



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



***TOXOPLASMA GONDII* REKOMBİNANT
ROP6 PROTEİNİNİN *SACCHAROMYCES*
CEREVISIAE INVSc.1 SUŞUNDA
EKSPRESYONU VE SAFLAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Tuğba KARAKAVUK

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

İzmir

2023

T.C.
Ege Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü

***TOXOPLASMA GONDII* REKOMBİNANT
ROP6 PROTEİNİNİN *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE* INVSc.1 SUŞUNDA
EKSPRESYONU VE SAFLAŞTIRILMASI**

Tuğba KARAKAVUK

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mert DÖŞKAYA

İkinci Danışmanı: Doç. Dr. Hüseyin CAN

Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı
Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı

İZMİR
2023

Tuğba KARAKAVUK tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “*Toxoplasma gondii* Rekombinant ROP6 Proteininin *Saccharomyces cerevisiae* INVSc.1 Suşunda Ekspresyonu ve Saflaştırılması” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 09/06/2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Mert DÖŞKAYA

Raportör Üye: Prof. Dr. Adnan Yüksel GÜRÜZ

Üye: Doç. Dr. Gülşah EREL AKBABA

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Toxoplasma gondii* Rekombinant ROP6 Proteininin *Saccharomyces cerevisiae* INVSc.1 Suşunda Ekspresyonu ve Saflaştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

09 / 06 / 2023

Tuğba KARAKAVUK

ÖZET***TOXOPLASMA GONDII* REKOMBİNANT ROP6
PROTEİNİNİN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* INVSc.1
SUŞUNDA EKSPRESYONU VE SAFLAŞTIRILMASI**

KARAKAVUK, Tuğba

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mert DÖŞKAYA

İkinci Danışmanı: Doç. Dr. Hüseyin CAN

Haziran 2023, 69 sayfa

Toxoplasma gondii (*T. gondii*), neredeyse tüm sıcakkanlı hayvanları ve insanları enfekte ederek toksoplazmozise neden olan zorunlu hücre içi parazittir. Parazitle karşılaşan kişilerden, immün sistemi sağlam olanlarda çoğunlukla hiçbir bulgu görülmezken, immün sistemi baskılanmış kişilerde ölüme varan ciddi klinik tablolar gözlenmektedir. *T. gondii* hayvancılık sektöründe de koyun ve keçi gibi çiftlik hayvanlarında düşük ya da ölü doğumlara neden olarak büyük boyutlu ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Toksoplazmozisli kişilerde kullanılan günümüzdeki hiçbir ilaç tedavi edici özelliğe sahip değildir. Sadece hastalığın ilerlemesini durdurmada etkili olmaktadır. Erken teşhis ve tedavi bu nedenle çok önem kazansa da ne yazık ki çoğunlukla hastalığın teşhisi hastalık %85-90 asemptomatik seyrettiği için çoğunlukla arzu edilen sürede yapılamamaktadır. İlaçların kronik toksoplazmoziste ise hiçbir etkisi gösterilememiştir. Bu nedenlerle, *T. gondii*'ye karşı aşı geliştirmek büyük önem taşımaktadır. Bu tez çalışmasında aşı formülasyonlarında kullanılmak üzere *T. gondii* rekombinant ROP6 proteininin *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) hücrelerinde ekspresyonu ve saflaştırılması hedeflenmiştir.

Bu amaçla, mikroarray taraması sonucu güçlü bir aşı adayı olabileceği belirlenen ROP6 proteini biyoinformatik ve immünoinformatik analizler gerçekleştirilmiştir. Bu tasarımın ardından rekombinant ROP6 proteininin güçlü bir aşı adayı olabileceği saptanmış ve ilk kez *S. cerevisiae* hücrelerinde eksprese edilmiştir. Altakım aşamasında dört farklı hücre duvarı yıkma yöntemi denenerek maya hücrelerinde üretilen protein elde edilmiş ve aralarındaki farklılıklar değerlendirilmiştir. Elde edilen rekombinant ROP6 proteini, sonrasında affinite kromatografi ile saflaştırılmış ve bu proteinin *T. gondii*'ye karşı aşı formülasyonunda kullanılabileceği saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: *Toxoplasma gondii*, *Saccharomyces cerevisiae*
Rekombinant ROP6 proteini, Aşı

ABSTRACT**EXPRESSION AND PURIFICATION OF *TOXOPLASMA GONDII*
RECOMBINANT ROP6 PROTEIN IN *SACCHAROMYCES*
CEREVISIAE INVSc.1 STRAIN**

KARAKAVUK, Tuğba

MSc in Department of Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Mert DÖŞKAYA

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hüseyin CAN

June 2023, 69 pages

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) is an obligate intracellular parasite that infects almost all warm-blooded animals and humans, causing toxoplasmosis. Generally, when a person encounters with *T.gondii*, no symptoms are observed in individuals with intact immune system, contrarily serious clinical symptoms even death can be seen in immunosuppressed individuals. *T. gondii* causes miscarriages or stillbirths in farm animals such as sheep and goats, which are also economically important in animal husbandry. Currently, available drugs are only effective in controlling the progression of the disease if administered as early as possible. Although early diagnosis and treatment are very important for this reason, unfortunately, the diagnosis of the disease is mostly not made in the desired time since the disease progresses 85-90% asymptotically. Medical therapy has no use during the chronic phase of the disease. For these reasons, it is of great importance to develop a vaccine against *T. gondii*. In this thesis, we aimed to express and purify *T. gondii* recombinant ROP6 protein in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) cells to be used in vaccine formulations.

To achieve our goal, ROP6 protein, which was found to be a strong vaccine candidate by using microarray scanning, was evaluated with various bioinformatic and immunoinformatic analyses. Following this design, we believed that the recombinant ROP6 protein could be a potent vaccine candidate and for the first time in literature it was expressed in *S. cerevisiae* cells for the first time. In order to

obtain the protein produced in yeast cells in the downstream stage, four different cell wall destruction methods were applied and the differences between them were evaluated. After these procedures, the recombinant ROP6 protein was purified by affinity chromatography. As a result of our research, we accredit recombinant ROP6 protein to be used in vaccine formulation against *T. gondii*.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, Recombinant ROP6 protein, Vaccine



ÖNSÖZ

COVID-19 salgını sırasında aşı çalışmalarının önemi dünya genelinde çok daha iyi anlaşılmıştır. Aşıların geliştirilmesinde birçok farklı platform kullanılmaktadır. Bunlarda birisi de rekombinant protein aşı üretimidir. *Saccharomyces cerevisiae* adlı maya hücrelerinde üretilen rekombinant protein aşılarına örnek olarak insanlarda etkin şekilde kullanılan Hepatit B aşısı verilebilir. Bende yüksek lisans tezimde insan ve hayvan sağlığı için önemli riskler oluşturan *T. gondii* adlı parazitin immünojen olduğu gösterilmiş ROP6 proteinini aşı formülasyonlarında kullanılmak üzere *S. cerevisiae* hücrelerinde sentezlemeyi amaçladım. Çalışmamda öncelikle, ROP6 proteinini biyoinformatik olarak inceledim, hücre içi ve transmembran kısımlarını çıkardıktan sonra gerçekleştirdiğim modifikasyonların ardından proteinin hücre dışında kalan kısmını aşı adayı olarak *S. cerevisiae* hücrelerinde ürettim.

Tez çalışmam Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) TOA-2021-22890 numaralı öncelikli alan projesi tarafından desteklenmiştir. Tezim ile ilgili yapılan tüm işlemler Ege Üniversitesi Aşı Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmamın tüm planının oluşturulmasında ve yürütülmesinde bilgi, ilgi ve tecrübesinden yararlandığım, çalışmam kapsamında yaptığım tüm denemelerde yönlendirme ve bilgilendirmelerini esirgemeyen danışman hocalarım Prof. Dr. Mert DÖŞKAYA ve Doç. Dr. Hüseyin CAN'a teşekkürlerimi sunarım.

İZMİR

09/06/2023

Tuğba KARAKAVUK

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
İÇ KAPAK	ii
KABUL ONAY SAYFASI	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ.....	xi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
TABLolar DİZİNİ.....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xx
1. GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Tarihçe	3
2.2 Morfoloji ve Hayat Döngüsü	3
2.3 Toksoplazmozis	5
2.4 Epidemiyoloji.....	5
2.5 <i>T. gondii</i> İmmünolojisi	7
2.6 <i>T. gondii</i> Roptri Proteinleri	8
2.7 <i>T. gondii</i> Aşı Çalışmaları.....	10
2.8 Rekombinant Protein Aşıları.....	11
2.8.1 Rekombinant Protein Üretiminde Kullanılan Ekspresyon Sistemleri.....	11
2.9 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
2.9.1 Oksotrofik Mayaların Genel Özellikleri	15
2.9.2 <i>S. cerevisiae</i> Ekspresyon Vektörleri	16
2.9.3 <i>S. cerevisiae</i> Kullanılarak Yapılan Aşı Çalışmaları	17
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	19

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.1 Aşı Adayı Rekombinant ROP6 Proteininin Biyoinformatik analizi	19
3.2 pYES2.1/ROP6 Plazmitinin <i>E. coli</i> TOP10 Hücrelerine Transformasyonu	21
3.3 <i>S. cerevisiae</i> INVSc.1 Suşunun Canlandırılması.....	22
3.4 <i>S. cerevisiae</i> INVSc.1 Suşu ile Rekombinant Proteinin Üretiminde Kullanılacak SC-U Besiyerinin ve Agar Plakların Hazırlanması.....	23
3.5 pYES2.1/ROP6 Plazmitinin Canlandırılan INVSc.1 Suşuna Transformasyonu	24
3.6 Rekombinant ROP6 Protein Ekspresyonunun Belirlemesi	24
3.6.1 Rekombinant ROP6 Proteininin <i>S. cerevisiae</i> INVSc.1 Suşunda Küçük Ölçekli Üretimi	25
3.6.2 Maya Hücre Duvarının Asitle Yıkanmış Cam Boncuklar ve Parçalama Tamponu ile Parçalanması	25
3.6.3 SDS-PAGE ve Western Blot ile Rekombinant Protein Ekspresyonunun Belirlemesi.....	26
3.7 Rekombinant ROP6 Proteininin <i>S. cerevisiae</i> INVSc.1 Suşunda Büyük Ölçekli Üretimi	28
3.8 Maya Hücre Duvarının Parçalanması.....	28
3.8.1 Maya Hücre Duvarının Asitle Yıkanmış Cam Boncuklar ve EDTA İçermeyen Parçalama Tamponu ile Parçalanması	29
3.8.2 Maya Hücre Duvarının Sıvı Azot ile Parçalanması.....	29
3.8.3 Maya Hücre Duvarının Microfluidizer ile Parçalanması	30
3.8.4 Maya Hücre Duvarının Y-PER™ Maya Protein Ekstraksiyon Reaktifi ile Parçalanması.....	31
3.9 Parçalanmış Maya Hücrelerinin Affinite Kromatografi ile Saflaştırılması.....	31
4. BULGULAR	33
4.1 ROP6 Proteininin Biyoinformatik Analizi	33

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4.2 pYES2.1/ROP6 Plazmitinin <i>E. coli</i> TOP10 Hücrelerine Transformasyonu ve Saflaştırma Sonucu Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi	42
4.3 <i>S. cerevisiae</i> INVSc.1 Suşunun Canlandırılması	42
4.4 pYES2.1/ROP6 Plazmitinin INVSc.1 Suşuna Transformasyonu	43
4.5 Rekombinant Protein Ekspresyonunun Belirlemesi	44
4.6 Rekombinant ROP6 Proteininin Büyük Ölçekli Üretimi	46
4.7.1 Maya Hücrelerinin Asitle Cam Boncuklar ve EDTA içermeyen Parçalanma Tamponu ile Parçalanma Sonuçları	47
4.7.2 Maya Hücrelerinin Sıvı Azot ile Parçalanma Sonuçları	48
4.7.3 Maya Hücrelerinin Microfluidizer ile Parçalanma Sonuçları	49
4.7.4 Maya Hücrelerinin Y-PER™ Maya Protein Ekstraksiyon Reaktifini ile Parçalanma Sonuçları	51
5.TARTIŞMA	52
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	56
KAYNAKLAR DİZİNİ	57
TEŞEKKÜR	65
ÖZGEÇMİŞ	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 <i>T. gondii</i> yaşam döngüsü.....	3
2.2 <i>T. gondii</i> takizoit.....	8
2.3 <i>T. gondii</i> 'nin konakçı hücreye invazyonu.....	9
2.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> hücre yapısı.....	14
4.1 TMHMM-2.0 programı kullanılarak tespit edilen proteine ait hücre içi, transmembran ve hücre dışı alanlar.....	34
4.2 ROP6 proteinine ait N glikozilasyon bölgeleri.....	36
4.3 ROP6 proteinine ait O glikozilasyon bölgeleri.....	36
4.4 Expsy Protparam programı ile stabil olduğu saptanan ROP6 proteini.....	37
4.5 VaxiJen programı ile antijen olduğu saptanan protein sekansı.....	37
4.6 pYES2.1/ROP6 plazmit haritası	40
4.7 Çözünür ROP6 proteini.....	41
4.8 Stabil ROP6 proteini.....	41
4.9 Alerjen olmayan ROP6 proteini.....	41
4.10 ROP6 proteininin üç boyutlu görünümü.....	41
4.11 Saflaştırılan plazmitin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi ...	42
4.12 YPD agar plaklarda gözlenen maya kolonileri.....	43
4.13 SC-U seçici plaklarda gözlenen tek maya kolonileri.....	44

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

4.14	Küçük ölçekli üretim.....	44
4.15	Asitle yıkanmış cam boncuklar ve parçalama tamponu kullanılarak parçalanan maya hücrelerinin mikroskop görüntüleri.....	45
4.16	Maya hücrelerinde üretimi gerçekleştiren rekombinant ROP6 proteininin 0., 12., 16. ve 24. saatlerde alınan örneklerde proteinin üretiminin Western blot ile gösterilmesi.....	46
4.17	3 mL'den 400 mL'ye ölçek büyütme ile gerçekleştirilen büyük ölçekli üretim.....	46
4.18	EDTA içermeyen parçalama tamponu ve asitle yıkanmış cam boncuklar kullanılarak parçalanan maya hücrelerinin mikroskop görüntüleri	47
4.19	EDTA içermeyen parçalama tamponu ve asitle yıkanmış cam boncuklar kullanılarak parçalanan maya hücrelerinin üst sıvılarının saflaştırma sonrası SDS-PAGE ve Western blot görüntüleri.....	47
4.20	Sıvı azot ile maya hücrelerinin parçalanması.....	48
4.21	Sıvı azot ile parçalama sonrası maya hücrelerinin mikroskop görüntüleri.....	48
4.22	Sıvı azot kullanılarak parçalanan maya hücrelerinin üst sıvılarının saflaştırma sonrası SDS-PAGE ve Western blot görüntüleri.....	49
4.23	Microfluidizer ile parçalanma sonrası maya hücrelerinin mikroskop görüntüleri.....	49
4.24	Microfluidizer kullanılarak parçalanan maya hücrelerinin üst sıvılarının saflaştırma sonrası SDS-PAGE ve Western blot görüntüleri.....	50
4.25	Microfluidizer ile parçalama sonrası saflaştırılıp konsantre edilen rekombinant ROP6 proteininin Western blot analizi.....	50

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

- 4.26 Y-PER Maya Protein Ekstraksiyon Reaktifi ile parçalanma sonrası maya hücrelerinin mikroskop görüntüleri51
- 4.27 Y-PER reaktifi kullanılarak parçalanmış maya hücrelerinin üst sıvılarının saflaştırma sonrası SDS-PAGE ve Western blot görüntüleri.....51



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.1 A <i>Toxoplasma gondii</i> ROP6 proteini tam gen bölgesi.....	33
4.1 B ROP6 proteinine ait DNA sekansının protein sekansına çevrimi ile elde edilen sekans.....	33
4.2 A MHC-I epitopları.....	34
4.2 B MHC-II epitopları.....	35
4.2 C B hücre epitopları.....	35
4.3 ROP6 proteini üzerinde bulunan MHC-I, II ve B hücre epitoplarının gösterilmesi.....	35
4.4 pYES2.1/V5-His TOPO plazmiti içinde yer alan ROP6 proteini.....	38
4.5 Plazmit içinde başlangıç ve sonlandırma sekansları arasında yer alan ROP6 proteini.....	40

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
g	Yerçekimi Kuvveti
μ L	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
kDa	Kilodalton
mL	Mililitre
<u>Kısaltmalar</u>	
APC	Antijen Sunan Hücre
CDC	Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
CTL	Antijene Özgü Sitotoksik T Lenfosit
DC	Dentritik Hücre
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GRA	Yoğun Granüller
GRAS	Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen
IFN- γ	İnterferon Gama
IL	İnterlökin
INOS	İndüklenmiş Nitrik Oksit Sentetaz

LB	Luria Bertani Besin Ortamı
LEU2	p-izopropil malat dehidrojenaz
MHC	Majör Doku Uyumluluk Kompleksi
MIC	Mikronemler
MJ	Hareketli Bağlantı Noktası
ng	Nanogram
NK	Doğal Öldürücü Hücre
PV	Parazitofor Vakuol
PVM	Parazitofor Vakuol Membranı
RON	Roptri Boyun Proteinleri
ROP	Roptri
SC-U	Urasil İçermeyen Sentetik Tamamlayıcı Besi Yeri
SOC	Katabolit Represyonlu Süper Optimal Sıvı Besi Yeri
TAE	Tris-Asetat-EDTA
T _H	T-Yardımcı Lenfosit
T _C	T-Sitotoksik Lenfosit
URA3	orotidin 5'-dekarboksilaz
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Toxoplasma gondii (*T. gondii*), sıcakkanlı canlıların çoğunu ve insanları enfekte ederek toksoplazmozise neden olan zorunlu hücre içi parazittir. Parazitin yaşam döngüsünde; kesin konaklar olan kedi ve kedigillerde oluşan sporozoit, ara konaklarında oluşan ve akut enfeksiyon sırasında gözlenen takizoit ile kronik enfeksiyon sırasında gözlenen bradizoit formları bulunmaktadır (Attias et al., 2020).

T. gondii ile enfekte olan koyun ve keçi gibi çiftlik hayvanlarında görülen düşükler ya da ölü doğumlarda ayrıca ciddi ekonomik kayıp nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Enfekte hayvanların etleri insanlarca çiğ/az pişmiş olarak tüketildiğinde, etlerde bulunan doku kistleri insanları da enfekte etmektedir. Parazit ile karşılaşan insanlarda immün sistemi sağlam olanlarda çoğunlukla hiçbir bulgu olmazken, immün sistemi baskılanmış kişilerde ölüme kadar gidebilen ciddi klinik semptomlar gözlenmektedir (Al-Malki., 2021). İnsanlarda görülen konjenital toksoplazmozis, hamilelik sırasında az pişmiş et tüketimi, iyi yıkanmamış sebzeler/meyve/ellerle veya enfekte kedi/kedigillerin dışkılarıyla temas sonucu enfekte olan anneden plasenta yolu ile bebeğe geçmesidir. Bulaş sonucu bebeklerde anomaliler veya düşükler görülebilmektedir (Dubey, 2008).

Geniş yayılım gösteren ve ciddi sonuçları olan parazite karşı, kullanımda olan tek aşı ToxovaxTM (MSD, Birleşik Krallık) aşısıdır. Bu aşının canlı zayıflatılmış bir aşı olması, koruyuculuk süresinin kısalığı ve vahşi tipe dönüşme riski nedeniyle insanlarda kullanılması önerilmemektedir (Zhang et al., 2013). Günümüzde bu kadar ciddi sonuçları olan paraziter bir etkene karşı güvenilir ve etkili bir aşuya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla araştırmacılar patojenite riski taşımayan, kolay üretilen biyoteknolojik alt ünite aşılara yönelmiştir. Özellikle rekombinant protein aşıları son yıllarda önem kazanan aşı modelleri arasında yer almaktadır (Hansson et al., 2000).

Günümüzde, *T. gondii* takizoit ve bradizoitlerinden salgılanan ve patogeneze kritik rollere sahip ROP, MIC, SAG ve GRA antijenleri sıklıkla kullanılmaktadır (Karakavuk vd., 2022). Bu çalışmalarda, Bu amaçlar doğrultusunda bu tez çalışmasında Döşkaya ve ark. tarafından yapılan mikroarray çalışması sonucunda yüksek immünojenite gösteren Roptri protein 6 (ROP6) aşı adayı olarak seçilmiş ve *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) maya

hücrelerinde üretimi gerçekleştirilmiştir. Yapılan üretimlerin ardından maya hücrelerinin hücre duvarlarını yıkacak farklı parçalama yöntemleri denenmiştir. Gerçekleştirilen denemeler sonucunda sıvı azot ve EDTA içermeyen parçalama tamponunun en iyi iki yöntem olduğu saptanmıştır. Parçalama sonucunda üst sıvıdan saflaştırılan rekombinant ROP6 proteininin prelinik aşı çalışmalarında kullanılabileceği öngörülmüştür.



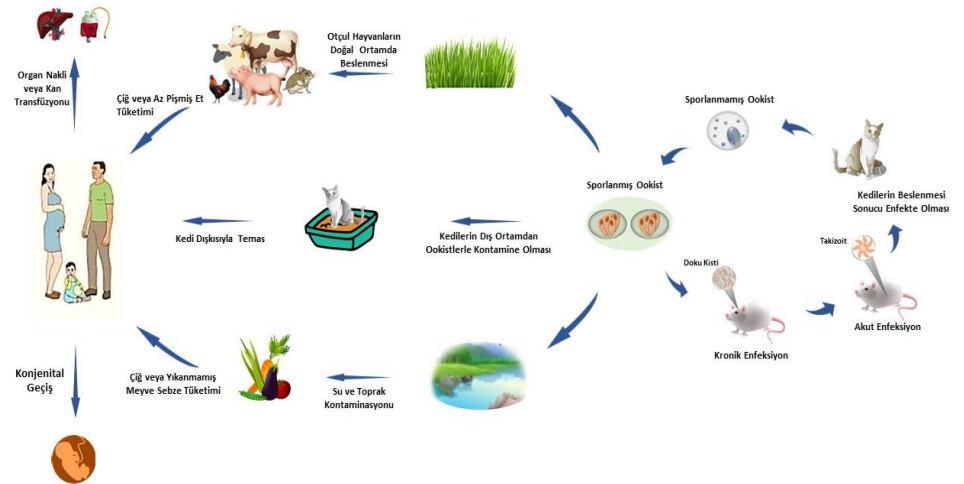
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tarihçe

Toxoplasma gondii ilk kez 1908 yılında Nicole ve Manceaux isimli araştırmacılar tarafından tanımlanmıştır. Araştırmacılar virüs ve *Leishmania* çalışmalarında deney hayvanı olarak seçtikleri *Ctenodactylus gundi* adlı bir canlıda yaptıkları denemeler esnasında parazit ilk kez tespit etmişlerdir (Dubey, 2008). Türkiye’de ise 1970 yıllarında ilk önce bir köpekte parazit saptanmış ve daha sonra bir bebekte parazit varlığı saptanmıştır. Sonrasında, 1972 yılında Ankara’da bir bebekte *T. gondii* tespit edilmiş ve elde edilen suş Ankara suşu olarak adlandırılmıştır (Kolören and Dubey, 2020).

2.2 Morfoloji ve Hayat Döngüsü

T. gondii yaşam döngüsünde 3 farklı enfektif form bulunmaktadır. Bu formlar; çevreye yayılan sporozoitleri içeren ookist, akut enfeksiyonda görülen takizoit ve kronik enfeksiyonda görülen bradizoittir (doku kisti haline gelir). Şekil 2.1’de anlatıldığı gibi parazit yaşamında bu formlar birbirlerine dönüşerek döngüyü tamamlamaktadır (Attias et al., 2020).



Şekil 2.1 *T. gondii* yaşam döngüsü (Karakavuk vd., 2022) (Şekilde kullanılan görseller

<https://www.shutterstock.com/tr/search/> adresinden alınmıştır.)

Ookist; bu form son konak olan kedilerin bağırsaklarında eşeyli üreme sonucu oluşmaktadır. 10-12 µm (mikrometre) çapındadır ve dışkılama ile çevreye bırakıldıklarında enfektif değildir. Birkaç günde ortam şartlarına göre havalandırma ve sıcaklığın etkisiyle sporlanarak enfektif hale gelmektedirler. Bu formda çevresel şartlara bağlı olarak aylarca canlı kalabilirler. Sporlanan ookistlerin yapısında iki adet sporokist bulunmakta ve her sporokiste dört adet sporozoit yer almaktadır. Sporozoitlerin farklılaşarak takizoitlere dönüştüğü ve sonrasında çoğalarak konakçının diğer dokularına ilerlediği belirtilmektedir. Bu nedenle kedilerin geniş yayılım kaynağı olduğu bilinmektedir (Wang et al., 2019; Dubey, 2010).

Takizoit; hilal şekline benzeyen 2×6 µm boyutunda ve hızlı çoğalan enfektif form olarak bilinmektedir. Aktif penetrasyon yetenekleri ile parazitifer vakuol (PV) oluşturarak hücre içine girebilmektedirler (Döşkaya ve Gürüz, 2009). Oluşturdukları PV sayesinde konakçı immün sisteminden kaçtığı bildirilmektedir. Konak hücrede geçirdikleri endodiyogeni adı verilen özel bölünme yöntemi ile bölünerek çoğalırlar ve sonrasında konak hücreye girerek diğer komşu hücreleri işgal ettikleri bilinmektedir. Bir kısım takizoit hücre ise konakçı hücreler tarafından fagosite edilip kan veya lenf aracılığıyla taşınarak kalp, göz ve plasenta gibi doku ve organlara yayılırlar. Yayılan takizoitler önce bradizoitlere sonrasında doku kistleri içinde kendilerini korumaya alıp latent hale dönüşmekte ve bu sayede konak immün sisteminden korunmaktadır (Attias et al., 2020; Dubey et al., 1998).

Bradizoit ve Doku kistleri; bradizoitleri içeren doku kistleri, konak hücrenin sitoplazmasında gelişen formdur. Doku kistlerinin yapısında hem parazit, hem de konak hücre materyali bulunmaktadır. Takizoitlere oranla daha yavaş bölünmektedir. Doku kistinin çapı, içerisindeki bradizoit miktarına göre farklılık göstermektedir. Konak hücre içinde kalan doku kistleri konak immün sisteminden korunarak latent enfeksiyona ve ömür boyu süren kalıcı seropozitiviteye de sebep olmaktadır. Doku kistleri en çok merkezi sinir sistemi, beyin, göz, kalp ve iskelet kası gibi doku ve organlarda bulunmaktadır. Genelde hücre içinde buldukları bilinse de beyine yerleşen doku kistlerinin, hücre dışına çıkarak takiozitlere dönüşerek (reaktivasyon) konağın ölümüne dahi sebep oldukları bilinmektedir (Dubey et al.,1998; Can, 2014).

2.3 Toksoplazmozis

T. gondii parazitinin enfekte ettiği memeli ve sıcakkanlılarda neden olduğu hastalığa toksoplazmozis adı verilemektedir. Küçükbaş hayvanlarda görülen toksoplazmozis dünya genelinde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Özellikle koyun ve keçi gibi çiftlik hayvanlarında düşükler ya da ölü doğumlara sebep olmaktadır. Hayvanların kesimiyle uğraşan insanlarda (ellerindeki yaralardan) yada bu enfekte etleri çiğ veya az pişmiş olarak yenmesi sonucu toksoplazmozis gelişebilmektedir. Bunun dışında, kedi dışkılarıyla atılan ookistlerle kontamine olan su veya besinlerin alımı sonucu insanlara bulaş gerçekleşmektedir (Hill and Dubey, 2002; Al-Malki, 2021). Diğer bir bulaş yolu, organ transplantasyonudur. Seropozitif donörden alınan karaciğer, akciğer, böbrek, kalp gibi organların nakillerinde enfeksiyonun alıcı hastaya geçtiği bilinmektedir. Konjenital toksoplazmozis, hastalığın gebelikte enfekte olan anneden plasenta yoluyla bebeğe geçmesidir. Hamileliğin erken dönemlerinde görülen enfeksiyonlar düşük veya ölüme sebep olmaktadır. Gebeliğin geç dönemindeki enfeksiyonlarda ise daha az hasarla doğum ya da prematüre doğum gelişebilmektedir. (Dubey, 2008). Toksoplazmozis, immün sistemi sağlam kişilerde asemptomatik seyrederken immün sistem yetmezliği olan kişilerde hastalığın daha ciddi belirtilerle ilerlediği bilinmektedir (Montoya and Liesenfeld, 2004).

2.4 Epidemiyoloji

T. gondii, insan dahil kuş ve memelilerin çoğunu enfekte edebilen parazitik zoonozdur. Dünya'da her üç insandan birinin parazit ile enfekte olduğu belirtilmektedir (Elmore et al., 2010). *T. gondii* enfeksiyonunun prevalansı ile ilgili gerçekleştirilen araştırmalarda dünya çapında değişiklikler göstermektedir. Bireylerin kişisel alışkanlıkları, kültürel ve iklimsel değişiklikler, kedilerin varlığı, hava şartları ve yaşam kalitesi gibi değişkenlerin parazit yayılımını etkilediği ortaya konmuştur (Yektaeian et al., 2021). Latin Amerika, Afrika ve Güneydoğu Asya'da gelişmekte olan veya az gelişmiş ülkelerde prevalansın yüksek, gelişmiş ülkelerde ise düşük prevalans değerleri gözlenmektedir. Avrupa ülkelerinde soğuk iklim şartları nedeniyle prevalans çok düşükken sıcak iklimlerin yaşandığı ülkelerde yüksek prevalans değerlerinin saptandığı bilinmektedir (Al-Malki, 2021). Güncel

kaynaklara göre, Brezilya'da %77'ye ulaşan prevalans, Güney Kore'de %1'in altında olduğu tespit edilmiştir (Djurković-Djaković et al., 2019).

Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'nin (Centers for Disease Control and Prevention - CDC) raporlarına göre ABD'de 2000'li yıllarda toksoplazmozis gıda kaynaklı enfeksiyonların içinde en sık ikinci ölüm sebebi ve dördüncü hastaneye başvuru nedeni olarak bildirilmektedir (Yektaeian et al., 2021). Dünya Sağlık Örgütü'ne (World Health Organization - WHO) göre Avrupa kıtasında gıda kaynaklı bulaşan hastalık etkenlerinin %20'sinin *T. gondii* olduğu tespit edilmiştir (Havelaar et al., 2015). Paris'te yaşayan kadınlar ile yapılan bir çalışmada çiğ veya az pişirilmiş et ürünlerinin tercihine bağlı olarak Londra'da bulunan kadınlara kıyasla yüksek oranda pozitiflik gözlenmiştir (Dubey et al., 1998). Yapılan bir başka çalışmada ise Almanya'da *T. gondii* enfeksiyonunun %20 ile %77 arasında olduğu ve bunun sebebinin pişmemiş sosis tüketiminden kaynaklandığı belirtilmektedir (Pleyer et al., 2019).

Türkiye'de de geniş yayılımı olan parazitin seroprevalansını belirlemek amacıyla 2000'li yılların başından itibaren birçok ilde çalışmalar yapılmıştır. 2000 ile 2018 tarihleri arasında bölgesel olarak taranan serum örnekleri araştırıldığında seropozitifliğin Ege Bölgesinde %30,5, Marmara Bölgesi'nde %28,8, Karadeniz Bölgesi'nde %21,3, İç Anadolu Bölgesi'nde %29,5, Akdeniz Bölgesi'nde %3 olduğu görülmüştür (Kolören and Dubey, 2020). İller üzerinde yapılan çalışmalarda ise Antalya ve İskenderun'da hamile kadınların serum örnekleri incelendiğinde %52,1 oranında seropozitiflik saptanmıştır (Ocak et al., 2007). Adıyaman'da gebelik takibi amacıyla toplanan serum örneklerinden %48,4 oranında seropozitiflik saptanmıştır (Kölgeliev vd., 2009). Ankara'da yapılan bir çalışmada taranan 7869 hamile kadının serum örneğinde %25,5'inin, Uşak ilinde 1465 hamile kadının serum örneklerinden %18,3'nün anti-*Toxoplasma* IgG pozitif olduğu belirlenmiştir (Çelen vd., 2013; Toklu, 2013). Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden elde edilen sonuçlar incelendiğinde parazit yayılımında gözlenen en büyük risk faktörlerinin çiğ veya az pişmiş etler, iyi yıkanmamış sebze ve meyvelerin tüketimi olduğu açıkça görülmektedir (Cevizci ve Bakar, 2013). Toplumda sosyal ve ekonomik kayıplar oluşturan *T. gondii*'nin neden olduğu sorunların azaltılabilmesi amacıyla hamilelik döneminde kadınların

bilgilendirilmesi ve düzenli serolojik testlerin yapılması gerekmektedir. Ayrıca, kedi besleyen bireyler kedi kumlarını sporulasyona fırsat vermeden düzenli temizliklerini yapmaları hakkında bilgilendirilmelidir. Koruyucu tedbirlerin titizlikle uygulanmasının parazit yayılımında etkili olabileceği tahmin edilirken en önemli koruyuculuğun etkili bir aşının kullanılması sonucu sağlanabileceği bildirilmektedir (Bilgili ve Hanedan, 2019).

2.5 *T. gondii* İmmünolojisi

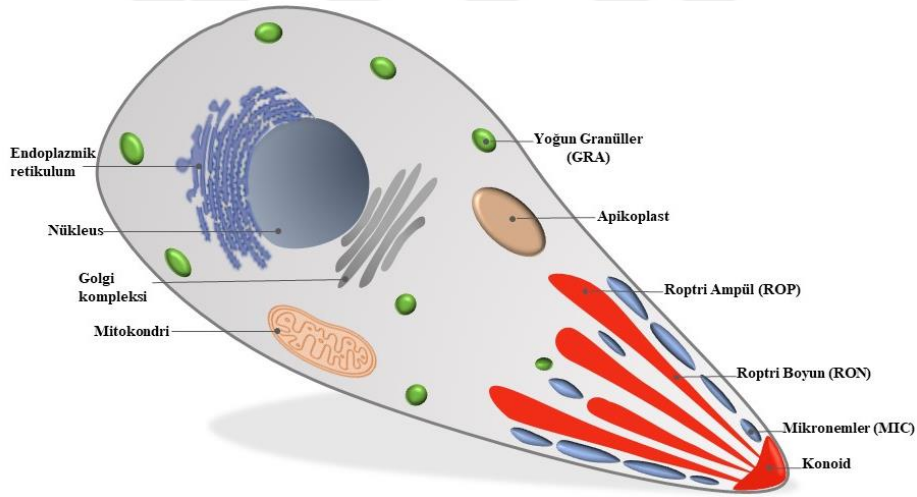
T. gondii ile enfekte olan konakçı hücrelerde enfeksiyona bağlı olarak hücresel immün yanıtın yanında sıvısal immün yanıtın da uyarıldığı saptanmıştır. Hücresel immün yanıtta rol alan CD4+ ve CD8+ T hücreleri, sıvısal immün yanıt hücreleri olan B hücreleri enfeksiyonun önlenmesinde başlıca görevli hücrelerdir. Antijen sunan hücreler (Antigen-presenting cells - APC) tarafından fagosite edilen *T. gondii*'ye ait antijenler majör doku uyumluluk kompleksi (major histocompatibility complex - MHC) MHC II reseptörleri ile kompleks oluşturarak APC hücre yüzeyinden sunulmaktadır. Oluşan kompleks ile CD4+ T-Yardımcı Lenfosit (Th₀) hücrelerini ve T hücrelerde yer alan CD28 reseptörü olan CD80/86 ile uyarılarak CD4+ hücrelerin Th₁ yönünde polarizasyonu ile aktifleşme uyarısı arttırılmaktadır. Gerçekleşen polarizasyonun CD4+ Th₁ hücrelerden salgılanan İnterferon gamanın (IFN- γ) makrofajları ve doğal katil hücrelerini (Doğal Öldürücü Hücre - NK) uyararak İnterlökin 12 (IL-12) üretimini arttırdığı ve bunun sonucunda hücresel immün yanıtı güçlendirilmesini pekiştirdiği gözlemlenmiştir (Guiton et al., 2009; Pier et al., 2004).

Bir başka hücresel immün yanıt yolağında ise *T. gondii* yüzey antijenlerinin veya endojen antijenlerinin hücreye girişlerinin ardından proteozomlar tarafından lizize uğratılıp MHC I ile kompleks yaptıktan sonra hücre yüzeyinden sunulmaktadır. T hücrelerde bulunan CD3+'ün T-Sitotoksik Lenfosit (T_c) hücreleri aktifleştirilmesi sonucu TCR (MHC-I-Ag) kompleksi oluşmaktadır. Oluşan kompleks CD8+ hücrelerini uyararak kuvvetli bir bağ oluşturmaktadır. Uyarımın arttırılması sonucunda APC için sitotoksik moleküller olan perforin ve granzim salgılanmaktadır. Buna ek olarak, CD8+ hücrelerden IFN- γ salgısının artışı görülmekte ve APC'den İndüklenmiş Nitrik Oksit Sentetaz (iNOS) salgısı

arttırılarak mikroorganizmaların ölümü gerçekleşmektedir. Ayrıca, CD8+ hücrelerde bulunan FasL ile APC üzerindeki Fas yapıları birleşerek APC'de apoptozis uyarısı tetiklenmektedir (Henriquez et al., 2010; Hu et al., 1999).

2.6 *T. gondii* Roptri Proteinleri

T. gondii'nin akut dönemde etkili formu olan takizoitler, neredeyse tüm hücrelere invazyon yapabilme yeteneğine sahiptir (Boothroyd and Dubremetz, 2008). Apicomplexa ailesinde yer alan *T. gondii* takizoitlerinin, Şekil 2.2'de gösterildiği üzere, apikal ucunda mikronemler (MIC) ve roptriler (ROP) bulunurken yoğun granüller (GRA) ise hücre içinde dağılmış halde bulunmaktadır. ROP'ları salgılayan organel sopa şeklinde olup, boyun bölgesinde roptri boyun proteinleri (RON'lar) ve yukarıda bulunan ampule benzer bölgesinde ise roptri proteinleri (ROP'lar) bulunmaktadır.

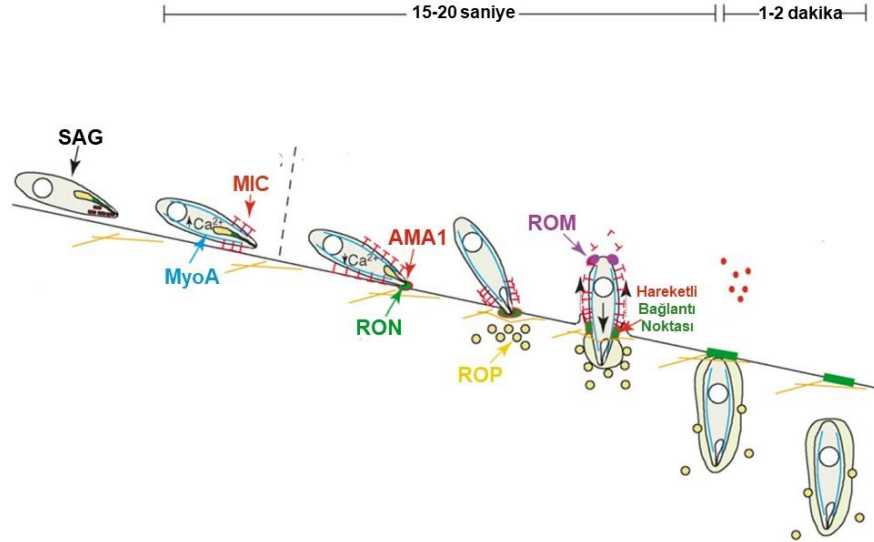


Şekil 2.2 *T. gondii* takizoit (çizimde kullanılan mitokondri ve endoplazmik retikulum <https://www.stockunlimited.com/> adresinden alınmıştır.)

Roptri organeller üzerinde yapılan çalışmalarda araştırmacılar toplam 38 adet roptri proteini tanımlamış ve her bir organelin 2-3 μm uzunluğa sahip olduğu saptanmıştır. Roptri proteinleri, hücre hacminin yaklaşık %1-30'unu oluşturmaktadır. ROP'lar parazitin konakçıya istilası sırasında, penetrasyon ve PV'ün biyogenezinde kritik rollere sahiptir. Bunlara ek olarak, RON'lar hücre istilasını desteklerken, ROP ve GRA'lar konakçı bağışıklığı ve metabolik yanıtları düzenleyerek parazitin hayatta kalmasını sağlamaktadır (Venugopal and Marion,

2018; Zhang et al., 2019; Foroutan et al., 2019). Ayrıca ROP'lar, *T. gondii*'nin bilinen tek asitlenmiş organelleridir (Dlugonska, 2008).

ROP proteinlerinin konak hücreyi istilasını konakçı üzerinde bulunan alıcı molekül/moleküller ile doğrudan tanımayla ilgili olduğu bildirilmektedir. Konakçı hücreyle tanıma sonrasında gerçekleşen salınımın mekaniği tam olarak bilinmeyen noktaları bulunmaktadır. Ancak, gerçekleşen tanımanın ardından RON 2, 4 ve 5 proteinleri mikronem türevli AMA1 proteini ile kompleks oluşturmaktadır. Bu kompleks ile konak hücreye girişte etkili olan dairesel bir hareketli bağlantı (Moving junction – MJ) oluşumu sağlanmaktadır. Oluşan MJ'nin ardından ROP proteinleri konak hücrenin sitoplazmasına gönderilmektedir. ROP'ların bir kısmı konak hücrenin parazitofor vakuol membranına (PVM) gönderilirken bir kısmı konak hücre sitoplazmasında kalmaktadır. Sonrasında, parazit kendisini oluşturduğu PV'ye iterek konak hücreye girişini sağlamaktadır. Bu girişin yaklaşık üç dakika gibi kısa bir zamanda tamamlandığı bildirilmektedir (Şekil 2.3) (Carruthers and Boothroyd, 2007; Boothroyd and Dubremetz, 2008).



Şekil 2.3 *T. gondii*'nin konakçı hücreye invazyonu

T. gondii hayat döngüsünde protein kinazların transkripsiyon, translasyon ve çevresel olaylara tepki gibi rolleri bulunmaktadır (Gaji et al., 2021). Ropri proteinlerinin %80'i kinaz alanı içerir, ROP6 proteini ve ROP1,9,10,12,13,15 proteinlerinde kinaz alanının bulunduğuna yönelik bir veri bulunmamaktadır. Lee

ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları çalışmada ROP6 proteininin *E. coli* hücrelerinde ekspresyonu ve saflaştırılmasını gerçekleştirmiş ve biyoinformatik analizler ile protein yapısı anlamaya çalışmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda ROP6 proteininin enfeksiyonun gerçekleştiği 2 saatlik zaman dilimi içinde etkin olduğu saptanmıştır (Lee et al., 2014). Tüm bunların yanında, ROP6 proteinin henüz tam olarak aydınlatılamayan yönleri bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar ROP proteinlerinin parazitin hem takizoit hem de bradizoit formunda sentezleniyor olmasının yanında T ve B hücre yanıtını kuvvetli uyarmasından önemli bir aşı adayı olabileceğini göstermektedir (Döşkaya et al., 2018; Rezaei et al., 2019).

2.7 *T. gondii* Aşı Çalışmaları

T. gondii'ye yönelik aşı çalışmaları uzun yıllardır devam etmektedir. Günümüzde *T. gondii*'ye karşı kullanımda olan lisanslı tek aşı Toxovax™ (MSD, Birleşik Krallık) aşısıdır. Bu aşı S48 canlı suşundan elde edilen canlı zayıflatılmış bir aşıdır ve koyunlarda ölü doğumları engellemek amacıyla kullanılmaktadır. Ancak, aşının vahşi tipe dönüşerek bağışıklığı düşük bireylerde patojenik olma riski ve raf ömrünün kısa olmasından dolayı insanlarda kullanımını uygun bulunmamaktadır. Belirtilen riskler nedeniyle toksoplazmozise karşı insanlarda da kullanılacak aşılarda geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu kapsamda son 20 yılda rekombinant protein aşılarda, DNA aşılarda ve peptid aşılarda hız kazanmıştır (Zhang et al., 2013).

Son yıllarda aşı çalışmalarında, üretim kolaylığı, zararsız olması, maliyet etkin olması ve enfeksiyon riski taşıması gibi nedenlerden dolayı biyoteknolojik alt ünite aşılara olan ilgi artmıştır. Bu çalışmalarda, *T. gondii*'ye özgü aday takizoitler ve bradizoitler tarafından salgılanan ve patogeneizde önemli işlevleri bulunan SAG, ROP, MIC ve GRA antijenleri öne çıkmaktadır. İlgili antijenlerin kullanımıyla yapılan aşı çalışmaları sonuçlarında yüksek immün yanıtlar, hayatta kalma sürelerinde belirgin uzama ve kist yükünde belirgin azalmalar saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar, toksoplazmozise yönelik aşı çalışmalarının hızla devam etmesi gerektiğini göstermektedir (Karakavuk vd., 2022).

2.8 Rekombinant Protein Aşıları

Geleneksel aşılar canlı, zayıflatılmış veya öldürülmüş bakteri veya virüs kaynaklı olup bu aşıların içeriklerinde virüs veya bakteriye ait genetik materyalin bulunma olasılığı ve vahşi tipe dönüşme riskleri bulunmaktadır. Bu riskler nedeniyle başta immün sistemi baskılanmış kişilerde oluşturabilecekleri zararların yüksek olmasından dolayı kullanımları yasal otoriteler tarafından oldukça zor kabul edilmektedir. Bu nedenle aşı içeriği bilinen alt ünite aşı formülasyonlarının geliştirilmesine yönelik çalışmalar ilgi görmektedir (Bill, 2015).

Rekombinant protein teknolojisi ile geliştirilen aşılar, immün cevap oluşturmak amacıyla etkenin bir bölgesinin biyoteknolojik olarak elde edilip saf aşı antijeninin kullanıldığı sistemlerdir. Aşı üretim prosesinde etkene ait antijenik gen bölgeleri elde edilerek gen düzeyinde düzenlemeler yapılmaktadır. Sonrasında patojenik olmayan konakçılarda (maya, bakteri, böcek, memeli ve bitki hücreleri) protein ekspresyonları sağlanmaktadır. Günümüzde farklı patojen canlılara yönelik yapılan aşılar, rekombinant proteinler kullanılmaktadır (Hansson et al., 2000).

2.8.1 Rekombinant Protein Üretiminde Kullanılan Ekspresyon Sistemleri

Genetik mühendisliği çalışmaları ile çeşitli rekombinant proteinlerin üretimi sağlanmaktadır. Bu proteinlerin üretiminde hedef proteinin özelliklerine uygun olarak seçilen bakteri, maya, memeli, böcek ve bitki ekspresyon sistemleri kullanılmaktadır. Ekspresyon sistemlerinin seçiminde üretilecek hedef rekombinant proteinin biyokimyasal özellikleri, salgılanma yeri, üretim hızı, ekspresyon seviyesi, translasyon sonrası modifikasyonlar ve proteolitik bozunuma dayanıklılığı gibi faktörler göz önüne alınmaktadır (Andersson, 2000).

Rekombinant proteinlerin üretiminde en çok kullanılan sistemlerden biri bakteriyel ekspresyon sistemleridir. Bu sistemlerin en sık tercih edilen konakçısı *Escherichia coli* (*E. coli*) olup, iyi bilinen genetik yapısı, üretim kolaylığı, yüksek ekspresyon seviyeleri ve manipülasyon kolaylığı gibi avantajları bulunmaktadır. Ancak, ökaryotik proteinlerin üretiminde translasyon sonrası modifikasyonların bu

sistemlerde yeterince gerçekleştirilememesi ve endotoksin sorunu en önemli dezavantajlarıdır (Demain and Vaishnav, 2009; Tripathi and Shrivastava, 2019).

Maya ekspresyon sistemleri translyasyon sonrası modifikasyon yetenekleri, büyük ölçekli üretime uygun olması, verimli üreme ve patojenik olmama gibi avantajları nedeniyle en çok kullanılan sistemlerden biridir (Baghban et al., 2019). Geçmişten günümüze insan kullanımına uygun terapötik proteinlerin üretiminde insanlardaki N-glikozilasyona benzer şekilde genetik olarak modifiye edilebilmeleri sebebiyle en çok kullanılan maya ekspresyon sistemlerinin başında *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ve *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) gelmektedir (Tripathi and Shrivastava, 2019). Yapılarında bulunan glikozilasyon ve fosforilasyon yolları sayesinde protein verimliliğinin artırılması çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca, ökaryotik organizmalar olmaları nedeniyle rekombinant proteinlerin üretimlerinde tercih edilmektedir. Maya ekspresyon sistemlerinde en sık tercih edilen *S. cerevisiae* ile yapılan çalışmalarda yollar üzerinde yapılacak manipülasyonlar sonucu protein verimliliğinin artırılabilceği bildirilmektedir (Andersen and Krummen, 2002). Ayrıca, *S. cerevisiae* insan gıdalarında da kullanılabilmesi nedeniyle yasal otoriteler tarafından kolay kabul görmektedir. Buna karşılık, *P. pastoris*'in üretimi sırasında yüksek metanol ve proteaz seviyeleri açığa çıkarak çalışmasını sınırladığı bildirilmektedir. Buna ek olarak, *P. pastoris* hücrelerinde üretilen proteinlerin proteolitik bozunuma uğrayarak veriminin düşmesi ve aktivitesinin kaybolması önemli dezavantajlarındandır (Baghban et al., 2019; Tripathi and Shrivastava, 2019).

Böcek ekspresyon sistemleri, protein katlanmalarını memeli hücrelerine benzer olarak gerçekleştirebilmesi nedeniyle tercih edilmektedir (Demain and Vaishnav, 2009). Böcek hücrelerinde rekombinant proteinlerin üretiminde en çok bakülovirüs bazlı ekspresyon sistemleri kullanılmaktadır. Diğer sistemlere oranla proteinlerin yüksek seviyelerde eksprese edilmesi ve yapılarında gerçekleşen glikozilasyonun memeli hücreler ile aynı olması gibi avantajları bulunmaktadır (Hansson et al., 2000). Ancak, bu sistemlerde N-glikozilasyonun gerçekleşmemesi, üretimlerinin maliyetli olması ve sonuçların uzun zaman diliminde elde edilmesinden

dolayı bakteri ve maya ekspresyon sistemlerine göre daha az tercih edildiği bildirilmektedir (Demain and Vaishnav, 2009; Tripathi and Shrivastava, 2019).

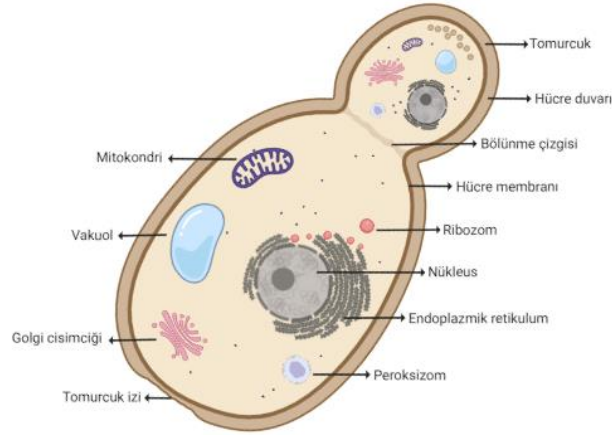
Memeli ekspresyon sistemleri diğer sistemler ile kıyaslandığında büyük ve karmaşık rekombinant proteinlerin ekspresyonunda kullanılan sistemlerdir. Yapılarında gerçekleşen translasyon sonrası modifikasyonlar bakımından insan hücrelerine çok benzemesi, üretilen rekombinant proteinin insanla benzer şekilde olduğunu ifade etmektedir. Başarılı bir hücre hattının geliştirilmesinin ardından uygun ortam koşullarının (pH, sıcaklık, hücre yoğunluğu, indükleyici yoğunluğu, indüksiyon süresi vb.) sağlanması ile yüksek protein ekspresyon seviyelerine ulaşılmaktadır (Tripathi and Shrivastava, 2019). Bu sistemlerin en büyük dezavantajı ise yapılan tüm işlemlerin maliyetli, zaman alıcı ve stabil hücre hatlarının oluşturulma zorluğudur. Ayrıca, hücre hatlarında bakteriyel veya viral enfeksiyon risklerinin yaşanma ihtimalinin oldukça yüksek olduğu bildirilmektedir (Hansson et al., 2000).

Rekombinant protein ekspresyonunda bitki ekspresyon sistemlerinin kullanımı diğer sistemlere oranla daha güvenli, ucuz ve hızlı gerçekleşmektedir. Ayrıca, insanlara yönelik patojen riski bulunmamakta ve tarımsal ölçekte üretim sağlandığı için büyük üretimler kolaylıkla yapılabilmektedir. Bitki ekspresyon sistemlerinin en önemli dezavantajı toksik bitki metabolitleri, pestisit veya herbisitler ile kontaminasyon riski olarak bildirilmektedir (Demain and Vaishnav, 2009).

2.9 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*), ekmek mayası olarak bilinen ve Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen (generally recognized as safe – GRAS), patojenik olmayan bir maya türüdür. Genomu dizilenen ilk ökaryotik organizma olması nedeniyle geçmişten beri temel hücresel süreçlerin anlaşılmasında kullanılmıştır. Rekombinant proteinlerin üretiminde ve aşı çalışmalarında sıklıkla tercih edilen *S. cerevisiae*'nin hücre yapısı Şekil 2.4'te gösterilmiştir. Ölçeklenebilir olması, translasyon sonrası modifikasyonlar gerçekleştirilmesi,

endotoksin içermemesi ve düşük üretim maliyetine sahip olması en önemli avantajları arasında yer almaktadır (Raj et al., 2002).



Şekil 2.4 *Saccharomyces cerevisiae* hücre yapısı (<https://www.biorender.com> adresinden modifiye edilerek kullanılmıştır.)

S. cerevisiae ekspresyon sistemleri kullanılarak insanların kullanımına uygun olarak üretilen hepatit B yüzey antijeni, insülin, glukagonlar, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü gibi çeşitli proteinler bulunmaktadır (Böer et al., 2007). Günümüzde de *S. cerevisiae*, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration - FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (European Medicines Agency - EMA) tarafından en güvenilir mikroorganizma olarak kabul edilmektedir.

FDA tarafından onaylanan 150'den fazla biyofarmasötik çoğunluğu *S. cerevisiae*'de olmak üzere yaklaşık %20'si mayalarda, %30'u *E. coli*'de ve %50'si hibridoma ve memeli hücre hatlarında üretilmektedir (Bill, 2015). Biyofarmasötik üretimi dışında *S. cerevisiae* kullanılarak üretilen rekombinant protein aşılı bulunmaktadı. Bu çalışmalarda, *S. cerevisiae* yapısında bulunan yabancı antijenleri eksprese ederek dentritik hücreleri (Dentritic cells - DC) aktive edebildiği, antijene özgü sitotoksik T lenfosit (antigen specific cytotoxic t lymphocytes - CTL) tepkileri ortaya çıkardığı ve koruyucu hücre bağışıklık tepkileri sağlandığı bildirilmektedir. Günümüzde Hepatit B ve insan papilloma virüslerine karşı uygulanan rekombinant protein aşılarının üretiminde *S. cerevisiae* başarı ile kullanılmaktadır (Ardiani et al., 2010).

2.9.1 Oksotrofik Mayaların Genel Özellikleri

Protein ekspresyon sistemlerinde kullanılan konakçı hücrelerin seçici besiyerlerinde kontrollü seçimini sağlayan, metabolik enzim kodlayan işaretleyici genler bulunmaktadır. Bu genler çeşitli bileşiklere ve antibiyotiklere karşı direnç sağlamaktadır. İlgili bileşiğin ortamda bulunması sonucu büyüeyebilen hücrelere oksotrofik hücreler adı verilmektedir. Maya konakçı suşu genlerinde yapılan manipülasyonlar sonucu biyogenezde son ürünün olmadığı ortamlarda yalnızca hedef geni taşıyan plazmitlerin bulunduğu maya hücrelerinin büyüebilmesi ile seçim yapılmaktadır. Aksi durumda, yani plazmit taşımayan maya hücreleri ilgili bileşik ortamda bulunsun bile ölmektedir. Bu seçici genlerin kullanımıyla yüksek kopya sayısında plazmitler elde edilebilmektedir (Pronk, 2002).

S. cerevisiae'nin konakçı olarak kullanımını kolaylaştıran maya ve bakteri dizilerinin melezlenmesi gibi genetik manipülasyonlar gerçekleştirilmektedir (Çelik and Çalık, 2012). Bu manipülasyonlar en çok mayadan alınan transformantların seçimini kolaylaştıran seçici genler ve promotörler üzerinde yapılmaktadır. Rekombinant proteinlerin üretiminde seçim için oksotrofi genleri, toksisite genleri ve glikolitik yollarda bulunan temel genler kullanılmaktadır (Liu et al., 2012). Konak seçiminde en çok “p-izopropil malat dehidrojenaz (LEU2)” geni veya “orotidin 5'-dekarboksilaz (URA3)” geni üzerinde manipülasyonlar gerçekleştirilmektedir. Bu genler üzerinde yapılan düzenlemeler sayesinde kolaylıkla hücre seçimi yapılmakta ve seçilen hücrelerin üretimi ile yüksek hücre yoğunlukları elde edilerek protein sentezi sağlanabilmektedir (Çelik and Çalık, 2012).

Rekombinant proteinlerin üretiminde kullanılan vektörlerin yapısında da bulunan güçlü ve etkili ekspresyonun başlatılmasını sağlayan promotörlerin seçimi de oldukça önemlidir. Bu promotörler indüklenebilir ve kurucu promotörler olarak iki grupta incelenmektedir. İndüklenebilir promotörler belirli bir uyarının varlığında veya yokluğunda transkripsiyon seviyesinde gerçekleşen değişikliğe bağlı promotörlerdir. Bu uyarılar, ısı, ışık, pH, çeşitli iyonlar gibi çevresel faktörler olabildiği gibi galaktoz, maltoz, glukoz, gliserol, asetat ve etanol gibi maddeler de olabilmektedir. *S. cerevisiae*'de yaygın olarak kullanılan promotörler

ise galaktoz ile indüklenebilir PGAL1, PGAL2, PGAL7 ve PGAL10'dur (Tang et al., 2020). Ayrıca TEF1 ve TPI1 promotörleri, hem yüksek glukoz koşullarında hem de glukozu sınırlandırılmış ortamlarda yüksek protein ekspresyonunu sağlayabilmektedir (Liu et al., 2012). Buna ek olarak, tek bir vektörde iki farklı genin aynı anda eksprese edilmesini sağlayan çift yönlü GAL1/GAL10 promotörü de bulunmaktadır. GAL1 ve GAL10 promotörlerinin, hem glikoz baskısında hem de galaktoz indüksiyonunda çalıştığı bildirilmektedir. Ancak, glikozdan galaktoza geçişin büyük metabolik değişiklikler oluşturduğu da bilinmektedir (Partow et al., 2010).

2.9.2 *S. cerevisiae* Ekspresyon Vektörleri

Maya hücrelerinde rekombinant protein üretiminde, üretilen transkriptlerin kopya sayısının kontrol edilmesi biyoteknolojik çalışmalarda ve temel araştırmalarda önemli yer tutmaktadır. Bu amaçla *S. cerevisiae*'de protein üretiminde çeşitli vektör sistemleri kullanılmaktadır. İstenilen genin maya genomuna entegrasyonunda maya bütünleyici plazmitler (YIps) veya yüksek kopya sayısı elde etmede maya epizomal plazmitleri (YEps) gibi ifade sistemleri geliştirilmiştir. Ayrıca, çeşitli özelliklere sahip promotörler bulunduran ve farklı düzenleme profilleri içeren yeni plazmitler geliştirilmektedir (Partow et al., 2010).

Maya çalışmalarında kullanılan çoğu plazmit "mekik vektör" olarak isimlendirilmekte ve kromozoma entegre olarak veya kromozom dışı olarak konakçıda korunabilmektedir. Mekik vektörler, biyoteknolojik yöntemler kullanılarak yapısal olarak manipüle edilen ve istenilen özellikler kazandırılan vektör tipleridir. Genellikle yapılarında klonlamayı kolaylaştıran çoklu klonlama bölgesi (MCS), plazmit replikasyonunu sağlayacak replikasyon orijini (ori) ve spesifik antibiyotiklere karşı seçilebilirliği sağlayan gen bölgesi içermektedirler (Gnügge and Rudolf, 2017).

Laboratuvar koşullarında gerçekleştirilen genetik manipülasyonlar sonucu çeşitli özellikleri değiştirilerek üretilen vektörler bulunmaktadır. *S. cerevisiae*'de yüksek protein verimliliği sağlayan pYES vektörleri bunlara örnek olarak gösterilebilmektedir. Yapılarında, hedef genin besiyerinde kolaylıkla seçimini

sağlayan (URA3 geni) ve hedef proteinin belirlenmesini veya saflaştırılmasını kolaylaştıran epitop bölgeleri bulunmaktadır. Bunlara ek olarak, yapılarındaki GAL1 promotörü sayesinde glikoz varlığında transkripsiyon baskılanıp glikoz yerine ortama galaktoz eklenerek indüksiyon ile transkripsiyonun arttırılması sağlanmaktadır. Üretilen bu vektörler sayesinde protein üretim hızlarının arttırılması sonucunda verimli üretimler gerçekleştirilmektedir (ThermoFisher, 2023).

2.9.3 *S. cerevisiae* Kullanılarak Yapılan Aşı Çalışmaları

Günümüze dek yapılan aşı çalışmalarında çeşitli yöntemler kullanılmış ve farklı konakçılarda üretimleri sağlanarak önemli hastalıklara karşı aşilar geliştirilmiştir. 1986 yılında lisanslanan ve üretiminde *S. cerevisiae* kullanılan, ilk rekombinant protein aşısı olan Recombivax HB[®], Hepatit B enfeksiyonunun önlenmesinde kullanılmıştır. Hemen ardından yine kronik karaciğer hastalığına karşı (Hepatit B) Engerix-B isimli rekombinant protein aşısı lisanslanarak kullanıma sunulmuştur (Josefsberg and Buckland, 2012; Keating and Noble, 2003). *S. cerevisiae*'de üretimi gerçekleştirilen bir diğer aşı ise insan papilloma virüsüne (HPV) karşı virüs benzeri partiküller (VLP) kullanılarak yapılan Gardasil[®] aşısıdır. Papilloma virüsüne ait olan kapsid proteinleri rekombinant maya hücrelerinde eksprese edilerek üretimi gerçekleştirilmiştir (Josefsberg and Buckland, 2012). İnsan bağışıklık yetmezliğine karşı (HIV) bakteriyofaj MS2'ye dayalı VLP ile RNA bazlı, maya hücrelerinde eksprese edilen bir aşı çalışması yapılmıştır. BALB/c farelerde yapılan denemeler ve analizler sonucunda faj bazlı yeni bir platform oluşturulabileceği belirtilmiştir (Sun et al., 2011).

T. gondii'ye yönelik yapılan aşı çalışmaları arasında *S. cerevisiae* yüzeyinde üretimi gerçekleştirilen MIC16 proteini yer almaktadır. İlgili çalışmada fareler pCTCON2-TgMIC16/EBY100 vektörü ile maya yüzeyine bağlantılı olarak üretilen rekombinant MIC16 protein aşısı farelere hem intraperitoneal hemde oral yolla adjuvant kullanılmadan uygulanmıştır. Aşının farelerde güçlü humoral ve hücrel bağışıklık tepkilerini uyardığı, farelerin *T. gondii* takizoitleri ile karşılaştırma sonucunda hayatta kalma sürelerinde artış olduğu gözlemlenmiştir (Wang et al., 2018).

Tavuk koksiidiozisine neden olan ve dünya çapında kümes hayvanları için büyük tehdit oluşturan *Eimeria tenella* parazitinin mikronem proteini olan EtMic2'nin *S. cerevisiae* hücrelerinde eksprese edilmiş ve ardından tavuklar EtMic2 içeren canlı maya hücreleri ile oral yoldan aşılanmıştır. Aşılama sonrasında güçlü sıvısal ve hücresel bağışıklık tepkilerinin oluştuğu saptanmıştır (Sun et al., 2014). Yüksek patajonik kuş gribi virüsü (H5N1) salgınlarını kontrol etmek amacıyla yine *S. cerevisiae*'de üretilen EBY100/pYD1-HA proteini oral aşılama yoluyla adjuvant kullanılmadan tavuk modelinde uygulanmıştır. Çalışma sonucunda H5N1 virüslerine karşı koruma sağlamış, yüksek IgG titresi ve hücresel bağışıklık tepkileri uyarılmıştır. Ayrıca, yapılan geleneksel enjeksiyon yöntemlerine karşı oral aşılamanın enflamasyona neden olmadan gerçekleştirildiği ve daha başarılı olduğu bildirilmektedir (Lei et al., 2021). Son dönemde şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2'nin (SARS-CoV-2) reseptör bağlama bölgesinin (RBD) maya hücrelerinde üretimi gerçekleştirilmiştir. Oral yolla aşılama yapılan farelerde aşılama sonucunda güçlü hücresel yanıtlar elde edilmiştir (Gao et al., 2021). Bu gibi çalışmalar ve piyasada var olan rnler *S. cerevisiae*'nin güvenilir, etkin ve hızlı bir platform olarak dünyada yaygın görülen hastalıklara karşı aşıların geliştirilmesinde kullanılabileceğini göstermektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışmamın tüm aşamaları Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) TOA-2021-22890 numaralı öncelikli alan projesi desteği ile Ege Üniversitesi Aşı Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıp Fakültesi Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1 Aşı Adayı Rekombinant ROP6 Proteininin Biyoinformatik Analizi

Döşkaya ve ark. tarafından *T. gondii* genomuna ait proteinlerin mikroarray yöntemi ile taraması sonucunda ROP6 proteininin yüksek immünojenisiteye sahip olduğu gösterilmiş ve aşı adaylığı olabileceği belirtilmiştir (Döşkaya vd., 2018). Buradan yola çıkarak, bu tez çalışmasında güçlü antijenik yapısı ve parazit morfolojisindeki kritik rollerinden dolayı aşı adaylığı olabilecek *T. gondii* ROP6 proteini biyoinformatik olarak incelenerek, *S. cerevisiae* maya hücrelerinde rekombinant protein olarak üretilmesi amaçlanmıştır.

T. gondii'ye ait ROP6 DNA sekansı "Toxoplasma Genomic Resource" (ToxoDB) TGME49_258660 numarası ile ToxoDB adresinden elde edilmiştir. 1443 baz çifti uzunluğundaki sekans öncelikle Expasy çevirme aracı kullanılarak amino asit (aa) sekansına çevrilmiş ve ardından TMHMM- 2.0 programı ile proteinin hücre içi, transmembran ve hücre dışı alanları tespit edilmiştir. Sonrasında *T. gondii*'ye karşı geliştirilebilecek rekombinant protein aşı formülasyonunda kullanılabilmesi için hücre içi ve transmembran kısımları çıkarılmış, hücre dışı olarak belirtilen sekans aralığı antijen tasarımı için kullanılmıştır. Ardından, protein sekansındaki MHC-I ve MHC-II hücre epitopları immün epitop veritabanı (IEDB) kullanılarak, B hücre epitopları ise SWMTriP (A tool to Predict Linear Antigenic Epitopes) çevrimiçi program ile tespit edilmiştir. MHC-I epitoplarının belirlenmesinde ANN 4.0 seçilmiş, insan ve MHC-I kaynağı on iki farklı MHC-I alleli (A01.01, A02.01, A03.01, A24.02, A26.01, B07.02, B08.01, B27.05, B39.01, B40.01, B58.01 ve B15.01) kullanılmıştır. Sonuçlar, yarı maksimum inhibitör konsantrasyon (IC50) ve yüzdelik sıra değeri ile belirlenmiştir. MHC-II epitoplarının belirlenmesinde NetMHCIIpan 4.0 BA seçilerek insan ve yedi farklı MHC-II alleli (DRB1.03.01, DRB1.07.01, DRB1.15.01, DRB3.01.01,

DRB3.02.02, DRB4. 01.01 ve DRB5.01.01) HLA referansları kullanılmıştır. MHC-I çıktıkları IC50 ve yüzdelerik sıra değerleri olarak verilmiştir (Can et al., 2020). ROP6 proteini yapısında yer alan N glikozilasyon bölgeleri NetNGlyc 1.0 programı ile O glikozilasyon bölgeleri ise NetOGlyc 4.0 programı ile belirlenmiştir (Karakavuk et al., 2021). Stabilite analizi hücre dışı protein sekansı alınarak Expasy ProtParam çevrimiçi programı ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan analiz sonucunda proteinin hücre dışı sekansının stabil olmadığı belirlenmiştir. Bu analizler sonrasında ROP6 proteininin yüksek antijenik olan hücre dışı kısmı stabil olacak şekilde kısaltılmıştır. Ardından kısaltılmış olan ROP6 proteininin VaxiJen programında antijenikliği analiz edilmiştir.

Gerçekleştirilen biyoinformatik analizler sonucunda ROP6 proteininin aşı formülasyonlarında kullanımına yönelik tasarımı gerçekleştirilmiştir. Bu tasarımda, protein stabilitesinin korunabilmesi amacıyla başlangıç kodonundan hemen sonra Valin aa sekansı eklenmiştir (Kathuria et al., 2016). Ardından, ROP6 proteininin maya hücrelerinde yüksek protein ekspresyonunun sağlanabilmesi amacıyla mayaya özgü Kozak sekansı eklenmiştir (Li et al., 2017). Buna ek olarak, proteinin proteolitik aktiviteye uğramadan yüksek konsantrasyonda kullanımına izin veren TEV proteaz bölgesi protein tasarımına ilave edilmiştir (Xiong et al., 2020). Ayrıca, plazmitin tekrar kullanılabilmesi amacıyla protein sekansının başına ve sonuna uygun enzimler eklenmiştir. Yapılan düzenlemelerin ardından 627 baz çifti ORF (Open reading frame; Açık okuma çerçevesi) büyüklüğündeki ROP6 proteinini sentez eden gen GeneArt Gene Synthesis (Thermo Fisher Scientific, ABD) programı kullanılarak *S. cerevisiae* için kodon optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Tasarımı gerçekleştirilen, başlangıç ve sonlandırma kodonları arasında sentezlenecek proteinin Scratch Protein Predictor çevrimiçi programı ile çözünürlük, Expasy ProtParam programı ile stabilite ve AlgPred programı ile alerjenlik analizleri yapılmıştır. Son olarak tasarlanan proteinin 3 boyutlu görünümü I-TASSER programı kullanılarak elde edilmiştir. Yapılan analizler sonrasında ROP6 proteini, mayaya özgü pYES2.1/V5-His TOPO plazmitine GeneArt Gene Synthesis programı ile klonlanmış ve plazmit hizmeti alımıyla temin edilmiştir.

3.2 pYES2.1/ROP6 Plazmitinin *E. coli* TOP10 Hücrelerine Transformasyonu

Sentetik olarak elde edilen pYES2.1/ROP6 plazmitinin laboratuvar stoğunun oluşturulması amacıyla *E. coli* TOP10 (C4040-04, Thermo Fisher Scientific, ABD) hücrelerine transformasyonu ticari bir kit aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Kısaca, *E. coli* TOP10 hücreleri buz üzerinde çözdürülmüş ve hücrelerin üzerine 100 ng pYES2.1/ROP6 plazmiti eklenmiştir. Daha sonra hücreler buz üzerinde yavaşça karıştırılmış ve karışım 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından reaksiyon tüpüne 42°C sıcaklıkta 30 saniye boyunca ısı şoku uygulanmış ve karışım üzerine (oda sıcaklığında) 250 µl Katabolit Represyonlu Süper Optimal sıvı besiyeri (Super Optimal broth with Catabolite repression - SOC, Invitrogen, ABD) eklenmiştir. Sonrasında hücreler 225 rpm'de (Rounds Per Minute: Dakikadaki Devir Sayısı) 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından transformantları içeren 50 µL reaksiyon karışımı içinde ampisilin bulunan LB-Agarın (25 g/L Luria Bertani (LB) besin ortamı ve 15 g/L agar) plaklara ekimi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra plaklar gece boyu 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında tek koloni seçimi yapılarak 3 mL ampisilin içeren LB sıvı besiyerine ekilmiş ve gece boyu 37°C, 225 rpm'de inkübasyonu sağlanmıştır. İnkübasyon sonrası 500 µL besiyeri ile gliserol stok oluşturularak (final konsantrasyon %15 v/v) -80°C'de saklanmış ve kalan besiyeri ile plazmit saflaştırma kiti (iNtRON, G.Kore) kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre saflaştırma yapılmıştır. Saflaştırma sonrası elde edilen plazmit miktarı spektrofotometre (Nanodrop, ABD) ile ölçülmüş ve 2339 ng/µl olarak saptanarak -20°C'de saklanmıştır.

pYES2.1/ROP6 plazmitinin varlığını göstermek amacıyla agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Özetle, %1'lik agaroz jel (100 mL TAE [Tris-Asetat-EDTA] tampon içinde 1 gram agaroz) hazırlanmış, izole edilen plazmitler 6X bromfenol mavisi içeren örnek yükleme tamponu (%60 gliserol, %0,25 bromfenol mavisi) ile jele yüklenirken, DNA merdiveni olarak Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmıştır. Ardından jel 100 Volt güç ile yaklaşık 50 dakika boyunca yürütülmüştür (Bio-Rad, ABD). Süre sonunda jel Etidyum Bromür ile boyanmış ve jel UV ışık altında görüntülenerek (Major Science, Tayvan) boyut analizi gerçekleştirilmiştir.

3.3 *S. cerevisiae* INVSc.1 Suşunun Canlandırılması

Ticari olarak satın alınan INVSc.1 (C81000, Invitrogen, ABD) suşunun canlandırılması ve laboratuvar stoğunun oluşturulması amacıyla ilk olarak maya pepton dekstroza (Yeast Peptone Dextrose Medium - YPD) agar ve YPD sıvı besiyeri aşağıda tarif edildiği gibi hazırlanmıştır.

100 mL YPD sıvı besiyeri; 1 gr maya ekstraktı (A3732, AppliChem, Almanya) ve 2 gr pepton (18332, Fluka) tartılmış ve 90 mL'ye dH₂O ile tamamlanmıştır. Bu karışım 121°C de 20 dakika boyunca otoklavlanmıştır. Ardından, %2 D-Glukoz hazırlamak (50997, Merck, Almanya) için 4 gr 20 mL dH₂O ile tamamlanarak karıştırıcıda çözdürülmüştür. Çözünen sıvı, 0,22 µm şırınga ucu filtre (S33-CA22-T, CHRXM) kullanılarak filtre edilmiştir. Steril hale getirilmiş olan %2 D-Glukoz'dan soğuyan YPD üzerine 10 mL eklenerek karıştırılmıştır.

100 mL YPD agar; 1 gr maya ekstraktı, 2 gr pepton ve 2 gr agar (A0949, AppliChem, Almanya) tartılarak üzerine 90 mL'ye kadar dH₂O eklenmiştir. Ardından 121°C de 20 dakika boyunca otoklavlanmış ve üzerine filtre sterilizasyonu ile steril hale getirilmiş olan 10 mL D-Glukoz eklenmiştir. Yeteri kadar soğuyan YPD agar, petri plaklarına dökülerek donması için bekletilmiştir.

Hazırlanan YPD sıvı besiyerinden 3 mL'si 12 mL tüpe alınmış ve ticari olarak satın alınan INVSc.1 suşundan 1 mL alınarak 28°C 250 rpm'de gece boyu inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürden 1/10 ve 1/100 seyreltmelerde örnek alınarak YPD agar plaklara alev başında çizgi ekimi yapılmıştır. Ardından plaklar 30°C'de 2 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda agar plaklarda maya kolonileri gözlenmiştir. Gözlenen koloniler 10 mL YPD besiyerine ekilmiş ve 28°C 250 rpm'de inkübatörde gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda üretilen kültürün OD₆₀₀ değerinin 3.0-5.0 aralığında olması beklenmiştir. İnkübasyonun 20. saatinde OD₆₀₀ değeri 3,84 olarak saptanmıştır. Saptanan değer 10 mL YPD sıvı besiyerinde 0.2-0.4 olacak şekilde seyreltilmiştir ve OD₆₀₀ değerinin 0.4-1.0 arasına yükselmesi için 28°C 250 rpm'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Kültür 3-6 saat boyunca çalkalanmış ve süre sonunda istenen OD₆₀₀ değeri aralığına ulaşılmış olup transformasyona uygun hale gelmiştir.

3.4 *S. cerevisiae* INVSc.1 Suşu ile Rekombinant Proteinin Üretiminde Kullanılacak SC-U Besiyerinin ve Agar Plakların Hazırlanması

Çalışma Invitrogen pYES2.1 TOPO® TA ekspresyon kit (K4150-01, Invitrogen, ABD) protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Hedef rekombinant proteini içeren plazmit hücrelerinin maya hücrelerine transformasyonu sonrası plazmit yapısında bulunan URA3 geni sayesinde, Urasil içermeyen besiyerinde yalnızca transforme hücrelerin seçiciliğini sağlayan SC-U besiyeri ve agar plak hazırlığı kit içinde tarif edilen protokollere uygun şekilde yapılmıştır.

Bunun için öncelikle;

- 1) 6,7 gr maya nitrojen baz (Q30007, Invitrogen, ABD),
- 2) 2 gr Rafinoz (A6882,0100, AppliChem, Almanya),
- 3) 0,1'er gr (adenin (A8626, Sigma Aldrich) arjinin (A3675, AppliChem), sistein (A3694, AppliChem), lösin (A3460, AppliChem), lizin (A1342, AppliChem), treonin (A1419, AppliChem), triptofan (A1645, AppliChem),
- 4) 0,05'er gr (aspartik asit (A1701, AppliChem), histidin (A3738, AppliChem), isolösin (I7403, Sigma Aldrich), metiyonin (A1340, AppliChem), fenilalanin (A1344, AppliChem), prolin (A1707, AppliChem), serin (A1708, AppliChem), tirozin (02194759, MPBio, Yeni Zelanda), valin (V0513, Sigma Aldrich) tartılmıştır.

Ardından tartılan kimyasallar 800 mL'ye dH₂O ile tamamlanmış, manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak 121°C'de 20 dakika boyunca otoklavlanmıştır. Besiyerinin 200 mL'si agar yapımı için farklı bir şişeye ayrılmıştır. Otoklav sonunda agar için ayrılan şişeye karbon kaynağı olarak 0,22 µm şırınga ucu filtre ile filtre edilmiş 40 mL %10 rafinoz eklenmiş ve donması için bekletilmiştir. SC-U besiyeri olarak kullanılacak 600 mL sıvı soğuması için +4°C'ye kaldırılmış ve besiyerinde kullanılacak karbon kaynağı (Rafinoz) kullanım sırasında gerekli olan miktarda besiyerine eklenmiştir.

3.5 pYES2.1/ROP6 Plazmitinin Canlandırılan INVSc.1 Suşuna Transformasyonu

Bölüm 3.2’de izole edilen konsantrasyonu saptanan pYES2.1/ROP6 plazmitinin INVSc.1 suşuna transformasyonu S.c. EasyComp™ Transformation Kiti (K5050-01, Invitrogen, ABD) kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Kısaca bölüm 3.3’te; OD₆₀₀ değeri istenen aralığa gelen canlandırılmış INVSc.1 suşu oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 500×g’de (1500 rpm) santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda üst sıvı atılmış ve pellet üzerine kit içerisinde yer alan Solüsyon I eklenerek resüspanse edilmiştir. Ardından, karışım oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 500×g’de (1500 rpm) santrifüjlenmiştir. Süre sonunda üst sıvı atılmış ve pellet üzerine 1 mL Solüsyon II eklenerek resüspanse edilmiştir. Hücreler bu aşamada kompetent hale gelmiştir. Kit protokolünde yer alan öneriye uygun olarak pYES2.1/ROP6 plazmiti 1 µL içinde 1 µg, 2,5 µg ve 5 µg olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda seyreltilmiştir. Ardından seyreltilen plazmitlerden 1’er mL alınarak 50 µL hacimde kompetent haldeki maya hücresiyle karıştırılmış ve 3 farklı reaksiyon tüpü hazırlanmıştır. Bu karışımların üzerine oda sıcaklığında bulunan Solüsyon III’ten 500 µL eklenerek karıştırılmıştır. Reaksiyonlar, 1 saat boyunca 15 dakika aralıklarla vortekslenerek 30 °C’lik etüvde inkübe edilmiştir. Süre sonunda reaksiyon karışımlarından 100’er µL alınmış ve SC-U seçici agar plaklara ekim yapılarak 2-4 gün boyunca 30°C etüvde inkübe edilmiştir. 4. günün sonunda 1 µg, 2,5 µg ve 5 µg plazmit DNA bulunan plaklardan tek koloni seçimi yapılmış ve seçilen koloniler %10 rafinoz içeren 3 mL SC-U sıvı besiyerine ekilmiştir. Ardından 30°C’de 250 rpm’de çalkalanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda OD₆₀₀ değeri yaklaşık 3,5 olan üretimden 500 µL alınmış, 500 µL %30 gliserol ile karıştırılarak oluşturulan gliserol stok -80°C’de saklanmıştır.

3.6 Rekombinant ROP6 Protein Ekspresyonunun Belirlenmesi

Transforme edilen plazmitlerin maya hücrelerinde protein ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla küçük ölçekli üretim sonrası SDS-PAGE ve Western blot yapılmıştır.

3.6.1 Rekombinant ROP6 Proteininin *S. cerevisiae* INVSc.1 Suşunda Küçük Ölçekli Üretimi

Bölüm 3.5'te tarif edildiği gibi üretilen ve -80°C'de saklanan gliserol stoktan alınan az miktarda maya hücresi %10 rafinoz içeren 3 mL SC-U sıvı besiyerine ekilerek gece boyu 30°C'de 250 rpm'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda OD₆₀₀ değeri saptanmış 10 mL %10 rafinoz içeren besiyerinde 0.4 olacak şekilde seyreltme gerçekleştirilmiştir. Ardından hesaplanan miktar son hazim 10 mL besiyeri olacak şekilde ekilmiş ve gece boyu 30°C'de 250 rpm'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürün OD₆₀₀ değeri saptanmış ve 10 mL %10 rafinoz ve %20 galaktoz içeren SC-U indüksiyon besiyerinde OD₆₀₀ değeri 0.4 olacak şekilde seyreltme miktarı hesaplanmıştır. Hesaplanan miktar 2 mL tüpe alınarak +4°C'de 1500×g'de 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Ardından üst sıvı dökülmüş ve pellet üzerine 0,22 µm şırınga ucu filtre ile filtre sterilizasyonu yapılmış %20 galaktoz içeren SC-U indüksiyon ortamından 200 µL eklenerek resüspanse edilmiştir. Hazırlanan resüspanse hücre ortamı 10 mL SC-U indüksiyon ortamına eklenmiştir ve 30°C 250 rpm'de çalkalayıcı inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat boyunca maya hücrelerinde gerçekleşen protein üretiminin saptanması amacıyla 0., 12., 16. ve 24. saatlerde kültürden 1'er mL örnekler alınmıştır. Alınan örnekler 1500×g'de 5 dakika +4°C'de santrifüjlenmiştir. Ardından üst sıvı dökülmüş ve pellet üzerine 100 µL dH₂O eklenerek resüspanse edilmiştir. Sonrasında 14.000 rpm'de 30 saniye santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası üst sıvı atılmış ve pelletler üretilen proteinin saptanması amacıyla -80°C'de saklanmıştır.

3.6.2 Maya Hücre Duvarının Asitle Yıkanmış Cam Boncuklar ve Parçalama Tamponu ile Parçalanması

Bölüm 3.6.1'de tarif edildiği şekilde elde edilen pelletlere kit protokolüne uygun şekilde işlem gerçekleştirilmiştir. Kısaca; 0., 12., 16. ve 24. saatlerde toplanan pelletlerin parçalanması için öncelikle parçalama tamponu (50 mM sodyum fosfat (pH:7.4), 1 mM EDTA, %5 gliserol v/v ve 1 mM Fenilmetil Sülfonil Florür (PMSF) proteaz inhibitör) hazırlanmıştır. Maya hücrelerinin duvarının mekanik

parçalanmasında asitle yıkanmış 0.4-0.6 milimetre boyutunda cam boncuklar (G8772, Sigma Aldrich) kullanılmıştır.

Bu işlem sırasında öncelikle, -80°C 'de bulunan hücre pelletlerinin üzerine 100 μL parçalama tamponu eklenerek resüspanse edilmiştir. Ardından $1500\times g$ 5 dakika $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüjlenmiş ve üst sıvı dökülerek pellet üzerine pellet ile aynı hacimde asitle yıkanmış cam boncuklar eklenmiştir. Sonrasında, karışım 30 saniye vortekslenmiş ve 30 saniye buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem toplamda 4 kez tekrarlanmıştır. Sonrasında içlerinde asitle yıkanmış cam boncuklar bulunan örnek tüpleri 14.000 rpm 'de 10 dakika boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüjlenmiştir. Süre sonunda üst sıvılar yeni bir tüpe alınmış ve Western blot analizi ile rekombinant protein varlığının saptanması için -20°C 'de saklanmıştır.

3.6.3 SDS-PAGE ve Western Blot ile Rekombinant Protein Ekspresyonunun Belirlenmesi

Küçük ölçekli üretim sonucu elde edilen proteinler %12 SDS-PAGE ile araştırılmıştır. Öncelikle, alt jel (ayırıcı jel) sonrasında üst jel (yığıcı jel) hazırlanarak proteinlerin ağırlıklarına göre ayrıştırılması yapılmıştır.

%12'lik alt jelin hazırlanması: 4,2 ml dH_2O , 3 mL alt jel tamponu (1,5 M Tris-Cl pH 8,8 ve %0,4 SDS (w/v)), 4,8 mL %30 Akrilamid, 60 μL %10'luk Amonyum persülfat ve 12 μL tetramethylethylenediamine (TEMED) ile hazırlanmıştır. Elde edilen jel karışımı hızlıca kit (Bio-Rad) protokolüne bağlı şekilde 10 mm boşluk içeren camlar arasına pastör pipeti kullanılarak yüklenmiştir. Ardından, polimerizasyonun sağlanması amacıyla alt jelin üzerine 200 μL dH_2O eklenip oda sıcaklığında 20 dakika boyunca donması için beklenmiştir.

Yığıcı üst jelin hazırlanması: 3,6 mL dH_2O , 1,5 mL üst jel tamponu (0,5 M Tris-Cl pH 6,8 ve %0,4 SDS (w/v)), 0,804 mL akrilamid (%30), 30 μL %10'luk Amonyum persülfat ve 6 μL tetramethylethylenediamine (TEMED) ile karışım hazırlanmıştır ve pipet kullanılarak alt jel üzerine yüklenmiştir. Üst jelde kuyu oluşumunu sağlayan 1 mm kalınlığındaki taraklar üst jele yerleştirilerek jelin donması amacıyla 20-30 dakika beklenmiştir.

Polimerizasyon sonrası jellerde bulunan taraklar çıkartılmıştır. Ardından hazırlanan jeller üretici protokolüne uygun şekilde plastik hazneye yerleştirilmiştir. Sonrasında hazne içinde 2 jel için yeterli olacak seviyede yürütme tamponu (200 mM glisin, %0,05 SDS (w/v), 62,5 mM Tris) doldurulmuştur. Yükleme yapılacak rekombinant proteinler, örnek yükleme tamponu (%10'luk beta-merkaptotanol, %4'lük SDS, 125 mM Tris-Cl pH 6,8, %10'luk bromfenol mavisi ve %20'lik gliserol) ile 1:1 oranında karıştırılmış ve hazırlanan karışım 100°C'de 3 dakika bekletilmiştir. Sonrasında karışım, jeldeki kuyucuklara 25'er µL yüklenmiştir. Her jelin ilk kuyusuna ise 3 µL protein merdiveni (Thermo Fisher Scientific) yüklenmiştir. Örnekler ilk olarak 20 dakika boyunca 60 Volt ile daha sonra 100 Volt ile tank hizasında bulunan kısma kadar jelde yürütülmüştür.

Western blot testi için jelde ayrıştırılan proteinler polivinylidene difluoride (PVDF) transfer membranına, transfer tamponu (25 mM tris, 192 mM glisin, % 20 metanol ve distile su) kullanılarak transfer edilmiştir. Transfer, 1 saat boyunca 100 Volt şeklinde uygulanmıştır. Transfer sonunda PVDF membranlar plastik kaplara alınıp ve bloklama tamponunda [%6,25 yağsız süt tozu içeren 1×TBS-T tamponu içinde (20 mM Tris-HCl, 0,1 Tween, 20,5 M NaCl pH:7,8)] oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bloklamanın ardından bloklama tamponu içerisinde 1/1500 oranında sulandırılan fare kaynaklı Anti-Poly-His (#MA1-135, Invitrogen, ABD) 1. antikoru eklenmiş ve önce 90 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalanarak sonrasında +4°C'de gece boyu inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası membranlar 3 kez hızlı, 3 kez 3'er dakika beklemeli olarak 1×TBS-T tamponu kullanılarak yıkama yapılmıştır. Yıkamanın ardından 1×TBS-T içerisinde 1/2000 oranında sulandırılan anti-fare IgG alkalen fosfataz-konjuge 2. antikoru (Sigma-Aldrich) ile 1 saat çalkalanarak oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası membranlar 3 kez hızlı, 3 kez 3'er dakika beklemeli olarak 1×TBS-T tamponu ile hemen ardından 3 kez hızlı, 3 kez 3'er dakika beklemeli olarak 1×TBS tamponu ile yıkama yapılmıştır.

Son olarak, rekombinant proteinlerin saptanması amacıyla 250/2/1 oranlarında yapılan dietanolamin tamponu (%10 Dietanolamin, 4 M HCl pH:9,8, 0,5 mM MgCl₂·6H₂O), %70 Dimetilformamid içinde çözdürülen %4,3'lük BCIP hazırlanıp membranları kapatacak şekilde dökülerek karanlıkta yaklaşık 10 dk

bekletilmiştir. Sonrasında membranlar, distile su ile yıkanmış ve reaksiyon durdurulmuştur.

3.7 Rekombinant ROP6 Proteininin *S. cerevisiae* INVSc.1 Suşunda Büyük Ölçekli Üretimi

INVSc.1 suşuna transforme edilen ve Western blot analizi ile protein üretimi doğrulanan rekombinant proteinin büyük ölçekli üretimi sırasında öncelikle 3 mL %10 rafinoz içeren SC-U besiyerine pYES2.1/ROP6 içeren *S. cerevisiae* INVSc.1 Suşu gliserol stoğundan sürüntü ile ekim yapılmıştır. Ardından, kültür 30°C 250 rpm'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kültürün OD₆₀₀ değeri 3.12 olarak saptandığında 10 mL %10 rafinoz içeren SC-U besiyerinde OD₆₀₀ değeri 0.4 olacak şekilde seyreltme yapılmış ve 30°C 250 rpm'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kültürün OD₆₀₀ değeri 3.5 olarak saptandığında 50 mL %10 rafinoz içeren SC-U besiyerinde OD₆₀₀ değeri 0.4 olacak şekilde seyreltme yapılmış ve 30°C 250 rpm'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda OD₆₀₀ değeri 3.11 olarak saptandığında 50 mL hücrenin tamamı 1500×g'de 5 dakika +4°C'de santrifüjlenmiştir. Sonrasında üst sıvı dökülmüş ve pellet üzerine yaklaşık 20 mL %10 rafinoz ve %20 galaktoz içeren SC-U indüksiyon ortamı eklenerek pellet resüspanse edilmiştir. Ardından hücre karışımı, 2000 mL'lik darbeli cam erlen şişede bulunan %10 rafinoz ve %20 galaktoz içeren 400 mL SC-U indüksiyon ortamına eklenmiş ve 30°C 250 rpm'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 0., 12., 16. ve 24. saatlerinde kültürden yaklaşık 1,2 mL örnek alınarak bölüm 3.6.1'de anlatıldığı şekilde pelletler oluşturulmuş ve OD₆₀₀ değerleri kaydedilmiştir. İnkübasyonun 24. saatinde 12 adet 1,5 mL tüpe 1'er mL olacak şekilde besiyeri eklenmiş ve geri kalan tüm besiyeri 500 mL santrifüj tüpüne alınmıştır. Tüm tüpler 5000×g'de +4°C'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Ardından üst sıvılar dökülmüş ve pelletler -80°C'de saklanmıştır.

3.8 Maya Hücre Duvarının Parçalanması

Maya hücrelerinde büyük ölçekli üretim sonucu elde edilen rekombinant proteinlerin saflaştırılması amacıyla pelletler 4 farklı yöntemle parçalanmıştır.

Maya hücrelerinin parçalama yöntemi farklılıklarının etkisi SDS-PAGE ve Western blot yöntemiyle incelenmiştir.

3.8.1 Maya Hücre Duvarının Asitle Yıkanmış Cam Boncuklar ve EDTA İçermeyen Parçalama Tamponu ile Parçalanması

Büyük ölçekli üretim sonunda maya hücrelerinin parçalanması amacıyla bölüm 3.6.2'de tarif edildiği gibi asitle yıkanmış cam boncuklar ve EDTA içermeyen parçalama tamponu kullanılmıştır. Parçalama tamponundan immünojenik testleri ve saflaştırmayı etkilediği için EDTA çıkarılmıştır. Büyük ölçekli üretim sonunda elde edilen ve 1,5 mL tüpler içinde bulunan pelletlerin her birinin üzerine 100 µL EDTA içermeyen parçalama tamponu eklenerek resüspanse edilmiştir. Ardından 1500×g'de 5 dakika +4°C'de santrifüjlenmiş ve üst sıvı dökülerek pelletlerin üzerine aynı hacimde asitle yıkanmış cam boncuklar eklenmiştir. Daha sonra 1,5 mL tüpler Disruptor Genie (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazı kullanılarak +4°C'de hücrelerin mekanik parçalanması gerçekleştirilmiştir. Parçalanma süreci mikroskopta takip edilmiş ve maya hücrelerinin hücre çeperlerinin bozularak hücre içeriğinin dışarıya çıktığı saptanmıştır. Daha sonra hücre süspansiyonları 50 mL tüpe toplanarak 30.000×g'de 30 dakika boyunca +4°C'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası üst sıvı temiz bir şişeye alınarak 0,22 µm çapa sahip olan ve protein bağlama kapasitesi düşük filtreden (Corning, ABD) geçirilerek saflaştırma işlemi için -80°C'de saklanmıştır.

3.8.2 Maya Hücre Duvarının Sıvı Azot ile Parçalanması

Büyük ölçekli üretim sonunda maya hücre duvarlarının parçalanması amacıyla diğer bir yöntem olarak sıvı azot uygulaması tarif edildiği gibi gerçekleştirilmiştir (Dunn and Wobbe, 2001). Üretim sonunda elde edilen 15 gr ıslak pellet üzerine 10 mL soğuk steril dH₂O eklenerek macun kıvamı elde edilmiştir. 50 mL'lik ucu parafilm ile kapatılmış şırınga içerisine macun kıvamındaki pellet dökülmüştür. Paslanmaz çelik laboratuvar küveti içerisine 400 mL sıvı azot eklenmiş ve şırınga ucundaki parafilm çıkarılarak içerisinde bulunan pellet sıvı azota yavaşça akıtılmıştır. Sıvı azot içinde katılaştıran pellet, -20°C'de iyice soğutulmuş 1 litrelik paslanmaz çelik homojenizatör (Blender, Waring, ABD) içine

dökülmüş ve blender ile 2 dakika boyunca parçalama işlemi gerçekleştirilmiştir. Parçalama sırasında azalan azot pellet üzerini geçecek şekilde eklenmiş ve öğütme işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Öğütme işleminden sonra, maya pelleti toz haline gelmiş ve üzerine yaklaşık 30 mL resüspansiyon tamponu (50 mM Tris-Cl, 0,3 M NaCl, pH 7,5) eklenmiştir. Karışım santrifüj tüpüne alınarak 30.000×g ile 30 dakika boyunca +4°C’de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası üst sıvı temiz bir şişeye alınarak 0,22 µm çapa sahip olan ve protein bağlama kapasitesi düşük filtreden (Corning, ABD) geçirilmiştir. Sonrasında gerçekleştirilecek saflaştırma işlemi için -80°C’de saklanmıştır.

3.8.3 Maya Hücre Duvarının Microfluidizer ile Parçalanması

Büyük ölçekli üretim sonunda maya hücrelerinin parçalanması amacıyla diğer bir yöntem olarak maya hücrelerinin microfluidizer parçalanması firma protokolü önerilerine uygun şekilde gerçekleştirilmiştir (Santos et al., 2019). Bu amaçla Microfluidizer™ (M-110L, Microfluidics Pneumatic, ABD) cihazı ile H10Z Z tipi chamber firma talimatlarına uygun şekilde kullanılmıştır (Microfluidics, 2017). Kısaca; öncelikle cihaz giriş hava basıncı 115 psi (Pounds per Square Inch, İnçkare başına libre) ve işlem basıncı 15000 psi olacak şekilde ayarlanmıştır. Ardından cihaz üzerinde bulunan örnek yükleme haznesinden öncelikle steril dH₂O, ardından aynı hacimde resüspansiyon tamponu eklenerek geçirilmiştir. Cihazın kullanıma hazır hale gelmesinin ardından 33,25 gr hücre pelleti üzerine yaklaşık 15 mL resüspansiyon tamponu eklenerek homojen bir karışım olması amacıyla öncelikle 20 saniye vortekslenmiş sonrasında yaklaşık 1 dakika boyunca blender kullanılarak homojenizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen homojen karışım cihazın yükleme haznesine aktarılmış ve cihaz açılarak homojenat sistemden 30 kez geçirilmiştir. İşlemin 0, 10 ve 30 kez geçirilme adımlarında örnek alınarak mikroskop altında maya hücrelerinin parçalanma seviyeleri tespit edilmiştir. Ardından karışım santrifüj tüpüne alınarak 30.000×g ile 30 dakika boyunca +4°C’de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası üst sıvı temiz bir şişeye alınarak 0,22 µm çapa sahip olan ve protein bağlama kapasitesi düşük filtreden (Corning, ABD) geçirilmiştir. Sonrasında gerçekleştirilecek saflaştırma için -80°C’de saklanmıştır.

3.8.4 Maya Hücre Duvarının Y-PER™ Maya Protein Ekstraksiyon Reaktifi ile Parçalanması

Y-PER™ Maya Protein Ekstraksiyon Reaktifi kullanılarak parçalama işlemi üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirilmiştir (Pierce, ThermoScientific, ABD). Kısaca; üretim sonucu elde edilen 40 gr pellet üzerine protokole uygun şekilde hesaplanan 60 mL oda sıcaklığında Y-PER reaktifi eklenmiş ve sıvı homojen hale gelene kadar vortekslenmiştir. Ardından 20 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırıcı ile karıştırılarak inkübasyonu sağlanmıştır. Süre sonunda karışımdan örnek alınarak maya hücrelerinin parçalanma seviyeleri mikroskop altında tespit edilmiş ve ardından karışım 14,000×g'de 10 dakika boyunca +4°C'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası üst sıvı temiz bir şişeye alınarak 0,22 µm çapa sahip olan ve protein bağlama kapasitesi düşük filtreden (Corning, ABD) geçirilmiştir. Sonrasında gerçekleştirilecek saflaştırma için -80°C'de saklanmıştır.

3.9 Parçalanmış Maya Hücrelerinin Affinite Kromatografi ile Saflaştırılması

S. cerevisiae hücrelerinde üretilen rekombinant ROP6 proteininin affinite kromatografisi ile saflaştırılması sırasında ÄKTA Hızlı Protein Sıvı Kromatografi Cihazı (FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography) ve UNICORNTM isimli program kullanılmıştır (GE Health, ABD). Saflaştırma için bölüm 3.8'de elde edilen filtre edilmiş üst sıvı örnekleri ve 5 mL HiTrap Ni²⁺ şelasyon HP kolonu (Afinite kolonu, GE Health ABD) kullanılmıştır. Kısaca, 5 mL HiTrap Ni²⁺ şelasyon HP kolonu 5 kolon hacmi (1 kolon hacmi=5 mL) resüpsansiyon tamponu (0,3 M NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 7,5) ile dengelenmiştir. Daha sonra kolona örnek yükleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnek yükleme işleminden sonra kolon tekrar 5 kolon hacmi resüpsansiyon tamponu ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası kolon, rekombinant proteinleri serbest bırakılmasını sağlamak için yıkama tamponunda bulunan imidazol miktarı 62,5 mM'dan başlayarak 125 mM, 375 mM ve 500 mM'a kadar adım adım yükseltilmiş ve kolondan serbestleşen rekombinant proteinlerin oluşturduğu pikler UV 280 mAU ile görüntülenerek toplanmıştır. Her pikten elde edilen proteinler 10 kDa (MWCO) por çapına sahip santrifüj filtreleri (Microcon, Amicon) ve Vivaspin 20 (Sartorius, Almanya) kullanılarak, sırasıyla 12.300×g'de ve 5000×g'de +4°C'de konsantre edilmiştir. Örneklerin protein konsantrasyonu

Bradford metodu ve seri sulandırılmış BSA kullanılarak ölçülmüştür. İşlem kit protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir (1856210, ThermoScientific). Kısaca; seri sulandırma ile hazırlanan BSA konsantrasyonları ile standart eğri grafiği oluşturulmuş ve parçalama işlemleri sonucu elde edilen proteinlerin konsantrasyonları tespit edilmiştir. Ardından proteinler bölüm 3.6.3'te anlatıldığı gibi %12'lik SDS-PAGE ve Western blot ile görüntülenmiştir.



4. BULGULAR

4.1 ROP6 Proteininin Biyoinformatik Analizi

Rekombinant ROP6 protein aşısı formülasyonunda kullanılmak üzere ToxoDB adresinden TGME49_258660 numarası ile proteine ait 1443 baz çifti uzunluğundaki DNA sekansı alınmıştır (Çizelge 4.1 A). Expaty translasyon programı ile DNA sekansı aa sekansına çevrilmiştir (Çizelge 4.1 B).

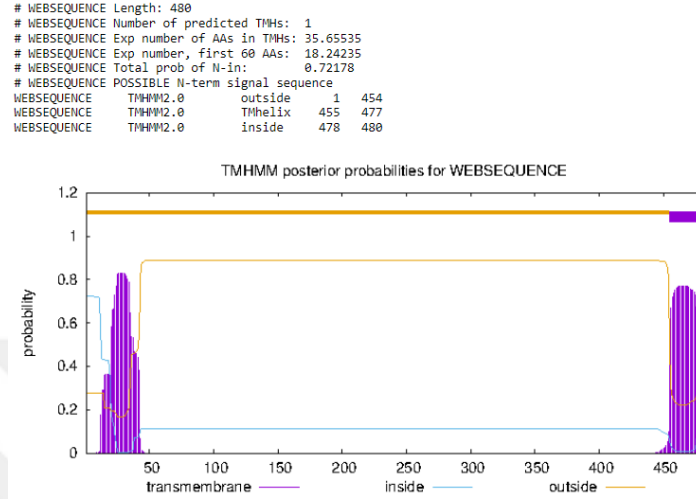
Çizelge 4.1 A *Toxoplasma gondii* ROP6 proteinini tam gen bölgesi

<i>Toxoplasma gondii</i> ROP6 proteinine ait DNA sekansı (1443 baz çifti)
ATGAGGAGCTCAGTAGGGCAGTCTCGTCTGCCGCTCAAGTTTTTTCCTTGCGCCGTTCTCGGTGA AAAATTCGGTTTTTCGCCCTCTTTTTTCGTGTTTCGCTCTTGTCTGCGTCTCCGGTCTGTCTTGGGA AGATGCTGAGGACGGCGCAGCGTGGGACTCAGTCTCGAACGATTCGGACGACAGCTTCGCGAAA GGTCTGACTTCGGGGAAGTCAAGTTGGGCAGCGCAGGCCAACGGCAGCTCCTCAGTCAGTCC AGAACGAGTTGGGCGGTGAATTCGAGGACGCAGACGTGAGTATGCTCCAGAGGGATCACGGAAT CCACGGAGAGGAAGCCGTTTTGTTCCGCAAGGCTGTTCCGGGCTTGGACGACCCAGCTGAAGAC GATGAAGCCGACGGCGAAAGTGCCTCGGATGAGGCAGAAGCCGACTCTGACGTCTTGGCGGACG ACGAAGAAGGGACATCCCTCATCGAAAATGCGAGTGAGGAAGACACAGACAACCTCCGAGGCAGA CAGTCAACAGGAGGATGACAGTGTGGGAGAGGATTCTTTTCTCCAGCAGGAGGGCGAGGACTCC GAGGAAGAAAGAGCAGTCGAGGACCCGTATGCTGCCGCCGAACCTCTTATCTTGAAGAGGACA ACACTGTTGACGACAGCGCGGCGGAGGATTATGCCCTGCTTCGTTTGTCCAGATCGGCAGTGG AGAGAGAAAAATCCGGGCGCACATGCATCTTGACAGCCGCAAGTTGCCCCGAAAGATTTCGG CATGCGTTCAACCAGGATCATGTCAGACTTCTGGACCAGACCGCCGTCGAGGACGAACCTTCTCG ATGAGGCCGCCCGGGCGGAGGCGCGAGCGCCGTAGTCTCCCCATCGACGAAAACCTGCAGA GATGGAAGCACCATCTCCGAGGGCGAAGCAGGTTCTGCGGTGGCGGCTCCTGAACAAGGTATC CAGCCAGAGGCAGAATTTGCTACCGCCAGCGAAGAACCACGTCCCCTGGAACCTGTGACCCCCG AAATGGCAGCTCAGCAGCCGCAACTGCCTCAAGAAGCTATGCCAACTGAGAATGCGGACCTTCT TGGAACCAGCCCAGAATGCGCAATGCTCTCGAACCTCTGCCAAGGTCCTCGAACCGGAAACC CTGGAAGGTCACCTGCTCTCGTCCCGCCGGCAGAGACTGAAGAGGGGACAGCCGCCAAATTG CGGAGGAAATGAGCAAGCAGGATCAGGGCATGCAGGAAGCCAGGCCTCAAGAAGTTCTCACACG ACACACCTGGCAAGATATGGAGAGAAGTGAAGACTACGAAAGAACGACGTCCCGGCTGCAGTG GCGAATTCGGCAGCCAGATCATCACGGCTGCGTCCGCTCGCCCTTGCTGGTCTACTGGTCCG CAGGACAGCTTTTTGTTTCAGCGTGGGCATGTACTGA

Çizelge 4.1 B ROP6 proteinine ait DNA sekansının protein sekansına çevrimi ile elde edilen sekans

ROP6 proteinine ait amino asit sekansı (480 aa , 51.4 kDa)
MRSSVQSRLPLKFFLAPFSVKNVFFVFFALVSVGLSWEDAEDGAAWDSVSNDSDDSDFAK GSDFGVQLGSAGQRQLLSQLQNELGGFEFEDADVSMQLQRDHGIHGEEAGLFRKAVPGLDDPAED DEADGESASDEAEADSDVLADDEEGTSLIENASEEDTDNSEADSQQEDDSVGEDSFLQQEGEDS EERAVEDPYAAAEPYLEDNTVDDSAEYAPASFVQIGSGERKIRAHMHLDSRQVAPERFA HAFNQDHVRLLDQTAVEDELLDEAAPGGGASAVVSPIDENPAEMESTISEGEAGSAVAAPQGI QPEAEFATASEEPRPLEPVDPEMAAQPPQLPQAMPTENADLLGNQPRMRNALEPSAKVLEPET LEGSPALVPPAETEEGTAAQIAEEMSKQDQGMQEARPQEVLTRHTWQDMERTEDLRKNDVPAAV ANSGSQIITAASSVALAGLLVAGQLLFSVGMV

Sonrasında, TMHMM-2.0 programı ile proteine ait hücre içi, transmembran ve hücre dışı alanlar tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Transmembran (455-477 aa) ve hücre içi (478-480 aa) kısımları atıldıktan sonra 454 amino asitlik hücre dışı kısım üzerinde antijen tasarımı yapma üzere epitop analizi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.1 TMHMM-2.0 programı kullanılarak tespit edilen proteine ait hücre içi, transmembran ve hücre dışı alanlar

ROP6 proteinine ait 454 aa'lık bölge içinde yer alan antijenik MHC-I ve MHC-II hücre epitopları IEDB programı kullanılarak, B hücre epitopları SWMTrip isimli program ile tespit edilmiştir. Bu analiz sonucuna göre 5 adet MHC-I epitopu (Çizelge 4.2 A), 2 adet MHC-II epitopu (Çizelge 4.2 B) ve 5 adet B hücre epitopu (Çizelge 4.2 C) saptanmıştır. Saptanan tüm epitoplar ROP6 proteini üzerinde gösterilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.2 A MHC-I epitopları

Allel	#	Başlangıç	Bitiş	Uzunluk	Peptit	IC50	Yüzelik Derece
HLA-B*15:01	1	10	19	10	LPLKFFLAPF	12.55	0.06
HLA-A*02:01	1	26	35	10	FALFFVFALV	21.16	0.19
HLA-B*15:01	1	84	93	10	QLQNELGGEF	28.77	0.14
HLA-B*40:01	1	91	100	10	GEFEDADVSM	31.27	0.08
HLA-B*15:01	1	20	29	10	SVKNSVFALF	41.02	0.22

Çizelge 4.2 B MHC-II epitopları

Allel	Başlangıç	Bitiş	Uzunluk	Çekirdek dizi	Peptit	IC50	Derece
HLA-DRB 5*01:01	227	240	14	FVQIGSGER	ASFVQIGSGERKIR	48.33	0.36
HLA-DRB1*15:01	9	22	14	LKFFLAPFS	RLPLKFFLAPFSVK	49.68	0.39

Çizelge 4.2 C B hücre epitopları

Derece	Konum	Epitop	Skor	Tavsiye edilen*
1	102 - 121	QRDHGIHGEEAGLFRKAVPG	0.586	
2	71 - 90	VKLSAGQRQLLSQLQNELG	0.582	
3	133 - 152	GESASDEAEADSDVLADDEE	0.565	
4	261 - 280	QDHVRLLDQTAVEDELLDEA	1.000	
5	398 - 417	EEGTAAQIAEEMSKQDQGMQ	0.635	

Çizelge 4.3 ROP6 proteini üzerinde bulunan MHC-I, II ve B hücre epitopları ve N ve O glikozilasyon bölgelerinin gösterilmesi

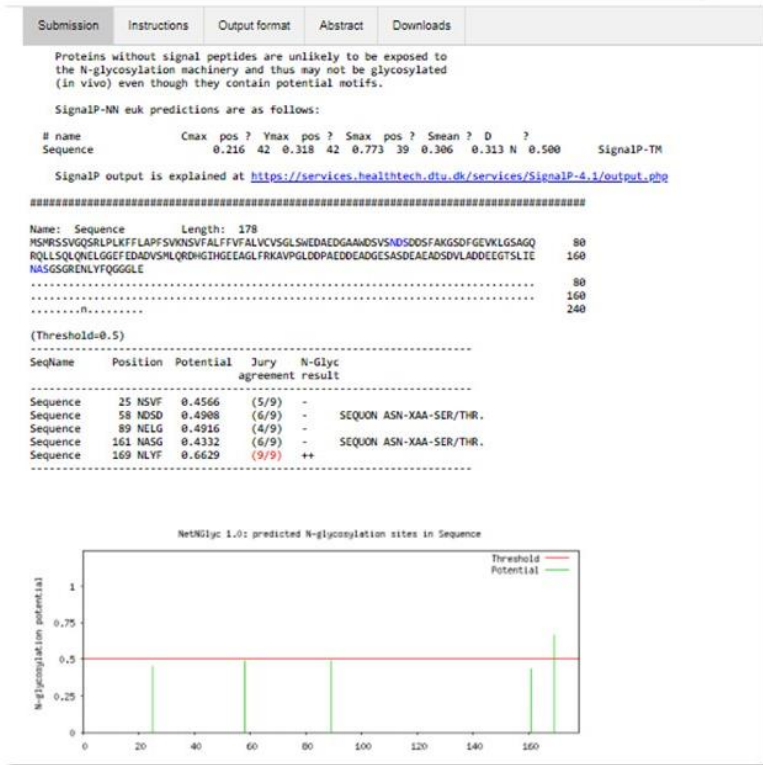
ROP6 proteinine ait amino asit sekansı (454 aa)
MRSSVGQS RlplkfflapfsvknsvfalfvfvfalyCVSGLSWEDAEDGAAWDSVSNDSDDSFAGK GSDFGEVKLSAGQRQLLSqlqnelggefadvsmLQRDHGIHGEEAGLFRKAVPGLDDPAED DEADGESASDEAEADSDVLADDEEGTSLIENASEEDTDNSEADSQQEDDSVGEDSFLQQEGEDS EEERAVEDPYAAAEPSTLEEDNTVDDSAAEADYAPASFVQIGSGERKIRAHMHLDNRQVAPERFA HAFNQDHVRLLDQTAVEDELLDEAAPGGGASAVVSPIDENPAEMESTISEGEAGSAVAAPQGI QPEAEFATASEEPRPLEPVDPEMAAQQPQLPQEAMPTENADLLGNQPRMRNALEPSAKVLEPET LEGSPALVPPAETEEGTAAQIAEEMSKQDQGMQEARPQEVLRHTWQDMERTEDLRKNDVPAAV ANSGSQ

Altı çizili bölgeler B hücre epitopudur.

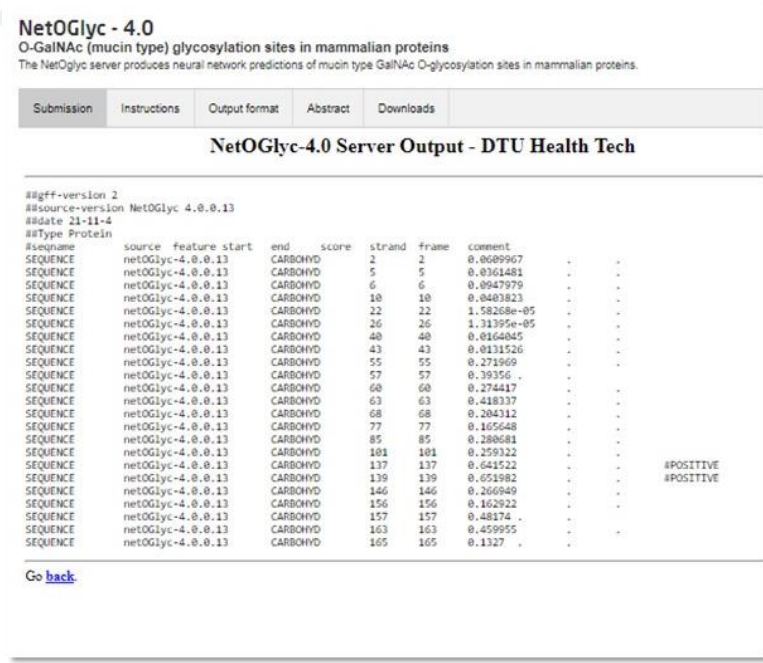
Yeşil işaretli bölgeler T hücre epitopudur. Küçük harfler MHC-I epitoplarını, yeşil ve italik olan bölgeler MHC-II epitop bölgelerini göstermektedir.

Mor işaretli kısımlar N glikozilasyon, Kırmızı harfler O glikozilasyon bölgelerini göstermektedir.

ROP6 proteini yapısında yer alan N glikozilasyon bölgeleri NetNGlyc 1.0 programı (Şekil 4.2), O glikozilasyon bölgeleri ise NetOGlyc 4.0 programı (Şekil 4.3) ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 2 adet O ve 2 adet N glikozilasyon bölgesi saptanmıştır (Çizelge 4.3).



Şekil 4.2 ROP6 proteinine ait N glikozilasyon bölgeleri



Şekil 4.3 ROP6 proteinine ait O glikozilasyon bölgeleri

Bu analizler sonrasında gerçekleştirilen Expsy ProtParam analizi sonucunda ROP6 proteininin 454 amino asit uzunluğundaki hücre dışı kısmının stabil olmadığı tespit edilmiştir. Stabil olmayan proteinler ekspresyon sistemlerinde saflaştırma sonrası kolaylıkla yıkılabildiklerinden protein stabil olacak şekilde kısaltılmış, stabiliteyi arttırmak için Kozak sekansı sonrasına Valin (V) aa'i eklenmiştir. Sonrasında Expsy ProtParam programı ile ROP6 proteininin stabil olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.4).

```

Estimated half-life:
The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
                          >20 hours (yeast, in vivo).
                          >10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:
The instability index (II) is computed to be 34.26
This classifies the protein as stable.

```

Şekil 4.4 Expsy Protparam programı ile stabil olduğu saptanan ROP6 proteini

Kısaltılmış olan ROP6 proteininin VaxiJen programı ile antijenik olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5).

```

Your Sequence:
MRSSVGQSRLLPLKFFLAPFSVKNSVFFALFFV
FALVCVSGLSWEDAEDGAAWDSVSNDSDDSF
AKGSDFGFEVKLGSAGQRQLLSQLQNELGGEF
EDADVSMQLQRDHGIGHGEEAGLFRKAVPGLDD
PAEDDEADGESASDEAEADSDVLADDEEGTS
LI

Overall Prediction for the Protective Antigen = 0.5992 ( Probable ANTIGEN )

```

Şekil 4.5 VaxiJen programı ile antijen olduğu saptanan protein

Biyoinformatik analizleri gerçekleştirilen ve stabil hale getirilmiş ROP6 proteinine Bölüm 3.1'de anlatıldığı restriksiyon enzimleri, maya özgülü kozak sekansı ve linker (bağlayıcı) TEV proteaz bölgesi eklenerek *S. cerevisiae* hücrelerine uygun olacak şekilde kodon optimizasyonu yapılmıştır. Bu bölge pYES2.1/V5-His TOPO vektörüne çerçeve içi (inframe) olarak eklenerek 627 baz çifti uzunluğunda ORF oluşturulmuştur.

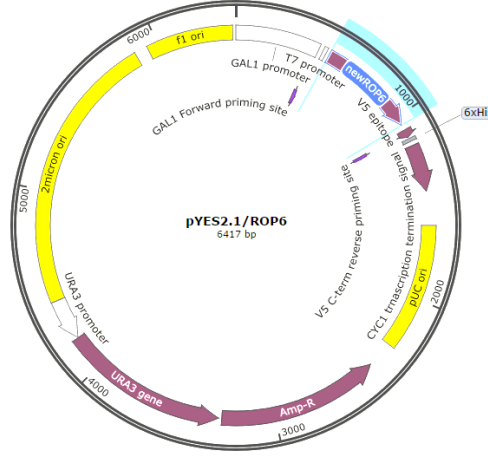
Tasarım yapılan ROP6 proteini GeneArt Gene Synthesis (Thermo Fisher Scientific, ABD) hizmet alımı ile pYES2.1/V5-His TOPO plazmitine klonlanmıştır. ROP6 protein sekansının plazmit içindeki görünümü Çizelge 4.4'te gösterilmektedir. Buna ek olarak, pYES2.1/V5-His TOPO plazmiti içinde bulunan ROP6 proteininin plazmit haritası (SnapGene programı kullanılarak) Şekil 4.6'da gösterilmektedir.

Çizelge 4.4 pYES2.1/V5-His TOPO plazmiti içinde yer alan ROP6 proteini

pYES2.1/ROP6 DNA sekansı (6417 baz çifti)	
KIRMIZI:	HindIII enzimi
YESİL:	Mayaya Özgü Kozak Sekansı
SARI:	VALİN
PEMBE-GRİ-PEMBE:	Linker, TEV proteaz ve linker
MAVİ:	XhoI enzimi
TURKUVAZ:	V5 Bölgesi
KOYU KIRMIZI:	Histidin sekansı
AÇIK GRİ:	Durdurma kodonu
<p>ACGGATTAGAAGCCGCCGAGCGGGTGACAGCCCTCCGAAGGAAGACTCTCCTCCGTGCGTCCTC GTCTTACACCGGTCGCGTTTCTGAAACGCAGATGTGCCTCGCGCCGCACTGCTCCGAACAATAAA GATTCTACAATACTAGCTTTTATGGTTATGAAGAGGAAAAATTGGCAGTAACCTGGCCCCACAA ACCTTCAAATGAACGAATCAAATTAACAACCATAGGATGATAATGCGATTAGTTTTTTTAGCCTT ATTTCTGGGGTAATTAATCAGCGAAGCGATGATTTTTGATCTATTAACAGATATATAAATGCAA AAACTGCATAACCACTTTAACTAATACTTTCAACATTTTTCGGTTTGTATTACTTCTTATTCAAA TGTAATAAAAAGTATCAACAAAAAATGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAA ACCCCGATCGGACTACTAGCAGCTGTAATACGACTACTATAGGGAATATTAAGCTCGCCCTT AAGCTTAAAAAAATGTCCTCAGATCCTCCGTTGGTCAATCAAGATTGCCATTGAAATTTTTCT TGGCCCCATTCTCCGTTAAGAACTCTGTTTTTGGCTCTGTTCTTCGTTTTTCGTTTTGGTTTTGT TTCTGGTTTTGTCTTGGGAAGATGCTGAAGATGGTGCTGCTTGGGATTCTGTTTCTAATGATTCT GATGATTCTTCGCCAAGGGTTCTGATTTTTGGTGAAGTTAAGTTGGGTTCTGCTGGTCAAAGAC AATTGCTATCTCAATTGCAAAACGAACTAGGTGGTGAATTTGAAGATGCCGATGTTTCTATGTT GCAACGTGATCATGGTATCCATGGTGAAGAAGCTGGTTTTGTTTAGAAAAGCTGTTCCAGGTTT GATGATCCAGCCGAAGATGATGAAGCTGATGGTGAATCTGCTTCTGATGAAGCCGAAGCTGATT CAGATGTTTTGGCTGATGACGAAGAAGTACTTCTTTGATTGGTCTGGTAGGGAAAACCTGTA CTTTCAAGGTGGTGGTGGACTCGAGAAGGGCGAGCTTCGAGGTCACCCATTCTGAAGGTAAGCCT ATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCAGTCATCATCACCATCACCATGAG TTTCTAGAGGGCCGCATCATGTAATTAGTTATGTACAGCTTACATTCACGCCCTCCCCCACAT CCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTTAT AGTTATGTTAGTATTAAGAAGCTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTTTCTGTACAGACGC GTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTT TAATTTGCAAGCTGCGGCCCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGTTTTGCGT ATTGGGCGCTCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGTTCGGGCGAG CGGTATGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAA GAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTT TTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAA ACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGT TCCGACCCTGCGGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCT CATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGC ACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCC GGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTAT GTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTAT TTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGG CAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAA AAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAAC</p>	

CACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA
AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGC
TTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCC
CCGTGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATAACC
GCGAGACCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAG
CGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTA
GAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGC GCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGT
GTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATT CAGTCCGGTTC CCAACGATCAAGGCGAGTTACA
TGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGTCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTA
AGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAAATCTCTTACTGTCATGCC
ATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATG
CGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAAATACCGCGCCACATAGCAGAACTT
TAAAAGTGCTCATCATTGGA AACGTTCTTCCGGGGCGAAA ACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTT
GAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACC
AGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACAC
GGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATGGGTAATAACTGATATAATTAATTGAA
GCTCTAATTTGTGAGTTTAGTATACATGCATTTACTTATAATACAGTTTTTTAGTTTTGCTGGC
CGCATCTTCTCAAATATGCTTCC CAGCCTGCTTTTTCTGTAACGTTACCCCTCTACCTTAGCATC
CCTTCCCTTTGCAAATAGTCTCTTCCAACAATAATAATGTCAGATCCTGTAGAGACCACATCA
TCCACGGTCTATACTGTTGACCCAATGCGTCTCCCTTGTCATCTAAACCCACACCGGGTGTCA
TAATCAACCAATCGTAACCTTCATCTCTTCCACCCATGTCTCTTTGAGCAATAAAGCCGATAAC
AAAATCTTTGTGCTCTTTCGCAATGTCAACAGTACCCTTAGTATATTTCTCCAGTAGATAGGGAG
CCCTTG CATGACAATTCTGCTAACATCAAAAGGCCTCTAGGTTCCCTTTGTTACTTCTTCTGCCG
CCTGCTTCAAACCGCTAACAAATACCTGGGCCCACCACACCGTGTGCATTTCGTAATGTCTGCCCA
TTCTGCTATTTCTGTATACACCCGCAGAGTACTGCAATTTGACTGTATTACCAATGT CAGCAAAAT
TTTCTGTCTTTCGAAGAGTAAAAAATTTGACTTTGGCGGATAATGCCTTTAGCCGGCTTAACGTGC
CCTCCATGGAAAAATCAGTCAAGATATCCACATGTGTTTTTAGTAACA AATTTTGGACCTAA
TGCTTCAACTAACTCCAGTAATTCCTTGGTGGTACGAACATCCAATGAAGCACACAAGTTTGT
TGCTTTTCGTGCATGATATTAATAGCTTGGCAGCAACAGGACTAGGATGAGTAGCAGCACGTT
CCTTATATGTAGCTTTTCGACATGATTTATCTTTCGTTTTCTGCAGGTTTTTGTCTGTGCAGTTG
GGTTAAGAATACTGGGCAATTTTCATGTTTCTTCAACACTACATATGCGTATATATAACCAATCTA
AGTCTGTGCTCCTTCCCTCGTTCTTCTTCTGTTTCGGAGATTACCGAATCAAAAAAATTTCAAG
GAAACCGAAATCAAAAAAAGAATAAAAAA AATGATGAATTGAAAAGCTAGCTTATCGATGA
TAAGCTGTCAAACATGAGAATTAATTCACGGACTATAGACTATACTTAGTATACTCCGCTAC
TGTACGATACACTTCCGCTCAGGTCCTTGTCTTTAACGAGGCCTTACC ACTCTTTTGTACTC
TATTGATCCAGCTCAGCAAAGGCAGTGTGATCTAAGATTCTATCTTCGCGATGTAGTAAACTA
GCTAGACCGAGAAAGAGACTAGAAATGCAAAAGGC ACTTCTACAATGGCTGCCATCATTATTAT
CCGATGTGACGCTGCAGCTTCTCAATGATATTCGAATACGCTTTGAGGAGATACAGCCTAATAT
CCGACAAACTGTTTTACAGATTTACGATCGTACTTGT TACCCATCATTGAATTTTTGAACATCCG
AACCTGGGAGTTTTCCCTGAAACAGATAGTATATTTGAACCTGTATAATAATATATAGTCTAGC
GCTTTACGGAAGACAATGTATGTATTTTCGTTTCTGGAGAACTATTGCATCTATTGCATAGGT
AATCTTGACGTCGCATCCCCGGTTCATTTTCTGCGTTTCCATCTTGC ACTTCAATAGCATATC
TTTGTAAACGAAGCATCTGTGCTTCATTTTGTAGAACAAAAATGCAACGCGAGAGCGCTAATTTT
TCAAACAAGAATCTGAGCTGCATTTTTTACAGAACAGAAATGCAACGCGAAAGCGCTAATTTT
CCAACGAAGAATCTGTGCTTCATTTTTGTAAAACAAAAATGCAACGCGAGAGCGCTAATTTTTT
AAACAAAGAATCTGAGCTGCATTTTTTACAGAACAGAAATGCAACGCGAGAGCGCTAATTTTACCA
ACAAAGAATCTATACTTCTTTTTTGTCTACAAAATGCATCCCGAGAGCGCTAATTTTTCTAAC
AAAGCATCTTAGATTACTTTTTTTCTCCTTTGTGCGCTCTATAATGCAGTCTCTTGATAACTTT
TTGC ACTGTAGGTCGGTTAAGGTTAGAAGAAGGCTACTTTGGTGTCTATTTTCTCTTCCATAAA
AAAAGCCTGACTCCACTTCCC GCTTTACTGATTACTAGCGAAGCTGCGGGTGCATTTTTTCAA
GATAAAGGCATCCCCGATTATATTCTATACCGATGTGGATTGCGCATACTTTGTGAACAGAAAG
TGATAGCGTTGATGATTCTT CATTGGTCAGAAAATTATGAACGGTTTCTTCTATTTTGTCTCTA
TATACTACGTATAGGAAATGTTTACATTTTTCGATTGTTTTTCGATTC ACTCTATGAATAGTTCT
TACTACAATTTTTTTGTCTAAAGAGTAATACTAGAGATAAACATAAAAAAATGTAGAGGTCGAGT
TTAGATGCAAGTTCAAGGAGCGAAAGGTGGATGGGTAGGTTATATAGGGATATAGCACAGAGAT
ATATAGCAAAGAGATACTTTTTGAGCAATGTTTGTGGAAGCGGTATTTCGCAATGGGAAGCTCCAC
CCCGTTGATAATCAGAAAAGCCCCAAAAACAGGAAGATTGTATAAGCAAATATTTAAATTTGTA
AACGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAAACGAAT
AGCCCCAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTG
TCCAGTTTCCAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAAGG
GTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCCGAGGT

GCCGTAAAGCAGTAAATCGGAAGGGTAAACGGATGCCCCATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCC
 GGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGGGCTAGGGCGGTGGGAAGT
 GTAGGGGTCACGCTGGGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGGGGCGCTACAGGGCGCGT
 GGGGATGATCCACTAGT



Şekil 4.6 pYES2.1/ROP6 plazmit haritası

pYES2.1/V5-His TOPO plazmiti içinde başlangıç ve sonlandırma kodonları arasında yer alan 208 amino asitlik protein sekansı Çizelge 4.5'te gösterilmektedir.

Çizelge 4.5 Plazmit içinde başlangıç ve sonlandırma sekansları arasında yer alan ROP6 proteini

pYES2.1/V5-His TOPO plazmitinde başlangıç ve sonlandırma sekansları arasında sentezlenecek ROP6 proteini (208 amino asit) (22.3 kDa)

MSVRSSVGQS **Rlpkfflapfsvknsvfalfv** **CVSGLSWEDAEDGAAWDSVS** **NDS** **DDSF**
 AKGSDFGE **VKLGSAQRQLLSqlqnelggedadvsm** **LQRDHGIHGEEAGLFRKAVPG** **LDDPA**
 EDDEAD **GESASDEAEADSDV** **LADDEE** **GTSLI** **SGRENLYFQGGGLE** **KGELRGHPFE** **GKPIPNP**
LLGLDST **RTG** **HHHHH** -

Altı çizili bölgeler B hücre epitopudur.

Yeşil işaretli bölgeler T hücre epitopudur. Küçük harfler MHC-I epitoplarını, yeşil ve italik olan bölgeler MHC-II epitop bölgelerini göstermektedir.

Mor işaretli kısım N glikozilasyon, kırmızı harfler O glikozilasyon bölgelerini göstermektedir.

Turkuaz ile işaretli alan V5 bölgesini, Pembe-Gri-Pembe ile işaretli alan linker-TEV-linker bölgesini, Mavi ile işaretli alan XhoI enzimini, Koyu kırmızı işaretli alan 6xHis etiketini göstermektedir.

Yapılan tasarımın ardından *S. cerevisiae* INVSc.1 maya hücrelerinde üretilecek proteinin çözünürlüğü (Şekil 4.7), stabilitesi (Şekil 4.8) ve alerjen olmadığı (Şekil 4.9) saptanmıştır. Son olarak, proteinin üç boyutlu görünümü I-TASSER programı ile elde edilmiştir (Şekil 4.10).

Name: temp_prot

Amino Acids:
 MSVRSSVGSRLPLKFFLAPFVSVKNSVFALFFVFALVCVSGLSMEDAEDGAAWDSVNSDSDSFAKGSDFGEVKLGSAGQRQLLSQLQNELGGFEFEDADVSMLQRDHGIGHGEEAGLFRKA
 VPGLDPAEDDEADGESASDEAEADSDVLADDEEGTSLIGSGRENLYFQGGGGLKGLERGHFPFEGKPIPNIPLGLDSTRTGHIIHHH

Predicted Solubility upon Overexpression:
 SOLUBLE with probability 0.595539

Şekil 4.7 Çözünür ROP6 proteini

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
 >20 hours (yeast, in vivo).
 >10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 34.26
 This classifies the protein as stable.

Şekil 4.8 Stabil ROP6 proteini

Name of sequence	Job5
Length of Sequence	208
Predicted On	Thu Jun 1 01:13:19 2023

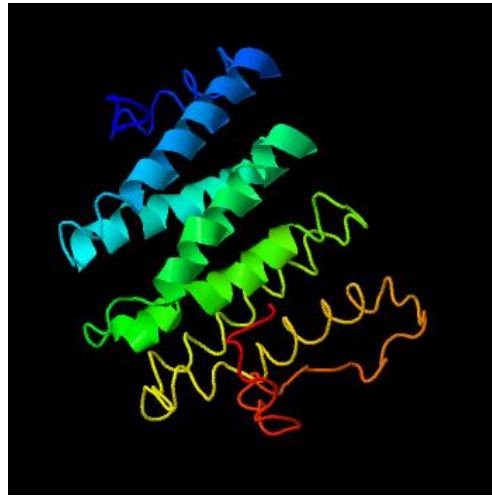
Prediction by SVM method based on amino acid composition

NON ALLERGEN

Score=-0.47461515 [Threshold=-0.4]

Positive Predictive Value=18.21% Negative Predictive Value=71.24%

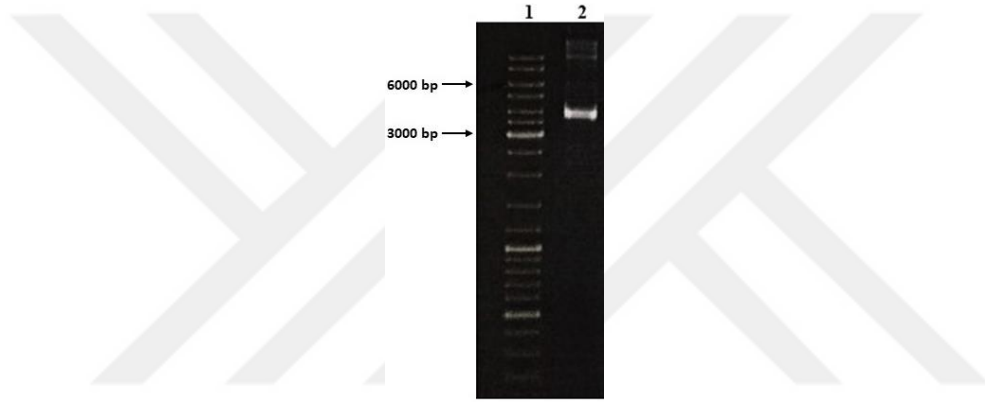
Şekil 4.9 Alerjen olmayan ROP6 proteini



Şekil 4.10 ROP6 proteininin üç boyutlu görünümü

4.2 pYES2.1/ROP6 Plazmitinin *E. coli* TOP10 Hücrelerine Transformasyonu ve Saflaştırma Sonucu Agaroz Jel Elektrofrezini ile Görüntülenmesi

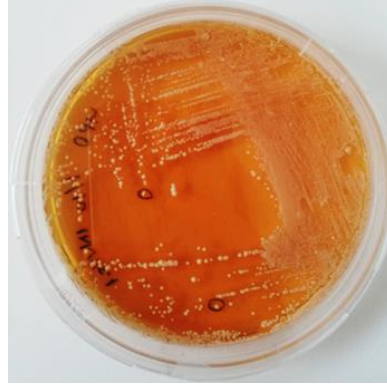
Tasarlanan ROP6 proteinini içeren pYES2.1 plazmitinin sentetik olarak temin edilmesinin ardından *E. coli* TOP10 hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Transforme edilen hücrelerin üretimi sonrası plazmit saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. 6417 baz çifti uzunluğundaki pYES2.1/ROP6 plazmitinin boyutu %1 agaroz jel elektrofrezini ile Şekil 4.11’de gösterildiği gibi saptanmıştır. Plazmitin süpersarmal (supercoil) formunda bulunması nedeniyle 6000 baz çiftinin altında gözlemlenmektedir.



Şekil 4.11 Saflaştırılan plazmitin agaroz jel elektrofrezinde görüntülenmesi, 1. Sütun: DNA Merdiveni, 2. Sütun: pYES2.1/ROP6 plazmiti

4.3 *S. cerevisiae* INVSc.1 Suşunun Canlandırılması

Ticari olarak satın alınan INVSc.1 maya suşunun YPD besiyerinde 28°C 250 rpm’de gece boyu üretiminin ardından maya hücreleri 1/10 ve 1/100 seyreltmeler yapılarak YPD agar plaklara çizgi ekim gerçekleştirilmiştir. Plakların 30°C’de 2 gün inkübasyonu sonunda Şekil 4.12’de gösterilen maya kolonileri saptanmıştır.

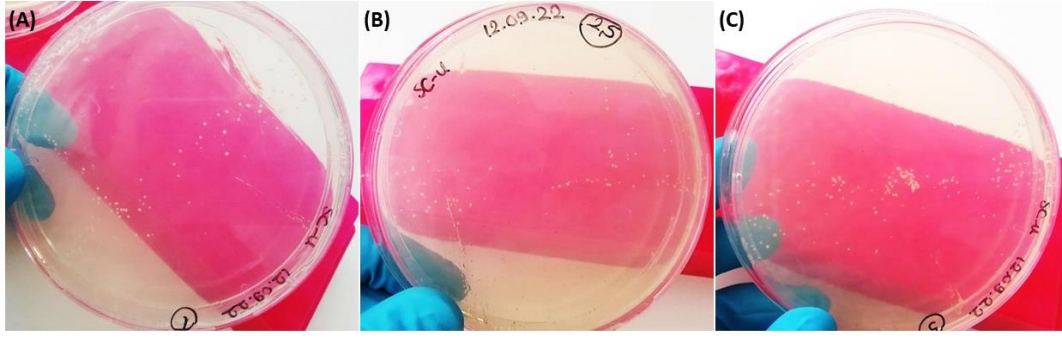


Şekil 4.12 YPD agar plaklarda gözlenen maya kolonileri

Agar plaklardan tek koloniler seçilmiş ve 3 mL YPD besiyerine ekilmiştir. Ardından 28°C 250 rpm’de inkübatörde gece boyu inkübasyona bırakılmıştır (İnkübasyon sonunda kültürün OD₆₀₀ değeri 3.0-5.0 aralığında olması gerekmektedir). OD₆₀₀ değeri 3,84 olarak saptanan kültür 10 mL YPD besiyerinde OD₆₀₀ değeri 0.2-0.4 olacak şekilde tekrar seyreltilmiştir. Kültürün OD₆₀₀ değerinin 3-6 saat aralığında 0.6-1.0 olması için 28°C 250 rpm’de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Kültürün yaklaşık 5. saatinde OD₆₀₀ değeri 1.1 olarak saptanmış ve INVSc.1 maya suşunun canlandırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Üretim sonunda taze kültürden 500 µL alınmış, 500 µL %30 gliserol ile karıştırılarak -80°C’de saklanmak üzere laboratuvar stoğu oluşturulmuştur.

4.4 pYES2.1/ROP6 Plazmitinin INVSc.1 Suşuna Transformasyonu

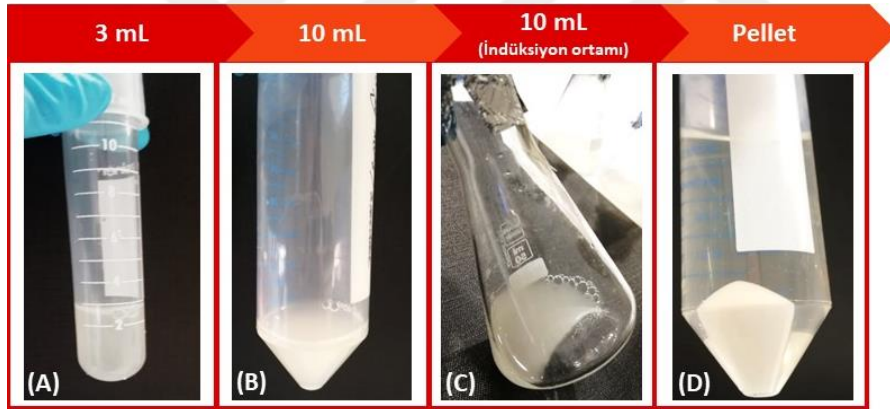
Taze kültür hazırlanarak OD₆₀₀ değeri saptanan INVSc.1 suşuna kit protokolünde belirtilen işlemler sırasıyla gerçekleştirilmiştir. pYES2.1/ROP6 plazmitinin INVSc.1 maya hücreleri ile karıştırılarak 1 saat boyunca 15 dakika aralıklarla vorteksenerek inkübe edilmiştir. Süre sonunda, maya hücrelerine transformasyonu sonrası rekombinant proteini içeren plazmit hücrelerinin, Urasil içermeyen besiyerinde yalnızca transforme olan maya hücrelerinin seçiciliğini sağlayan SC-U seçici plaklara ekimi yapılmış 2-4 gün boyunca 30°C etüvde inkübe edilmiştir. 4. gün sonunda SC-U seçici plaklarda transformantların seçiciliğini sağlayan URA3 geni sayesinde hedef geni taşıyan (transforme olmuş) hücreler tek koloniler halinde gözlemlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 SC-U seçici plaklarda gözlenen tek maya kolonileri, (A) 1 µg, (B) 2,5 µg ve (C) 5 µg plazmit DNA içeriği

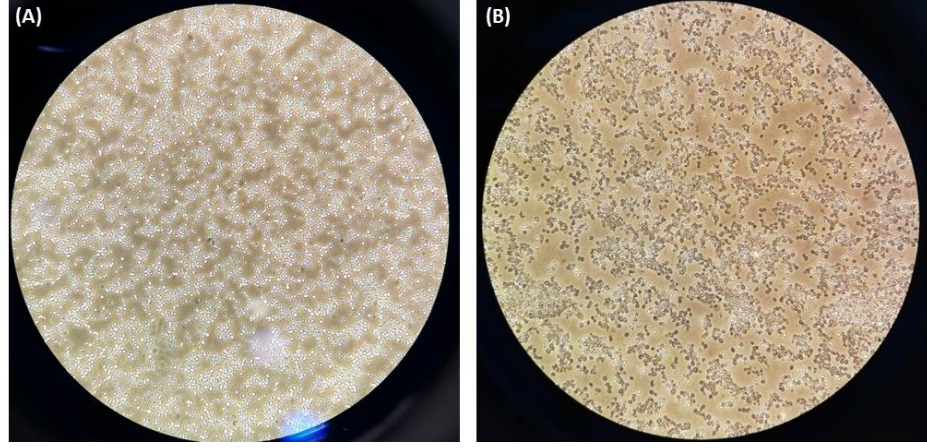
4.5 Rekombinant Protein Ekspresyonunun Belirlenmesi

Bölüm 3.6.1’de anlatıldığı şekilde maya üretimi, Şekil 4.14’te gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir.



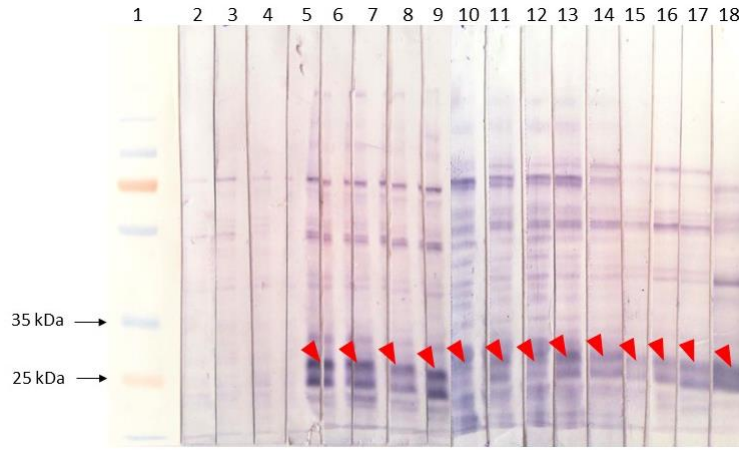
Şekil 4.14 Küçük ölçekli üretim, (A) 3 mL %10 rafinoz içeren SC-U besiyeri, (B) 10 mL %10 rafinoz içeren SC-U besiyeri, (C) 10 mL %10 rafinoz ve %20 galaktoz içeren SC-U besiyeri, (D) üretim sonunda elde edilen maya hücre pelleti

Elde edilen hücre pelletleri kit protokolüne uygun olarak parçalama tamponu ve asitle yıkanmış cam boncuklar kullanılarak parçalanmıştır. İşlem yapılmadan önce ve işlem yapıldıktan sonraki mikroskop görüntüleri gösterilmektedir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 Asitle yıkanmış cam boncuklar ve parçalama tamponu kullanılarak parçalanan maya hücrelerinin mikroskop görüntüleri, (A) işlem yapılmamış maya hücreleri ve (B) parçalama sonrası maya hücreleri

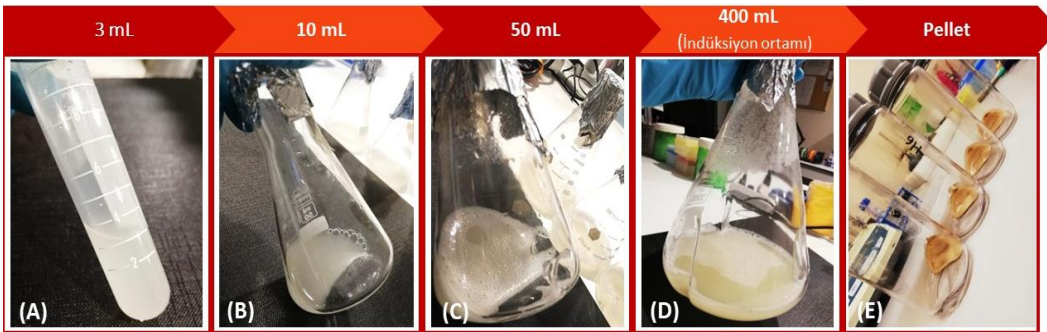
INVSc.1 maya hücreleri içinde üretilen pYES2.1/ROP6 plazmitinin küçük ölçekli üretiminin ardından kit protokolünde yer alan 0., 12., 16. ve 24. saatlerde üretimi gerçekleşen rekombinant ROP6 proteininin saptanması amacıyla Western blot analizi gerçekleştirilmiştir. Tasarlanan rekombinant ROP6 proteininin moleküler ağırlığı 18.6 kDa (kilodalton) olarak beklenmektedir. Diğer taraftan pYES2.1 plazmitinde başlangıç ve durdurma kodonu arasında bulunan V5 ve Histidin bölgelerinin eksprese edilmesi sonucu proteine yaklaşık 5 kDa eklediği kit protokolünde bildirilmektedir. Ayrıca, *S. cerevisiae* hücrelerinde gerçekleşen glikozilasyon sonucu proteinin moleküler ağırlığı artmaktadır. Bu nedenle üretilen rekombinant ROP6 proteininin moleküler ağırlığının yaklaşık olarak 27 kDa olduğu Şekil 4.16'da kırmızı oklar ile gösterildiği gibi gözlenmiştir.



Şekil 4.16 Maya hücrelerinde üretimi gerçekleşen rekombinant ROP6 proteininin 0., 12., 16. ve 24. saatlerde alınan örneklerde proteinin üretiminin Western blot ile gösterilmesi, 1. Sütun: Protein merdiveni; 2-5. Sütunlar: 0. saat örneği, 6-9. Sütunlar; 12. saat örneği, 10-13. Sütunlar; 16. saat örneği, 14-17. Sütunlar; 24. saat örneği, 18. Sütun; 24. saat pelleti

4.6 Rekombinant ROP6 Proteininin Büyük Ölçekli Üretimi

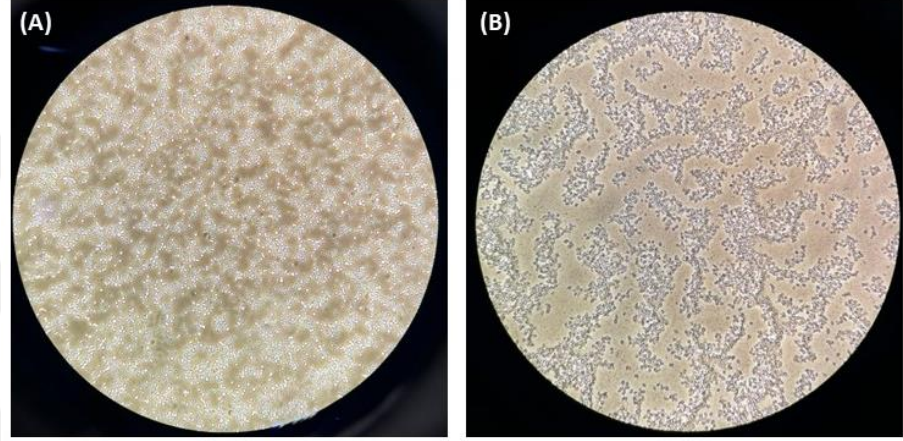
3 mL %10 rafinozlu SC-U besiyeri ile başlatılan üretim sırasında 10 ve 50 mL %10 rafinozlu SC-U ortamda Bölüm 3.7’de anlatıldığı gibi büyük hacimde ölçek büyütme şeklinde gerçekleştirilmiştir. Ardından, protein üretiminin sağlanabilmesi amacıyla %10 rafinoz ve %20 galaktoz içeren 400 mL indüksiyon ortamına alınmıştır. 24 saat süren üretim sonunda tüm üretim hacmi santrifüjlenerek pelletler oluşturulmuştur (Şekil 4.17).



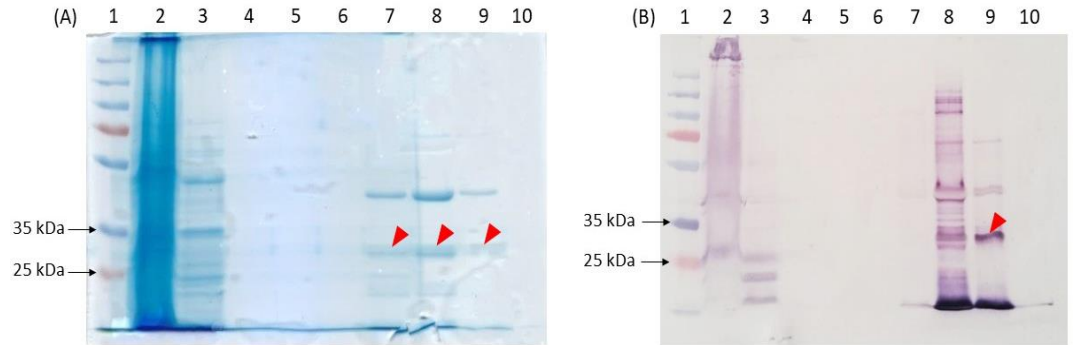
Şekil 4.17 3 mL’den 400 mL’ye ölçek büyütme ile gerçekleştirilen büyük ölçekli üretim, (A) 3 mL %10 rafinoz içeren SC-U besiyeri, (B) 10 mL %10 rafinoz içeren SC-U besiyeri, (C) 50 mL %10 rafinoz içeren SC-U besiyeri, (D) 400 mL %10 rafinoz ve %20 galaktoz içeren indüksiyon besiyeri, (E) üretim sonunda elde edilen maya hücre pelleti

4.7.1 Maya Hücrelerinin Asitle Cam Boncuklar ve EDTA içermeyen Parçalama Tamponu ile Parçalanması

Oluşturulan pelletlerin EDTA içermeyen parçalama tamponu ile parçalanmasının ardından elde edilen mikroskop görüntüsü Şekil 4.18’de gösterilmektedir. Üretilen rekombinant ROP6 proteininin boyut doğruluğu ve saflığının saptanması amacıyla yapılan SDS-PAGE ve Western blot analizleri Şekil 4.19’da gösterilmektedir.



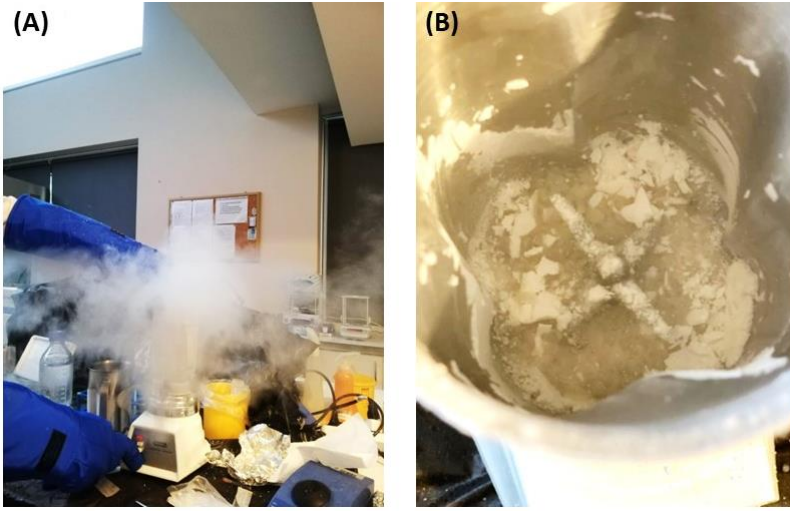
Şekil 4.18 EDTA içermeyen parçalama tamponu ve asitle yıkanmış cam boncuklar kullanılarak parçalanmış maya hücrelerinin mikroskop görüntüleri, (A) işlem yapılmamış maya hücreleri ve (B) parçalama sonrası maya hücreleri



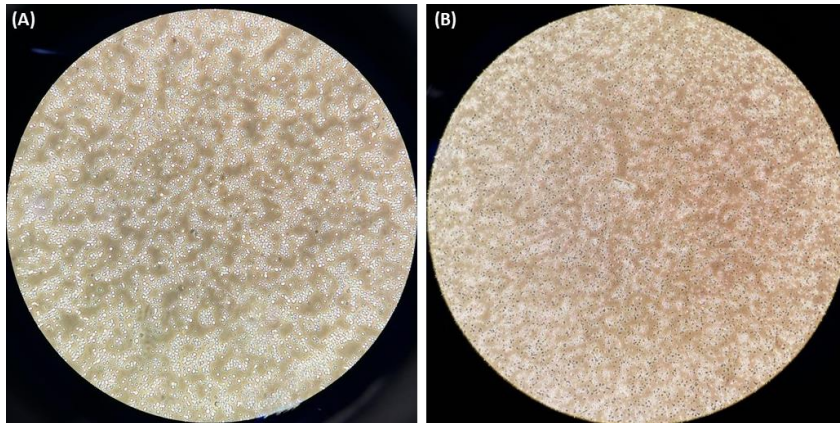
Şekil 4.19 EDTA içermeyen parçalama tamponu ve asitle yıkanmış cam boncuklar kullanılarak parçalanmış maya hücrelerinin üst sıvılarının saflaştırma sonrası SDS-PAGE ve Western blot görüntüleri, (A) SDS-PAGE ve (B) Western blot görüntüleri 1. Sütun: Protein merdiveni, 2. Sütun: Hücre pelleti; 3. Sütun: Santrifüj sonrası üst sıvı, 4. Sütun: Saflaştırma sonrası konsantre edilmeyen 2. pik; 5. Sütun: Saflaştırma sonrası konsantre edilmeyen 3. pik; 6. Sütun: Saflaştırma sonrası konsantre edilmeyen 4. pik; 7. Sütun: saflaştırma sonrası konsantre edilen 1. pik; 8. Sütun: saflaştırma sonrası konsantre edilen 2. pik; 9. Sütun: saflaştırma sonrası konsantre edilen 3. pik; 10. Sütun: saflaştırma sonrası konsantre edilen 4. Pik

4.7.2 Maya Hücrelerinin Sıvı Azot ile Parçalanma Sonuçları

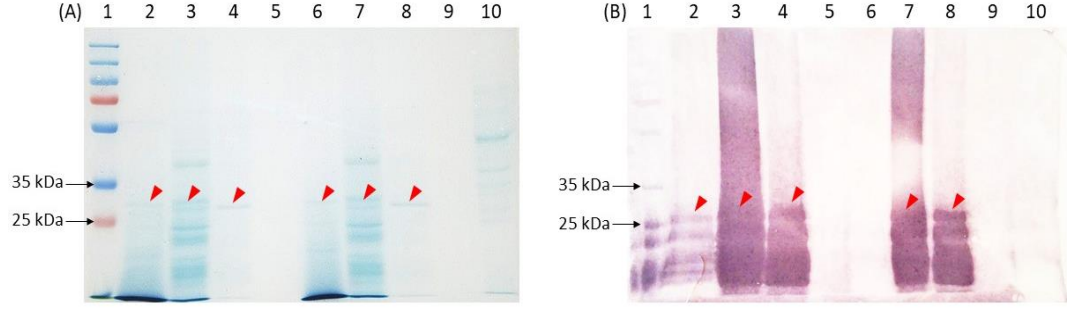
Bölüm 3.7’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen üretim sonucunda ilgili yayında belirtilen şekilde sıvı azot ile parçalama tekniği uygulanmıştır. Gerçekleştirilen işlem Şekil 4.20’de ve işlem sonrasında maya hücrelerinin mikroskop görüntüsü Şekil 4.21’de gösterilmektedir. İşlem sonrası üst sıvısı saflaştırılan ve Bölüm 3.6.3’de anlatıldığı gibi SDS-PAGE ve Western blot analizleri gerçekleştirilen rekombinant ROP6 proteininin varlığı Şekil 4.22’de gösterilmektedir.



Şekil 4.20 Sıvı azot ile maya hücrelerinin parçalanması, (A) Sıvı azot ile parçalama ve (B) Blender ile parçalanmış maya hücrelerinin görünümü



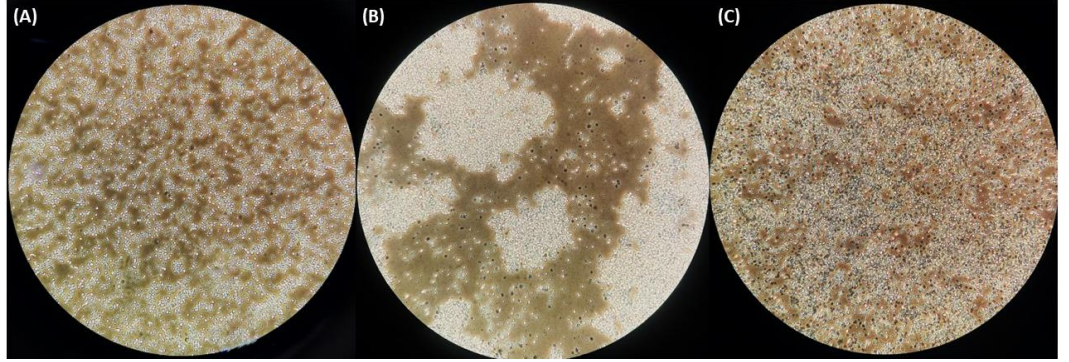
Şekil 4.21 Sıvı azot ile parçalama sonrası maya hücrelerinin mikroskop görüntüleri, (A) işlem yapılmamış maya hücreleri ve (B) parçalama sonrası maya hücrelerinin mikroskop görüntüsü



Şekil 4.22 Sıvı azot kullanılarak parçalanmış maya hücrelerinin üst sıvılarının saflaştırma sonrası SDS-PAGE ve Western blot görüntüleri, (A) SDS-PAGE ve (B) Western blot görüntüleri
 1. Sütun: Protein merdiveni, 2. Sütun: 1. Pik ROP6; 3. Sütun: 2. Pik ROP6; 4. Sütun: 3. Pik ROP6; 5. Sütun: 4. Pik; 6. Sütun: 1. Pik ROP6; 7. Sütun: 2. Pik ROP6; 8. Sütun: 3. Pik ROP6; 9. Sütun: 3. Pik ROP6; 10. Sütun: Flowthrough

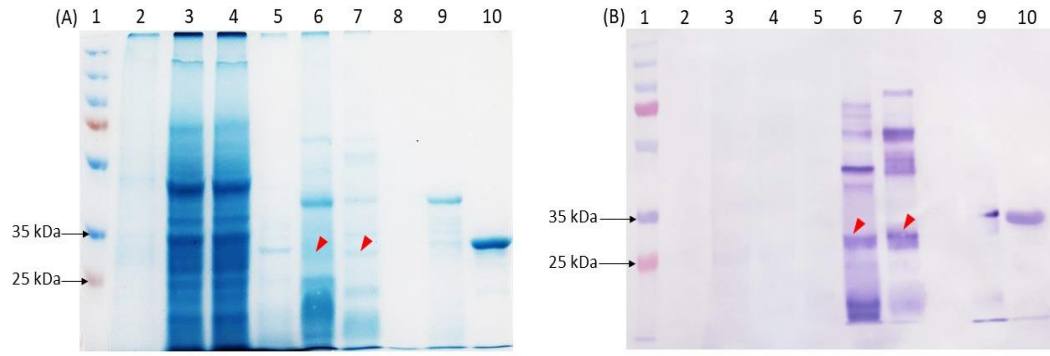
4.7.3 Maya Hücrelerinin Microfluidizer ile Parçalanma Sonuçları

Bölüm 3.7’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen üretim sonucu ıslak pelletin Microfluidizer ile parçalanması sonucu hiç işlem görmemiş, 10 kez sistemden geçirilmiş ve 30 kez sistemden geçirilmiş maya hücrelerinin mikroskop görüntüleri Şekil 4.23’te gösterilmektedir.



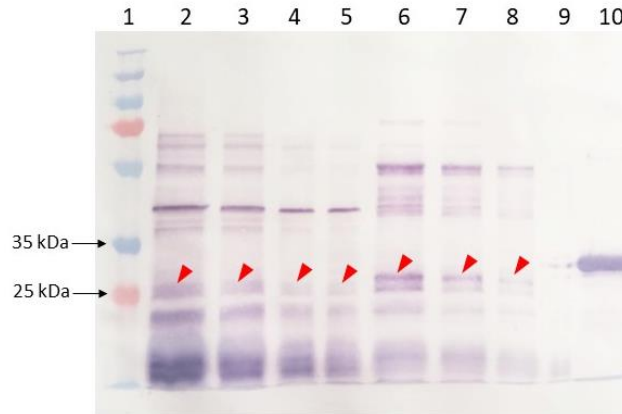
Şekil 4.23 Microfluidizer ile parçalanma sonrası maya hücrelerinin mikroskop görüntüleri (A) işlem yapılmamış maya hücreleri, (B) 10 kez sistemden geçirilmiş maya hücreleri, (C) 30 kez sistemden geçirilmiş maya hücreleri

Microfluidizer ile parçalama işlemi sonrası alınan üst sıvıların saflaştırılması sonrası rekombinant ROP6 proteininin SDS-PAGE ve Western blot analizleri Şekil 4.24’te gösterilmektedir.



Şekil 4.24 Microfluidizer kullanılarak parçalanmış maya hücrelerinin üst sıvılarının saflaştırma sonrası SDS-PAGE ve Western blot görüntüleri, (A) SDS-PAGE ve (B) Western blot analizleri 1.sütun: Protein merdiveni, 2. Sütun: Hücre pelleti; 3. Sütun: Santrifüj sonrası üst sıvı; 4. Sütun: Flowthrough; 5. Sütun: Konsantre edilen 1. pik; 6. Sütun: Konsantre edilen 2. Pik; 7. Sütun: Konsantre edilen 3. pik; 8. Sütun: Konsantre edilen 4. pik; 9. Sütun: Azotla parçalama sonucu elde edilen 2. pik; 10. Sütun: rekombinant GRA1 proteini

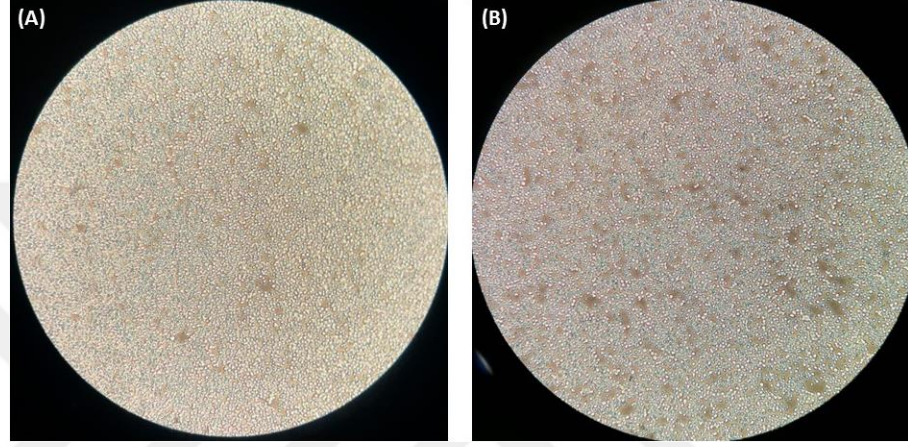
Bölüm 3.9’da anlatıldığı şekilde saflaştırma sonrası konsantre edilen, Microfluidizer ile elde edilen 2. ve 3. pikler azalan konsantrasyonlarda jele yüklenerek Şekil 4.25’te gösterildiği gibi Western blot analizi gerçekleştirilmiştir.



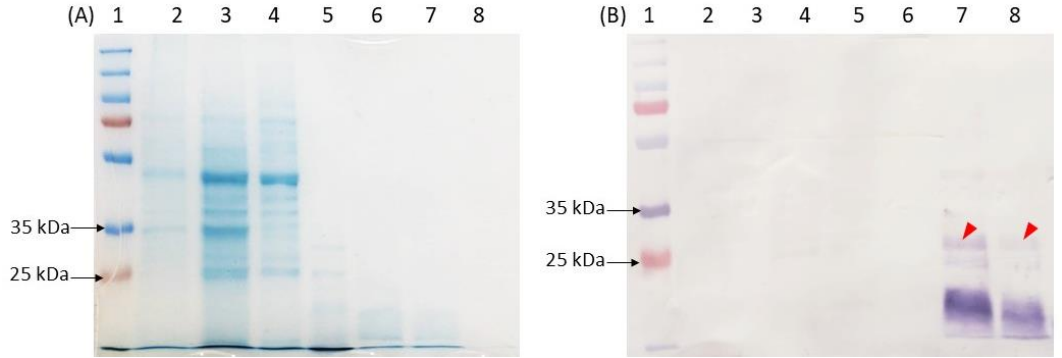
Şekil 4.25 Microfluidizer ile parçalama sonrası saflaştırılıp konsantre edilen rekombinant ROP6 proteininin Western blot analizi, 1. Sütun: DNA merdiveni; 2. Sütun: Konsantre pik 2; 3. Sütun: Konsantre pik 2; 4. Sütun: Konsantre pik 2; 5. Sütun: Konsantre pik 2; 6. Sütun: Konsantre edilen pik 3; 7. Sütun: Konsantre edilen pik 3; 8. Sütun: Konsantre edilen pik 3; 9. Sütun: Konsantre edilen pik 3; 10. Sütun: rekombinant GRA1 proteini

4.7.4 Maya Hücrelerinin Y-PER™ Maya Protein Ekstraksiyon Reaktifi ile Parçalanma Sonuçları

Y-PER Maya Protein Ekstraksiyon Reaktifi ile parçalama işlemi öncesi ve sonrası alınan mikroskop görüntüleri Şekil 4.26'da gösterilmektedir. Parçalama sonrası alınan üst sıvının saflaştırılmasının ardından rekombinant ROP6 proteinin SDS-PAGE ve Western blot analizleri Şekil 4.27'de gösterilmektedir.



Şekil 4.26 Y-PER Maya Protein Ekstraksiyon Reaktifi ile parçalanma sonrası maya hücrelerinin mikroskop görüntüleri, (A) işlem yapılmamış maya hücreleri ve (B) Y-PER ile parçalama sonrası maya hücreleri



Şekil 4.27 Y-PER reaktifi kullanılarak parçalanmış maya hücrelerinin üst sıvılarının saflaştırma sonrası SDS-PAGE ve Western blot görüntüleri, (A) SDS-PAGE ve (B) Western blot analizleri 1. Sütun: Protein merdiveni, 2. Sütun: Hücre pelleti; 3. Sütun: Santrifüj sonrası üst sıvı; 4. Sütun: Flowthrough; 5. Sütun: Konsantre edilen 1. pik; 6. Sütun: Konsantre edilen 2. Pik; 7. Sütun: Konsantre edilen 3. pik; 8. Sütun: Konsantre edilen 4. Pik

5. TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında seçilen *T. gondii*'ye ait ROP6 proteininin parazitin yaşam döngüsünde kritik rollere sahip olduğu öngörülmesine rağmen henüz konakçı hücreye invazyonu ve hücredeki görevleri net olarak ortaya konmamıştır. Bununla birlikte Döşkaya ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptıkları mikroarray incelemesinde ookist ve doku kisti ile enfekte edilmiş farelerde ROP6 proteinine karşı yüksek immün yanıt oluştuğu belirlenmiştir (Döşkaya et al., 2018). ROP proteinlerine genel olarak bakıldığında, parazitin konakçı hücreyi istilasında, penetrasyonunda ve PV'ün biyogenezinde önemli rolleri olduğu gösterilmiştir (Zhang et al., 2019).

ROP proteinleri ile yapılan aşı çalışmalarında bu proteinlerin hem hücresel hem de sıvısal bağışıklık tepkilerini uyardığı bildirilmektedir (Faridnia et al., 2018). Parazitin yalnızca takizoit formuna özgü olan bir proteinin aşı adayı olarak kullanımının parazitin bradizoit formunda etkisiz kalabileceği öngörülmektedir. Ancak, ROP proteinlerinin parazitin hem takizoit hem de bradizoit formunda sentezlendiği ortaya konmuştur (Rezaei et al., 2019). Bu nedenle, ROP proteinleri kullanılarak *T. gondii*'ye karşı geliştirilecek bir aşının umut vaat edici bir aşı adayı olabileceği açıkça görülmektedir. ROP6 proteini hem parazit yaşamında öngörülen kritik rolleri hem de takizoit ve bradizoit formlarında bulunması ve immünojen olması nedeniyle önemli bir aşı adayı olarak ortaya çıkmaktadır.

Literatür taraması sonuçlarına göre şimdiye dek ROP6 proteini *E. coli* hücrelerinde eksprese edilmesine rağmen *S. cerevisiae* hücrelerinde ekspresyonunun gerçekleştirilmediği görülmüştür. Bu nedenle tez çalışmasında rekombinant ROP6 proteininin *S. cerevisiae* hücrelerinde üretimi amaçlanmıştır. *E. coli* hücrelerinde ekspresyonda translasyon sonrası modifikasyonlar eklenememektedir ve bu durum proteinin işlevselliğini etkilemektedir. Özellikle aşı çalışmalarında ökaryotik mikroorganizmalara ait proteinlerin yine ökaryotik bir sistemde eksprese edilmesi tavsiye edilmektedir.

GRAS organizma olarak bilinen ve patojenik olmayan bir maya türü olan *S. cerevisiae* rekombinant ROP6 proteininin üretiminde konakçı organizma olarak

seçilmiştir. *S. cerevisiae*'nin ökaryotlara benzer şekilde protein katlanması geçirmesi, hızlı üretimi, az maliyetli olması ve elde edilen protein verimi sayesinde kullanılabilirliği oldukça yüksektir. Bu nedenle, *T. gondii*'ye karşı aşı antijeni üretiminde kullanılacak güçlü bir konakçı olduğu saptanmıştır. *S. cerevisiae* hücrelerinde üretimi yapılan ve yıllardır güvenli şekilde kullanılan Hepatit B aşı antijeni olan Hepatit B yüzey antijeni bunun en önemli göstergesidir. İnsanlarda kullanıma uygun olan mayalar hem patojen olmama hem de ökaryotik sistemler olmaları nedeniyle *T. gondii*'ye karşı geliştirilecek bir aşı antijeni üretiminde en güvenilir konakçı sistemi olabileceği saptanmaktadır.

Tez çalışması kapsamında ROP6 proteini biyoinformatik yöntemlerle incelendiğinde stabil olmadığı görüldüğünden protein yapısı üzerinde bir takım modifikasyon ve kısaltmalar gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler yapılırken proteinin antijenik yapısının korunabilmesi için B ve T hücre epitop analizinin yanında N ve O glikozilasyon bölgeleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, protein üzerinde 3 adet MHC-I (Çizelge 4.2 A), 1 adet MHC-II (Çizelge 4.2 B), 3 adet B hücre (Çizelge 4.2 C) ve 1 adet N (Şekil 4.2) ve 2 adet O (Şekil 4.3) glikozilasyon bölgelerini bulunduran tasarımın stabilitesi gösterildikten sonra klonlamada kullanılmıştır. pYES2.1/V5-His TOPO vektörüne eklenen rekombinant ROP6 proteininin moleküler ağırlığı 22.3 kDa (Çizelge 4.5) olarak belirlenmiştir. Ayrıca, *S. cerevisiae* hücrelerinde üretim sonucu gerçekleşen glikozilasyonlar ile protein boyutunun SDS-PAGE ve Western blot analizinde daha da arttığı görülmektedir (Ortalama 27 kDa).

Moleküler ağırlıkta oluşan büyüklük farklılıkları *E. coli* ekspresyon sistemlerinde üretilen rekombinant proteinlerde glikozilasyonun gerçekleşmemesi ve *S. cerevisiae* hücrelerinde ise yoğun glikozilasyondan dolayı moleküler ağırlığın artmasına bağlanmaktadır. Bu nedenle rekombinant aşı antijen üretimi çalışmalarında maya ekspresyon sistemlerinin kullanılması, proteinlerin doğal yapısında bulunan translasyon sonrası modifikasyonları gerçekleştirerek immünojenisiteyi arttırabilmektedir.

Literatürde bulunan güncel çalışmalara bakıldığında maya hücrelerinde gerçekleştirilen protein üretimlerinin ardından maya hücre duvarının sert yapısını

parçalamak için farklı yöntemler kullanıldığı görülmektedir. Bystryak ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada *S. cerevisiae* maya hücrelerinin parçalanmasında ultrasonik parçalama yöntemi kullanılmıştır. Laboratuvar ortamında ve büyük ölçekli üretimlerde kullanılmak üzere denenmiştir. Yapılan çalışma ile bu yöntemin kullanılabilirliği gösterilmiş ancak bu yöntemin ekipman ölçeklendirme sınırlaması olduğunda açıkça gösterilmiştir (Bystrak et al., 2015). Yapılan bir başka çalışmada *S. cerevisiae*'ye ait farklı suşların parçalanmasında kimyasal parçalama yöntemi kullanılmıştır. Yapılan çalışma ile farklı asit/baz kompozisyonları denenmiş ve bu kimyasalların, üzerinde çalışılan sitokinlerin ekspresyonunu değiştirdiği ortaya çıkarılmıştır (Pengkumsri et al., 2016). Yapılan bir başka çalışmada ise maya hücrelerinin lazer ile parçalanması denenmiştir. Bu yöntemde, lazer gönderilen noktada gerçekleşen ani ısı artışı sonucu hücrelerde termoliz gerçekleştiği belirtilmektedir. Ancak, bu yöntemin kullanımının çalışılan hücrenin tipine, ölçek boyutuna ve çalışma optimizasyonuna bağlı olarak etkinliğinin değiştiği bildirilmektedir (Gazor et al., 2018).

Tez kapsamında *S. cerevisiae*'de üretimi yapılan rekombinant ROP6 proteininin maya hücre duvarının parçalanması ile dışarıya çıkarılması amacıyla çeşitli yöntemler denenmiştir. Öncelikle takip edilen kit protokolünde yer alan EDTA içeren parçalama tamponu ve asitle yıkanmış cam boncuklar kullanılarak deneme gerçekleştirilmiştir. Yapılan işlemler sonucunda elde edilen mikroskop görüntüleri ve Western blot analizleri sonuçlarına göre maya hücrelerinin parçalandığı ve üretilen rekombinant ROP6 proteininin varlığı saptanmıştır. Bu yöntem ile hızlı, kolay ve verimli bir şekilde maya hücre duvarları parçalanmış ve rekombinant ROP6 proteini elde edilmiştir. Ancak, parçalama tamponunda bulunan EDTA kimyasalının immünolojik testleri etkilememesi amacıyla tampondan çıkarılması planlanmıştır. Sonrasında EDTA içermeyen parçalama tamponu ve asitle yıkanmış cam boncuklar kullanılarak tekrar parçalama işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen mikroskop ve Western blot analizi görüntülerine göre işlemin etkili ve verimli şekilde gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Ancak, yöntemin zahmetli ve maliyetli olması gibi dezavantajları olduğu saptanmıştır. Buna ek olarak, yapılacak büyük ölçekli üretimlerde parçalama tamponu ile parçalama işleminin işlevsel olmaması da diğer bir dezavantaj olarak ortaya çıkmıştır.

Tez çalışmasında maya hücrelerinin parçalanması sırasında diğer bir yöntem olan sıvı azot ile parçalama yöntemi de kullanılmıştır. Parçalama sonucunda elde edilen mikroskop görüntüleri incelendiğinde maya hücrelerinin parçalandığı gözlenmektedir. Rekombinant ROP6 proteini ile gerçekleştirilen SDS-PAGE ve Western blot analiz sonuçları incelendiğinde de aşıda kullanılacak özelliklere sahip rekombinant proteinin elde edildiği görülmüştür. Ayrıca, bu yöntem ile maya hücrelerinin hızlı, kolay ve maliyet etkin bir şekilde parçalanması yöntemin etkili bir şekilde kullanılabilir olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenlerle, *T. gondii*'ye karşı geliştirilecek bir aşının antijen üretiminde maya hücrelerinin duvarının yıkılmasında kullanılabilir bir yöntem olarak öngörülmüştür.

Tez çalışması sırasında kullanılan diğer bir yöntemde ise Y-PER reaktifi ile büyük ölçekli üretim sonucu maya hücre duvarını parçalama denemesi yapılmıştır. Elde edilen mikroskop görüntülerine bakıldığında Y-PER reaktifinin mayanın hücre duvarını tamamen parçalamadan yalnızca hücre duvarı yapısını bozarak hücre içeriğinin bir kısmının dışarıya çıktığı gözlemlenmektedir. Buna ek olarak, gerçekleştirilen SDS-PAGE ve Western blot analizlerinde gözlenen bantların rekombinant ROP6 proteinine ait yoğun bantlar olduğu saptanmıştır. Bu reaktifin kullanımı ile maya hücreleri hızlı ve kolay şekilde parçalanarak rekombinant ROP6 proteini elde edilmiştir. Ancak, Y-PER reaktifi içeriğinde bulunan denatüre edici ve indirgeyici ajanların immünolojik testleri ve aşının etkinliğini değiştirebilecek olması yöntemin kullanımını kısıtlamaktadır.

Maya hücre duvarı parçalama yaklaşımları arasında sıklıkla kullanılan Microfluidizer cihazı ile mekanik parçalama yöntemi de bu tez kapsamında kullanılmıştır. Cihaz kullanım koşullarının maya parçalamaya uygun hale getirilmesinin ardından yapılan parçalama işlemi sonucunda maya hücre duvarının hızlı ve güvenilir şekilde parçalandığı saptanmıştır. Protein varlığının SDS-PAGE ve Western blot analizleriyle saptanmasının ardından protein bantlarının temiz ve güçlü sinyal verdiği gözlemlenmiştir. Ancak, işlemin uzun sürmesi, sistemin sürekli soğuk tutulması gerekliliği ve maya hücre duvarının etkili şekilde parçalanması için sistemden birçok kez geçirilmesi gibi dezavantajlarının olduğu görülmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında *T. gondii* ROP6 proteini toksoplazmozise karşı geliştirilecek bir aşının formülasyonunda kullanılacak şekilde biyoinformatik araçlar ile yeniden tasarlanmıştır. Ardından tasarlanan rekombinant ROP6 proteini *S. cerevisiae* hücrelerinde başarılı bir şekilde eksprese edilmiş ve maya hücre duvarının farklı yöntemler kullanılarak parçalama işlemleri sonrası affinite kromotografisi ile saflaştırılmıştır.

Gerçekleştirilen parçalama yöntemleri arasındaki avantajlar ve dezavantajlar değerlendirilerek büyük ölçekli üretimde etkin olabilecek yöntemler tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre tez çalışmasında tasarımı yapılan rekombinant ROP6 proteininin *S. cerevisiae* hücrelerinde eksprese edildikten sonra saflaştırılarak hem aşı çalışmalarında hem de tanı testlerinin geliştirilmesinde kullanılabileceği öngörülmüştür. Bu gibi ökaryotik sistemlerde üretilen rekombinant proteinlerin artması ile çoklu antijen içeren aşılar geliştirilerek *T. gondii*'nin neden olduğu kayıpların azaltılmasının mümkün olacağı ve bunun sonucu olarak halk sağlığına ve ekonomiye büyük katkılar sağlanabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Al-Malki, E.S.**, 2021, Toxoplasmosis: stages of the protozoan life cycle and risk assessment in humans and animals for an enhanced awareness and an improved socio-economic status, *Saudi J Biol Sci*, 28(1):962-969p.
- Andersen, D.C. and Krummen L.**, 2002, Recombinant protein expression for therapeutic applications, *Curr Opin Biotechnol*, 13: 117-23p.
- Andersson, C.**, 2000, Production and delivery of recombinant subunit vaccines, *Department of Biotechnology Royal Institute of Technology (KTH)*, Sweden,92p.
- Ardiani, A., Higgins, J.P. and Hodge, J.W.**, 2010, Vaccines based on whole recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells, *FEMS yeast research*, 10(8), 1060-1069p.
- Attias, M., Teixeira, D.E., Benchimol, M., Vommaro, R.C., Crepaldi, P.H. and De Souza, W.**, 2020, The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations, *Parasites & vectors*, 13(1), 1-13p.
- Baghban, R., Farajnia, S., Rajabibazl, M., Ghasemi, Y., Mafi, A., Hoseinpoor, R., ... and Aria, M.**, 2019, Yeast expression systems: overview and recent advances, *Molecular biotechnology*, 61, 365-384p.
- Bilgili, A. ve Hanedan, Başak.**, 2019, Importance of toxoplasmosis for human and animal health, present condition, problems and solution proposals in Turkey and the World, *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 4(2), 061-074p.
- Bill, R. M.**, 2015, Recombinant protein subunit vaccine synthesis in microbes: a role for yeast?, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(3), 319-328p.
- Boothroyd, J.C. and Dubremetz, J.F.**, 2008, Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries, *Nature Reviews Microbiology*, 6(1), 79-88p.
- Böer, E., Steinborn, G., Kunze, G. and Gellissen, G.**, 2007, Yeast expression platforms, *Applied microbiology and biotechnology*, 77(3), 513-523p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bystryak, S., Santockyte, R. & Peshkovsky, A.S.**, 2015, Cell disruption of *S. cerevisiae* by scalable high-intensity ultrasound, *Biochemical engineering journal*, 99, 99-106.
- Can, H., Alak, S.E., Köseoğlu, A.E., Döşkaya, M. and Ün, C.**, 2020, Do *Toxoplasma gondii* apicoplast proteins have antigenic potential? An in silico study, *Computational Biology and Chemistry*, 84, 107158p.
- Can, H.**, 2014, İzmir sokak kedilerinde Toxoplasmosis: *Toxoplasma gondii* suşlarının mikrosatellit genotiplendirilmesi ve toxoplasmosis seroprevalansı, Doktora tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
- Carruthers, V. and Boothroyd, J.C.**, 2007, Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion, *Current opinion in microbiology*, 10(1), 83-89p.
- Cevizci, S. and Bakar, C.**, 2013, Halk Sağlığı bakışıyla *Toxoplasma gondii*/*Toxoplasma gondii* With Public Health's Perspective, *Türkiye Halk Sağlığı Dergisi*, 11(1): 45-58p.
- Çelen, Ş., Sargın, A., Çitil, A., Saygan, S., Ünlü, S, Danışman N & Seçkin B.**, 2013, Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and rubella among pregnant women in central Turkey, *African Journal of Microbiology Research*, 7, 2524-2529p.
- Çelik, E. and Çalık, P.**, 2012, Production of recombinant proteins by yeast cells, *Biotechnology advances*, 30(5), 1108-1118p.
- Demain, A.L. and Vaishnav, P.**, 2009, Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms, *Biotechnol Adv*, 27: 297-306p.
- Döşkaya, M. ve Gürüz, Y.**, 2009. *Toxoplasma gondii*'de Moleküler Yapı, 429-452, Moleküler Parazitoloji, Özcel, M.A., Tanyüksel, M. ve Eren, H. (Derl.), *Türkiye Parazitoloji Derneği*, Yayın no:22, Meta Basım, İzmir, 802p.
- Döşkaya, M., Liang, L., Jain, A., Can, H., İz, S.G., Felgner, P.L., ... and Gürüz, A.Y.**, 2018, Discovery of new *Toxoplasma gondii* antigenic proteins using a high throughput protein microarray approach screening sera of murine model infected orally with oocysts and tissue cysts, *Parasites & vectors*, 11(1), 1-13p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Djurković-Djaković, O., Dupouy-Camet, J., Van der Giessen, J., and Dubey, J.P.**, 2019, Toxoplasmosis: overview from a one health perspective, *Food Waterborne Parasitol*, 15:e00054p.
- Długonska, H.**, 2008, Toxoplasma rhoptries: unique secretory organelles and source of promising vaccine proteins for immunoprevention of toxoplasmosis, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*
- Dubey, J.P.**, 2008, The history of Toxoplasma gondii--the first 100 years, *J Eukaryot Microbiol*, 55:467-75p.
- Dubey, J.P.**, 2010, Toxoplasmosis of Animals and Humans, Second Edition, *CRP Press*, 313pp.
- 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 Reviews*, 11(2), 267-99pp.
- Dunn, B. and Wobbe CR.**, 2001, Preparation of Protein Extracts From Yeast, *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 13:Unit13.13.
- Elmore, S.A., Jones, J.L., Conrad, P.A., Patton, S., Lindsay, D.S. and Dubey, J.P.**, 2010, Toxoplasma gondii: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention, *Trends in parasitology*, 26(4), 190-196p.
- Faridnia, R., Daryani, A., Sarvi, S., Sharif, M. and Kalani, H.**, 2018, Vaccination against Toxoplasma gondii using rhoptry antigens: a systematic review, *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 59, 32-40p.
- Foroutan, M., Ghaffarifar, F., Sharifi, Z., Dalimi, A. and Jorjani, O.**, 2019, Rhoptry antigens as Toxoplasma gondii vaccine target, *Clinical and experimental vaccine research*, 8(1), 4-26p.
- Gaji, R.Y., Sharp, A.K. and Brown, A.M.**, 2021, Protein kinases in Toxoplasma gondii, *International Journal for Parasitology*, 51(6), 415-429p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gao, T., Ren, Y., Li, S., Lu, X. and Lei, H.,** 2021, Immune response induced by oral administration with a *Saccharomyces cerevisiae*-based SARS-CoV-2 vaccine in mice, *Microbial Cell Factories*, 20(1), 95p.
- Gazor, M., Talesh, S.S.A., Kavianpour, A., Khatami, M., Javidanbardan, A., and Hosseini, S.N.,** 2018, A novel cell disruption approach: effectiveness of laser-induced cell lysis of *Pichia pastoris* in the continuous system, *Biotechnology and bioprocess engineering*, 23, 49-54.
- Gnügge, R. and Rudolf, F.,** 2017, *Saccharomyces cerevisiae* Shuttle vectors. *Yeast*, 34(5), 205-221p.
- 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(10), 631-640p.
- Hansson, M., Nygren, P. and Ståhl, S.,** 2000, Design and production of recombinant subunit vaccines, *Biotechnology and applied biochemistry*, 32: 95-107p.
- Havelaar, A.H., Kirk, M.D., Torgerson, P.R., Gibb, H.J., Hald, T., Lake, R.J., ... and World Health Organization Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group,** 2015, World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. *PLoS medicine*, 12(12), e1001923p.
- Henriquez, F.L., Woods, S., Cong, H., McLeod, R. and Roberts, C.W.,** 2010, Immunogenetics of *Toxoplasma gondii* informs vaccine design, *Trends in parasitology*, 26(11), 550-555p.
- Hill, D. and Dubey, J.P.,** 2002, *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention, *Clinical microbiology and infection*, 8(10), 634-640p.
- Hiszczyńska-Sawicka, E., Gatkowska, J.M., Grzybowski, M.M. and Długońska H.,** 2014, Veterinary vaccines against toxoplasmosis, *Parasitology*, 141, 1365-1378pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hu, M.S., Schwartzman, J.D., Yeaman, G.R., Collins, J., Seguin, R., Khan, I.A. and Kasper, L. H.** 1999, Fas-FasL interaction involved in pathogenesis of ocular toxoplasmosis in mice, *Infection and immunity*, 67(2), 928-935p.
- Josefsberg, J.O. and Buckland, B.,** 2012, Vaccine process technology, *Biotechnology and bioengineering*, 109(6), 1443-1460p.
- Karakavuk, T., Gül, C., Karakavuk, M., Gül, A., Alak, S. E., Can, H., ... ve Döşkaya, A. D.,** 2022, Biotechnological Based Recombinant Protein Vaccines Developed Against Toxoplasmosis. *Turkiye parazitoloji dergisi*, 46(4), 342-357s.
- Karakavuk, M., Can, H., Gül, A., Döşkaya, A.D., Alak, S.E., Ün, C., ... and Döşkaya, M.,** 2021, GRA8 DNA vaccine formulations protect against chronic toxoplasmosis, *Microbial Pathogenesis*, 158, 105016.
- Kathuria, S.V., Chan, Y.H., Nobrega, R.P., Özen, A., and Matthews, C.R.,** 2016, Clusters of isoleucine, leucine, and valine side chains define cores of stability in high-energy states of globular proteins: Sequence determinants of structure and stability, *Protein Science*, 25(3), 662-675.
- Keating, G.M. and Noble, S.,** 2003, Recombinant Hepatitis B Vaccine (Engerix-B®) A Review of its Immunogenicity and Protective Efficacy Against Hepatitis B, *Drugs*, 63(10), 1021-1051p
- Kolören, Z., and Dubey, J.P.,** 2020, A review of toxoplasmosis in humans and animals in Turkey, *Parasitology*, 147: 12-28p.
- Kölgelir, S., Demiraslan, H., Katas, B. ve Güler, D.,** 2009, Gebelerde Toksoplasma gondii seroprevalansı, *Dicle Tıp Dergisi*, 36(3).
- Lee, W.K., Ahn, H.J., Yu, Y.G. and Nam, H.W.,** 2014, Rhopty protein 6 from *Toxoplasma gondii* is an intrinsically disordered protein, *Protein Expression and Purification*, 101, 146-151p.
- Lei, H., Lu, X., Li, S. and Ren, Y.,** 2021, High immune efficacy against different avian influenza H5N1 viruses due to oral administration of a *Saccharomyces cerevisiae*-based vaccine in chickens, *Scientific Reports*, 11(1), 8977p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Li, J., Liang, Q., Song, W. and Marchisio, M.A.,** 2017, Nucleotides upstream of the Kozak sequence strongly influence gene expression in the yeast *S. cerevisiae*, *Journal of biological engineering*, 11(1), 1-14p.
- Liu, Z., Tyo, K.E., Martínez, J.L., Petranovic, D. and Nielsen, J.,** 2012, Different expression systems for production of recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology and bioengineering*, 109(5), 1259-1268p.
- Microfluidics,** Microluidizer processor User Guide, <https://www.alfatest.it/keyportal/uploads/2017-microfluidics-chamber-user-guide.pdf> (Erişim tarihi: 21 Mayıs 2023).
- Montoya, J.G. and Liesenfeld, O.,** 2004, Toxoplasmosis, *Lancet*, 363: 1965–1976pp.
- Ocak, S., Zeteroglu, S., Ozer, C., Dolapcioglu, K. and Gungoren, A.,** 2007, Seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, rubella and cytomegalovirus among pregnant women in southern Turkey, *Scand J Infect Dis*, 39(3):231-4p.
- Partow, S., Siewers, V., Bjørn, S., Nielsen, J. and Maury, J.,** 2010, Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 27(11), 955-964p.
- Pengkumsri, N., Sivamaruthi, B.S., Sirilun, S., Peerajan, S., Kesika, P., Chaiyasut, K., and Chaiyasut, C.,** 2016, Extraction of β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of different extraction methods and in vivo assessment of immunomodulatory effect in mice, *Food Science and Technology*, 37, 124-130.
- Pier, G.B., Lyczak, J.B. and Wetzler, L.M.,** 2004, Immunology, infection, and immunity, *American Society for Microbiology*, Washington D.C, 697p.
- Pleyer, U., Gross, U., Schlüter, D., Wilking, H. and Seeber, F.,** 2019, Toxoplasmosis in Germany: Epidemiology, Diagnosis, Risk Factors, and Treatment, *Dtsch Arztebl Int*, 116(25):435-444p.
- Pronk, J.T.,** 2002, Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research, *Applied and environmental microbiology*, 68(5), 2095-2100p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Raj, A.E., Kumar, H.S., Kumar, S.U., Misra, M.C., Ghildyal, N.P. and Karanth, N.G.,** 2002, High-Cell-Density Fermentation of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Using Glycerol, *Biotechnology progress*, 18(5), 1130-1132p.
- Rezaei, F., Sarvi, S., Sharif, M., Hejazi, S.H., sattar Pagheh, A., Aghayan, S.A., and Daryani, A.,** 2019, A systematic review of *Toxoplasma gondii* antigens to find the best vaccine candidates for immunization, *Microbial Pathogenesis*, 126, 172-184p.
- Santos E. Uera-, Copple, C.D., Davis, E.A. and Hagar, WG.,** Evaluation of the Microfluidizer for Cell Disruption of Yeast and Chlorella, <https://analytik.co.uk/wp-content/uploads/2019/06/application-note-cell-disruption-publication-summarries.pdf> (2019) (Erişim tarihi: 21 Mayıs 2023).
- Sun, H., Wang, L., Wang, T., Zhang, J., Liu, Q., Chen, P., ... and Zhao, X.,** 2014, Display of *Eimeria tenella* EtMic2 protein on the surface of *Saccharomyces cerevisiae* as a potential oral vaccine against chicken coccidiosis, *Vaccine*, 32(16), 1869-1876p.
- Sun, S., Li, W., Sun, Y., Pan, Y. and Li, J.,** 2011, A new RNA vaccine platform based on MS2 virus-like particles produced in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemical and biophysical research communications*, 407(1), 124-128p.
- Tang, H., Wu, Y., Deng, J., Chen, N., Zheng, Z., Wei, Y., ... and Keasling, J.D.,** 2020, Promoter architecture and promoter engineering in *Saccharomyces cerevisiae*, *Metabolites*, 10(8), 320p.
- ThermoFisher,** https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/710_021524_pyes_bro.pdf (Erişim tarihi: 23.05.2023)
- Toklu, G.D.,** 2013, Antibodies Frequency Against Toxoplasmosis, Rubella Virus and Cytomegalovirus in Pregnant Women, *J Clin Anal Med*, 4(1), 38-40p.
- Tripathi, N.K. and Shrivastava, A.,** 2019, Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: expression hosts and process development, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 420p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Venugopal, K. and Marion, S.,** 2018, Secretory organelle trafficking in *Toxoplasma gondii*: A long story for a short travel, *International Journal of Medical Microbiology*, 308(7), 751-760p.
- Wang, J.L., Zhang, N.Z., Li, T.T., He, J.J., Elsheikha, H.M. and Zhu, X.Q.,** 2019, Advances in the development of anti-*Toxoplasma gondii* vaccines: challenges, opportunities, and perspectives, *Trends Parasitol*, 35: 239-53p.
- Wang, L.J., Xiao, T., Xu, C., Li, J., Liu, G.Z., Yin, K., ... and Sun, H.,** 2018, Protective immune response against *Toxoplasma gondii* elicited by a novel yeast-based vaccine with microneme protein 16, *Vaccine*, 36(27), 3943-3948p.
- Xiong, X., Qu, K., Ciazynska, K.A., Hosmillo, M., Carter, A.P., Ebrahimi, S., ... and Briggs, J.A.,** 2020, A thermostable, closed SARS-CoV-2 spike protein trimer, *Nature structural & molecular biology*, 27(10), 934-941p.
- Yektaeian, N., Malekpour, A., Atapour, A., Davoodi, T. and Hatam, G.,** 2021, Genetic immunization against toxoplasmosis: A review article, *Microb Pathog*, 155:104888p.
- Zhang, N.Z., Chen, J., Wang, M., Petersen, E. and Zhu, X.Q.,** 2013, Vaccines against *Toxoplasma gondii*: new developments and perspectives, *Expert review of vaccines*, 12(11), 1287-1299p.
- Zhang, Y., Lai, B.S., Juhas, M. and Zhang, Y.,** 2019, *Toxoplasma gondii* secretory proteins and their role in invasion and pathogenesis, *Microbiological research*, 227, 126293p.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam süresince tez danışmanlığımı yapan bu sürecin her aşamasında benden bilgi, deneyim ve desteğini esirgemeyen, kendimi her anlamda geliştirmeme, tecrübe kazanmama ve hayattaki bakış açımı değiştirmeme katkısı olan değerli hocam Prof. Dr. Mert DÖŞKAYA'ya teşekkür ederim. İkinci danışmanlığımı yapan deneyimlerini ve değerli bilgilerini benimle paylaşan sayın Doç. Dr. Hüseyin CAN'a katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince başta laboratuvar desteğini sağlayarak çalışmalarımın yapılmasına olanak sağlayan ve değerli bilgileriyle beni aydınlatan kıymetli hocam Prof. Dr. Adnan Yüksel GÜRÜZ'e teşekkürlerimi sunarım. Bu süreçte yakın ilgisini ve bilgisini esirgemeyen, her anlamda tüm desteğiyle yanımda olan kıymetli görüşlerinden yararlandığım sayın Doç. Dr. Aysu DEĞİRMENCİ DÖŞKAYA'ya teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında hem laboratuvar çalışmalarımda hem de özel hayatımda sağladıkları desteklerinden dolayı kıymetli arkadaşlarım Dr. Aytül GÜL, Dr. Sedef ERKUNT ALAK, Yüksek Lisans öğrencisi Ceren GÜL ve diğer genç laboratuvar çalışma arkadaşlarıma sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tüm çalışma sürecimde yanımda olan, hem bilgisi hemde tecrübe ve deneyimlerini benden esirgemeyen, varlığı, sevgisi ve ilgisiyle bana güç veren sevgili eşim Dr. Öğr. Üyesi Muhammet KARAKAVUK'a sonsuz teşekkür ederim.

Ve son olarak, bu günlere gelmemi sağlayan, destek ve sevgileriyle her an yanımda olan canım Annem, Babam ve Abime sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

.... / / 20..

İmzası

Adı-Soyadı

ÖZGEÇMİŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Başlık: *Toxoplasma gondii* Rekombinant ROP6 Proteininin *Saccharomyces cerevisiae* INVSc.1 Suşunda Ekspresyonu ve Saflaştırılması

Yıl: 2020-2023

Danışman: Prof. Dr. Mert DÖŞKAYA

I. YAYINLAR

MAKALELER

A. SCI (Science Citation Index) tarafından taranan dergilerde yayınlanan makaleler

1. Karakavuk, M., Can, H., Döşkaya, M., **Karakavuk, T.**, Erkunt-Alak, S., Köseoğlu, A. E., ... & Değirmenci-Döşkaya, A. (2021). Cryptosporidiosis outbreak on a dairy farm: Detection of *Cryptosporidium parvum* as a causative agent in the water source. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 323-333.
2. Karakavuk, M., Can, H., **Karakavuk, T.**, Gül, A., Alak, S. E., Gül, C., ... & Döşkaya, A. D. (2022). Rapid detection of *Toxoplasma gondii* DNA in cat feces using colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays targeting RE and B1 genes. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 101745.
3. Can, H., Aksoy Gökmen, A., Döşkaya, M., Erkunt Alak, S., Değirmenci Döşkaya, A., Karakavuk, M., Köseoğlu, A. E., **Karakavuk, T.**, ... & Ün, C. (2022). Development of a new serotyping ELISA for *Toxoplasma gondii* type II, type III and Africa 1 lineages using in silico peptide discovery methods, well categorized feline and human outbreak serum samples. *BMC Infectious Diseases*, 22(1), 1-14.
4. Gül, A., Alak, S. E., Gül, C., **Karakavuk, T.**, Can, H., Karakavuk, M., ... & Yeniay, L. (2021). Breast Cancer Vaccines: Current Status and Future Approach. *Frontiers in Clinical Drug Research-Anti-Cancer Agents: Volume 8*, 8, 108.
5. Parmaksız, S., Gül, A., Alak, S. E., Karakavuk, M., Can, H., Gül, C., **Karakavuk, T.**, ... & Şenel, S. (2022). Development of multistage recombinant protein vaccine formulations against toxoplasmosis using a new chitosan and porin based adjuvant system. *International Journal of Pharmaceutics*, 122199.
6. Gül, A., Alak, S. E., Gül, C., **Karakavuk, T.**, Can, H., Karakavuk, M., ... & Döşkaya, A. D. (2023). The Importance of Vaccines in a Sustainable Healthy Society. In *A Sustainable Green Future* (pp. 183-212). Springer, Cham.

B. SCI dışındaki uluslararası indekslerce taranan dergilerde yayınlanan makaleler

1. Karakavuk M, Selim N, Yeşilsiraz B, Atlı E, Özdemir H, Alan N, Yalçın M, Özkurt O, Aras M, Çelik T, Can Ş, Değirmenci Döşkaya A, Köseoğlu A, Erkunt Alak S, **Karakavuk T**, Ün C, Gürüz A, Döşkaya M, Can H, (2021), Prevalence of Gastrointestinal Parasites in Stray Cats of İzmir. *Animal Health Production and Hygiene*, 10(1), 6-11

2. Karakavuk M, Can H, **Karakavuk T**, Gül C, Erkunt Alak S, Gül A, Değirmenci Döşkaya A, Ün C, Gürüz AY, Döşkaya M, (2021), *Toxoplasma gondii* 529 baz çifti büyüklüğünde tekrar bölgesine (RE) özgü hızlı döngü aracılı izotermal amplifikasyon testinin geliştirilmesi ve analitik hassasiyetinin belirlenmesi. Ege Tıp Dergisi, 60(3), 269-273.
3. Karakavuk, M., Can, H., Aldemir, D., Döndüren, Ö., **Karakavuk, T.**, Karakavuk, E., ... & Döşkaya, M. (2021). Presence of Neospora caninum DNA of Wild Birds from Turkey. Türkiye Parazitolojii Dergisi, 45(4), 231-6.
4. Gül, C., **Karakavuk, T.**, Karakavuk, M., Can, H., Gül, A., Gürüz, A. Y., ... & Döşkaya, M. (2022). An Overview of DNA Vaccines Development Studies Against Toxoplasma gondii. Türkiye Parazitolojii Dergisi, 46(3), 253-270.
5. **Karakavuk, T.**, Gül, C., Karakavuk, M., Gül, A., Can, H., Ün, C., ... & Gürüz, A. Y. (2022). Biotechnological Based Recombinant Protein Vaccines Developed Against Toxoplasmosis. Türkiye Parazitolojii Dergisi, 46(4), 342-357.

II. PROJELER

- 1) **Proje başlığı:** TÜBİTAK "T(1004) COVID-19" Projesi
Görevi: Bursiyer
Proje tarihi: 2020-2021
Projeyi destekleyen kuruluş: TÜBİTAK (Proje No:18AG020)
- 2) **Proje başlığı:** Ülkemizde ve Dünyada Halk Sağlığını En Fazla Tehdit Eden HPV ve Influenza Kaynaklı Enfeksiyonlara Karşı Tanı Kitleri, İlaç Formülasyonları ve Aşı Geliştirilmesi
Görevi: Bursiyer
Proje tarihi: 2021-2025
Projeyi destekleyen kuruluş: TÜBİTAK-1004 projesi (Proje No: 20AG005)
- 3) **Proje Başlığı:** İmmün Sistem Yetmezliği olan hastalarda toksoplazmosis *Toxoplasma gondii* suşlarının izolasyonu mikrosatellit genotiplendirilmesi ve toksoplazmosis seroprevalansı
Görevi: Araştırmacı
Proje tarihi: 2021
Projeyi destekleyen kuruluş: TGA-2019-20654
- 4) **Proje Başlığı:** Toxoplasma gondiinin her üç dönemine etkili DNA ve rekombinant protein aşı stratejisinin geliştirilmesi
Proje No: TOA-2021-22890
Proje Türü: Öncelikli Alan
Süresi: 24 Ay
- 5) **Proje Başlığı:** Kedi Örneklerinde Toxoplasma gondii Hızlı LAMP Testinin geliştirilmesi ve Hassasiyetinin Belirlenmesi
Proje No ve ID: TGA-2020-22182-22182
Proje Türü: Genel Araştırma Projesi
Proje Tarihi: 21.10.2020-21.06.2022
- 6) **Proje Başlığı:** Pneumocystis jirovecii Tanısı İçin Hızlı Kolorimetrik LAMP Testinin Geliştirilmesi
Görevi: Araştırmacı
Proje No: 24479

III. BİLDİRİLER

A. Uluslararası Hakemli konferans/sempozyumlarda sunulan bildiriler

1. Döşkaya M., Gül A., Erkunt Alak S., Can H., Karakavuk M., Köseoğlu A.F., **Karakavuk T.**, Gül C., Ün C., Gürüz A.Y., Yılmaz H., Karasulu E., Tekin Ş., Değirmenci Döşkaya A. (2021). Administration of Four Different COVID-19 pcDNA 3.1 DNA Vaccine Prototypes Using Intradermal Electroporation and Assessment of Their Immunogenicity in BALB/c mouse. 2021 ISV Annual Congress, *Poster presentation*, September 13-15 2021, Online.
2. Döşkaya M.,* Can H., Korukluoğlu G., Altaş B. A., Pullukçu H., Kenanoğlu O. B., Karakavuk M., Erkunt Alak S., Gül A., Değirmenci Döşkaya A., **Karakavuk T.**, Gül C., Çiçek C., Taşbakan S. M., Çinkooğlu A., Ün C., Gürüz Y. A., Avcı M., Karasulu E., Tekin Ş., Işıkgöz Taşbakan M. Importance of IFN-λ1 levels in COVID-19 patients and implications on vaccine efficacy against SARSCoV-2. 2021 ISV Annual Congress, *Poster presentation*, September 13-15 2021, Online.
3. **KARAKAVUK M., CAN H., KARAKAVUK T., GÜL A., ERKUNT ALAK S., GÜL C., ÜN C., GÜRÜZ Y. A., DÖŞKAYA M., DEĞİRMENCİ DÖŞKAYA A.** *Toxoplasma gondii* RE ve B1 Genlerini Hedefleyen Kolorimetrik LAMP Testlerinin Geliştirilmesi ve PCR ile Doğrulanmış Kedi Dışkı DNA Örneklerinde Performanslarının Karşılaştırılması. Uluslararası 22. Parazitoloji Kongresi, *Sözlü Bildiri*, 11-15 Ekim 2021, Aydın
4. **KARAKAVUK T. (2021).** *Toxoplasma gondii*'ye Karşı rekombinant protein aşı yaklaşımı. Uluslararası 22. Parazitoloji Kongresi, *Yuvarlak masa konuşmaları*, 11-15 Ekim 2021, Aydın
5. Manufacturing Development Model of a Plasmid DNA Vaccine against SARS-CoV-2 , Gül Aytül, **KARAKAVUK MUHAMMET**, Gül Ceren, **Karakavuk Tugba**, Can Hüseyin, erkunt alak sedef, DEĞİRMENCİ DÖSKAYA AYSU, KÖSEOĞLU AHMET EFE, GÜRÜZ ADNAN YÜKSEL, ÜN CEMAL, KARASULU ERCÜMENT, TEKİN SABAN, DÖSKAYA MERT (2022). 2022 ISV Annual Congress Virtual Access, (Özet bildiri)
6. A Naked COVID-19 DNA Vaccine Candidate Elicits Robust Neutralizing Antibody and TH1-biased Cellular Immune Response in Murine Model Through Intradermal and Intramuscular Routes , Gül Aytül, Erkunt Alak Sedef, Can Hüseyin, **KARAKAVUK MUHAMMET**, korukoglu gülay, altas aysel basak, KÖSEOĞLU AHMET EFE, Gül Ceren, **Karakavuk Tugba**, ÜN CEMAL, GÜRÜZ ADNAN YÜKSEL, KANTARCI AYSE GÜLTEN, AKBABA HASAN, EREL AKBABA GÜLSAH, YILMAZ HABIBE, TASBAKAN MELTEM, PULLUKÇU HÜSNÜ, KARASULU ERCÜMENT, TEKİN SABAN, AVCI MAHMUT, DEĞİRMENCİ DÖSKAYA AYSU, DÖSKAYA MERT (2022).. 2022 ISV Annual Congress Virtual Access, (Özet bildiri)
7. **KARAKAVUK T., (2022).** DNA Vaccine Delivery Systems, INTERNATIONAL SYMPOSIUM ABOUT DNA VACCINES, Ege University Vaccine Development Application and Research Center Bornova/İzmir, Türkiye July 21 (Özet bildiri)
8. **KARAKAVUK T., (2022).** INTERNATIONAL EGE-AGEM VACCINE SYMPOSIUM, Ege University Vaccine Development Application and Research Center Bornova/İzmir, Türkiye September 1-2 (Özet bildiri)

IV. HAKEMLİK

1. Microbial Pathogenesis

V. ÖDÜLLER

1. “Evolution of immune responses and protectivity of multivalent recombinant proteins with a newly developed nanoparticulate adjuvant system against toxoplasmosis” Selin PARMAKSIZ, Aytül GÜL, Sedef ERKUNT ALAK, Ceren GÜL, **Tuğba KARAKAVUK**, Muhammet KARAKAVUK, Hüseyin CAN, Constantino LOPEZ-MACÍAS, Mert DÖŞKAYA, Sevda ŞENEL 4. Uluslararası Aşı Bilimi Kongresi, Sözlü Bildiri 3. lük Ödülü, Ankara

