedir. Bu antijenler arasında, yoğun granül antijenlerini (GRA) içeren eksretuar-sekretuar antijenler, konak hücreyle apikal bölgenin teması sonrasında salınan, parazit penetrasyonu tamamlanmadan önce görev alan rhoptri proteinleri (ROP) ve konak hücreye bağlanmada görev alan

mikronem (MIC) antijenleri bulunmaktadır (Carruthers, 1999).



Şekil 2.3. *T. gondii* takizoitinin konak hücreye invazyonu (Kim, 2004).

Bazı proteinler ise parazitin formuna özgü sentezlenirler. Bradizoite özgü proteinlerden, BAG1 olarak da bilinen HSP30 (*heat shock protein*; ısı şok proteini) proteini *T. gondii* açısından önemli bir protein olmasının yanında, immunojen özelliklerinden dolayı iyi bir aşı adayı olarak da gösterilmektedir (Mohamed et al., 2003; Nielsen et al., 2006; Dautu et al., 2007). Isı şok proteinleri (HSP) protein katlanması ve proteinlerin translokasyonunda oynadığı rollerin yanında, antijen sunan hücreler ile etkileşime girerek bu hücrelerin sitokin salgılamalarını da indüklemekte, ayrıca dendritik hücrelerin olgunlaşmasını uyarmaktadırlar. Böylece hem humoral, hem de hücresel bağışıklık yanıtının gelişmesi tetiklenmektedir (Mohamed et al., 2003; Echeverria et al., 2006).

T. gondii yaşam döngüsünde sıklıkla araştırılan iki ısı şok proteini HSP30 (BAG1) ve HSP70'dir. HSP70 konak hücre ölümü gerçekleşmeden önce takizoit formunda salgılanarak makrofajlardan NO salımını düzenlemektedir. Aynı zamanda B hücrelerinden anti-HSP70 otoantikorunun üretimini sağlarken, Th₁ ve Th₂ hücre yanıtının oluşmasını da uyarmaktadır (Kikumura et al., 2010). HSP30 (BAG1) proteini ise bradizoitlerden salgılanmakta, bir yandan *T. gondii*

takizoitlerinin bradizoitlere dönüşmesini indüklerken, eş zamanlı olarak paraziti çevresel streslerden de korumaktadır (Dautu et al., 2007; Mohamed et al., 2003; Mun et al., 1999).

Ekskretuar-sekretuar antijenlerin % 2'sini oluşturan GRA1 antijeni yoğun granül proteinlerden ilk tanımlanandır. 23 kDa molekül ağırlığındaki GRA1, parazitin takizoit, bradizoit ve sporozoit dönemlerinde salgılanmaktadır. GRA1'in tam fonksiyonu bilinmemesine rağmen takizoit döneminde, hücre invazyonu esnasında parazitofor vakuol içine salındığı ve bu etkileşimle oluşan ağ sistemi içinde çözülmüş ya da bağlı olarak kaldığı izlenmiştir (Cesbron-Delauw et al., 1989; Sibley et al., 1995). GRA1'in yüksek Ca^{+2} bağlama kapasitesine sahip olduğu saptanmıştır. Hücre invazyonu esnasında stabilite sağlayan Ca^{+2} iyonunun, GRA1 tarafından sağlanması ise parazitofor vakuol homeostazını sağlama görevinin olabileceğini düşündürmektedir (Endo et al., 1982).

Ekskretuar-sekretuar antijenlerin % 1,3'ünü oluşturan GRA2 antijeninin ise 28 kDa ağırlığında olduğu ve intravakuoler membran ağının oluşmasında rol oynadığı bildirilmiştir. Farelerde yapılan bir çalışmada GRA2 eksikliği olan parazitlerle oluşan enfeksiyonda klinik belirti görülmemesine rağmen uzun süreli antikor yanıtı oluştuğu saptanmıştır. Bu durum GRA2 antijeninin akut enfeksiyon ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Mercier et al., 1998).

30 kDa ağırlığındaki GRA3 antijeninin parazitofor vakuol içinde oluşan hidrofobik etkileşimlerin düzenlenmesinden sorumlu olduğu bilinmektedir. Sırasıyla 21 kDa ve 32 kDa molekül ağırlığına sahip GRA5 ve GRA6 antijenlerinin fonksiyonları netlik kazanmamıştır (Carruthers, 1999).

29 kDa molekül ağırlığındaki GRA7 antijeninin, parazitofor vakuol yapısının düzenlenmesinde etkin olduğu ve parazitin tüm dönemlerinde eksprese edildiği saptanmıştır. Diğer GRA proteinleri parazitofor vakuolde serbest halde bulunurken, GRA7 membrana bağlı olarak tüm invazyon işlemi boyunca sabit kalmaktadır. Parazitin tüm dönemlerinde salgılandığı, konağın her zaman immun yanıt oluşturmalarını sağlamaktadır. GRA7 eksikliği olan mutant parazitlerde virulansın önemli ölçüde kaybolduğu görülmüştür (Neudeck et al., 2002).

Konak hücreye bağlanmada görevli olan mikronem proteinlerinin, konak hücreyle temas sonrası bol miktarda salgılandığı bilinmektedir. Mikronem antijenlerden olan MIC1 antijeninin 60 kDa ağırlığında olduğu ve görevinin konak hücreye tutunmak olduğu saptanmıştır (Lourenço et al., 2001). MIC2 115 kDa molekül ağırlığındadır ve konak hücreye ait laminin ve kollajen gibi ekstrasellüler matriks yapılarına tutunmada rol almaktadır. MIC2 ayrıca konak hücre membranında bulunan aktin-miyozin liflerine bağlanarak tutunmayı ve hücre içine kayma hareketi ile penetre olmayı da sağlamaktadır (Sultan et al., 1997). MIC3 antijeni 90 kDa molekül ağırlığındadır. MIC2 gibi kayma hareketi ile hücreye penetre olmayı sağlamakta ve parazitofor vakuol yapısının oluşumunda görev almaktadır (Fourmaux et al., 1996).

Rhoptri proteinlerinden ROP1, 60 kDa molekül ağırlığında bir proteindir. Fonksiyonu tam olarak bilinmemesine rağmen parazit penetrasyonunu artırıcı olduğu belirtilmektedir (Kim and Boothroyd, 1993). ROP2, 54 kDa molekül ağırlığına sahip, transmembran olarak yerleşmiş bir antijendir. Parazitofor vakuol membranı ile konak hücre organel membranlarının etkileşime girmesinde görevli olduğu belirtilmiştir. (Beckers et al., 1994). ROP5, ROP6 ve ROP7 antijenlerinin 40-60 kDa aralığında molekül ağırlıklarına sahip oldukları gösterilmiş fakat görevleri tanımlanamamıştır (Leriche and Dubremetz, 1991). ROP8 antijeni 54 kDa ağırlığında ve ROP2 ile homoloji gösteren bir proteindir. Görevi tam olarak bilinmemesine rağmen ROP2 ile çapraz reaksiyon verebileceği düşünülmektedir (El Hajj et al., 2006).

2.5. Toksoplazmozis

T. gondii tüm memelileri ve sıcak kanlı canlıları enfekte edebilen bir protozoondur. Büyükbaş ve küçükbaş hayvanlarda düşüklere neden olması ve yeni doğanların kaybına yol açması hayvancılıkta önemli bir sorun olarak bilinmektedir (Bourguin et al., 1993). Toksoplazmozis sıcak ve nemli yerlerde, kuru yerlere oranla daha sık görülmektedir. Toksoplazmozis edinsel ve konjenital olmak üzere iki farklı yolla insanlara bulaşabilmektedir:

Edinsel bulaş, ookistlerle kontamine gıdaların, suların tüketilmesi ya da

ookist bulaşmış ellerin ağız ile teması sonrasında gerçekleşebilmektedir. Ayrıca kan transfüzyonu, organ transplantasyonu ve laboratuvar kazaları da edinsel bulaş sebepleri arasındadır. Takizoitlerle bulaşma seyrek görülen bir durum olup, ancak ağız veya vücuttaki doku bütünlüğü bozulmuş noktalardan bulaşma görülebilmektedir. Konjenital bulaş, gebelik esnasında ya da gebelik öncesi 6 haftalık dönemde anne adayının akut enfeksiyon geçirmesi sonucunda oluşmaktadır. Doku kistlerinin parçalanması sonucu serbest kalan bradizoitlerin takizoit forma dönmesiyle fetüs enfekte olmaktadır (Altıntaş, 2002; Dubey, 1993).

T. gondii ile enfekte olan kişilerde gerçekleşen klinik belirtiler konak canlının immun sistemine, parazitin sayısına ve yerleştiği dokuya bağlı olarak değişmektedir. İmmun sistemi sağlam olan kişilerde genellikle belirgin klinik bulgu görülmemekle birlikte, enfekte kişilerin % 10'unda klinik belirtiler görülebilmektedir. Toksoplazmoziste görülen klinik tabloların 4 grup altında incelenmesi önerilmektedir (Beaman et al., 1995; Altıntaş, 2002; Gürüz ve Delibaş, 2007).

- İmmun sistemi sağlam kişilerde edinsel toksoplazmozis
- İmmun sistemi sağlam olmayan kişilerde edinsel toksoplazmozis
- Oküler toksoplazmozis
- Konjenital toksoplazmozis

İmmun sistemi kuvvetli olan kişilerde genellikle hiç belirti görülmeyebileceği gibi hafif ateş, baş ağrısı, halsizlik gibi grip benzeri belirtiler görülebilir. Hastalığın neden olduğu ağır tablolar bu kişilerde çok seyrek görülmektedir (Gürüz ve Delibaş, 2007).

İmmun sistemi baskılanmış veya immun yetmezlik olan kişilerde ise çok daha ciddi tablolar oluşabilmektedir. Çoğunlukla merkezi sinir sistemi ile ilgili semptomlar, meningoensefalit tablosu, bilinç kaybı, yüksek ateş, ense sertliği gibi bulgular oluşmaktadır. Bu hasta grubunda ayrıca hepatit, hepatosplenomegali, perikardit, miyokardit ve tonsillit gibi farklı klinik tablolar da gözlenebilmektedir (Altıntaş, 2002).

Oküler toksoplazmozis hem konjenital hem de oküler olabilmektedir. Retina kanamaları, görme kaybı gibi ağır tablolara neden olabilir (Gürüz ve Delibaş, 2007).

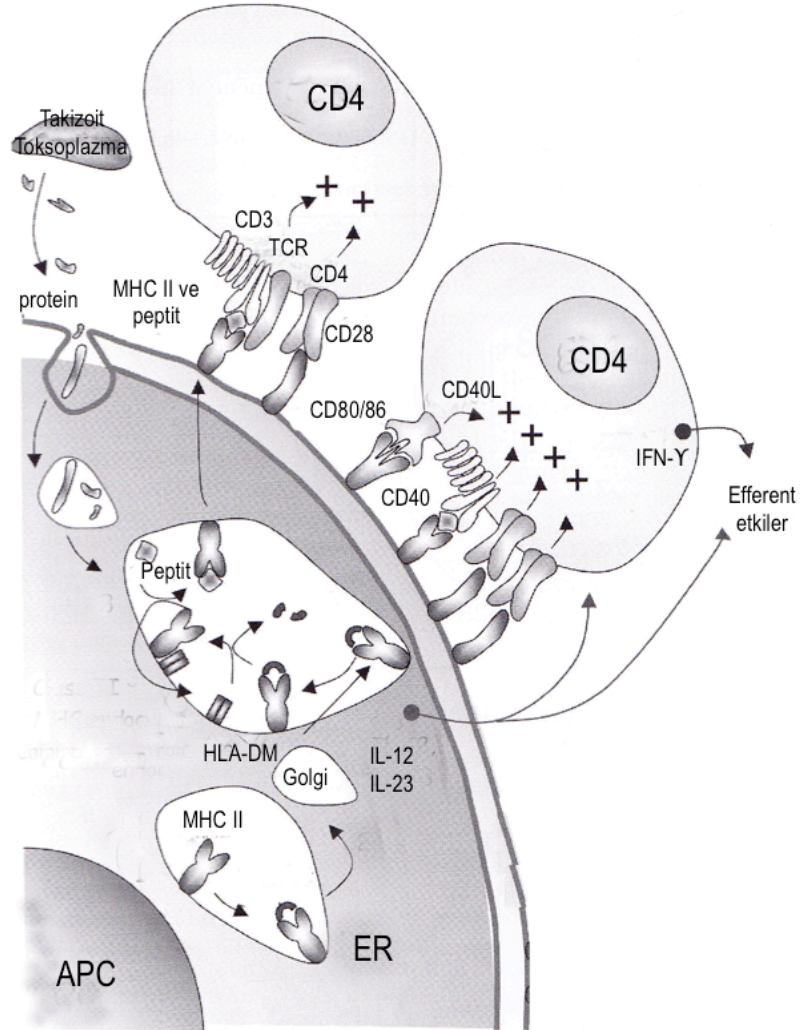
Konjenital bulaşta, enfekte plasentadan fetusa geçen parazitler, gebelik yaşına bağlı olarak fetal hasara neden olur. Gebeliğin ilk üç ayında fetusa bulaşma riski % 20 olmasına rağmen olan fetusta oluşacak hasar en ağırdır. Böyle durumlarda spontan abortus (yavru atma) görülmekte ya da fetusta ağır malformasyonlar (gelişim geriliği, hidrosefali, serebral kalsifikasyon ve konvülsiyon) gerçekleşmektedir. Gebelik ilerledikçe fetal bulaşma riski artmasına rağmen fetal hasar hafiflemektedir. Gebeliğin son üç ayındaki bulaşlarda konjenital toksoplazmozis riski yüksek, belirgin klinik tablo riski azdır (Altıntaş, 2002; Dubey, 1993; Gürüz ve Delibaş, 2007).

2.6. *T. gondii*'ye Karşı Gelişen İmmun Yanıt

T. gondii ile enfeksiyon sonucu konakta hem humoral, hem de hücrel immün yanıt oluşmaktadır. İmmün yanıtın gelişmesiyle, takizoitler immün yanıttan korunmak için bradizoitlere dönüşerek kist içinde saklanmayı tercih etmektedir. *T. gondii*'ye karşı bir aşı geliştirilebilmek için enfeksiyon sırasında oluşan immün yanıtın detaylarının bilinmesi gerekmektedir.

APC içine fagositoz ile alınan *T. gondii* antijenleri işlendikten sonra MHC II molekülleri ile birleşip (MHC II-Ag) hücre yüzeyinden sunulmaktadırlar (Şekil 2.4.). MHC II-Ag kompleksi, CD₃ TCR aracılığı ile CD₄ Th₀ hücreleri uyarması yanında, CD₂₈ reseptörü CD_{80/86} ile de uyarılmakta ve CD₄ Th₀ hücreler, CD₄ Th₁ yönüne polarize olmaktadır. Bu polarizasyonun APC'den salgılanan IL-12 ile arttığı anlaşılmıştır. CD₄ Th₁ hücrelerden salgılanan IFN- γ 'nın makrofajları uyardığı, uyarılan makrofajların da daha fazla IL-12 üretimi yaparak hücrel immün yanıtı kuvvetlendirdiği gözlemlenmiştir. APC üzerinde bulunan CD₄₀ reseptörü, CD_{40L} ligandı ile uyarıldığında APC'de CD_{80/86} ekspresyonunun arttığı, bunun sonucunda da CD₄ Th₀ hücresinin APC tarafından uyarılmasının da arttığı

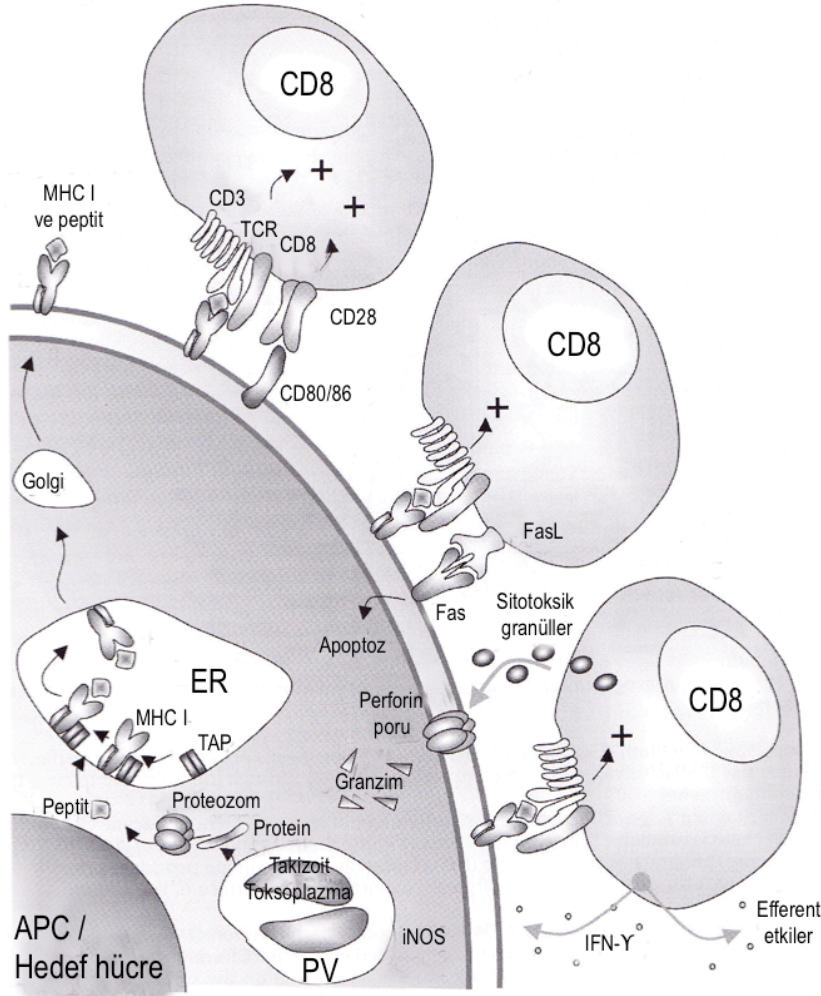
gösterilmiştir (Weiss and Kim, 2007; Gürüz ve Delibaş, 2007; Pier et al., 2004; Guiton et al., 2009).



Şekil 2.4. *T. gondii*'ye karşı oluşan CD₄ Th₁yanıtı (Weiss and Kim, 2007).

T. gondii'ye ait endojen antijenler konak hücreye salgılandıktan sonra proteozomlar tarafından peptitlere parçalandığı ve oluşan peptit parçalarının MHC I ile birleştiği anlaşılmıştır. MHC I-Ag kompleksinin CD₃ TCR aracılığı ile CD₈ hücreleri uyarması yanında CD₂₈ reseptörü CD_{80/86} ile de uyarılmakta ve uyarılan CD₈ hücrelerden perforin ve granzim gibi APC/hedef hücre için sitotoksik moleküllerin salgılandığı gözlemlenmiştir. Uyarılan CD₈ hücresinden IFN-γ salgısında da artış olmakta ve hedef hücrede INOS (uyarılabilir nitrik oksit sentaz; *inducible nitric oxide synthase*) artışı ile ölüm gerçekleşmektedir. CD₈ hücresinin *T. gondii* ile enfekte APC'yi öldürme mekanizmalarından biri ise CD₈ üzerinde

bulunan FasL ile APC'de apoptozisi uyarır (Şekil 2.5.) (Weiss and Kim, 2007; Gürüz ve Delibaş, 2007; Pier et al., 2004; Guiton et al., 2009).

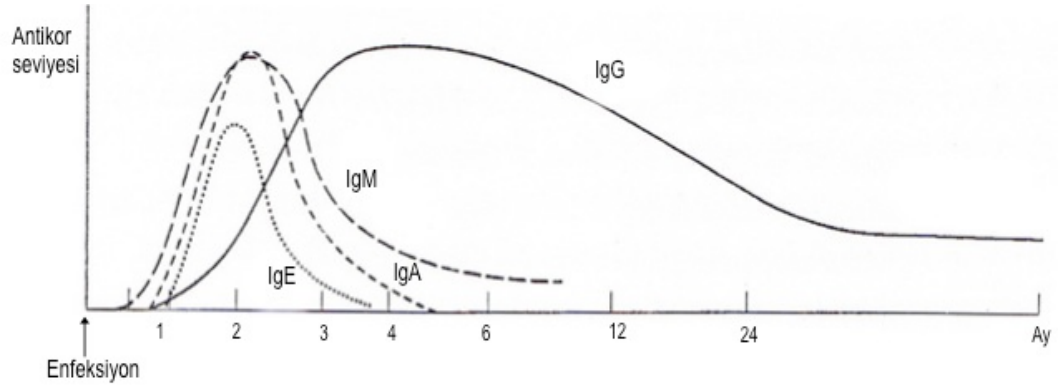


Şekil 2.5. *T. gondii*'ye karşı oluşan CD₈ yanıtı (Weiss and Kim, 2007).

T. gondii'ye karşı gelişen humoral immün yanıtta uyarılan B hücrelerden köken alana plazma hücreleri, öncelikle IgM antikor salgılaması sonrası IgA, IgE ve 10-15. günler arasında IgG antikor üretimi yapmaktadırlar. Bu antikorlar içinde IgM, IgA ve IgE salınımı bir süre sonra giderek azalmakta iken IgG salgısı ömür boyu sürmektedir (Şekil 2.6.). B hücreleri tarafından üretilen IgG antikorların takizoitlerin replikasyonunu ve intraselüler proliferasyonu önlediği belirtilmektedir (Bonenfant et al., 2001).

İmmün yanıt oluşumu göz önüne alındığında, akut toksoplazmozise karşı koruma sağlayacak bir aşının humoral immün yanıtın yanında, özellikle IFN-γ

salgılayan CD₄ Th₁ ve CD₈ T lenfositlerini uyarması beklenmektedir (Haumont et al., 2000; Jongert et al., 2008).



Şekil 2.6. *T. gondii*'ye karşı oluşan humoral immun yanıt (Joynson and Wreghitt, 2005).

2.7. *T. gondii*'ye Karşı Yapılan Aşı Çalışmaları

T. gondii'ye karşı yapılan aşı çalışmaları 1990'lu yıllardan itibaren hız kazanmıştır. Bazı çalışmalarda sadece humoral ve hücrel immun yanıt incelenirken, bazılarında da aşılama sonrası fareler enfekte edilerek yaşam süresi takibi yapılmıştır. Çalışmalar sıklıkla, parazitin yaşam döngüsünde önemli olduğu düşünülen proteinlerin rekombinant olarak elde edilmesi veya bu proteinleri kodlayan DNA aşıları ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca *T. gondii*'den izole edilerek elde edilen proteinlerden yapılan aşı geliştirme çalışmaları bulunmaktadır (Fermin et al., 1999; Velge-Roussel et al., 2000; Bonenfant et al., 2001; Yang et al., 2003). Günümüze kadar ticari olarak sadece koyunlara uygulanabilen Toxovax (Intervet Ltd.) adlı aşı üretilmiştir. Bu aşı *T. gondii* S48 suşuna ait zayıflatılmış bir aşıdır. Bu aşı kısa raf ömrü, yan etkileri, üç yıldan daha fazla koruma sağlayamaması ve insanlara karşı patojen olması gibi dezavantajlarından dolayı sahada çok kullanılmamaktadır (Haumont et al., 2000).

2.7.1. DNA aşı çalışmaları

DNA aşısı, hedef olarak kullanılacak antijenin uygun bir vektör sistemine yerleştirilmesi ile oluşturulmaktadır (Plotkin and Orenstein, 2008). Konak canlıya DNA aşısı uygulandığında, antijenik özellikteki protein sentezlenmektedir. DNA

aşılarında protein aşılarında olduğu gibi rekombinant proteinlerin, prokaryotik ekspresyon sisteminde üretilmesinde yaşanabilecek post translasyonel modifikasyonlar ve yanlış katlanma gibi sorunlar bulunmamaktadır. Bunun yanında, rekombinant proteinler ile karşılaştırıldığında DNA aşılarının en büyük avantajı, CD₈ ve CD₄ hücre yanıtını uyarak, özellikle intraselüler protozoon enfeksiyonlarına karşı koruma sağlayabilmesidir. Ayrıca miligram seviyesinde oldukça düşük miktarının immun sistemi uyarmak için yeterli olması, üretim ve soğuk zincir ihtiyacı olmadığından, ulaşım maliyetlerinin düşük olması DNA aşılarının önemli avantajları arasında sayılmaktadır (Ismael et al., 2003; Mohamed et al., 2003; Hiszczyńska-Sawicka et al., 2010).

Yapılan çalışmalarda DNA aşısının farelerde yeterli immun yanıtı uyardığı görülürken, diğer hayvanlarda ve insanlarda immun yanıtı istenen düzeyde uyaramaması, bu aşılarının günümüzdeki en büyük dezavantajıdır. Bu nedenle son yıllarda intramusküler, intranazal, intraperitoneal, gen tabancası gibi farklı aşılama yolları kullanılarak immun yanıtın daha hızlı ve belirgin bir şekilde uyarılması hedeflenmektedir. Ayrıca GM-CSF, IL-12 gibi sitokinler, mikro partiküller ve lipozomlar gibi immun yanıtı uyaran adjuvantlar DNA aşıları ile birlikte kullanılarak immun yanıtın istenen düzeye getirilmesi planlanmaktadır (Bonenfant et al., 2001; Ismael et al., 2003; Zhang et al., 2007; Hiszczyńska-Sawicka et al., 2010; Liu et al., 2010).

DNA aşı teknolojisi gelişmeye açık bir uygulama alanıdır. Ticari kullanıma sunulan DNA aşısı oldukça azdır. İlk DNA aşısı 2005 yılında, Batı Nil virüsüne karşı geliştirilerek atlarda kullanılmaya başlanmıştır. Somon balıklarında hematopoetik nekroz virüsüne karşı geliştirilen DNA aşısı da aynı yıl lisanslandırılmıştır. 2007 yılında ise köpeklerde melonamaya karşı ve domuzlarda yavru ölüm oranını düşürmeyi hedefleyen iki farklı DNA aşısı da kullanıma sunulmuştur (Kutzler and Weiner, 2008).

T. gondii'ye karşı geliştirilen DNA aşı çalışmaları Tablo 2.3.'te özetlenmiştir. Çalışmalarda konak hücreye tutunmada önemli rolü olan yüzey antijeni SAG1 proteini öne çıkmaktadır. SAG1 antijeni kodlayan plazmit ile yapılan bir çalışmada immun yanıt uyarılmış, *T. gondii* RH suşu ile yapılan

enfeksiyon sonucu % 80-100 koruma sağlandığı bildirilmiştir (Nielsen et al., 1999). Scorza et al. (2003) SAG1 ile % 70 koruma sağlandığını bildirmiştir.

Bu tez çalışmasında kullanılan GRA1 antijeni takizoit ve bradiozit evrelerinde salgılanmakta olup, iyi bir aşı adayı olarak düşünülmektedir (Vercammen et al., 2000; Scorza et al., 2003; Döşkaya et al., 2007; Jongert et al., 2007; Jongert et al., 2008; Wu et al., 2012). GRA1 proteininin fare ve insanlarda hücrel ve humoral bağışıklığı arttırdığı bilinmektedir (Scorza et al., 2003). GRA1 kodlayan plazmit ile yapılan bir çalışmada, farelerde %75-100 oranında korunma sağlandığı bildirilmiştir (Scorza et al., 2003). Ayrıca Vercammen et al. (2000) GRA1, GRA7 ve ROP2 kodlayan plazmit karışımı ile yaptıkları aşılama sonucu %50-90 oranında, Jongert et al. (2007) GRA1, GRA7 ve ROP2 kodlayan plazmit ile yaptıkları aşılama ile % 89 oranında korunma elde ettiklerini yayınlamışlardır. Jongert et al. (2008) diğer çalışmasında GRA1 ve GRA7 kodlayan plazmit ile domuzlarda immun yanıtın belirgin bir şekilde uyarıldığını bildirmiştir.

Takizoitlerin bradizoitlere dönüşmesini indükleyen, ısı şok proteini HSP30 (BAG1) proteini de immunojen özelliklerinden dolayı iyi bir aşı adayı olarak gösterilmektedir (Dautu et al., 2007; Mohamed et al., 2003; Nielsen et al., 2006). BAG1 antijeni, APC ile etkileşime girip, sitokin salgısını uyararak dendritik hücrelerin olgunlaşmasını sağlamakta ve böylece humoral ve hücrel bağışıklık yanıtın oluşmasını sağlamaktadır (Mohamed et al., 2003; Echeverria et al., 2006).

Mohamed et al. (2003) HSP70, HSP30 ve SAG1 kodlayan plazmitler ile yaptığı çalışmada en iyi korumanın HSP70 ile sağlandığını bildirmiştir. BAG1 ve MAG1 kodlayan plazmitler ile yapılan bir çalışmada, beyinde bulunan doku kistlerinde % 62 azalma saptandığı bildirilmiştir (Nielsen et al., 2006). Bir başka çalışmada MIC2, M2AP, AMA1 ve BAG1 kodlayan plazmitler arasında BAG1 kodlayan plazmit ile elde edilen korumanın %20 civarında olduğu ve diğer aşılamalara göre daha düşük seviyede kaldığı bildirilmiştir (Dautu et al., 2007).

Tablo 2.3. *T. gondii* 'ye karşı geliştirilen DNA aşısı çalışmaları

Aşı adayları	Adjuvant	Aşılama Yolu	Sonuçlar	Yazar	Yıl
SAG1 kodlayan plazmit			% 80–100 koruma sağlandı	Nielsen et al.	1999
SAG1 kodlayan plazmit		i.m.	Beyin kistlerinde kayda değer azalma görüldü	Angus et al.	2000
GRA1, GRA7, ROP2 kodlayan plazmitler		i.m.	Değişik gruplarda fare yaşam oranı % 50–90 olarak belirlendi	Vercammen et al.	2000
ROP2 kodlayan plazmit		i.m.	Sadece 2 gün fazla korunma sağlandı	Leyva et al.	2001
SAG1 ve ROP2 kodlayan plazmitler		i.m.	Kokteyl aşısı uygulanan farelerde 9–12 gün yaşam süresi görüldü	Fachado et al.	2003
GRA1 kodlayan plazmit		i.m.	% 75–100 koruma sağlandı	Scorza et al.	2003
SAG1 kodlayan plazmit		i.m.	Beyin kistleri azalırken, materno-fötal bulaşı engellemede	Couper et al.	2003
HSP70, HSP30 ve SAG1 kodlayan plazmitler		Gen tabancası/ i.m./ i.p..	En iyi kısmi koruma HSP70 ile sağlandı	Mohamed et al.	2003
MIC3 kodlayan plazmit	pGM-CSF	i.m.	Beyin kistlerinde % 67–74 azalma görüldü	Ismael et al.	2003
r-SAG1/2 kodlayan plazmit	Vet L-10	i.p.	Enfeksiyon sonrası yaşam oranı % 73 olarak elde edildi	Yang et al.	2004
BAG1 ve MAG1 kodlayan plazmit		i.m.	%62 daha az beyin kisti görüldü	Nielsen et al.	2006
GRA1 kodlayan plazmit, rGRA1 protein	Provac	i.m.	rGRA1 protein aşısı GRA1 kodlayan plazmite göre daha iyi	Döşkaya et al.	2007
GRA1, GRA7 ve ROP2 kodlayan plazmit		i.m.	Akut toksoplazmozise karşı %89 koruma , beyin kistlerinde	Jongert et al.	2007
ROP2 eksprese eden <i>Mycobacterium bovis</i>		s.c.	Kontrol grubuna göre ölüm zamanında gecikme görüldü	Wang et al.	2007
MIC2, M2AP, AMA1 ve BAG1 kodlayan		Gen tabancası	Kısmi korunma (%12,5-60 aralığında değişen koruma) sağlandı	Dautu et al.	2007
SAG1 ve ROP2 kodlayan plazmitler	IL12	i.m.	RH suşuna karşı belirgin korunma sağlandı	Zhang et al.	2007
GRA1 ve GRA7 kodlayan plazmitler		i.d.	Belirgin immun yanıt uyarıldı (humoral ve hücrel)	Jongert et al.	2008
MIC6 kodlayan plazmit		i.m.	Korunma zamanı uzadı	Peng et al.	2009
MIC3 kodlayan plazmit		i.m.	Korunma belirgin uzadı	Fang et al.	2009
SAG1 eksprese eden <i>Baculovirus</i>		i.m.	Korunma belirgin uzadı	Fang et al.	2010
GRA7 kodlayan plazmit	Lipozom	i.m.	Belirgin immun yanıtın uyarıldığı izlendi	Hiszcyńska et al.	2010
SAG1 kodlayan plazmit	IL-18	i.m.	%60 koruma elde edildi	Liu et al.	2010
SAG2 eksprese eden influenza ve adenovirus		i.n.	Beyin kistlerinde % 85 azalma görüldü	Machado et al.	2010
HSP70 kodlayan plazmit		Gen tabancası	İmmun yanıt uyarılmış, korunma zamanı uzadı	Kikumura et al.	2010
ROP18 kodlayan plazmit		i.m.	İmmun yanıt uyarılmış, korunma zamanı uzadı	Yuan et al.	2011
RON4 kodlayan plazmit ve protein	Freund	i.m.	İmmun yanıt uyarılmasına rağmen belirgin bir koruma	Rashid et al.	2011
SAG1 ve ROP2 kodlayan plazmitler		i.m.	İmmun yanıtın uyarıldığı izlendi	Khosroshahi et al.	2011
HSP70 kodlayan plazmit		Gen tabancası	Kist sayısında azalma görüldü	Makino et al.	2011
TgPLP1 kodlayan plazmit	IL-18	i.m.	Korunma zamanı uzadı	Yan et al.	2011
TgIMP1 kodlayan plazmit		i.m.	Korunma zamanı uzadı	Cui et al..	2012
SAG1 ve MIC3 plazmit karışımı		i.m.	Korunma zamanı uzadı	Fang et al.	2012
GRA1 ve SAG1 plazmit karışımı		i.m.	Humoral ve hücrel immun yanıtın uyarıldığı gözlemlendi	Wu et. al.	2012
GRA7 ve ROP1 kodlayan plazmitler	IL-12	i.m.	Korunma zamanı uzadı, immun yanıtın uyarıldığı izlendi	Quan J. et al.	2012

i.m.: İntramuskuler, kas içine; i.p.: İntraperitoneal, periton içine; s.c. Subkutan, derialtına; i.n.: İntranazal, burun içine; i.d. İntradermal, deri içine

2.7.2. Rekombinant protein aşı çalışmaları

Rekombinant protein aşıları immunojenik özellikteki hedef antijenlerin heterolog ekspresyon sistemlerinde (bakteri, maya, virüs veya memeli hücre) üretilmesiyle elde edilmektedir. Bu amaçla ilk olarak antijenik protein saptadıktan sonra bu proteini eksprese etmek amacıyla gen dizilimi belirlenmektedir. Daha sonra antijenik proteini kodlayan gen bölgesi mikroorganizmadan izole edilmekte ve ekspresyon vektörü klonlama bölgesine eklenmektedir. Bir sonraki aşamada vektör, ekspresyon sistemine aktarılmaktadır (Andersson, 2000).

Ekspresyon sistemi olarak bakteri, maya, virüs (*Baculovirus*) veya memeli hücre kültürü seçilebilmektedir. Ekspresyon sisteminin seçiminde hedef proteinin biyolojik ve biyokimyasal özelliği, miktarı, post translasyonel modifikasyon gerekliliği, hedef proteinin proteolitik stabilitesi ve salgılanma şekli, yanlış katlanmış proteinlerin tekrar katlanması gibi faktörler önemlidir. Bakteriyel sistemlerin en önemli avantajı yüksek miktarlarda antijen üretimini sağlayabilmesidir. Post translasyonel modifikasyona ihtiyaç duymayan antijenler, bakteriyel sistemlerde üretilmektedir. Bu amaçla en çok kullanılan bakteri, üretimi kolay, genetik ve fizyolojik olarak iyi tanımlanmış, ekspresyon verimliliği yüksek olan *Escherichia coli* (*E. coli*) hücreleridir. Ökaryotik ekspresyon sistemleri arasında da *Saccharomyces cerevisiae* adlı maya sıklıkla kullanılmaktadır. Bu sistemlerde fosforilasyon, glikozilasyon gibi post translasyonel modifikasyonlar gerçekleşmekte ve ayrıca yüksek molekül ağırlıklı proteinler eksprese edilebilmektedir. Bakteriyel sistemlerde olduğu gibi verim yüksek ve maliyet düşüktür (Hansson et al., 2000).

Baculovirus kullanılan ekspresyon sistemlerinde böcek hücre kültürü ortamı kullanılmaktadır. Maliyet bakteri ve maya ekspresyon sistemlerine göre biraz daha yüksek olup, sonuçlar daha uzun sürede alınmaktadır. En önemli avantajı, ökaryotik hücreler kullanıldığından post translasyonel modifikasyonların mümkün olması ve yüksek verimde protein elde edilebilmesidir. Memeli hücre kültürlerinin avantajı ise glikozilasyonu doğru bir şekilde gerçekleştirebilmesi ve yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin üretimini sağlayabilmesidir. Buna rağmen

yüksek maliyet, düşük verim ve zaman isteyen işlemlerden dolayı memeli hücre kültürlerinin kullanımı yaygınlaşmamıştır (Andersson, 2000).

Ekspresyon sisteminde üretilen rekombinant proteinlerin hücre içi veya hücre dışına salgılanma durumuna göre santrifüjleme, homojenizasyon, ultrafiltrasyon ve kromatografi gibi saflaştırma basamaklarından geçirilmesi önemlidir (Andersson, 2000; Hansson et al., 2000).

Rekombinant protein aşılarının avantajları arasında güvenli olması, sadece hedef antijen ile immun sistemin uyarılması, farklı üretim sistemlerinde büyük ölçekli üretilmesi ve geliştirilmeye müsait olması sayılmaktadır. En önemli dezavantajının ise immun sistem uyarımında antijenik proteinin tek başına yeterli olamaması, ek adjuvant kullanımı ile tekrarlayan dozlara gereksinim duyulması sayılabilir (Zafar).

T. gondii'ye karşı yapılan rekombinant protein aşı çalışmaları Tablo 2.4.'te özetlenmiştir. DNA aşı çalışmalarında olduğu gibi rekombinant protein aşı çalışmalarında da özellikle SAG1 proteininin kullanıldığı görülmektedir. Rekombinant SAG1 proteini ve adjuvant olarak IL-12 sitokini kullanılan bir çalışmada baskın IgG₁ antikor yanıtı yanında, IgG_{2a} antikor yanıtının da oluştuğu ve beyinde doku kisti sayısında %40 oranında azalma olduğu saptanmıştır (Letscher Bru et al., 1998). Fermin et al. (1999) rekombinant SAG1 proteini ve adjuvant olarak salbutamol veya kolera toksin kullandıkları çalışmada beyindeki doku kisti sayılarında sırasıyla % 80 ve % 60 oranında azalma olduğunu saptamışlardır. Mishima et al. (2001) SAG2, SRS1 ve P54 antijenlerini Freund adjuvantı ile karıştırarak elde ettikleri aşının *T. gondii* Beverley suşu bradizoitleri ile enfekte edilen farelerde %100 korunma sağladığını bildirmişlerdir. Letscher Bru et al. (2003) adjuvant kullanmadan yaptıkları rekombinant SAG1 aşısında IgG₁ antikor yanıtının yükseldiğini, IFN- γ üretiminin arttığını ve BALB/c farelerde anneden yavruya maternofetal geçişin azaldığını saptamışlardır. Ayrıca SAG1 ile yapılan diğer rekombinant protein aşı denemelerinde farelerde % 70 üzerinde koruma sağlandığı bildirilmiştir (Debard et al., 1996; Velge- Roussel, 2000; Haumont et al., 2000; Bonenfant et al., 2001).

Rekombinant GRA1 ile aşı çalışmaları yapılmış olmasına rağmen rekombinant BAG1 ile *T. gondii*'ye karşı gerçekleştirilmiş bir aşı çalışması literatürde bulunmamaktadır. Supply et al. (1999) rekombinant GRA1 proteinini zayıflatılmış *Mycobacterium bovis* suşu olan BCG bakterilerinde eksprese etmiş, elde edilen rekombinant GRA1 proteinini Freund adjuvantı ile birleştirerek OF1 farelere ve adjuvantsız olarak koyunlara uygulamışlardır. Rekombinant GRA1 aşısının farelerde yaşam süresini bir miktar uzattığı, koyunlarda ise parazitemi süresini kısalttığı bildirilmiştir (Supply et al., 1999). Döşkaya et al. (2007) GRA1 kodlayan plazmit ve rekombinant GRA1 protein aşısının uygulandığı karşılaştırmalı çalışmada, rekombinant GRA1 proteinini Provax adjuvantı ile kombine ederek BALB/c farelere uygulamışlardır. Protein aşı uygulaması sonrası IgG₁ antikor yanıtının IgG_{2a} antikor yanıtına göre daha yüksek olduğunu, GRA1 DNA aşısı ile uygulama sonrası IgG_{2a} antikor yanıtının IgG₁ antikor yanıtına göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Rekombinant protein aşısının, DNA aşısına göre daha yüksek oranda IFN- γ salgılanmasına sebep olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada *T. gondii* RH suşu ile enfekte edilen farelerde rekombinant protein ile elde edilen korumanın, GRA1 DNA aşısı ile elde edilen korumaya göre daha iyi olduğunu bildirilmiştir (Döşkaya et al., 2007).

DNA ve rekombinant protein aşı çalışmaları son yıllarda daha da hızlanmıştır. Ticari olarak medikal kullanıma sunulan herhangi bir DNA aşısı olmamasına rağmen, uzun yıllardır insanlar için kullanılan rekombinant protein aşıları bulunmaktadır. Hepatit B'ye karşı maya ekspresyon sistemi kullanılarak geliştirilmiş rekombinant aşı 1981 yılından beri kullanılmaktadır. Difteriye karşı toksoit aşı, koleraya karşı bakterin ile birlikte kombine kullanılan rekombinant kolera toksini aşısı mevcuttur. Ayrıca tetanoza karşı, difteri aşısında olduğu gibi rekombinant toksoit aşı geliştirilmiştir. HPV enfeksiyonlarına karşı geliştirilen rekombinant protein aşısı da 2006 yılında lisans alarak kullanıma sunulmuştur (BVGH, 2012). DNA aşılarının avantajları oldukça fazla olsa da yeterli immun yanıtın sağlanamaması rekombinant protein aşılarını öne çıkartmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada rekombinant BAG1 ve GRA1 proteinleri alüminyum hidroksit adjuvantı ile birleştirilerek geliştirilen multivalan rekombinant protein aşısı ilk defa farelere uygulanmış, oluşan immun yanıt ve korunma incelenmiştir.

Tablo 2.4. *T. gondii*'ye karşı geliştirilen rekombinant protein aşı çalışmaları

Aşı adayları	Ekspresyon Sistemi	Adjuvant	Aşılama Yolu	Sonuçlar	Yazar	Yılı
rSAG1 proteini	<i>E.coli</i>	Alum		11. günde canlı fare oranı %55.6 olarak saptandı	Petersen et al.	1998
rSAG1 proteini	<i>E.coli</i>	IL-12		Beyin kistlerinde % 40 azalma görüldü	Letscher Bru et al.	1998
GRA1 antijeni üreten BCG ve rGST-GRA1 proteini	<i>E.coli</i>	Freund	i.p.	12. günde canlı fare oranı % 10 olarak saptandı	Supply et al.	1999
rSAG1	<i>P. pastoris</i>	SBA51	s.c.	Materno-fötal bulaştan % 70 koruma sağlandı	Haumont et al.	2000
SAG1, SAG2, SAG3, SRS1, P54 ve karışımları	<i>E. coli</i>	Freund	i.p.	İmmun yanıt uyarıldı, beyinde kist oluşumu görülmedi	Mishima et. al	2001
rSAG1	<i>E.coli</i>		s.c.	Fare yavruları toksoplazmozise karşı %50 korundu	Letscher Bru et al.	2003
rGRA4, r-ROP2 ve karışımı	<i>E.coli</i>	Alum	i.m.	GRA4 ile daha az beyin kisti saptandı	Martin et al.	2004
ROP2-Hsp83 füzyon proteini	<i>E.coli</i>	HSP83	Ayak tabanı	Yaşam süresi uzadı	Echeverria et al.	2006
SAG1-GRA2 füzyon proteini	<i>P. pastoris</i>	Freund	s.c.	Korunma zamanı uzadı	Zhou et al.	2007
rGRA1 protein	<i>E.coli</i>	Provax	i.m.	rGRA1 protein aşısı GRA1 kodlayan plazmite göre daha iyi korudu	Döşkaya et al.	2007
rROP2	<i>Mycobacterium bovis</i> BCG		s.c.	Kontrol grubuna göre ölüm zamanında gecikme görüldü	Wang et al.	2007
rROP2 ve rROP4 proteinleri	<i>E.coli</i>	Freund	s.c.	Beyin kistlerinde %40 azalma saptandı	Dziadek et al.	2009
rSAG1	<i>Baculovirus</i>		i.m.	Korunma belirgin uzadı	Fang et al.	2010
rSAG2	<i>Influenza ve Adenovirus</i>		i.n.	Beyin kistlerinde % 85 azalma saptandı	Machado et al.	2010
rRON4 proteini	<i>E.coli</i>	Freund	i.m.	İmmun yanıt uyarılmasına rağmen belirgin bir koruma sağlanamadı	Rashid et al.	2011
rROP2 ve rGRA4 protein karışımı	<i>E.coli</i>	Cpg-ODN	i.m.	Beyin kistlerinde % 62–63 azalma görüldü	Sanchez-Vizcaino et al.	2011
rROP2, rROP4, rGRA4 ve rSAG1 protein karışımları	<i>E.coli</i>	Freund	s.c.	%77-84 oranında kist azalması görüldü, immün yanıt uyarıldı	Dziadek et al.	2012
rGRA7 protein	<i>E.coli</i>		s.c. / i.m.	DNA sonrası protein aşılması daha yüksek immün yanıt oluştu	Min J. et al.	2012

i.m.: İntramusküler, kas içine; i.p.: İntraperitoneal, periton içine; s.c.: Subkutan, derialtına; i.n.: İntranazal, burun içine; i.d.: İntradermal, deri içine

3. MATERYAL VE METOT

Yapılan tüm deneylerde kullanılan metotlar aşağıda ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Çalışmalar boyunca kullanılan kimyasallar aksi belirtilmedikçe “Applichem (Almanya)” adlı firmadan satın alınmıştır.

3.1. Araştırma Sırasında Kullanılan Deney Hayvanları

Bu çalışmada 6-8 haftalık dişi *Swiss out-bred* fareler kullanılmıştır. Araştırma sırasında kullanılan fareler Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü’nden temin edilmiştir. Fareler, etik kurallara uygun şartlarda bakılıp beslenmiştir. Bu aşı çalışmasının deneysel planı Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Onay No: 2011/159).

3.2. BAG1 ve GRA1 Geni İçeren Plazmitlerin BL21 Star (DE3) pLysS Hücrelere Klonlanması

Rekombinant BAG1 ve GRA1 proteinlerini eksprese eden pET28a/BAG1 ve pET28a/GRA1 plazmitleri Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı çalışanlarından Doç Dr. Mert Döşkaya’nın izni ile kullanılmıştır. pET28a/BAG1 ve pET28a/GRA1 plazmitlerinin gen dizilimleri Tablo 3.1. ve 3.2.’de verilmiştir. pET28a/BAG1 ve pET28a/GRA1 *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS kimyasal kompetent hücrelere (Invitrogen, A.B.D.) tarif edildiği gibi aktarılmıştır:

Tablo 3.1. Rekombinant BAG1 proteinin üretimini sağlayan pET28a/BAG1 vektörü gen (A) ve protein (B) sekansları (GeneBank No: X82213)

A)pET28a/BAG1 vektöründe yer alan BAG1 genini içeren ORF bölgesi (846 bp)*

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGC
CATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTGCGGGATCCGAATTCGAGCTC
GCGCCGTCAGCATCGCATCCGCCGGGAGCTTGTCCACCGGGATGTACCAAGCATCCTG
CTACTGCGACAGCCATTTCCCCGAGTGGAGTGTGTCCCATGCGTGCGTTCCATCCCCG
GGGGCCTCACTCACATTTCTCATGTACGATGATCTCAGAAATAGGCTGAGTCACGAC
AAAAATGTTTCGACCGGTGCGCTCTCAACAGCTAGACTATTTGGATGAAGTAAGCCCGT
TTGCTCTGGCGTACTACCTCCCCCGTTTTGGGGTGGAGTCGGTCTTAATCCCATCGAC
GATATGTTGTTTCGAGACGGCCCTCACCGCAAACGAAATGATGGAGGACATCACGTGG
AGACCCAGAGTCGACGTGGAGTTCGACAGCAAAAAGAAGGAAATGATTATTTTGGCT
GACTTGCCAGGTCTTCAGAAAGATGACGTAACCATAGAAAGTCGACAACGGAGCCATC
GTTATCAAAGGAGAGAAGACCTCGAAAGAAGCGGAGAAAGTGGACGATGGCAAAAC
AAAGAACATTTTACTGAGCGAGTGTCCGGTTATTTGCGCGCCGGTTCCAGCTCCCG
AGTAATTACAAGCCCGACGGAATCAGTGCGGCAATGGACAACGGCGTTCTACGTGTC
ACGATCAAGGTCGAGGATTCAGGGGGCGCAAAGCAACAAATCAGCGTGAAGGTCGA
CAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

B)pET28a/BAG1 vektörü ORF bölgesinin kodladığı protein (281 aminoasit) **

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFELAPSASHPPGACPPGCTKHPAT
ATAISPSGVCPMRAFHAPGPHSHFSCYDDLRLNRLSHDKNVRPVASQQLDYLDEVSPFALA
YPPPFWGGVGLNPIDDMLFETALTANEMMEDITWRPRVDVEFDSKKKEMILADLPGLQ
KDDVTIEVDNGAIVIKGEKTSKEAEKVDDGKTKNILTERVSGYFARRFQLPSNYKPDGISA
AMDNGVLRVTIKVEDSGGAKQKQISVKVDKLAALHHHHHH-

* kırmızı renkli kısım 684 bp büyüklüğündeki BAG1 genine aittir.

** kırmızı renkli kısım 228 aminoasitten oluşan BAG1 proteinine, yeşil kısımlar histidin bölgelerine (2 adet, her birisi 6 aminoasit) aittir.

Tablo 3.2. Rekombinant GRA1 proteinin üretimini sağlayan pET28a/GRA1 vektörü gen (A) ve protein (B) sekansları (GeneBank No: M26007)

A)pET28a/GRA1 vektöründe yer alan GRA1 genini içeren ORF bölgesi (663 bp)*

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGC
CATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTGCGGGATCCGAATTCGAGCTC
ATGGCCGAAGGCGGCGACAACCAAGTCGAGCGCCGTCTCAGATCGGGCGTCTCTCTTT
GGTTTGCTGAGTGGAGGGACAGGGCAGGGATTAGGAATCGGAGAATCTGTAGATTTG
GAGATGATGGGGAACACGTATCGTGTGGAGAGACCCACAGGCAACCCGACTTGCTC
AAGATCGCCATTAAAGCTTCAGATGGATCGTACAGCGAAGTCGGCAATGTTAACGTG
GAGGAGGTGATTGATACTATGAAAAGCATGCAGAGGGACGAGGACATTTTCCTTCGT
GCGTTGAACAAAGGCGAAACAGTAGAGGAAGCGATCGAAGACGTGGCTCAAGCAGA
AGGGCTTAATTCGGAGCAAACCCTGCAACTGGAAGATGCAGTGAGCGCGGTGGCGTC
TGTTGTTCAAGACGAGATGAAGGTGATCGACGATGTGCAGCAGCTTGAAAAGGACAA
ACAACAGCTTAAGGATGACATTGGGTTCTTAACAGGAGAGAGAGAGGTCGACAAGCT
TGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

B)pET28a/GRA1 vektörü ORF bölgesinin kodladığı protein (220 aminoasit) **

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFELMAEGGDNQSSAVSDRASLFG
LLSGGTGQGLGIGESVDLEMMGNTYRVERPTGNPDLLKIAIKASDGSYSEVGNVNVEEVI
DTMKSMQRDEDIFLRALNKGETVEEAIEDVAQAEGLNSEQLQLEDAVSASVVDDEM
KVIDDVQQLKDKQQLKDDIGFLTGEREVDKLAALHHHHHH-

* kırmızı renkli kısım 501 bp büyüklüğündeki GRA1 genine aittir.

** kırmızı renkli kısım 167 aminoasitten oluşan GRA1 proteinine, yeşil kısımlar histidin bölgelerine (2 adet, her birisi 6 aminoasit) aittir.

- 50 µL *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS hücreleri ve 50 ng pET28a/BAG1 veya pET28a/GRA1 plazmitleri buz üzerinde karıştırılmış ve 30 dakika inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrasında karışım, 42°C’de 30 saniye termal şoka uğratılmış ve 2 dakika buz üzerinde inkübe edilmişlerdir.
- Karışıma hemen 250 µL SOC (*super optimal broth with catabolite repression*, Invitrogen, A.B.D.) besin ortamı eklenmiş, 225 rpm (*rounds per minute*: dakikadaki devir sayısı) ile 1 saat boyunca 37°C’de inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrasında, final konsantrasyonu 50 µg/ml kanamisin olan LB-agar petri plaklarına (25 g/L Luria Bertani (LB) besin ortamı ve 15 g/L agar içeren LB agar) 50 µl bakteri ekilmiştir.
- Plaklar 37°C’de, bir gece boyunca koloni oluşumu için inkübe edilmiştir.
- Ertesi gün gözlemlenen petri plaklarından 3 tek koloni seçilmiş, 50 µg/ml kanamisin ve 34 µg/ml kloramfenikol içeren 3 ml LB sıvı besin ortamına aktararak gece boyunca 37°C’de, 250 rpm ile çalkanarak inkübe edilmiştir.
- Üreme oluşan tüplerden alınan 1 ml üzerine % 30 gliserol 1:1 oranında ilave edilmiş, homojenize edilerek kriyo tüplere aktarılmış ve derin dondurucuda (-80°C) stoklanmıştır.
- Geri kalan 2 ml üreme olmuş besin ortamından pET28a/BAG1 ve pET28a/GRA1 plazmitleri saflaştırma kiti ile üretici firmanın protokolüne göre (Qiagen, Almanya) izole edilmiştir. Elde edilen ürünler agaroz jelde (% 1 sol.) [100 ml TAE (Tris-acetate-EDTA) tampon içine 1 gram agaroz konularak hazırlanır] 80 V’da ortalama 50 dk yürütülerek (Bio-Rad, A.B.D.), UV ışık altında görüntülenmiştir.
- Örnekler ve DNA merdiveni (*Gene Ruler DNA Ladder Mix*, Fermentas, A.B.D.) yükleme sırasında 6× bromfenol mavisi içeren örnek tamponu (% 30 gliserol, % 0,25 bromfenol mavisi) kullanılmıştır.

3.3. *T. gondii* BAG1 ve GRA1 Rekombinant Proteinlerin Ekspresyonunun Optimizasyonu

Transformasyon sonucu elde edilen hücrelerin üretim şartlarının ve protein üretiminin optimizasyonu için küçük ölçekli deneme üretimleri

gerçekleştirilmiştir.

- 50 µg/ml kanamisin ve 50 µg/ml kloramfenikol içeren 10 ml LB besin ortamına inokule edilen pET28a/BAG1 ve pET28a/GRA1 içeren *E.coli* hücreleri 16-24 saat boyunca 37°C’de 250 rpm ile çalkanarak inkübe edilmiştir.
- Süre sonunda üreyen hücreler 50 µg/ml kanamisin ve 50 µg/ml kloramfenikol içeren Tablo 3.3.’teki üretim amaçlı 40 ml besin ortamlarına eklenmiştir.
- Ekim sonrası OD₆₀₀ (600 nm’de algılanan optik dansite) takibi yapılmış, besi ortamının OD₆₀₀ değeri 0,4’ü geçtiği zaman, *E. coli* hücreleri son konsantrasyon 0.5 mM olacak şekilde *isopropil-β-D-tiogalactopiranoside* (IPTG) ile uyarılmıştır.
- IPTG eklendikten sonra 37°C’de 4 saat veya 18-22°C’de gece boyunca 250 rpm ile çalkanarak inkübe edilen besin ortamından ilk dört saat başında ve son saatte örnekler alınmıştır. Alınan örnekler 5000×g’de, 10 dk santrifüjlenmiş, pelletler ayrılmıştır.
- Son saat örneklerine ait pelletler % 0,1 Triton X-100 içeren 50 mM Tris-Cl ve 0,3 M NaCl (pH: 7,5) tamponu ile sulandırılmış, 30 dk buz üzerinde bekletildikten sonra 5000×g’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen üst sıvıdan “*The Qiaexpressionist*” (Qiagen, Almanya) saflaştırma kiti ile üretici firmanın protokolüne göre küçük ölçekli saflaştırma yapılmıştır.
- Saat başları alınan örnekler ve saflaştırılan son saat örneklerine SDS-PAGE ve Western Blot uygulanmıştır (Ayrıntılı metot Bölüm 3.6’da anlatılmıştır).
- SDS-PAGE ve Western Blot uygulamaları sonrası, saf ve bol miktarda protein elde edilen ekspresyon ortamı büyük ölçekli üretimde kullanılmıştır.

3.4.Rekombinant BAG1 ve GRA1 Proteinlerinin Büyük Ölçekli Ekspresyonu

Küçük ölçekli optimizasyon çalışmaları sonrasında büyük ölçekli üretime geçilmiştir. Üretimler oksijen havalandırmalı biyoreaktörde (BioFlo 110, New Brunswick, A.B.D.), 10 litrelik besin ortamında gerçekleştirilmiştir.

- Transformasyon sonrası pET28a/BAG1 veya pET28a/GRA1 plazmitleri içeren hücre stoklarından alınan örnek, 50 µg/ml kanamisin ve 50 µg/ml kloramfenikol içeren 500 ml LB besin ortamına eklenmiş, 37°C’de bir gece boyunca 225 rpm’de karıştırılarak inkübe edilmiştir.
- Ertesi gün biyoreaktörde 50 µg/ml kanamisin içeren 9,5 litre üretim besin ortamına (içeriği Tablo 3.3.’te tarif edilmiştir) 500 ml gecelik kültür eklenmiştir.
- Daha sonra 37°C, pH 7’de, sürekli 2-5 LPM (*liter per minute*; dakikada verilen hava litresi) oksijen uygulanan besin ortamı 400 rpm devirle karıştırılarak inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon süresince OD₆₀₀ nm’de üreme takip edilmiş ve optik dansite 0,4’e ulaşınca, ortama 0,5 mM final konsantrasyonda IPTG ilave edilmiş ve sıcaklık 18°C’ye ayarlanarak gece boyunca inkübe edilmiştir.
- Ertesi gün üretim sonlandırılmış, hücreler yer tipi soğutmalı santrifüjde (Kubota, Japonya) 5000×g’de, 10 dk, 4°C’de santrifüj edilerek toplanmıştır.

Tablo 3.3. Üretim besin ortamı içeriği

Kimyasallar	Son Konsantrasyon
KH ₂ PO ₄	2 g/L
K ₂ HPO ₄	3 g/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄ (Merck)	5 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g/l
Glukoz	25 g/L
Maya ekstraktı	5 g/L
Köpük kırıcı (Sigma Aldrich)	0,35-0,4 ml/L
Tiamin	1 mg/L
İz Elementler	Son Konsantrasyon
FeCl ₃ .6H ₂ O	4,75 g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,4 g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1 g/L
MoNa ₂ O ₄ .2H ₂ O	0,5 g/L
BH ₃ O ₃	0,575 g/L
6N H ₂ SO ₄	12,5 ml/L
MnCl ₂ . 4H ₂ O	4 g/L
NaCl	5 g/L

3.5. Rekombinant GRA1 ve BAG1 Proteinlerinin Saflaştırılması

Toplanan hücreler saflaştırma basamaklarından geçirilerek rekombinant BAG1 (rBAG1) ve rekombinant GRA1 (rGRA1) proteinleri saf olarak elde edilmiştir. Bu basamaklar aşağıda anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir (Döşkaya ve Gürüz, 2011).

3.5.1. Hücrelerin yıkılması

- Santrifüj sonrası elde edilen hücre pelletleri 200 ml resüspansiyon tamponu (50mM Tris-Cl, 0,3 M NaCl, pH: 7,5) ile buz üzerinde çözündürülmüştür.
- Çözünen hücreler parçalayıcı karıştırıcı (blender) (Waring, A.B.D.) ile 10-15 saniye boyunca homojenize edilmiş ve toplam hacim resüspansiyon tamponu ile 1 litreye tamamlanmıştır.
- Homojenize hücreler 18,000 psi basınç altında, soğutmalı ortamda 2 kere yüksek basınçlı homojenizatörden (*Microfluidizer*, Microfluidics M110 L Pneumatic, A.B.D.) geçirilmiştir.
- Yıkılmış hücreleri içeren süspansiyon 30000×g'de, 30 dk boyunca, 4°C'de santrifüj edilip, üst sıvı delik çapı 0,45 µm olan düşük protein bağlama kapasiteli selüloz asetat filtreden (Corning, Meksika) geçirilmiştir.

3.5.2. HiTrap Ni²⁺ şelasyon HP kolonu ile saflaştırma (afinite kolonu);

Protein saflaştırılması sırasında ÄKTA hızlı protein sıvı kromatografi cihazı (FPLC: *fast protein liquid chromatography*) ve UNICORN programı kullanılmıştır (GE Health, A.B.D.).

Saflaştırma afinite (HiTrap Ni²⁺ şelasyon HP kolonu, GE Health A.B.D.) ve jel filtrasyon kolonları (Superdex 200/10-300 GL, GE Health, A.B.D.) kullanılarak 4°C'de gerçekleştirilmiştir.:

- Öncelikle 5 ml histidin bağlayan afinite kolonu sırasıyla 20 ml distile su, 5 ml 100 mM NiSO₄ ve tekrar 20 ml distile su geçirilerek rejenere edilmiştir.

- İkinci aşamada kolon resüspansiyon tamponu (50mM Tris-Cl, 0,3 M NaCl, pH: 7,5) ve yıkama tamponu (500 mM imidazol, 50mM Tris-Cl, 0,3 M NaCl, pH 7,5) ile yıkanarak ortama alıştırılmıştır.
- Daha sonra filtreden geçirilen üst sıvıdan ortalama 100 ml kolona yüklenmiştir.
- Yükleme sonrası kolon, resüspansiyon tamponuyla yabancı proteinler azalıncaya kadar 4°C’de yıkanmıştır.
- Yıkama sonrası rBAG1 veya rGRA1 proteinlerini kolondan serbestleştirmek için kolon 375 mM konsantrasyonda imidazol içeren 50 mM Tris-Cl, 0,3 M NaCl (pH: 7,5) tampon ile 4°C’de yıkanmıştır.
- Kolondan serbestleşen proteinler UV280 ile görüntülenmiş ve fraksiyon toplayıcı ile toplanmıştır.

Bu aşamada elde edilen proteinler SDS-PAGE ve Western Blot ile Bölüm 3.6.’da anlatıldığı gibi görüntülenmiştir. Saf proteinler 10000 Dalton (MWCO) delik çaplı polietersülfon santrifüj filtreleri (Vivaspin 20, Sartorius, Almanya) kullanılarak 4°C’de, 8000×g ile yaklaşık 1-2 ml hacme ulaşılınca kadar konsantre edilmiştir.

3.5.3. Jel filtrasyon kolonu ile saflaştırma

Konsantre edilen rBAG1 ve rGRA1 proteinleri molekül ağırlıklarına göre saflaştırılmaları için, Superdex 200/10-300 GL (10000-600000 MWCO) jel filtrasyon kolonuna yüklenmiştir.

- Bu işlem sırasında öncelikle kolon 50 mM Tris-Cl, 80 mM (NH₄)₂SO₄ (pH: 7,5) içeren tamponla yıkanmıştır.
- Daha sonra örnekler 0,75 ml/dk akış hızı ile kolona yıkama tamponu kullanılarak yüklenmiştir.
- Kolonda molekül ağırlıklarına göre ayrılan proteinler UV280 ile görüntülenmiş ve fraksiyon toplayıcı ile toplanmıştır.

Bu aşamada elde edilen proteinler SDS-PAGE ve Western Blot ile Bölüm 3.6.’da anlatıldığı gibi görüntülenmiştir. Saf proteinler 10000 Dalton (MWCO)

gözenek çaplı polietersülfon santrifüj filtreleri (Vivaspin 20, Sartorius, Almanya) kullanılarak 4°C’de 8000×g ile yaklaşık 1 ml hacme ulaşıncaya kadar konsantre edilmiştir. Elde edilen proteinler kullanıma kadar derin dondurucuda (-80°C) tutulmuştur.

3.6. Saflaştırma Sonrası Rekombinant GRA1 ve BAG1 Proteinlerinin Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ve Western Blot Kullanılarak Gösterilmesi

Konsantre edilmiş proteinler % 12 SDS-PAGE ile ayrıştırılmış ve Western Blot uygulanarak incelenmiştir.

3.6.1. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE)

SDS-PAGE sırasında öncelikle ayırıcı jel, sonrasında yığıcı jel hazırlanmış ve örnekler bu jellere yüklenerek proteinler ayrıştırılmıştır.

3.6.1.1. Ayırıcı (alt) jelin hazırlanması

- Ayırıcı jel karışımı (% 12), 3,2 ml akrilamid (% 30 sol.), 2 ml 0,45 µm filtreden geçirilmiş alt jel tamponu [1,5 M Tris-Cl, pH: 8,8 ve % 0,4 SDS (w/v) karışımı], 2,8 ml distile su, 40 µL % 10 (w/v) amonyum persülfat ve 8 µL TEMED (*tetramethylethylenediamine*) karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım hızlıca, transfer pipeti ile üretici firmanın (Bio-Rad, A.B.D.) tarifine göre hazırlanan iki cam arasına aktarılmıştır.
- Karışım üzerine 200 µL distile su eklenmiş, oda sıcaklığında, 20 dakika boyunca polimerizasyonun gerçekleşerek jelin donması beklenmiştir.
- Polimerizasyon sonrası fazlalık su, bir vakum cihazı uzaklaştırılmıştır.

3.6.1.2. Yığıcı (üst) jelin hazırlanması

- Yığıcı jel karışımı, 0,335 ml akrilamid (% 30 sol.), 0,625 ml 0,45 µm filtreden geçirilmiş üst jel tamponu [0,5 M Tris-Cl pH: 6,8 ve % 0,4 SDS (w/v)], 1,5 ml

distile su, 12,5 µL % 10 (w/v) amonyum persülfat, 2.5 µL TEMED karıştırılması ile hazırlanmış ve transfer pipetiyle hızlıca polimerize olmuş ayırıcı jel üzerine eklenmiş ve sisteme ait taraklar dikkatlice yerleştirilerek jelin donması için beklenmiştir.

- Polimerizasyon sonrası taraklar dikkatlice çıkartılmış, iki adet jel üretici firmanın tarifine göre plastik hazneye yerleştirilmiş ve hazneye yürütme tamponu (62,5 mM Tris, % 0,05 SDS (w/v), 200 mM glisin) eklenmiştir.
- SDS-PAGE denemelerinde yürütülecek rekombinant protein örnekleri 2× örnek tamponu (125 mM Tris-Cl, % 4 SDS, % 10 bromfenol mavis, % 20 gliserol ve % 10 beta-merkaptoetanol) ile 1:1 oranında karıştırılmış, 95°C'de 3 dakika ısıtılmış ve jelin her bir kuyucuğuna ortalama 25 µL yüklenmiştir. Her bir jelin birer kuyucuğuna 2 µL protein merdiveni (Pageruler plus prestained, Fermentas, A.B.D.) yüklenmiştir.
- % 12'lik jele ilk 15 dakika 60 V, daha sonra 110 V akım uygulanarak proteinlerin ayrışması sağlanmıştır.
- Proteinleri ayrıştırılmış jellerden biri boyama solüsyonu [% 45 metanol (v/v), % 10 glasial asetik asit (v/v), % 0,1 Coomassie mavis G-250 (w/v) distile suya eklenerek elde edilir] ile çalkalayıcı üzerinde gece boyunca muamele edilmiştir. Jel üzerindeki fazlalık Coomassie mavis, boya çıkarıcı solüsyon [% 45 metanol (v/v), % 10 glasial asetik asit (v/v) distile suya eklenerek elde edilir] ile çalkalayıcı üzerinde gün boyunca çalkalanarak azaltılmıştır.

3.6.2. Western Blot

Ayrıştırılmış proteinleri içeren SDS-PAGE jellerden ikincisine Western Blot uygulanmıştır.

- Transfer yapılacak PVDF (*polyvinylidene difluoride*) transfer membranları (Immobilon-P, Millipore, A.B.D.) 2 dakika metanol ve 10 dakika transfer tamponunda (25 mM tris, 192 mM glisin, % 20 metanol ve distile su) bekletilerek transfere uygun hale getirilmiştir.

- SDS-PAGE sonrası, tutucu kaset içerisine sırasıyla fiber tampon, filtre kâğıdı, % 12'lik SDS-PAGE jeli, PVDF transfer membranı, filtre kâğıdı, fiber tampon konulmuş ve tutucu kaset içerisinde sıkılmıştır.
- Jel tutucu kaset buz soğutma ünitesi ile birlikte, içerisinde transfer tampon bulunan plastik hazne içerisine (Bio-Rad, A.B.D.) yerleştirilmiştir. Jelden PVDF transfer membranına doğru 1 saat boyunca 100 volt akım uygulanmıştır.
- Transfer süresi sonrasında PVDF transfer membranları dikkatlice alınmış ve oda sıcaklığında bloklama tamponunda [% 6,25 yağsız süt tozu içeren 1×TBS-T tamponu (% 0,1 Tween 20, 20 mM Tris-HCl, 0,5M NaCl)] 30 dk oda sıcaklığında çalkalanarak bloke edilmiştir.
- Membranlar bloklama tamponunda 1/2000 oranında sulandırılmış monoklonal anti-polihistidin antikör (Sigma-Aldrich, A.B.D.) ile oda sıcaklığında 1,5 saat süreyle çalkalanarak inkübe edilmiştir.
- Membranlar 1×TBS-T tamponu ile üç kere kısa süreli ve üç kere üç dakika boyunca yıkanmış ve 1/2500 oranında sulandırılmış alkalın fosfataz-konjuge edilmiş keçi kaynaklı anti-fare IgG (H+L) antikoru (Sigma-Aldrich, A.B.D.) ile oda sıcaklığında bir saat boyunca çalkalanarak inkübe edilmiştir.
- İnkubasyon sonrası membranlar 1×TBS-T tamponu ile üç kez kısa süreli ve üç kere üç dakika boyunca yıkanmış ve daha sonra 1×TBS (20 mM tris-Cl, 0,5 M NaCl, pH 7,5) tamponu ile üç kere kısa süreli ve üç kere üçer dakika daha yıkanmıştır.
- Bantların görüntülenmesi için, 250:2:1 oranında dietanolamin tampon (% 10 dietanolamin, 4 M HCl ile pH 9,8, 0,5 mM MgCl₂·6H₂O), % 70 dimetilformamid içinde çözöürölen % 4,1 nitro-BT ve dimetilasetaid içinde çözöürölen % 4,3 BCIP karıştıırılarak boyama tamponu hazırlanmıştır.
- Hazırlanan boyama tamponu PVDF transfer membranı üzerine eklenmiş ve karanlık ortamda 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra membran musluk suyu ile yıkanarak reaksiyon durdurulmuştur.

3.7. Rekombinant Proteinlerin Miktarlarının Kantitatif Ölçümü

Saflaştırma basamaklarında ve saflaştırma sonrası elde edilen rBAG1 ve rGRA1 örneklerinin içerdığı protein miktarları Bradford protein analizi yöntemi

kullanılarak belirlenmiştir. Ölçüm sırasında ticari kit (Coomassie Plus Protein Assay Reagent Kit, Pierce, A.B.D.) ve spektrofotometre (NanoDrop, A.B.D.) kullanılmıştır. Analiz sırasında standart eğri, seri olarak sulandırılmış sığır serum albümini (BSA) ile belirlenmiştir.

3.8.Rekombinant Proteinlerin Endotoksin Seviyesinin Ölçümü

Saflaştırılmış ve protein miktarları belirlenmiş rBAG1 ve rGRA1 proteinlerinde bulunan endotoksin seviyesi 0,25 EU/ml hassasiyete sahip *Limulus Ameobocyte Lysate Gel-Clot* testi içeren Pyrotell tek test tüplerinde üretici firmanın protokolüne göre saptanmıştır (Cape Cod Inc, A.B.D.). Pozitif kontrol olarak *E. coli O113:H10* kontrol standart endotoksini (Cape Cod Inc, A.B.D.), negatif kontrol olarak ise LAL reajan suyu (LRW, Cape Cod Inc, A.B.D.) kullanılmıştır.

3.9. Multivalan Rekombinant Protein Aşısının Üretimi ve Aşılama

İstenen düzeyde saflaştırılmış ve protein miktarı belirlenmiş rBAG ve rGRA1 protein örnekleri alum adjuvantı ile kombine edilerek multivalan protein aşısı oluşturulmuştur.

3.9.1. Multivalan rekombinant protein aşısının oluşturulması

rBAG1 ve rGRA1 proteinlerinden oluşan multivalan rekombinant aşısında ticari alum adjuvantı (Sigma-Aldrich, A.B.D.) kullanılmıştır. Kullanılacak optimum adjuvant miktarını belirlemek için, çeşitli oranlarda protein (50-200 µg), 1 mg alum ile karıştırılmıştır.

- 50-200 µg protein/1 mg alum değer aralığına denk gelecek şekilde 25, 50, 75 µl adjuvanta 33'er µg rBAG1 veya rGRA1 proteinleri eklenmiş, her bir karışım toplam hacim 100 µl olacak şekilde PBS (*phosphate buffered saline*, pH 7,4) ile tamamlanmış, iyice karıştırılmış ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir.

- 20 dakika sonunda adjuvantın bağlama kapasitesi, üst sıvıda bulunan protein miktarının Bradford protein analizi yöntemiyle (Bkz Bölüm 3.7.) belirlenmiştir. Üst sıvıda protein bulunmaması, rekombinant proteinin adjuvanta bağlandığını göstermektedir (Harlow and Lane, 1988).
- Bu testten elde edilen veriler (Bkz. Bölüm 4.4.) ışığında multivalan rekombinant protein aşısı tarif edildiği şekilde oluşturulmuştur:
 - Karışım A: 33 µg rBAG1 (+) 25 µl alumdan oluşan karışımın hacmi 50 µl'ye PBS ile tamamlanmış, iyice karıştırılmış ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir.
 - Karışım B: 33 µg rGRA1 (+) 25 µl alumdan oluşan karışımın hacmi 50 µl'ye PBS ile tamamlanmış, iyice karıştırılmış ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir.
 - İnkübasyon sonrası, karışım A ve B karıştırılarak hedef aşı enjeksiyona hazır hale getirilmiştir.

3.9.2. Rekombinant protein aşısının uygulanması

Bu çalışmada 6-8 haftalık, her biri 11'şer adet dişi *Swiss outbred* farelerden oluşan bir aşı ve üç kontrol grubu olmak üzere 4 grup oluşturulmuştur (Tablo 3.4.). Kontrol 1 grubuna intraperitoneal yoldan 100 µl PBS, kontrol 2 grubuna 50 µl PBS (+) 50 µl alum karışımı, kontrol 3 grubuna da alum adjuvantı içermeyen rBAG1 (+) rGRA1 rekombinant protein aşısı uygulanmıştır. Aşı grubuna ise Bölüm 3.9.1.'de anlatıldığı gibi hazırlanan multivalan rekombinant protein aşısı uygulanmıştır. Fareler üçer hafta aralıklarla, iki defa intraperitoneal yoldan aşılanmıştır. Kuyruk kanları her aşılama üç hafta sonra toplanmıştır.

Tablo 3.4. Deney hayvanlarında oluşturulan aşı ve kontrol grupları

Grup Adı	0.gün (1.aşılama)	21. gün (2.aşılama)
PBS	100 µl PBS	100 µl PBS
Alum	50 µl alum (+) 50 µl PBS	50 µl alum (+) 50 µl PBS
rBAG1+rGRA1	33 µg BAG1 (+) 33 µg GRA1 (toplam hacim PBS ile 100 µl yapılmıştır)	33 µg BAG1 (+) 33 µg GRA1 (toplam hacim PBS ile 100 µl yapılmıştır)
Alum+rBAG1+rGRA1	33 µg BAG1 (+) 33 µg GRA1 (+) 50 µl alum (toplam hacim PBS ile 100 µl yapılmıştır)	33 µg BAG1 (+) 33 µg GRA1 (+) 50 µl alum (toplam hacim PBS ile 100 µl yapılmıştır)

3.10. Aşılanan Farelerin *T. gondii* PRU Suşu ile Enfekte Edilmesi

Multivalan rekombinant protein aşısının koruyuculuğunu belirlemek için her gruptan sekiz fare, ikinci aşılamadan üç hafta sonra *T. gondii* PRU suşuna ait 10-12 kist ile, gavaş kullanılarak oral yoldan enfekte edilmiştir.

3.10.1. *T. gondii* PRU suşuna ait doku kistlerinin elde edilmesi

- Doku kisti ile önceden enfekte edilmiş *Swiss outbred* farelerin beyinleri steril şartlar altında diseksiyon uygulanarak çıkarılmıştır.
- Her hayvandan alınan beyinler, 2 ml antibiyotik karışımı içeren % 0,9 NaCl solüsyonuna (10 U/ml penisilin, 10 µg/ml streptomisin ve 2 µg/ml gentamisin içerir) eklenmiş ve 20G 1" (0,9×25 mm) iğne uçlu enjektör ile homojenize edilmiştir.
- Homojenize edilen örneklerde bulunan doku kistleri faz kontrast mikroskopta (Nikon, Japonya) 20× objektif ile sayılmıştır.

3.10.2. Aşılanmış farelerin *T. gondii* PRU suşuna ait doku kistleri ile enfekte edilmesi ve farelerde enfeksiyon sonrası oluşan doku kistlerinin sayılması

- Her gruptan sekiz fare, ikinci aşılamadan üç hafta sonra *T. gondii* PRU suşu doku kistlerini içeren homojenat ile oral yoldan enfekte edilmiştir.
- Beyin doku homojenatı 100 µl'de 10-12 kist olacak şekilde % 0,9 NaCl ile sulandırılmış ve her bir fareye 100 µl homojenat oral yoldan gavaş (Harvard Apparatus, A.B.D.) yardımı ile verilmiştir.
- Bu işlemi takiben 42 gün boyunca fareler gözlenmiş ve süreç sonunda farelere ötanazi uygulanmıştır.
- Yukarıda anlatıldığı gibi çıkarılan, beyin dokularında var olan doku kisti miktarı faz kontrast mikroskopta 20× objektif kullanılarak sayılmıştır.
- Ayrıca her beyin örneğinden 40 mg doku, DNA ekstraksiyonu için ayrılmıştır.

3.11. Fare Beyin Dokusunda Bulunan *T. gondii* PRU Suşu DNA Miktarının Gerçek Zamanlı (*Real Time*) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Belirlenmesi

Bu aşamada *T. gondii* PRU suşu ile enfekte edilen farelerden elde edilen beyin dokularına DNA ekstraksiyonu uygulanmış, daha sonra gerçek zamanlı PZR Light Cycler 1.2 cihazı (Roche, Almanya) ile *T. gondii* DNA'sı araştırılmıştır.

3.11.1. DNA ekstraksiyonu

Homojenize edilmiş 40 mg beyin dokularında DNA ekstraksiyonu, QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Almanya) ile üretici firmanın protokolüne uygun olarak kısaca şu şekilde gerçekleştirilmiştir.

- 40 mg doku üzerine 180 µl ATL tampon ve 20 µl Proteinaz K ilave edilerek vorteks ile iyice karıştırılmış ve 56°C'de dokular tamamen eriyene kadar inkübe edilmiştir.
- Eriyik doku üzerine 200 µl AL tampon ekledikten sonra tekrar iyice karıştırılmış ve 70°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.
- Daha sonra karışım üzerine 200 µl etanol eklenerek iyice karıştırılmıştır.
- Elde edilen karışım kite ait filtreli tüplere aktarılmış, 8000×g'de bir dakika santrifüj edilmiş ve filtreli tüpe 500 µl AW1 yıkama tamponu eklenerek 8000×g'de tekrar bir dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası tüpe 500 µl AW2 tamponu yıkama eklenerek, 14000×g'de 3 dakika daha santrifüj edilmiştir.
- 200 µl elüsyon tamponu filtreli tüpe eklenerek 8000×g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Elde edilen DNA örneği gerçek zamanlı PZR çalışılncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.11.2. Gerçek zamanlı PZR

T. gondii DNA'sı AF146527 geninde bulunan 134 bp'lik kısım, primer ve hibridizasyon problemleri kullanılarak araştırılmıştır. Reaksiyon karışımı LightCycler Fast Start DNA Master HybProbe kiti, primerler (TOX-SE *forward* 5-AGGCGAGGGTGAGGATGA-3 ve TOX-AS *reverse* 5-TCGTCTCGTCTGGATCGCAT-3) ve problemlerin (TOX-FLU: 5-GCCGGAAACATCTTCTCCCTCTCC-FL ve TOX-LCR: 5-640-CTCTCGTCGCTTCCCAACCACG-3) karışımı ile hazırlanmıştır (Tablo 3.5). Örneklerdeki *T. gondii* DNA konsantrasyonu 10^1 - 10^6 /reaksiyon olan, altı pozitif kontrolle oluşturulan standart eğrinin belirlenmesi sonrası saptanmıştır.

Örneklere LightCycler 1.2 gerçek zamanlı PZR cihazında tarif edilen ön inkübasyon, nicelleme amaçlı amplifikasyon ve erime eğrisi analizleri uygulanmıştır (Tablo 3.6.).

Tablo 3.5. Gerçek zamanlı PZR testinde her örnek için kullanılan reaksiyon karışımı

Malzeme	Son hacim	Son konsantrasyon
<i>Forward</i> Primer TOX-SE (20 µM)	0,5 µl	0,5 µM
<i>Reverse</i> Primer TOX-AS (20 µM)	0,5 µl	0,5 µM
TOX-FLU Prob (20 µM)	0,1 µl	0,1 µM
TOX-LCR Prob (20 µM)	0,5 µl	0,5 µM
10× <i>FastStart</i> karışımı ^a	2,0 µl	1×
25 mM MgCl ₂	3,2 µl	5 mM ^b
Distile su	8,2 µl	-
Kalıp DNA	5 µl	-
Toplam	20 µl	

^a *FastStart* karışımı, *FastStart* enzim (1a) ve *FastStart* reaksiyon karışımı HybProbe (1b) tüplerinin karışımı ile oluşturulmuştur.

^b 25 mM MgCl₂ eklenmesi sonrası son konsantrasyonun 5 mM olması, 10× *FastStart* karışımı içinde bulunan 10 mM son konsantrasyondaki MgCl₂ solüsyonundan kaynaklanmaktadır.

Tablo 3.6. Gerçek zamlı PZR testinde her bir örnek için kullanılan protokol

Analiz Modu	Döngü sayısı	Basamak	Hedef sıcaklık	Süre	Sıcaklık artış hızı (°C/sn)	Okuma modu
Ön inkübasyon						
-	1	-	50°C	2 dk	20	-
	1	-	95 °C	10 dk	20	
Amplifikasyon						
Kantifikasyon	50	Denaturasyon	95°C	5 sn	20	-
		Bağlanma	60°C	10 sn	20	Tek
		Uzama	72°C	15 sn	20	-
Erime Eğrisi						
Erime Eğrisi	1	Denaturasyon	95°C	20 sn	20	-
		Bağlanma	40°C	20 sn	20	-
		Uzama	85°C	0 sn	0.2	Sürekli
Soğutma						
-	1		40°C	30 sn	20	-

3.12. İmmun Yanıtın İncelenmesi

Bir aşı ve üç kontrol grubundaki *Swiss outbred* farelerden aşılama öncesi (0. gün) ve her aşılama üç hafta sonra alınan (21. ve 42. günler) serum örneklerinde aşılama ile oluşturulan humoral (salgısal) immün yanıt incelenmiştir. Her gruptan üçer farenin dalakları, ikinci aşılama üç hafta sonra steril şartlar altında diseksiyon ile alınmış ve dalak T lenfositlerinde aşılama ile uyarılan hücresel immün yanıt araştırılmıştır.

3.12.1. Humoral immün yanıtın incelenmesi

Aşılama öncesi ve sonrası *Swiss outbred* farelerden alınan serum örneklerinde rGRA1 ve rBAG1 proteinlerine karşı oluşan antikor yanıtı rekombinant ELISA (*recombinant enzyme linked immunosorbent assay*; Rec-ELISA) ve Western Blot ile araştırılmıştır. Ayrıca *T. gondii* Ankara suşu takizoiti eriyik antijeni kullanılarak, doğal GRA1 proteinine karşı uyarılan antikor yanıtı Western Blot ile araştırılmıştır.

3.12.1.1. *T. gondii* Ankara suşu takizoiti ile eriyik antijen hazırlanması

Western Blot ve ELISA yöntemlerinde kullanılan *T. gondii* Ankara suşu takizoiti eriyik antijeni *Swiss outbred* farelerde tarif edildiği gibi hazırlanmıştır (Değirmenci et al., 2011).

- Öncelikle enfektif dozda (1×10^5 takizoit) *T. gondii* Ankara takizoitleri 6-8 haftalık *Swiss outbred* farelerin peritoneal boşluğuna inoküle edilmiştir.
- *Swiss outbred* farelerin periton boşluğunda 3-4 günde çoğalan *T. gondii* takizoitleri steril şartlarda serum fizyolojik irrigasyonu sonrası, pastör pipeti kullanılarak 15 ml'lik tüplere aktarılmıştır.
- Takizoitlerin sayısı % 0,4 tripan mavisi ile hemositometre kullanılarak belirlenmiştir.
- Daha sonra *T. gondii* takizoitleri $3000 \times g$ 'de 10 dakika santrifüj edilmiş, üst sıvı atıldıktan sonra pellete 10 ml PBS eklenerek $3000 \times g$ 'de, 10 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı atılmıştır. Bu işlem iki kez daha uygulanmıştır.
- Üçüncü yıkama sonrası takizoit miktarı sayılarak $13000 \times g$ 'de, 15 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası üst sıvısı atılan pellet üzerine ortalama çökelti miktarı kadar distile su eklenmiş ve takizoitlerin parçalanması için 10 kere dondurulup çözündürülmüştür.
- Daha sonra hücre eriyiği $13000 \times g$ 'de, 15 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı insülin enjektörüne çekilerek gözenek çapı $0,22 \mu m$ olan şırınga filtresinden geçirilmiştir.
- Elde edilen eriyik antijen, anti-GRA1 proteininin araştırıldığı Western Blot testinde kullanılmıştır.

3.12.1.2. Eriyik *E. coli* proteininin hazırlanması

Farelerde aşılama ile uyarılan antikor yanıtının araştırıldığı rec-ELISA ve Western Blot testlerinde kullanılan eriyik *E. coli* proteini tarif edildiği gibi hazırlanmıştır (Liang et al., 2011). *E. coli* eriyiği, özellikle *E. coli*'ye karşı

oluşmuş antikorların çapraz reaksiyon vermemesi için serum örneklerine eklenmiş ve inkübe edilmiştir.

- Transforme edilmemiş *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS hücreleri antibiyotik içermeyen 250 ml LB besin ortamında gece boyunca çoğalmaya bırakılmıştır.
- Ertesi gün üreme gerçekleşen besin ortamı 5000×g'de, 10 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı atılarak pellet tartılmıştır.
- 10 ml TBS tamponu ile sulandırılan pellet homojenize edilmiş, 18 psi basınç altında soğutmalı ortamda iki kere yüksek basınçlı homojenizatörden geçirilmiştir.
- Homojenizatör 10 ml TBS tamponu ile yıkanmış ve yıkama sırasında gelen TBS tamponunda eriyiğin üstüne eklenmiştir. Toplam hacim ortalama 25 ml kadar olmuştur.
- Eriyik protein miktarı 100 mg/ml olacak şekilde TBS ile sulandırılmış, % 0,05 oranında Tween-20 eklenmiş, karıştırılmış ve -80°C'de kullanıma kadar saklanmıştır.

3.12.1.3. Anti-GRA1 ve anti-BAG1 antikorlarının Western Blot ile araştırılması

T. gondii bradizoitleri ve takizoitleri GRA1 proteini üretebilmektedir. BAG1 proteini ise sadece doku kistlerinde bulunan bradizotler tarafından üretilmektedir (Bkz. Bölüm 2.4.2.2.). Aşılanmış ve kontrol grubu fare serumlarında anti-GRA1 IgG antikorlarının varlığı, rGRA1 protein ve *T. gondii* Ankara suşu takizoitlerinden hazırlanan eriyik antijen içeren Western Blot testi ile araştırılmıştır. Aşılanmış ve kontrol grubu fare serumlarında anti-BAG1 IgG antikorlarının varlığı rBAG1 protein içeren Western Blot testi ile araştırılmıştır.

SDS-PAGE ve Western Blot testleri Bölüm 3.6.'da tarif edildiği gibi uygulanmış olup Western Blot aşamasında farklı antikorlar kullanılmıştır.

- SDS-PAGE sırasında beşer kuyucuğa rGRA1 ve rBAG1 proteinleri, dört kuyucuğa ise *T. gondii* Ankara suşu takizoitlerinden hazırlanan eriyik antijen

eklenmiştir. PVDF membrana aktarım sonrası bloklama yapılan membranlar kuyucuk hizasından kesilmiş ve her kesilmiş membrana ayrı ayrı Western Blot uygulanmıştır.

- Dört gruptaki fare serumları ile dört ayrı serum havuzu oluşturulmuştur (1. havuz: PBS uygulanan kontrol grubu fareler; 2. havuz: alum uygulanan kontrol grubu fareler; 3. havuz: rBAG1 (+) rGRA1 proteini uygulanan kontrol grubu fareler; 4. havuz: alum (+) rBAG1 (+) rGRA1 uygulanan aşı grubu farelerden oluşmaktadır).
- rGRA1 ve rBAG1 içeren dörder adet kesilmiş membrana Western Blot sırasında birincil antikor olarak 10 mg/ml *E. coli* eriyik proteini içeren bloklama tamponu ile 1/50 oranında sulandırılan fare serum havuzları eklenmiştir.
- Serumlar PVDF membran ile karşılaştırılmadan önce 30 dk oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edilmiştir (Bu süreçte anti-*E. coli* antikorlar, *E. coli* eriyik antijenine bağlanmaktadır).
- rGRA1 ve rBAG1 içeren iki adet kesilmiş membrana, birincil antikor olarak bloklama tamponunda 1/2000 oranında sulandırılmış monoklonal anti-polihistidin antikor (Sigma-Aldrich, A.B.D.) eklenmiştir.
- İkincil antikor olarak ise TBS-T ile 1/2000 oranında sulandırılan alkalın fosfataz-konjuge edilmiş keçi kaynaklı anti-fare IgG (H+L) antikor (Sigma-Aldrich, A.B.D.) kullanılmıştır.

3.12.1.4. Rec-ELISA ile IgG₁ ve IgG_{2a} antikor yanıtının araştırılması

Aşılanmış ve kontrol grubu fare serumlarında anti-BAG1 ve anti-GRA1 IgG₁ ve IgG_{2a} antikor varlığı rBAG1 ve rGRA1 protein içeren rec-ELISA ile tarif edildiği gibi araştırılmıştır (Gülçe İz, 2013).

- Öncelikle ELISA plaklarının (Nunc, A.B.D.) kuyucukları üç kez 300 µl PBS-T (% 0,05 Tween-20 içeren PBS, pH 7,4) ile yıkanmıştır.
- Daha sonra plakların kuyucuklarına 0,01 M KCl tamponu içinde son konsantrasyonları 5 µg/ml olacak şekilde sulandırılan rBAG1 ve rGRA1

protein karışımından 100 µl eklenmiş ve gece boyunca 4°C'de inkübe edilmiştir.

- Kontrol amacı ile plakların kuyucuklarına 0,01 M KCl tamponu içinde son konsantrasyonları 5 µg/ml olacak şekilde sulandırılan rBAG1 ve rGRA1 protein ayrı ayrı 100 µl eklenmiştir.
- Ertesi gün bağlanmayan proteinleri uzaklaştırmak için, her bir çukura 300 µl PBS-T gelecek şekilde plaklar 3 kere yıkanmış, yıkama sonrası her bir kuyucuğa 200 µl bloklama tamponu (% 5'lik yağsız süt tozu içeren % 0,05 PBS-T) eklenmiş ve 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrası plaklar 3 kez 300 µl PBS-T ile yıkanmıştır.
- Daha sonra her bir kuyucuğa, 10 mg/ml *E. coli* eriyik proteini içeren bloklama tamponu ile 1/100 oranında sulandırılarak 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilen fare serumlarından 100 µl eklenmiştir.
- Sadece rBAG1 ve rGRA1 proteinlerini içeren kontrol kuyucuklarına ise bloklama tamponu içinde 1:3000 oranında sulandırılan monoklonal anti-polihistidin antikordan (Sigma-Aldrich, ABD.) 100 µl eklenmiştir.
- Plaklar oda sıcaklığında iki saat boyunca çalkalayıcıda inkübe edilmiş ve üç kez 300 µl PBS-T ile yıkanmıştır.
- Yıkama sonrası fare serumu içeren kuyucuklara PBS-T ile 1:1500 oranında sulandırılan peroksidaz işaretli anti fare IgG₁ (Jackson Immunoresearch, A.B.D.) ve 1:1000 oranında sulandırılan peroksidaz işaretli anti-fare IgG_{2a} (Jackson Immunoresearch, A.B.D.) antikorlarından 100 µl eklenmiştir.
- rBAG1 ve rGRA1 içeren kontrol kuyucuklarına ise PBS-T ile 1:4000 oranında sulandırılan peroksidaz işaretli anti-fare IgG antikorundan (Sigma Aldrich, A.B.D.) 100 µl eklenmiştir.
- İkincil antikor eklenen plaklar, oda sıcaklığında, bir saat boyunca çalkalayıcıda inkübe edilmiş ve sonrasında her çukur üç kez 300 µl PBS-T ile yıkanmıştır.
- Son yıkama sonrası plaklar ters çevrilip kağıt havluya vurularak kuyucukları tamamen boşaltılmış ve substrat olarak her bir kuyucuğa 10:1 oranında hazırlanan TMB tampon [70,4 mM Na₂HPO₄ + 36,4 mM sitrik asit + % 7 (v/v) dimetilasetamid + % 0,016 (v/v) H₂O₂ distile su] ve TMB stok [0,1 mM 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin + % 4 (v/v) dimetilasetamid distile su, 4 M HCl ile pH 2 ayarlanır] solüsyonundan 100 µl eklenmiştir.

- Plaklar karanlık ortamda ortalama 10 dakika bekletildikten sonra her kuyucuğa 75 µl 2 N H₂SO₄ (Merck, A.B.D.) (durdurma solüsyonu) eklenerek reaksiyon durdurulmuştur.
- Absorbans değeri (AD) ELISA plak okuyucusu ile 450 nm dalga boyunda (OD₄₅₀) ölçülmüştür. Serum örneklerinden elde edilen absorbans değerleri, negatif kontrollere göre AD (+) 3× standart sapma üzerine çıktığında, serumlar pozitif kabul edilmiştir.

3.12.2. Hücresel immun yanıtın belirlenmesi

Aşılama yapılan dört gruptan üçer adet *Swiss outbred* farenin dalakları, ikinci aşılama üç hafta sonra steril şartlar altında çıkarılmış ve oluşturulan tek hücre süspansiyonları *in vitro* ortamda, rBAG1 ve rGRA1 proteinleri ile tarif edildiği gibi uyarılmıştır (Döşkaya et al., 2007; Polat et al., 2013; Gülçe İz, 2011). Uyarımdan 72 saat sonra IL-4 ve IFN-γ salgılayan CD₄ hücreleri ile IFN-γ salgılayan CD₈ hücrelerin oranları akış sitometrisi ile belirlenmiştir (Döşkaya et al., 2007; Polat et al., 2013; Gülçe İz, 2011).

3.12.2.1. Tek hücre süspansiyonlarının hazırlanması

- Farelerden steril şartlarda alınan dalaklar, steril iki buzlu mikroskop lamı arasında Ca⁺² ve Mg⁺² ile fenol kırmızısı içermeyen Hank'ın dengeli tuz solüsyonunda (HBSS, Biochrom, Almanya) homojenize edilmiştir.
- Homojenize hücreler 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve üst sıvı atıldıktan sonra hücrelerin üzerine 1 ml kırmızı kan hücre yıkıcı solüsyon [15 mM NH₄Cl + 10 mM KHCO₃ + 0,1 mM EDTA, pH 7,4] eklenerek 2-3 kere pipetle süspanse edildikten sonra 3 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrası süspansiyon üzerine 5 mL HBSS eklenerek ortam izotonik hale getirilerek, 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve üst sıvı atılmıştır.
- Hücrelere 10 ml besin ortamı [1× RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen, A.B.D.), % 10 yeni doğan buzağı serumu (NBCS, HyClone, Thermo Fisher Scientific, A.B.D.), 2 mM L-glutamin (Gibco, Invitrogen, A.B.D.), 1× penisilin-streptomisin solüsyonu (100U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin) (Sigma-

Aldrich, A.B.D.), 0,1 mM esansiyel olmayan aminoasitler (Gibco, Invitrogen, A.B.D), 1,0 mM sodyum pirüvat (Gibco, Invitrogen, A.B.D), 55 µM 2-merkaptoetanol] ile süspanse edilmiştir.

- Süspanse dalak hücrelerinin canlılığı ve sayısı % 0,4 tripan mavisi ile hemositometre kullanılarak belirlenmiştir. Her bir fareye ait süspansiyon 5×10^6 hücre/ml içerecek şekilde sulandırılmış ve yuvarlak tabanlı 96 kuyucuklu plakların her bir kuyucuğuna 100 µl eklenmiştir.
- rBAG1 ve rGRA1 proteinlerinde endotoksin miktarının azaltılması için, proteinlere 50µg/ml son konsantrasyonda polimiksin B ilave edilmiş ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnsülin enjektörüne çekilen proteinler gözenek çapı 0,22 µm olan şırınga filtresinden geçirilerek steril hale getirilmiştir.
- Daha sonra plakların kuyucuklarında bulunan dalak hücre süspansiyonları final konsantrasyonları 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml ve 25 µg/ml olan rBAG1 ve rGRA1 protein karışımı ile uyarılmıştır.
- Pozitif kontrol gruplarına hücre proliferasyonunu uyarmak amacıyla son konsantrasyon 10 µg/mL olacak şekilde Concanavalin A (Sigma-Aldrich, Almanya) eklenmiştir. Negatif kontrol gruplarına ise sadece besin ortamı eklenmiştir.
- Hazırlanan plaklar 37°C'de % 5 CO₂ içeren ortamda 72 saat inkübe edilmiştir.
- İnkübasyonun son dört saatinde plaklardaki tüm kuyucuklara monensin (lenfositlerin Golgi cisimciğinde protein transportunu inhibe etmektedir) final konsantrasyon 0,66 µl/ml olacak şekilde üretici firmanın protokolüne (GolgiStop, BD Biosciences, A.B.D.) göre eklenmiştir.

3.12.2.2. CD₃ lenfositlerin yüzey antijenlerinin belirlenmesi

Swiss outbred farelerde lenfosit popülasyonlarının belirlenmesi için dalak hücreleri, T lenfosit yüzey antijeni olan CD₃ reseptörüne özgü Alexa flour 647 işaretli anti-fare CD₃ antikoru ile boyanmıştır (Tablo 3.7.). Boyama işlemi sırasında Cytofix/Cytoperm Plus Fiksasyon/Permeabilizasyon kiti üretici firmanın protokolüne göre kullanılmıştır (BD Biosciences, A.B.D.).

Tablo 3.7. T lenfosit yüzey reseptörlerine bağlanan floresan işaretli antikorlar (BD Biosciences, A.B.D.)

T Lenfosit Yüzey Reseptörü	Floresan İşaretli Antikor
CD ₃	Alexa flour 647 işaretli anti-fare CD ₃

- Bölüm 3.12.2.1.'de anlatıldığı gibi oluşturulan dalak hücre süspansiyonlarına uygulanan 72 saatlik inkübasyonun 68. saatinde eklenen monensin sonrası, plaklar 4°C'de 1500 rpm ile 5 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve üst sıvı atılmıştır.
- Daha sonra *Swiss outbred* farelerde lenfosit popülasyonunu saptamak için aşılınmamış kontrol grubuna ait ortalama 1×10^6 hücre içeren üç kuyucuğun her birine 50 µL boyama tamponu içinde 0,5 µg anti-fare CD₃ antikor (tavsiye edilen kullanım konsantrasyonu 0,5 µg/ 10^6 hücre) eklenmiş, karanlık ortamda 4°C'de 30 dk inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrası hücrelerin üstüne 250 µL boyama tamponu eklenmiş ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek üst sıvı atılmıştır.
- Yıkama işlemi iki kez daha tekrar edilmiştir.
- Son yıkamayı takiben üst sıvı atılmış, hücreler 100 µL Cytofix/Cytoperm (BD, A.B.D.) fiksasyon/permeabilizasyon solüsyonunda süspanse edilmiş ve 4°C'de 20 dk karanlıkta inkübe edilmiştir.
- Daha sonra hücrelere 250 µL permeabilizasyon yıkama tamponu (*Perm/Wash*, BD, A.B.D.) eklenmiş ve sonrasında 1500 rpm'de beş dakika santrifüj edilerek üst sıvı atılmıştır. Yıkama işlemi iki kez daha tekrar edilmiştir.
- Son yıkama sonrası üst sıvı atılmış, hücreler 500 µL boyama tamponunda süspanse edilmiş ve akış sitometrisine geçilmiştir.
- Yüzey antijenlerinin saptanmasında akış sitometri cihazının (BD FACSAria, BD Biosciences, A.B.D.) floresan ışık algılayan kanallarından 10^4 dalak hücresi geçirilmiş ve CD₃ reseptör içeren T hücreler belirlenmiştir. Elde edilen veriler BD FACSDiva programı (BD Biosciences, A.B.D.) kullanılarak analiz edilmiştir.

3.12.2.3. CD₄ ve CD₈ lenfositlerinin ürettiği hücre içi sitokinlerin belirlenmesi

CD₄ ve CD₈ lenfositlerin ürettiği hücre içi sitokinlerin belirlenmesi için aynı fareye ait ortalama 1×10^6 dalak hücresinin bulunduğu üç farklı kuyucuk Tablo 3.8.'de belirtilen antikorlar ile boyanmıştır. Boyama işlemi Cytofix/Cytoperm Plus Fiksasyon/Permeabilizasyon kiti üretici firmanın protokolüne uygun olarak yapılmıştır (BD Biosciences, A.B.D.).

- Bölüm 3.12.2.1.'de anlatıldığı gibi oluşturulan dalak hücre süspansiyonlarına, 72 saatlik inkübasyonun 68. saatinde eklenen monensin sonrası, plaklar 4°C'de 1500 rpm ile 5 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve üst sıvı atılmıştır.
- Her fareye ait ortalama 1×10^6 hücre içeren üç kuyucuğa 50 µL boyama tamponu içinde 0,5 µg floresan izosiyanat (FITC) işaretli anti-fare CD₄ (iki kuyucuk) ve 0,5 µg FITC işaretli anti-fare CD_{8a} (bir kuyucuk) antikorları eklenmiş, 4°C'de, 30 dk, karanlıkta inkübe edilmiştir.
- Inkübasyon sonrası hücrelerin üstüne 250 µL boyama tamponu eklenmiş ve sonrasında 1500 rpm'de, 5 dakika santrifüj edilerek üst sıvı atılmıştır. Yıkama işlemi iki kez daha tekrar edilmiştir.
- Son yıkama sonrası üst sıvı atılmış, hücreler 100 µL Cytofix/Cytoperm (BD, A.B.D.) fiksasyon/permeabilizasyon solüsyonunda süspanse edilmiş ve 4°C'de, 20 dk, karanlıkta inkübe edilmiştir.
- Inkübasyonu takiben hücrelere 250 µL Perm/Wash tamponu ilave edilmiş ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek üst sıvı atılmıştır. Yıkama işlemi iki kez daha tekrar edilmiştir.
- Son yıkama sonrası üst sıvı atılmış, 50 µL boyama tamponu içinde 0,5 µg PE (*R-phycoerythrin*; fikoeritrin) işaretli anti-fare IFN- γ (CD₄⁺ ve CD₈⁺ boyalı hücrelerin bulunduğu 2 kuyucuğa) ve 0,5 µg PE işaretli anti-fare IL-4 (CD₄ boyalı hücrelerin bulunduğu 1 kuyucuğa) antikorları eklenmiş, 4°C'de 30 dk karanlıkta inkübe edilmiştir (Tablo 3.8.).

Tablo 3.8. CD₄ ve CD₈ T hücrelerin salgıladığı hücre içi sitokinlerin belirlenmesinde kullanılan antikorlar

Grup	Yüzey Reseptör Bağlayan Antikor	Hücre İçi Sitokin Bağlayan Antikor
CD ₄ ve IFN- γ	FITC işaretli anti-fare CD ₄	PE işaretli anti-fare IFN- γ
CD ₄ ve IL-4	FITC işaretli anti-fare CD ₄	PE işaretli anti-fare IL-4
CD ₈ ve IFN- γ	FITC işaretli anti-fare CD ₈	PE işaretli anti-fare IFN- γ

- Daha sonra hücrelere 250 μ L Perm/Wash tamponu eklenmiş ve sonrasında 1500 rpm'de, 5 dakika santrifüj edilerek üst sıvı atılmıştır. Yıkama işlemi iki kez daha tekrar edilmiştir.
- Son yıkama sonrası üst sıvı atılmış, hücreler 500 μ L boyama tamponunda süspanse edilmiş ve akış sitometrisine geçilmiştir.
- Hücre içi sitokin salgılayan T lenfositlerin belirlenmesinde akış sitometri cihazının floresan ışın algılayan kanallarından 10⁴ dalak hücresi geçirilmiş, IFN- γ ve IL-4 salgılayan CD₄ ve CD₈ T hücreler belirlenmiştir. Elde edilen veriler BD FACSDiva programı (BD Biosciences, A.B.D.) kullanılarak analiz edilmiştir.

3.13. İstatistiksel Analiz

Çalışma sırasında elde edilen veriler Microsoft Excel 2010 programı ile işleminden geçirilmiş ve Graphpad Prism 5 programı ile (GraphPad, San Diego, CA) istatistiksel analiz gerçekleştirilmiştir. Aşılama grupları arasındaki farkı değerlendirmek için çift kuyruklu *t* testi veya % 95 güvenlik aralığı bulunan tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Humoral ve hücrel bağışıklık yanıt sonuçları aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiş, aksi belirtilmediği takdirde, 0,05 ve daha küçük *P* değerleri anlamlı olarak yorumlanmıştır.

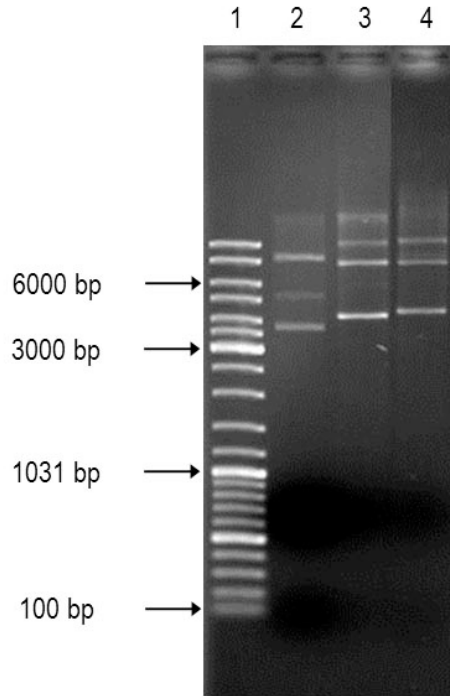
4. SONUÇLAR

Bu çalışmada gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen veriler yedi ana başlık altında verilmiştir.

4.1. pET28a/GRA1 ve pET28a/BAG1 Plazmitlerinin Gösterilmesi

Bu çalışmada kullanılan pET28a/GRA1 ve pET28a/BAG1 plazmitler Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalında Doç. Dr. Mert Döşkaya tarafından hazırlanmış ve bu projede kullanılmasına izin verilmiştir.

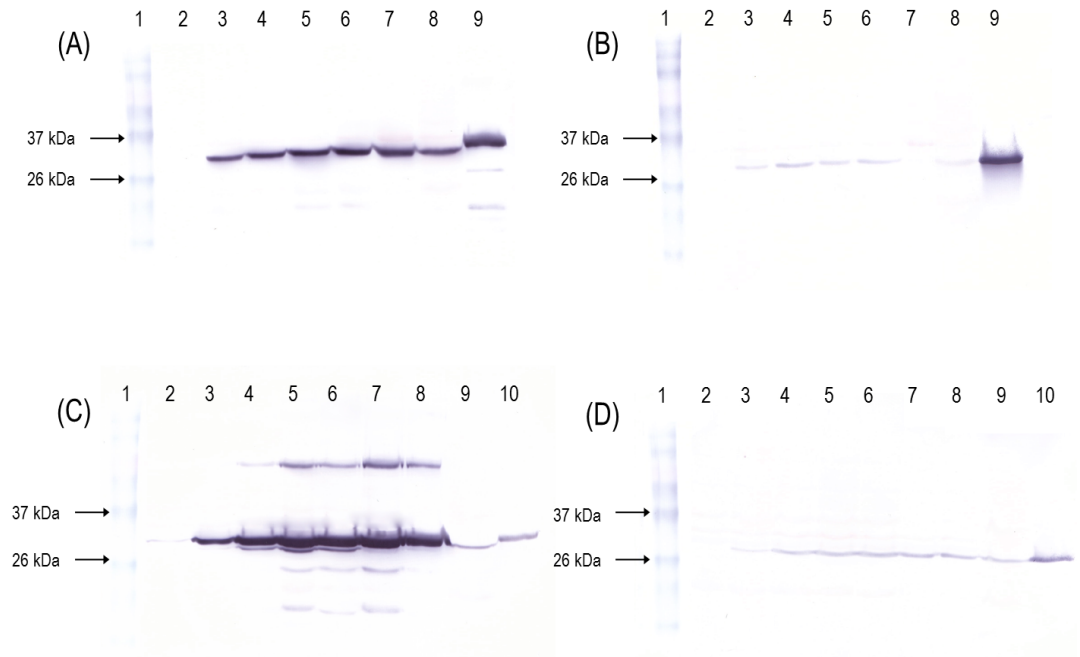
pET28a/GRA1 ve pET28a/BAG1 plazmitleri *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS kimyasal kompetent hücrelere aktarılmış ve plazmit ekstraksiyon kiti ile izole edilerek % 1'lik agaroz jelde gösterilmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Plazmit ekstraksiyonu sonrası elde edilen agaroz jel görüntüsü; 1. sütun: DNA merdiveni (Fermentas); 2. sütun: pET28a dairesel kontrol vektörü; 3. sütun: pET28a/GRA1 plazmiti; 4. sütun: pET28a/BAG1 plazmiti

4.2. rGRA1 ve rBAG1 Proteinlerinin Ekspresyonunun Optimizasyonu

Bu çalışmada kullanılan rGRA1 ve rBAG1 proteinlerinin ekspresyonu sırasında kullanılacak IPTG uyarılma süresinin ve sıcaklık derecesinin belirlenmesi için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. IPTG ile uyarılma sonrası 37°C'de 4 saat veya 18-22°C'de gece boyunca inkübe edilen besin ortamından, ilk dört saat başında ve son saatte alınan örneklerdeki rGRA1 ve rBAG1 miktarları Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. rBAG1 ve rGRA1 proteinlerinin optimizasyonuna ait Western Blot görüntüleri. IPTG uyarısı sonrası 37°C'de 4 saatlik inkübasyon sürecinde **(A)** rBAG1 ve **(B)** rGRA1 proteinlerinin ekspresyonu. Sütun 1: protein merdiveni (Invitrogen); Sütun 2: IPTG eklenmeden alınan örnek; Sütunlar 3-6: ekspresyonun 1., 2., 3. ve 4. saatleri arasında alınan örnekler; Sütun 7: ekspresyonun 4. Saatinde alınan hücre örneğinin TritonX-100 ile yıkılması sonrası elde edilen pellet örneği; Sütun 8: üst sıvı örneği; Sütun 9: saflaştırılmış protein.

IPTG uyarısı sonrası 18-22°C'de gece boyunca inkübasyon sürecinde **(C)** rBAG1 ve **(D)** rGRA1 proteinlerinin ekspresyonu. Sütun 1: protein merdiveni (Invitrogen); Sütun 2: IPTG eklenmeden alınan örnek; Sütunlar 3-7: ekspresyonun 1., 2., 3., 4. saatleri ve bir gece sonra arasında alınan örnekler; Sütun 8: ekspresyonun 4. saatinde alınan hücre örneğinin TritonX-100 ile yıkılması sonrası elde edilen pellet örneği; Sütun 9: üst sıvı örneği; Sütun 10: saflaştırılmış protein.

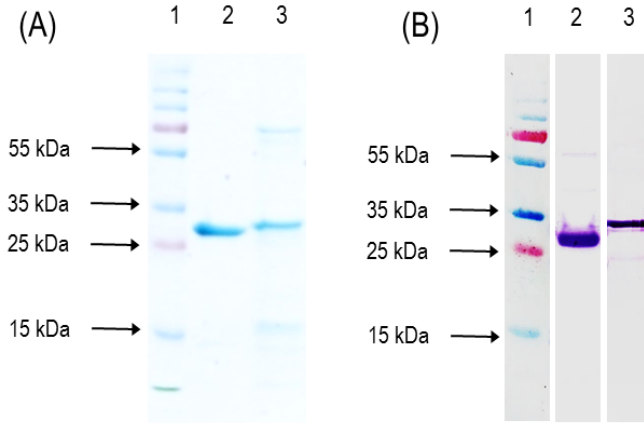
Elde edilen veriler sonucunda IPTG eklemenin, zaman ilerledikçe rBAG1 ve rGRA1 protein ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır (Şekil 4.2.). Sıcaklık denemelerinde ise 18-22°C'de gece boyunca üretim (Şekil 4.2. C-D) ile 37°C'de 4

saatlik üretim arasında önemli bir fark olmadığı Western Blot ile gösterilmiştir (Şekil 4.2. A-B).

Küçük ölçekli saflaştırma sonrası ortamda bulunan yabancı proteinlerin azaldığı, rBAG1 ve rGRA1 proteinlerinin saf olarak elde edilebildiği gözlenmiştir (Şekil 4.2.).

4.3. rBAG1 ve rGRA1 Proteinlerinin Saflaştırılması

pET28a/BAG1 ve pET28a/GRA1 plazmitlerini içeren *E. coli* hücreleri, optimizasyon çalışmalarından elde edilen verilerin sonuçlarına göre 10 litre besin ortamında, IPTG uyarımı sonrası 18°C’de gece boyunca inkübe edilerek üretilmiş ve elde edilen hücreler yüksek basınç altında parçalandıktan sonra elde edilen üst sıvı protein saflaştırma işlemlerinde kullanılmıştır. Sıvı kromatografi cihazında histidin bağlayan afinite ve jel filtrasyon kolonları kullanılarak saflaştırılan rBAG1 ve rGRA1 proteinlerine ait SDS-PAGE ve Western Blot görüntüleri Şekil 4.3.’te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. rBAG1 ve rGRA1 proteinlerinin histidin bağlayan afinite ve jel filtrasyon kolonları kullanılarak saflaştırılmaları sonrası **(A)** SDS-PAGE ve **(B)** Western Blot görüntüleri. Sütun 1: protein merdiveni (Fermentas); Sütun 2: saflaştırılmış rGRA1 proteini; Sütun 3: saflaştırılmış rBAG1 proteini

SDS-PAGE ve Western Blot görüntülerine göre, histidin bağlayan afinite ve jel filtrasyon kolonlarından geçirilen rGRA1 ve rBAG1 proteinlerinin yabancı proteinlerden arındırıldığı ve aşı çalışmasında kullanılabilecek saflığa ulaştığı saptanmıştır.

4.4. Rekombinant Proteinlerin Endotoksin Seviyesi, Protein Konsantrasyonu ve Adjuvant Bağlanma Kapasitesinin Belirlenmesi

Limulus Ameobocyte Lysate (LAL) *Gel-Clot* testi kullanılarak yapılan endotoksin ölçümlerinde afinite ve jel filtrasyon kolonları ile gerçekleştirilen saflaştırma sonrası rBAG1 ve rGRA1 protein örneklerinde endotoksin seviyesinin 0,5 EU/ml'den daha düşük olduğu saptanmıştır. Bradford yöntemi ve seri sulandırılmış BSA proteininin standart olarak kullanıldığı ölçüm ile saflaştırılmış ve endotoksini eksiltilmiş rBAG1 ve rGRA1 protein örneklerinde, protein konsantrasyonunun sırasıyla 2200 µg/ml ve 5900 µg/ml olduğu saptanmıştır.

Aşılama sırasında her fareye 33 µg rGRA1 ve 33 µg rBAG1 proteini uygulanması amaçlanmıştır. En az miktarda adjuvant ile en fazla protein uygulayabilmek için yapılan optimizasyon çalışmasında 25, 50 ve 75 µl adjuvanta 33'er µg rBAG1 veya rGRA1 proteinleri eklenmiş, toplam hacim PBS ile 100 µl'ye tamamlanmış ve inkübasyon sonrası üst sıvılarda protein miktarı ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre 25 µl alum adjuvantı kullanımı sonrası üst sıvılarda protein olmadığı ve 33'er µg rBAG1 veya rGRA1 proteinlerinin tamamının aluma bağlandığı anlaşılmıştır. Bu veriler ışığında multivalan rekombinant protein aşısı Bölüm 3.9.1.'de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

4.5. Humoral İmmun Yanıt

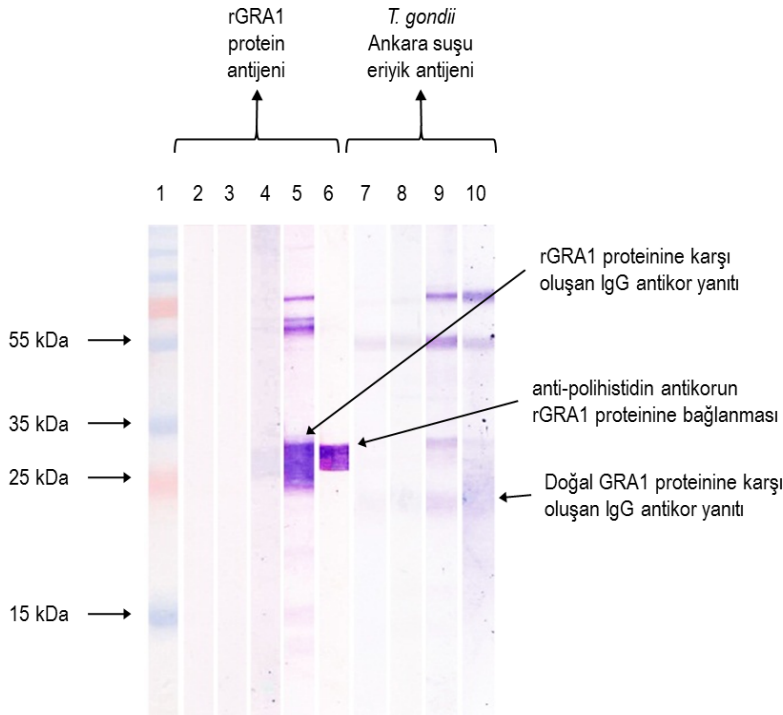
Aşılama ile farelerde uyarılan anti-GRA1 IgG ve anti-BAG1 IgG antikor yanıtları Western Blot ile değerlendirilmiştir. Western Blot sırasında antiijen olarak rGRA1 ve rBAG1 proteinleri ile *T. gondii* Ankara suşu takizoitlerinden hazırlanan eriyik antiijeni kullanılmıştır. Aşı ve kontrol grubu farelerde aşılama ile uyarılan IgG antikor yanıtının IgG₁ veya IgG_{2a} yönüne kutuplanması ise rec-ELISA ile araştırılmıştır.

4.5.1. IgG antikor yanıtı

Aşılanma sonrası uyarılan IgG antikor yanıtının araştırılmasında, aşı ve kontrol gruplarını oluşturan dört grup (her grup 8 fare içermektedir) fareden

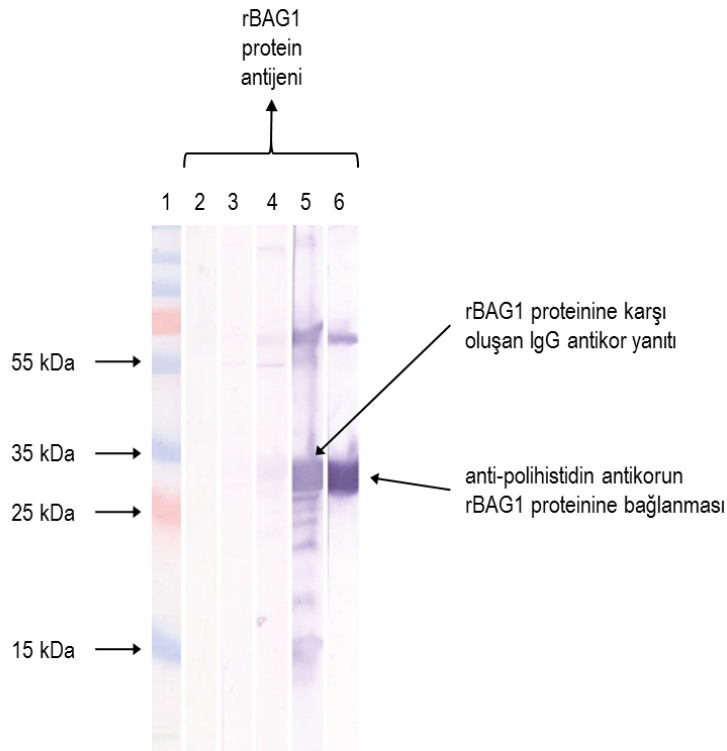
alınan serumlarla, dört serum havuzu oluşturulmuştur. 1. havuz: PBS uygulanan kontrol grubu fareler; 2. havuz: alum uygulanan kontrol grubu fareler; 3. havuz: rBAG1 (+) rGRA1 proteini uygulanan kontrol grubu fareler; 4. havuz: alum (+) rBAG1 (+) rGRA1 uygulanan aşı grubu farelerden oluşmaktadır.

Aşılama sonrası rGRA1 proteini ve *T. gondii* Ankara suşu takizoiti eriyik antijenine karşı oluşan IgG antikor yanıtı Şekil 4.4.'te gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre PBS ve alum uygulanan kontrol grubu farelerde rGRA1 proteini ve *T. gondii* Ankara suşu takizoiti eriyik antijenine karşı her hangi bir antikor yanıtı saptanmamıştır. rBAG1 (+) rGRA1 proteini uygulanan kontrol grubu farelerin ise rGRA1 proteini ve *T. gondii* Ankara suşu takizoiti eriyik antijeninde bulunan doğal GRA1 proteinine karşı IgG antikor yanıtı oluşturduğu gözlenmiştir. Alum (+) rBAG1 (+) rGRA1 uygulanan aşı grubu farelerin ise rGRA1 proteini ve *T. gondii* Ankara suşu takizoiti eriyik antijeninde bulunan doğal GRA1 proteinine karşı daha kuvvetli IgG antikor yanıtı oluşturduğu saptanmıştır.



Şekil 4.4. Aşılama sonrası rGRA1 proteini ve *T. gondii* Ankara suşu takizoiti eriyik antijeninde bulunan doğal GRA1 proteinine karşı oluşan IgG antikor yanıtının Western Blot ile gösterilmesi. Sütun1: protein merdiveni (Fermentas); Sütun2 ve 7: PBS uygulanan kontrol grubu, Sütun 3 ve 8: alum uygulanan kontrol grubu; Sütun 4 ve 9: rBAG1 (+) rGRA1 proteini uygulanan kontrol grubu; Sütun 5 ve 10: alum (+) rBAG1 (+) rGRA1 uygulanan aşı grubu; Sütun 6: monoklonal anti polihistidin antikorun kullanıldığı kontrol bantı.

Aşılama sonrası rBAG1 proteinine karşı oluşan IgG antikor yanıtı Şekil 4.5.'te gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre PBS ve alum uygulanan kontrol grubu farelerde rBAG1 proteinine karşı herhangi bir antikor yanıtı oluşmamıştır. rBAG1 (+) rGRA1 proteini uygulanan kontrol grubu farelerin ise rBAG1 proteinine karşı IgG antikor yanıtı oluşturduğu gözlenmiştir. Alum (+) rBAG1 (+) rGRA1 uygulanan aşı grubu farelerin ise rBAG1 proteinine karşı daha kuvvetli IgG antikor yanıtı oluşturduğu saptanmıştır.



Şekil 4.5. Aşılama sonrası rBAG1 proteinine karşı oluşan IgG antikor yanıtının Western Blot ile gösterilmesi. Sütun1: protein merdiveni (Fermentas); Sütun2: PBS uygulanan kontrol grubu, Sütun 3: alum uygulanan kontrol grubu; Sütun 4: rBAG1 (+) rGRA1 proteini uygulanan kontrol grubu; Sütun 5: alum (+) rBAG1 (+) rGRA1 uygulanan aşı grubu; Sütun 6: monoklonal anti polihistidin antikorun kullanıldığı kontrol bantı.

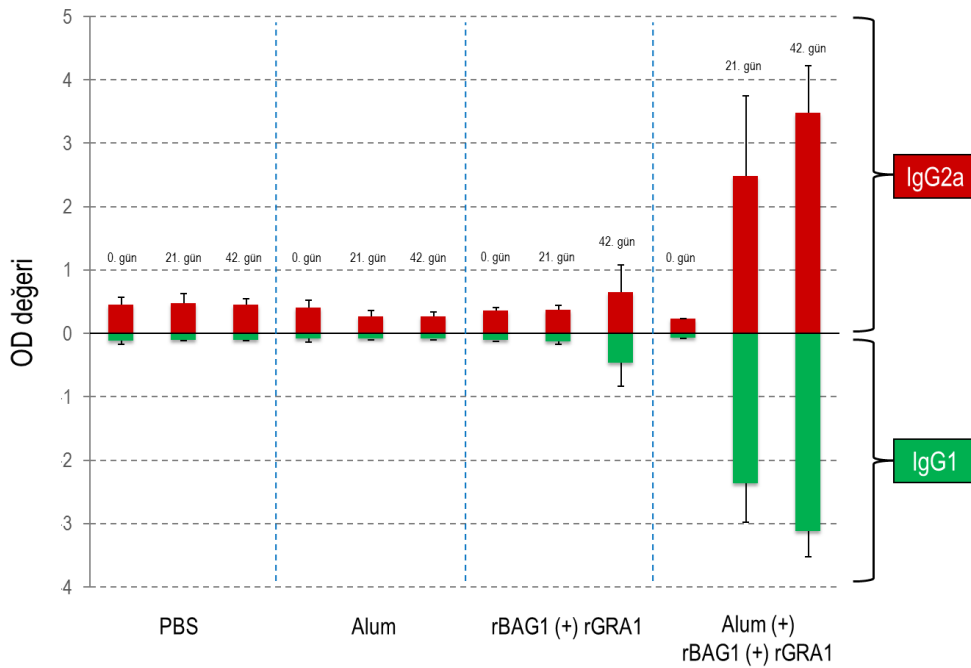
4.5.2. IgG₁ ve IgG_{2a} antikor yanıtı

Aşılama öncesi ve sonrası farelerden alınan serum örneklerinde, rGRA1 ve rBAG1 proteinlerine karşı oluşan IgG₁ ve IgG_{2a} antikor yanıtı rec-ELISA ile araştırılmıştır. Farelerde aşılama ile IgG_{2a} antikor yanıtının uyarılmasının immun yanıtın Th₁ yönüne, IgG₁ antikor yanıtının uyarılmasının ise immun yanıtın Th₂

yönüne kutuplaştığını dolaylı olarak göstermektedir (Borrego et al., 2006; Döşkaya et al., 2007; Kutzler and Weiner, 2008).

Aşılama sonrası oluşan IgG₁ ve IgG_{2a} antikor yanıtı Grafik 4.1.'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre PBS ve alum uygulanan kontrol grubu farelerde, 42. gün sonunda IgG₁ ve IgG_{2a} değerlerinde aşılama öncesine (0. gün) göre herhangi bir artış saptanmamıştır. rBAG1 (+) rGRA1 proteini uygulanan kontrol grubu farelerde, 42. gün sonunda IgG₁ değerlerinin aşılama öncesine göre belirgin şekilde arttığı (P=0,0008), rBAG1 (+) rGRA1 proteini uygulanan kontrol grubu farelerde, 42. gün sonunda IgG_{2a} değerlerinin aşılama öncesine göre anlamlı şekilde yükseldiği (P=0,0095) ve alum (+) rBAG1 (+) rGRA1 uygulanan aşı grubu farelerde ise 42. gün sonunda IgG₁ (P<0,0001) ve IgG_{2a} (P<0,0001) değerlerinin aşılama öncesine göre belirgin şekilde arttığı gözlemlenmiştir.

Alum (+) rBAG1 (+) rGRA1 uygulanan aşı grubu farelerde ikinci aşılama sonrası uyarılan IgG_{2a} ve IgG₁ antikor yanıtları karşılaştırıldığında, IgG_{2a} yanıtının IgG₁ yanıtına göre bir miktar daha fazla olduğu görülmüştür. Alum (+) rBAG1 (+) rGRA1 aşısının uyardığı IgG_{2a} antikor yanıtının, alum eklenmemiş kontrol grubu rBAG1 (+) rGRA1 aşısına göre belirgin şekilde fazla olduğu saptanmıştır (P<0,0001).

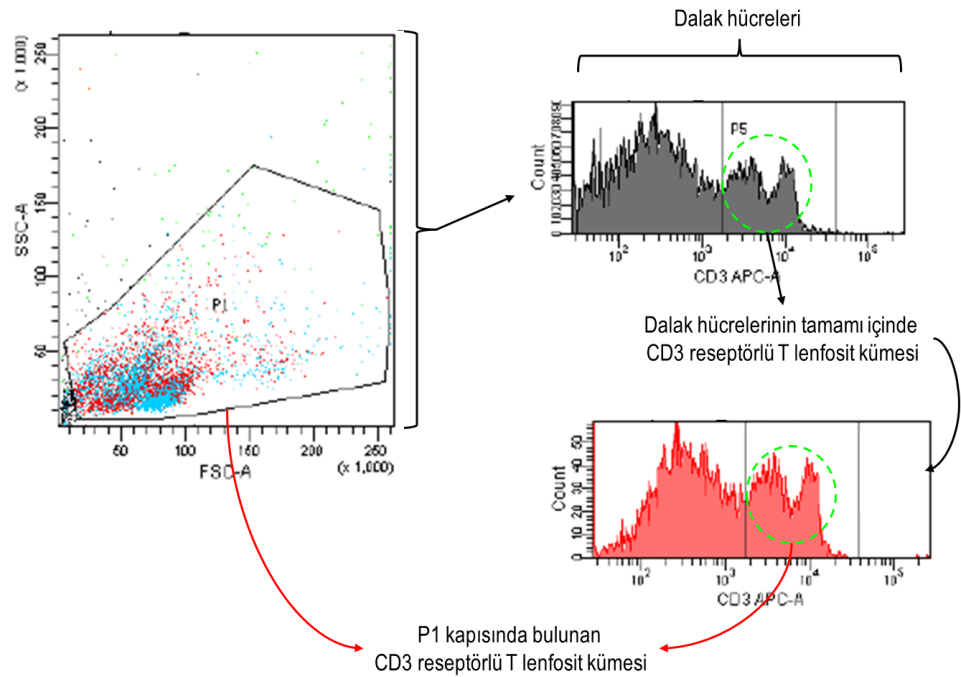


Grafik 4.1. IgG₁ ve IgG_{2a} antikor yanıtı

4.6. Hücresel İmmün Yanıt

Kontrol grubu ve aşı grubu farelerde oluşturulan hücresel immün yanıtın belirlenmesinde, fare dalak hücrelerinin rGRA1 ve rBAG1 protein karışımı ile uyarımı sonrası T hücreler tarafından hücre içine salgılanan sitokin miktarı araştırılmıştır. Hücresel immün yanıtın araştırılmasında dalak hücrelerini uyarmak için protein karışımı konsantrasyonunu belirlemek için optimizasyon çalışması yapılmıştır. Daha sonra belirlenen protein konsantrasyonunda CD₈ hücrelerin salgıladığı IFN- γ oranı, CD₄ hücrelerin salgıladığı IFN- γ ve IL-4 oranı saptanmıştır.

Hücresel immün yanıtın saptanmasında PBS kontrol grubuna ait fare dalak hücreleri anti-CD₃ antikor ile işaretlenmiş ve CD₃ reseptörlü T hücre kümesi belirlenmiştir (Şekil 4.6.).



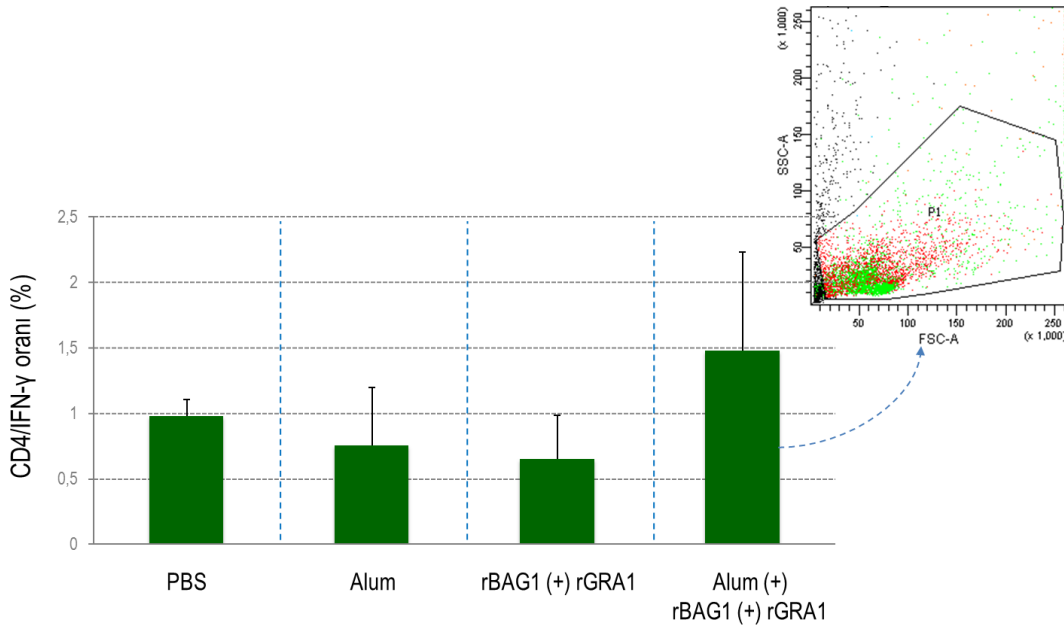
Şekil. 4.6. CD₃ reseptörlü T hücre kümesi

Hücresel immün yanıtın araştırılmasında dalak hücrelerini uyarmak için protein karışımı konsantrasyonunun belirlenmesi için, aşı grubuna ait fare dalak hücreleri, hücre kültürü ortamında rGRA1 (+) rBAG1 protein karışımı ile 200 μ g/ml, 100

$\mu\text{g/ml}$ ve $50 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda uyarılmıştır. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonrası, dalak hücrelerinin $50 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda protein karışımı ile uyarılmasının optimum etkinliği yansıttığı gözlemlenmiştir.

4.6.1. CD₄ hücrelerinin salgıladığı IFN- γ oranı

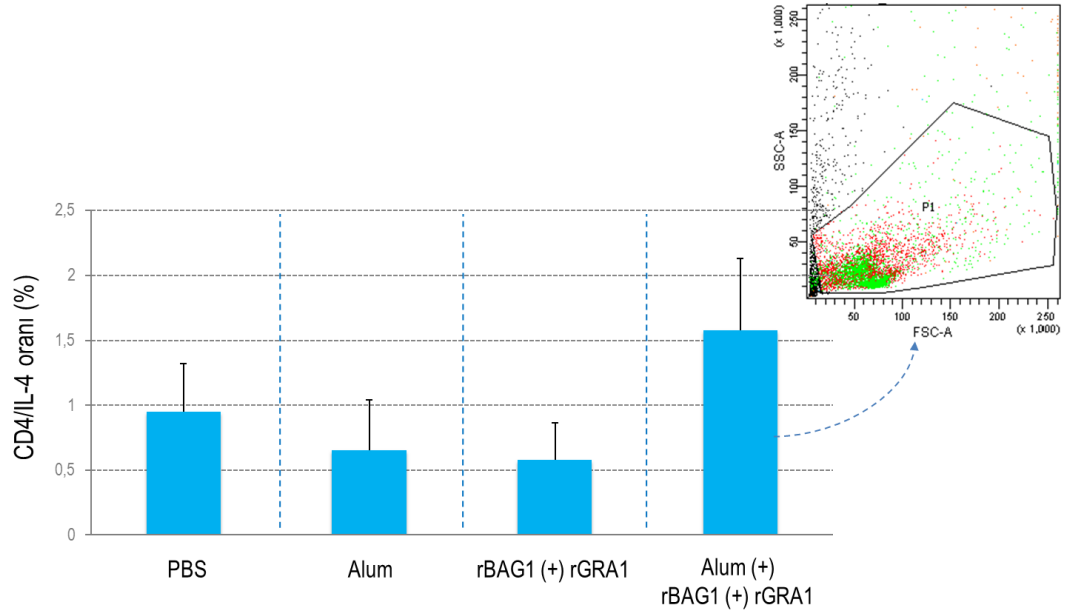
Kontrol grubu ve aşı grubu farelerin dalak hücrelerinin rGRA1 (+) rBAG1 protein karışımı ile uyarılmaları sonrası CD₄ T lenfositlerin salgıladığı hücre içi IFN- γ oranı Grafik 4.2.'de verilmiştir. Elde edilen verilere göre, alum (+) rBAG1 (+) rGRA1 uygulanan aşı grubu farelerde CD₄ hücrelerin salgıladığı IFN- γ oranı PBS ve alum kontrol gruplarına göre sırasıyla 1,51 ve 1,96 kat artmıştır.



Grafik 4.2. CD₄ T lenfositlerin salgıladığı hücre içi IFN- γ oranı

4.6.2. CD₄ hücrelerinin salgıladığı IL-4 oranı

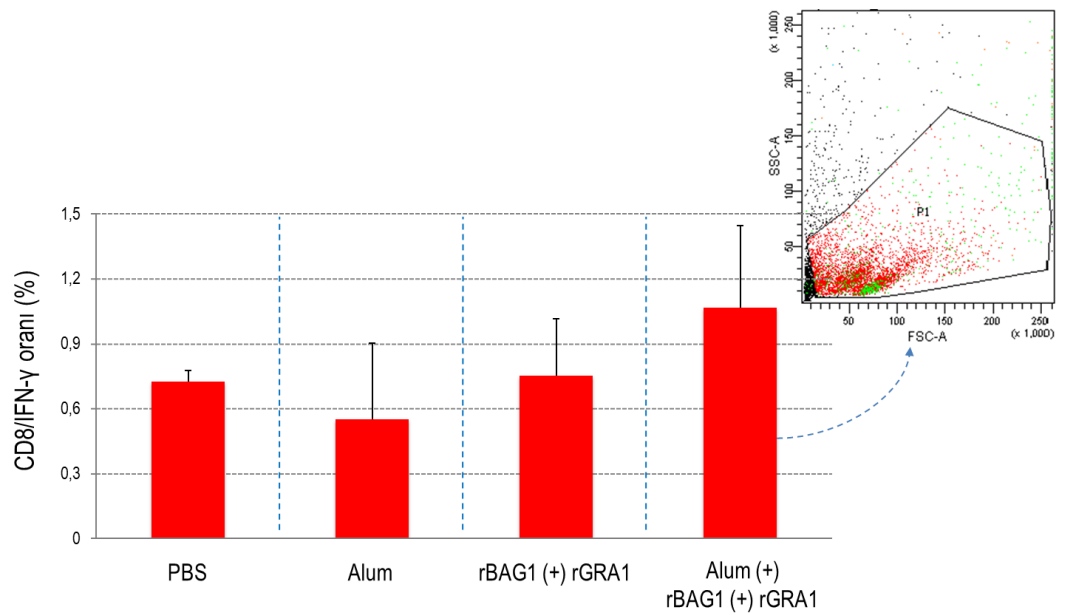
Kontrol grubu ve aşı grubu farelerin dalak hücrelerinin rGRA1 (+) rBAG1 protein karışımı ile uyarılmaları sonrası, CD₄ T lenfositlerin salgıladığı hücre içi IL-4 oranı Grafik 4.3.'de gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre, alum (+) rBAG1 (+) rGRA1 uygulanan aşı grubu farelerde CD₄ hücrelerin salgıladığı IL-4 oranı PBS ve alum kontrol gruplarına göre sırasıyla 1,65 ve 2,42 kat artmıştır.



Grafik 4.3. CD₄ T lenfositlerin salgıladığı hücre içi IL-4 oranı

4.6.3. CD₈ hücrelerinin salgıladığı IFN- γ oranı

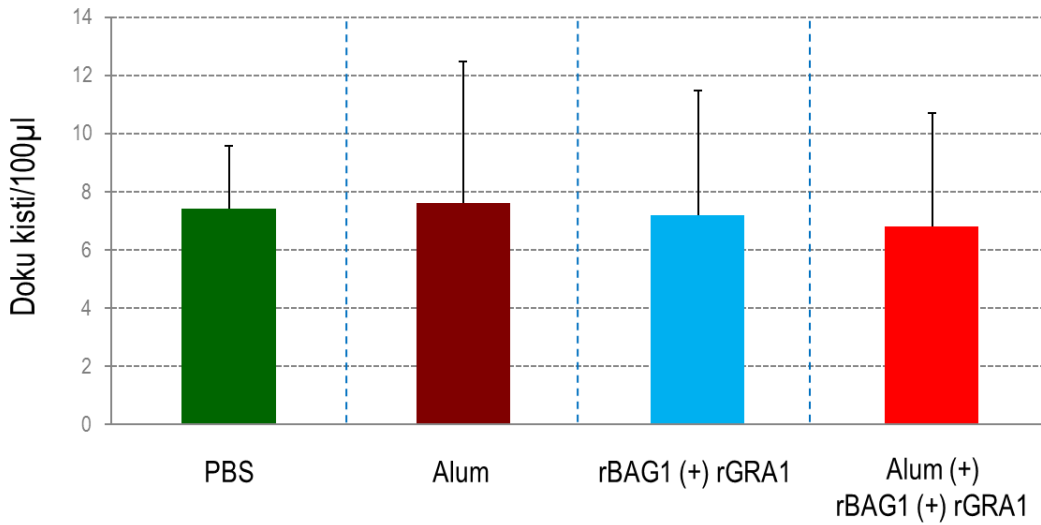
Kontrol grubu ve aşı grubu farelerin dalak hücrelerinin rGRA1 (+) rBAG1 protein karışımı ile uyarılmaları sonrası CD₈ T lenfositlerin salgıladığı hücre içi IFN- γ oranı Grafik 4.4.'te detaylandırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, alum (+) rBAG1 (+) rGRA1 uygulanan aşı grubu farelerde CD₈ hücrelerin salgıladığı IFN- γ oranı PBS ve alum kontrol gruplarına göre sırasıyla 1,47 ve 1,93 kat artmıştır.



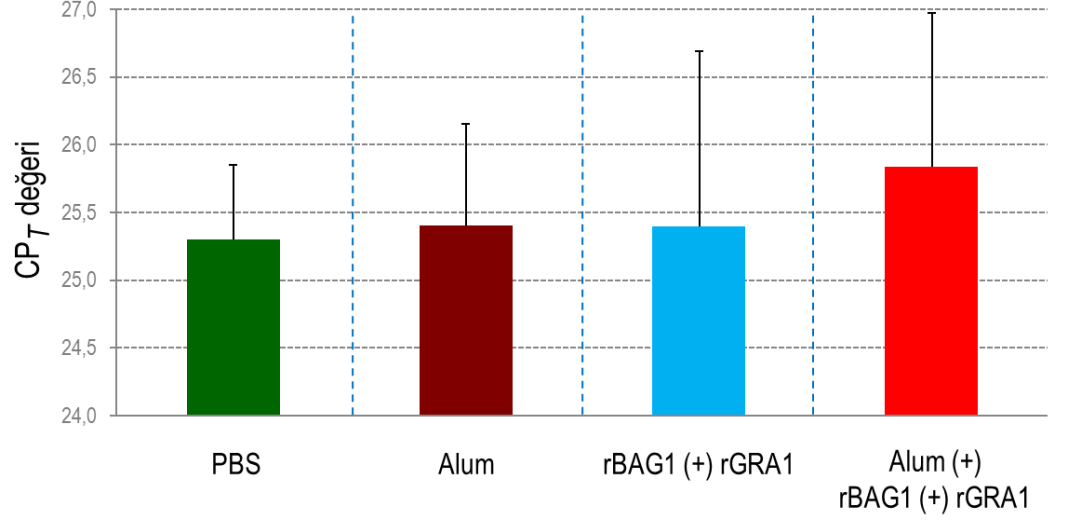
Grafik 4.4. CD₈ T lenfositlerin salgıladığı hücre içi IFN- γ oranı

4.7. *T. gondii* PRU Suşuna Karşı Oluşan Korunma

İkinci aşılamadan 21 gün sonra (42. gün) kontrol grupları ve aşı grubunda bulunan fareler oral yoldan, 10-12 doku kisti (*T. gondii* PRU suşu) ile enfekte edilmiştir. Enfeksiyon sonrası 42. günde farelerin beyinlerindeki doku kisti miktarı mikroskopi ve gerçek zamanlı PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Mikroskopi sonrası elde edilen verilere göre, alum (+) rBAG1 (+) rGRA1 uygulanan aşı grubu farelerinin beyinde bulunan ortalama doku kisti miktarının PBS ve alum kontrol gruplarına göre sırasıyla % 8,11 ve % 10,52 azaldığı gözlenmiştir (Grafik 4.5.). Gerçek zamanlı PZR sonrası elde edilen CP_T (*Crossing point threshold*; *T. gondii* DNA'sının saptanmaya başlandığı ilk eşik değeri. Bu değer ne kadar büyükse aranan DNA miktarı o kadar azdır.) değerlerine göre, alum (+) rBAG1 (+) rGRA1 uygulanan aşı grubu farelerin beyinlerinde bulunan ortalama *T. gondii* DNA miktarı PBS ve alum kontrol gruplarına göre sırasıyla % 2,07 ve % 1,67 daha yüksek bulunmuştur (Grafik 4.6.).



Grafik 4.5. Mikroskopi sonucu kontrol ve aşı grubu fare beyinlerinde bulunan ortalama doku kisti sayısı



Grafik 4.6. Kontrol ve aşı grubu fare beyin dokularında yapılan gerçek zamanlı PZR sonrası elde edilen CP_T değerleri

5. TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında aşı adayı olarak seçilen BAG1 ve GRA1 proteinleri *T. gondii*'nin yaşam döngüsünde önemli yer tutmaktadır. BAG1 proteini, parazitin bradizoit formuna özgü olup, immun sistemde antijen sunan hücrelerin sitokin salgılamalarını ve dendritik hücrelerin gelişimini indüklemesinin yanında, hücresel immun yanıtın oluşmasında görev almaktadır (Mohamed et al., 2003; Kikumura et al., 2010). GRA1 ise parazitin takizoit, bradizoit ve sporozoit evrelerinin tümünde salgılanmakta olup, konak hücresinin işgali sırasında parazitofor vakuol içine salgılanmaktadır (Cesbron-Delauw et al., 1989). Ayrıca GRA1 proteini Ca^{+2} bağlayarak konak hücrenin işgali sırasında stabilite sağlamaktadır (Cesbron-Delauw et al., 1989).

Doku kisti ile oluşan doğal enfeksiyon sürecinde, bağırsakta serbestlenen bradizoitlerin takizoite dönüşümünün 18 saatte tamamlandığı bilinmektedir (Dubey, 1997). Takizoitler bu dönüşüm sırasında bağırsak epitelyal hücrelerini hiç uyarmadan, 20 saniyeden kısa bir süre içinde protein salgısı ve aktif penetrasyon hareketi ile konak hücreleri işgal edebilmektedir (aktif invazyon). Parazitin konoidi ile temasta olan konak hücre yüzeyinde invajinasyon meydana geldiği, invajinasyonla birlikte parazitin hücre içine ilerlediği ve PV oluşturarak tamamen hücre içine alındığı gösterilmiştir (Bkz Bölüm 2.4.2.).

Takizoitin konak hücreleri hızla işgal edebilmesi ve kendini konak hücrelerin immun mekanizmalarından PV içine girerek başarı ile saklaması, parazitin sadece takizoit formuna karşı yapılan aşı denemelerindeki başarının kısıtlı olmasının başlıca sebeplerinden sayılabilir (Tablo 2.4.). *T. gondii*'ye karşı geliştirilecek bir aşının, parazitin hem bradizoit, hem de takizoit formlarına karşı kademeli korunma sağlaması, aşının koruyuculuğunu arttırabilecektir.

Bu sebeplerle, bu çalışmada *T. gondii*'nin bradizoit evresinde salgılanan BAG1 ile hem bradizoit hem de takizoit evrelerinde salgılanan GRA1 proteinleri kullanılarak aşı geliştirilmesi amaçlanmıştır. Diğer bir deyişle, aşı ile uyarılan immun yanıtın *T. gondii* bradizoit ve takizoit formlarına ardışık olarak etki ederek, hastalığın şiddetinin azaltılması amaçlanmıştır.

Bunun için öncelikle rekombinant BAG1 ve GRA1 proteinleri üretilmiş ve daha sonra alum adjuvantı ile birleştirilerek hayvan modelinde aşı adayı olarak kullanılmıştır. İkinci aşamada, aşılama sonrasında farelerde uyarılan humoral ve hücrel immun yanıt incelenmiştir. Ayrıca aşılanmış fareler doğal enfeksiyona benzer şekilde ağızdan, *T. gondii* PRU suşu doku kistleri ile enfekte edilmiştir.

Bu çalışmada aşılama sırasında kullanılan rBAG1 ve rGRA1 proteinlerinin moleküler ağırlıkları sırasıyla 30,71 ve 23,79 kDa'dur. SDS-PAGE ve Western Blot görüntülerinde rBAG proteini 30 kDa civarında iken, rGRA1 proteini 26 kDa civarında görüntülenmiştir. Döşkaya (2006), yaptığı çalışmada rGRA1 proteininin SDS-PAGE ve Western Blot testlerinde benzer şekilde davrandığını saptamış, MALDI-TOF kütle spektrometrisi ile yapılan inceleme sonucunda rGRA1 protein büyüklüğünün 24 kDa olduğunu göstermiştir.

Aşılama sırasında *T. gondii*'ye karşı korunma sağlayacak immun yanıtın özellikle IFN- γ salgılayan CD₄ Th₁ ve CD₈ T lenfositlerini uyarmasının yanında, özgün antikor yanıtını da uyarması gerektiği belirtilmektedir (Haumont et al., 2000; Bonenfant et al., 2001; Jongert et al., 2008). Farelerde yapılan aşı çalışmalarında elde edilen IgG_{2a} antikor yanıtının, immun yanıtın Th₁ yönüne kutuplaştığının dolaylı göstergesi olduğu belirtilmektedir. Aşılama ile uyarılan IgG₁ antikor yanıtı oluşumunun ise immun yanıtın Th₂ yönüne kutuplaştığının göstergesi olduğu bilinmektedir (Borrego et al., 2006; Döşkaya et al., 2007; Kutzler et al., 2008). Aşılama ile *T. gondii*'ye karşı farelerde elde edilen IFN- γ artışı ve B hücreleri tarafından üretilen IgG_{2a} üretiminin birbiri ile bağlantılı olduğu belirtilmektedir (Dautu et al., 2007; Döşkaya et al., 2007). Bu nedenle, bu çalışmada geliştirilen "adjuvante multivalan rGRA1 ve rBAG1 protein aşısının" [alum (+) rGRA1 (+) rBAG1] IgG_{2a} artışı yanında, IFN- γ salgılayan CD₄ Th₁ ve CD₈ T lenfositlerini de uyarması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, alum (+) rBAG1 (+) rGRA1 aşılması ile farelerde rBAG1 proteini, rGRA1 proteini ve *T. gondii* Ankara suşu takizoiti eriyik antijeninde bulunan doğal GRA1 proteinine karşı özgün IgG antikor yanıtı uyarıldığı saptanmıştır (Şekil 4.4. ve 4.5.). Alum (+) rBAG1 (+) rGRA1 aşılması ile uyarılan IgG antikor yanıtı rec-ELISA ile incelendiğinde, IgG_{2a} yanıtının IgG₁

yanıtına göre bir miktar daha fazla olduğu görülmüştür (Grafik 4.1.). Bu sonuç alum (+) rBAG1 (+) rGRA1 aşısının daha fazla oranda Th₁ yanıtını uyardığını göstermektedir. Alum (+) rBAG1 (+) rGRA1 aşısının uyardığı IgG_{2a} antikor yanıtının alum eklenmemiş kontrol grubu rBAG1 (+) rGRA1 aşısına göre belirgin şekilde fazla olduğu saptanmıştır (P<0,0001). Bu veri alum adjuvantının rekombinant protein aşısının etkinliğinin artırılmasındaki önemini göstermektedir.

Adjuvant olarak alumun seçilmesinde yan etkilerinin az olması ve piyasada bulunan aşılar da en çok kullanılan adjuvant olması etkili olmuştur. Bazı hücre içi enfeksiyonlara karşı etkin bir aşı geliştirilmesinde Th₁ immun yanıtının uyarılmasının, koruyucu immun yanıtın oluşması için gerekli olduğu belirtilmektedir. Th₁ immun yanıtının artırılmasının hedeflendiği aşılar da alüminyum hidroksit adjuvantları kullanılmıştır (Guy, 2007; Kundi, 2007; Wack et al., 2008; Didierlaurent et al, 2009; Mori et al., 2012).

T. gondii'ye karşı geliştirilen rekombinant protein aşı çalışmalarında adjuvant olarak genellikle alum kullanılmıştır. Petersen et al. (1998) farelere alum ile adjuvante rekombinant SAG1 protein aşısı uygulamış ve IgG₁ antikor yanıtının IgG_{2a} yanıtına göre daha kuvvetli olduğunu yayınlamıştır. Martin et al. (2004) farelere alum ile adjuvante multivalan rekombinant GRA4 ve ROP2 protein aşısı uygulamıştır. rROP2'ye karşı oluşturulan IgG₁ antikor yanıtının IgG_{2a} antikor yanıtından daha yüksek olduğu, rGRA4'e karşı oluşturulan IgG₁ miktarının IgG_{2a} miktarına eşit olduğunu belirtmiştir.

T. gondii'ye karşı multivalan rekombinant protein aşısı geliştirilen diğer çalışmalarda alum dışında Freund ve Cpg-OGN gibi adjuvantlar kullanılmıştır (Tablo 2.4.). SAG1, SAG2, SAG3, SRS1, P54 rekombinant protein karışımının Freund adjuvantı ile farelere uygulandığı bir çalışmada, antikor yanıtının IgG₁ yönüne kutuplaştığı saptanmıştır (Mishima et al., 2001). SAG1 ve GRA2 füzyon proteininin Freund adjuvantı ile birleştirip farelere uygulandığı bir başka çalışmada ise antikor yanıtının IgG_{2a} yönüne kutuplaştığı gösterilmiştir (Zhou et al., 2007). Dziadek et al. (2009) ROP2 ve ROP4 rekombinant protein karışımını Freund adjuvantı ile farelere uygulamış ve antikor yanıtının IgG₁ yönünde

arttığını saptamıştır. Aynı araştırmacılar ROP2, ROP4, GRA4 ve SAG1 rekombinant proteinleri ile oluşturdukları üç farklı karışımı Freund adjuvantı ile farelere uygulamış ve antikor yanıtlarının tüm gruplarda IgG₁ yönünde arttığını belirtmiştir (Dziadek et al., 2012). Sánchez et al. (2011) ROP2 ve GRA4 rekombinant protein karışımını Cpg-ODN adjuvantı ile farelere uygulamış ve antikor yanıtının IgG_{2a} yönüne kutuplaştığını göstermiştir.

GRA1 ve BAG1 genlerini içeren DNA aşı çalışmalarında ise genellikle IgG_{2a} antikor yanıtı uyarılmıştır (Vercammen et al., 2000; Nielsen et al., 2006; Dautu et al., 2007; Döşkaya et al., 2007; Jongert et al., 2007). GRA1 ile yapılan DNA aşı çalışmasında iki farklı tür farede (BALB/c ve C3H) antikor yanıtı incelenmiş, IgG_{2a} antikor miktarının IgG₁ antikor miktarına oranla genelde daha yüksek olduğu saptanmıştır (Vercammen et al., 2000). BAG1 ve MAG1 kodlayan plazmitlerle farelerde yapılan aşı çalışmasında, BAG1 kodlayan plazmite karşı oluşturulan IgG_{2a} antikor yanıtının MAG1 kodlayan plazmite göre daha yüksek, toplam IgG_{2a} antikor yanıtının IgG₁ antikor yanıtına oranla daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Nielsen et al., 2006). GRA1, GRA7 ve ROP2 kodlayan plazmitlerle farelerde gerçekleştirilen kokteyl aşı denemesinde, IgG_{2a} antikor yanıtının IgG₁ antikor yanıtına göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Jongert et al., 2007). Bu sonuçlardan farklı olarak, Dautu et al. (2007) MIC2, M2AP, AMA1 ve BAG1 kodlayan plazmitler ile farelerde yaptıkları çalışmada BAG1'e karşı oluşturulan IgG₁ antikor yanıtının IgG_{2a} antikor yanıtına oranla daha yüksek olduğunu göstermiştir. Provax ile adjuvante rekombinant GRA1 protein aşısı ve GRA1 DNA aşısının kullanıldığı bir başka çalışma yukarıdaki veriler ile uyumlu olup, rGRA1 protein aşısının, IgG₁ antikor yanıtını IgG_{2a} antikor yanıtına göre daha belirgin uyardığı, GRA1 DNA aşısının ise IgG_{2a} antikor yanıtını IgG₁ antikor yanıtına göre daha fazla uyardığını göstermektedir (Döşkaya et al., 2007).

Bu çalışmada hücresel immun yanıtın incelenmesi sırasında elde edilen verilere göre, alum (+) rBAG1 (+) rGRA1 uygulanan aşı grubu farelerde CD₄ hücrelerin salgıladığı IFN- γ ve IL-4 ile CD₈ hücrelerin salgıladığı IFN- γ oranlarının kontrol grubu farelere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (Grafik 4.2., 4.3. ve 4.4.). Aşılama ile *T. gondii*'ye karşı korunma sağlayacak immun yanıtın, özellikle IFN- γ salgılayan CD₄ Th₁ ve CD₈ T lenfositleri uyarması

beklendiği için bu çalışmada uyarılan hücresel immün yanıtın farelerde korunma sağlayabileceği sonucuna varılmıştır.

Alum adjuvantı kullanılan multivalan rekombinant GRA4 ve ROP2 protein aşı çalışmasında, farelerde rROP2 ile daha çok IL-4 yanıtı uyarılırken, rGRA4 ile daha çok IFN- γ salgılanması uyarıldığı izlenmiştir (Martin et al., 2004). Freund ile adjuvante edilmiş rekombinant SAG1 ve GRA2 füzyon proteini aşısının farelerde IFN- γ salgısının arttırdığı yayınlanmıştır (Zhou et al., 2007).

Freund adjuvantı kullanılan multivalan rekombinant ROP2 ve ROP4 rekombinant protein karışımının ise farelerde IFN- γ ve IL-2 yanıtını uyardığı saptanmıştır (Dziadek et al., 2009). Aynı grubun daha çok protein ile (ROP2, ROP4, GRA4 ve SAG1) gerçekleştirdiği çalışmada, IFN- γ oranının beklenilenin aksine fazla artmadığı fakat IL-4 oranının arttığı saptanmıştır (Dziadek et al., 2012). Rekombinant ROP2 ve GRA4 protein karışımının farelere uygulandığı bir başka çalışmada, farelerde IFN- γ artışı yanı sıra IL-10 artışının da olduğu belirtilmiştir (Sánchez et al., 2011).

GRA1 ve BAG1 genlerini içeren DNA aşı çalışmalarında ise genelde IFN- γ artışı saptanmıştır (Vercammen et al., 2000; Döşkaya et al., 2007; Jongert et al., 2007; Dautu et al., 2007). GRA1 DNA aşısı kullanılan bir çalışmada, iki farklı tür farede (BALB/c ve C3H) IFN- γ seviyesinde artış saptanmıştır (Vercammen et al., 2000). GRA1, GRA7 ve ROP2 kodlayan plazmitlerin uygulandığı farelerde IFN- γ seviyesinde artış gözlenmiştir (Jongert et al., 2007). MIC2, M2AP, AMA1 ve BAG1 kodlayan plazmitler ile farelerde yapılan bir çalışmada IFN- γ seviyesinde belirgin artış sağlanırken, IL-4 seviyesindeki artışın sınırlı olduğu bildirilmiştir (Dautu et al., 2007). GRA1 DNA aşısı ile uyarılan IFN- γ seviyesinin, Provax ile adjuvante rekombinant GRA1 protein aşısına göre daha az olduğu belirtilmiştir (Döşkaya et al., 2007).

Aşı çalışmalarında, uyarılan immün yanıtın incelenmesi yanında, aşının hayvan modelinde oluşturduğu koruyuculuğun da incelenmesi önemlidir. *T. gondii*'ye karşı geliştirilen aşı denemelerinde genellikle *T. gondii* RH suşuna ait takizoitler intraperitoneal olarak uygulanmaktadır. *T. gondii* RH suşu takizoitleri

letal (*öldürücü*) dozda (10^5 takizoit/fare) i.p. yoldan uygulandığında, farelerde ortalama 4-5 günde ölüme sebep olmaktadır. Halbuki takizoitler konak hücreleri hızla işgal edip, PV içine girerek kendilerini konağın immun sistem yanıtından başarı ile saklamaktadırlar. Takizoitlerle enfeksiyon ancak laboratuvar ortamında kaza ile gerçekleşmektedir. Hayvanlar ve insanlar için doğal enfeksiyon kaynağı, doku kistleri veya ookistlerin ağızdan alınmasıdır. Dolayısıyla *T. gondii*'ye karşı aşı çalışmalarında doku kistleri veya ookistlerin oral yoldan uygulanmasının doğru olacağı düşünülmüştür. Aşılama yapılan fare grubunda kontrol gruplarına göre doku kisti sayısında azalma, aşının koruyucu etkisini göstermesi açısından önemlidir.

Bu çalışmada aşı ve kontrol grubu farelerde *T. gondii* PRU suşu ile oral yoldan (10-12 kist/fare) oluşturulan enfeksiyonun 42. günündeki mikroskopik inceleme sonucunda, alum (+) rBAG1 (+) rGRA1 uygulanan aşı grubu farelerin beyinlerindeki doku kisti miktarının PBS ve alum kontrol gruplarına göre % 8,11 ve % 10,52 azaldığı gösterilmiştir (Grafik 4.5.).

Yapılan bir çalışmada alum ile adjuvante rekombinant SAG1 protein aşısı uygulanan fare grupları *T. gondii* RH suşu takizoitleri ile i.p. (10^5 takizoit/fare) yoldan ve SSI119 suşu doku kistleri ile s.c. (100 kist/fare) yoldan enfekte edilmiştir. Doku kisti ile enfekte edilen aşı grubundaki kist miktarı kontrol grubuna göre daha fazla miktarda iken, takizoit ile enfekte edilen aşı grubu farelerinin % 55'inin 11. günde yaşadığı belirtilmiştir (Petersen et al., 1998). Alum ile adjuvante multivalan rekombinant GRA4 ve ROP2 protein aşısı uygulanan fareler *T. gondii* ME49 suşuna ait doku kistleri (20-100 kist/fare) ile oral yoldan enfekte edilmiş ve aşı grubundaki farelerin beyinlerindeki kist sayısının anlamlı olarak azaldığı belirtilmiştir (Martin et al., 2004). Freund ile adjuvante rekombinant SAG1, SAG2, SAG3, SRS1, P54 protein karışımı ile aşılanan fareler *T. gondii* Beverley suşu doku kistleri ile (300 kist/fare) i.p. yoldan enfekte edilmiş ve aşı grubundaki farelerin % 17'sinin 11. gün ve sonrasında yaşadığı belirtilmiştir (Mishima et al., 2001). Freund ile adjuvante SAG1 ve GRA2 füzyon proteini ile hazırlanan aşının uygulandığı fareler *T. gondii* RH suşu takizoitleri ile i.p. (10^4 takizoit/fare) yoldan enfekte edilmiş ve aşı grubundaki farelerin 6-15. günler arası öldüğü, yaşam sürelerinin uzadığı belirtilmiştir (Zhou

et al., 2007). ROP2 ve ROP4 rekombinant protein karışımının Freund adjuvantı ile farelere uygulandığı bir başka çalışmada, fareler *T. gondii* DX suşuna ait doku kistleri ile i.p. (5 kist/fare) yoldan enfekte edilmiş ve enfeksiyondan dört hafta sonra aşılınmış fare grubundaki doku kistlerinin kontrol grubuna göre % 46 daha az olduğu saptanmıştır (Dziadek et al., 2009). Aynı grubun yaptığı diğer çalışmada ise, Freund ile adjuvante ROP2, ROP4, GRA4 ve SAG1 rekombinant proteinleri ile aşılınan fare grupları yine *T. gondii* DX suşuna ait doku kistleri ile i.p. (5 kist/fare) yoldan enfekte edilmiş ve aşı uygulanan farklı fare türlerinde, enfeksiyondan dört hafta sonra kist sayısında, kontrol grubuna göre % 41-90 arasında azalma olduğu saptanmıştır (Dziadek et al., 2012). ROP2 ve GRA4 rekombinant protein karışımının Cpg-ODN adjuvantı ile birlikte uygulandığı fareler, *T. gondii* ME49 suşu doku kistleri ile oral yoldan (20 kist/fare) enfekte edilmiş ve enfeksiyondan 4 hafta sonra, tüm aşı gruplarında beyindeki kist sayılarının kontrol grubuna göre % 60 üzerinde azaldığı saptanmıştır (Sánchez et al., 2011).

GRA1 DNA aşısı uygulanan bir çalışmada, üç farklı fare türü *T. gondii* IPB-G (i.p./oral) ve 76K (i.p.) suşlarına ait doku kistleri ile (25-100 kist/fare) enfekte edilmiş, C3H farelerde %10-90 arasında koruma sağlandığı, BALB/c ve C57BL6 farelerde ise korunma sağlanamadığı belirtilmiştir (Vercammen et al., 2000). Bir başka çalışmada ise, GRA1, GRA7 ve ROP2 DNA aşılarının uygulandığı C3H fareleri *T. gondii* 76K suşuna ait doku kistleri ile (20-100 kist/fare) oral yoldan enfekte edildikten sonra, kontrol grubuna göre doku kistlerinde % 81-84 oranında azalma sağlandığı bildirilmiştir (Jongert et al., 2007).

BAG1 ve MAG1 DNA aşısı uygulanan fareler ise *T. gondii* SSI 119 suşu doku kistleri ile oral yoldan (30 kist/fare) enfekte edilmiş ve kontrol grubuna göre % 62 oranında daha az doku kisti saptanmıştır (Nielsen et al., 2006). Aynı çalışma grubuna ait sekiz yıl önceki çalışmada, fareler yine SSI119 suşu doku kistleri ile farklı yoldan (s.c.) ve daha yüksek dozda (100 kist/fare) enfekte edilmiştir (Petersen et al., 1998). BAG1 DNA aşısı uygulanan bir başka çalışmada ise, C57BL/6 ve BALB/c fareler *T. gondii* Beverley suşu doku kistleri ile (20 kist/fare) oral yoldan enfekte edilmiş ve C57BL/6 farelerin sırasıyla % 12,5'sinin 15. gün, BALB/c grubu farelerin % 20'sinin 12. gün ve sonrasında sağ kaldığı

bildirilmiştir (Dautu et al., 2007). Aynı çalışma grubuna ait yedi yıl önceki çalışmada, fareler yine Beverley suşu doku kistleri ile farklı yoldan (i.p.) ve daha yüksek dozda (300 kist/fare) enfekte edilmiş ve aşıl原因an gruplarda beyin kisti oluşumu görülmemiştir (Mishima et al., 2001).

Literatürde geçmişte sık kullanılan *T. gondii* RH suşu takizoitlerinin veya farklı suşlara ait doku kistlerinin i.p. yoldan uygulaması günümüzde doğal enfeksiyonu taklit etmek amacı ile tercih edilmemektedir. Bu sonucu aynı çalışma grupları tarafından geçmişte kullanılan i.p. yoldan enfeksiyon modelinin, son yıllarda oral yol uygulamasına dönüştürülmesi desteklemektedir (Petersen et al., 1998; Dautu et al., 2007; Mishima et al., 2001; Nielsen et al., 2006). *T. gondii* RH suşu ile letal enfeksiyon oluşturulması ise bu yolun doğal enfeksiyonda mümkün olmaması sebebiyle artık tercih edilmemektedir. Döşkaya et al. tarafından gerçekleştirilen bir aşı çalışmasında GRA1 DNA aşısı ve Provax ile adjuvante rekombinant GRA1 protein aşısı uygulanan BALB/c fareler *T. gondii* RH suşu takizoitleri ile i.p. (10^5 takizoit/fare) yoldan enfekte edilmiş ve farelerin sırasıyla 8-11. günler ve 8-14. günler arası öldüğü belirtilmiştir (Döşkaya et al., 2007). Bu sebeplerle bu çalışmada enfeksiyon *T. gondii* PRU suşu ile oral yoldan oluşturulmuştur.

Bu çalışmada ilk defa rekombinant BAG1 proteini, bir aşı denemesinde kullanılmıştır. *T. gondii*'ye karşı geliştirilecek aşının parazitin hem bradizoit, hem de takizoit formuna karşı kademeli korunma sağlaması amacı ile rekombinant BAG1 (bradizoite özgü) ve GRA1 (bradizoit ve takizoite özgü) proteinleri ilk defa adjuvante multivalan rekombinant protein aşısının bileşenleri olarak kullanılmıştır. Sonuçta bu çalışmada ilk defa geliştirilen adjuvante multivalan rekombinant BAG1 ve GRA1 protein aşısının fare modelinde koruyucu immun yanıtı uyardığı saptanmıştır. İleride yapılacak çalışmalarda *T. gondii*'nin farklı formlarına özgü antijenlerin saptanmasına gereksinim duyulmaktadır. Seçilen antijenlerin rekombinant protein olarak üretilmesi sonrası farklı adjuvantlarla birleştirilip, hayvan modellerine uygulanmasının daha kuvvetli korunma sağlayacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ada G.**, 1999, The immunology of vaccination, 28-39, Vaccines, Plotkin S.A. and Orenstein W.A. (Eds). WB Saunders, Philadelphia.
- Aguilar J.C. and Rodriguez E.G.**, 2007, Vaccine adjuvants revisited, Vaccine 25, 3752-3762 pp.
- Akısü Ç. ve Budak S.**, 1998, *Toxoplasma gondii*'nin aktif penetrasyonu ve endodiyogenezi, Türkiye Parazitoloji Dergisi 22, 371- 374 ss.
- Andersson C.**, 2000, Production and delivery of recombinant subunit vaccines, Department of Biotechnology Royal Institute of Technology (KTH), Sweden, 92 p.
- Altıntaş K.**, 2002, Tıbbi Parazitoloji, 142-162, Nobel Tıp Yayınları, Ankara.
- Angus C.W., Klivington Evans D., Dubey J.P. and Kovacs J.A.**, 2000, Immunization with a DNA plasmid encoding the SAG1 (P30) protein of *Toxoplasma gondii* is immunogenic and protective in rodents, The Journal of Infectious Diseases 181(1), 317-324 pp.
- Aşı Danışma Merkezi,** “Bağışıklama”
http://asidanisma.com/genel_bagisiklama_01p.asp (Erişim Tarihi: 22 Ağustos 2012)
- Beaman M.H., Mc Cabe R.E., Wong S. and Remington J.S.**, 1995, *Toxoplasma gondii*, 2455-2475, Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Churchill, Livingstone, New York.
- Beckers C.J., Dubremetz J.F., Mercu-Puigalon O. and Joiner K.A.**, 1994, The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP2 is inserted into parasitophorous vacuole membrane surrounding the intracellular parasite is exposed to the host cell cytoplasm, The Journal of Cell Biology 127, 947-961 pp.
- Bonenfant C., Dimier-Poisson I., Velge-Roussel F., Buzoni-Gatel D., Del Giudice D., Rappuoli R. and Bout D.**, 2001, Intranasal immunization with Sag1 and nontoxic mutant heat-labile enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*, Infection and Immunity, 1605–1612 pp.
- Borrego B., Fernandez-Pacheco P., Ganges L., Domenech N., Fernandez-Borges N., Sobrino F. and Rodriguez F.**, 2006, DNA vaccines expressing B and T cell epitopes can protect mice from FMDV infection in the absence of specific humoral responses Vaccine 24, 3889-3899 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Bourguin I., Chardès T. and Bout D.,** 1993, Oral immunization with *Toxoplasma gondii* antigens in association with cholera toxin induces enhanced protective and cell-mediated immunity in C57BL/6 mice, *Infection and Immunity*, 2082-2088 pp.
- BVGH: Bio Ventures for Global Health,** “Recombinant/purified protein vaccines”, <http://www.bvgh.org/Biopharmaceutical-Solutions/Global-Health-Primer/Targets/cid/ViewDetails/ItemID/10.aspx> (Erişim tarihi: 12 Ağustos 2012)
- Carruthers V.B.,** 1999, Armed and Dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells, *Parasitol. Int.* 48, 1- 10 pp.
- Cesbron-Delauw M.F., Guy B., Pierce R.J., Torpier G., Lenzen G., Cesbron J.Y., Charif H., Lepage P., Darcy F., Lecocq J.P. and Capron A.,** 1989, Molecular characterization of a 23 kDa major antigen secrets by *Toxoplasma gondii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7537- 7541 pp.
- Couper K.N., Nielsen H.V., Petersen E., Roberts F., Roberts C.W. and Alexander J.,** 2003, DNA Vaccination with immunodominant tachyzoite surface antigen (SAG1) protects against adult acquired *Toxoplasma gondii* infection but does not prevent maternofetal transmission, *Vaccine* 21, 2813-2820 pp.
- Cui X., Lei T., Yang D., Hao P., Li B. and Liu Q.,** 2012, *Toxoplasma gondii* immune mapped protein-1 (TgIMP1) is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis, *Vaccine* 30(13), 2282-2287 pp.
- Dautu G., Munyaka B., Carmen G., Zhang G., Omata Y., Xuenan X. and Igarashi M.,** 2007, *Toxoplasma gondii*: DNA vaccination with genes encoding antigens MIC2, M2AP, AMA1 and BAG1 and evaluation of their immunogenic potential, *Experimental Parasitology* 116, 273–282 pp.
- Debard N., Buzoni D. and Bout-Gatel D.,** 1996, Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection, *Infectious Immunology* 64, 2158-2166 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Değirmenci A., Döşkaya M., Caner A., Çiçek C., Korkmaz M., Gürüz Y. and Uner A.,** 2011, *Toxoplasma gondii* RH Ankara: production of evolving tachyzoites using a novel cell culture method, *Experimental Parasitology* 128(1), 1-8 pp.
- Didierlaurent A.M., Morel S., Lockman L., Giannini S.L., Bisteau M., Carlsen H., Kielland A., Vosters O., Vanderheyde N., Schiavetti F., Larocque D., Van Mechelen M. and Garçon N.,** 2009, AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity, *The Journal of Immunology* 183(10), 6186-6197 pp.
- Döşkaya M., Caner A., Ajzenberg D., Değirmenci A., Dardé M.L., Can H., Dirim Erdoğan D., Korkmaz M., Üner A., Güngör Ç., Altıntaş K. and Gürüz Y.,** 2013, Isolation of *Toxoplasma gondii* strains similar to Africa 1 genotype in Turkey. *Parasitology International* (in press).
- Döşkaya M., Kalantari-Dehaghi M., Walsh C.M., Hiszczyńska-Sawicka E., Davies D.H., Felgner P.L., Larsen L.S., Lathrop R.H., Hatfield G.W., Schulz J.R., Gürüz Y. and Jurnak F.,** 2007, GRA1 protein vaccine confers better immune response compared to codon-optimized GRA1 DNA vaccine. *Vaccine* 25 (10), 1824-1837 pp.
- Döşkaya M. ve Gürüz Y.,** 2011, Proteinlerin Saflaştırılması, 427-450, *Parazitolojide Laboratuvar*, Korkmaz M. ve Ok Ü. (Derl.), Türkiye Parazitoloji Derneği 23, İzmir, 470 s.
- Döşkaya M.,** 2006, *Toxoplasma gondii* GRA1 proteininin tanımlanması ve aşı çalışmalarındaki yeri, Doktora tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Dubey J.P.,** 1993, *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis, and other tissue cyst-forming Coccidia of humans and animals*, Kreier J.P. (Ed.), *Parasitic Protozoa*, Volume 6, Academic Press Inc., San Diego.
- Dubey J.P., Lindsay D.S. and Speer C.A.,** 1998, Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts, *Clinical Microbiology Rev* 11, 267–299 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Dubey J.P.**, 1997, Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*, The Journal of Eukaryotic Microbiology 44, 592-602 pp.
- Dziadek B., Gatkowska J., Brzostek A., Dziadek J., Dzitko K. and Dlugonska H.**, 2009, *Toxoplasma gondii*: The immunogenic and protective efficacy of recombinant ROP2 and ROP4 rhoptry proteins in murine experimental toxoplasmosis. Experimental Parasitology 123, 81–89 pp.
- Dziadek B., Gatkowska J., Grzybowski M., Dziadek J., Dzitko K. and Dlugonska H.**, 2012, *Toxoplasma gondii*: the vaccine potential of three trivalent antigen-cocktails composed of recombinant ROP2, ROP4, GRA4 and SAG1 proteins against chronic toxoplasmosis in BALB/c mice, Experimental Parasitology 131(1), 133-138 pp.
- Echeverria P., Miguel N., Costas M. and Angel S.**, 2006, Potent antigen-specific immunity to *Toxoplasma gondii* in adjuvant-free vaccination system using Rop2-Leishmania infantum Hsp83 fusion protein, Vaccine 24, 4102–4110 pp.
- El Hajj H., Demey E., Poncet, J., Lebrun M., Wu B., Galeotti N., Fourmaux M.N., Mercerau Pujalon O., Viel H., Labesse G. and Dubremetz J.F.**, 2006, The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: Proteomic and genomic characterization and molecular modeling. Proteomics 6, 5773-5784 pp.
- Endo T., Sethi K.K. and Piekarski G.**, 1982, *Toxoplasma gondii* calcium ionophore A23187-mediated exit of trophozoites from infected murine macrophages. Experimental Parasitology 53, 179-188.
- Fachado A., Rodriguez A. and Angel S.O.**, 2003, Protective effect of a naked DNA vaccine cocktail against lethal toxoplasmosis in mice, Vaccine 21, 1327-1335 pp.
- Fang R., Nie H., Wang Z., Tu P., Zhou D., Wang L., He L., Zhou Y. and Zhao J.**, 2009, Protective immune response in BALB/c mice induced by a suicidal DNA vaccine of the MIC3 gene of *Toxoplasma gondii*, Veterinary Parasitology 164(2-4), 134-140 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Fang R., Feng H., Nie H., Wang L., Tu P., Song Q., Zhou Y. and Zhao J.,** 2010, Construction and immunogenicity of pseudotype baculovirus expressing *Toxoplasma gondii* SAG1 protein in BALB/c mice model, *Vaccine* 28(7), 1803-1807 pp.
- Fang R., Feng H., Hu M., Khan M., Wang L., Zhou Y. and Zhao J.,** 2012, Evaluation of immune responses induced by SAG1 and MIC3 vaccine cocktails against *Toxoplasma gondii*, *Veterinary Parasitology* 187, 140–146 pp.
- Ferguson, D.J.P.,** 2002, *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra?, *Trends in Parasitology* 18, 351-355 pp.
- Fermin Z., Bout D., Ricciardi-Castagnoli P. and Hoebeke, J.,** 1999, Salbutamol as an adjuvant for nasal vaccination, *Vaccine* 17, 1936–1941 pp.
- Fourmaux, M.N., Achbarou, A., Mercereau-Puijalon O., Biderre C., Briche I., Loyens A., Odberg-Ferregut C., Camus D. and Dubremetz, J.F.,** 1996, The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor like domain and binds to host cell surface, *Molecular and Biochemical Parasitology* 83, 201-210 pp.
- Gillray J.,** “*The Cow-Pock or the Wonderful Effects of the New Inoculation*” http://en.wikipedia.org/wiki/File:The_cow_pock.jpg (Erişim Tarihi: 15 Mart 2013)
- Glenny A.T., Pope C.G., Waddington H. and Wallace U.,** 1926, Immunological notes XVII to XXIV, *The Journal of Pathology and Bacteriology* 29, 31-40 pp.
- Guiton R., Zagani R. and Dimier-Poisson I.,** 2009, Major role for CD₈⁺ T cells in the protection against *Toxoplasma gondii* following dendritic cell vaccination, *Parasite Immunology* 31, 631–640 pp.
- Guy B.,** 2007, The perfect mix: recent progress in adjuvant research, *Nature Reviews Microbiology* 5, 505–517 pp.
- Gülçe İz S., Döşkaya M., Borrego B., Rodriguez F., Gürüz Y. and Gürhan İ.D.,** 2013, Co-expression of the Bcl-xL antiapoptotic protein enhances the induction of Th₁-like immune responses in mice immunized with DNA vaccines encoding FMDV B and T cell epitopes. *Veterinary Research Communications* (in press).

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Gülçe İz S.**, 2011, Şap Hastalığına Karşı DNA Aşı Modeli Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Gülmezoğlu E. ve Ergüven S.**, 1994, İmmunoloji, Hacettepe Taş Kitapçılık, Ankara
- Gürüz, A.Y. ve Delibaş, S.B.**, 2007, Toxoplasmosis ve İmmunolojisi, 167-194, Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji, M. A. Özcel, A. İnci, N. Turgay, ve E. Köroğlu (Derl.), Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları 21, İzmir, 732s.
- Hansson M., Nygren P. and Stahl S.**, 2000, Design and production of recombinant subunit vaccines, *Biotechnology and Applied Biochemistry* 32, 95–107 pp.
- Harlow E. and Lane D.**, 1988, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, A.B.D.
- Haumont M., Delhaye L., Garcia L., Margarita J., Pasqualina M., Véronique D., Vincent V., Alex B., Ralph B. and Alain J.**, 2000, Protective immunity against congenital toxoplasmosis with recombinant SAG1 protein in a guinea pig model, *Infection and Immunity* 68(9), 4948-4953 pp.
- Hiszczyńska-Sawicka E., Li H., Xu J.B., Olędzka G., Kur J., Bickerstaffe R. and Stankiewicz M.**, 2010, Comparison of immune response in sheep immunized with DNA vaccine encoding *Toxoplasma gondii* GRA7 antigen in different adjuvant formulations, *Experimental Parasitology* 124(4), 365-372 pp.
- Hökelek M.**, “Tokso plazmoz”, www.ekmud.org/dosya/zoo06/20-mhokelek.pdf (Erişim tarihi: 26 Kasım 2012)
- Ilchmann K., Revill J., McLeish C. and Nightingale P.**, “*Vaccine Development & the BWC*”, *S&T Reviews*, [http://www.unog.ch/80256EDD006B8954/\(httpAssets\)/1820F9EAAC22FDE9C125787600385C25/\\$file/Ilchmann+et+al+-+Vaccines+and+the+BWC.pdf](http://www.unog.ch/80256EDD006B8954/(httpAssets)/1820F9EAAC22FDE9C125787600385C25/$file/Ilchmann+et+al+-+Vaccines+and+the+BWC.pdf) (Erişim tarihi: 12 Ağustos 2012)
- Ismael A.B., Sekkai D., Collin C., Bout D. and Mevelec M.N.**, 2003, The MIC3 gene of *Toxoplasma gondii* is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis, *Infection and Immunity* 71, 6222–6228 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Jongert E., Melkebeek V., De Craeye S., Dewit J., Verhelst D. and Cox E.,** 2008, An enhanced GRA1—GRA7 cocktail DNA vaccine primes anti-Toxoplasma immune responses in pigs, *Vaccine* 26, 1025—1031 pp.
- Jongert E., Craeye S., Dewit J. and Huygen K.,** 2007, GRA7 provides protective immunity in cocktail DNA vaccines against *Toxoplasma gondii*, *Parasite Immunology* 29 (9), 445-453 pp.
- Joynson D.H.M. and Wreghitt T.G.,** 2005, Toxoplasmosis, A comprehensive clinical guide, Cambridge University Press, 412 p.
- Kasper L.H. and Boothroyd J.C.,** 1993, *Toxoplasma gondii* and toxoplasmosis, 269-300, Warren K.S.(Ed.), Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections, Blackwell Scientific Publications, Boston.
- Kasper L.H., Crabb J.H. and Pfefferkorn E.R.,** 1983, Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody, *The Journal of Immunology* 130, 2407- 2412.
- Khosroshahi K., Ghaffarifar F., D'Souza S., Sharifi Z. and Dalimi A.,** 2011, Evaluation of the immune response induced by DNA vaccine cocktail expressing complete SAG1 and ROP2 genes against toxoplasmosis, *Vaccine* 29, 778—783 pp.
- Kikumura A., Fang H., Mun H.S., Uemura N., Makino M., Sayama Y., Norose K. and Aosai F.,** 2010, Protective immunity against lethal anaphylactic reaction in *Toxoplasma gondii*-infected mice by DNA vaccination with *T. gondii*-derived heat shock protein 70 gene, *Parasitology International* 59 (2), 105—111 pp.
- Kim K.,** 2004, Role of proteases in host cell invasion by *Toxoplasma gondii* and other *Apicomplexa*, *Acta Tropica* 91, 69-81 pp.
- Kim K. and Boothroyd, J.C.,** 1993, Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker, *Science* 262, 911-914 pp.
- Kindt T.J., Goldsby R.A. and Osborne B.A.,** 2007, *Kuby Immunology*, W.H. Freeman and Company, USA.
- Kundi M.,** 2007, New hepatitis B vaccine formulated with an improved adjuvant system, *Expert Review of Vaccines* 6, 133—140 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kutzler M. and Weiner D.B.**, 2008, DNA vaccines: ready for prime time?, *Nature Reviews Genetics* 9, 776-788 pp.
- Lekutis C., Ferguson D.J.P., Grigg M.E., Camps M. and Boothroyd J.C.**, 2001, Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *International Journal of Parasitology* 31, 1285- 1292 pp.
- Leriche M.A. and Dubremetz J.F.**, 1991, Characterization of protein contents of rhoptries and dense granule proteins of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. *Molecular and Biochemical Parasitology* 45, 249-260 pp.
- Letscher Bru V., Villard O., Risse B., Zauke M., Klein J.P. and Kien T.T.**, 1998, Protective effect of vaccination with a combination of recombinant surface antigen 1 and interleukin 12 against toxoplasmosis in mice, *Infection and Immunity* 66, 4503–4506 pp.
- Letscher Bru V., Pfaff A.W., Abou-Bacar A., Filisetti D., Antoni E., Villard O., Klein J.P. and Candolfi E.**, 2003, Vaccination with *Toxoplasma gondii* SAG-1 protein is protective against congenital toxoplasmosis in BALB/c mice but not in CBA/J mice, *Infection and Immunity*, 71, 6615-6619 pp.
- Leyva R., Herion P. and Saavedra R.**, 2001, Genetic immunization with plasmid DNA coding for the ROP2 protein of *Toxoplasma gondii*, *Parasitology Research* 87, 70-79 pp.
- Liang L., Döskaya M., Juarez S., Caner A., Jasinskas A., Tan X., Hajagos B.E., Bradley P.J., Korkmaz M., Gürüz Y., Felgner P. and Davies D.H.**, 2011, Identification of potential serodiagnostic and subunit vaccine antigens by antibody profiling of toxoplasmosis cases in Turkey. *Molecular and Cellular Proteomics*, 10(7):M110.006916.
- Liu Q, Shang L., Jin H., Wei F., Zhu X. and Gao H.**, 2010, The protective effect of a *Toxoplasma gondii* SAG1 plasmid DNA vaccine in mice is enhanced with IL-18, *Research in Veterinary Science* 89, 93–97 pp.
- Lourenço E.V., Pereira V.M., Faca A.A., Coelho J.R., Mineo M.C., Roque L.J. and Castelo A.P.**, 2001, *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC1 is a lactose binding protein, *Glycobiology* 11, 541-547 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Machado A., Caetanoa B., Barbosa R., Salgado A.P., Rabelo R., Garcia C., Bruna-Romero O., Escriou N. and Gazzinelli R.,** 2010, Prime and boost immunization with influenza and adenovirus encoding the *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 (SAG2) induces strong protective immunity, Vaccine 28, 3247–3256 pp.
- Makino M., Uemura N., Moroda M., Kikumura A. and Piao L.,** 2011, Innate immunity in DNA vaccine with *Toxoplasma gondii*-heat shock protein 70 gene that induces DC activation and Th₁ polarization, Vaccine 29, 1899–1905 pp.
- Marti M., Li Y., Kohler P. and Hehl A.B.,** 2001, Conformationally correct expression of membrane anchored *Toxoplasma gondii* SAG1 in the primitive protozoan *Giardia duodenalis*, Infection and Immunity 70, 1014–1016 pp.
- Martin V., Supanitsky A., Echeverria P., Litwin S., Tanos T., Roodt A., Guarnera A. and Angel S.,** 2004, Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the GRA4 gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 11(4), 704-710 pp.
- Mercier C., Howe D.K., Mordue D., Lingnau M. and Sibley L.D.,** 1998, Targeted disruption of the GRA2 locus in *Toxoplasma gondii* decreases acute virulence in mice, Infection and Immunity 66, 4176-4182 pp.
- McLeod R., Remington J.S. and Desmonts G.,** 1995, Toxoplasmosis, 140-267, Infectious diseases of fetus and newborn infant, Remington J.S. and Klein J.O. (Eds.), W.B. Saunders, Philadelphia.
- Min J., Qu D., Li C., Song X., Zhao Q., Li X.A., Yang Y., Liu Q., He S. and Zhou H.,** 2012, Enhancement of protective immune responses induced by *Toxoplasma gondii* dense granule antigen 7 (GRA7) against toxoplasmosis in mice using a prime-boost vaccination strategy, Vaccine 30(38), 5631-5636 pp.
- Mishima M., Xuan X., Shioda A., Omata Y., Fujisaki K., Nagasawa H. and Mikami T.,** 2001, Modified protection against *Toxoplasma gondii* lethal infection and brain cyst formation by vaccination with SAG2 and SRS1, The Journal of Veterinary Medical Science, 63(4), 433-438 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Mohamed R., Aosai F., Chen M., Mun H., Norose K., Belal U., Piao L. and Yano A.**, 2003, Induction of protective immunity by DNA vaccination with *Toxoplasma gondii* HSP70, HSP30 and SAG1 genes, *Vaccine* 21, 2852–2861 pp.
- Montoya J.G. and Remington J.S.**, 2000, *Toxoplasma gondii*, 2858-2888, Principles and Practice of Infectious Diseases, Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R.(Eds.), Churchill Livingstone Inc., New York.
- Mori A., Oleszycka E., Sharp F.A., Coleman M., Ozasa Y., Singh M., O'Hagan D.T., Tajber L., Corrigan O.I., McNeela E.A. and Lavelle E.C.**, 2012, The vaccine adjuvant alum inhibits IL-12 by promoting PI3 kinase signaling while chitosan does not inhibit IL-12 and enhances Th₁ and Th₁₇ responses. *European Journal of Immunology* 42(10), 2709-2119 pp.
- Mun H.S., Aosai F. and Yano A.**, 1999, Role of *Toxoplasma gondii* HSP70 and *Toxoplasma gondii* HSP30/bag1 in antibody formation and prophylactic immunity in mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii*, *Microbiology and Immunology* 43(5), 471-479 pp.
- Mun H.S., Aosai F., Norose K., Chen M., Hata H., Tagawa Y.I., Iwakura Y., Byun D.S. and Yano A.**, 2000, *Toxoplasma gondii* Hsp70 as a danger signal in *Toxoplasma gondii*-infected mice. *Cell Stress Chaperones* 5(4), 328-335 pp.
- Neudeck A., Stachelhaus S., Nischik N., Striepen B., Reichmann C., Fischer H.G.**, 2002, Expression variance, biochemical and immunological properties of *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7, *Microbes and Infection* 4, 581-590 pp.
- Nielsen H.V., Di Cristina M., Beghetto E., Spadoni A., Petersen E. and Gargano N.**, 2006, *Toxoplasma gondii*: DNA vaccination with bradyzoite antigens induces protective immunity in mice against oral infection with parasite cysts, *Experimental Parasitology* 112(4), 274-279 pp.
- Nielsen H.V., Lauemoller S.L., Christiansen L., Buus S., Fomsgaard A. and Petersen E.**, 1999, Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with a plasmid encoding the SAG1 gene, *Infection and Immunity* 67, 6358-6363 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Peng G.H., Yuan Z.G., Zhou D.H., He X.H., Liu M.M., Yan C., Yin C.C., He Y., Lin R.Q. and Zhu X.Q.**, 2009, *Toxoplasma gondii* microneme protein 6 (MIC6) is a potential vaccine candidate against toxoplasmosis in mice, *Vaccine* 5 27(47), 6570-6574 pp.
- Petersen E., Henrik V.N., Christiansen L. and Spenter, J.**, 1998, Immunization with *E. coli* produced recombinant *T. gondii* SAG1 with alum as adjuvant protect mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*, *Vaccine* 16, 1283-1239 pp.
- Pier G.B., Lyczak, J.B. and Wetzler L.M.**, 2004, Immunology, Infection, and Immunity, American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Plotkin S.A. and Orenstein W.A.**, 2008, Vaccines, Saunders, Elsevier Inc. Pennsylvania, 1748 p.
- Polat C., Gülçe İz S., Döşkaya M., Can H., Caner A., Değirmenci A., Balcan E. and Gürüz Y.**, 2013, Comparison of immune responses elicited by adjuvanted tachyzoite lysate vaccines developed from two different *Toxoplasma gondii* strains isolated in Turkey, *Mikrobiyoloji Bülteni* 47(1), 122-134 pp.
- Quan J.H., Chu J.Q., Ismail H.A., Zhou W., Jo E.K., Cha G.H. and Lee Y.H.**, 2012, Induction of protective immune responses by a multiantigenic DNA vaccine encoding GRA7 and ROP1 of *Toxoplasma gondii*. *Clinical and Vaccine Immunology* 19(5), 666-674 pp.
- Radke J.R., Gubbels M.J. and Jerome M.E.**, 2004, Identification of a sporozoitespecific member of the Toxoplasma SAG superfamily via genetic complementation, *Molecular Microbiology* 52, 93–105 pp.
- Rashid I., Hedli D., Moire N., Pierre J., Debierre-Grockieo F., Dimier-Poisson I. and Mevelec M.**, 2011, Immunological responses induced by a DNA vaccine expressing RON4 and by immunogenic recombinant protein RON4 failed to protect mice against chronic toxoplasmosis, *Vaccine* 29, 8838–8846 pp.
- Sánchez V., Pitkowski M., Cuppari A., Rodríguez F., Fenoy I., Frank F., Goldman A., Corral R. and Martin V.**, 2011, Combination of CpG-oligodeoxynucleotides with recombinant ROP2 or GRA4 proteins induces protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection, *Experimental Parasitology* 128, 448–453 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Sanchez-Vizcaino J.M.**, “*Course of Introduction to the Swine Immunology, New Generation Vaccines*“, <http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmun/welcome1.htm> (2001), (Erişim tarihi: 18 Ağustos 2013)
- Scorza T., D'Souza S., Laloup M., Dewit J., De Braekeleer J., Verschueren H., Vercammen M., Huygen K. and Jongert E.**, 2003, A GRA1 DNA vaccine primes cytolytic CD₈ T cells to control acute *Toxoplasma gondii*, *Infection and Immunity* 71(1), 309-316 pp.
- Sibley L.D., Niesman I.R., Parmley S.F. and Cesbron-Delauw M.F.**, 1995, Regulated secretion of multi lamellar vesicles leads to formation of a tubulo- vesicular network in host cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*, *Journal of Cell Science* 108, 1669-1677 pp.
- Sibley L.D., Pfefferkorn E.R. and Boothroyd J.C.**, 1991, Proposed nomenclature for *Toxoplasma gondii*, *Parasitology Today* 7, 327- 328 pp.
- Singh M. and O'Hagan D.T.**, 2002, Recent advances in vaccine adjuvants, *Pharmaceutical Research* 19, 715-728 pp.
- Sultan A.A., Thathy V., Frevert U., Robson K.J., Crisanti A., Nussenzweig W., Nussenzweig R.S. and Menard R.**, 1997, TRAP is a necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoites, *Cell* 90, 511-522 pp.
- Supply P., Sutton P., Coughlan S.N., Bilo K., Saman E., Trees A.J., Cesbron Delauw M.F. and Loch C.**, 1999, Immunogenicity of recombinant BCG producing the GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*, *Vaccine*, 17, 705-714 pp.
- Vercammen M., Scorza T., Huygen K., De Braekeleer J., Diet R., Jacobs D., Saman E. and Verschueren H.**, 2000, DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice, *Infection and Immunity* 68(1), 38-45 pp.
- Velge-Roussel F., Marcelo P., Lepage A.C., Buzoni-Gatel D. and Bout D.T.**, 2000, Intranasal immunization with *Toxoplasma gondii* SAG1 induces protective cells into both NALT and GALT compartments, *Infection and Immunity* 68, 969–972 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Vogel F.R. and Hem S.L.**, 2008, Immunologic adjuvants, 59-71, *Vaccines*, Plotkin S.A., Orenstein W.A., Offit P.A. (Eds.), WB Saunders, Philadelphia.
- Wack A., Baudner B.C., Hilbert A.K., Manini I., Nuti S., Tavarini S., Scheffczik H., Ugozzoli M., Singh M., Kazzaz J., Montomoli E., Del Giudice G., Rappuoli R. and O'Hagan D.T.**, 2008, Combination adjuvants for the induction of potent, long-lasting antibody and T-cell responses to influenza vaccine in mice, *Vaccine* 26(4), 552-561 pp.
- Wang H., Liu Q., Liu K., Zhong W., Gao S., Jiang L. and An N.**, 2007, Immune response induced by recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing ROP2 gene of *Toxoplasma gondii*, *Parasitology International* 56(4), 263-268 pp.
- Weiss L.M. and Kim K.**, 2007, *Toxoplasma gondii*, The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods, Elsevier Ltd., Great Britain, 800 p.
- Wu X.N., Lin J., Lin X., Chen J., Chen Z.L. and Lin J.Y.**, 2012, Multicomponent DNA vaccine-encoding *Toxoplasma gondii* GRA1 and SAG1 primes: anti-Toxoplasma immune response in mice, *Parasitology Research* 111(5), 2001-2009 pp.
- Yan H., Yuan Z., Petersen E., Zhang X., Zhou D., Liu Q., He Y., Lin R., Xu M., Chen X., Zhong X. and Zhu X.**, 2011, *Toxoplasma gondii*: Protective immunity against experimental toxoplasmosis induced by a DNA vaccine encoding the perforin-like protein 1, *Experimental Parasitology* 128, 38-43 pp.
- Yang C.D., Chang G.N. and Chao D.**, 2003, Protective immunity against *Toxoplasma gondii* in mice induced by the SAG2 internal image of anti-idiotypic antibody, *Parasitology Research* 91, 452-457 pp.
- Yang C.D., Chang G.N. and Chao D.**, 2004, Protective immunity against *Toxoplasma gondii* in mice induced by a chimeric protein rSAG1/2, *Parasitology Research* 92, 58-64 pp.
- Yuan Z., Zhang X., Lin R., Petersen E., He S., Yu M., He X., Zhou D., He Y., Li H., Liao M. and Zhu X.**, 2011, Protective effect against toxoplasmosis in mice induced by DNA immunization with gene encoding *Toxoplasma gondii* ROP18, *Vaccine* 29, 6614-6619 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Yurdakök K. ve İnce T.**, 2008, Aşı Adjuvanları, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 51, 225-239 ss.
- Zafar A.**, Design and production of recombinant subunit vaccines, National Centre of Excellence in Molecular Biology, Lahore.
- Zhang J., He S., Jiang H., Yang T., Cong H., Zhou H., Zhang J., Gu Q., Li Y. and Zhao Q.**, 2007, Evaluation of the immune response induced by multiantigenic DNA vaccine encoding SAG1 and ROP2 of *Toxoplasma gondii* and the adjuvant properties of murine interleukin-12 plasmid in BALB/c mice, Parasitology Research 101(2), 331-338 pp.
- Zhou H., Gu Q., Zhao Q., Zhang J., Cong H., Li Y. and He S.**, 2007, *Toxoplasma gondii*: expression and characterization of a recombinant protein containing SAG1 and GRA2 in *Pichia pastoris*, Parasitology Research 100, 829–835 pp.

ÖZGEÇMİŞ

Yaprak GEDİK

Biyomühendis

Kişisel Bilgiler

E-posta : yaprakgedik@gmail.com
yaprakgedik@egevet.com.tr

Uyruk : T.C.

Doğum Tarihi : 11.02.1988

Doğum Yeri : İzmir

Adres : 372/29 Sokak No:14 Bornova / İzmir

Telefon : + 90 535 8665464

Eğitim Bilgileri

2010-2013 : Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans

2006-2010 : Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi,
Biyomühendislik Bölümü, Lisans (3.lük derecesi)

2002-2006 : Bornova Anadolu Lisesi, İngilizce Bölümü

İş Deneyimi

07/2009-08/2009 : Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA),
İspanya, Staj

07/2010- - : AtaFen Veteriner Malzemeleri Hayvancılık
Pazarlama Sanayi ve Ticaret A.Ş., Bakteriyel Aşı Üretim
Sorumlusu

Yayınlar ve Posterler

Gedik Y., 2010, İmmünizasyon sonrası elde edilen B ve T hücre yanıtının belirlenmesinde kullanılan yöntemler, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Lisans Bitirme Tezi

Gedik Y., Deliloğlu Gürhan İ.S., 2010, İmmünizasyon sonrası elde edilen B ve T hücre yanıtının belirlenmesinde kullanılan yöntemler, *Poster*, V. Biyomühendislik Kongresi, 16-18 Haziran 2010, İzmir

Gedik Y., Döşkaya M., Caner A., Gülçe İz S., Can H., Değirmenci A., Deliloğlu

Gürhan İ., Gürüz Y., 2013, A novel multivalent recombinant-protein vaccine confers protection against Toxoplasmosis, *Poster*, 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 27-30 April 2013, Berlin, Germany

Katılan Sempozyum ve Kongreler

- Single Use Forum, Sartorius, 7 May 2013, İstanbul.
- 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 27-30 April 2013, Berlin, Germany
- 2. Laboratuvar Hayvanları Bilimi Sempozyumu, 1-2 Ekim 2010, Ürkmez, İzmir.
- Vth International Bioengineering Congress, 16-19 June 2010, İzmir.
- Aşı Sempozyumu, 26 Nisan 2010, İzmir.
- Biyogirişimcilik Günü Sempozyumu, 5 Mart 2010, İzmir.
- Kök Hücre Sempozyumu, 16 Mart 2009, İzmir.
- IV. Ulusal Biyomühendislik Kongresi, 15-18 Ekim 2008, İzmir.
- Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi, 27-30 Ağustos 2008, İzmir.
- Küresel Isınmaya Karşı Çevre Bilinci ve Alternatif Enerji Kaynakları Sempozyumu, 1 Nisan 2008, İzmir.
- Biyoremediasyon Temel Esasları ve Uygulamaları, 10-11 Aralık 2007, İzmir.

Organizasyonunda Görev Alınan Sempozyum/Kurslar

- Temel Hücre Kültürü Alternatif Yöntemler Kursu, 14-17 Haziran 2011, İzmir.
- 7. Biyomühendislik Günleri, 16 Haziran 2010, İzmir.
- Yapay Doku ve Organ Sempozyumu: Artan Organ İhtiyacına Güncel Yaklaşımlar, 27 Ekim 2009, İzmir.

Katılan Kurslar ve Eğitimler

- World Wide Sires International Artificial Insemination Industry Training Program, June 24-30, 2013, USA.
- Kişisel Etkinlik ve Zaman Yönetimi Eğitimi, Mikor İnsan Kaynakları ve Kurumsal Koçluk, 8 Mayıs 2013, İzmir.
- Satış Teknikleri ve Satışa Koçluk, Mikor İnsan Kaynakları ve Kurumsal Koçluk, 1 Şubat 2013, Kuşadası, İzmir.

- Sütçü Sığır İşletmelerinde Sürü Yönetimi, Ata Fen İç Eğitim, 12 Ocak 2013, İzmir.
- Time Management/Adding Value to Product Building Care Business, World Wide Sires, November 12, 2012, İzmir.
- Pasteurella, Patogenez, Tedavi ve Korunma, Ata Fen, 21 Haziran 2012, İzmir.
- Metot Validasyonu, Brucella Sayımları Eğitimi, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, 17 Ocak 2012, İzmir.
- Basic Course BioPAT MFCS/Win 3.0, Sartorius, September 26-28, 2011, İstanbul.
- Aşı Üretim Proseslerinde Risklerin Analizi ve Değerlendirilmesi Eğitimi, Kalite Dünyası, 15 Ağustos 2011, İzmir.
- Brucella Aşıları ve Biyogüvenlik, Ata Fen İç Eğitim, 22 Temmuz 2011, İzmir.
- Auditor/Lead Auditor (ISO 9001:2008) Sertifikası, iqms and Alberk QA Technic Ltd., February 14-18, 2011.
- GMP Bölüm II Başlangıç Maddeleri Olarak Kullanılan Aktif Maddelerde Temel Gereksinimler Eğitimi, Kalite Dünyası, 1-2 Aralık 2010, İzmir.
- Hijyen Eğitimi, Kalite Dünyası, 25 Kasım 2010, İzmir.
- Brucella Aşılarının Üretim Teknikleri ve Kalite Kontrollerinin Yapılması Eğitimi, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Kasım 2010, İstanbul.
- GMP Kılavuzu Ek 13, 14, 15, 16 Eğitimi, Kalite Dünyası, 28 Ekim 2010, İzmir.
- GMP Kılavuzu Ek 1, 2, 6, 9, 11 Eğitimi, Kalite Dünyası, 8 Ekim 2010, İzmir.
- Farmasötik Ürünlerin İyi İmalat Uygulamalarına (GMP) İlişkin Kılavuz, Kalite Dünyası, 27 Eylül 2010, İzmir.
- Kaizen (Sürekli İyileştirme) Eğitimi, Mart 2009, TMMOB Kimya Mühendisleri Odası, İzmir.