

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı**

**TOXOPLASMOSIS TANILI GEBELERDEN ALINAN  
AMNİYON SIVILARINDAN *TOXOPLASMA GONDII* GRA4  
GENİNİN TANI VE İMMÜNİZASYONDA  
KULLANILMAK ÜZERE İZOLE EDİLMESİ,  
KLONLANMASI VE MOLEKÜLER  
KARAKTERİZASYONU**

**Hazırlayan  
Bekir TARTICI**

**Danışman  
Prof. Dr. Abdullah İNCİ**

**Doktora Tezi**

**Aralık 2020  
KAYSERİ**



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

**TOXOPLASMOSIS TANILI GEBELERDEN ALINAN  
AMNİYON SIVILARINDAN *TOXOPLASMA GONDII* GRA4  
GENİNİN TANI VE İMMÜNİZASYONDA  
KULLANILMAK ÜZERE İZOLE EDİLMESİ,  
KLONLANMASI VE MOLEKÜLER  
KARAKTERİZASYONU**

**(Doktora Tezi)**

**Hazırlayan  
Bekir TARTICI**

**Danışman  
Prof. Dr. Abdullah İNCİ**

**Aralık 2020  
KAYSERİ**

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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

**Adı-Soyadı :** Bekir TARTICI

**İmza :**

## YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

**“Tokso plazmosis Tanılı Gebelerden Alınan Amnion Sıvılarından *Toxoplasma gondii* GRA4 Geninin Tanı ve İmmünizasyonda Kullanılmak Üzere İzole Edilmesi, Klonlanması ve Moleküler Karakterizasyonu”** adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

**Tezi Hazırlayan**

Bekir TARTICI

**Danışman**

Prof. Dr. Abdullah İNCİ

**Tıbbi Parazitoloji AD Başkanı**

Prof. Dr. Bilgehan AYGİN

**Prof. Dr. Abdullah İNCİ** danışmanlığında **Bekir TARTICI** tarafından hazırlanan “**Toksoplazmosis Tanılı Gebelerden Alınan Amnion Sıvılarından *Toxoplasma gondii* GRA4 Geninin Tanı ve İmmünizasyonda Kullanılmak Üzere İzole Edilmesi, Klonlanması ve Moleküler Karakterizasyonu**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

..... /..... /2020

**JÜRİ :**

**İMZA**

|          |                                                                                              |       |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Danışman | : Prof. Dr. Abdullah İNCİ<br>ERÜ Veteriner Fakültesi, Parazitoloji AD.                       | ..... |
| Üye      | : Doç. Dr. Önder DÜZLÜ<br>ERÜ Veteriner Fakültesi, Parazitoloji AD                           | ..... |
| Üye      | : Dr. Öğr. Üyesi İbrahim SÖZDUTMAZ<br>ERÜ Veteriner Fakültesi Viroloji AD                    | ..... |
| Üye      | : Prof. Dr. Barış SARI<br>Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı | ..... |
| Üye      | : Prof. Dr. Yusuf ÖZBEL<br>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı         | ..... |

**ONAY:**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun.....tarih ve .....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... /..... / .....

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Bu tez projesinin planlanması, yürütülmesi ve yazılması hususlarında göstermiş olduğu destek ve yardımlarından ötürü tez danışmanım Prof. Dr. Abdullah İNCİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tez çalışmamın laboratuvar aşamasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM'a, Doç. Dr. Önder DÜZLÜ'ye teşekkür ederim. Tez çalışmamın her aşamasına katkılarını esirgemeyen arkadaşlarım; Dr. Öğr. Üyesi Merve YÜRÜK'e, Arş. Gör. Dr. Emrah ERDOĞAN'a ve Dr. Eda SİVCAN'a şükranlarımı sunarım. Çalışmalarım süresince birçok fedakârlık gösterip, yaşamımın her döneminde bana duydukları güven için aileme en derin duygularla teşekkür ederim.

Bekir TARTICI

Aralık 2020

**TOXOPLASMOSIS TANILI GEBELERDEN ALINAN AMNİON  
SIVILARINDAN *TOXOPLASMA GONDII* GRA4 GENİNİN TANI VE  
İMMÜNİZASYONDA KULLANILMAK ÜZERE İZOLE EDİLMESİ,  
KLONLANMASI VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**Bekir TARTICI**

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Parazitoloji Anabilim Dalı  
Doktora Tezi, Aralık 2020  
Danışman: Prof. Dr. Abdullah İNCİ**

**ÖZET**

Sıcakkanlı omurgalılarda enfeksiyon oluşturabilen *Toxoplasma gondii*, hücre içi zorunlu bir protozoon parazittir. bu çalışmada, *Toxoplasma gondii*'nin GRA4 geninin klonlanması, sekanslanması ve moleküler karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, ERÜ tıp fakültesi hastanesi kadın ve doğum hastalıkları polikliniğine başvuran, amniyosentez yapıp toxoplasmosis tanısı konulan toplam 4 hastadan alınan amniyon sıvılarından Genomik DNA izolasyonu yapılarak *Toxoplasma gondii* GRA4 geninin açık okuma çerçevesini (ORF) bütün olarak amplifiye eden (1038 bç) spesifik primer ile PCR kurulmuştur. Elde edilen PCR ürünleri saflaştırılarak pJET1.2/blunt Cloning vektörüne klonlanmış, klonlamanın doğrulanması için koloni tarama yapılarak miniprep ile saflaştırılan plasmid DNA sekans analizine gönderilmiştir. 1038 bç uzunluğundaki sekans dizisi yüksek kalite skoru ile elde edilen *T. gondii* GRA4 geni DNA dizi analiz sonuçlarının Geneious 2020.1.1 yazılımı üzerinden çoklu hizalamaları yapılmış ve 4 izolatın GRA4 sekans dizilerinin homolog olduğu görülmüştür. Blast analizlerinde, TRTOXGRA4 olarak isimlendirilen sekansın Genbank veri tabanında *T. gondii*'ye ait Avustralya'dan bildirilen (M76432) izolat ile %100; Hindistan'dan rapor edilen EU660037 kodlu izolat ile %99,9, Suudi Arabistan'dan (LN714501.1) ve ABD'den bildirilen (XM\_002364283) izolatlarla ise %97,8 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. İlgili izolatların ikili hizalama analiz sonuçlarına göre nükleotid farklılıkları tespit edilmiştir. ORF sekansının, 346 amino asit uzunluğunda bir zinciri kodladığı ve in-silico analiz sonuçlarına göre GRA4 proteininin 36.284 kDa ağırlığında olduğu belirlenmiştir. GRA4 amino asit zincirinin, uzunluğu 7-43 aa arasında değişen, en düşük skoru 1,03 en yüksek skoru ise 1,243 olan 12 antijenik bölge içerdiği belirlenmiştir. Ayrıca ilgili amino asit zincirinin 20 aa uzunluğunda bir

sinyal peptid içerdği, ikincil yapısının non-sitoplazmik domain özellikte olduğu ve iki adet potansiyel transmembran bölgeye sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca ikincil yapı analizinde % 22,25 alfa-heliks, % 26,3 beta-strand ve %28,03 oranında random coil yapısı tespit edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışma ile Türkiye’de ilk kez amniyotik sıvılardan elde edilen *T. gondii* izolatlarında önemli immunojenik bir antijen olan GRA4 proteinini kodlayan gen üzerine karakterizasyon verileri elde edilmiştir. Çalışma ile rekombinant olarak elde edilen GRA4’ün biyoinformatik analizlerle genetik ve proteomik yapısı ortaya çıkarılmış olup, toxoplasmosise karşı başta aşı çalışmaları olmak üzere biyoteknolojik mücadele çerçevesinde yeni projeler için öncül sonuçlar sağlanmıştır. Ayrıca elde edilen sonuçlar gen bazında parazitin moleküler epidemiyolojisi noktasında da katkı sağlamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmosis, Gebelerde Toxoplasmosis, GRA4

**ISOLATION, CLONING AND MOLECULAR CHARACTERISATION GRA4  
GENE OF *TOXOPLASMA GONDII* OBTAINED BY AMNION MAIES OF  
PREGNANTS WHO HAVE TOXOPLASMOSIS**

**Bekir TARTICI**

**Erciyes University, Graduate School of Healthy Sciences**

**Department of Parasitology**

**PhD. Thesis, Dec 2020**

**Supervisor: Prof. Dr. Abdullah İNCİ**

**ABSTRACT**

*Toxoplasma gondii*, which can infect warm-blooded vertebrates, is an intracellular obligate protozoan parasite. In this study, the cloning, sequencing and molecular characterization of *Toxoplasma gondii*'s GRA4 gene was aimed. For this purpose, Genomic DNA isolation from amniotic fluids taken from 4 patients who were admitted to the ERÜ medical faculty hospital obstetrics outpatient clinic and diagnosed with toxoplasmosis undergoing amniocentesis, and PCR was established with a specific primer (1038 bp) that amplifies the open reading frame (ORF) of *T. gondii* GRA4 gene as a whole. The PCR products obtained were purified and cloned into pJET1.2 / blunt Cloning vector. To confirm the cloning, the colony was scanned and the plasmid DNA purified by miniprep was sent for sequence analysis. Multiple alignments of the DNA sequence analysis results of *T.gondii* GRA4 gene, which were obtained with a high quality score of 1038 bp sequence, were performed on Geneious 2020.1.1 software and it was observed that the GRA4 sequence sequences of 4 isolates were homologous. In blast analysis, the sequence named TRTOXGRA4 is 100% similar to the isolate (M76432) reported from Australia belonging to Tgondii in Genbank database; 99.9% similar to the isolate coded EU660037 reported from India; It was determined that it was 97.8% similar to the isolates reported from Saudi Arabia (LN714501.1) and the USA (XM\_002364283). Nucleotide differences were determined according to the binary alignment analysis results of the respective isolates. It was determined that the ORF sequence encodes a chain of 346 amino acids in length and according to the in-silico analysis results, the GRA4 protein weighs 36.284 kDa. It was determined that the GRA4 amino acid chain contains 12 antigenic regions varying between 7-43 aa with the lowest score of 1.03 and the highest score of 1.243. It was also observed that the related amino acid chain contains a 20 aa signal peptide, its secondary structure is non-

cytoplasmic domain and has two potential transmembrane regions. In addition, in the secondary structure analysis, 22.25% alpha-helix, 26.3% beta-strand and 28.03% random coil structure were detected. In conclusion, this study for the first time in amniotic important data on the characterization of the gene encoding the immunogenic protein in *T. gondii* antigens that GRA4 isolates were obtained from liquids in Turkey. The genetic and proteomic structure of GRA4, which was obtained recombinantly with the study, was revealed by bioinformatic analysis, and preliminary results were obtained for new projects within the framework of biotechnological struggle, especially vaccine studies against toxoplasmosis. In addition, the results obtained have contributed to the molecular epidemiology of the parasite on a gene basis.

**Key Words:** *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmosis, Toxoplasmosis at pregnant, GRA4

## İÇİNDEKİLER

### LABORATUVAR HATTI *LUCILIA SERICATA*'NIN LUCİMYCİN, CHYMOTRYPSİN, LUCİFENSİN GENLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE REKOMBİNANT FÜZYON PROTEİNİN EKSPRESYON DENEMELERİ

|                                                 |      |
|-------------------------------------------------|------|
| İÇ KAPAK.....                                   | i    |
| BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....                    | ii   |
| YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI .....                | iii  |
| KABUL ONAY.....                                 | iv   |
| TEŞEKKÜR .....                                  | v    |
| ÖZET.....                                       | vi   |
| ABSTRACT .....                                  | viii |
| İÇİNDEKİLER .....                               | x    |
| KISALTMALAR ve SİMGELER .....                   | xii  |
| TABLolar LİSTESİ.....                           | xiii |
| ŞEKİLLER LİSTESİ.....                           | xiv  |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ .....                          | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                          | 2    |
| 2.1. Tarihçe.....                               | 2    |
| 2.2. Sınıflandırma .....                        | 4    |
| 2.3. Etken.....                                 | 5    |
| 2.4. Morfoloji .....                            | 5    |
| 2.4.1. Takizoitler (trofozoitler) .....         | 5    |
| 2.4.2. Bradizoit (kistler).....                 | 6    |
| 2.4.3. Ookistler (kedi dışkıısındaki form)..... | 7    |
| 2.5. Hayat Döngüsü .....                        | 8    |
| 2.6. Epidemiyoloji .....                        | 9    |
| 2.7. Semptomlar .....                           | 11   |
| 2.9. Korunma .....                              | 12   |

|                                                                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.10. <i>Toxoplasma Gondii</i> GRA4 Geni .....                                                            | 13        |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>                                                                           | <b>15</b> |
| 3.1. Gereçler .....                                                                                       | 15        |
| 3.2. Yöntem .....                                                                                         | 16        |
| 3.2.1. Total Genomik DNA İzolasyonu .....                                                                 | 16        |
| 3.2.2. <i>Toxoplasma gondii</i> GRA4 Genine Göre Tasarlanan Primerler ve PCR<br>Koşulları.....            | 18        |
| 3.2.3. PCR Ürününün Saflaştırılması .....                                                                 | 18        |
| 3.2.4. GRA4 Geninin Klonlanması.....                                                                      | 19        |
| 3.2.5. Transformasyon .....                                                                               | 20        |
| 3.2.6. Rekombinant Plazmid DNA Eldesi .....                                                               | 21        |
| 3.2.7. Sekans ve Biyoinformatik Analizler.....                                                            | 23        |
| <b>4. BULGULAR.....</b>                                                                                   | <b>24</b> |
| 4.1. <i>T. gondii</i> GRA4 Geninin Amplifikasyonu .....                                                   | 24        |
| 4.2. pJET1.2/blunt Vektörüne Klonlama.....                                                                | 25        |
| 4.2.1. Rekombinant Plazmitin Doğrulanması; PCR Tarama (PCR Screening)<br>Kullanılarak Prezantasyonu ..... | 26        |
| 4.3. Rekombinant Plazmit Saflaştırılması ve PCR ile Doğrulanması .....                                    | 27        |
| 4.4. <i>T. gondii</i> GRA4 Geninin Sekans ve Biyoinformatik Analiz Sonuçları .....                        | 28        |
| <b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>                                                                          | <b>32</b> |
| <b>6. KAYNAKLAR .....</b>                                                                                 | <b>40</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>                                                                                      | <b>45</b> |

## KISALTMALAR ve SİMGELER

|                         |                                 |
|-------------------------|---------------------------------|
| <b>μl</b>               | : Mikro Litre                   |
| <b>bç</b>               | : Baz Çifti                     |
| <b>ddH<sub>2</sub>O</b> | : Bi Distile Su                 |
| <b>DNA</b>              | : Deoksiribo Nükleik Asit       |
| <b>dNTP</b>             | : Deoksi Nükleosid Trifosfat    |
| <b>EDTA</b>             | : Etilendiamin Tetraasetik Asit |
| <b>g</b>                | : Gram                          |
| <b>l</b>                | : Litre                         |
| <b>M</b>                | : Molar                         |
| <b>ml</b>               | : Mili Litre                    |
| <b>oC</b>               | : Santigrad Derece              |
| <b>P n</b>              | : probability (anlamlılık)      |
| <b>TAE</b>              | : Tris-Asetik Asit-EDTA         |
| <b>PCR</b>              | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu   |
| <b>pH</b>               | : Potansiye Hidrojen            |

## TABLÖLER LİSTESİ

|                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 3.1. Deneylerde kullanılan cihazlar.....                                                      | 15 |
| Tablo 3.2. Deneylerde kullanılan malzemeler.....                                                    | 16 |
| Tablo 4.1. TRTOXGRA4 gen dizisinin GenBank'ta mevcut GRA4 sekansları ile<br>benzerlik oranları..... | 29 |



## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. <i>Toxoplasma gondii</i> trofozoiti .....                                                                                | 6  |
| Şekil 2.2. Fare beyrinde bulunan doku kisti içindeki bradizoitler .....                                                             | 7  |
| Şekil 2.3. <i>T. gondii</i> ookisti.....                                                                                            | 7  |
| Şekil 2.4. <i>Toxoplasma gondii</i> 'nin hayat döngüsü .....                                                                        | 9  |
| Şekil 3.1. Vektör haritası; pJET1.2/blunt (2972 bç).....                                                                            | 20 |
| Şekil 4.1. PCR yöntemi ile <i>T. gondii</i> GRA4 geninin çoğaltılması ile oluşan 1038 bç'lik bant ve agaroz jeldeki görüntüsü ..... | 24 |
| Şekil 4.2. Jelden pürifiye edilen PCR ürününün görüntüsü .....                                                                      | 24 |
| Şekil 4.3. Transformasyondan sonra oluşan koloniler .....                                                                           | 25 |
| Şekil 4.4. Transformasyondan sonra oluşan kolonilerden tek nokta ekimi.....                                                         | 26 |
| Şekil 4.5. PCR tarama ile pozitif çıkan örneklerin agaroz jelde görüntüsü .....                                                     | 27 |
| Şekil 4.6. Saflaştırılmış rpTgGRA4'ün PCR sonrası görüntüsü; saflaştırılmış plazmitler.....                                         | 27 |
| Şekil 4.7. TRTOXGRA4 izolatının nükleotid sekansı .....                                                                             | 28 |
| Şekil 4.8. TRTOXGRA4 ile GenBank'a kayıtlı GRA4 sekanslarının ikili hizalama analizine göre nükleotid farklılıkları.....            | 29 |
| Şekil 4.9. TRTOXGRA4 izolatının amino asit sekansının biyoinformatik verileri. ....                                                 | 30 |

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

*Toxoplasma gondii* tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de görülen bir parazittir. Çoğunlukla asemptomatik olmakla birlikte immün sistemi baskılanmış kişilerde ciddi tablolara sebep olabilmektedir. Mortaliteye de sebep olabilen bu parazit gebelerden bebeklere geçişi sebebiyle oldukça önemli bir halk sağlığı sorunu olarak görülmektedir. Parazitin oluşturduğu 'Toksoplazmosis' hastalığının patogenezinde bir çok faktör rol oynamaktadır. Patogeneizde, parazite ait faktörler, parazitin tanısının konulması ve parazitten korunmak için aşı geliştirilmesi çalışmalarında önemli olmaktadır. *T.gondii*'nin oluşurduğu hastalıkta en önemli moleküllerden biri de GRA4 genidir. Dolayısıyla bu çalışmada GRA4 genin klonlanması amaçlanmıştır.

Bu çalışma sonrasında GRA4 geni tanısal amaçla kullanılabileceği gibi parazite karşı aşı geliştirme çalışmalarında da kullanılabilecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Sıcakkanlı omurgalılarda enfeksiyon oluşturabilen *Toxoplasma gondii*, hücre içi zorunlu bir protozoon parazittir (Ryan ve Ray, 2004, Ferreira da Silva Mda ve ark., 2008). Konak seçiciliği düşük olan *T. gondii*, sağlık alanında ve ekonomik açıdan önemli bir parazittir. Hayvanlarda ve insanlarda plasental geçiş yoluyla bulaşması; düşük veya hastalıklı doğumlara sebep olmaktadır. Ayrıca immun yetmezlikli kişilerde organları etkileyebilmekte, beyin tutulumu sonucu oluşturduğu meningoensefalit tablolarına sebep olabilmektedir. Toksoplazmosis, kontamine su ve gıdaların tüketimi, organ ve doku nakilleri gibi değişik yollarla bulaşabildiği için yaygın görülmektedir. Toksoplazmosise bağlı oluşan fetal anomalilerin azaltılması ve dünyada enfekte kişilerin tedavisi için her yıl yüz milyonlarca doların harcandığı bildirilmiştir (Caner, 2007).

### 2.1. Tarihçe

Toxon kelimesi Yunanca ‘yay’ demektir. Parazitin görünümü yaya benzediğinden bu isim seçilmiştir.(Nicolle ve Manceaux, 2009). Yirminci yüzyılın ilk yılında bir tür serçenin (java seçesi) hemotopoetik sisteminde ilk kez görülmüş fakat *Haemamoeba danilewskyi*’nin çoğalan formu zannedilmiştir (Özcel, 2007). Charles Nicolle ve L. Manceaux isimli araştırmacılar tarafından 8 yıl sonra (1908) *Ctenodactylus gundii* adındaki kemiricinin hepatosplenik bölge ve kemik iliğinde *T. gondii* saptanmıştır. Aynı sene içerisinde, Splendore tavşanda *T. Gondii* tespit etmiştir. Mello 1910 senesinde bir köpekte yaptığı araştırma sonucunda *T. gondii*’yi göstermiştir.

İnsanda ilk vaka Prag’da 1923’te bir bebeğin gözünde tespit edilmiştir. Levadity, Schsen ve Sanches, 1928 yılında diğer adı ‘kistozoit’ olan ‘bradizoit’ doku kistini tanımladılar. Wolf, Cowen ve Paige, ABD’de sezeryan ile dünyaya gelen kız bebekte, 1939’da insan vücudunda paraziti ilk kez göstermiştir.

Sabin, 1941 yılında Cincinnati'de 6 (altı) yaşındaki erkek hastada, *T. gondii* etkisini göstermiştir. Ayrıca Sabin tarafından aynı yılda insan ve hayvandaki *Toxoplasma gondii*'nin aynı olduğu kanıtlanmıştır. Sabin tarafından 1942 yılında toxoplasmosise ait (hidrosefali, mikrosefali, koryoretinit ve intraserebral kalsifikasyon) dört klinik belirti bulundu. Aynı zamanda Sabin ve arkadaşı Waren tarafından sulfanamidlerin *T. gondii*' tedavisinde etkili olduğu tespit edildi. Kean ve Grocott, 1945 yılında semptomsuz kişilerde, *T. gondii*'nin doku kistlerini ilk olarak göstermişlerdir.. Plaut tarafından 1946'da kronik enfeksiyonun asemptomatik belirtisini gösteren kistler, otopside tespit edildi. Sabin ve Feldman tarafından Dye testi, Frenkel tarafından cilt testi 1948 yılında ortaya konuldu. Dye testi, 1949'da, Sabin ve Feldman tarafından toxoplasmosis tanısında kullanılmaya başlanmıştır. Frenkel ve Friatlander tarafından 1951 yılında *Toxoplasma gondii*'nin hidrosefalinin bir sebebi olduğu bulunmuştur. Ayrıca doku kisti sitolojik olarak tanımlanmıştır. Eyles ve Coleman, 1953'te, takizoitlerin bölünmesini engelleyen sülfonamid ve primetaminlerin, sinerjik etki gösterdiğini ispatlamıştır. Unat ve arkadaşları, 1953'te, ülkemizdeki ilk insan olgusunu bildirmiştir. 1956'da Siim ve Beverley, 1958'de Beatie, yaptıkları çalışmalarda toxoplasmosiste en sık görülen belirtinin lenfadenopati olduğunu kabul etmişlerdir. Hardley ve Marshall epidemiyolojik toxoplasmosisi 1957'de koyunda teşhis etmişlerdir. Frenkel ve Hitchings 1957'de yaptıkları araştırmalarda maya ve folik asitin; sülfodiyazin ve primetaminin aktivitesini artırdığını göstermişlerdir. Goldman, 1958'de *T. gondii*'nin intrasellüler formda endodiyogoni ile çoğaldığını göstermiştir. Garin ve Eyles 1958'de, spiramisin'in anti-sitoplazmik aktiviteye sahip olduğunu kanıtlamıştır. İnsana et yemekle bulaşabileceği 1960'da Remington, Jacobs ve Melton tarafından ispatlanmıştır. Remington tarafından 1968'de, Desmonts tarafından ise 1981 yıllarında kandaki IgM antikorlarının tespitini kolaylaştırmak için testler geliştirilmiştir. Dubey tarafından 1970 yılında ookistin morfolojisi tanımlanmıştır.

Sheffelt, Piekarski, Pelster ve Witte tarafından, 1970 yılında *T. gondii*'deki beş aseksüel döngü açıklanmıştır. İnsanların, ookistlerle teması sonucu oluşan toxoplasmosise yakalanmamak için gereken tedbirler, 1972 yılında Frenkel ve Dubey tarafından belirlenmiştir.

Frenkel, 1973'de *T. gondii*'nin hayat döngüsündeki takizoit (tachy: fast/zoite: yaşam) ve bradizoit (brady: slow /zoite: yaşam ) formunu tanımlamıştır. Thalhammer, 1973-

1978 yıllarında Avusturya ve Fransa'daki hamile kadınlarda taramalar yapmış ve konjenital toxoplasma sayısını düşürmek için profilaksi uygulamasını başlatmıştır. Doku kisleri ve bradizoitlerin olgunlaşması, yapısı ve dış görünüşü hakkında ilk derinlemesine çalışma, Dubey ve Frenkel tarafından 1976'da yapılmıştır. Luft isimli araştırmacı tarafından 1983'te toxoplasmosisin AIDS'li hastalardaki duyarlılığı araştırılmıştır. İlk ticari aşı Wilkins ve O'Connell isimli araştırmacılar tarafından 1983'te koyunlardaki *T. Gondii* kaynaklı fetal enfeksiyonları azaltmak için geliştirilmiştir. Waldeland ve Frenkel, 1983'te ara konaklar için Ts-4 aşısını geliştirmişlerdir. Dubey 1986'da, etlerdeki *T. gondii*'yi yok etmek için uygulanan ısıtma ve dondurma işlemlerindeki sıcaklık eğrilerini belirlemiştir. Dubey ve Beattie tarafından 1988'de koyunların ve zirai ürünlerin üzerindeki kötü etkinin, *T. gondii*'den kaynaklandığı açıklığa kavuşturulmuştur. Burk tarafından 1989'da PCR testi B1 geni kullanılarak *T. gondii* DNA'sını tespit etmek için geliştirildi. Frenkel tarafından 1991 yılında kedilerin attığı ookistlerin etkisini azaltmak için T-263 aşısı geliştirilmiştir. Dubey'in serum testleriyle ilgili ilk doğrulaması 1995 yılında parazitin izole edilmesi ile gerçekleştirilmiş oldu. Bradizoit ve doku kistlerinin tüm biyolojisini, Dubey 1998'de gözden geçirmiştir. Cole, 2000 yılında, su samurlarında *T. gondii*'yi göstermiştir(Dubey, 2009).

## 2.2. Sınıflandırma

*Toxoplasma gondii* ökaryot bölümünde yer almakta ve taksonomik olarak aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır (Durdu, 2008).

| Taksonomik kategori |                          |
|---------------------|--------------------------|
| Bölüm               | Ökaryot                  |
| Alem                | Protozoa                 |
| Şube                | Mizozoa                  |
| Alt Şube            | Apicomplexa              |
| Sınıf               | Conaidasida              |
| Alt Sınıf           | Coccidiasina             |
| Takım               | Eucoccidiasina           |
| Alt Takım           | Eimeriorina              |
| Aile                | Sarcocytidae             |
| Alt Aile            | Toxoplasmatinae          |
| Tür                 | <i>Toxoplasma gondii</i> |

### 2.3. Etken

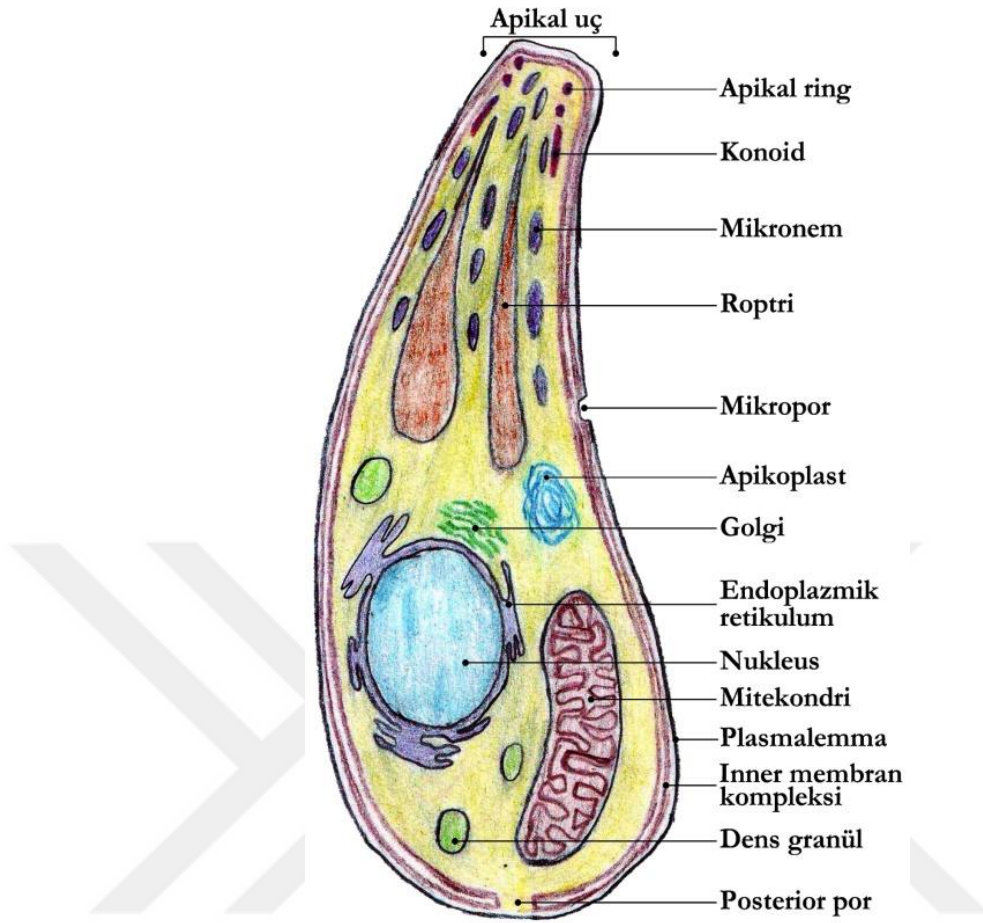
Sıcak kanlı omurgalılarda tüm çekirdekli hücreleri enfekte edebilen, tüm dünyada yaygın ve sık olarak rastlanan bir enfeksiyon olan toksoplazmosis etkeni *T. gondii*'nin 25 suşu olduğu bildirilmiş ve tüm suşların benzer karakterde temel antijenik yapıları bulunmaktadır. Karmaşık bir antijen yapısına sahip olan parazitin, monoklonal antikörlerle yapılan fare deneylerinde, virulansı etkileyen özel antijenlerin varlığı gösterilmiştir. Hayvan ve insan izolatları incelendiğinde, genotipleri arasında belirgin bir fark olduğu gözlemlenmiştir. Hayvan izolatlarında genellikle Tip III suşu tespit edilirken, kronik enfeksiyonların reaktivasyonu ile ilişkili olduğu düşünülen Tip II suşuna insan izolatlarında daha çok rastlanılmıştır. İnsanlardaki konjenital enfeksiyonlardan sorumlu tutulan suş ise Tip I suşudur (Durdu, 2008).

### 2.4. Morfoloji

Obligat intrasellüler parazit olan *T. gondii*, Retüküloendotelyal sistem, serebral parankim, pulmoner parankim, çizgili kaslar, kalp kası ile oküler bölge vb. organlara ait hücrelerin sitoplazmalarında ve çekirdeklerinde çoğalabilmektedir (Roos ve ark., 2008). Enfekte edebilen üç dönemi vardır; hızlı bölünen invaziv takizoit, yavaş bölünen ve doku kistinde yaşayan bradizoit ve ookistte korunmuş formu olan sporozoittir (Unat ve ark., 1995).

#### 2.4.1. Takizoitler (trofozoitler)

4-8 µm boyunda, 2-4 µm genişliğinde ve hilal görünümündedir. Parazitin bir ucu sivri diğer ucu kabadır ve çekirdek kaba uç tarafındadır (Yazar ve ark., 2015). Çekirdek, Giemsa veya Wright boyası ile boyanırsa kırmızı-mor görünürken; sitoplazma, mavi boyalı görünür. *T. gondii* tıpkı ökaryotlar gibi nükleus, mitokondri ve golgi cisimciğine sahip olmakla birlikte parazitin apex tarafında hücreye invaze olmak için gerekli olan mikronem, roptri ve dens granülleri de vardır. İnnen membran parazite şekil verir ve paraziti çevreler (Kara, 1997).

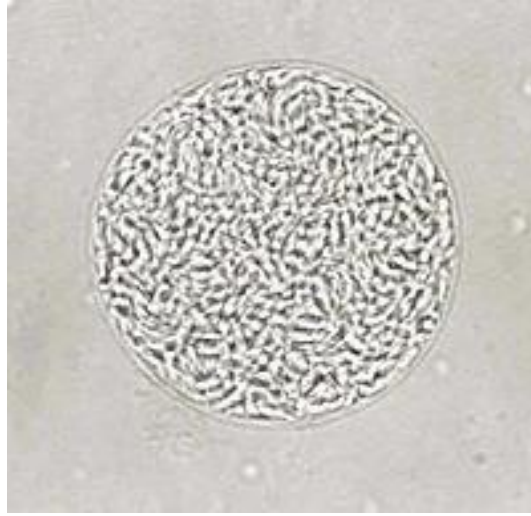


Şekil 2.1. *Toxoplasma gondii* trofozoiti (DO, 1992).

#### 2.4.2. Bradizoit (kistler)

10-120  $\mu\text{m}$  büyüklüğündeki *bradizoitler*, parazitin intrasellüler ortama girmesinden sonra, selüler immünitinin aktifleşmesiyle meydana gelen doku kistlerinin iç kısmında sessiz çoğalması ile meydana gelir. Takizoitlere benzerler fakat farklı olarak; çekirdekleri arkadadır, çok sayıda glikojen vakuölü içerirler ve PAS boyası ile güçlü boyanırlar (Montoya ve ark, 2000).

Kist tüm dokularda oluşabilir, daha çok nöral hücrelerde, retinada, kaslarda bulunabilir ve kimi zaman senelerce uykuda kalır. İmmüsupresif tedavi alanlarda, nakil yapılanlarda, immün direncin azaldığı zamanlarda, kanserlilerde, HIV(+) olanlarda bazı nedenlere bağlı reaktivasyon olmaktadır (Nicolle ve Manceaux, 2009).

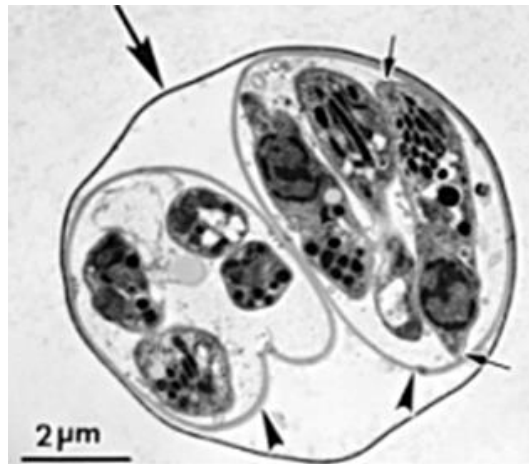


**Şekil 2.2.** Fare beyninde bulunan doku kisti içindeki bradizoitler (DO, 1992).

#### **2.4.3. Ookistler (kedi dışkılarındaki form)**

Ookistlerin ebatları  $11-14 \mu\text{m} \times 9-11 \mu\text{m}$ 'dir. Kedigillerin bağırsak sisteminde eşeyli üreme ile oluşur ve dışkıyla atılan formdur, enfektiftir. Her bir ookist, 2 sporokist içerir; her sporokist, 4 sporozoit içerir. Ookist duvarı fiziksel etkenlerden korunmasına yardım eden intakt tabakalardan oluşmaktadır. Kedi dışkısı ile atılan form uygun nem ve hava koşullarında enfektif hale gelir. Bu evreye sporulasyon denir (Özcan, 1998).

Ookistler, sporlanmadıkça bulaştırıcı değildir. Ookist, kediden başka bir hayvanda oluşamaz. Bu yüzden, kedi son konak (ana konak), diğer tüm sıcakkanlı hayvanlar ise ara konaktır (Afonso ve ark., 2006).



**Şekil 2.3.** *T. gondii* ookisti (DO, 1992).

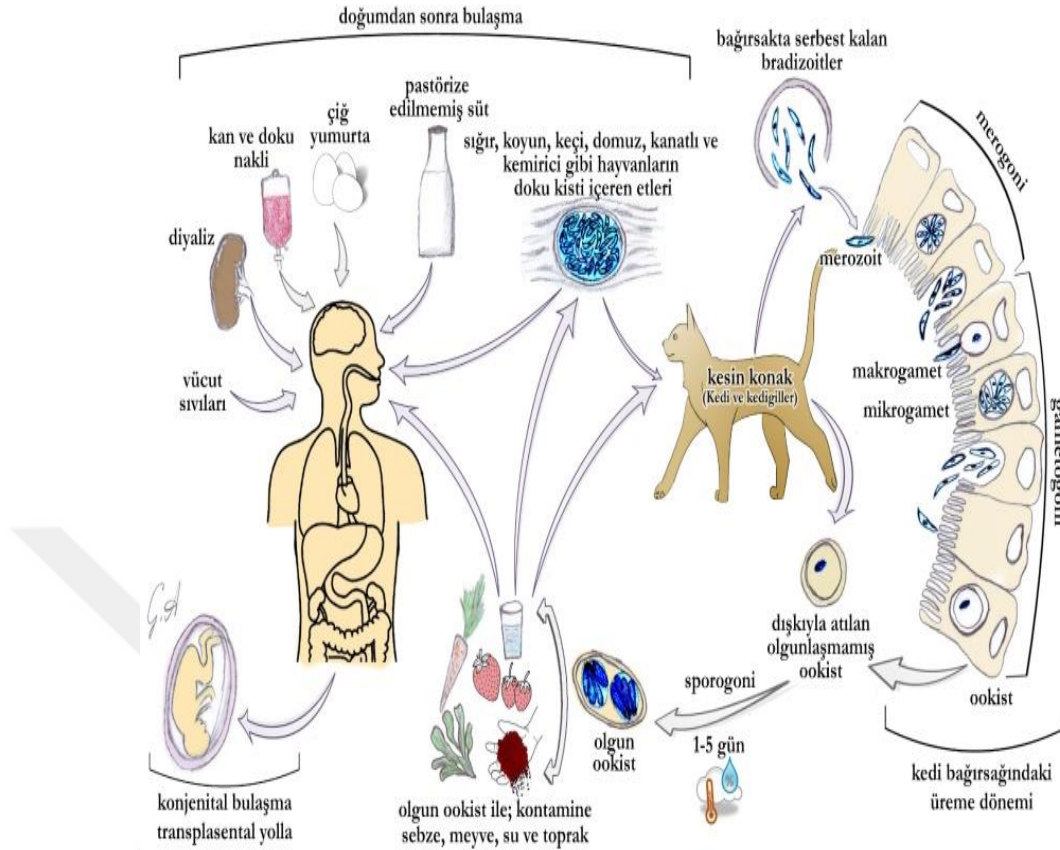
## 2.5. Hayat Döngüsü

*Toxoplasma gondii*'nin hayat döngüsünde kedi ve kedigiller ile ilgili olan kısmı 3 dönemde meydana gelir. Aseksüel dönemde merogoni ile merozoitler, gametogoni ile gametler, seksüel dönemde de sporogoni ile ookistler oluşur. Eşeyli üreme dönemi, kedi ve kedigiller dışındaki hayvanlarda oluşmamaktadır (Dubey, 1998).

Alınan gıdalarla parazitin herhangi bir döneminin kedinin incebağırsak epitel hücrelerine girmesi ile başlayan intestinal faz, kedigiller haricindeki hayvanlarda gerçekleşmez. Sporozoitler trofozoite, bağırsak epitel hücresinde kendisinin oluşturduğu parazitoforik vakuolde dönüşür. Oluşan trofozoitler bölünerek çoğalır ve bir trofozoitten 2 ila 40 kadar merozoit oluşur. Birkaç gün içinde sayıları artan merozoitler, hücreyi parçalayarak başka hücrelere yayılmaya başlar (Ferguson, 2002).

Hücreye giren bu merozoitlerden mikro ve makrogametosit oluşur. Oluşan her bir mikrogametosit, 12 mikrogamet meydana getirir. Bulundukları hücreyi parçalamasının ardından makrogamet içeren hücreye girerler. Hücre içindeki mikrogamet, makrogameti döllemesiyle zigot oluşur. Oluşan zigot da ookisti oluşturur ve kedigillerin bağırsak boşluğuna atılır. Dışkı ile dışarı atılan ookist uygun ortam ve şartlarda sporlanır. Bu evrede her bir ookist içinde 2 adet sporokist, her bir sporokist içinde 4 adet sporozoit meydana gelir. Bu aşamalardan geçen ookist artık enfektif hale gelir (Duncanson ve ark., 2001).

Kedi dışındaki canlılara enfektif ookistler; doku kisti bulaşlı gıdalarla yahut tüm vücut sıvılarıyla yerleşebilmektedir. Oral olarak alınan ookistlerin içindeki sporozoitler serbest kalır ve her biri intestinal epitel hücreler içine girip çoğalmaya başlar. Parazitler epitel hücreyi aşarlarsa, makrofajlar tarafından fagosit edilerek immün sistemden korunurlar ve tüm vücutta enfeksiyon oluşturabilme yeteneğine sahip olurlar (Montoya ve ark., 2004).



Şekil 2.4. *Toxoplasma gondii*'nin hayat döngüsü (Kara, 1997).

## 2.6. Epidemiyoloji

*Toxoplasma gondii*, dünyanın her yerinde dağılım gösteren zoonotik bir parazittir. İnsanlarda, eritrositler hariç tüm çekirdekli hücreleri; sıcakkanlı ve bazı soğukkanlı canlılarda, eritrositler de dahil tüm çekirdekli hücreleri enfekte etme özelliğine sahiptir (Leport ve Remington, 1992).

*Toxoplasma gondii* seroprevalansı, dünya çapında farklı oranlardadır. Bu oranlar %10 gibi düşük olabilmenin yanı sıra %80 civarlarında da seyir gösterebilmektedir. Dünya nüfusunun yaklaşık %30' unun enfekte olduğu düşünülmektedir (Jones ve Dubey, 2010; Beaman et al, 1995; Smith, 1991; Dubey ve Beattie, 1988).

Türkiye'de *T. gondii* seroprevalansının, evcil kedilerde %43; köpeklerde %68,57; atlarda %1,9; sığırlarda %66; koyunlarda %33,76; keçilerde %63,2; kümes hayvanlarında %1,66 ve av kuşlarında %9,09 olduğu tespit edilmiştir. Hayvanlarda Toxoplasmosis'in genel prevalansı %39,5 ile %78 arasında değişmektedir. Diğer yandan, Toxoplasmosis'in prevalansı, (i) yatan hastalar, (ii) et endüstrisinde çalışan

veya hayvanlarla yakın ilişki içinde bulunan mesleklerde çalışan insanlar, (iii) asemptomatik hastalar ve (iv) homoseksüelleri ve hemodiyaliz hastalarını içeren hastalar gibi farklı insan gruplarında, sırasıyla %13,9 -%85,3; %20,7 -%57,6; %23,0 - %43,7 ve %16,3 - %76,6 oranlarındadır(İnci ve ark., 2018).

Enfeksiyon farklı bulaş yolları vardır; nonpastörize süt ve ürünleri ile, akut dönemde vücut sıvıları ile, hemodiyaliz yoluyla meydana gelebilecek bulaşmalarda; bulaşın, alıcının bağışıklık sistemi baskılandığında, klinik problemler ortaya çıkmasına sebep olabileceği gibi; kist içeren yiyeceklerin alınması ile de seropozitiflik %50'lere ulaşmaktadır. Enfeksiyon dağılımında en büyük etken ise kedi dışkısı ile kontamine ookistlerin alınmasıdır (Kara, 1997; Robert-Gangneux ve Darde, 2012).

Oranlar, her ülkede farklı olabildiği gibi, bir ülkedeki değişik toplumlarda da farklılık gösterebilir. İklim farklılığı bunun sebepleri arasındadır. İklim, ookistin dış ortamdaki hayatta kalma uzunluğunu belirlediğinden, tropik iklimlerde, ılıman hava durumunun hakim olduğu kuru olmayan topraklarda seroprevalans yükselirken; soğuk ve kuru bölgelerde bu oran daha düşüktür. Doğu Avrupa'da %87, Afrika'da %71, Kuzey Amerika'da %33, Karaippler'de %26 iken İsveç ve İskoçya'da %12 dir (Altıntaş, 1997).

İklim faktörünün yanı sıra toplumların antropogenetik özellikleri de bu prevalansta önemli yer tutmaktadır. Örneğin sosyokültürel ve ekonomik seviye, kullanılan suyun hijyeni, yeme-içme alışkanlıkları ve sağlıkla ilgili diğer faktörler bu oranların belirlenmesinde pay sahibidir (Bahia-Oliveira ve ark., 2003).

Bu etkenlerle ilişkili olarak yapılan çalışmada lise öğrencisi kızlardan *T. gondii*'ye özgü IgM ve IgG antikor titreleri ELISA testi kullanılarak saptama yapılmıştır. 114 olguda IgG antikorları bakımından pozitiflik bulunmuşken IgM için 7 olguda pozitiflik tespit edilmiştir. Olgulardan 81 tanesinde kedi temas öyküsü bulunmaktadır. *T. gondii* seroprevalansı pozitifliği ile sosyokültürel seviye arasında doğru orantı vardır ve köy, kasaba gibi yerleşim yerlerinde yaşayanlara oranla şehir hayatı yaşayanlarda daha yüksek pozitiflik saptanmıştır

Ayrıca Kuzey Brezilya'da yapılan bir çalışmada, aynı yaş grupları içinde düşük düzeyde sosyo-ekonomik seviyesi olanlarda seroprevalansın %84, orta düzeyde %62, yüksek ekonomik düzeyli bireylerde oranın %23 olduğu gösterilmiştir. Düşük sosyo-

ekonomik seviyesindeki %84 seroprevalanstaki bireyler incelendiğinde çoğunun 15 yaş altı olduğu, yüksek sosyo-ekonomik seviyedeki bireylerde ise 20 yaşından sonra geçirdiği gösterilmiştir (Robert-Gangneux ve Darde, 2012).

2010-2011 yıllarında, Afyon civarında 20. gebelik haftasının altındaki gebelerde *T. gondii* seroprevalansının geriye dönük olarak araştırıldığı bir çalışmada; %22,7 olguda IgG pozitifliği tespit edilirken IgM antikorundaki pozitiflik %1,6 olarak tespit edilmiştir (Aşık, 2013).

2011 ile 2013 yılları arasında 16 ile 45 yaş arası hamile kadınların, gebeliğinin ilk üç ayındaki *T. gondii* seroprevalansının geriye dönük olarak araştırıldığı bir çalışmada; IgG serum örneklerinin %37,2'sinde pozitif iken IgM yalnız %0,9 oranda pozitif bulunmuştur (Çeltek, 2014).

## 2.7. Semptomlar

İnsanlarda iki tür enfeksiyon görülür; ilki kongenital enfeksiyon, diğeri postnatal enfeksiyondur. Önceden enfekte olmuş ve bağışıklığı olan kadınlar, gebe kaldıklarında, fetuslar parazitten etkilenmez. Daha önce parazite karşı bağışıklık geliştirmemiş kadınlar, gebeyken enfekte olursa, takizoitler oluşur ve plasentadan geçip fetusu enfekte eder.

Kongenital toxoplasmosiste fetal ensefalit, hidrocefali, göz ve deride problemleri, sarılık ve hepatomegali görülür. Nöronların yıkılmasına bağlı intrakranial kalsifikasyonlar ortaya çıkar. Postnatal ölüm oranı yüksektir. Daha çok mental retardasyon ve sonra göz problemleri oluşabilir.

Doğum sonrası görülen vakaların birçoğunda, tanı konmadan iyileşme görülür. En sık klinik prezentasyon lenfadenopatidir. Farklı olarak egzantemli form, serebrospinal form ve oftalmik formları da mevcuttur. Kronik toxoplasmosisli hastalarda bağışıklık baskılanmasına sebep olan AIDS gibi hastalıklar ve bazı immunsupresif ilaçların kullanımıyla kistler açılır ve bradizoitler, takizoite dönüşüp yeniden hızlı çoğalmaya başlar. Bu şekilde akut enf nöks etmiş olur. Bu durumda prognoz çok ağır seyredebilir. Bu olaylarda çoğunlukla göz sorunları ve mortal seyreden ensefalit görülür. (Yaman, 2007).

## 2.8. Tanı

Toxoplasmosisin klinik belirtileri tutulan organa göre değişir. Doğru tanı için birçok tanı yöntemi kullanılır. Bunların bazıları, direkt bazıları indirekt tanı yöntemleri olarak adlandırılır. Direkt tanı yöntemleri; etken izolasyonu, PCR, antijen spesifik lenfosit transformasyon, lenfosit kopyalama tekniği ve histolojik metotlar ile yapılmaktadır. İndirekt yöntemler ise toxoplasmaya özgü antikorları belirlemek üzere kullanılan serolojik testleri kapsamaktadır. Serolojik tanı, subklinik vakalarda büyük önem taşır. En çok kullanılan serolojik testler; Sabin-Feldman Test (SFT), Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA), İndirekt Fluoresan Antikor Testi (IFAT) ve Modifiye Aglutinasyon Test (MAT) dir. Bunun dışında İndirekt Hemaglutinasyon Testi (IHAT), Komplement Fiksasyon Testi (CFT), Lateks Aglutinasyon Test (LAT) gibi testler de kullanılır. Serolojik tanı için, uygulanacak yöntemin özgüllüğü ve duyarlılığı oldukça önemlidir. Bu noktada testlerin hiçbiri yalnız başına yeterli değildir ve özellikle akut enfeksiyonlarda tanı için IgM oluşup oluşmadığını gösterecek yöntemler kullanılmalıdır. Latent enfeksiyonlar ve diğer Apikompleksan parazitlerin varlığında, *Toxoplasma gondii*'ye karşı düşük antikor titrasyonunda kross reaksiyon görülebilir (Yaman, 2007).

## 2.9. Korunma

İmmünsupresif hastalarda ve duyarlanmamış hamilelerde hastalığa yakalanmamaya çok dikkat edilmelidir. Hastalığın bulaşmasını ve parazitin hayat döngüsünü bildiğimiz için, basit önlemler alınarak korunma sağlanabilmektedir. Toxoplasmosisten korunmada alınması gereken primer önlemler şöyle sıralanabilir: hiç pişmemiş ya da tam pişmemiş et ve et ürünlerinden uzak durulmalıdır. Etleri 66°C'de pişirmekle ve -20°C'de dondurmakla doku kistlerinin öleceği bildirilmektedir. Pişmemiş et veya sebzelere dokunduktan sonra eller iyice temizlenmelidir. Pişmemiş yumurta yemekten ve kaynatmadan yahut pastörize edilmemiş süt içilmemelidir. 4-5 dk kaynatılmış ve 3-4 dk sahanda pişirilmiş yumurtada canlı parazit gösterilmiştir. Keçi sütünün, pastörize edilse dahi enfeksiyona sebep olabileceği gösterilmiştir. Çiğ yenen marul gibi yeşillikler yenmeden önce iyice yıkanmalıdır. Kedilerle sıkı ilişkiden kaçınılmalıdır. Hamamböceği, sinek gibi artropodların vektör olabileceği ihtimaline istinaden, artışıları engellenmelidir. Seropozitif donörden, seronegatif hastaya ve immünsupresif bireylere

herhangi bir doku nakli yapılmamalıdır. Doğurma çağındaki kadın bireylerin toksoplazmozdan korunmalarına ilişkin bilgilendirilmeleri gereklidir (Kara, 1997).

## 2.10. *Toxoplasma gondii* GRA4 Geni

*Toxoplasma gondii*'nin sahip olduğu antijenler 4 ana grupta toplanabilir.

- 1) Yüzey Antijenleri: Parazit yüzeyinde bulunurlar ve immünizasyon oluşturmak için en çok çalışılan protein grubudur.
- 2) Rhoptry Proteinleri: ROP grubu
- 3) Mycronome Proteinleri: MIC grubu
- 4) Dense Granule Proteinleri: GRA grubu, beslenme sarmalında görev alır ve ayrıca parazit ile konak arasındaki protein trafiğinde rolü vardır.

Parazitofor vakuole salgılanmasının ardından, GRA proteinleri olarak adlandırılan yoğun granül proteinleri, vakuolar membran ile bağlantılı bir tübüler membran kompleksi dahil olmak üzere farklı konumlara hedeflenir. Bu intravakuolar ağın oluşumunu daha fazla tanımlamak için, parazitofor vakuol içinde GRA4 ve GRA6'nın salgılanması, kaçakçılığı ve membran ilişkisi araştırılmıştır. Hücre dışı parazitlerde, GRA4 ve GRA6, özellikle çözünür proteinler olarak paketlenen yoğun salgı granüllerinde bulunmuştur. Vakuole salınmasının ardından, GRA6, daha önce GRA2 için bildirildiği gibi, ağa yol açan birçok katmanlı vezikül kümesine bağlandığı parazitin arka ucuna hızla yer değiştirmiştir. Buna karşılık GRA4, vakuolün lümeni boyunca dağılmıştır ve ancak daha sonra, vakuol boyunca dağılmış bulunan olgun ağ ile ilişkilendirilmiştir. Hücre fraksiyonasyonu ve denatüre edici ajanlar ile muamele, GRA4'ün ağ membranları ile ilişkisine güçlü protein-protein etkileşimleri aracılık ettiğini ortaya koymuştur. Buna karşılık GRA6, hidrofobik etkileşimlerden ağırlıklı olarak etkilendi ve bu proteinin vakuol içinde bulunan fosforile bir formu, ağ membranları ile artan ilişkisi olduğunu göstermiştir. Çapraz bağlama çalışmaları, GRA4 ve GRA6'nın intravakuolar ağ ile stabil bir şekilde ilişkili olan multimerik bir kompleks oluşturmak için GRA2 ile spesifik olarak etkileşime girdiğini ortaya koymuştur. Hem protein-protein hem de hidrofobik etkileşimlere dayanan bu protein kompleksinin oluşumu, vakuol içinde besin veya protein taşınmasına katılabileceği bildirilmiştir. (Labruyere ve ark., 1999).

Kronik *Toxoplasma gondii* kistinin nasıl geliştiği ve GRA moleküllerinin bu aşamadaki katkısı hakkında çok az şey bilinmektedir. Intravakuolar ağ bağlantılı yoğun granül (GRA) proteinleri GRA1, GRA2, GRA4, GRA6, GRA9 ve GRA12'yi takizoit aşamasındaki parazitofor vakuolün farklılaşmasından sonra in vitro kist gelişimi sırasında araştırılmıştır. Enfeksiyondan sonraki farklılaşmanın ilk gününde GRA1, GRA4, GRA6, GRA9 ve GRA12 moleküllerinin kist çevresinde lokalize olduğu Dolichos biflorus aglutinin boyası ile tespit edilmiştir. Buna karşılık GRA2 moleküllerinin kist matriksinde lokalize olduğu tespit edilmiştir. Farklılaşma sonrası 2. günde, GRA2'nin kist çevresine lokalizasyonu ile çıkan GRA1, GRA4, GRA6 ve GRA9, kiste sürekli bir matris modeli oluşturduğu, buna karşılık, GRA2 ve GRA12, kist gelişimi boyunca belirgin kist matriks puncta'da ortak lokalize edildiği gösterilmiştir. GRA2, GRA6 ve GRA12 kist duvarının dış ve iç katmanlarında yer alırken, GRA1, GRA4 ve GRA9 ağırlıklı olarak kist duvarının iç katmanlarında yer almaktadır. GRA2 ve GRA12, farklılaşma sonrası 7. günde kist duvarında gözlemlenmiş ve bununla birlikte, farklılaşma sonrası 10. günde GRA12, kist duvarından kist matriksindeki noktaya yeniden taşındığı gözlemlenmiştir. Null-GRA2 parazitlerinin farklılaşması, normal bir kist matriksi oluşturma yeteneğinin kusurlu olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ek olarak, GRA1 dışında herhangi bir intravakuolar ağ ile ilişkili GRA proteininin silinmesi, kistin iç kısmına göre kist çevresinde kist duvarı proteinlerinin birikme oranını azaltmıştır. Bulgular, kist gelişimi sırasında GRA protein lokalizasyonunun dinamik modellerini ortaya koymakta ve intravakuolar ağ ile ilişkili GRA proteinlerinin kist matriksi ve kist duvarı yapılarının oluşumunu ve olgunlaşmasını düzenlediğini göstermiştir. (Guevara ve ark., 2019).

GRA4 hızlı IgG, IgM ve IgA cevabında rolü olduğu bilindiğinden hem tanı hem aşı çalışmalarında kullanılan majör proteinlerden biridir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereçler

Deneylerde, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'ndaki cihazlar (Tablo 3.1.) ve malzemeler, solüsyon ve besi yerleri, canlı materyaller (Tablo 3.2.) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 3.1.** Deneylerde kullanılan cihazlar.

| Cihaz/Adı                                                |
|----------------------------------------------------------|
| Santrifüj (Hettich 32R, Almanya)                         |
| Jel görüntüleme cihazı (ChemiDoc Mp, Bio-Rad, ABD)       |
| Elektroforez güç kaynağı (Bio-Rad, ABD)                  |
| Vorteks (Bencmixer, Benchmark, ABD)                      |
| İnvert mikroskop (Leica, ABD)                            |
| Termalcycler (Sensoquest, Almanya)                       |
| NanoDrop 2000c Spektrofotometre (Thermo scientific, ABD) |
| Su banyosu Jeio tech BS-06 (Jeiotech, G. Kore)           |
| İnkübatörlü shaker (Jeio tech SI-300, G. Kore)           |
| Kuru Isı Bloğu, Digital heat blog (Benchmark, ABD)       |
| Mikrodalga fırın, MD 554 (Arçelik, Türkiye)              |
| Manyetik karıştırıcı, MK 418 (Nüve, Türkiye)             |
| -20 Derin dondurucu (Siemens, Almanya)                   |
| -80 Derin Dondurucu (Panasonic, Japonya)                 |
| +4 buzdolabı (Uğur, Türkiye)                             |
| Hassas terazi (Radwag, Polonya)                          |
| Yatay elektroforez cihazı (Bio-Rad, ABD)                 |
| Distile su cihazı (Elga, UK)                             |

**Tablo 3.2.** Deneylerde kullanılan malzemeler.

| Sıra | Tanımı/Adı                                                                 |
|------|----------------------------------------------------------------------------|
| 1    | TgGAR4 F                                                                   |
| 2    | TgGRA4 R                                                                   |
| 3    | 15 ml’lik falkon, santrifüj tüpü (Sigma-Aldrich, ABD)                      |
| 4    | Ampisilinli LB katı besiyeri                                               |
| 5    | Ampisilinli LB sıvı besiyeri                                               |
| 6    | Penicillin-Streptomycin 100X Solution (5000 units) (Invitrogen, ABD)       |
| 7    | Dokudan DNA İzolasyon Kiti (QIAamp, Qiagen, ABD)                           |
| 8    | PCR Master mix 2x (GeneAll Biotechnology, G. Kore)                         |
| 9    | Agaroz (Lonza, ABD)                                                        |
| 10   | 100 bç. DNA Marker (GeneAll Biotechnology, G. Kore)                        |
| 11   | 500 bç. DNA Marker (GeneAll Biotechnology, G. Kore)                        |
| 12   | 1 kb DNA Marker (GeneAll Biotechnology, G. Kore)                           |
| 13   | CloneJET PCR Clonning Kit (Thermo Scientific, ABD)                         |
| 15   | EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep Kit (BioBASIC, Kanada)              |
| 17   | dNTP miks (Bio-Basic Kanada),                                              |
| 18   | Plasmid izolasyon kiti (Roche, Almanya)                                    |
| 20   | PCR pürifikasyon kiti (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche, ABD) |

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Total Genomik DNA İzolasyonu

ERÜ tıp fakültesi hastanesi kadın doğum polikliniğine başvuran, amniyosentez yapıp Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarına tetkik için müracaat eden ve toxoplasmosis tanısı konulan toplam 4 hastadan alınan amniyon sıvılarından Genomik DNA izolasyonu ticari nükleik asit ekstraksiyon kiti (QIAGEN, ABD) ile prosedürüne uygun olarak aşağıda sıralandığı gibi yapıldı.

1. 1,5 ml hacmindeki tüpler etiketlenerek hastalardan temin edilen amniyon sıvılarından 500 µl’lik örnek hazırlandı.

2. Hazırlanan örneklerin üzerine 500 µl ATL buffer eklenerek karıştırıldı ve santrifüj yapıldı. Santrifüj sonucu iki faz oluştu, üstteki sıvı kısım alınarak farklı bir tüpe eklendi.
3. 4 µl RNase (100mg/ml) tüpe eklendi. Yaklaşık 15 saniye civarı vortekslendi ve 2 dk. oda ısısında inkübasyona kondu.
4. Karışımın üzerine 200 µl AL Buffer eklendikten sonra yaklaşık 15 saniye vortekslendi. Sonrasında örnekler 70°C sıcaklıkta 10 dk. boyunca inkübasyona bırakıldı ve 15 saniye vortekslendi.
5. Vortekslendikten sonra 200 µl %100 etanol eklenip tekrar 15 saniye vortekslendi. Karışım spin kolona aktarıldı. 1 dk. süresince 8000 rpm hızda santrifüj yapılarak süzüntü çıkarıldı ve filtrasyon kolonu 2 ml hacminde farklı bir tüpe aktarıldı.
6. 500 µl AW1 buffer eklendikten sonra kolon 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Tüpün dibine çöken süzüntü atıldı ve filtrasyon kolonu yeni bir 2 ml'lik tüpe aktarıldı.
7. 500 µl AW2 buffer eklenerek 14000 rpm devirde 3 dk. santrifüje bırakıldı. Santrifüj sonrasında dibe çöken süzüntü atılıp filtrasyon kolonu 2 ml'lik başka bir tüpe aktarıldı.
8. İçerisinde filtrasyon kolonu bulunan bu yeni tüp 14000 rpm devirde 1 dk tekrar santrifüje bırakıldı.
9. Filtrasyon kolonu 1,5 ml hacmindeki farklı bir tüpe aktarılıp üstüne AE tampon solüsyonundan 200 µl eklendi. Oda sıcaklığında 1 dk. bekletilerek 14000 rpm'de 1 dk boyunca santrifüj yapıldı.
10. Son basamak 1 kez daha tekrarlanıp filtratta bulunan DNA materyali PCR işlemine dek -20°C'de saklandı.

### 3.2.2. *Toxoplasma gondii* GRA4 Genine Göre Tasarlanan Primerler ve PCR Koşulları

PCR döngüsünde kullanılması için <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/M76432.1> referans dizisi kullanılarak *Toxoplasma gondii* GRA4 geninin açık okuma çerçevesini (ORF) bütün olarak amplifiye eden (1038 bç) TgGRA4 F (5'-ATGCAGGGCACTTGGTTTTTC-3') ve TgGRA4 R (5'-TCACTCTTTGCGCATTCTTTCC-3') primerleri oluşturulmuştur. PCR solüsyonu; totalde 25 µl olacak şekilde 12,5 µl PCR Master miks (2x) (GeneAll Biotechnology, G. Kore), 2 µl genomik DNA, 1 µl TgGRA4 F (20 pmol) ve 1µl TgGRA4 R (20 pmol) primerleri ile oluşturuldu. 95°C sıcaklıkta 5 dk pre-denatürasyon yapıldıktan sonra 94°C'de 1 dk, 63°C'de 2 dk, 72°C'de 1 dk olmak üzere toplam 35 döngülük inkübasyondan sonra 72°C sıcaklıkta 30dk. süren son uzama ile sonuçlanan PCR programı tercih edildi. Elde edilen PCR ürünü, 100 bç DNA Ladder birlikteliğinde etidyum bromid ile boyalı % 1.5'luk agaroz jelde elektroforez edildi ve görüntüleme cihazıyla (Bio-Rad chemidoc Mp Jel ABD) incelenmiştir.

### 3.2.3. PCR Ürününün Saflaştırılması

PCR materyali, jelden kesildikten sonra pürifikasyon kitinin (Roche, ABD) prosedürüne uyarak saflaştırıldı

1. Her 10 mg'lık PCR ürünü içeren jel parçası için 10 µl membran bağlama solüsyonu ilave edilmek üzere karışım hazırlandı. Jel parçası tamamen çözülene kadar vortekslendi ve 50-65°C'de inkübe edildi.
2. Filtrasyon kolonu 1,5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüpüne kondu. Oluşan karışım, filtrasyon kolonuna aktararak oda ısısında 1 dk inkübe edildi.
3. Sonra 16000 xg'de 1 dk. santrifüj edildi ve tüpün dip kısmında kalan çökelti ayrılarak filtrasyon kolonu 1,5 ml'lik yeni, steril bir tüpe alındı.
4. Tüpün içindeki filtrasyon kolonuna tekrar 700 µl membran yıkama solüsyonu eklenerek 16000 xg'de 1 dk. santrifüj işlemi uygulandı. Süzüntü atılarak filtrasyon kolonu 1,5 ml'lik steril yeni bir tüpe aktarıldı.

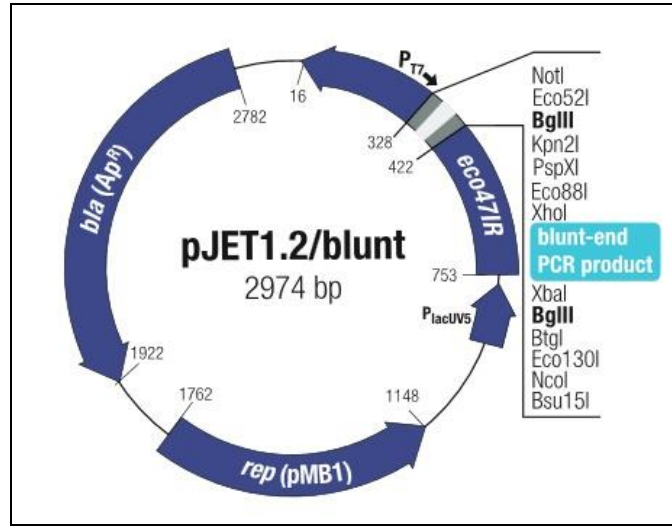
5. Filtrasyon kolonuna bu aşamada 500 µl membran yıkama solüsyonu eklenip 16000 xg'de 1dk. santrifüj işlemi uygulandı.
6. Süzüntü atıldıktan sonra filtrasyon kolonu 1,5 ml'lik yeni bir steril tüpe aktırılarak boş kolon 16000 xg'de 1 dk.'lık santrifüj işlemi tekrar edildi ve kapak açık tutularak rezidüal etanolün uçması sağlandı.
7. Yeni bir steril tüpe aktarılan filtrasyon kolonuna 50 µl elüsyon tamponu eklendikten sonra 16000 xg'de 1 dk. santrifüj edildi. Filtrasyon kolonu atılarak saf PCR ürünü elde edildi.
8. Saflaştırılan PCR ürünü, klonlama işleminin yapılacağı ana kadar -20°C'de saklandı.

#### **3.2.4. GRA4 Geninin Klonlanması**

PCR ürününü klonlamak amacıyla CloneJET PCR Clonning Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanıldı.

1. Toplamda 18 µl'lik klonlama reaksiyonu; 10 µl reaksiyon tamponu, 1 µl blunting enzim, 4 µl PCR ürünü ve 3 µl steril su ile hazırlandı.
2. Hazırlanan karışım 5 sn. vortekslendikten sonra santrifüj edildi ve 70°C'de 5 dk inkübasyona bırakıldı. Inkübasyondan sonra ligasyon reaksiyonu buz üzerine alındı.
3. Karışıma, 1µl pJET1.2/blunt Cloning Vector (50ng/µl) (Şekil 3.1.) ve 1 µl T4 DNA Ligaz eklendikten sonra mevcut karışım steril distile su eklenerek 20 µl'ye tamamlandı.
4. Oluşan bu karışım 5 sn. vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 5 dk. bekletildi.

Bu son aşamadan sonra oluşan ligasyon reaksiyon ürünü genin garanti altına alınması amacıyla -20°C'de saklandı.



**Şekil 3.1.** Vektör haritası; pJET1.2/blunt (2972 bç) (Thermo Scientific, ABD).

### 3.2.5. Transformasyon

Rekombinant plazmidin kompetan hücrelere transformasyonu kit protokolüne göre aşağıdaki gibi yapıldı:

1. -80°C’de muhafaza edilen One ShotTOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, ABD) hücreleri buz üzerinde çözdürüldü.
2. *E. coli* hücrelerinin 100 µl’sine ligasyon ürününün 3µl’si ilave edildi.
3. Elde edilen karışım 30 dk boyunca buz üzerinde inkübe edildi.
4. Karışım 30 sn, 42 °C’de sabit tutularak su banyosunda ısı şoku yapıldıktan sonra hızlı bir şekilde tekrar buz içerisine alındı ve 1 dk bekletildi.
5. Transforme olmuş hücrelerin üstüne oda sıcaklığındaki 250 µl SOC besiyeri ilave edildi.
6. Bu hücreler 225 rpm’de 37°C’de inkübatörlü çalkalayıcıda 1,5 saat inkübe edildi.
7. Ampisilinli LB katı besiyerine SOC sıvı besiyeri ikiye ayrılarak ekildi ve pleytler 37°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı.
8. İnkübe edilen LB Katı besiyerlerinde koloni gelişimi gözlemlendikten sonra besiyerindeki koloniler numaralandırıldı.

Klonlamanın doğrulanması için amp(+)LB katı besiyerinde oluşan kolonilerin rekombinant plazmidi (pJET1.2+GRA4) içerip içermediği PCR tarama yapılarak kontrol edildi. Bunun için, koloniler kalıp DNA olarak kullanılıp koloni PCR yapıldı. Miniprep sonrası saflaştırılan PCR ürünü, DNA dizi analizi ile doğrulandı.

#### **Koloni PCR analizleri için,**

1. 0,5 ml'lik PCR tüpleri içerisinde 3.2.2'de anlatıldığı gibi PCR karışımı hazırlandı.
2. Tüpler numaralandırıldıktan sonra LB katı besiyerinde üreyen numaralandırılmış kolonilerden steril ortamda pipet ucu ile alınan örnekler, tüplerdeki karışımlara eklendi.
3. Bölüm 3.2.2.'deki protokol kullanılarak PCR programı kuruldu ve bant profilleri görüntülendi.
4. PCR ürünü, etidyum bromidle boyanmış %1,5'luk agaroz jelde yürütüldü ve jel ChemiDoc Mp görüntüleme cihazı (BioRad, Almanya) ile görüntülendi.

#### **3.2.6. Rekombinant Plazmid DNA Eldesi**

*Toxoplasma gondii* GRA4 gen dizilimini taşıyan plazmidleri içeren kolonilerden plazmid DNA izolasyonu için EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep Kit kullanıldı (BioBASIC, Kanada). Kit prosedürü aşağıdaki şekilde uygulandı;

1. Steril kabin içerisinde çalışılarak, LB katı besiyerindeki pozitif olduğu belirlenen koloniler pipet ucu yardımı ile alınarak 10 ml ampisilinli LB sıvı besiyerine ekim yapıldı.
2. Besiyeri gece boyunca 37 °C'de 225 rpm.'de inkübe edildi.
3. Üreme olan 10 ml kültürün tamamı 2 dk 12.000 rpm'de santrifüj edildi.
4. Üst sıvı atılarak önceden RNAaz ilave edilmiş olan 100 µl solüsyon-I pellete eklendi. Pelet çözdürülerek karışım oda sıcaklığında 1 dk bekletildi.
5. Daha sonra, süspansiyon halindeki pellet-solüsyon-I karışımı üzerine oda sıcaklığındaki 200 µl solüsyon-II eklendi. Tüp birkaç defa alt-üst edilerek

kariştırıldı ve oda sıcaklığında 1 dk bekletilerek mavi renkli homojen bir karişım elde edildi.

6. Karişıma 350 µl oda sıcaklığındaki solüsyon-III ilave edildi. Tüp nazıkçe kariştırılıp oda sıcaklığında 1 dk boyunca beyaz renkli ve akışkan olmayan bir çökelti oluşuncaya kadar bekletildi.
7. Karişım 5 dk 12.000 rpm’de santrifüj edilerek oluşan berrak üst sıvı toplandı ve kit içerisindeki kolona aktarıldı.
8. Kolon 2 ml’lik yeni bir tüpe alınarak 10.000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi.
9. Filtrat atılarak ve filtrasyon kolonu tekrar yeni toplama tüpüne yerleřtirildi.
10. Kolun üzerine 750 µl yıkama solüsyonu eklendi ve 10.000 rpm.’de 2 dk. santrifüj edildi ve kolon tekrar yeni tüpe yerleştirildi. Bu basamak birkez daha tekrarlandı.
11. Kolon boş olarak tekrar 10.000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi.
12. Filtrasyon kolonu 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne alınarak kolonun membran bölümüne gelecek şekilde 50 µl elüsyon tamponu eklendi.
13. Oda sıcaklığında 2 dk. inkübe edildikten sonra sonra 10000 rpm’de 2 dk santrifüj edilerek rekombinant plazmid saf olarak elde edildi.
14. Saflaştırılmış rekombinant plazmid miktarı ve kalitesi NanoDrop2000c-UV vis spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) cihazıyla ölçüldü.
15. Miniprep ile elde edilen rekombinant plazmid DNA’sının 5’er µl’si 3.2.2.’de analtıldığı gibi jelde görüntülendi.
16. Görüntülenen rekombinant plazmidlerin hedef geni içerip içermediğini anlamak için Bölüm 3.2.2.’de verilen protokol kullanılarak PCR kuruldu. DNA olarak miniprep ile elde edilen ve 1/10 oranında sulandırılmış rekombinant plazmidin 1 µl’si kullanıldı ve görüntülendi.
17. Doğrulanın rekombinant plazmid, DNA dizi analizine gönderilmek üzere -20 °C’de bekletildi.

### 3.2.7. Sekans ve Biyoinformatik Analizler

Farklı bireylerin amniyon sıvılarından elde edilen toplam 4 adet *T. gondii* GRA4 plazmid DNA izolatu çift yönlü sekans analizine tabii tutulmuştur. DNA dizi analizi için, PCR ürünü elektroforez sonrası agaroz jelden kesilerek alındı ve GeneAll Expin Combo GP-Gel PCR Purification Kit (GeneAll Biotechnology, G. Kore) protokolüne göre saflaştırıldı. Dizi analizi, BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Sti. (Ankara, Türkiye) firmasından hizmet satın alma yoluyla gerçekleştirildi. Firma tarafından Big Dye Cycle Sequencing v3.1 kit (AppliedBiosystems, ABD) kullanıldı ve sonuçlar otomatik DNA dizi analiz cihazında (ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer, ABD) analiz edildi. Dizi analizi F ve R PCR primerleri ile 2 defa gerçekleştirildi.

DNA dizileri Chromas v.1.45 (ConorMcCarty School of Science Griffith University, Avustralya) programı ile incelendi. F ve R primerleri ile çift yönlü yapılan dizi analizi sonuçlarının, Geneious v11.1.5 (Biomatters, ABD) (75) programı ile dizi hizalaması yapıldı ve GRA 4 genine ait konsensüs dizi belirlendi.

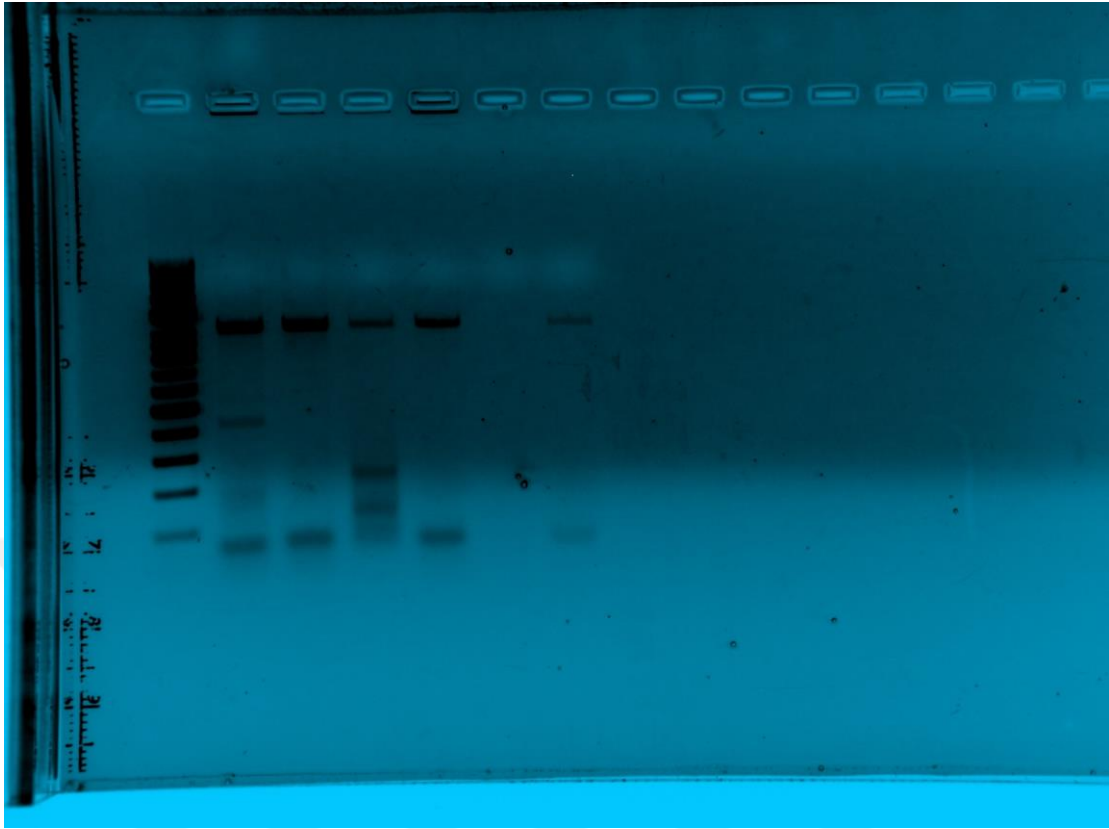
*Toxoplasma gondii* GRA4 geni DNA dizi analiz sonucu <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> internet adresinde yer alan web tabanlı BLAST (Basic LocalAlignmentSearchTool) sistemine girilerek GenBank'ta mevcut *Toxoplasma gondii*'ye ait diğer izolatların ilgili gen bölgesi sekanslarıyla Geneious 2020.1.1 yazılımı üzerinden çoklu hizalamaları yapıldı ve intraspesifik nükleotid ve aminoasit farklılıkları ortaya çıkarıldı.

GRA4 geninin ifade ettiğı proteinin tahmini moleküler ağırlığı ExpASy Biyoinformatik programı kullanılarak hesaplandı. Ayrıca proteinin domain özellikleri, antijenik bölgelerin varlığı ve sinyal peptid analizleri gibi biyoinformatik analizler Geneious Prime üzerinden EMBOSS Protein Analysis 1.0 plugin yazılımı kullanılarak yapıldı.

## 4. BULGULAR

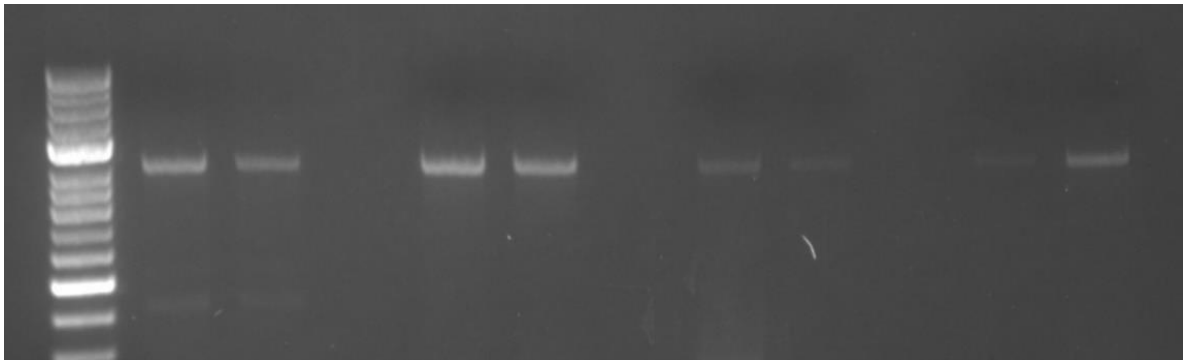
### 4.1. *T. gondii* GRA4 Geninin Amplifikasyonu

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarına gönderilen ve toxoplazmozis pozitif belirlenen toplam 4 adet amniyon sıvısı örneğine ait DNA izolatlarının tamamında hedef gen bölgesi yönünden amplifikasyon belirlenmiştir. Bazı pozitif izolatlar ile DNA bankamızda sakladığımız *T. gondii* genomik DNA'sından GRA4 geni için spesifik primerler ile yapılan PCR ürünleri 1038 bp uzunluğundadır ve Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.1.** PCR yöntemi ile *T. gondii* GRA4 geninin çoğaltılması ile oluşan 1038 bp'lik bant ve agaroz jeldeki görüntüsü M: Marker (1 kb Promega, ABD)

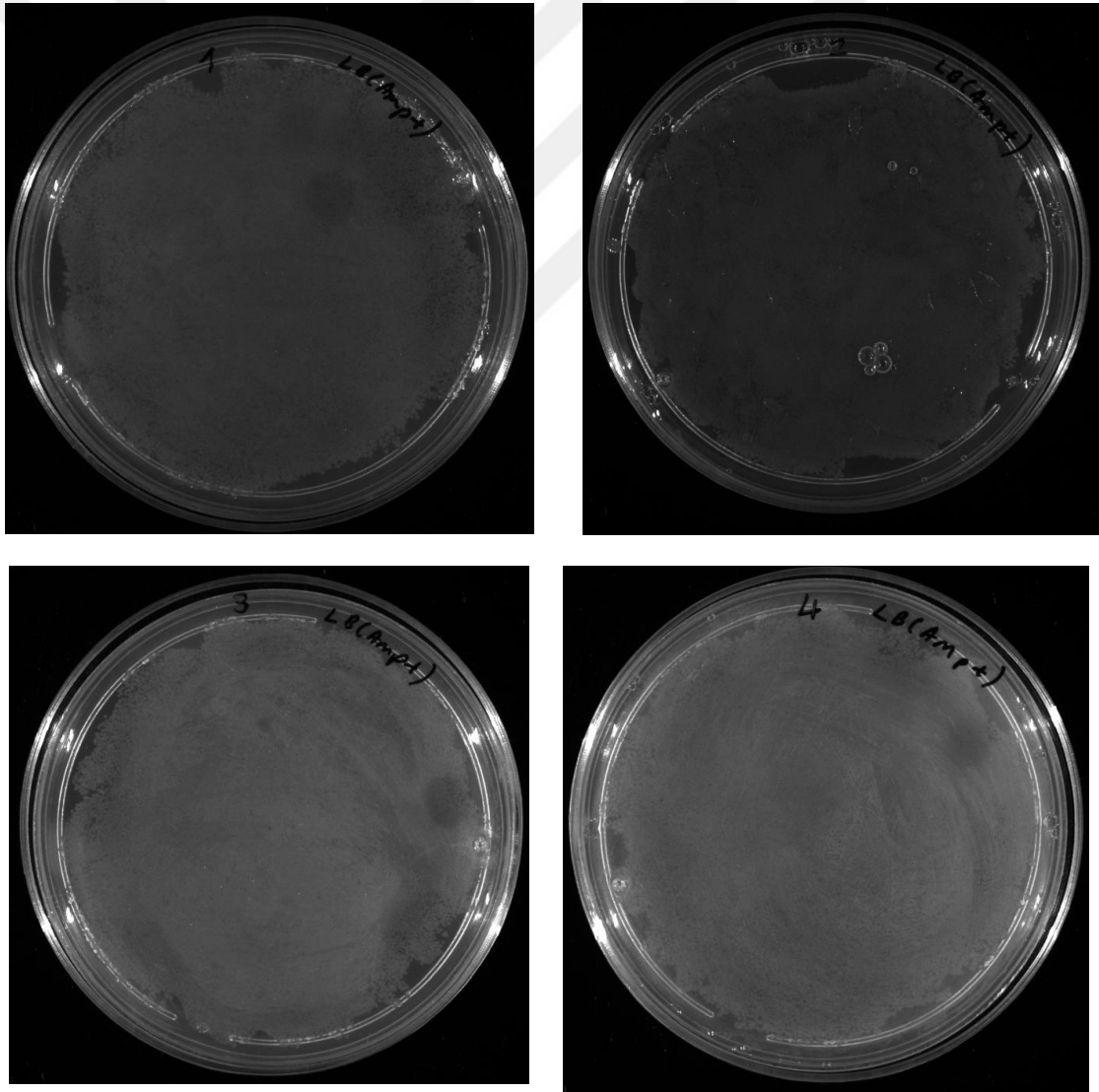
Jelde görüntüsü elde edilen PCR ürünleri bisturi yardımıyla ayrıldı ve 1,5 ml tüpe alındı ve jelden PCR Clean-Up System (Promega, ABD) kit prosedürüne göre agaroz jelden saflaştırıldı. Saflaştırılan 1038 bp *T. gondii* GRA4 PCR ürünleri agaroz jelde yürütüldü ve görüntülendi (Şekil 2.2 ).



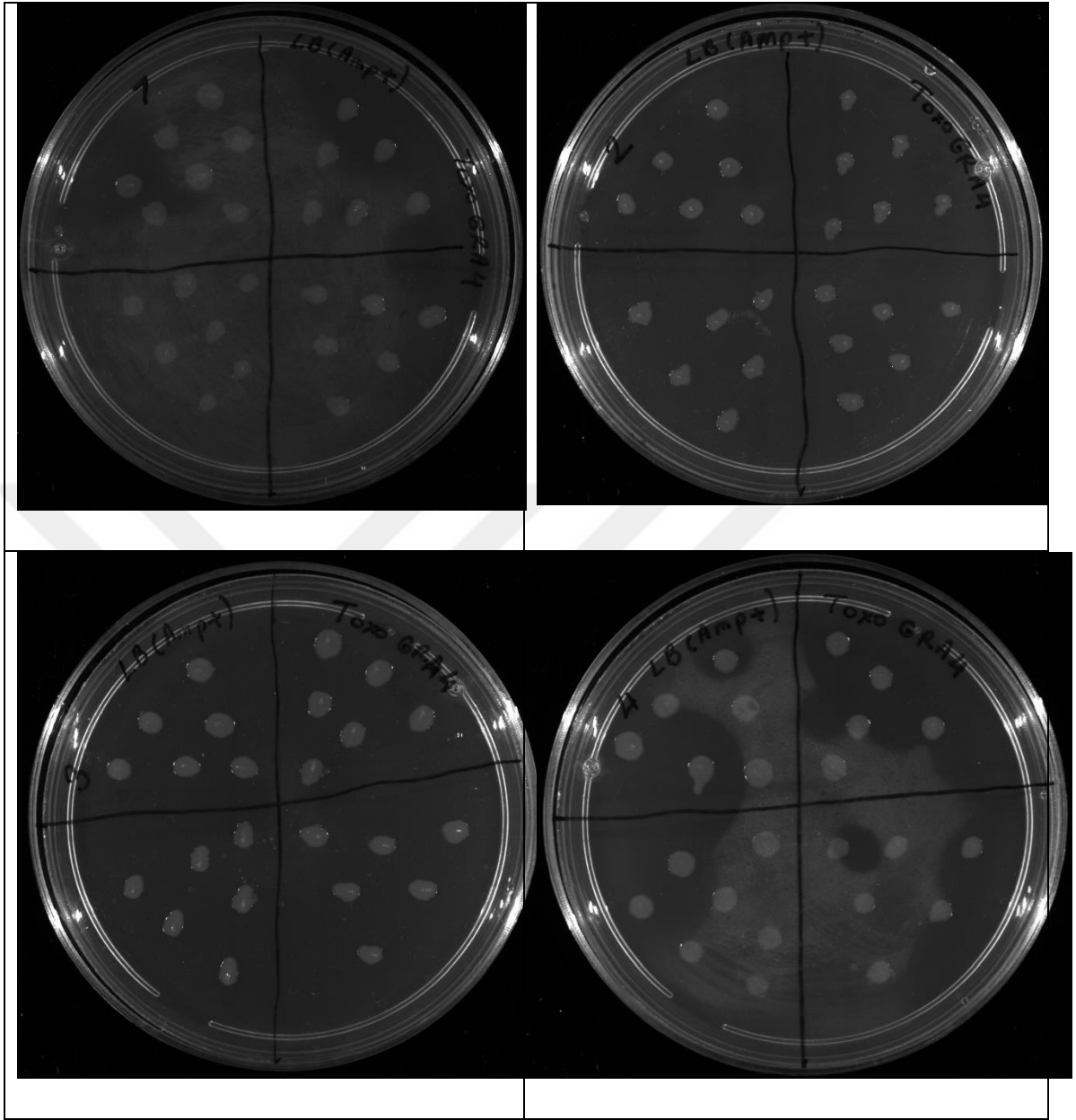
**Şekil 4.2.** Jelden pürifiye edilen PCR ürününün görüntüsü. 1-4: örnekler M: Marker (1kb Promega, ABD).

#### 4.2. pJET1.2/blunt Vektörüne Klonlama

Ortaya çıkarılan 1038 bç uzunluğundaki saflaştırılmış PCR ürünlerinin 4 µl'si ile hedef bölge CloneJET PCR Clonning Kit (ThermoScientific, ABD) kullanılarak pJET1.2/blunt klonlama vektörüne yerleştirilmiştir. Ligasyon sonucu elde edilen rekombinant plazmitler (rpTgGRA4), OneShot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, ABD) kompetan hücrelerine transforme edildi. (Şekil 4.3). Her bir örnek için klonlama ve transformasyon tekrarlandı. Daha sonra yine her bir örnek için transformasyon sonucu oluşan koloniler PCR taraması yapmak üzere antibiyotikli LB katı besiyerine tek nokta ekimi ile yapıldı (Şekil 4.4).



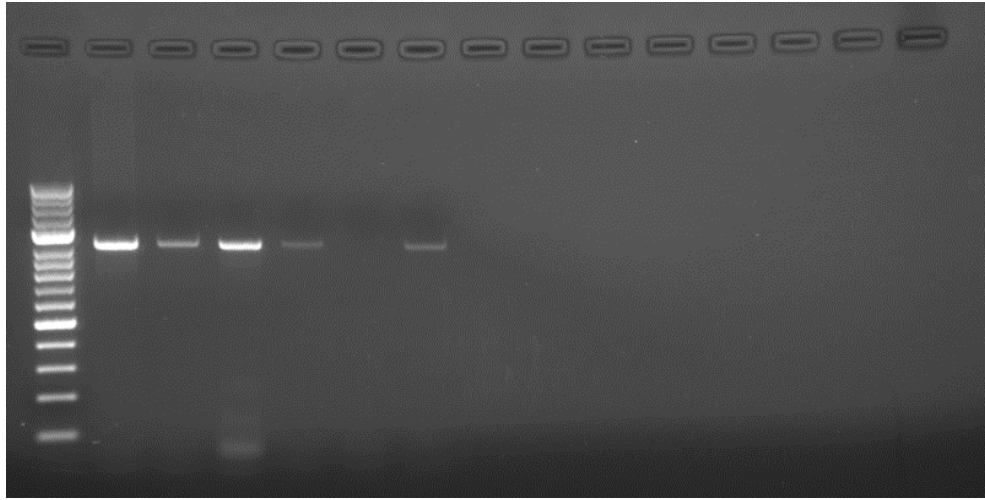
Şekil 4.3. Tranformasyondan sonra oluşan koloniler



**Şekil 4.4.** Transformasyondan sonra oluşan kolonilerden tek nokta ekimi

#### **4.2.1. Rekombinant Plazmitin Doğrulanması; PCR Tarama (PCR Screening) Kullanılarak Prezantasyonu**

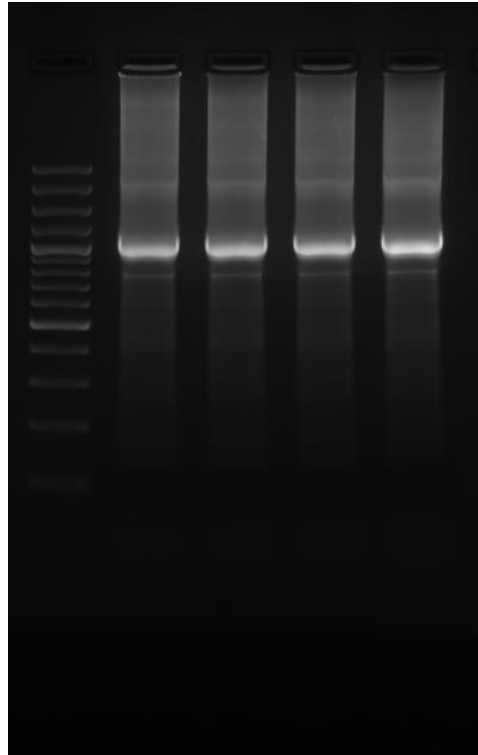
Transformasyondan sonra ortaya çıkan kolonilerde bulunan rekombinant plazmit, PCR tarama yöntemi kullanılarak görüntülendi. Transformasyondan sonra ortaya çıkan kolonilerin PCR taramayla, içinde TgGRA4 geni bulunan rekombinant plazmit olduğu gösterildi. (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5.** PCR tarama ile pozitif çıkan örneklerin agaroz jelde görüntüsü, Negatif kontrol: N, Pozitif koloniler: 2,3,4, Marker: M (1kb Promega, ABD).

#### 4.3. Rekombinant Plazmit Saflaştırılması ve PCR ile Doğrulaması

PCR tarama ile varlığı teyit edilen kolonilerden EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps Kit önerisine uyarak plazmitler saflaştırıldı. Saflaştırılmış plazmid içeren ürünlerden PCR yapıldı ve rekombinant plazmitin *T. gondii* GRA4 geni içerdiği doğrulandı (Şekil 4.6.).

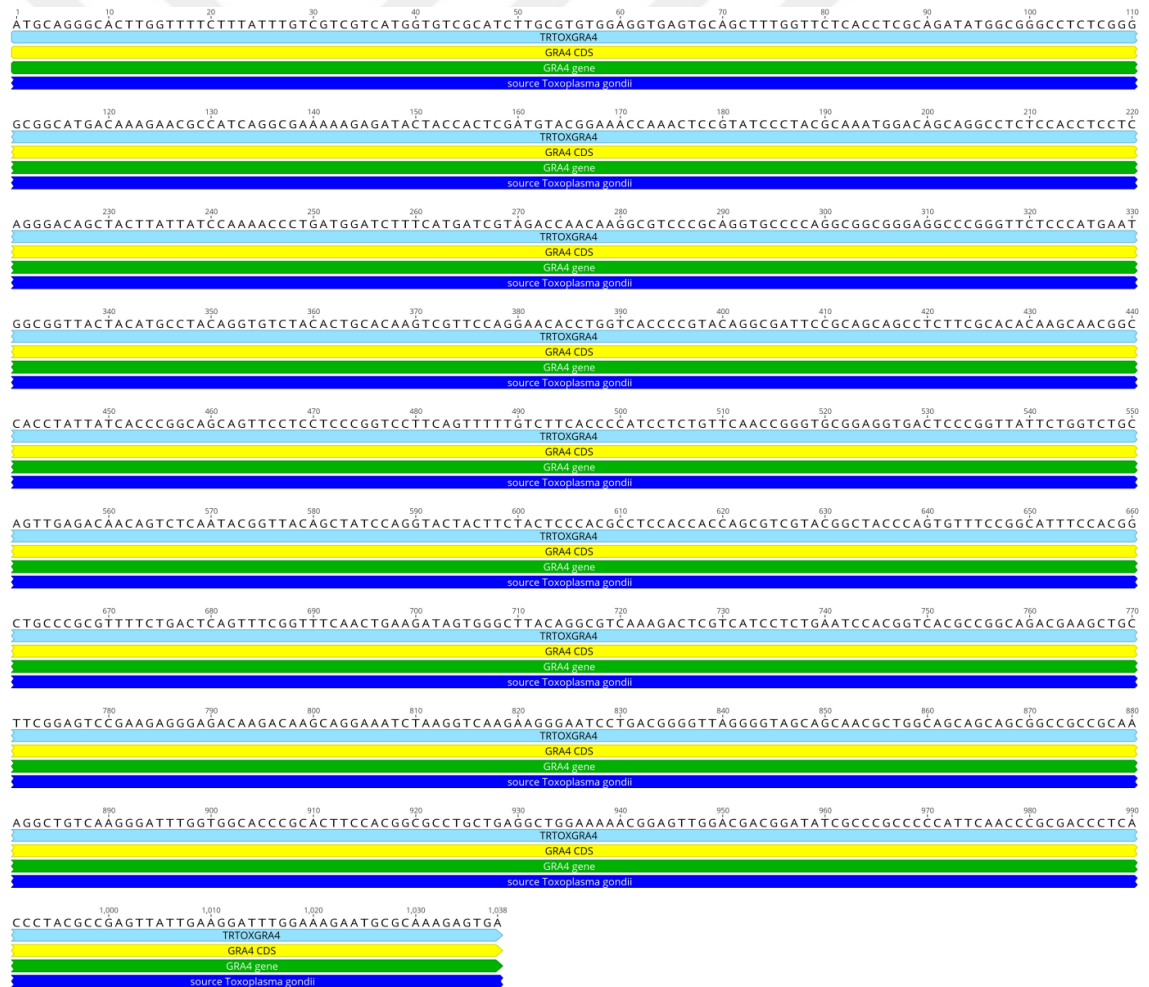


**Şekil 4.6.** Saflaştırılmış rpTgGRA4'ün PCR sonrası görüntüsü; saflaştırılmış plazmitler: 1-4, Marker: M (1kb Promega, ABD).

#### 4.4. *T. gondii* GRA4 Geninin Sekans ve Biyoinformatik Analiz Sonuçları

Saflaştırılan rekombinant plazmid DNA, vektöre özgü primerlerle sekans analizine tabii tutularak *T. gondii* GRA4 geninin DNA sırası oluşturulmuştur. Ortaya çıkarıla

DNA dizi sonuçları Chromas v.1.45 (ConorMcCarty School of Science Griffith University, Avustralya) programı ile incelenmiştir. F ve R dizi analiz sonuçları Geneious v11.1.5(Biomatters, ABD) programına girilerek sekans hizalaması yapılmıştır ve 1038 bp uzunluğundaki sekans dizisi yüksek kalite skoru ile elde edilmiştir. Sekans analizi yapılan 4 izolatın GRA4 sekans dizilerinin homolog olduğu görülmüştür. İlgili gen sekansı (Şekil 4.7) TRTOXGRA4 izolatı olarak isimlendirilmiştir.

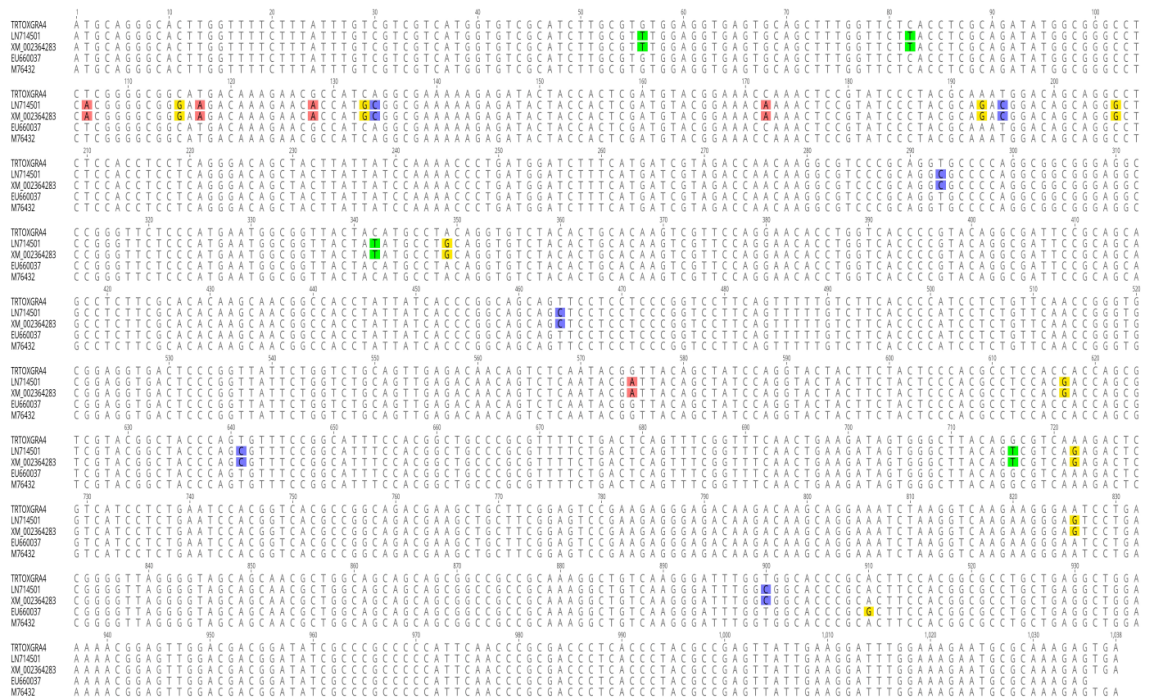


Şekil 4.7. TRTOXGRA4 izolatının nükleotid sekansı

*T.gondii* GRA4 geni DNA dizi analiz sonucu Geneious v11.1.5 (Biomatters, ABD) programı ile web tabanlı BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sistemine girilerek GenBank verilerinde bulunan DNA dizileri ile kıyaslanmıştır. Gerçekleştirilen blast analizlerinde, TRTOXGRA4 sekansının Genbank veri tabanında *T. gondii*'ye ait Avustralya'dan bildirilen (M76432) izolat ile %100; Hindistan'dan rapor edilen EU660037 kodlu izolat ile %99,9; Suudi Arabistan'dan (LN714501.1) ve ABD'den bildirilen (XM\_002364283) izolatlarla ise %97,8 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 4.1). İlgili izolatların ikili hizalama analiz sonuçlarına göre nükleotid farklılıkları Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

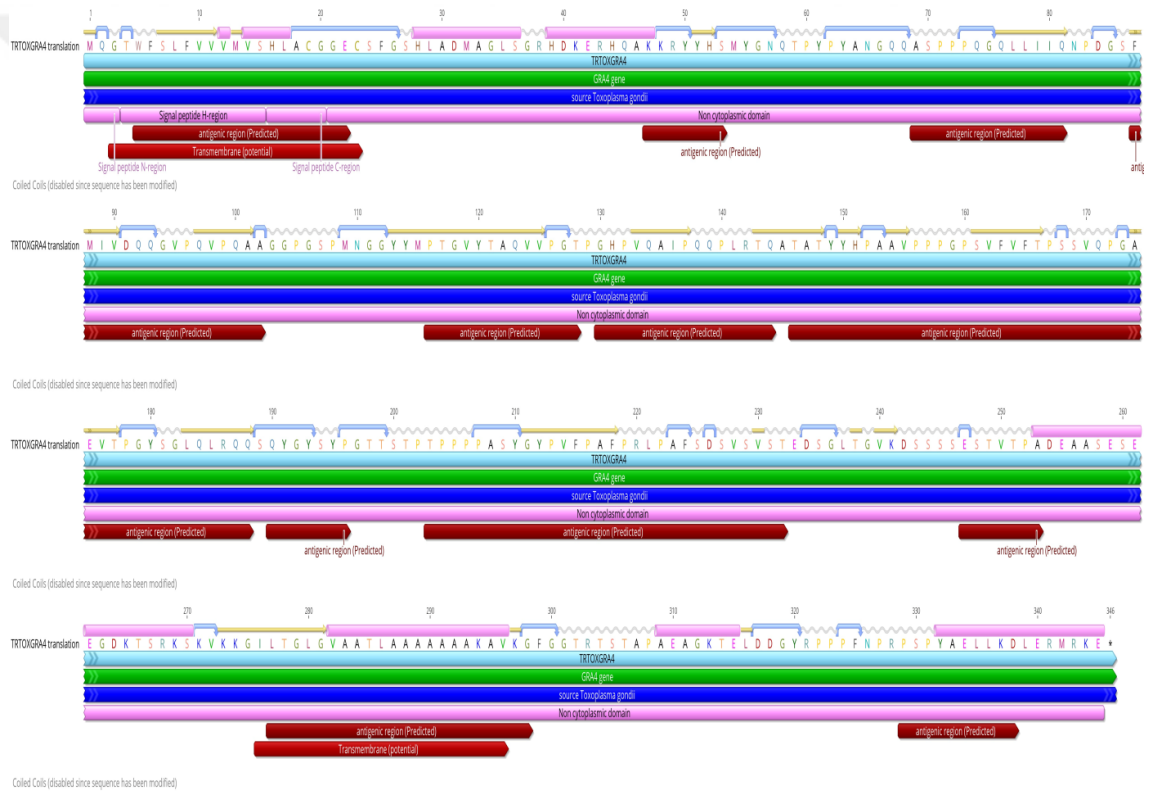
**Tablo 4.1.** TRTOXGRA4 gen dizisinin GenBank'ta mevcut GRA4 sekansları ile benzerlik oranları

|              | LN714501 | XM_0023... | EU660037 | M76432 | TRTOXGRA4 |
|--------------|----------|------------|----------|--------|-----------|
| LN714501     |          | 100%       | 97.7%    | 97.8%  | 97.8%     |
| XM_002364283 | 100%     |            | 97.7%    | 97.8%  | 97.8%     |
| EU660037     | 97.7%    | 97.7%      |          | 99.9%  | 99.9%     |
| M76432       | 97.8%    | 97.8%      | 99.9%    |        | 100%      |
| TRTOXGRA4    | 97.8%    | 97.8%      | 99.9%    | 100%   |           |



**Şekil 4.8.** TRTOXGRA4 ile GenBank'a kayıtlı GRA4 sekanslarının ikili hizalama analizine göre nükleotid farklılıkları

Çalışmada, *Toxoplasma gondii*'nin 1038 bç büyüklüğünde ORF sekansının, 346 amino asit uzunluğunda bir zinciri kodladığı (Şekil 4.9) ve in-silico analiz sonuçlarına göre GRA4 proteininin 36.284 kDa ağırlığında olduğu belirlenmiştir. GRA4 amino asit zincirinin, uzunluğu 7-43 aa arasında değişen, en düşük skoru 1,03 en yüksek skoru ise 1,243 olan 12 antijenik bölge içerdiği belirlenmiştir. Ayrıca ilgili amino asit zincirinin 20 aa uzunluğunda bir signal peptide içerdiği, ikincil yapısının non-stoplazmik domain özellikte olduğu ve iki adet potansiyel transmembran bölgeye sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca ikincil yapı analizinde %22,25 alfa-heliks, %26,3 beta-strand ve %28,03 oranında random coil yapısı tespit edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. TRTOXGRA4 izolatının amino asit sekansının biyoinformatik verileri.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Toxoplasmosis tüm dünyada yaygın bir enfeksiyondur (Aghdası ve ark., 2018). Toxoplasmosis'in nedensel ajanı olan parazitik protozoon *Toxoplasma gondii*, çoğu memeliyi ve kuşu enfekte edebilir. İnsan tıbbında *T. gondii* hamile kadınlarda ve bağışıklık yetersizliği olan kişilerde komplikasyonlara neden olabilirken, veteriner hekimlikte *T. gondii* enfeksiyonu, hayvancılıkta düşük ve neonatal kayıp nedeniyle ekonomik öneme sahiptir (Ya'cono ve ark., 2012). *T. gondii*, beyinde kalıcı olan kalın duvarlı kistler oluşturarak insanlarda kronik enfeksiyon yapar. Konakçı bağışıklığı azalır, kistler yeniden etkinleşerek şiddetli ve genellikle ölümcül toxoplazmik ensefalite neden olur. Kistleri ortadan kaldırmak veya yeniden aktifleşmelerini önlemek için mevcut bir tedavi yoktur. Dahası, hayati ve karakteristik kist matrisinin ve kist duvarı yapılarının nasıl geliştiği tam olarak anlaşılamamıştır. In-vitro kist gelişimi sırasında Toxoplazma intravakuolar ağ ile ilişkili yoğun granül antijen (GRA) proteinlerinin lokalizasyonunu gösterilmiştir. İntravakuolar ağ GRA'ları gelişen kistlerde kist matriksi içinde ve kist duvarında mevcuttur ve intravakuolar ağ ilişkili GRA'ların genetik olarak silinmesi, kist çevresinde kist duvarı materyalinin birikme oranını azaltmaktadır. İntravakuolar ağ bağlantılı GRA'ların, özellikle GRA2 ve GRA12'nin, kist matriksi ve kist duvarı yapılarının gelişimi ve olgunlaşmasında dinamik ve önemli roller oynadığı gösterilmiştir (Guevara ve ark., 2019). Takizoit ve bradizoitten salgılanan yoğun granül antijenlerinden biri de GRA4'tür. GRA4 genomu, intronsuz benzersizdir ve *Toxoplasma gondii*'nin başlıca immünojenik proteinlerinden biridir (Aghdası ve ark., 2018). Bu durum, toxoplazmozise karşı geliştirilecek ve parazitin tüm formlarına karşı savaşabilecek bir korunma yöntemi olarak etkili bir anti-Toxoplazma aşısının geliştirilmesinin çok değerli ve gerekli olduğunu ve GRA4 proteininin hedef alınabileceğini göstermiştir. Ayrıca, konakçı antikor yanıtı tarafından hedeflenen spesifik epitopların tanımlanması, enfeksiyona verilen doğal yanıtı anlamak ve epitop bazlı marker aşılarda ve toksoplazmoz için teşhis araçlarının geliştirilmesi için

önemlidir (Wang ve ark., 2014). Dolayısıyla bu çalışmada, amniyosentez ile enfekte gebelerden sağlanan izolatlarda *T. gondii*'nin sahip olduğu önemli ve özgün moleküllerinden biri olan GRA4 geninin klonlanması, sekanlanması ve moleküler karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

Konak immunizasyonunda *T. gondii* GRA proteinlerinin rolü üzerine sistematik bir derleme çalışmasında; PubMed, Science Direct, Google Scholar, Scopus, ISI Web of Science dahil olmak üzere İngilizce veri tabanları sistematik olarak taranmıştır. Haziran 2019'a kadar yayınlanan GRA antijenlerini değerlendiren makaleler seçilerek değerlendirilmiştir. Buna göre, GRA4 ve GRA7'nin deney hayvanlarının hayatta kalma süresini önemli ölçüde artırdığını ortaya çıkartılmıştır. GRA3, GRA7 ve M2AP antijenlerinin kombinasyonu (%93,5) ile aşılana BALB / c farelerde kist yükünde maksimum azalmanın gözlemlendiği dikkat çekici bulunmuştur. GRA6 ve GRA10, yüksek immunojenisite göstermiştir ve GRA1 ve 2, virülans ve immün yanıtların indüksiyonu için önemli olduğu belirtilmiştir. Araştırmacıların *T. gondii* enfeksiyonuna karşı bağışıklama alanında daha etkili çalışmalar yapmalarına yardımcı olacağı düşünülerek bu inceleme yapılmıştır (Ram ve ark., 2013).

Bir çalışmada, *T. gondii* GRA4 antijeninin bütün bitkilerinde kloroplast transformasyonu (chlGRA4) ile ekspresyonu analiz edilmiştir ve bir murin modelinde, chlGRA4'ün oral uygulamasından sonra humoral ve hücresel yanıtları ve koruma derecesi değerlendirilmiştir. ChlGRA4 ile oral bağışıklama, kontrol farelerine kıyasla farelerin beyin kisti yükünde %59'luk bir azalma ile sonuçlanmıştır. ChlGRA4 immünizasyonu, hem spesifik IgA üretimi ile karakterize edilen bir mukozal immün tepkisi ve mezenterik lenf düğümü hücreleri tarafından IFN- $\gamma$ , IL-4 ve IL-10 sekresyonu hem de GRA4'e spesifik serum antikorları ve splenositler tarafından IFN- $\gamma$ , IL-4 ve IL-10 salgılanması açısından sistemik bir yanıt ortaya çıkarmıştır. Sonuçlar, chlGRA4'ün oral uygulamasının, Toxoplazma enfeksiyonunu kontrol eden ve parazit yüklerini azaltan hem mukozal hem de sistemik dengeli Th1 / Th2 yanıtlarının ortaya çıkmasını teşvik ettiğini göstermektedir (Ya'cono ve ark., 2012).

Biyoinformatik araçlar kullanılarak yapılan bir çalışmada, GRA4'ün potansiyel B hücre epitopları arasındaki altı bölgesine (52–77 aa, 93–112 aa, 127–157 aa, 178–201 aa, 223–252 aa ve 314–333 aa) odaklanılmış ve bu bölgelerden sentezlenen 11 kısa peptit

sentezlenmiştir. Gansu jingtai suşu *T. gondii* ile enfekte edilen domuzlardan farklı zamanlarda toplanan serum örneklerinde denenen 11 peptitten üçü olan 62–77, 233–252 ve 314–333 aminoasitlerinin, tüm serumlar tarafından tanındığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, tanımlanan epitopların epitop bazlı aşılar ve teşhis reaktiflerine ilişkin ek çalışmalar için faydalı olabileceği düşünülmüştür (Wang ve ark., 2014). Çalışmada karakterize ettiğimiz TRTOXGRA4 izolatına ait amino asit zincirinin analizlerinde yukarıdaki çalışmada bahsi geçen peptidlerin antijenik bölgeleri içerdiği görülmüş olmakla birlikte, daha uzun yapıda ve yüksek antijenik skora sahip (Örn, 146-188 amino asit arası) bölgelerin varlığı da tespit edilmiştir.

*Toxoplasma gondii*'nin GRA4 genine ait açık okuma çerçevesinin moleküler klonlaması, sekanslama ve biyolojik karakterizasyonunun yapıldığı bir çalışmada, *T. gondii* ile enfekte keçilerden toplanan serumlarının iyi bir immun-reaktivite gösterdiği tespit edilirken, laboratuvar farelerinde gerçekleştirilen rekombinant proteinin bağışıklama çalışması sonrasında takizoit lizat antijenine (TLA) göre, *T. gondii* ile canlı enfeksiyonun daha yüksek seviyede IgG tepkisi ortaya çıkardığı indirekt ELISA ile tespit edilmiştir. Buna karşılık, aşılanmış farelerde hayatta kalma süresinin 2 gün uzatılması haricinde belirgin bir sonuç görülememiştir (Picchio ve ark., 2018).

Kronik toxoplasmosis'li C3H farelerinde, rekombinant *T. gondii* GRA4, RPO2 ve TgPI-1 proteinlerinin karışımı olan bir antijen kokteylinin aşı potansiyelinin araştırıldığı çalışmada, intradermal ve intranazal yolları birleştiren homolog bir prime-boost protokolü uygulanmıştır. Me49 *T. gondii* suşunun doku kistleri ile oral uygulanmış ve test edilen tüm aşı formülasyonlarının, kısmi koruma sağladığı gösterilmiştir. En yüksek koruma seviyesi, aşılanmamış kontrol grubuna kıyasla % 50 ortalama parazit yükü azalması ile rTgPI-1 ve rROP2 proteinlerinin karışımı ile elde edilmiştir. Sonuçlar, rTgPI-1 + rROP2 antijenlerinin, toxoplasmosis'e karşı multiantijenik bir aşı formülasyonunda diğer immünojenik proteinlerle birleştirilecek umut verici bir karışım gibi görüldüğünü göstermiştir (Lau ve ark., 2010).

Bir başka çalışmada, *T. gondii* GRA4 proteinin klonlanması ve eksprese edilmesinde bir maya hücresi olan *Pichia pastoris* kullanılmış ve proteinin konformasyonel değişikliklere bağlı etkinliğinde fark olup olmadığı incelenmiştir. Buna göre, ifade edilen GRA4 proteini, hesaplanan moleküler kütle ile boyut olarak tutarsızlık gösterdiği

görülmüş; bu durum, glikozilasyon ve fosforilasyon dahil olmak üzere çeşitli posttranslasyonel modifikasyonlara atfedilmiştir. Moleküler ağırlıktaki farklılığa rağmen, rekombinant protein, Western blot formatında toxoplasmosis'i tespit edebilmiştir. Ayrıca rekombinant GRA4, antijenin gelecekteki saflaştırılması için kullanılabilen bozulmamış bir polihistidin etiketi ile ifade edilebildiği gösterilmiştir (Rezaei ve ark., 2019). Çalışmamızda klonlama ve sekans analizlerinin biyoinformatik araçlarla analizi sonucu ilgili proteinin yukarıdaki çalışma sonuçlarıyla paralel olarak yaklaşık 36 kDA büyüklüğünde olduğu görülmüştür.

Başka bir aşı çalışmasında ise BALB/c (H-2d) farelerde kronik toxoplazmoza karşı rROP2 + rGRA4 + rSAG1, rROP2 + rROP4 + rGRA4 ve rROP2 + rROP4 + rSAG1'den oluşan üç adet üç değerlikli subunit rekombinant aşının, aşı potansiyeli değerlendirilmiştir. Test edilen tüm aşılar, düşük virülanslı DX *T. gondii* suşunun doku kistleri ile enfeksiyonuna karşı kısmi bir koruma sağlamıştır, ancak en güçlü koruma seviyesi, yoğun granül rGRA4 antijeni ile uygulanan her iki rhoptry protein (rROP2 ve rROP4) karışımları veya rSAG1 proteini tarafından indüklenmiştir. Bu aşılanmış BALB/c farelerindeki ortalama parazit yükü, PBS enjekte edilmiş kontrol hayvanlarına kıyasla sırasıyla %84 ve %77 azaldığı tespit edilmiştir. Dalak hücrelerinin antijene özgü in vitro proliferasyonu, Th1 tipi sitokinlerinin, IFN- $\gamma$  ve IL-2'nin spesifik antijenle indüklenen in vitro sentezi ile gösterilen hücresel ve humoral immün yanıtların gelişimi aşıyla indüklenen koruma ile ilişkilendirilmiştir. Sistemik antijene özgü IgG1 ve IgG2a antikorlarının yüksek titrelerinin olduğu görülmüştür. Bu iki rekombinant antijen karışımının daha sonraki deneyler için çok umut verici olduğu tespit edilmiştir (Dziadek ve ark., 2012).

DNA aşılamaının *T. gondii*'ye karşı koruyucu bir bağışıklık tepkisi sağlayıp sağlayamayacağını belirlemek için yapılan bir çalışmada, lipozomla kapsüllenmiş pGRA4 ile C57BL / 6 fareleri ve BALB / c fareleri kas içinden üç kez aşılanmıştır. Aşının kapsamı; GRA4 antijenini kodlayan pcDNA3.1-GRA4 (pGRA4) plazmidini dehidrasyon-rehidrasyon yöntemi ile enkapsüle eden 16 mmol/L yumurta fosfatidilkolin (PC), 8 mmol/L dioleoil fosfatidiletanolamin (DOPE) ve 4 mmol/L 1,2-dioleoil-3-(trimetilamonyum) propan (DOTAP) lipozomal bileşikleri içerecek şekilde oluşturulmuştur. Bağışıklaştırılmış farelerden alınan serumlarda GRA4'e karşı yüksek seviyelerde IgG antikorları üretildiği ELISA ile gösterilmiştir. GRA4 ile uyarılan

aşılanmış farelerin splenositlerinde IFN- $\gamma$  ve IL-2 üretiminin olduğu ve modüle edilmiş bir Th-1 tipi yanıtın geliştiği gösterilmiştir. Yapılan çalışma ile lipozom ile kapsüllenmiş pGRA4'ün, *T. gondii* enfeksiyonuna karşı koruyucu etkiyi arttırdığı gösterilmiştir (Chen ve ark., 2009).

DNA aşılmasının *T. gondii*'ye karşı koruyucu bağışıklık tepkisi sağlayıp sağlayamayacağını belirlemek için yapılan bir çalışmada ise, GRA4'ün tüm kodlama dizisi bir ökaryotik ifade vektörüne eklenmiştir. Duyarlı C57BL/6 fareleri daha sonra kas içinden pGRA4 DNA ile aşılanmış ve öldürücü dozda 76 K *T. gondii* suşu kistleri ile oral yoldan muamele edilmiştir. pGRA4 ile bağışıklama, C57BL/6 ile enfekte olmuş farelerde %62 oranında hayatta kalma ile sonuçlanmıştır. GRA4 DNA ile aşılanan farelerin, in vitro rekombinant GRA4 proteini yeniden uyarılmasına yanıt olarak splenosit proliferasyonu, yüksek seviyelerde serum anti-GRA4 immünoglobulin G antikorları ve bir hücrel bağışıklık yanıtı geliştirdiği tespit edilmiştir. Hücrel bağışıklık tepkisi, modüle edilmiş bir Th-1 tipi tepkiyi düşündüren IFN- $\gamma$  ve IL-10 sentezi ile ilişkilendirilmiştir. Splenosit proliferasyonu, GRA4 DNA eklenmiş bir granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör ifade eden vektörle aşılama yoluyla güçlü bir şekilde artmış ve koruma biraz daha yüksek olmuştur. Bu çalışmanın, *T. gondii* enfeksiyonunun akut fazına karşı DNA aşısı ile indüklenen koruyucu bir bağışıklığın kurulduğunu gösteren ilk rapor olduğu belirtilmiştir (Desolme ve ark., 2000).

Bir çalışmada (Döşkaya ve ark., 2018), yüksek verimli protein mikrodizi taraması kullanarak *T. gondii* genomik verilerinden yeni antijenik proteinlerin keşfine odaklanılmıştır. Çalışmada (Döşkaya ve ark., 2018), protein mikrodizileri, ookistler veya doku kistleri ile oral yoldan uygulanan hayvan modellerinden iyi karakterize edilmiş serum örnekleri ile incelenmiştir. Fare profilinde daha önce yayınlanan insan antikor profilleri ile örtüşen antijenleri keşfedilmiştir. Bunun için, kemirgen IgG ve IgM tarafından tanınan 240 antijenden oluşan bir reaktif antijen listesi, oral yoldan enfekte edilmiş farelerden alınan havuzlanmış serumlar kullanılarak tanımlanmıştır. Tarama verilerinin analizleri bol miktarda antijen belirlemiş ve hem fare hem de insan antikor profillerinde güçlü immünojenite göstermiştir. Bunlar arasında, ROP1, GRA2, GRA3, GRA4, GRA5, GRA6, GRA7, GRA8, GRA14, MIC1, MIC2 ve MAG1 güçlü immünojenite göstermiştir ve önceki çalışmalarda aşılardan veya serolojik teşhis testlerinin geliştirilmesinde antijen olarak kullanılmıştır. Bu bulgulara ek olarak, ROP6,

MIC12, SRS29A ve SRS13 güçlü immünojenisite göstermiş ancak henüz bir teşhis testi veya aşı modeli geliştirmede test edilmemiştir (Döşkaya ve ark., 2018).

TgGRA4'ü kodlayan dört farklı aşılama stratejisinin neden olduğu immün yanıtın değerlendirildiği bir çalışmada (Meng ve ark., 2013); BALB / c fareleri, spesifik aşılama programlarına göre dört kez kas içinden (i.m.) aşılanmıştır. Deney gruplarındaki fareler polipeptit, pGRA4, peptit / DNA veya DNA / peptit ile aşılanmış ve kontrol gruplarındaki farelere PBS veya pEGFP enjekte edilmiştir. İmmünizasyondan sonra, IgG antikorlarının seviyeleri ve sitokin üretimi, enzime bağlı immünosorbent analizleri (ELISA) ile belirlenmiştir. Farelerin hayatta kalma süresi, yüksek derecede virülen *T. gondii* RH suşu ile enfeksiyonundan sonra da değerlendirilmiştir. Farklı aşılama rejimleriyle (polipeptit, pGRA4, peptit / DNA veya DNA / peptit) aşılanan farelerin, yüksek düzeyde toplam IgG, IgG2a izotipi ve gama interferon (IFN- $\gamma$ ) ile spesifik humoral ve hücresel yanıtlar ortaya çıkardığı gösterilmiştir. Belirli bir Th-1 bağışıklığının etkinleştirildiği ileri sürülmüştür. Ölümcül tehditten sonra, aşılanmış farelerde ( $11.8 \pm 4.8$  gün), PBS veya pEGFP enjekte edilen kontrol gruplarına kıyasla ( $P < 0.05$ ) artmış bir hayatta kalma süresi gözlenmiştir. PBS veya pEGFP enjekte edilen fareler 8 gün içinde ölmüş ve iki grupta koruma seviyesinde kayda değer bir farklılık bulunmadığı gösterilmiştir ( $P > 0.05$ ). Bu sonuçlar, TgGRA4'ü kodlayan bu DNA prime ve peptid boost immünizasyon protokolünün, diğer immünize gruplara kıyasla en yüksek seviyede humoral ve hücresel immün tepkileri ortaya çıkarabileceğini gösterdi; bu, DNA immünizasyonunun etkinliğini artırmak için umut verici bir yaklaşım olduğu belirtilmiştir (Roozbehani ve ark., 2018).

Başka bir çalışmada, ortak majör histo-uyumluluk kompleksi (MHC) moleküllerine bağlanma yeteneklerine dayalı olarak SAG1, AMA1, ROP2 ve GRA4 proteinlerinin tahmin edilen T ve B hücre epitoplarını kullanarak multimerik bir rekombinant *T. gondii* aşısını tasarlamak için biyoinformatiği kullanılmıştır. Ayrıca, eksprese edilen proteini, bir iletim aracı olarak poli-laktik-ko-glikolik asit (PLGA) nanopartiküllerinde kapsüllenmiş ve ayrıca bu multimerik antijenin aşı gücünü belirlemek için bir adjuvan olarak alum kullanılmıştır. BALB / c fareleri aşılanmış ve ardından *T. gondii* RH suşu ile enfekte edilmiştir ve hayatta kalma oranı ve sitokin profilleri incelenmiştir. Hem PLGA ile hem de PLGA'sız çoklu epitop bazlı aşı ile aşılanan fareler, kontrollere göre daha yüksek Th-1 immün tepkileri, hayatta kalma oranları, spesifik antikor titreleri ve

IFN- $\gamma$  ve IL-2 seviyelerine sahipken, alum adsorbe edilmiş aşının, Th-2 tipi humoral bağışıklık tepkisini stimüle ettiği tespit edilmiştir (Roozbehani ve ark., 2018).

Parazitik vakuole lokalize olan Dense granüller (GRA) ve Rhoptry moleküllerinin salgılanmasının *T. gondii* ile enfekte konak hücrelerinin CD8+T hücreler tarafından tanınmasında rolü olduğunu öne süren bir çalışmada bu efektör moleküller araştırılmıştır. Çeşitli salgılanan GRA veya ROP efektörlerinin MHC-I tarafından antijen sunumunu baskılama yeteneği, hücre tipine, IFN- $\gamma$  ekspresyonuna veya konak IRG efektörlerine bağlı olduğu belirtilmiştir. Antijen sunumunun ROP5, ROP18 ve GRA7 tarafından bastırılması, IFN- $\gamma$  ile aktive edilen konak IRG efektörleri tarafından PV bozulmasının önlenmesi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. *Toxoplasma gondii* ile enfekte olmuş konakçı hücrelerin CD8 + T hücre tanınmasını ve klirensini azaltmak için MHC-I tarafından antijen sunumunu aktif olarak bastırmak için önemli roller oynadığı ifade edilmiştir (Rommereim ve ark., 2019).

GRA-1, GRA-4, GRA-6 ve GRA-7 proteinlerinin yapısal, fiziksel ve kimyasal karakterlerini, immünojenitesini tahmin etmek, analiz etmek ve karşılaştırmak için biyoinformatik araçlar ile çevrimiçi yazılım kullanılan bir çalışmada, dizi hizalama sonuçları, GRA-1, GRA-4, GRA-6 ve GRA-7 proteinlerinin düşük benzerliğe sahip olduğunu göstermiştir. İkincil yapı tahmini, dört protein arasında, GRA-1 ve GRA-6'nın küçük bir tutarsızlık dışında benzer ikincil yapıya sahip olduğunu gösterdi. Hidrofiliklik / hidrofobiklik analizi, her bir protein dizisi için çok sayıda hidrofilik bölge ve bazı klasik yüksek hidrofilik alanlar göstermiştir. İmmünojenik epitop tahmin sonuçları, GRA-1 ve GRA-4 epitoplarının stabil olduğunu ve GRA-4'ün en yüksek derecede antijeniteye sahip olduğunu göstermiştir. GRA-7 epitopu en yüksek immünojenite skoruna sahip olmasına rağmen, bu epitopun kararsız olduğu ve ökaryotik hücrede en düşük antijenite derecesine ve yarı zamana sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca ilgili çalışmanın (Shadde ve ark., 2018) sonuçları, GRA4-GRA7 epitopunun ve GRA6-GRA7'nin sırasıyla çoklu hibrid epitoplar arasında en yüksek antijenite ve immünojeniteye sahip olduğunu göstermiştir. Toplam olarak, tekli epitopların, multihibrit epitoplar ile karşılaştırıldığında en yüksek antijenite derecesini gösterdiği rapor edilmiştir. Sonuçlar göz önüne alındığında, GRA-4 ve GRA-7'nin *T. gondii*'ye karşı güçlü DNA aşısı adayları olabileceği sonucuna varılabileceği belirtilmiştir (Shadde ve ark., 2018).

Sonuç olarak bu çalışma ile Türkiye’de ilk kez amniyotik sıvılardan elde edilen *T. gondii* izolatlarında önemli immunojenik bir antijen olan GRA4 proteinini kodlayan gen üzerine karakterizasyon verileri elde edilmiştir. Çalışma ile rekombinant olarak elde edilen GRA4’ün biyoinformatik analizlerle genetik ve proteomik yapısı ortaya çıkarılmış olup, toxoplasmosis’e karşı başta aşı çalışmaları olmak üzere biyoteknolojik mücadele çerçevesinde yeni projeler için öncül sonuçlar sağlanmıştır. Ayrıca elde edilen sonuçlar gen bazında parazitin moleküler epidemiyolojisi noktasında da katkı sağlamıştır.



## 6. KAYNAKLAR

- Afonso E, Thulliez P, Gilot-Fromont E. Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (*Felis catus*). International journal for parasitology. 2006;36 (13):1373-82.
- Aghdası M, Ghaffarifar F, Forooghi F, Dalımı AH, Sharıfı Z, Maspı N. Expression of Plasmid Encoded GRA4 Gene of *Toxoplasma gondii* RH Strain in CHO Eukaryotic Cells. Iran J Parasitol: Vol. 13, No. 3, Jul-Sep 2018, pp.392-398.
- Altıntaş K. Tıbbı genel parazitoloji ve protozooloji. Nobel tıp kitapevi Ltd.Şti, Ankara, 1997:171-192, 272-274.
- Aşık G. Afyon bölgesinde gebelerde toxoplasma ve rubella seroprevelansı. Pamukkale Tıp Dergisi. 2013;6(3).
- Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Orefice F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. Emerging infectious diseases. 2003;9(1):55-62.
- Beaman et al, 1995; Smith, 1991; Dubey ve Beattie, 1988.
- Caner A., Kök Hücre Ve Karaciğer Transplantasyon Hastalarında Toxoplasmosisin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ve Nested Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemleri İle Takibi. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2007.
- Chen R, Shao-hong LU, Tong Q, Lou D, Shi D, Jia B, Huang G, Wang J. Protective effect of DNA-mediated immunization with liposome-encapsulated GRA4 against infection of *Toxoplasma gondii*. J Zhejiang Univ Sci B 2009 10(7):512-521.
- Çeltek NY. Türkiye'nin Orta Karadeniz Bölgesinde Gebelerde Rubella, CMV ve Toxoplasmosis Seroprevelansı. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2014;6(1).
- Desolme B, MeÂveÂlec M, Buzoni-Gatel D, Bout D. Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by DNA immunization with a plasmid encoding *Toxoplasma gondii* GRA4 gene. Vaccine 18 (2000) 2512-2521.
- DO H-Y. Human Toxoplasmosis: Oxford Medical Publishing; 1992.

- Döşkaya M, Liang L, Jain A, Can H, İz SG, Felgner PL, Değirmenci Döşkaya A, Davies DH, Gürüz AY. 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* (2018) 11:393.
- Dubey J. The history of *Toxoplasma gondii* – The first 100 years by the International Society of Parasitologists DOI:10111/j 1550-7408.2008.00345.x
- Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology*. 1998; 28(7):1019-24.
- Duncanson P, Terry RS, Smith JE, Hide G. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. *International journal for parasitology*. 2001;31(14):1699-703.
- Durdu B. Sağlıklı Gebelerde *Toxoplasma gondii* Seropozitifliği, IgG Avidite Değerlerinin İncelenmesi Ve Seropozitifliğe Etki Eden Çeşitli Risk Faktörlerinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi. Haseki Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, 2008, İstanbul.
- Dziadek B, Gatkowska J, Grzybowski M, Dziadek J, Dzitko K, Dlugonska H. *Toxoplasma gondii*: The vaccine potential of three trivalent antigen-cocktails composed of recombinant ROP2, ROP4, GRA4 and SAG1 proteins against chronic toxoplasmosis in BALB/c mice. *Experimental Parasitology*, 2012, 131(1):133-8.
- Ferguson DJ. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? *Trends in parasitology*. 2002;18(8):355-9.
- Ferreira da Silva Mda F, Barbosa HS, Gross U, Lüder CG. Stressrelated and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biosyst*, 2008; (4): 824-834.
- Guevara RB, Fox BA, Falla A, Bzika DJ. *Toxoplasma gondii* Intravacuolar-Network-Associated Dense Granule Proteins Regulate Maturation of the Cyst Matrix and Cyst Wall. *mSphere*, 2019, 4(5):e00487-19.

- İnci et all., Overview of Zoonotic Diseases in Turkey: The One Health Concept and Future Threats. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2018 Mart 42(1):39.
- Jones JL, Dubey JP. Waterborne toxoplasmosis-recent developments. *Experimental parasitology*. 2010;124(1):10-25.
- Kara H. Konjenital toksoplazmozun tanısında PCR 'ın kullanılması ve İFAT sonuçlarıyla karşılaştırılması. Uzmanlık tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 1997).
- Labruyere E, Lingnau M, Mercier C, Sibley LD. Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 102 (1999) 311–324.
- Lau YL, Hasan MT, Thiruvengadam G, Idris MM, Init I. Cloning and expression of *Toxoplasma gondii* dense granular protein 4 (GRA4) in *Pichia pastoris* *Tropical Biomedicine* 27(3): 525–533 (2010).
- Leport C, Remington JS. [Toxoplasmosis in AIDS]. *Presse medicale*. 1992;21(25):1165-71.
- Meng M, Zhou A, Lu G, Wang L, Zhao G, Han Y, Zhou H, Cong H, Zhao Q, Zhu XQ, He S. DNA prime and peptide boost immunization protocol encoding the *Toxoplasma gondii* GRA4 induces strong protective immunity in BALB/c mice. *BMC Infectious Diseases* 2013, 13:494.
- Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004;363(9425):1965-76.
- Montoya JG, Remington JS. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Toxoplasma gondii*. Principles and practice of Infectious Diseases, 5th Ed.2000;(2):2858-2881.
- Nicolle C, Manceaux LH., On a leishman body infection (or related organisms) of the *gondi*. 1908. *International journal for parasitology* ;2009;39(8):863-4.
- Özcan K. *Toxoplasma gondii*. Tıbbi parazitoloji ders ve laboratuvar notları, Adana 1998:64-73.
- Özcel MA. Tıbbi Parazit Hastalıkları. *Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları* No:22; İzmir, 2007.

- Picchio MS, Sanchez VR, Arcon N, Soto AS, Sibilia MP, Aldirico MA, Urrutia M, Moretta R, Fenoy IM, Goldman A, Martin V. Vaccine potential of antigen cocktails composed of recombinant *Toxoplasma gondii* TgPI-1, ROP2 and GRA4 proteins against chronic toxoplasmosis in C3H mice. *Experimental Parasitology*, 2018, 185:62-70.
- Ram H, Rao JR, Tewari AK, Banerjee PS, Sharma AK. Molecular cloning, sequencing, and biological characterization of GRA4 gene of *Toxoplasma gondii* *Parasitol Res* (2013) 112:2487–2494.
- Rezaeia F, Sharifa M, Sarvia S, Hejazie SH, Aghayanf S, Paghehg AS, Dodangeha S, Daryania A. A systematic review on the role of GRA proteins of *Toxoplasma gondii* in host immunization. *Journal of Microbiological Methods* 165 (2019) 105696.
- Robert-Gangneux F, Darde ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical microbiology reviews*. 2012;25(2):264-96.
- Roos DS, Crawford MJ, Donald RG, Kissinger JC, Klimczak LJ, Striepen B. Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid. *Current opinion in microbiology*. 1999;2(4):426-32.
- Rommereim LM, Fox BA, Butler KL, Cantillana V, Taylor GA and Bzik DJ (2019) Rhoptry and Dense Granule Secreted Effectors Regulate CD8+ T Cell Recognition of *Toxoplasma gondii* Infected Host Cells. *Front. Immunol.* 10:2104.
- Roosbehani M, Falak R, Mohammadi M, Hemphill A, Razmjou E, Meamar AR, Masoori L, Khoshmirsafa M, Moradi M, Gharavi MJ. Characterization of a multi-epitope peptide with selective MHC-binding capabilities encapsulated in PLGA nanoparticles as a novel vaccine candidate against *Toxoplasma gondii* infection. *Vaccine* 36 (2018) 6124–6132.
- Ryan KJ, Ray CG. *Sherris Medical Microbiology* (4th Edition), McGraw Hill Medical Publishing Division, New York, 2004: 722-727.
- Shadde M, Ebrahimi M, Tabandeh MR. Bioinformatics analysis of single and multi-hybrid epitopes of GRA-1, GRA-4, GRA-6 and GRA-7 proteins to improve

DNA vaccine design against *Toxoplasma gondii* J Parasit Dis (Apr-June 2018) 42(2):269–276.

Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M. Unat'ın Tıp Parazitoloji 5. Baskı, İstanbul: Doyuran Matbaası, 1995:601-620.

Wang Y, Wang G, Ou J, Yin H, Zhang D. Analyzing and identifying novel B cell epitopes within *Toxoplasma gondii* GRA4 Parasites & Vectors 2014, 7:474.

Ya'cono ML, Farran I, Becher ML, Sander V, Sa' nchez VR, Martí'n V, Veramendi J, Clemente M. A chloroplast-derived *Toxoplasma gondii* GRA4 antigen used as an oral vaccine protects against toxoplasmosis in mice. Plant Biotechnology Journal (2012) 10, pp. 1136–1144.

Yaman K. *Toxoplasma gondii* Antijenlerinin Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2007 Ankara.

Yazar S, Kuk S, Miman Ö. Saygı'nın Temel Tıbbi Parazitolojisi. Kayseri: Erciyes Üniversitesi Basım Evi; 2015: 104-109.

# ÖZGEÇMİŞ

## KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Bekir TARTICI  
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti (TC)  
Doğum Tarihi ve Yeri : 02.06.1986/HATAY  
Tel : 0542 796 02 06  
E-mail : b.tartici@gmail.com  
Yazışma Adresi : Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji AD.

## EĞİTİM

| Derece | Kurum                              | Mezuniyet Tarihi |
|--------|------------------------------------|------------------|
| Lisans | Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi | 2011             |

## YABANCI DİL

İngilizce