

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

***TOXOPLASMA GONDII* AŞI ADAYI SAG 1  
GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU,  
PROTEİN EKSPRESYONU VE ANTİJENİK YAPISI**

**Hazırlayan  
Abdüssamed AKŞİT**

**Danışman  
Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM**

**Doktora Tezi**

**Mart 2019  
KAYSERİ**



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

***TOXOPLASMA GONDII* AŞI ADAYI SAG 1  
GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU,  
PROTEİN EKSPRESYONU VE ANTİJENİK YAPISI**

**Hazırlayan  
Abdüssamed AKŞİT**

**Danışman  
Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM**

**Doktora Tezi**

**Mart 2019  
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: Abdüssamed AKŞİT**

**İmza :**

## YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

**“*Toxoplasma gondii* Aşı Adayı SAG 1 Geninin Moleküler Karakterizasyonu, Protein Ekspresyonu ve Antijenik Yapısı”** adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

**Tezi Hazırlayan**

**Abdüssamed AKŞİT**

**Danışman**

**Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM**

**Anabilim Dalı Başkanı**

**Prof. Dr. M. Hakan POYRAZOĞLU**

**Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM** danışmanlığında **Abdüssamed AKŞİT** tarafından hazırlanan “*Toxoplasma gondii* Aşı Adayı SAG 1 Geninin Moleküler Karakterizasyonu, Protein Ekspresyonu ve Antijenik yapısı” konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Parazitoloji** Anabilim Dalı’nda **Doktora Tezi** tezi olarak kabul edilmiştir.

08 / 03 / 2019

**JURİ:****İmza**

**Danışman:** Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM .....

(ERÜ Veteriner Fakültesi, Parazitoloji ABD, Kayseri)

**Üye:** Prof. Dr. Uğur USLU .....

(Selçuk Üniv. Tıp Fakültesi, Parazitoloji ABD, Konya)

**Üye :** Doç.Dr. Kerem ÖTER .....

(İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi, Parazitoloji ABD, İstanbul)

**Üye:** Dr. Öğr. Üyesi Zuhâl ÖNDER .....

(ERÜ Veteriner Fakültesi, Parazitoloji ABD, Kayseri)

**Üye:** Dr. Öğr. Üyesi İbrahim SÖZDUTMAZ .....

(ERÜ Veteriner Fakültesi, Viroloji ABD, Kayseri)

**ONAY**

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

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

**Prof. Dr. Bilal AKYÜZ**

**Enstitü Müdürü**

## TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam sűresince bilgi ve deneyimlerini aktararak desteklerini esirgemeyen tez danıőmanım Sayın Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM'a katkılarıyla bana yardımlarını esirgemeyen hocalarım Sayın Prof. Dr. Abdullah İNCİ, Sayın Doç. Dr. Önder DÜZLÜ ve Dr. Öğr. Üyesi Zuhâl ÖNDER'e teőekkür ederim. Diđer yandan çalıőmalarına her daim çok yakından tam destek veren ERÜ Tıp Fakóltesi Dekanı ve Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. M. Hakan POYRAZOĐLU'na űkranlarımı sunarım. Çalıőmalarımın her aőamasında desteklerini aldığım ERÜ Tıp Fakóltesi Parazitoloji ve ERÜ Veteriner Fakóltesi Parazitoloji Anabilim Dalı personeline teőekkür ederim.

Son olarak akademik çalıőmalarım sűresince sevgi ve fedakârlıklarıyla sürekli yanımda olan aileme, eőime ve sevgili oğluma teőekkür ederim.

# **TOXOPLASMA GONDII AŞI ADAYI SAG 1 GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU, PROTEİN EKSPRESYONU VE ANTİJENİK YAPISI**

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı  
Doktora Tezi, Mart 2019  
Danışman: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM

## **ÖZET**

*Toxoplasma gondii* kozmopolit dağılıma sahip bir parazit olmasının yanı sıra mortaliteye sebep olması ve transplasental yolla yavrulara geçişi nedeni ile oldukça önemli bir halk sağlığı sorunudur. Toxoplasmosis'in tanısı ve hastalığa karşı aşı geliştirilmesi amacıyla geçmişten günümüze parazite ait birçok antijen araştırılmış ve etkinlikleri değerlendirilmiştir. Bu çalışmada Türkiye Halk Sağlığı Kurumundan temin edilen *T. gondii* takizoitleri kullanılarak yüzey antijenleri arasında önem arz eden SAG1 proteinini kodlayan genin moleküler karakterizasyonunun yapılması, rekombinant protein ve DNA'nın elde edilmesi, immunreaktivitenin gösterilmesi ve rekombinant SAG1 antijeninin ELISA tabanlı teşhisteki duyarlılık ve özgünlüğünün ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaçla *T. gondii* takizoitlerden genomik DNA (gDNA) izolasyonunu takiben SAG1 gen bölgesi dizayn edilen özgün primerlerle amplifiye edilmiş ve sonrasında plazmit vektörlere klonlanmıştır. Klonlama sonrası elde edilen plazmit DNA sekanslanarak SAG1 geninin nükleotid ve amino asit sekansları elde edilmiş ve moleküler karakterizasyonları ortaya konulmuştur. Hem nükleotid hem de amino asit sekans ve filogenetik analizleri SAG1 geninin korunmuş bir gen bölgesi olduğunu göstermiştir. Moleküler karakterizasyonu takiben elde edilen TrToxSAG1 izolatına ait ampikonlar DNA aşısı adayı olarak pcDNA<sup>TM</sup>3.1/V5-His TOPO<sup>®</sup> ekspresyon vektörüne başarılı bir şekilde klonlanmış ve rekombinant DNA izolasyonu yapılarak uygun şartlarda muhafaza altına alınmıştır. TrToxSAG1 izolatına ait gDNA optimize edilen primerlerle PCR'da çoğaltılmış ve elde edilen ampikonlar pet100 ekspresyon sisteminde klonlanarak rekombinant antijen ekspresyonu ve izolasyonu sağlanmıştır. İlgili proteini kodlayan amino asitlerin in-silico analizleri ile rekombinant antijenin SDS-PAGE ve Western Blot analizleri SAG1 proteininin yaklaşık 35 kDa büyüklüğünde olduğunu ortaya koymuştur. Elde edilen rekombinant SAG1 antijeni ELISA yöntemiyle işlenmiş ve referans tanı kiti eşliğinde farklı konsantrasyonlardaki



antijenlerin etkinlikleri değerlendirilmiştir. Rekombinant SAG1 ELISA'nın %84,2 duyarlılığa ve %81,0 özgülüğe sahip olduğu belirlenmiş ve aynı zamanda kappa istatistik testi sonuçlarına göre referans ticari kitsonuçları ile arasında iyi bir korelasyonun bulunduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez *T. gondii*'nin önemli yüzey antijenlerinden biri olan SAG1'in moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, ülkemize özgü izolatlar kullanılarak parazitin spesifik tanısı ve hastalığa karşı aşı geliştirilmesi üzerine yeni araştırmalar için model oluşturmuştur.

**Anahtar kelimeler:** *Toxoplasma gondii*, SAG1geni, Moleküler karakterizasyon, Klonlama, Rekombinant protein, DNA Aşısı, ELISA

**MOLECULAR CHARACTERIZATION, EXPRESSION AND ANTIGENIC  
STRUCTURE OF SAG 1 GENE AND ITS PROTEIN, A CANDIDATE FOR  
*TOXOPLASMA GONDII* VACCINE**

**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences  
Department of Parasitology  
PhD. Thesis, March 2019  
Supervisor: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM**

**ABSTRACT**

*Toxoplasma gondii* is a cosmopolitan parasite that is found all over the world. This parasite can cause mortality and also it is an important public health problem because of transplacental passage from pregnant women to babies. In order to diagnose toxoplasmosis and develop a vaccine against the disease, many antigens have been investigated and their activities have been evaluated from past to present.

This study aimed to perform molecular characterization of the gene encoding the SAG1 protein, which is an important surface antigen, using tachyzoites of *T. gondii* taken from Turkey Public Health Agency, and also to obtain recombinant protein and DNA, to demonstrate immune reactivity and to illustrate the sensitivity and specificity of recombinant SAG1 antigen in ELISA-based diagnosis. For this purpose, after isolation of genomic DNA (gDNA) from *T. gondii* tachyzoites, SAG1 gene region was amplified using originally designed primers and then cloned into plasmid vectors.

Through sequencing of the plasmid DNA obtained by cloning, nucleotide and amino acid sequences of the SAG1 gene and protein were obtained and their molecular features were demonstrated. It was shown that the SAG1 gene was a conserved gene region by using nucleotide and amino acid sequence based phylogenetic analysis.

The amplicons of the TrToxSAG1 isolate following the molecular characterization were successfully cloned into the pcDNA™ 3.1 / V5-His TOPO® expression vector as a DNA vaccine candidate and recombinant DNA was isolated and kept under appropriate conditions. The gDNA of TrToxSAG1 was amplified in PCR with optimized primers and the resulting amplicons were cloned in the pet100 expression system, recombinant antigen expression and isolation were performed.

The in-silico analysis of amino acids encoding the protein of SAG1 and SDS-PAGE and Western blot analysis of the recombinant antigen have shown that SAG1 is approximately 35 kDa. The obtained recombinant SAG1 antigen was utilized in ELISA and the efficacy of different concentrations of the antigen was evaluated in parallel with the reference diagnostic kit. Recombinant SAG1 ELISA had a sensitivity of 84.2% and a specificity of 81.0% respectively, and it was also found that there was a good correlation between the results of Recombinant SAG1 ELISA and the reference commercial kit results using kappa statistical test.

In conclusion, in this study, molecular characterization of SAG1, one of the important surface antigens of *T. gondii*, was performed for the first time in Turkey. The obtained results have been a basis for new research on the specific diagnosis of parasites and development of a vaccine against the disease by using the isolates specific to our country.

**Key words:** *Toxoplasma gondii*, SAG1 gene, Molecular Characterization, Cloning, Recombinant protein, DNA Vaccine, ELISA

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

<b>İÇ KAPAK</b> .....	<b>i</b>
<b>BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK</b> .....	<b>ii</b>
<b>YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI</b> .....	<b>iii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>v</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>viii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>x</b>
<b>KISALTMALAR</b> .....	<b>xiv</b>
<b>TABLolar LİSTESİ</b> .....	<b>xvi</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	<b>xvii</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1 TOXOPLASMOSIS VE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> .....	<b>3</b>
2.1.1 Tarihçe .....	<b>3</b>
2.1.2 Sınıflandırma.....	<b>3</b>
2.1.3 Morfoloji .....	<b>4</b>
2.1.4 Hayat Döngüsü.....	<b>7</b>
2.1.5 Bulaşma.....	<b>9</b>
2.1.6 Epidemiyoloji.....	<b>10</b>
2.1.7 Patogenez ve İmmünolojisi.....	<b>11</b>
2.1.8 Klinik .....	<b>14</b>
2.1.9 Tanı .....	<b>15</b>
2.1.10 Tedavi.....	<b>18</b>

2.1.11 Korunma.....	18
2.2 AŞI VE AŞI ÇALIŞMALARI .....	19
2.3 ADJUVANLAR.....	23
2.3.1 Alüminyum Tuzları.....	24
2.3.2 Emülsiyonlar (MF59).....	25
2.3.3 Lipozom ve virozomlar .....	25
2.3.4 Toll-like reseptör agonistleri .....	25
2.3.5 Saponinler (Quil A).....	27
2.3.6 İmmün stimüle edici kompleksler (ISCOMs).....	27
2.4 <i>TOXOPLASMA GONDII</i> YÜZEY ANTİJENLERİ.....	27
2.5 <i>TOXOPLASMA GONDII</i> YÜZEY GENLERİ VE EKSPRESYON.....	28
2.6 YÜZEY GENLERİNDEKİ FARKLILIK VE VARYASYONLAR .....	28
2.7 YÜZEY GENLERİNİN FONKSİYONLARI.....	29
2.8 SAG1 GENİ .....	30
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>31</b>
3.1 TOTAL GENOMİK DNA İZOLASYONU .....	32
3.2 <i>T. GONDII</i> SAG 1 GENİNİN AMPLİFİKASYONU .....	33
3.3 SAG1 GENİNİN KLONLANMASI.....	33
3.3.1 SAG1 Geninin pJET1.2/blunt Plazmitine Klonlanması .....	34
3.3.2 Transformasyon .....	35
3.3.3 Klonlamanın Doğrulanması .....	36
3.3.4 Rekombinant pJET1.2+SAG1 Plazmitinin Eldesi ve Saflaştırılması .....	36
3.4 SAG1 GENİNİN SEKANS VE FİLOGENETİK ANALİZLERİ .....	38
3.4.1 SAG1 Geni Nükleotid Sekans ve Filogenetik Analizleri.....	38
3.4.2 SAG1 Geni Amino Asit Sekanslarının In-Silico Analizleri .....	38

3.5 SAG 1 GENİNİN PLAZMİD DNA AŞI ADAYI OLARAK PCDNA3.1 MEMELİ EKSPRESYON VEKTÖRÜNE KLONLANMASI .....	39
3.6 REKOMBİNANT <i>T. GONDII</i> SAG 1 PROTEİNİNİN EKSPRESYONU, KARAKTERİZASYONU VE İMMUN REAKTİVİTESİNİN GÖSTERİLMESİ.....	41
3.6.1 SAG 1 Geninin pET100 Ekspresyon Vektörüne Ligasyonu .....	41
3.6.2 Rekombinant pET100+SAG1 Plazmidinin One Shot BL21 Star (DE3) Kompetan Hücrelerine Transformasyonu .....	43
3.6.3 <i>T. gondii</i> Rekombinant SAG 1 Proteininin Ekspresyonu .....	43
3.6.4 Rekombinant SAG 1 Proteininin Analizi.....	43
3.6.5 Rekombinant SAG 1 Proteininin Saflaştırılması .....	46
3.7 REKOMBİNANT SAG 1 ANTİJENİNİN ELISA YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ .....	47
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>49</b>
4.1 <i>T. GONDII</i> SAG 1 GENİNİN AMPLİFİKASYON VE pJET1.2/BLUNT VEKTÖRÜNE KLONLAMASI.....	49
4.1.1 SAG 1 Geninin Amplifikasyonu .....	49
4.1.2 pJET1.2/blunt Vektörüne Klonlama .....	50
4.2 <i>T. GONDII</i> SAG 1 GENİNİN SEKANS VE FİLOGENETİK ANALİZ SONUÇLARI.....	52
4.3 <i>T. GONDII</i> SAG 1 GENİNİN DNA AŞISI OLARAK PCDNA3.1 VEKTÖRÜNE KLONLAMASI.....	60
4.4 <i>T. GONDII</i> SAG 1 GENİNİN EKSPRESYON ANALİZİ SONUÇLARI.....	62
4.4.1 pET100 Directional TOPO Ekspresyon Vektörüne Klonlama .....	62
4.4.2 Rekombinant <i>T. gondii</i> SAG 1 geninin One Shot BL21 Star (DE3) <i>E. coli</i> hücrelerine transformasyonu .....	65
4.4.3 SDS-PAGE ve Western Blot Analiz Sonuçları.....	67
4.5 REKOMBİNANT <i>T. GONDII</i> SAG 1 ANTİJEN ELISA SONUÇLARI .....	68

<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>72</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>78</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>92</b>



**KISALTMALAR**

$\mu$ l	: Mikrolitre
$\mu$ m	: Mikrometre
AIDS	: Edinilmiş Bağışıklık Yetersizliği Sendromu
CFT	: Komplement Fiksasyon Testi
CTL	: Sitotoksik T-lenfosit
DAT	: Direkt Aglutinasyon Testi
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	: Enzim Bağlı İmmunosorban Yöntem
FDA	: U.S. Food and Drug Administration
GP	: Glikoprotein
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
IFAT	: İndirekt Floresan Antikor Testi
IFN	: İnterferon
IgG	: İmmünglobulin G
IgM	: İmmünglobulin M
IHAT	: İndirekt Hemaglutinasyon Testi
IL	: İnterlökin
LAT	: Lateks Aglutinasyon Test
LPG	: Lipofosfolikan
LPS	: Lipopolisakkarit
M.Ö.	: Milattan önce
MAT	: Modifiye Aglutinasyon Test
MHC	: Major Histokompatibilite Kompleksi



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

## TABLOLAR LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 2.1.</b>	<i>T. gondii</i> hayat döngüsünde bulunan farklı hayat evrelerindeki değişiklikler .....	13
<b>Tablo 2.2.</b>	Takizoit veya bradizoitte bulunan <i>T. gondii</i> yüzey antijenlerinin gen ve proteinleri .....	28
<b>Tablo 3.1.</b>	Deneylerde kullanılan cihazlar. ....	31
<b>Tablo 3.2.</b>	Deneylerde kullanılan malzemeler. ....	31
<b>Tablo 4.1.</b>	SAG1 geninin <i>T. gondii</i> ve <i>N. caninum</i> arasındaki nükleotid farklılığı ....	55
<b>Tablo 4.2.</b>	<i>T. gondii</i> SAG 1 proteininde tespit edilen antijenik bölgeler .....	58
<b>Tablo 4.3.</b>	SAG 1 antijeninin farklı konsantrasyonları ile elde edilen OD değerlerinin ROC analizleri sonucu belirlenen cutoff değerleri ve istatistiksel analizi.....	69
<b>Tablo 4.4.</b>	SAG1 ELISA'nın referans TOXO IgG ELISA sonuçlarına göre özgünlük ve duyarlılığı .....	70
<b>Tablo 4.5.</b>	SAG1 ELISA'nın referans TOXO IgG ELISA sonuçlarıyla Kappa analizine göre uyumu.....	71

## ŞEKİLLER LİSTESİ

### Sayfa

<b>Şekil 2.1.</b>	<i>Toxoplasma gondii</i> trofozoiti.....	5
<b>Şekil 2.2.</b>	Fare beyinde bulunan doku kisti içindeki bradizoitler.....	6
<b>Şekil 2.3.</b>	<i>Toxoplasma gondii</i> ookisti .....	7
<b>Şekil 2.4.</b>	<i>Toxoplasma gondii</i> 'nin hayat döngüsü .....	9
<b>Şekil 2.5.</b>	<i>T. gondii</i> antikor serolojilerinin yorumlanması .....	17
<b>Şekil 3.1.</b>	Vektör haritası; pJET1.2/blunt.....	35
<b>Şekil 3.2.</b>	pcDNA3.1/V5-his TOPO® vektör haritası.....	40
<b>Şekil 3.3.</b>	pET100 Champion Directional TOPO vektör haritası .....	42
<b>Şekil 4.1.</b>	Mikroskop altında görüntülenen <i>T.gondii</i> takizoitleri .....	49
<b>Şekil 4.2.</b>	1010 bp uzunluğundaki SAG1 PCR ürününün %1,5'luk agaroz jel görüntüsü .....	50
<b>Şekil 4.3.</b>	<i>E. coli</i> kompetan hücrelerine <i>T. gondii</i> SAG 1 geninin transformasyonu sonrası katı besiyerinde üreyen koloniler .....	51
<b>Şekil 4.4.</b>	Kolonilerde PCR tarama ile SAG1 geninin varlığının doğrulanması.....	51
<b>Şekil 4.5.</b>	Rekombinant pJET1.2+SAG1 plazmidin gen spesifik primerlerle PCR sonucu belirlenen ampikonların agaroz jel üzerinde görünümü.....	52
<b>Şekil 4.6.</b>	TRtoxSag1 izolatının SAG1 geninin açık okuma çerçevesi (ORF) nükleotid ve amino asit sekansları .....	53
<b>Şekil 4.7.</b>	SAG1 data setindeki izolatlara ait nükleotid sekanslarının çoklu hizalama analiz sonucu .....	54
<b>Şekil 4.8.</b>	SAG1 data setindeki izolatların ML analizine göre filogenetik analiz sonuçları.....	56
<b>Şekil 4.9.</b>	<i>T. gondii</i> TRtoxSag1 izolatının SAG 1 amino asit sekansı ve özellikleri .	57
<b>Şekil 4.10.</b>	SAG1 data setindeki izolatlara ait amino asit sekanslarının çoklu hizalama analiz sonucu .....	59

- Şekil 4.11.** *T. gondii* SAG 1 proteininin 3 boyutlu görünümü ve aminoasit dizisi..... 60
- Şekil 4.12.** PCR ürünü *T. gondii* SAG 1 geninin *E. coli* kompetan hücrelerine transformasyonu sonrası üretilen koloniler..... 61
- Şekil 4.13.** PCR tarama ile kolonilerde rekombinant plazmid varlığının doğrulanması..... 61
- Şekil 4.14.** Rekombinant pcDNA 3.1+SAG 1 plazmidin gen spesifik primerlerle PCR sonucu belirlenen amplikonların agaroz jel üzerinde görünümü. .... 62
- Şekil 4.15.** Agaroz jel elektroforezde pET100 ekspresyon vektörüne ligasyon için modifiye edilen primerlerle TRtoxSag1 izolatına ait SAG1 PCR ürününün görünümü..... 63
- Şekil 4.16.** *T. gondii* SAG 1 PCR ürününün One Shot Top10 *E. coli* kompetan hücrelerine transformasyonu sonrası üretilen koloniler..... 64
- Şekil 4.17.** PET100 ekspresyon sisteminde PCR tarama ile kolonilerde rekombinant plazmid varlığının doğrulanması ..... 65
- Şekil 4.18.** SAG1 rekombinant plazmitinin One Shot BL21 Star (DE3) *E. coli* kompetan hücrelerine transformasyonu sonrası LB besi yerinde belirlenen koloniler ..... 66
- Şekil 4.19.** One Shot BL21 Star (DE3) kolonilerinde rekombinant plazmid varlığının koloni PCR tarama ile doğrulanması ..... 66
- Şekil 4.20.** TrToxSAG1 izolatının pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin saatlere göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin SDS-PAGE analizi görüntüsü ..... 67
- Şekil 4.21.** 0,001-0,1mM IPTG konsantrasyonu ile indüklenen rekombinant proteinlerin Western Blot analizi sonrası membran üzerinde görünümü. . 68
- Şekil 4.22.** TOXO IgG ELISA kiti ve SAG1 antijen ELISA analizi sonucu pleytlerde şekillenen reaksiyonların görünümü ..... 69
- Şekil 4.23.** SAG 1 antijeninin farklı konsantrasyonları ile elde edilen ROC eğrileri .. 70

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

*Toxoplasma gondii*, dünya çapında yaygın dağılım gösteren zorunlu intrasellüler bir parazittir (1). Çok farklı ve geniş konak dağılımı gösteren *T. gondii*, memelilerden kuşlara kadar tüm sıcakkanlı hayvanları enfekte etme yeteneğine sahiptir (2). Transplental bulaşma sonucunda insanlarda ve hayvanlarda ölü doğum, düşük ve fetal anomalilere, immün sistemi baskılanmış ya da zayıf bireylerde birçok organ tutulumundan meningoensefalit tablosuna kadar hayatı tehdit eden durumlara neden olmaktadır. Bu özellikler *T. gondii*'yi sağlık ve ekonomik açıdan önemi yüksek bir parazit yapmasının yanında, aşı çalışmaları kapsamına alınan bir parazit olmasına neden olmaktadır (3).

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

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

*Toxoplasma gondii* takizoit ve bradizoitlerinin glikosilfosfolipid (GPI) ile ilişkili antijenlerle kaplı olduğu gösterilmiştir. Bu antijenlerin büyük bir çoğunluğu SAG1 ve SAG2'den oluşmaktadır. *T. gondii* yüzey moleküllerinin konak hücreye invazyonda immün modülasyonda ve virülansda önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Aynı zamanda parazitin çevrede yaşamını sürdürebilmesine katkı sağladığı görülmüştür (70). Dolayısıyla parazitin patogenezinin aydınlatılması, aşı çalışmaları ve tanı kitlerinde hedef molekül olarak SAG proteinleri yoğun olarak kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında toxoplasmosis'e karşı umut verici aşı adaylarından olan *T. gondii* SAG 1 geninin Türkiye izolatu kullanılarak moleküler karakterizasyonu ve filogenetik analizinin yapılması, SAG 1 geni taşıyan plazmid DNA ve SAG 1 rekombinant proteininin elde edilmesi, antijenik yapısının incelenmesi ve serolojik etkinliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 TOXOPLASMOSIS VE *TOXOPLASMA GONDII*

#### 2.1.1 Tarihçe

İlk kez 1900 yılında bir kuş türü olan java serçesinin hemotopoetik sisteminde tespit edilen *T. gondii*, *Haemamoeba danilewskyi*'nin çoğalan bir formu olarak düşünülmüştür(4).

Charles Nicolle ve L. Manceaux isimli iki araştırmacı tarafından ilk kez 1908 yılında tanımlanan *T. gondii*, Kuzey Afrika'da Tunus'ta yaşayan *Ctenodactylus gundii* isimli bir kemirgenin karaciğer, dalak ve kemik iliğinde saptanmıştır. Parazitin cins isminde geçen "toxon" kelimesi yunanca olup yay anlamına gelmektedir. Parazit yay şekline benzediği için parazitin isimlendirilmesi bu şekilde yapılmıştır (6). İlk insan olgusu 1923'te Prag'ta Janku tarafından yaklaşık bir yaşında olan bir bebeğin gözünde saptanmıştır. 1937'de Cowen ve Wolf tarafından ilk yeni doğan ensefaliti bildirilmiştir. Kean ve Grocott tarafından 1945'te ilk defa asemptomatik kişilerde *T. gondii*'ye bağlı doku kistleri gösterilmiştir. 1949'da Sabin ve Feldman tarafından toxoplasmosis tanısında kullanılan sensivitesi ve spesivitesi yüksek bir test olan Dye testi kullanılmaya başlanmıştır. Remington, Jacobs ve Melton 1960 yılında *T. gondii*'nin hayvan etinden de insana bulaşabileceğini göstermişlerdir. Ülkemizde ilk insan olgusu Unat ve arkadaşları tarafından 1953'te bildirilmiştir (6, 7).

#### 2.1.2 Sınıflandırma

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

Bölüm : Eukaryota

Alem : Protozoa

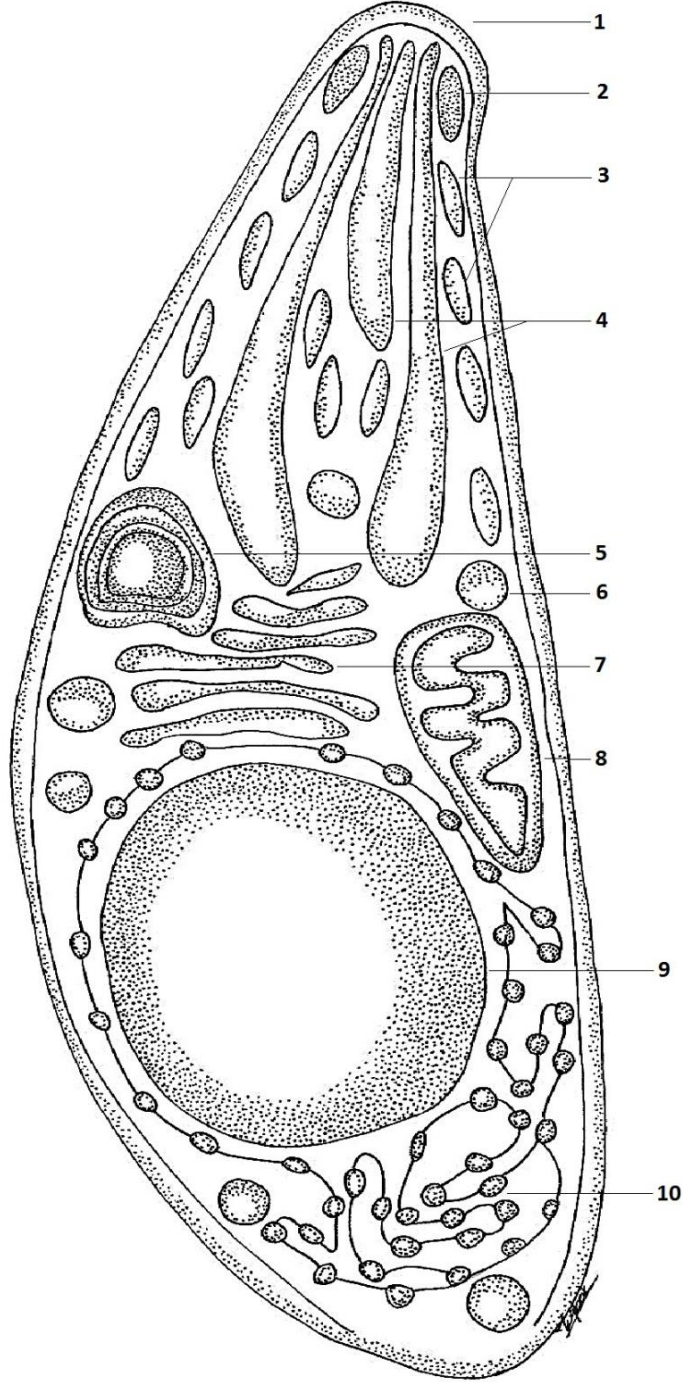
Şube	:	Mizozoa
Alt Şube	:	Apicomplexa
Sınıf	:	Conoidasida
Alt Sınıf	:	Coccidiasina
Takım	:	Eucoccidiasina
Alt Takım	:	Eimeriorina
Aile	:	Sarcocytidae
Alt Aile	:	Toxoplasmatinae
Tür	:	<i>Toxoplasma gondii</i>

### 2.1.3 Morfoloji

*T. gondii*'nin üç enfektif dönemi vardır. Bunlar hızlı bölünen invaziv takizoit, doku kistlerinin içinde yaşayan ve yavaş bölünen bradizoit ve ookistin içinde korunmuş halde bulunan sporozoittir (8).

**Takizoitler (trofozoitler, hızlı çoğalan form)**, hilal veya muz şeklinde olup uzunluğu 4-8 µm, genişliği de 2-3 µm'dir. Bir ucu yuvarlak iken diğer uç daha incedir. İnce olan kısım sivri olmayıp daha çok ucu kesilmiş gibi düz bir şekilde sonlanır. Giemsa veya Wright boyası ile boyanan örneklerde çekirdek kırmızı – mor renkte boyanırken, sitoplazma ise mavi renkte boyanır. Bu form serolojik testlerde (Sabin-Feldman Testi, Floresan Antikor Testi gibi) sıklıkla kullanılmaktadır. *T. gondii* ökaryot canlıların ortak özelliği olan nükleus, mitokondri ve golgi cisimciğine sahip olmasının yanında bazı özelleşmiş organelleri de bulunmaktadır. Bu organeller yaygın olarak parazitin apikal ucunda bulunurken daha çok invazyon mekanizmasında görev alırlar. Bu organellerden bazıları sekretuar tiptedir. Bunlar mikronemler, roptriler ve dens granüllerdir. Bazıları da daha çok parazitin iskeletini oluşturan yapısal organellerdir. Bunlar apikoplast ve konoittir. Apikoplast 4 kat membranla kaplı özel bir organel olup, konoid, tubulin ve polar ring gibi birçok elemandan oluşmaktadır. Plazma membranı boyunca uzanan mikrotübül denen yapı parazitin yaklaşık 2/3'ü kadardır. Parazit kendisine karakteristik şeklini veren inner membranla çevrelenmiştir (2, 9) (Şekil 2.1).

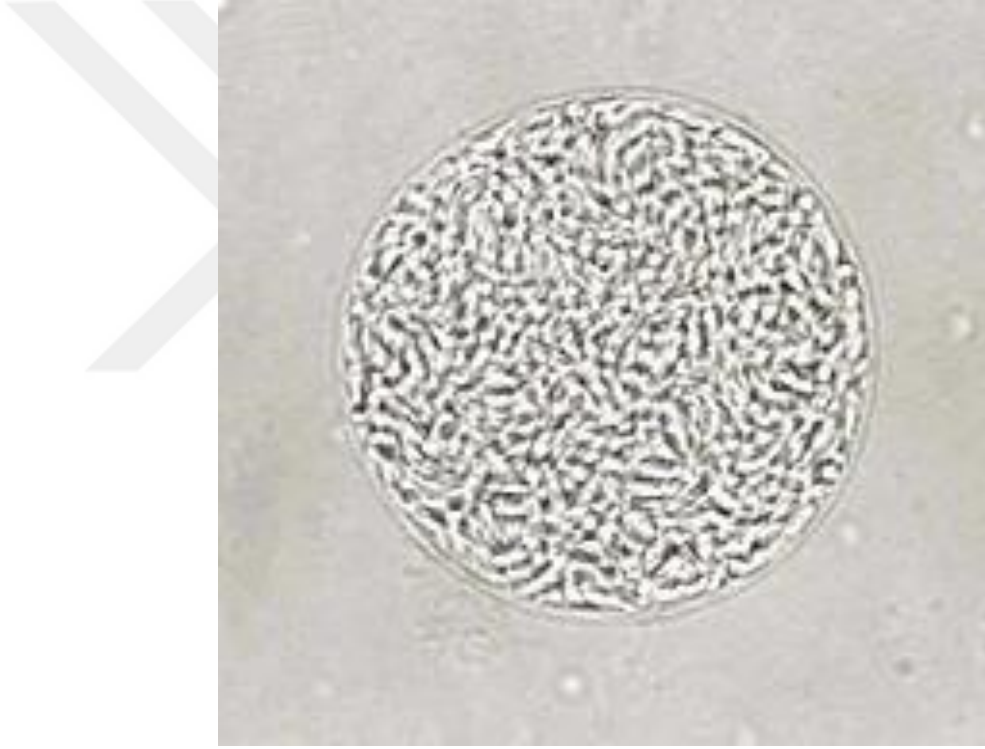




**Şekil 2.1.** *Toxoplasma gondii* trofozoiti; 1: Apikal uç, 2: Konoid, 3: Mikronem, 4: Roptri, 5: Apikoplast, 6: Dense Granülü, 7: Golgi Aygıtı, 8: Mitokondri, 9: Nükleus, 10: Granüllü Endoplazmik retikulum (10).

**Bradizoitler (kistler veya doku kistleri),** *T. gondii*'nin hücre içine girdikten sonraki dönemde hücresel immün cevabın oluşmasını takiben oluşan doku kistlerinin içinde yavaş çoğalan formu bradizoit olarak adlandırılmaktadır. Bu kistler birçok doku ve

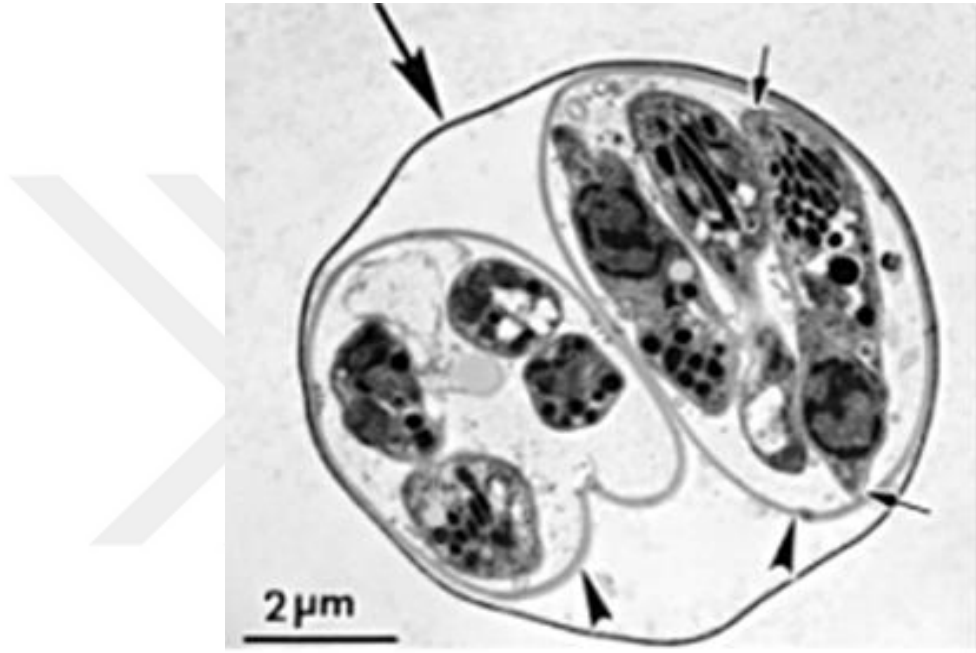
organa yerleşebilirken daha çok beyin ve kasları tercih etmektedirler. Bu kistler beyinde daha ovalimsi iken kas dokusunda ise ince ve uzun bir hal alır. Kistlerin boyutları çok değişkendir. Genç kistler 10  $\mu\text{m}$  iken, daha yaşlı olan kistler ise 100  $\mu\text{m}$ 'ye kadar çıkabilmektedirler. Bu kistlerin içinde yüzlerce bazen binlerce bradizoit bulunabilmektedir (11). Kist içinde bulunan bradizoitler endodiyogeni ile çoğalırlar. Doku kisti şeklinde alınan bradizoitler sindirim sisteminden asit pepsine karşı olan resistansları sayesinde yapısı bozulmadan geçerler. Periyodic-acid-schiff boyası (PAS), Wright-Giemsa, Gomori'nin methamine silver ve immunoperoksidaz boya ile boyanırlar (4) (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2.** Fare beyinde bulunan doku kisti içindeki bradizoitler (10).

**Ookistler (kedi dışkıdaki form),** *T. gondii*'nin kedi ve kedigillerin bağırsaklarında eşeyli üremenin sonucunda oluşan ve dışkıyla dışarıya atılan enfektif bir formudur. Ookistler oval, 11-14  $\mu\text{m}$  x 9-11 $\mu\text{m}$  boyutundadır. Her bir ookist 2 sporokist içerir. Her sporokist 4 adet sporozoit içermektedir. Ookist duvarı sağlam, güçlü çok katlı tabakalardan oluşmaktadır. Bu yapı onu çevresel faktörlerden korunmasına katkı sağlamaktadır (12). Kedi dışkısıyla dışarıya atılan form henüz enfektif değildir. Enfektif olabilmesi ve olgunlaşabilmesi için uygun hava ve nem koşullarına gereksinim duyar.

Bu olgunlaşma sürecine sporulasyon adı verilmektedir. Bu süreç ortamın ısı, nem ve oksijen miktarına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Sporulasyonun, 24°C’de 2-3 gün, 15°C’de 8 gün, 11°C’de 14-21 gün sürdüğü, 4°C’nin altında veya 37°C’nin üstünde ise oluşmadığı gösterilmiştir. Olgunlaşan ookistler uygun şartlarda toprakta 1 yıl kadar canlılığını koruyabilmektedir. Ookistlerin klorlamaya ve bazı dezenfektanlara da dirençli olduğu bilinmektedir (13) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. *Toxoplasma gondii* ookisti (5).

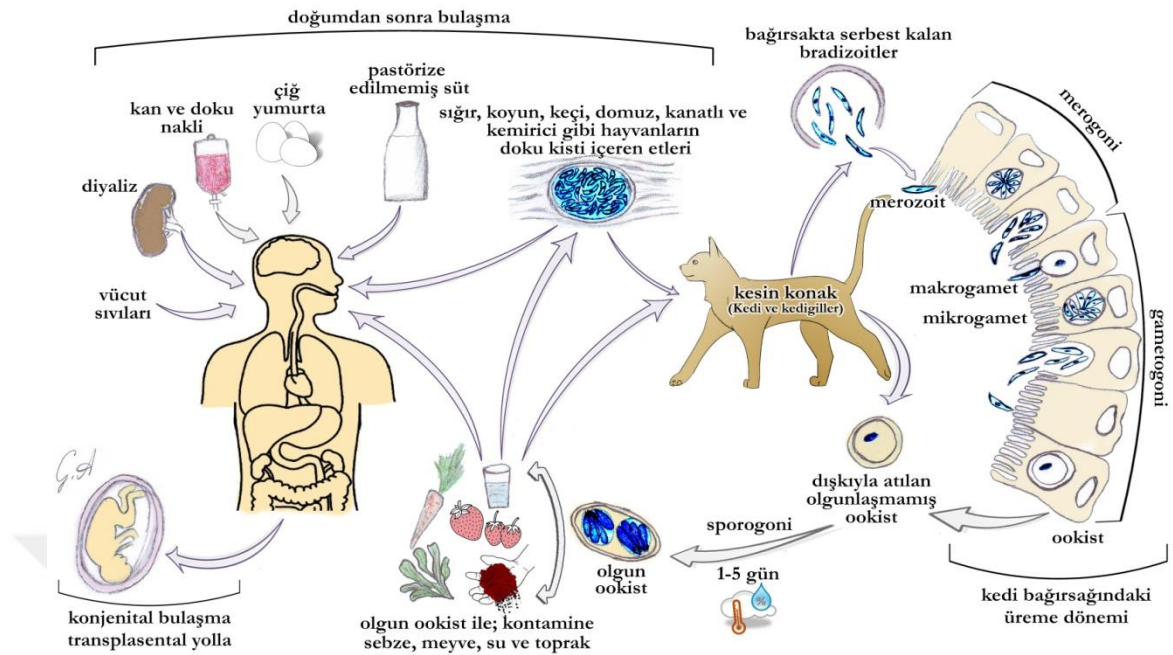
#### 2.1.4 Hayat Döngüsü

*Toxoplasma gondii*'nin doku kistlerini ya da sporlanmış ookistlerini oral yolla alarak enfekte olan kedilerde parazit iki farklı şekilde gelişme gösterir. Bu gelişmeler enterik ve ekstraintestinal fazların birbirini takip etmeleri sonucunda oluşur. Aseksüel dönemde merogoni ile merozoitler, gametogoni ile gametler oluşurken, seksüel dönemde sporogoni ile ookistler meydana gelir. Bu seksüel dönem sadece kedi ve kedigillerde oluşmaktadır. Parazitin neslinin devamında kedi anahtar bir rol oynamaktadır (14). Son konak olan kedinin beslenmesi esnasında parazitin herhangi bir formunu alması sonucunda parazit, kedinin incebağırsak epitel hücrelerine girer. Bu döneme enterik ya da enteroepitelyal faz denir ve sadece kedigillerde gerçekleşir. Alınan sporozoitler bağırsak epitel hücrelerine girerken etrafında parazitoforik vakuol oluşur. Bu vakuol içinde sporozoitler trofozoite dönüşür. Oluşan bu trofozoitlerde endodiyogoni ile

bölünerek çoğalmaya başlar. Bir hücrede şizontların içinde bir trofozoitten yaklaşık 2-40 kadar merozoit oluşur. Enfeksiyondan birkaç gün sonra sayıları artan merozoitler hücreyi parçalayarak yeni hücreleri enfekte etmeye başlarlar (15). Yeni hücelere giren bu merozoitlerden mikrogametosit ve makrogametosit oluşur. Oluşan her bir mikrogametositten de 12 mikrogamet meydana gelir. Mikrogametlerin buldukları hücreyi parçalamasının ardından makrogamet içeren hücreye girerler. Hücre içinde bulunan mikrogamet, makrogameti döllemesi sonucunda zigot oluşur. Oluşan zigot ookiste dönüşür ve kedilerin bağırsak lümenine atılır. Kedinin dışkılaması esnasında dışarıya atılan ookist uygun ısı, nem ve oksijen varlığında sporlanır ve bu döneme sporulasyon denir. Bu dönemde her bir ookist içinde 2 sporokist, her bir sporokist içinde de 4 sporozoit meydana gelir. Bu aşamaları geçiren ookist artık enfektif hale gelmiştir (4, 9, 16).

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

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



Şekil 2.4. *Toxoplasma gondii*'nin hayat döngüsü (9).

### 2.1.5 Bulaşma

Toksoplazmozis'te bulaşma edinsel ve konjenital olarak şekillenmektedir. Edinsel bulaşma kedi dışkılarındaki ookistler ile kontamine su ve gıdaların alınması, bradizoitler bulunan doku kistlerini barındıran çiğ veya yeterince pişmemiş etlerin yenilmesi ile gerçekleşirken, konjenital bulaşma takizoitlerin transplasental olarak geçmesi sonrasında meydana gelmektedir. Son konağın dışkısı ile henüz sporüle olmayan olgunlaşmamış ookistler dışarıya atılırlar. Ara konaklar bu ookistleri farklı yollarla alırlar. Alınan bu ookistler ara konağın vücudunda hızlıca takizoite dönüşüp, savunma sisteminin devreye girmesiyle dokularda bradizoit içeren doku kistleri haline dönüşürler. Vücutlarında doku kisti bulunduran ara konakların, son konak kedi tarafından yenmesi ile kediler enfekte olurlar. Doku kisti içeren etlerin çiğ ya da az pişmiş yenmesiyle, kontamine ookistlerle, kan, kemikiliği ve organ nakli esnasında *T. gondii* ile enfekte olunabilir. Anneden bebeğe transplasental yolla bulaş olabilmektedir. Boyalı biyopsi örneklerinde doku kistleri görülmesine rağmen tanı seroloji ile konur. Konjenital infeksiyonun tanısında amniyon sıvısında *T. gondii* DNA'sı PCR ve Real-Time PCR gibi moleküler yöntemlerle tespit edilebilmektedir.

### 2.1.6 Epidemiyoloji

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

Enfeksiyon etkeninin insanlara çok farklı yollar ile bulaşabildiği; akut dönemde tüm vücut sıvılarıyla, pastörize olmamış keçi sütüyle, hemodiyaliz ile olabileceği gibi daha çok kist barındıran besinlerin çiğ veya az pişirilip yenmesi ve ookist barındıran yiyeceklerin alınması yolu ile gerçekleşir. Enfeksiyonun dağılımında kedi dışkılarıyla kontamine ookistlerin alınması yolu da önemlidir. Ayrıca bu ookistlerin yayılımında bazı böcek ve sineklerde görev almaktadır. Kedilerin dışkılama alışkanlığında dışkının toprağa gömülmesi de parazit neslinin devamı açısından önem arz etmektedir (9).

Son yıllarda organ transplantasyonlarının ve kemik iliği naklinin artması, kanserli ve AIDS hastalarındaki artış sebebiyle *T. gondii*'nin giderek önemi artan bir parazit olmasına neden olmuştur. Konjenital enfeksiyonun olduğu durumlarda, hidrosefali intrakranial kalsifikasyon, korioretinit, mikrosefali gibi tablolara neden olabildiğinden bu konuda önemli çabalar sarf edilmektedir (21-24).

*T. gondii* seroprevalansı insanlar, sıcakkanlı hayvanlar ve son konak kedilerde dünya çapında çok farklı oranlarda bulunmaktadır. Hastalık %10 gibi düşük oranlarda olabileceği gibi %80 civarında da görülebilmektedir. Genel olarak dünya nüfusunun yaklaşık %30'unun *T. gondii* ile enfekte olduğu bildirilmektedir (19, 24). *T. gondii* prevalansı, Güneydoğu Asya, Kuzey Amerika, Kuzey Avrupa ve Afrika sahil ülkelerinde %10-30 civarlarında iken, Orta ve Güney Avrupa ülkelerinde bu oranın %30-50 olduğu belirtilmiştir. Tropikal Afrika ve Latin Amerika ülkelerinde ise bu oranın daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Bu oranlar ülkeden ülkeye değişebileceği gibi aynı ülkedeki farklı toplumların arasında da değişkenlik gösterebilmektedir. Bu değişikliğin ana nedenleri arasında iklim faktörleri yer almaktadır. Çünkü iklim faktörleri ookistin canlı kalma süresini etkilemektedir. Tropikal iklimlerde, nemli topraklarda ve sıcak havanın olduğu bölgelerde yüksek seroprevalans görülürken, kurak ve soğuk bölgelerde bu oranın daha düşük olduğu görülmüştür.

İklim faktörlerinin yanı sıra toplumların antropogenetik özellikleri de hastalığın prevalansında önemli bir yer tutmaktadır. Örneğin diyet alışkanlıkları (pişirme metodları, el yıkama alışkanlıkları, tüketilen etin cinsi, sebze meyve yıkama alışkanlığı), ekonomik, sosyal, kültürel seviye, kullanılan suyun temizliği gibi faktörler hastalığın prevalansını etkilemektedir (2).

Kötü hijyen koşulları altında yaşayan çocuklarda *T. gondii* seroprevalansının yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu durumun muhtemelen su kaynaklı olabileceği üzerinde durulmuştur.

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

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de *T. gondii* farklı seroprevalanslar göstermektedir. 1983-87 yılları arasında Özcan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 4200 hasta serumunun yaklaşık %49'unda, 1991-95 yılları arasında Altıntaş ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 9410 hasta serumunun yaklaşık %50'sinde, 2003 yılında ise Yazar ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada hastaların %58,2'sinde *T. gondii*'ye ait antikörlere rastlanmıştır (4).

### 2.1.7 Patogenez ve İmmünoloji

*Toxoplasma gondii*'nin oluşturduğu patolojinin temelinde girdiği hücreyi parçalamasıyla meydana gelen hücre hasarı vardır.

*Toxoplasma gondii*'nin çok geniş bir konak yelpazesinde, invazyon yeteneği vardır. Bu invazyon mekanizması önceden bilinenin aksine aktif bir mekanizmadır. Bu mekanizmada parazitin aktif motilitesi ve sekretuar organellerden (micronem, rhoptri, dense granül) salınan proteinler görev almaktadır (Tablo 2.1). İnvazyon için öncelikle adezyon yani konak hücreye tutunma gerekmektedir. Bunun için mikronemlerden

salınan mikronem proteinleri gerekir ve bu olay kalsiyum bağımlı bir mekanizma ile gerçekleşir. Mikronemlerin konak hücre yüzeyindeki reseptörlerle olan ilişkisi parazitin oryantasyonunu gerçekleştirmesine katkıda bulunurken, adezyonunu da güçlendiren bir mekanizmadır. İnvazyon, konak hücre yüzeyi ile parazit arasındaki kompleks bir ilişkiye dayanır. Bu dinamik olay parazitin sitoskeleton yapısında bulunan aktin miyozin etkileşmesi ile karmaşık bir lineer motor sistem kurularak hücre içine girmesi sağlanır. Bu mekanizmaya “gliding motility” adı verilmektedir. Bir başka deyişle parazit hücre içine kayma hareketine benzer bir hareketle girmektedir (5).

Hücre içine giriş yakın zamana kadar bilinenin aksine, endositik bir aktivite olmayıp, parazitin apikal tarafı ile konak hücre membranı arasında kurulan “tight junctionlar” sayesinde adına “moving junction” denilen bir mekanizma ile gerçekleşmekte ve sadece 15 ile 30 saniye arasında parazit hücre içine girmektedir. Kurulan hücreler arasındaki köprüler sayesinde “moving junction” mekanizması ile parazitin önce apikal tarafı sonrada diğer ucu hücre içine girmekte ve parazitin etrafını parazitoforik vakuol çevrelemektedir. Bu sistemde görevli olan diğer yapılar ise parazitin apikal ucunda bulunan apikal membran antijeni, mikronemler, roptriler, roptri neck proteinleridir. Meydana gelen parazitoforik vakuolun devamlılığını sağlayan roptrilerden salınan proteinlerdir. Bu roptrilerden ROP2 ve ROP18 parazitoforik vakuolun sitozolik tarafı ile ilişki içinde olup protein kinaz aktivitesine sahiplerdir. Bu aktivite sayesinde parazitin büyümesine ve virülansına katkı sağlarlar (26). İnvazyonda görevli diğer bir roptri proteini de ROP16 olup, konak hücre gen ekspresyonunu etkileyip, interlökin salınımına neden olmaktadır (27).

İnvazyonda ROP proteinlerinin yanında, dense granüllerde görev almaktadır. Dense granülleri invazyondaki ilk bir saate oluşan parazitoforik vakuolün şekillenmesine katkıda bulunmaktadırlar. Oluşan bu parazitoforik vakuol paraziti lizozomal enzimlerden ve sitoplazmik veziküllerden korumaktadır. Dense granüllerden salınan sekresyonların parazitoforik vakuol membranından gelişen membran tübülleri ve vakuoler lümenin oluşumuna katkı sağladığı, oluşan bu tübül ve lümen yapısının parazit ve konak hücre arasında madde alışverişine katkı sağladığı, parazitin konak hücre sitozolünden besinleri alırken, parazitin sentezlediği bazı lipid yapılı bileşikler ve proteinleri de konak hücreye aktarımında rol aldığı gösterilmiştir (28).



*T. gondii* için hayati öneme sahip olan parazitoforik vakoul yapısı konak hücre mitokondrisi ile ilişkilidir. Buda parazitin metabolizması için gereken enerji kaynağını karşılama açısından önem arz etmektedir. Parazitoforik vakoul yapısı içinde endodiyogeni ile çoğalan takizoitler ortalama 6 ya da 9 döngüden sonra sayıları yaklaşık olarak 64 veya 128 oluncaya kadar bu vakoul yapısı içinde kalmaya devam ederler. Bu sayıya ulaşan parazitin içinde bulunduğu hücre içi kalsiyum artışıyla tetiklenen mekanizma, takizoitlerin hücreyi parçalayıp serbest kalması ile sonuçlanır. Serbest kalan parazitler komşuluk yoluyla yeni hücreleri enfekte edebileceği gibi, kan ve lenf yolu ile taşıyıp uzak organ ve dokuları da invaze edebilir (29).

Meydana gelen hücre ölümlerinin artmasıyla beraber hastalığın patolojisi de belirgin hale gelmeye başlar. Farklı organ ve dokularda farklı histopatolojik belirtiler oluşur. Örneğin lenf bezleri büyür ve şişerken kimi zaman bu duruma ateşte eşlik edebilmektedir. Hepatosplenomegali, akciğerlerde hiperemik görünüm, bağırsak duvarının kalın ve ödemli görünümü akut toxoplasmosis'in klinik belirtileri arasındadır. Çoğu zaman hastanın immün sisteminin devreye girmesiyle, eğer herhangi bir immün sistemi baskılayan bir durum söz konusu değil ise hastalık hafif grip benzeri semptomlarla ya da asemptomatik olarak geçirilebilmektedir (2, 4, 29, 30).

Kronik *T. gondii* enfeksiyonunda bradizoitlerin hücreleri parçalama şansları çok sınırlı olduğundan, klinik belirtiler nadir görülmektedir. Ancak bağışıklık sisteminin hasar gördüğü durumlarda bradizoitler takizoit forma dönüşebilmektedirler. Genellikle bu durum çok ağır ve öldürücü olabilmektedir (23, 24).

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

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

### 2.1.8 Klinik

*T. gondii* enfeksiyonu başlıca 2 gruba ayrılabilir.

1. Konjenital enfeksiyon

2. Postnatal enfeksiyon

Postnatal enfeksiyon da kendi arasında immun sistemi sağlam bireyler ve immün sistemi baskılanmış bireyler olmak üzere iki kısımda incelenebilir.

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

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

Bebekte meydana gelen klinik tablonun ciddiyeti enfeksiyon ajanıyla hangi dönemde karşılaşıldığıyla yakından ilişkilidir. Eğer bu dönem ilk üç aylık periyotta ise parazitin bebeğe geçme oranı %10 iken, bu oran ikinci üç aylık dönemde %30, son dönemde ise %70'lere kadar çıkabilmektedir. Fakat oluşan klinik tablonun şiddetiyle, parazitin bebeğe geçtiği trimester ters orantılıdır. Yani ne kadar erken dönemde bebeğe geçiş olursa bebekte meydana gelen hasar o denli şiddetli olmaktadır (22, 31). Bebeğe geçiş son trimesterde olduğunda, vakaların %80'den fazlasında klinik tablo oluşmayıp asemptomatik seyretmektedir. Fakat parazitin bebeğe geçişi ilk trimesterde oluşursa çok ağır tablolar oluşabilmektedir. *T. gondii* nörotrop bir parazit olduğundan beyin ve göze yerleşebilmekte ve buralarda ilk trimesterde çok ağır tablolara neden olabilmektedir. Santral sinir sisteminde özellikle beyaz cevheri tutup bu bölgelerde inflamasyon odakları ve ardından nekrotik odaklar oluşturmaya başlar. Bunun neticesinde nekrotik

odaklar aqua ductus sylvius'u tıkar ve neticesinde lateral ventriküllerde dilatasyon ve sonucunda hidrosefali tablosu oluşur. Oluşan bu nekrotik odaklara kalsiyumun çökmesi neticesinde kalsifikasyon odakları oluşmakta ve oluşan odaklar X-ray veya transfontanel ekografi ile de görüntülenebilmektedir. İlk trimesterde oluşan majör sekeller, mental reterdasyon, epileptik nöbetler, mikrosefali, hidrosefali, sağırılık ve motor gelişim geriliğidir (32)

İlk trimesterde hasarın şiddetli olduğu diğer bir organ gözdür. Gözde de mikrooftalmi, katarakt, artmış intraokuler basınç, strabismus, optik nörit ve retinal nekroz odakları, retinokoroid, üveit ve oluşan nekrotik odaklar maküla densa'yı etkiler ise körlükle de neticelenebilmektedir (33).

### 2.1.9 Tanı

Toxoplasmosis'de tespit edilen klinik bulgular sadece *T. gondii*'ye ait spesifik semptom ve bulgular olmadığından, oluşan klinik tablo birçok enfeksiyon ajanının oluşturduğu durumlarla ve bazı klinik tablolarda oluşan belirtiler ile benzerlik gösterebilmektedir. Bu sebeple hastalığın tanınması, diğer hastalıklarla karıştırılmaması ve oluşan tabloların ciddiyetinden dolayı özel önem arz etmektedir.

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

1. Direkt tanı yöntemleri
2. İndirek tanı yöntemleri

Direk tanı yöntemleri arasında bulunan etkene yönelik tanıda, *T. gondii*'nin bradizoit takizoit ve ookist gibi hayat döngülerinden birinin içinde bulunduğu doku veya organlardan hazırlanmış preparatlarda gösterilmesi ile olabileceği gibi, *T. gondii*'ye ait şüpheli materyaller deney hayvanlarına intraperitoneal veya intrakranial olarak verilmesini takiben, hayvanlar 3 ila 7 gün bekletildikten sonra periton sıvılarından ya da beyin dokusundan alınan örneklerde parazitin varlığı tespit edilebilmektedir. Bu yöntemin dışında parazit farklı hücre hatlarına da ekilebilmektedir (9).

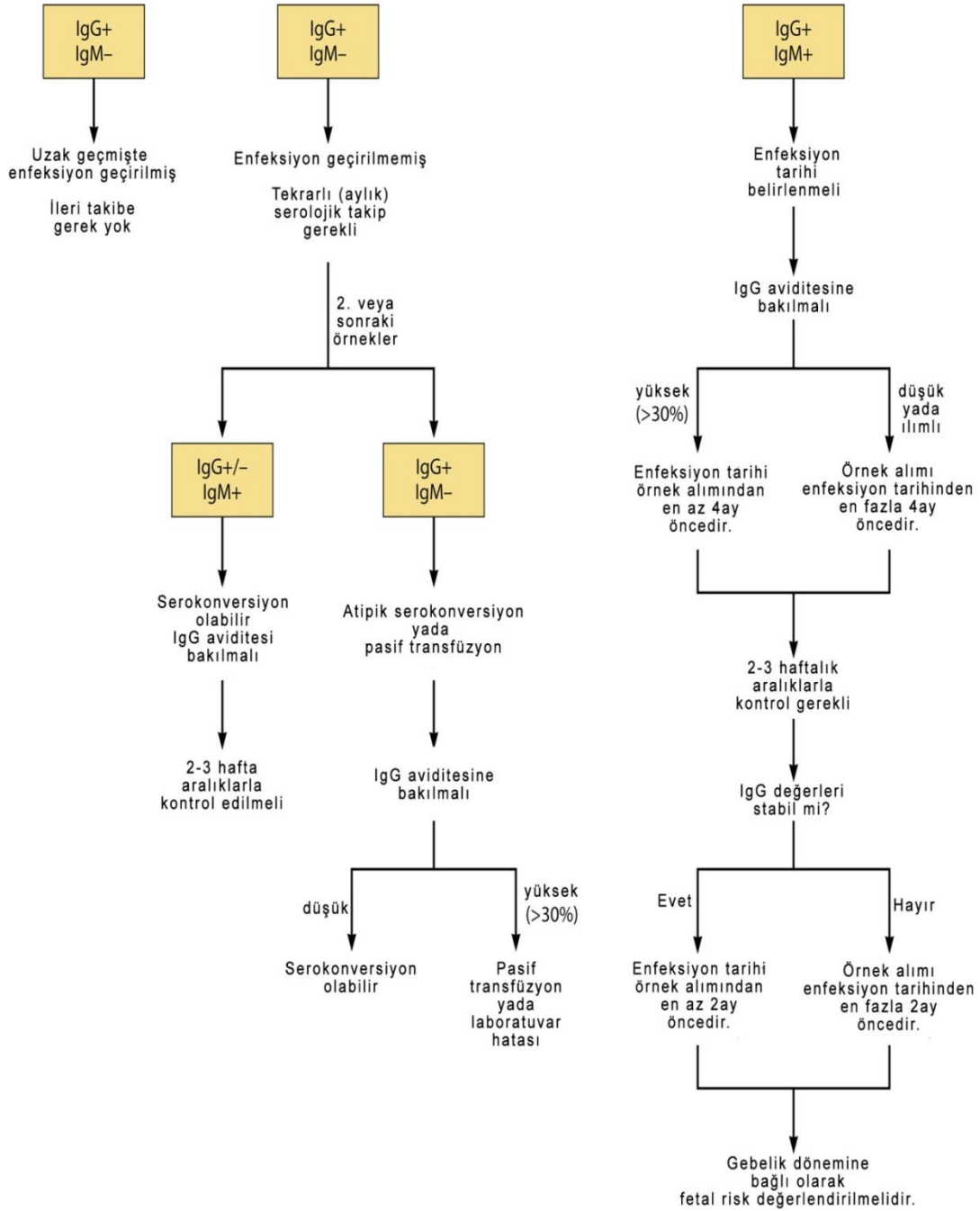
Bir diğerk direk tanı yöntemi de PCR'dır. Bu yöntem toxoplasmosis'in tanısında kullanılan duyarlılığı ve hassasiyeti yüksek bir testtir. Gelen hasta örneklerinden izole edilen *T. gondii* DNA'sının hedef gen bölgelerinin çoğaltılıp görüntüleme sistemlerine aktarılmasına dayanan bir metottur. Bu sistemin biraz daha gelişmiş olanı Real Time PCR olup sensivitesi ve spesifitesi daha yüksektir.

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

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

Akut enfeksiyonun serolojik tanısında en çok IgM tipi antikorlar kullanılmaktadır. Ancak kullanılan bu antikorlar bazı protozoon parazit enfeksiyonlarında ve bazı inflamatuvar romatizmal hastalıklarda da yükseldiğinden çapraz reaksiyon oluşturup yanlış pozitif sonuç verebilmektedir.

Gebeliğin ilk trimestrında ve gebelik döneminden önce belirlenen IgG antikorlarının negatif olması, bebek ve anne açısından riskli bir durum oluşabileceğinden anne adaylarının bu konuda bilgilendirilmesi gerekmektedir. IgG pozitif bulunan gebelerde ise anne adayının daha önce *T. gondii* ile karşılaşmış olduğunu fakat enfeksiyonu ne zaman geçirdiği hakkında bilgi vermemektedir. Bunun için anne adayının avidite testi yaptırması gerekmektedir. Düşük avidite enfeksiyonun yakın bir zamanda, yaklaşık 3-4 ay içinde geçirmiş olabileceğini gösterdiğinden bebek açısından riskli bir durum oluşturmaktadır. Yüksek avidite ise enfeksiyonun 3-4 aydan daha uzun bir süre önce geçirdiğini göstermektedir. Bu bilgilerin bilinmesi tedaviyi yönlendirmenin yanında bebeğin anne karnından alınması ile de sonuçlanabilmektedir (2) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. *T. gondii* antikor serolojilerinin yorumlanması (10).

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

Gelecekte kullanılmasına umutla bakılan yeni bir yöntem IFN-  $\gamma$  release assay'dir. Bu yöntem konjenital enfeksiyonun, postnatal dönemdeki tanısına yönelik bir testtir (34).

Bu yöntem IFN-  $\gamma$  konsantrasyonunun ölçümüne dayalı bir sistemden oluşmaktadır. Tam kan hücrelerinin *T. gondii* antijenleriyle in vitro ortamda stimülasyonu sonucunda ortaya çıkan IFN-  $\gamma$  miktarının ELISA yöntemiyle ölçülmesine dayanan bir testtir. Yöntem aynı zamanda *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonunun tanısında da kullanılmaktadır (35).

### 2.1.10 Tedavi

Toxoplasmosis'in kliniği, hastanın yaşı, immun durumu, cinsiyeti vb. gibi birçok duruma bağlı olduğundan, tedavisinde de farklılıklar bulunmaktadır. Hastalar enfeksiyonu çoğu zaman asemptomatik olarak geçirmekte ve böylece bu bireylerde tedaviye gereksinim duyulmamaktadır. Tedavi için asıl önemli olan kitle gebeler ve immün sistemi zayıflamış bireylerdir (36).

İmmün sistemi baskılanmış bireylerde tedavi; bu bireylerde hastalık çok ağır bir tablo ile karakterizedir. Özellikle AIDS hastalarında oluşan ensafalit tablosunda genellikle birden fazla ilacın kombine kullanımı uygulanmaktadır. Primethamine, sulfadiazine ve folik asit eklenmesi ile oluşan tedavi protokolü uygulanmaktadır. Eğer kişinin sülfonamidlere olan toleransında bir bozulma meydana geldiği takdirde klindamisin kullanılabilir. Fakat hasta akut toxoplasmosis ise kullanılan primethamine/sulfadiazine yerine atovaquon kullanılır.

AIDS hastalarında ise primethamine/sulfadiazine kombinasyonunun yerine trimetoprim sulfametaksazol kombinasyonu tercih edilmektedir (4, 9, 14).

### 2.1.11 Korunma

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

Enfeksiyon kaynağının kedi dışındaki ookist olduğu durumlar; kedi dışkıları içindeki ookistler çevreye atıldıktan yaklaşık 2-3 gün sonra enfektif hale gelebilmektedir. Ookist atılımı kedinin hayatı boyunca sadece bir kere olup, yaklaşık 2 hafta boyunca atılım devam etmektedir. Oluşan ookistler 55°C ısıtılmakla yaklaşık 1-2 dakika içinde ölmektedir. Fakat bu ookistler sodyum hipokloride dirençlidir. Bu bilgiler ışığında

kedilerle temastan sonra ellerin yıkanması, kedi dışkısının bulunduğu eşyaların sık sık 60°C'nin üzerindeki sularla yıkanması, kedi dışkısının bulunduğu eşyaların temizliği yapılırken eldiven giyilmesi, kedi besleyen kişilerin kedileri konserve ve çiğ olmayan besinlerle beslemesi bu alanda alınacak önlemler arasında sıralanabilmektedir (37, 38)

Enfeksiyon kaynağının, çevreye dağılmış halde bulunan ookist olduğu durumlar; bu tip bulaşmada oluşan riskli durumlar, genellikle bahçe işleriyle uğraşıldığı, açık alanda yapılan çeşitli aktiviteler esnasında toprakla temas esnasında oluşabilmektedir. Ookistler çevre ısısının 4°C olduğu durumlarda yaklaşık 1 yıl, -10°C olduğu durumlarda 106 gün, 35°C olduğu durumlarda 32 gün, 40°C olduğunda ise 9 gün canlı kalabilmekte ve enfektivitesini korumaktadır. Ayrıca ookistler çevrede bulunan arıtılmamış sularda ve kuyu sularının yüzey kısmında bulunabilmektedir. Ookistler ile enfekte topraklar ile temasta ellerin, özellikle tırnakların fırçayla yıkanması ve bahçe işlerinde eldiven kullanılması, alınacak önlemler arasındadır. Ookistler suda uzun süre canlılığını kaybetmeden yaşayabilmekte, dondurulmaya, klorlanmaya, ozon uygulanmasına direnç göstermektedirler. Midye, istakoz, yengeç gibi kabuklu deniz canlılarının pişirilmeden, yere yakın yetişen sebze ve meyvelerin iyice yıkanmadan yenilmemesi, deniz ve nehirlerde yapılan aktivitelerde suların yutulmamasına dikkat edilmesi, açıkta bulunan suların içilmemesi, bu alanda alınacak önlemler arasındadır (18, 39).

Enfeksiyon kaynağının doku kisti olduğu durumlar; açık alanda organik olarak üretilen koyun, keçi, domuz gibi hayvanların yanında en riskli grubun yaban hayvanlarının olduğu canlıların, et tüketiminin ve kesim işlemlerinin yapıldığı hallerdir. Doku kistleri 67°C'de ısıtılma ile ölmekte iken, -12°C'de en az 3 gün bekletilmesi gerekmektedir. Doku kistleri buzdolabında 3 hafta, 60°C'de 10 dakika, 50°C'de 10 dakika, -6,7°C'de 11 gün canlılığını korumakta olup, bu değerler doku kistinin içinde bulunduğu etin kalınlığına da bağlı olabilmektedir. Bu durumlarda alınacak önlemler arasında etlerin iyi pişirilmesi, az pişmiş et yenmemesi, pişirme esnasında mikrodalga fırın kullanılmaması, etlerin buzdolabında -20°C'de en az 15 gün bekletilmesi, et kesim işlemlerinde kullanılan bıçakların iyi yıkanması gerekmektedir (40).

## 2.2 AŞI VE AŞI ÇALIŞMALARI

*Toxoplasma gondii*'nin oluşturduğu tablonun ciddiyeti, seroprevalansının yüksek oluşu, hem sağlık, hem de ekonomik açıdan kayıplara yol açması nedeniyle parazitin

oluşturduğu hastalıkların tedavisi oldukça önemlidir. Kullanılan ilaçların hem maliyet hem de yan etkisi, klinik durumlarda oluşan tablonun ciddiyeti, tedavideki yetersizlikler nedeniyle günümüzde kullanılan ilaçların tedavide eksik kaldığı görülmektedir. Bu sebeble günümüzde aşı çalışmalarına hız verilmiştir.

Aşı çalışmalarında hedef olarak parazitin hayat döngüsünde görülen özellikle 3 farklı dönem üzerinde durulmuştur. Aşı çalışmaları ile insanlarda enfeksiyonun önlenmesi, klinik semptomların giderilmesi, kedilerin dışkıları ile çevreye yaydıkları ookistlerin sporlanmasının engellenmesi, hayvanlarda oluşan doku kistlerinin oluşumunun engellenenerek insana geçişin azaltılması hedeflenen amaçlar arasında gösterilmektedir (41).

*Toxoplasma gondii*'nin farklı hayat evrelerindeki farklı antijenik yapılarından kaynaklanan nedenlerle aşı çalışmalarında bazı zorluklarla karşılaşmaktadır. Var olan bu farklı antijenik yapı ve parazitin farklı hayat evreleri, insan ve hayvan konak farklılıkları aşı çalışmaları sırasında karşılaşılan zorluklardandır. İnsanlarda canlı ve attenué aşı adaylarının kullanımında bazı yan etkiler ve etik problemler bulunmaktayken, günümüzde hayvanlarda canlı ve atenué aşı adayları denenmektedir (42).

Kedilerde ookist atılımını önlemek için yapılan aşı çalışmalarının büyük bir kısmı canlı aşılarından oluşmaktadır. Kullanılan bu canlı aşıların bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu dezavantajlar arasında aşıların canlı olduğu için sınırlı raf ömrü olması ve enfeksiyona yol açabilme riskleridir. Koyunlar için geliştirilen ve canlı bir aşı olan Toxovax, *T. gondii*'nin S48 suşu ile hazırlanmıştır. Koyunlarda bu aşının kullanımının doku kisti oluşumunu azalttığı görülmüştür. Her ne kadar koyunlar için geliştirilmiş olsa da kedilerde kullanıldığında *T. gondii*'nin kedideki eşeyli üremesini belirli oranda inhibe ettiği de görülmüştür (9).

Bu konuda yapılan başka bir canlı mutant aşı ise; *T. gondii*'nin T-263 adlı suşu ile hazırlanan aşıdır. Bu aşı çalışmasında domuz çiftlikleri kullanılmıştır. Domuz çiftliklerinde yaşayan kediler toplanıp, aşılandıktan sonra serbest bırakılmışlardır. Daha sonra domuzlardan alınan serum örneklerinde *T. gondii* seroprevalansının düşük olduğu görülmüştür. Bunun sonucunda çevrenin ookistlerle kontaminasyonun azaltılması, domuzlarda enfeksiyon riskini azalttığı belirlenmiştir (9).



Kedilerde kullanılan aşı türlerinde, *T. gondii* suşları irridasyon yoluyla, kimyasal ajanlarla, rekombinant antijenler aracılığı ile veya yeni bir sistem olan feline herpes virüs type 1 aracılığı gibi farklı yollarla verilmiştir. Kullanılan bütün yöntemlerde kedilerde belli bir seviyede immunité oluşmuştur. Fakat bu tip aşuların insanlarda kullanılması uygun görülmemiştir (41, 43-44).

İnsanlarda DNA aşularının canlı bakteriyel komponentlerle birlikte kullanılması etik açıdan tartışma oluşturmaktadır. Buna rağmen bu tip aşular günümüzde bulunmaktadır.

Gebeler için geliştirilen bir stratejide, gebe kalmadan önce anne adaylarının aşılması ve gebeliğin sonuna kadar olan süre zarfında *T. gondii*'ye karşı koruyucu bir immunité gelişmesini amaçlamıştır. Bunun için hücre içermeyen fakat *T. gondii*'nin sekrete ettiği antijenik özellikteki proteinlerin eksozomlar aracılığı ile verilmesi denenmiştir. Bu metodun farelerde işe yaradığı görülmüş ve insanlar içinde bir umut olabileceği düşünülmüştür. Eksozomların bunu hangi mekanizma ile yaptığı hala tam olarak açıklanamamıştır. Bu konuda daha çok ve geniş çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Profilaktik aşı ile; insan enfeksiyonunu önlemesi, enazından klinik tablo oluşturacak hastalıkları azaltabilmesi, hayvanlardaki enfeksiyonu önleyerek insanlara geçişin azaltılması, kedilerdeki zoonotik döngüyü engelleyerek çevreye yayılan ookistlerin azaltılması amaçlanmıştır (43).

İmmun sistemi baskı altında olmayan sağlıklı bireylerde enfeksiyon bir kez geçirilmiş ise ömür boyu bağışıklık sağlamaktadır. Fakat konjenital bulaşmanın söz konusu olduğu durumlarda ise enfeksiyonun oluşturduğu klinik tablo ilerleme eğilimindedir. Bu durum bazen doğumdan hemen sonra oluşmasa bile doğumdan yıllar sonra da oluşabilmektedir. Böyle durumlarda en çok hasar bireyin retinasında meydana gelmektedir. Konjenital enfeksiyonun hamilelik sürecinde ilk kez enfekte olan anne adayından bebeğe geçtiği bilinmekte olup enfeksiyonun kronik olduğu durumlardaki gebelerden de bebeğe enfeksiyon ajanının geçtiğini gösteren kanıtlar nadir de olsa bulunmaktadır (42). Fakat yapılan çalışmalar toplumdaki genel popülasyonun %0,1'den daha azının konjenital olarak enfekte olduğunu göstermiştir (41).

*T. gondii*'ye karşı oluşan koruyucu immunitéde var olan ve oluşan CD4+ T-lenfosit ve CD8+ sitotoksik T-lenfositlerin rolü olduğu bulunmuştur. CD4+ T-lenfosit ve CD8+

sitotoksik T-lenfositlerin birbirine sinerjik etki gösterdiği, CD4+ T-lenfositlerin Th1 sitokinler aracılığıyla CD8+ sitotoksik T-lenfositlerinin faaliyetlerini düzenlediği gösterilmiştir. Anti CD4+, anti CD8+ antikorlarının *T. gondii*'ye karşı oluşmuş dirençi zayıflattığı, bu durumun *T. gondii*'ye karşı oluşmuş immüntenin CD4+ T-lenfosit ve CD8+ sitotoksik T-lenfositleri ile oluştuğunun bir göstergesi olmuştur.

DNA aşılarının başlıca kuvvetli bir sitotoksik T hücre yanıtıyla ilişkili olduğu bilinmektedir.

Akut enfeksiyonda ve aşılama ile gelişen immunitede CD4+ T-lenfositlerin rolü olduğu, kist oluşumunun engellenmesinde ve immun cevabın devamlılığında ise CD8+ sitotoksik T-lenfositleri görev aldığı kaydedilmiştir (46, 47).

Protein aşılarında B hücre cavabının indüklendiği gösterilmiştir.

DNA aşılarının ise kuvvetli bir CD8 + sitotoksik T-lenfosit yanıtını uyardığı, bunu yaparkende Th1 yanıtını kullandığı bilinmektedir (1).

*Toxoplasma gondii* için hazırlanan ve çalışılan aşı adaylarının büyük bir kısmı, adezyon ve invazyonda görevli olan moleküller hedef alınarak geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu hedef moleküller salgısal ve yüzey proteinlerdir. Bu sebebledir ki adezyonda ilk salınan proteinlerden olan ve parazitin apikal kısmında bulunun bir organel olan mikronemlerden salınan MIC proteinleri, hedef moleküller arasında yoğun olarak çalışılan bir grubu oluşturmaktadır. *T. gondii* ekstraktlarından hazırlanan mikronem proteinleriyle yapılan çalışmalarda sıçan ve farelerin canlı kaldıkları görülürken, beyinlerinde oluşan doku kisti miktarında da yüksek miktarda azalma olduğu tespit edilmiştir (48).

Yoğun olarak çalışılan bir diğer hedef molekül SAG1 antijenidir. SAG1 antijeni toplam takizoit proteinlerinin %5 kadar kısmını oluşturmaktadır. *T. gondii* konak hücre birleşmesi esnasında temas edilen bölgeden hücre dışına doğru salınmaktadır. SAG1'in farklı adjuvanlarla kullanılması sonucunda yapılan çalışmalarda, kullanılan farelerde yüksek oranda sağ kalım ve beyin parazit yükünde azalmalar olduğu tespit edilmiştir (49).

Başka bir antijen olan GRA ve ROP'lar ile yapılan çalışmalarda da *T. gondii*ye karşı gelişen immün yanıt oluşturduğu ve bu oluşan immün yanıtın enfeksiyona karşı kısmi koruma sağladığı görülmüştür (50). Efektif bir rekombinant aşı hem seküel hem de aseksüel döngüye etkili olabilmeli ve *T. gondii*'nin her üç hayat evresinde de etki gösterebilmelidir. Hayvanlarda oluşan kist formunu önlemek amacıyla hedef alınan bölge beyin olmalıdır.

Beyin kistlerini önlemek için yapılacak çalışmalarda kullanılacak ajanların beyinde çözünen tipte olması ve bununda oral yoldan uygulanması gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda en az iki farklı *T. gondii* izolatinin kullanıldığı ve çalışmanın paralel yapılması gerekliliği kaydedilmiştir. *T.gondii*'ye karşı oluşmuş immunitenin etkinliğinden bahsedebilmemiz için oluşan immunitenin genotip2 dışında kalan izolatlarda da etkili olabilmelidir. İmmünizasyon işleminde kullanılacak fareler tercihen BALB/c ve C57BL/6, C3H/HeN olmalıdır. Bu farelerin dışında aşının insan için etkili olup olmadığını anlamak için outbred fareler kullanılmalıdır. Çünkü bu farelerin genetik yapısı, insanlardaki genetik yapıyla yakın benzerlik taşımaktadır (51).

### 2.3 ADJUVANLAR

Aşılamada amaç, enfeksiyon ve/veya hastalığa karşı etkin patojen spesifik immün yanıtın uyarılması ve bu yanıtın uzun süreli olmasıdır. Bu çoğu zaman istenildiği ölçüde başılamamaktadır. Özellikle kompleks hayat döngüsüne sahip sıtma etkeni *Plasmodium* türleri ve büyük vücut yapıları *Fasciola hepatica* gibi helmintlere karşı aşı çalışmalarında ümit edilen başarılar elde edilememiştir. Pek çok viral etkene karşı ticari olarak aşı bulunmasına karşın bugün parazitlere karşı etkin ve insanlara uygulanabilen bir aşı bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu durum aşı etkinliğini arttırmak için yeni arayışlara girilmesine sebep olmuştur. Yaklaşık yüz yıl önce aşı formüllerine ilave edilen ve "adjuvant" olarak adlandırılan alüminyum tuzları bu konuda önemli bir adım olmuştur. 1920 yılında Gaslon Ramon tarafından adjuvant özelliği olan maddeler keşfedilmesinden birkaç yıl sonra Glenny tarafından veteriner difteri aşı kombinasyonunda alüminyum tuzları kullanılmıştır. Freund adjuvantının insanlarda reaksiyon vermesi yeni arayışlara yol açmış ve son 20 yıldır yeni nesil adjuvantlar oluşturulmuş ve kullanılmıştır. Son yıllarda aşı teknolojisindeki gelişmelerle DNA aşıları ve canlı vektör aşılarının kullanımına ilaveten adjuvant ve adjuvant sistemlerinde

de gelişmeler olmuştur. Adjuvantların yan etkilerinin düşük seviyelerde olması ayrıca stabil, kullanımı kolay ve enjeksiyona uygun olması gerekmektedir. Hem antijen spesifik bağışık yanıtı güçlendirmek hem de optimal tipte immünite uyarımıyla koruma sağlamak için gerekli olan adjuvantlar özetle üç grupta incelenebilmektedir (51).

<b>1-Klasik adjuvantlar sistemleri</b>	<b>2-Yeni nesil adjuvantlar</b>	<b>3-Adjuvant</b>
-Alüminyum Tuzları	-Toll-like reseptör agonistleri	-Klasik+Yeni nesil
-Emülsiyonlar	-Saponinler	
-Lipozom ve virozomlar	-İmmün stimüle edici kompleksler	

Geleneksel adjuvanlar çoğunlukla karmaşıktırlar ve yüzey-aktif bileşikler, mikrobiyal bileşenleri ve/veya çeşitli polimerler ve lipidler çok iyi tanımlanmıştır.

### **2.3.1 Alüminyum Tuzları**

Alüminyum tuzları 80 yıldan daha uzun süredir aşılarda yaygın bir şekilde adjuvant olarak kullanılmakla birlikte etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (52). Daha önceleri alüminyum tuzlarının enjeksiyon bölgesinde (antijen ısrarı) depo formasyonu (depot formation) şeklinde etki gösterdiği ve APC'lerin o bölgeye migrasyonunu ve alınımını arttırdığı düşünülmekteydi. Son zamanlarda ise alüminyum tuzlarında absorbe edilen antijenlerin multivalent formda sunuldukları ve bunun antijenlerin APC'lerde daha etkili şekilde internalize olmalarını sağladığı öne sürülmüştür (53). Üstelik daha yakın zamanlarda alüminyum tuzlarının, pro-inflamatory sitokinlerin (IL-1 $\beta$  ve IL-18 gibi) üretimi ve salınmasında öncül olan "inflammasom" kompleksi (PRR lerin Nod -benzeri ailesinin bir üyesi) komponentlerini aktive ettiği gösterilmiştir. Th-1 tipi cevabında küçük bir etkileri olan, alüminyum tuzları Th-2 antikor cevabında birinci derecede rol oynamaktadırlar (54). Bu tür adjuvantların kullanıldığı aşılarla örnek olarak Hepatit A aşıları, Hepatit B aşıları, insan papillavirus aşıları, *Streptococcus pneumoniae* aşısı, pediatrik difteri, tetanoz ve pertussis (DTaP) aşıları verilebilir (51).

### 2.3.2 Emülsiyonlar (MF59)

Önceleri water-in-oil emülsiyon (w/o) adjuvantlar (Freud'un incomplete/complete) insanlarda çok reaktogenik olduğu için kullanımına son verilmiştir. Daha sonraları (w/o) emülsiyonların daha yüksek saflıktaki yeni versiyonları aşılarda kullanılmıştır. Bunlardan biri Montainide emülsiyonlarıdır ve klinik denemelerde önemli sonuçlar alınmıştır. bB adjuvantlar prostat kanseri, ovaryum kanseri ve non-small-cell akciğer kanseri aşılarda kullanılmıştır (55-57). W/o emülsiyonlarına ek olarak, o/w (oil-in-water) emülsiyonları da geliştirilmiştir. O/w emülsiyonlarının etki mekanizması tam olarak anlaşılacakla birlikte doğuştan gelen inflamatory cevaplarla ilgili olduğuna, APC'lerin oluşumu ve aktivasyonunu, injeksiyon bölgesinde antijen varlığının devam ettirilmesi ve immün-komponent hücrelere sunulması ve sitokinlere farklı materyallerin teminini sağladığı düşünülmektedir (52). Reaktogenik özelliğe sahip o/w emülsiyonlar, w/o emülsiyonlarla karşılaştırıldıklarında lisanslı aşılarda daha başarılı olarak kullanılmışlardır. Bir o/w emülsiyonu olan MF59 adjuvantı, mevsimsel influenza aşısında kullanılmaktadır. MF59, Th2 aracılığıyla humoral cevabı stimüle etmektedir (58).

### 2.3.3 Lipozom ve virozomlar

Lipozomlar klasik adjuvantların üçüncü tipi olan sentetik nano küreciklerdir. Antijenleri çevreleyen lipit katmanlar taşırlar ve antijen verici cihaz gibi görev yaparlar. Lipozomlar aktif olmamalarına rağmen, ana fonksiyonlarının antijen sunumu olduğu düşünülmektedir. Lipozom içermeyen fakat virozom içeren lisanslı ürünler influenza virüslerinin boş zarflarını taşırlar ve lipozomlara benzemektedirler. Fonksiyonel viral zarf glikoproteinleri hücrenin uyandırılması ve antijenin hedef hücrelere membrandan füzyonunu sağlamaktadır. Hepatit A ve influenza aşılarda virozomlar adjuvant olarak kullanılmaktadır. Tüm yaş gruplarında güvenle kullanılabilen influenza aşısındaki virozomların iyi tolere edildiği ve yüksek derecede immunojenik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (59, 60).

### 2.3.4 Toll-like reseptör agonistleri

Toll-like reseptörler (TLR) immün sistem tarafından patojene bağlı moleküler yapıların tanımlanmasında kullanılmaktadırlar. TLR'lerin keşfi ile doğuştan ve kazanılmış bağışıklık arasındaki ilişkinin tanımlanmasıyla paralel yeni nesil adjuvantların/immün

uyarıcılarının (immunoenhancer) gelişimini getirmiştir. Immunoenhancerlar adjuvant fonksiyonlarını monositler, makrofajlar ve dendritik hücrelerde olduğu gibi direkt sitümülasyon yoluyla göstermektedirler.

Önemli bir immunositumulatorlerden biri olan ve TLR-4 agonisti olan MPL, *Salmonella minnesota* bakterisinin ana lipopolisakkaritinin (LPS) kimyasal detoksifike edilmiş formudur. MPL, TLR-4 e bağlanma yeteneğine sahiptir ve doğuştan gelen immün hücrelere LPS'nin mekanizmasıyla aynı şekilde etki etmektedir. MPL, yardımcı stimülatör moleküllerin ve sitokin salınımını stimule etmekte ve böylece kaliteli ve kantitatif olarak hem humoral hem de hücre sel bağışıklıkta anjijene bağlı immun yanıtı arttırmaktadır (61-63).

Diğer Toll-like reseptörlerin agonistleri arasında mikrobiyal DNA'nın immunostimulator sequences (ISS) leri yer almaktadır. Aynı zamanda ISS taşıyan bileşiklerin iyi tolere edilebildiğinin belirlenmesi bu konudaki çalışmalarının artışına sebep olmuştur. TLR ler tarafından tanındıklarında, bu ISS ler doğuştan gelen immun yanıtı izleyen adaptif immun yanıtın amfilikasyonunu sağlamaktadırlar. Biyolojik aktiviteden yoksunluğu gösterilmiş ISS'lerin kullanımının aşı antijenlerine karşı humoral ve hücre sel immun yanıtı arttırdığı gösterilmiştir. Bu durum kanser ve allerji aşılarında olduğu gibi, enfeksiyonel hastalıklara karşı kullanılan çeşitli aşı adaylarında da (Hepatit B, Malaria, HPV ve HIV gibi) gözlemlenmiştir. TLR-9 un agonisti ve pre-inflamator sitokinlerin uyarıcısı olan CpG DNA, günümüzde kanser terapisinde kullanılan ISS lere bir örnektir. Ön klinik çalışmalarda CpG lerin Th-1 immunitesini ve sitotoksik T lenfositlerin yanıtlarını arttırma yeteneği olduğu gösterilmiştir (64).

TLR7 ve TLR8'e bağlı imidazoquininler de aday adjuvantlar arasındadırlar. Bu sentetik organik bileşikler (Imiquimod ve resiquimod gibi), RNA bağlanmasındaki aynı immün yanıtı indükliyerek güçlü anti-viral aktivite gösterirken, bunu doğal TLR reseptör ligandlarını taklit ederek yapmaktadırlar. Imidazoquininler, HIV gibi viral enfeksiyonlara karşı ek T hücrelerinin cevaplarının gösterilmesini sağlamış ve farelerde antiviral immuniteyi arttırmışlardır (65, 66).

### 2.3.5 Saponinler (Quil A)

Aşı adjuvantı olarak geliştirilmeye çalışılan bitkisel kökenli en önemli madde doğal saponin olan Quil A'dır. Quil A, Güney Amerika'da bir ağaç olan *Quillaja saponaria*' dan ekstrakte edilmiş ve ilk olarak veteriner aşılarda kullanılmıştır (67). Fakat insanlarda reaktöjenik etkisinden dolayı kullanımına izin verilmemiştir. Quil A'nın QS21 denilen pürüfiye edilmiş bir parçası güçlü bir adjuvan kabiliyeti gösterdiği ve hayvan modellerinde hem Th1 hem de Th2 sitokin salınmasını sağladığı bildirilmiştir (68).

### 2.3.6 İmmün stimüle edici kompleksler (ISCOMs)

ISCOMs lipidler, kolesterol, antijen ve Quil-A'dan oluşan kafes benzeri komplekslerdir. Bu adjuvantın fonksiyonu, hidrofobik etkileşimler ile, protein antijeni yakalamak ve endositoz yoluyla APC tarafından tutulmasını sağlamaktır. ISCOMATRIX, ISCOM'ların ticari olarak bulunan diğer bir versiyonudur. Esas olarak ISCOM'ların yapısına benzemektedir ancak antijenle birleşik değildir. ISCOMATRIX son yıllarda HCV, influenza ve kansere karşı aşı adayı olarak kullanılmıştır (69). Adjuvant sistemleri, birden fazla adjuvantın antijenle kombine edilmesiyle oluşturulmuş sistemlerdir. Bunlar doğuştan immün cevabın sonradan kazanılan immün cevabı modüle etme yaklaşımına dayanmaktadır. Bu amaçla MPL, QS21 gibi adjuvantlar klasik adjuvantlarla (alüminyum tuzları emülsiyonlar ve lipozomlar) kombine edilmişlerdir. Bu şekilde oluşturulmuş AS01, AS02, AS03, AS04 ve AS15 başta sıtma olmak üzere tüberküloz, H5N1, mevsimsel influenza, hepatit B, Human papilloma virus, Herpes simplex virüs, kanser immünoterapisi ve melanoma'da kullanılmaktadır (70).

## 2.4 TOXOPLASMA GONDII YÜZEY ANTİJENLERİ

*Toxoplasma gondii* takizoit ve bradizoitlerinin glikosilfosfolipid (GPI) ile ilişkili antijenlerle kaplı olduğu gösterilmiştir. Bu antijenlerin büyük bir çoğunluğu SAG1 ve SAG2'den oluşmaktadır. *T. gondii* yüzey moleküllerinin konak hücreye invazyonda immün modülasyonda ve virülansda önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Aynı zamanda parazitin dış çevrede yaşamını sürdürebilmesine katkı sağladığı görülmüştür (71). Dolayısıyla parazitin patogenezinin aydınlatılması, aşı çalışmaları ve tanı kitlerinde hedef molekül olarak SAG proteinleri yoğun olarak kullanılmıştır (72) (Tablo 2.2).

**Tablo 2.2.** Takizoit veya bradizoitte bulunan *T. gondii* yüzey antijenlerinin gen ve proteinleri (71).

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

## 2.5 TOXOPLASMA GONDII YÜZEY GENLERİ VE EKSPRESYON

*T. gondii* yüzey antijenleri ilk olarak biyokimyasal yolla tespit edilmiştir. Bunlardan üçü antijen spesifik monoklonal antikör kullanımı ile P30 (SAG1), P22 (SAG2A) ve P43 (SAG3) olarak tanımlanmıştır (73). Sonrasında P18 (SAG4A), SRS1 ve BSR4 geni klonlanarak tanımlanmıştır (74). Daha sonra da yapılan çalışmalarda; SAG1, SAG3, SRS1-SRS4 ve BSR4'ü içeren bir aile tanımlanırken, SAG2A ve SAG4A-B'nin bu aile ile ilişkili olmadığı tespit edilmiştir. *T. gondii* yüzey antijenlerini kodlayan gen ve protein takizoit veya bradizoitte bulunmasıyla ilgili veriler Tablo 2.2'de sunulmuştur (75). Tanımlanan genler klonlanmış ve ekspresyonları değerlendirilmiştir. Çalışmalar sonucunda bu genlerden yalnızca SRS5'in pseudogen olabileceği gösterilirken SAG2B'in 23 kDa'luk bir protein olduğu bildirilmiştir (73).

## 2.6 YÜZEY GENLERİNDEKİ FARKLILIK VE VARYASYONLAR

Günümüze kadar SAG1 dışındaki SAG genlerinin birçoğunun *T. gondii*'nin takizoit, bradizoit, merozoit ve sporozoit formlarındaki ekspresyon profilleri tanımlanamamıştır. Dolayısıyla bu yüzey genlerinin ekspresyonlarının gelişimsel regülasyonunun



tanımlanması önemli veriler sağlayacaktır. *T. gondii* için kesin konak olan kedilerin dışkı ve bağırsaklarında bulunan ookist formu ile seksüel gelişimin sonucu oluşan yüksek derecede enfeksiyöz sporozoit dönemi bulunmaktadır. Günümüze kadar biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle çok az sporozoit antijeni tanımlanmıştır. İmmunodominant takizoit antijeni olan SAG1 ve SAG2 yokluğunda sporozoitlerin 67 ve 25 kDa'lık iki önemli immunojen eksprese ettikleri tespit edilmiştir (76). Merozoit dönemle ilgili çok az çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda *T.gondii*'nin hem bağırsak hem de bağırsak dışı formlarının BSR4 veya BSR4 benzeri moleküller eksprese ettiği gösterilmiştir. Ayrıca merozoitlerin SAG1, SAG2C/D ve SRS2 eksprese etmedikleri belirtilmiştir. Bradizoitlerle ilgili ilk çalışmalar antiserum ve radyasyonla yapılan çalışmalar sonrası monoklonal antikorlarla gerçekleştirilmiştir (77, 78). Bu çalışmalar sonucunda P36, P24, P21 ve P18 isimli dört bradizoit spesifik molekül tanımlanmıştır. Monoklonal antikor yöntemiyle takizoit yüzeylerinde P43, P35, P30, P23 ve P22 isimli beş önemli antijen tanımlanmıştır. Bunlardan ikisi olan P43 (SAG3) ve P23 bradizoitlerden de eksprese edilirken diğerlerinin takizoit spesifik olduğu belirtilmiştir (79). SAG2A ve SAG2B yalnızca takizoitlerde tespit edilirken SAG2C ve/veya SAG2D ise olgun bradizoitlerde tanımlanmıştır. Ayrıca SAG1 ailesinin üyesi olan SAG5B ve SAG5C'nin ise takizoitler tarafından eksprese edildiği bildirilmiştir (80).

Belirtilen *T. gondii* dönemlerindeki SAG gen ekspresyonlarındaki farklılıklara ilaveten *T. gondii*'nin üç tipi arasında da ölçülebilir düzeyde varyasyonların olduğu bildirilmiştir (81). Gerçekte birçok SAG geni, üç *T. gondii* tip ve nadir rekombinant izolatlarla karşılaştırıldığında dimorfik olduğu belirtilirken SAG genlerinin 0,5-2,0kb büyüklüğündeki sekansları karşılaştırıldığında %1-5 polimorfik olduğu belirtilmiştir (82).

## 2.7 YÜZEY GENLERİNİN FONKSİYONLARI

Yüzey genlerinden SAG genlerinin fonksiyonuyla ilgili ilk çalışmalar monoklonal antikor kullanılarak yapılmış ve *T. gondii*'nin invazyonu sırasında erken dönemde SAG genlerinin fonksiyonu aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalarda, P30 (SAG1) hedefli monoklonal antikorların, kültüre edilmiş konak hücrelerine takizoitlerin yapışmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (83). P22 (SAG2A) ve T3.3G11, T4.IF5 spesifik

monoklonal antikorların parazitle inkübasyonunun takizoitlerin tutunmasını artırdığı gösterilmiştir (84). SAG1 ve SAG2 genlerinin invazyon sırasındaki önemi canlı SAG mutantlarının izolasyonu ile ortaya konmuştur. Bu mutantlar takizoitlerin tutunma ve invazyondaki minör defektleri ortaya koyarken aynı zamanda P22 ve P30 negatif mutantların tespitine de kolaylık sağlamaktadır (85). Yapılan bu çalışmalar SAG genlerinin en önemli fonksiyonunun immunmodülatör ve virulans faktörleri olduğunu göstermiştir. Bu nedenle parazitin konak içindeki yaşamına katkısı olan en önemli moleküllerden birinin SAG geni olduğu bildirilmiştir.

## 2.8 SAG1 GENİ

*Toxoplasma gondii* kozmopolit dağılıma sahip bir parazit olmasının yanı sıra mortaliteye sebep olması ve transplasental yolla bebeklere geçişi nedeni ile oldukça önemli bir halk sağlığı sorunu olarak değerlendirilmektedir. İnsanda bradizoit ve takizoit formu bulunan parazitin oluşturduğu toxoplasmosisin patogenezinde parazite ait faktörler parazitin tanısının konulması ve parazitten korunmak için aşı geliştirilmesi çalışmalarında önem arz etmektedir. SAG 1 proteini hastalığın patogenezinde önemli olan ve parazitin hücreye invazyonunda salgılanan bir proteindir. SAG1 geni takizoit döneminde ortaya çıkan bir antijendir. *T. gondii* antijenleri içerisinde en iyi karakterize edilenlerden biri olan SAG1 antijenine karşı vücutta hem humoral hem de hücreli bağışıklık oluşmaktadır. Bu nedenle; SAG1 gerek tanıda gerekse aşı çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir antijendir (86,87).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyler, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında bulunan cihazlar (Tablo 3.1) ve sarf malzemeleri, solüsyon ve besi yerleri, canlı materyaller (Tablo 3.2) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 3.1.** Deneylerde kullanılan cihazlar.

Cihaz/Adı
1. Santrifüj (Hettich 32R, Almanya)
2. Santrifüj (Avanti® J-E, ABD)
3. Jel görüntüleme cihazı (ChemiDoc Mp, Bio-Rad, ABD)
4. Elektroforez güç kaynağı (Bio-Rad, ABD)
5. Vorteks (Bencmixer, Benchmark, ABD)
6. İnvirt mikroskop (Leica, ABD)
7. Termalcycler (Sensoquest, Almanya)
8. NanoDrop 2000c Spektrofotometre (Thermo scientific, ABD)
9. Su banyosu Jeio tech BS-06 (Jeiotech, G. Kore)
10. İnkübatörlü shaker (Jeio tech SI-300, G. Kore)
11. Kuru Isı Bloğu, Digital heat blog (Benchmark, ABD)
12. Mikrodalga fırın, MD 554 (Arçelik, Türkiye)
13. Manyetik karıştırıcı, MK 418 (Nüve, Türkiye)
14. -20 Derin dondurucu (Siemens, Almanya)
15. -80 Derin Dondurucu (Panasonic, Japonya)
16. +4 buzdolabı (Uğur, Türkiye)
17. Hassas terazi (Radwag, Polonya)
18. Yatay elektroforez cihazı (Bio-Rad, ABD)
19. Distile su cihazı (Elga, UK)

**Tablo 3.2.** Deneylerde kullanılan malzemeler.

Sıra	Tanımı/Adı
1.	<i>Toxoplasma gondii</i> takizoitleri (RH Ankara suşu)
2.	NNN besiyeri
3.	RPMI-1640 Medium
4.	Hepes 1M (MULTICELL, Rhode Island, UK)
5.	T <sub>g</sub> SAG1 F: (5'-ATG TCG GTT TCG CTG CAC C-3')
6.	T <sub>g</sub> SAG1 R:(5'- TCA CGC GAC ACA AGC TGC -3')

- 
7. TgSAG1PFU F: (5'-CAC CAT GTC GGT TTC GCT GCA CC-3')
  8. TgSAG1PFU R: (5'-TCA CGC GAC ACA AGC TGC-3')
  9. 15 ml'lik falkon, santrifüj tüpü (Sigma-Aldrich, ABD)
  10. 25 cm<sup>3</sup> kültür flask (Sigma-Aldrich, ABD)
  11. RPMI-1640 Medium (Biochrome, Almanya)
  12. Ampisilinli LB katı besiyeri
  13. Ampisilinli LB sıvı besiyeri
  14. Penicillin-Streptomycin 100X Solution (5000 units) (Invitrogen, ABD)
  15. Dokudan DNA İzolasyon Kiti (QIAamp, Qiagen, ABD)
  16. PCR Master mix 2x (GeneAll Biotechnology, G. Kore)
  17. Agaroz (Lonza, ABD)
  18. 100 bp. DNA Marker (GeneAll Biotechnology, G. Kore)
  19. 500 bp. DNA Marker (GeneAll Biotechnology, G. Kore)
  20. 1 kb DNA Marker (GeneAll Biotechnology, G. Kore)
  21. CloneJET PCR Clonning Kit (Thermo Scientific, ABD)
  22. pcDNA<sup>TM</sup>3.1/V5-His TOPO Expression Kit (Invitrogen, ABD)
  23. OneShot TOP10 ChemicallyCompetent *E. coli* hücreleri (Invitrogen, ABD)
  24. EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep Kit (BioBASIC, Kanada)
  25. Pfu DNA polimeraz ve reaksiyon tamponu(10x) (Bio-Basic Kanada)
  26. dNTP miks (Bio-Basic Kanada),
  27. Plasmid izolasyon kiti (Roche, Almanya)
  28. DAB tablet (Sigma-Aldrich, ABD)
  29. Anti-HisG-HRP antikor (Invitrogen, ABD)
  30. PCR pürifikasyon kiti (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche, ABD)
- 

### 3.1 TOTAL GENOMİK DNA İZOLASYONU

Genomik DNA (gDNA) izolasyonu Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'ndan temin edilen *T. gondii* takizoitlerinden DNeasy Blood & Tissue Kiti (QIAGEN, ABD) ile prosedürüne uygun olarak ile aşağıdaki şekilde yapıldı.

1. 1,5 ml'lik tüpe *T. gondii* takizoitlerinin içinde bulunduğu kültür ortamından alınarak 500 µl'lik örnek hazırlandı.
2. 1,5 ml'lik tüpte bulunan *T. gondii* kültür üzerine 500 µl ATL buffer eklendi. Oluşan bu karışım homojenize edildikten sonra santrifüj edildi. Santrifüjden sonra oluşan iki fazın üst sıvı kısmı alındıktan sonra DNA izolasyonu işlemine kit prosedürü uygulandı.
3. Total genomik DNA'nın elde edilmesi için öncelikle RNA'dan arındırılması gerekmektedir. Bu işlem için öncelikle 4 µl RNase (100mg/ml) tüpe eklendi. Yaklaşık 15 saniye kadar vortekslendikten sonra 2 dk oda sıcaklığında inkübasyona konuldu.
4. İnkübasyondan sonra kısa süre santrifüj edilen tüpün üzerine 200 µl AL Buffer eklendikten sonra yaklaşık 15 saniye vortekslendi. Daha sonra mevcut tüp 70°C'de 10 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra 15 sn vortekslendi.

5. Vortekslenen tüpe 200 µl %100 etanol eklenerek 15 sn daha vortekslendi. Tüp içeriği kitten temin edilen kolona aktarıldı. 1 dk boyunca 8000 rpm'de santrifüj edilerek kolon 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne 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. Filtrasyon kolonunun üstüne 500 µl AW2 buffer eklendikten sonra 14 000 rpm'de 3 dk santrifüj işlemi uygulandı. Santrifüj işleminden sonra tüpün dip kısmına çöken süzüntü atılarak filtrasyon kolonu 2 ml'lik yeni bir tüpe aktarıldı.
8. Filtrasyon kolonunun içinde bulunduğu tüp 14 000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek geriye kalan rezidüdeki AW2 buffer filtrasyon kolonundan elemine edildi.
9. Kolon 1,5 ml'lik yeni bir tüpe aktarıldıktan sonra üzerine AE tamponundan 200 µl eklendi. Oda ortamında 1 dk bekletilerek 14000 rpm'de 1 dk boyunca santrifüj edildi.
10. En son yapılan basamak 1 kez daha tekrarlandıktan sonra tüpün filtratta bulunan gDNA materyali PCR işlemi yapılana kadar -20°C'ye kaldırıldı.

### 3.2 *T. GONDII* SAG 1 GENİNİN AMPLİFİKASYONU

PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere *T. gondii* SAG 1 genini komple olarak çoğaltan TgSAG1 F (5'-ATGTCGGTTTCGCTGCACC-3') ve TgSAG1 R (5'- TCACGCGAC ACAAGCTGC-3') primerleri GenBank veri tabanında mevcut olan referans sekanslar kullanılarak dizayn edilmiş ve sentezletilmiştir.

PCR karışımı; toplamda 25 µl olmak üzere 12,5 µl PCR hazır kullanımlık mastermix (2x) (GeneAll Biotechnology, G. Kore), 1 µl TgSAG1 F (20 pmol) ve 1µl TgSAG1 R (20 pmol) primerleri ve 30ng gDNA ile hazırlanmıştır. Termal profil 95°C de 5 dk pre-denatürasyon sonrası 94°C'de 1 dk, 63°C'de 1 dk, 72°C'de 2 dk olmak üzere 35 döngülük inkübasyon sonrası 72°C'de 30 dk son uzama şeklinde ayarlanmıştır. PCR ürünü, 100 bp DNA Ladder eşliğinde etidyum bromid ile boyanmış %1,5'lük agaroz jelde elektroforeze tabii tutularak jel dökümantasyon sisteminde (Bio-Rad chemidoc Mp Jel ABD) görüntülenmiş ve analiz edilmiştir.

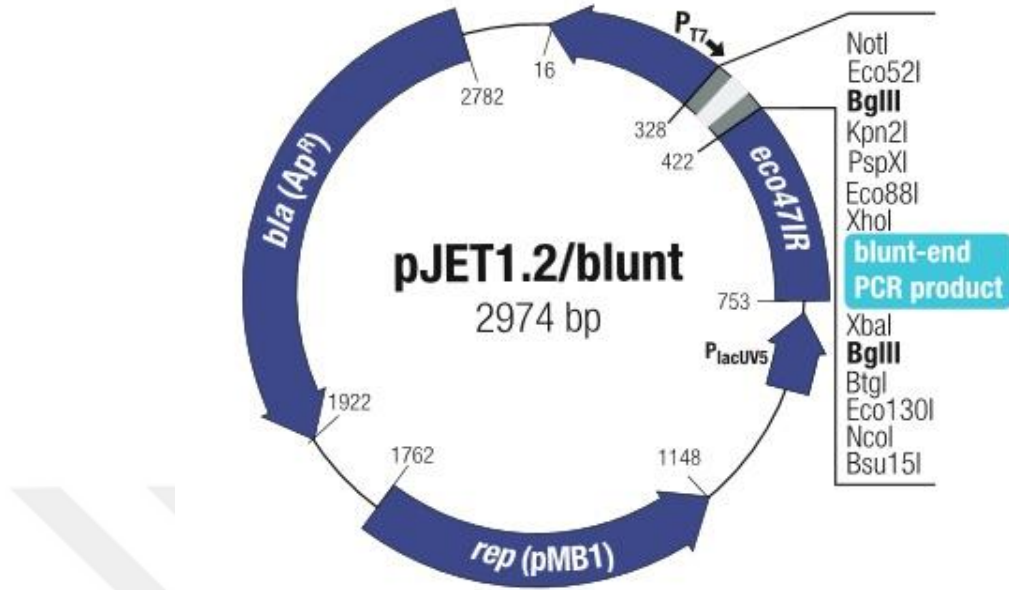
### 3.3 SAG1 GENİNİN KLONLANMASI

Klonlama basamaklarına geçmeden önce SAG1 PCR ürünleri aşağıdaki basamaklar takip edilerek jel pürifiye edilmiştir.

1. PCR ürünü pürifikasyon kitinin (Roche, ABD) prosedürüne göre yapılarak filtrasyon kolonu 1,5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüpüne konuldu. 100 µl'lik PCR ürününün üzerine 500 µl membran bağlama solüsyonu ilave edildi.
2. Oluşan karışım, filtrasyon kolonuna aktarıldıktan sonra 13000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüpün dip kısmında kalan süzüntü atılarak filtrasyon kolonu 1,5 ml'lik yeni steril bir tüpe alındı. Tüpün içindeki filtrasyon kolonuna 500 µl membran yıkama solüsyonu eklenerek 13000 rpm'de 1 dk santrifüj işlemi uygulandı.
3. Bu işlemden sonra tüpün dibinde kalan süzüntü atılarak filtrasyon kolonu 1,5 ml'lik steril yeni bir tüpe aktarıldı. Tüpün içindeki filtrasyon kolonuna bu aşamada 200 µl membran yıkama solüsyonu eklenip 13000 rpm'de 1dk santrifüj işlemi uygulandı.
4. Bu basamaktan sonra tüpün dip kısmında oluşan süzüntü atılarak filtrasyon kolonu 1,5 ml'lik yeni bir steril tüpe konuldu. Bu aşamada üzerine hiçbir madde eklenmeden 13000 rpm'de 1 dk santrifüj işlemi tekrar edildi.
5. Tüpün dip kısmında olan süzüntü atıldıktan sonra filtrasyon kolonu 1,5 ml'lik steril tüpe aktararak filtrat atıldı. Filtrasyon kolonuna 50 µl elüsyon tamponu eklendikten sonra 13000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Son basamakta saflaştırılan PCR ürünü klonlama işleminin yapılacağı ana kadar -20°C'de saklandı.

### 3.3.1 SAG1 Geninin pJET1.2/blunt Plazmitine Klonlanması

PCR ürününü klonlamak amacıyla CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanıldı. Toplamda 18 µl'lik klonlama reaksiyonu; 10 µl reaksiyon tamponu, 1 µl DNA blunting enzim, 1 µl PCR ürünü ile hazırlandı. Hazırlanan karışım 5 sn vortekslendikten sonra santrifüj edildi ve 70°C'de 5 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra mevcut karışım buz üzerine konuldu. Karışıma 1µl pJET1.2/blunt Cloning Vector (50ng/µl) (Şekil 3.1.) ve 1 µl T4 DNA Ligaz eklendikten sonra üzerine steril distile su eklenerek 20 µl'ye tamamlandı. Oluşan bu karışım 5 sn vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. Bu son aşamadan sonra oluşan ligasyon reaksiyon ürünü -20°C'de saklandı.



Şekil 3.1. Vektör haritası; pJET1.2/blunt (2974 bp) (Thermo Scientific, ABD).

### 3.3.2 Transformasyon

Ligasyon ürünlerinin kompetan hücelere transformasyonu kit (CloneJET PCR Cloning Kit) protokolüne göre aşağıdaki gibi yapıldı:

1.  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den alınan One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, ABD) hücrelerinin buz üzerinde çözülmesi sağlandı.
2. Buz içerisinde bekletilen 100  $\mu\text{l}$  kompetan *E. coli* hücrelerine (Invitrogen, ABD) ligasyon ürününden 3  $\mu\text{l}$  ilave edildi.
3. Elde edilen karışım 30 dk boyunca buz üzerinde inkübe edildi.
4. Karışım 30 sn boyunca  $42^{\circ}\text{C}$ 'de sabitlenmiş su banyosu içerisinde bekletildikten sonra hızlı bir şekilde tekrar buz içerisine konuldu.
5. Isı şoku yapılan hücelere rekombinant plazmidin transformasyonu sağlamak için tekrar buz içerisinde 1 dk bekletildi.
6. Transform olmuş hücreler oda sıcaklığındaki 250  $\mu\text{l}$  SOC besiyerine aktarıldı.
7. Bu hücreler 225 rpm'de  $37^{\circ}\text{C}$ 'de inkübatörlü çalkalayıcıda 1,5 saat inkübasyona bırakıldı.

8. SOC sıvı besiyerindeki hücreler ampisilinli LB katı besiyerine ikiye ayrılarak ekildi ve pleytler 37°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı.
9. İnkübe edilen LB Katı besiyerlerinde koloni gelişimi gözlendikten sonra besiyerindeki koloniler numaralandırıldı.

### 3.3.3 Klonlamanın Doğrulanması

Klonlamanın doğrulanması için amp+LB katı besiyerinde oluşan kolonilerin rekombinant pJET1.2+SAG1 plazmidini içerip içermediği koloni PCR tarama yapılarak kontrol edildi. Bunun için, koloniler kalıp DNA olarak kullanılıp PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

PCR reaksiyonları için;

1. 0,5 ml’lik PCR tüpleri içerisinde 3.2’de anlatıldığı gibi karışım 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’deki protokol takip edilerek PCR analizleri sonrası şekillenen amplikonlar %1,5’luk agaroz jel üzerinde elektroforeze tabii tutuldu.
4. PCR ürünleri jel dökümantasyon sisteminde (Bio-Rad chemidoc Mp Jel ABD) görüntülenerek analiz edildi.

### 3.3.4 Rekombinant pJET1.2+SAG1 Plazmitinin Eldesi ve Saflaştırılması

Katı besiyerinde SAG1 insert konfirmasyonu yapılan koloniler aşağıdaki basamaklar takip edilerek sıvı besiyerine geçilmiş ve EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep Kiti (BioBasic, Kanada) ile rekombinant plazmid pürifikasyonu yapılmıştır.

1. Steril kabin içerisinde çalışılarak, LB katı besiyerindeki pozitif olduğu belirlenen kolonilerden 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 pelete önceden RNAaz ilave edilmiş olan 100 µl solüsyon-I eklendi. Pelet resüspanse edilip karışım oda sıcaklığında 1 dk bekletildi.
5. Daha sonra, süspanse edilen pellet-solüsyon-I karışımı üzerine oda sıcaklığındaki 200 µl solüsyon-II eklendi. Tüp birkaç defa alt-üst edilerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 1 dk bekletilerek mavi renkli homojen bir karışım elde edildi.
6. Karışıma 350 µl oda sıcaklığındaki solüsyon-III ilave edildi. Tüp nazikçe karıştırılıp oda sıcaklığında 1 dk boyunca beyaz renkli ve akışkan olmayan bir çökelti oluşuncaya kadar bekletildi.
7. Karışım 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 toplama tüpüne alınarak 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi.
9. Filtrat atılarak ve filtrasyon kolonu tekrar yeni toplama tüpüne yerleştirildi.
10. Kolon üzerine 750 µl yıkama solüsyonu eklendi ve 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi ve kolon tekrar yeni tüpe yerleştirildi.
11. Kolona tekrar 750 µl yıkama solüsyonu eklendi ve 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek kolon aynı tüpe tekrar yerleştirildi.
12. Kolon boş olarak tekrar 10.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
13. Filtrasyon kolonu 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınarak membran üzerine 50 µl elüsyon tamponu eklendi.
14. Kolon oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildikten sonra sonra 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek rekombinant plazmid izolasyonu sağlandı.
15. Saflaştırılmış rekombinant plazmid miktarı NanoDrop 2000c-UV vis spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) cihazıyla ölçüldü.

Elde edilen rekombinant plazmid DNA'da insert SAG1 geninin varlığı 3.2.'de anlatıldığı gibi gen spesifik primerlerle PCR analizleriyle konfirme edildi. Kalıp DNA olarak 1/10 oranında sulandırılmış rekombinant plazmitten 1 µl kullanıldı. PCR analizleri sonrası şekillenen ampliconlar %1,5'luk agaroz jel üzerinde elektroforeze tabii tutuldu ve jel dökümantasyon sisteminde (Bio-Rad chemidoc Mp Jel ABD) görüntülenerek analiz edildi. İnsert varlığı doğrulanan rekombinant plazmid sub-klonlama işlemine kadar -20°C'de saklandı.

### 3.4 SAG1 GENİNİN SEKANS VE FİLOGENETİK ANALİZLERİ

#### 3.4.1 SAG1 Geni Nükleotid Sekans ve Filogenetik Analizleri

SAG1 gen bölgesi için elde edilen rekombinant plazmid DNA'lar klonlama vektörü spesifik primerleri ile çift yönlü olarak sekanslanmıştır (BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Sti. Ankara, Türkiye). Çift yönlü DNA dizisi belirlenen plazmidlere ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious 11.1.5 yazılımı ile forward ve reverse dizilimler DeNovo Assamble kullanılarak contig analizi yapılmış ve ilgili gen için final konsensüs dizilim ortaya çıkarılmıştır.

Elde edilen sekansların blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri yapıldıktan sonra GenBank'ta mevcut *T. gondii* izolatlarına ait ilgili gen bölgesi sekanslarıyla Geneious 11.1.5 yazılımı üzerinden çoklu hizalamaları yapılarak interspesifik ve intraspesifik nükleotid ve aminoasit farklılıkları belirlenmiştir. Elde edilen hedef gen bölgesi sekansı GenBank veri tabanında kayıt altına alınmıştır. Karakterize edilen izolatın Dünyadaki diğer izolatlarla SAG1 gen bölgesi yönünden filogenetik yapılanmalarının belirlenmesinde Maximum Likelihood (ML) analizi uygulanmıştır. ML analizlerinde sekans evrimi için en uygun modelin belirlenmesinde jModelTest 2 kullanılmış ve en düşük Akaike Bilgi Kriteri (AIC) değerine sahip General Time Reversible + Gamma distributed (GTR+G) modeli filogenetik ağacın oluşturulmasında kullanılmıştır. ML analizleri Geneious 11.0.2 yazılımı üzerinden PHYML plugin kullanılarak 1000 tekrarlı bootstrap ile gerçekleştirilmiştir.

#### 3.4.2 SAG1 Geni Amino Asit Sekanslarının In-Silico Analizleri

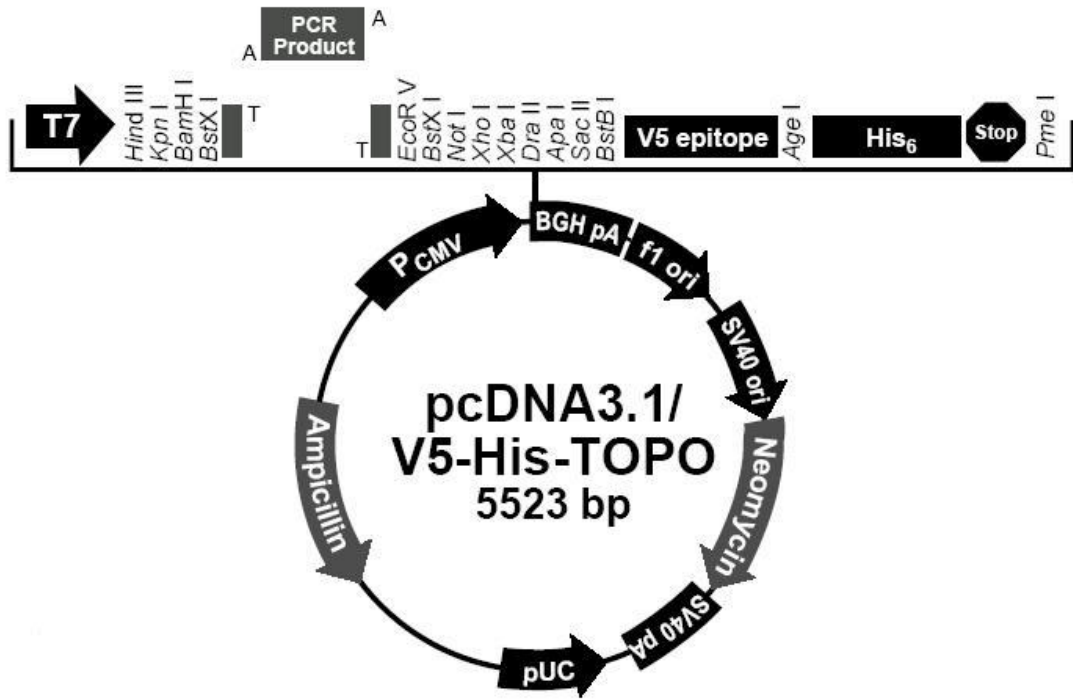
Karakterize edilen izolatlara ait SAG1 geni amino asit dizilimi; başlangıç ve bitiş sinyal kodonlarını belirlemek ve fraksiyonlarını göstermek amacıyla web tabanlı ORF Finder yazılımıyla açık okuma çerçevesi (open reading frame, ORF) analizleri gerçekleştirilmiştir. SAG1 proteininin transmembran bölgelerindeki amino asit dizilimlerinin sinyal peptid analizleri ve dizilimlerdeki tahmini antijenik peptidlerin varlığı Geneious 11.1.5 yazılımı üzerinden EMBOSS Protein Analysis 1.0 plugin yazılımı kullanılarak yapılmıştır. İlgili proteinlerin transmembran sarmallarının analizleri ise yine ilgili yazılım üzerinden Transmembrane Prediction Tool 0.9 plugini kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzoelektrik nokta ve proteinlerin tahmini moleküler

ağırlıkları ExPASy programı ile hesaplanmıştır. Amino asit dizilimlerindeki polimorfizm oranları ProSeq3 yazılımı kullanılarak belirlenmiştir. Subolesin proteininin üç boyutlu yapısı Phyre2 Protein Homology/Analogy Recognition Engine V2.0 programı ile analiz edilmiş ve görüntülenmeleri Jmol: An open-source Java viewer programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### **3.5 SAG 1 GENİNİN PLAZMİD DNA AŞI ADAYI OLARAK pCDNA3.1 MEMELİ EKSPRESYON VEKTÖRÜNE KLONLANMASI**

Rekombinat *T. gondii* SAG1 geni, memeli hücrelerinde ekspresyon vektörü olarak kullanılan ve DNA aşısı için uygun bir vektör olarak nitelenen pcDNA<sup>TM</sup>3.1/V5-His TOPO<sup>®</sup> ekspresyon plazmitine (Invitrogen, ABD) (Şekil 3.2) klonlanmıştır. Bu amaçla ön basamakta *T. gondii* gDNA izolatu kullanılarak TgSAG1 F ve R primerleri ile başlık 3.2.'de belirtilen protokol takip edilerek PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri başlık başlık 3.3'de anlatıldığı gibi agaroz jelden pürifiye edilmiş ve sonrasında pCDNA3.1 vektörü ile ligasyon işlemine tabii tutulmuştur. Klonlama basamakları aşağıda verilmiştir.

1. Saflaştırılmış SAG1 PCR ürününün 1 µl'si ile 1 µl tuz solüsyonuna 3 µl steril su eklenerek toplam 5 µl'lik karışım hazırlandı.
2. Karışımın üzerine 1 µl pcDNA<sup>TM</sup>3.1/V5-His TOPO<sup>®</sup> vektörü eklenerek hafifçe birkaç saniye vortekslendi.
3. Karışım 15dk. boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. Bu reaksiyon ile SAG1 geninin pcDNA3.1/V5-his TOPO plazmidine ligasyonu gerçekleştirildi.



Şekil 3.2. pcDNA3.1/V5-his TOPO® (Invitrogen, ABD) vektör haritası (5523 bp).

pcDNA3.1+SAG1 ligasyon ürününün, kompetan *E.coli* hücrelerine (Invitrogen, ABD) transformasyonu için kit protokolünde yer alan basamaklar modifiye edilerek aşağıdaki şekilde uygulandı.

1. -80°C'de muhafaza edilen kompetan *E. coli* TOP10 hücrelerini (Invitrogen, ABD) içeren tüp buz üzerine alındı.
2. Kompetan hücrelerin yavaşça çözülmesi için buz üzerinde 30 dk boyunca bekletildi.
3. 100 µl kompetan hücre bulunan tüpün içine 2 µl ligasyon tamponu eklendi.
4. Karışım buz içerisinde 30 dk bekletilerek ısı şoku yapılamak üzere sıcak su banyosuna taşındı.
5. Karışım, 42°C'de 30 sn bekletildikten sonra hızlı bir şekilde buz üzerine alındı ve 1 dk bekletildi.
6. Hücrelerin üzerine oda sıcaklığındaki 250 µl SOC sıvı besiyeri eklendi.
7. Karışım 1,5 saat boyunca çalkalayıcılı inkübatörde 225 rpm'de 37°C'de inkübe edildi.

8. Hücreler ampisilinli LB katı besiyeri bulunan iki pleyte dağıtılarak ekildi ve 37°C'de gece boyunca inkübe edildi.
9. LB katı besiyerinde gelişimi gözlenen koloniler numaralandırıldı.

Klonlamanın doğrulanması için amp+LB katı besiyerinde oluşan kolonilerin rekombinant pcDNA3.1+ SAG1 plazmidini içerip içermediği başlık 3.3.3'de verildiği şekilde koloni PCR analizleri ile belirlendi. Rekombinant plazmidleri içerdiği tespit edilen koloniler başlık 3.3.4'deki protokole uygun olarak işlendi ve rekombinant plazmid pürifikasyonu gerçekleştirildi.

Elde edilen rekombinant plazmid DNA'da insert SAG1 geninin varlığı başlık 3.2.'de anlatıldığı gibi gen spesifik primerlerle PCR analizleriyle konfirme edildi. Kalıp DNA olarak 1/10 oranında sulandırılmış rekombinant plazmitten 1 µl kullanıldı. PCR analizleri sonrası şekillenen ampikonlar %1,5'luk agaroz jel üzerinde elektroforeze tabii tutuldu ve jel dökümantasyon sisteminde (Bio-Rad chemidoc Mp Jel ABD) görüntülenerek analiz edildi. İnsert varlığı doğrulanarak rekombinant plazmidler -20°C'de muhafaza altına alındı.

### **3.6 REKOMBİNANT *T. GONDII* SAG 1 PROTEİNİNİN EKSPRESYONU, KARAKTERİZASYONU VE İMMUN REAKTİVİTESİNİN GÖSTERİLMESİ**

#### **3.6.1 SAG 1 Geninin pET100 Ekspresyon Vektörüne Ligasyonu**

Küt uçlu SAG1 PCR ürününü elde etmek için 0,2 µl Pfu DNA polimeraz (Bio-Basic Kanada), 5 µl 10x Pfu reaksiyon tamponu (Bio-Basic Kanada), 1 µl 10 mM dNTP karışımı (Bio-Basic, Kanada), 1 µl 10 pmol CACC ön bölgesi içeren SAG 1 F1 primeri, 1µl 10 pmol SAG 1 R primeri ve 41,8 µl distile su ile toplam 50µl'lik PCR karışımı hazırlandı. PCR karışımlarına kalıp DNA olarak distile su ile 1/100 oranında seyreltilmiş olan pcDNA3.1+SAG 1 plazmitinden 1µl eklendi.

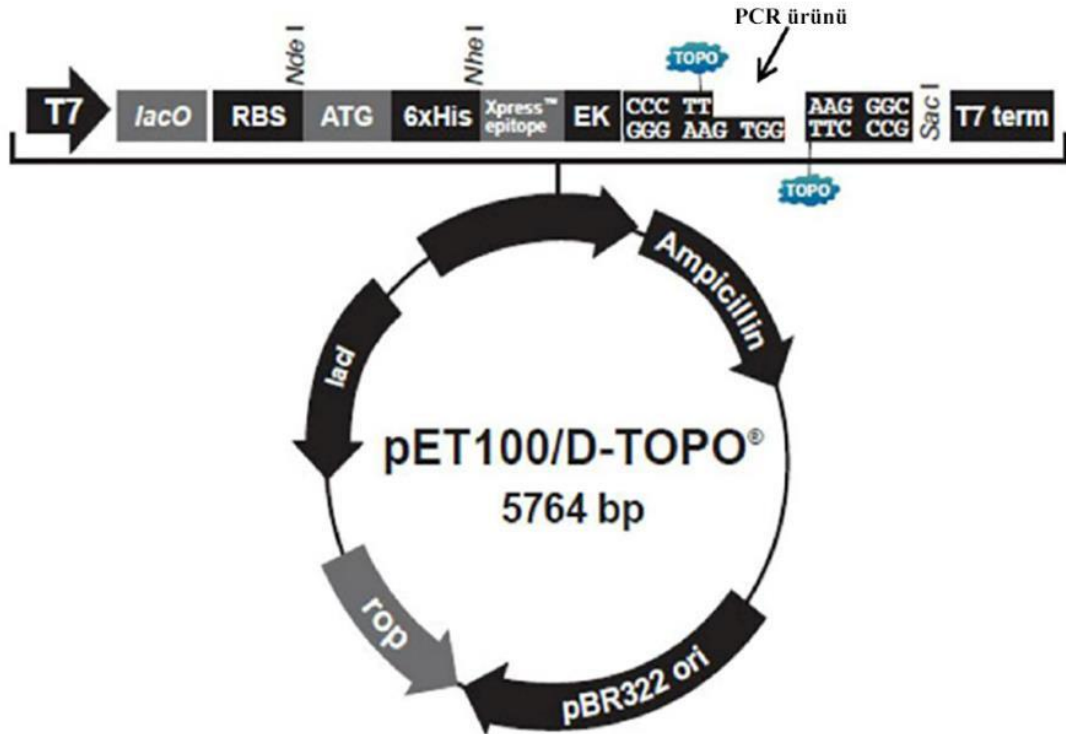
PCR protokolü bölüm 3.2'de verildiği şekilde ayarlandı ve PCR ürünü elde edilerek saflaştırıldı.

Klonlama reaksiyonu için pET100 Directional TOPO Expression (Invitrogen, ABD) kiti kullanılmıştır (Şekil 3.3). Klonlama reaksiyonu aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

### Klonlama reaksiyonu

PCR ürünü	4 µl
Tuz solüsyonu	1 µl
Steril su	0 µl
<u>TOPO vektör</u>	<u>1 µl</u>
Total volüm	6 µl

Elde edilen karışım oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakılmış ve sonrasında ligasyon ürünü elde edilmiştir. Bu basamaktan sonra rekombinant plazmid eldesine kadar başlık 3.3.1-3.3.4’de belirtilen metodoloji izlenmiştir.



Şekil 3.3. pET100 Champion Directional TOPO (Thermo Scientific, ABD) vektör haritası (5764 bp).

### 3.6.2 Rekombinant pET100+SAG1 Plazmidinin One Shot BL21 Star (DE3) Kompetan Hücrelerine Transformasyonu

Prokaryotlarda protein ekspresyonuna uyumlu kompetan hücrelere rekombinant SAG 1 plazmidi ilave edilmiştir. Kompetan hücre olarak One Shot BL21 Star (DE3) (Invitrogen- ABD) *E. coli* hücreleri kullanılmıştır. pET100+SAG1 rekombinant plazmidinin kompetan hücrelere transformasyonu bölüm 3.3.2. deki şartlara göre yapılmıştır.

### 3.6.3 *T. gondii* Rekombinant SAG 1 Proteininin Ekspresyonu

10 ml'lik ampisilinli sıvı LB besiyeri içerisine rekombinant SAG 1 plazmidi içeren BL21 Star kompetan *E. coli* hücrelerinin ekimi yapıldı ve inkübatörlü çalkalayıcı içerisinde 24 saat 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra hücresel süspansiyondan 1ml alınarak 30ml Ampisilinli besi yerine aktarılmıştır. Spektrofotometrik ölçümlerle hücresel süspansiyondan belirli aralıklarla kontrollü şekilde 100'er µl alınarak OD<sub>600</sub> değeri 0.5-0.8 olana kadar hücrelerin çoğalması sağlanmıştır. OD değeri hedef sınırlara ulaştığında hücresel süspansiyon eşit hacimlerde (5 ml) altı adet 10 ml falkon tüpüne ayrılmıştır. Kültürlere 2-1-0,1-0,01-0,001 mM son konsantrasyonda olacak şekilde İzopropiltiyogalaktozit (IPTG) eklenmiştir. Kontrol grubuna ise IPTG ilavesi yapılmamıştır. 37°C'de inkübasyon işlemine devam edilerek işlem sürecinin 2,5-3,5-4,5-5,5. saatlerinde her bir kültürden 500 µl örnek alınmış ve 12500'rpm de 1 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra tüp içindeki pelletler etiketlenerek -20°C'de protein ekspresyon analizi için muhafaza altına alınmıştır.

### 3.6.4 Rekombinant SAG 1 Proteininin Analizi

Rekombinant protein ekspresyonu için ayrılan örnekler Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)'de yürütülerek analiz edilmiştir. Sonrasında rekombinant SAG1 antijeninin konfirmasyonu Western blot analizleri ile gösterilmiştir.

SDS-PAGE'de kullanılan jel ve solüsyonlar aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

1. 29 gr akrilamid + 1 gr NN metilen bisakrilamid 60 ml distile su içerisinde çözdürülmüştür. %30 akrilamid karışım hazırlanmıştır. Solüsyonun pH değeri

ölçülerek 7 veya daha düşük olduğu kontrol edilmiş ve sonrasında 0,45 µm'lik filtreden süzülerek oda ısısında ve karanlık ortamda muhafaza edilmiştir.

2. 1,5 M tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris) (pH 8,8) hazırlanmıştır. 27,23 gr Tris baz 80 ml distile su içerisinde çözülmüştür. pH değeri HCl ile 8,8'e ayarlanmış, distile su ile 150 ml'ye tamamlanarak +4 °C'de muhafaza edilmiştir.
3. 0,1 gr amonyum persülfat 1 ml distile su içerisinde çözümlenerek %10'luk amonyum persülfat hazırlanmıştır. Amonyum persülfat solüsyonunun taze olarak hazırlanmasına dikkat edilmiştir.
4. 10 gr SDS 100 ml distile su içerisinde çözümlenerek %10'luk Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) hazırlanmıştır.
5. 1 M Tris (pH 6,8), 6 gr Tris baz 30 ml distile su içerisinde çözdürülerek hazırlanmış ve pH değeri 6,8'e ayarlanmıştır. Distile su ile 50 ml'ye tamamlanarak +4 °C'de muhafaza edilmiştir.
6. Solüsyonlar ve 2x SDS gel-loading buffer aşağıda verilen miktarlarda hazırlanarak +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Solüsyon 2 kat sulandırılarak kullanılmıştır.

Gliserol \_\_\_\_\_ 2 ml

%10 SDS \_\_\_\_\_ 4 ml

1 M Tris (pH 6,8) \_\_\_\_\_ 1,6 ml

Beta-merkaptotanol \_\_\_\_\_ 1 ml

Distile su \_\_\_\_\_ 1,4 ml

Brom fenol blue \_\_\_\_\_ 4 mg

7. 5x Tris Glycine elektroforez buffer, 7,5 gr Tris + 47 gr glisin 400 ml distile suda çözdürülerek elde edilmiştir. Solüsyona 25 ml %10'luk SDS eklenmiş ve toplam hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır. Elde edilen buffer 5 kat sulandırılarak kullanılmıştır.
8. Solüsyonlar aşağıda verilen miktarlarda kullanılarak 5 ml %10 luk ayrıştırma jeli hazırlanmıştır.

Distile su \_\_\_\_\_ 1,9 ml



%30 akrilamid mix	1,7 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,3 ml
%10'luk SDS hazırlanışı	50 $\mu$ l
%10'luk amonyum persülfat	50 $\mu$ l
TEMED	6 $\mu$ l

Solüsyonlar aşağıda verilen miktarlarda kullanılarak 3 ml %5'lik sıkılaştırma jeli hazırlanmıştır.

Distile su	2,1 ml
%30 akrilamid mix	500 $\mu$ l
1 M Tris (pH 6,8)	380 $\mu$ l
%10'luk SDS hazırlanışı	30 $\mu$ l
%10'luk amonyum persülfat	30 $\mu$ l
TEMED	3 $\mu$ l

SDS PAGE ve Western blot analizleri aşağıdaki basamaklar takip edilerek gerçekleştirilmiştir:

1. Örnekler üzerine 100  $\mu$ l gel-loading buffer eklenerek vortekslenmiştir.
2. Boya ile birlikte 2 dk kaynatılan örneklerin 20  $\mu$ l'si protein marker eşliğinde stain free jellere (Mini-PROTEAN® TGX™ Gels, BioRad) yüklenmiştir.
3. 300 V'ta 15 dk elektroforez sonrasında jel üzerindeki proteinler jel dökümantasyon sisteminde (Bio-Rad chemidoc Mp Jel ABD) görüntülenerek analiz edilmiştir.
4. Daha sonra protein varlığı stain free jellerde konfirme edilen örnekler optimum görüntü alınması için Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution (Bio-Rad, ABD) ile prosedürüne uygun olarak boyanmış ve jel dökümantasyon sisteminde (Bio-Rad chemidoc Mp Jel ABD) görüntülenmiştir.

5. SDS-PAGE jelleri üzerindeki proteinler nitroselüloz membrana blotlanarak aktarılmış ve sonrasında membranlar blocking buffer (500 ml PBS+ 250 µl Tween 20+ 25 gr yağsız süt tozu) içerisine alınarak shaker üzerinde oda ısında 1 saat inkübe edilmiştir.
6. İnkübasyon sonrasında membran 5 kez 5'er dk süreyle yıkama solüsyonu (500 ml PBS+ 250 µl Tween 20) ile yıkanmıştır.
7. Yıkama sonrasında membran üzerine blocking buffer ile 1:5000 oranında sulandırılan Anti-HisG-HRP antikor (Invitrogen, ABD) ilave edilmiştir. Membran shaker üzerinde oda ısında 1 gece inkübe edilmiştir.
8. İnkübasyon sonrasında membran 5 kez 5'er dk yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır.
9. Diaminobenzidine (DAB) tablet solüsyonu 15 ml 50 mM pH:7,5 tris içerisinde 1 adet Sigma Fast DAB tablet (Sigma-Aldrich, ABD) çözülerek hazırlanmıştır. Solüsyon 0,2 µm'lik filtreden süzülerek üzerine 20 µl %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenmiştir.
10. DAB tablet solüsyonu yıkama sonrasında membran üzerine dökülerek bantlar jel dökümantasyon sisteminde (Bio-Rad chemidoc Mp Jel ABD) görüntülenmiştir.

### 3.6.5 Rekombinant SAG 1 Proteininin Saflaştırılması

Pilot ekspresyon denemeleri sonucunda belirlenen optimum IPTG oranı ve indüklenme saati, final protein ekspresyon basamaklarında kullanılmıştır. BL21 Star (DE3) *E. coli* hücrelerinde eksprese olan hedef proteinlerin saflaştırılması amacıyla hücreler 15.300 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek çöktürülmüş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücresel peletlerin bir kısmı hedef proteinlerin ekspresyonu yönünden SDS-PAGE ve Western Blot analizleriyle konfirme edilmiş diğer kısmı ise saflaştırmaya alınmıştır. Uygun protokoller takip edilerek hücresel peletler uygun lysis buffer (soluble veya insoluble protein olma durumuna göre belirlenmiştir) içerisine alınıp hücrelerin resüspense ve lize olması sağlanmıştır. Daha sonra buz üzerine alınan örnekler bakteri hücre duvarını parçalamak için sonikatör cihazında uygun süre ve frekansta işleme tabii tutulmuştur. Sonrasında santrifüj edilen lizatların hedef rekombinant proteinleri içeren süpernatant kısmı alınarak kromatografik protein pürifikasyon sisteminde (Akta Pure, GE Health Science) uygun kolonlar kullanılarak pürifiye edilmiştir. Pürifikasyon sonrası rekombinant proteinlerin miktarı Qubit™ florometrik kantitasyon cihazında

ölçülmüştür. Saflaştırılmış rekombinant proteinin konfirmasyonu, protein büyüklüğü ve immün reaktivitesi (Anti-HisG-HRP Antikoru kullanılarak) SDS-PAGE ve Western Blot analizleriyle sağlanmıştır.

### **3.7 REKOMBİNANT SAG 1 ANTİJENİNİN ELISA YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Pürifiye olarak elde edilen rekombinant SAG1 antijeninin (rSAG1) *T. gondii*'nin serolojik teşhisindeki duyarlılığı ve özgünlüğü ticari TOXO IgG ELISA kiti (DIA:PRO, İtalya) ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir:

1. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Laboratuvarında daha önce TOXO IgG ELISA kiti (DIA: PRO, İtalya) ile analiz edilen *T. gondii* IgG pozitif 20 ve *T. gondii* IgG negatif 20 bireye ait serumlar çalışma için kullanılmıştır.
2. Optimum antijen konsantrasyonunun belirlenmesi için saf rekombinant SAG 1 proteini 2,5, 5, 10 µg/ml konsantrasyonlarda bikarbanot tamponunda (pH 9.0.) çözüldü.
3. Elde edilen 2,5, 5 ve 10 µg/ml konsantrasyondaki çözeltilerin her birinden 100 µl alınarak 3 farklı düztabanlı 96'lık elisa pleytlerindeki 48 kuyucuğa sıralı olarak eklendi ve bir gece +4°C de inkübasyona bırakıldı.
4. Kuyucuklar PBS ile dörder kez yıkandı.
5. Kuyucuklara 100 µl blocking buffer (500 ml PBS+ 250 µl Tween 20+ 25 gr yağsız süt tozu) eklendi ve bir gece +4°C de inkübasyona bırakıldı.
6. Kuyucuklar PBS çözeltisi ile dörder kez tekrar yıkandı.
7. Pozitif ve negatif serumlar sıralı olarak (1:100) oranında PBS ile seyreltilerek pleytlerdeki kuyucuklara 100 µl hacimde eklendi.
8. Pleytler 37 °C de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra pH :7, 10 mM fosfat tamponu içerisinde % 0,05 Tween 20 ve %0,1 Kathon GC içeren yıkama solusyonu ile beşer kez yıkandı.

9. Kuyucuklara 100 µl TOXO IgG ELISA kiti (DIA:PRO, İtalya) içinde yer alan IgG spesifik enzim konjugatı (HRP conjugated polyclonal antiboides to human IgG) eklendi. Pleytler 37 °C de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra pH :7 10 mM fosfat tamponu içinde % 0,05 Tween 20 ve %0,1 Kathon GC içeren yıkama solusyonu ile tekrar beşer kez yıkandı.

10. Daha sonra kuyucuklara 100 µl TOXO IgG ELISA kiti (DIA:PRO, İtalya) içinde yer alan TMB (Tetra-methyl-benzidine) kromojen substrat eklendi ve oda sıcaklığında karanlık ortamda 20 dk inkübasyona bırakıldı.

11. Kuyucuklara stop solusyonu olarak 100 µl 0,3M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eklendi ve pleytlerin elisa okuyucuda 450-620 nm aralığında absorbans değerleri ölçüldü.

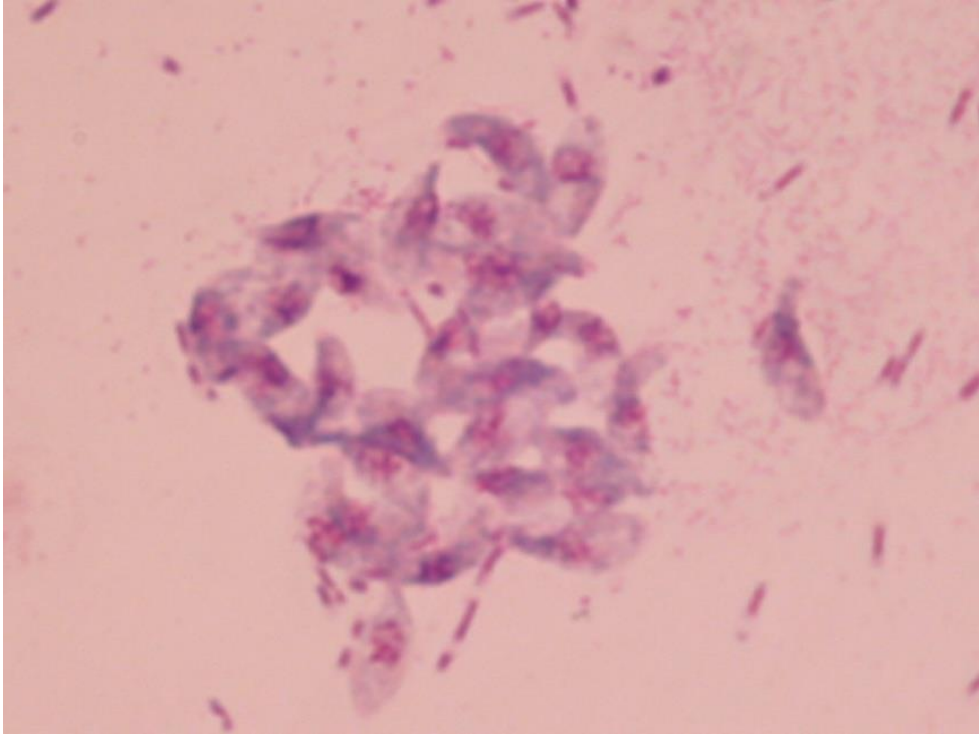
12. Cutoff değerlerinin belirlenmesi ve antijen konsantrasyonları arasındaki etkinlik değerlendirilmeleri ROC analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Sensitivite ve spesifite hesaplamaları ve ticari kit sonuçları ile korelasyon değerlendirilmeleri ilgili metodolojiye (88) göre yapıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1 *T. GONDII* SAG 1 GENİNİN AMPLİFİKASYON VE PJET1.2/BLUNT VEKTÖRÜNE KLONLAMASI

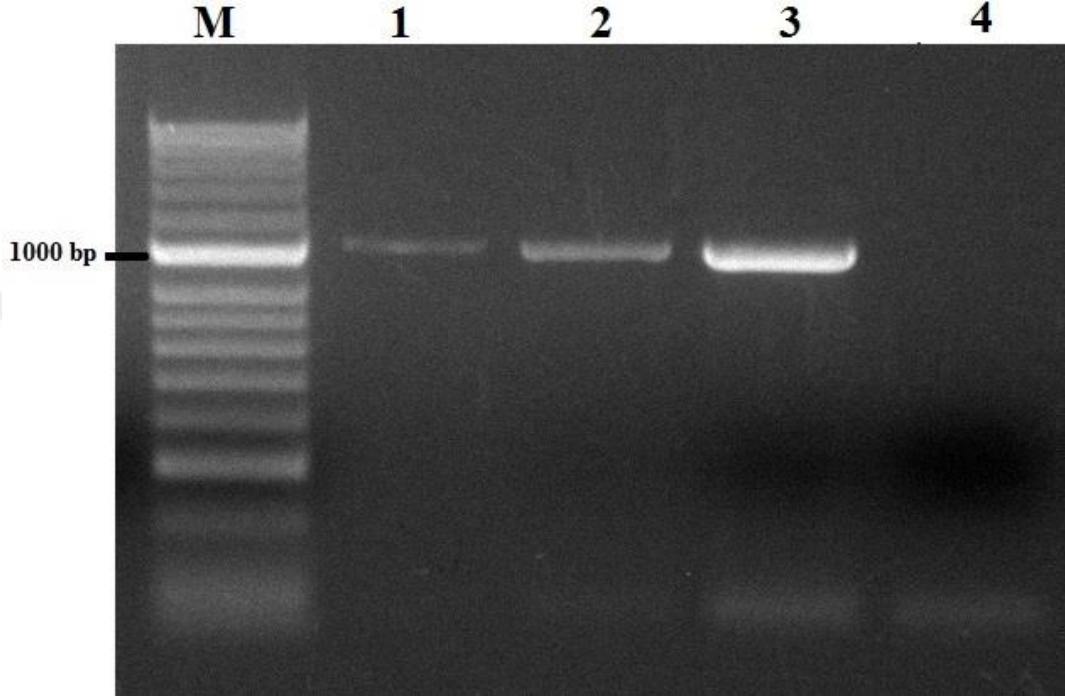
#### 4.1.1 SAG 1 Geninin Amplifikasyonu

TC. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'ndan alınan vial içerisindeki *T. gondii* takizoitlerinin bir kısmı alınıp santrifüj edilmiş, pellet kısmından alınan materyal lam üzerine konularak Giemsa boyama metoduyla boyanmıştır. Boyama işleminin ardından örnek lamelle kapatıldıktan sonra 100X büyütme ile mikroskop altında incelenerek *T. gondii* takizoitleri görüntülenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Mikroskop altında görüntülenen *T. gondii* takizoitleri (100×)

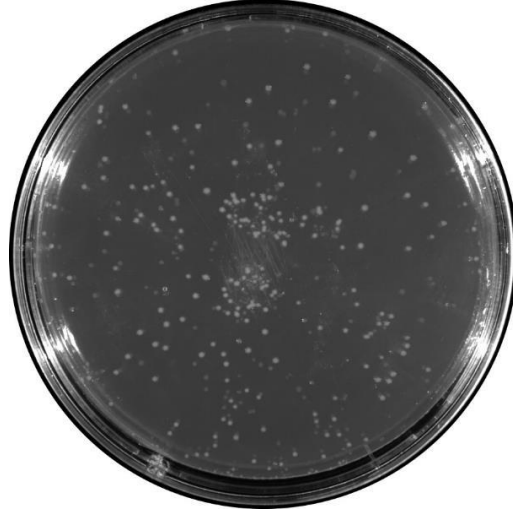
Takizoitlerden gDNA izolasyonunu takiben *Toxoplasma gondii* SAG1 gen bölgesine spesifik primerlerle yapılan PCR analizlerinde hedef büyüklükte (1010 bp) ampliconlar başarı ile elde edilmiştir. Elde edilen ampliconların agaroz jel üzerinde görünümü Şekil 4.2’de verilmiştir.



**Şekil 4.2.** 1010 bp uzunluğundaki SAG1 PCR ürününün %1,5’luk agaroz jel görüntüsü. M;100 bp Ladder, 1: gDNA miktarı 1µl, 2: gDNA miktarı 3µl, 3: gDNA miktarı 5µl, 4: negatif kontrol

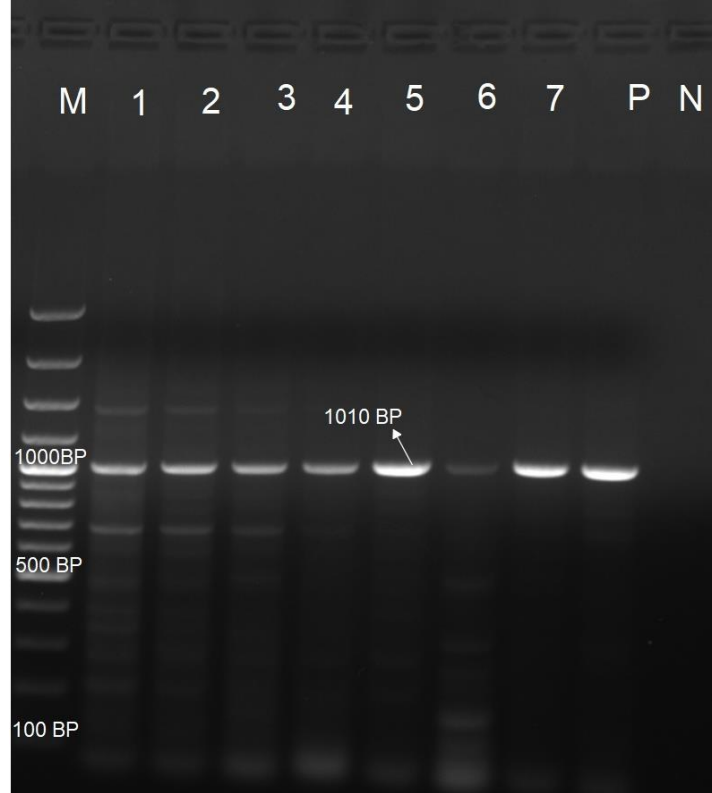
#### 4.1.2 pJET1.2/blunt Vektörüne Klonlama

CloneJET PCR Cloning Kit (ThermoScientific, ABD) kullanılarak pJET1.2/blunt klonlama vektörüne amplifikasyonu tamamlanan 1010 bp PCR ürünü yerleştirilmiştir. OneShot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, ABD) kompetan hücrelerine ligasyon ürünü transforme edilmiştir. Bir gece 37 °C’de inkübasyona bırakılan petrielerde koloniler tespit edilerek transformasyonun etkin bir şekilde tamamlandığı belirlenmiştir (Şekil 4.3).



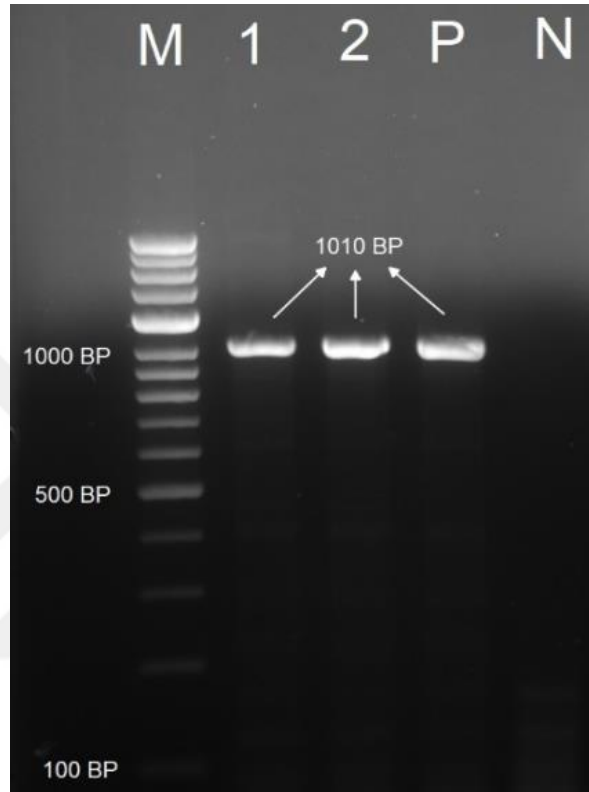
**Şekil 4.3.** *E. coli* kompetan hücrelerine *T. gondii* SAG 1 geninin transformasyonu sonrası katı besiyerinde üreyen koloniler

Gen spesifik primerlerle yapılan koloni PCR taramasında katı besiyerinden seçilen 7 koloniden hepsinin SAG1 genini içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** Kolonilerde PCR tarama ile SAG1 geninin varlığının doğrulanması. M: 100 bp marker (SolisBio Dyne FIREPol, Estonya); 1-7: PCR tarama sonucu pozitif örnekler, P: Pozitif kontrol (gDNA PCR ürünü), N: Negatif kontrol.

Protokolde beş numaralı (Şekil 4.4) koloniden alınan transformantlar sıvı besi yerine geçilerek rekombinant plazmid izolasyonu yapılmıştır. Rekombinant plazmin gen spesifik primerlerle PCR analizleri ile hedef gen bölgesinin konfirmasyonu sağlanmıştır (Şekil 4.5). Elde edilen rekombinant plazmid, pJET1.2+SAG1 olarak isimlendirilmiştir.

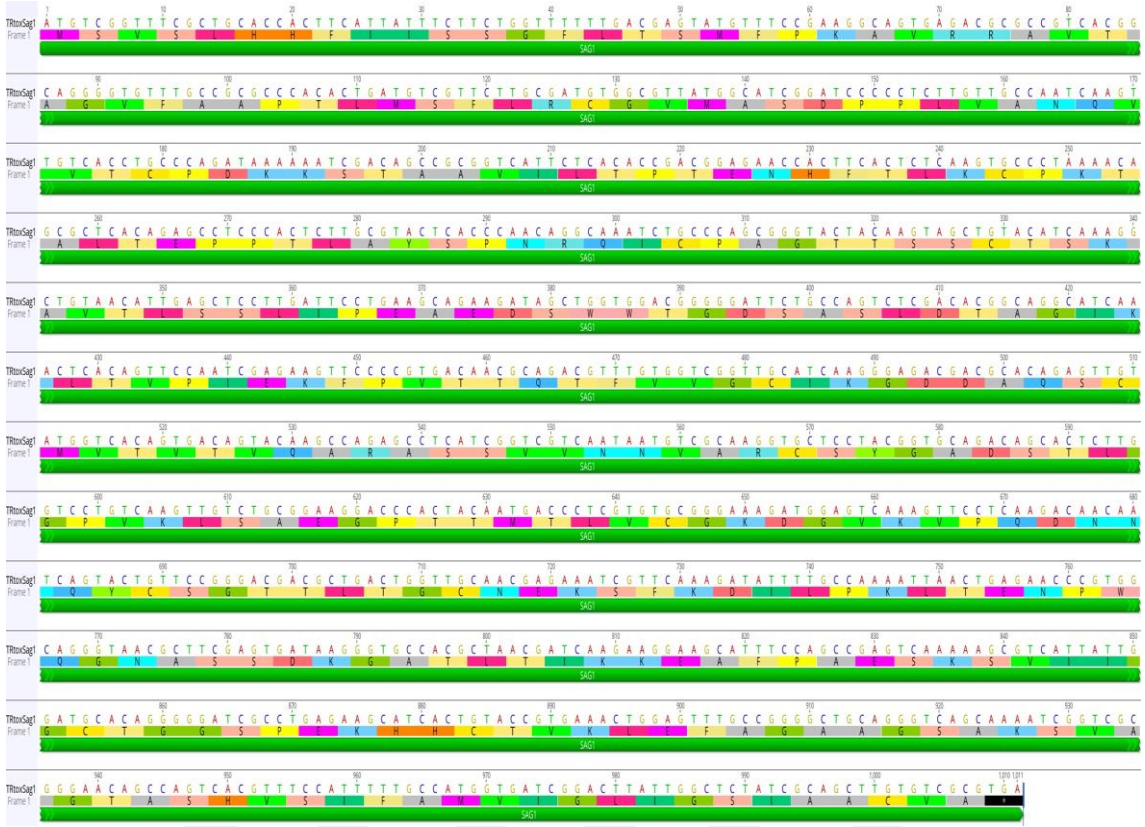


**Şekil 4.5.** Rekombinant pJET1.2+SAG1 plazmidin gen spesifik primerlerle PCR sonucu belirlenen ampliconların agaroz jel üzerinde görünümü. M: 100 bp.'lik marker (SolisBio Dyne FIREPol, Estonya) P: Pozitif kontrol (gDNA PCR ürünü), N: Negatif kontrol, 1-2: Rekombinant plazmidin kullanıldığı 1010 bp.'lik PCR ürünü.

#### **4.2 T. GONDII SAG 1 GENİNİN SEKANS VE FİLOGENETİK ANALİZ SONUÇLARI**

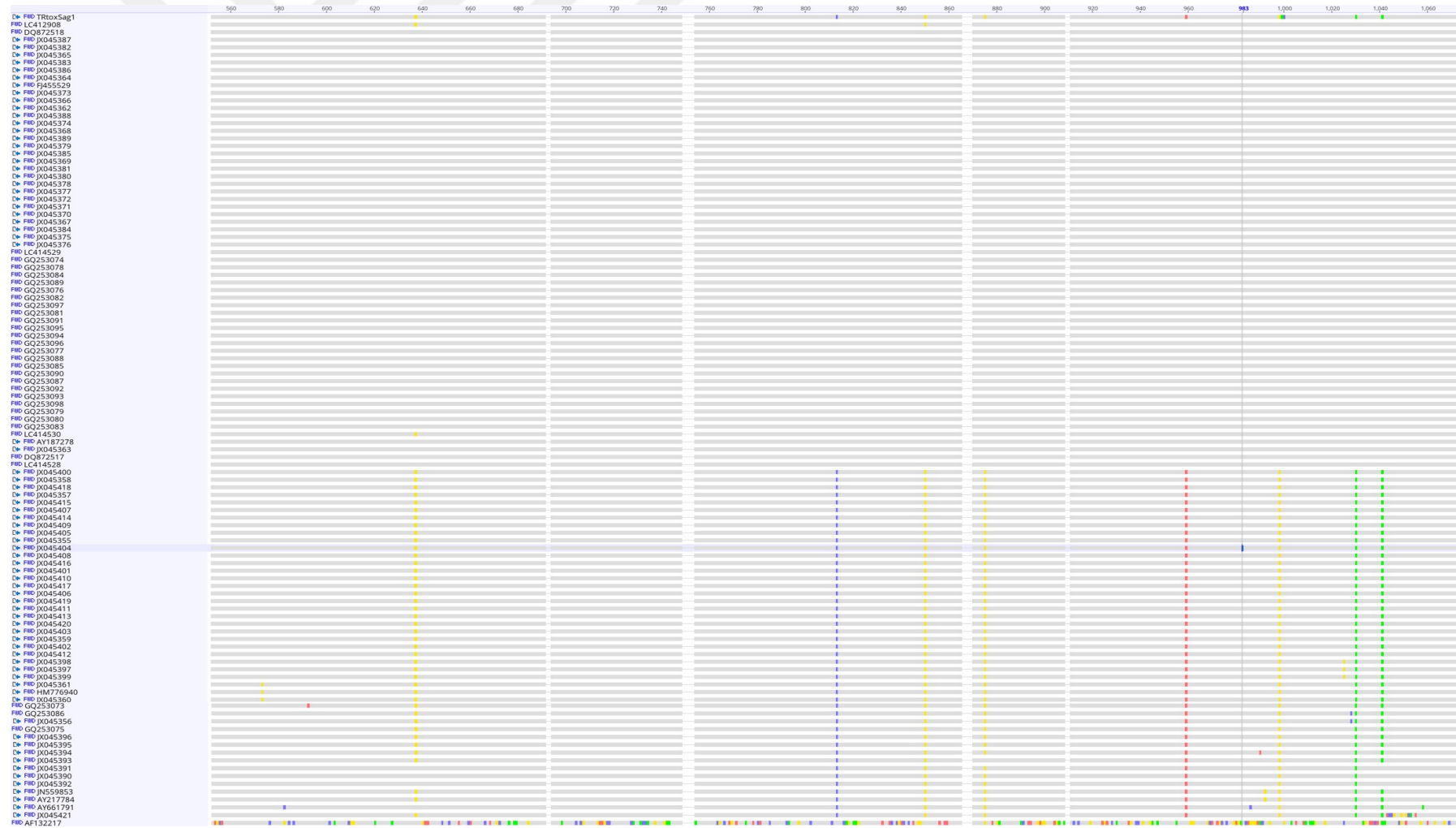
pJET1.2+SAG1 plazmid DNA'sının vektör spesifik primerlerle sekans analizleri sonucu kalite skoru yüksek kromotogramlar elde edilmiş ve DeNovo analizleriyle ilgili izolata ait final nükleotid ve amino asit dizimleri saptanmıştır (Şekil 4.6). TRtoxSag1 olarak isimlendirilen izolat MK403957 aksesyon numarası ile GenBank'a kaydedilmiştir. TRtoxSag1 izolatının nükleotid sekansları incelendiğinde GC oranının %52,1, AT oranının ise %47,9 olduğu tespit edilmiştir.





Şekil 4.6. TRtoxSag1 izolatının SAG1 geninin açık okuma çerçevesi (ORF) nükleotid ve amino asit sekansları

TRtoxSag1 izolatının nükleotid ve amino asit dizilimlerinin GenBank veri tabanında mevcut olan homolog SAG1 sekansları ile çoklu hizalamaları Şekil 4.7’de gösterilmiştir. Hizalama ve filogenetik analizler için GenBank veri tabanında mevcut olan *T. gondii*’ye ait farklı ülkelerden bildirilmiş 104 SAG1 sekansı ve *Neospora caninum* türüne ait mevcut bir izolat kullanılarak SAG1 data seti oluşturulmuştur. SAG1 data setinin analizinde ilgili genin *T. gondii*’nin farklı ülkelerden bildirilmiş izolatlar arasında 980 identik bölge gösterdiği (ort. %99,5 identiklik) ve nükleik asit sekansları temelinde oldukça korunmuş bir gen bölgesi olduğu görülmüştür. Genel olarak *T. gondii* SAG 1 sekanslarının hizalama analizlerinde 50. nükleotidde A-G, 173.’de C-T, 637.’de A-G, 833’de C-G, 850.’de T-G, 875.’de C-G, 959.’da C-A, 998.’de T-G, 1030. ve 1040. nükleotidlerde de T-C olmak üzere 10 ana nükleotid değişimi belirlenmiştir (Şekil 4.7). SAG1 geninin *T. gondii* ile *N. caninum* arasındaki interspesifik nükleotid farklılığı ortalama 2,83 olarak saptanmıştır (Tablo 4.1).



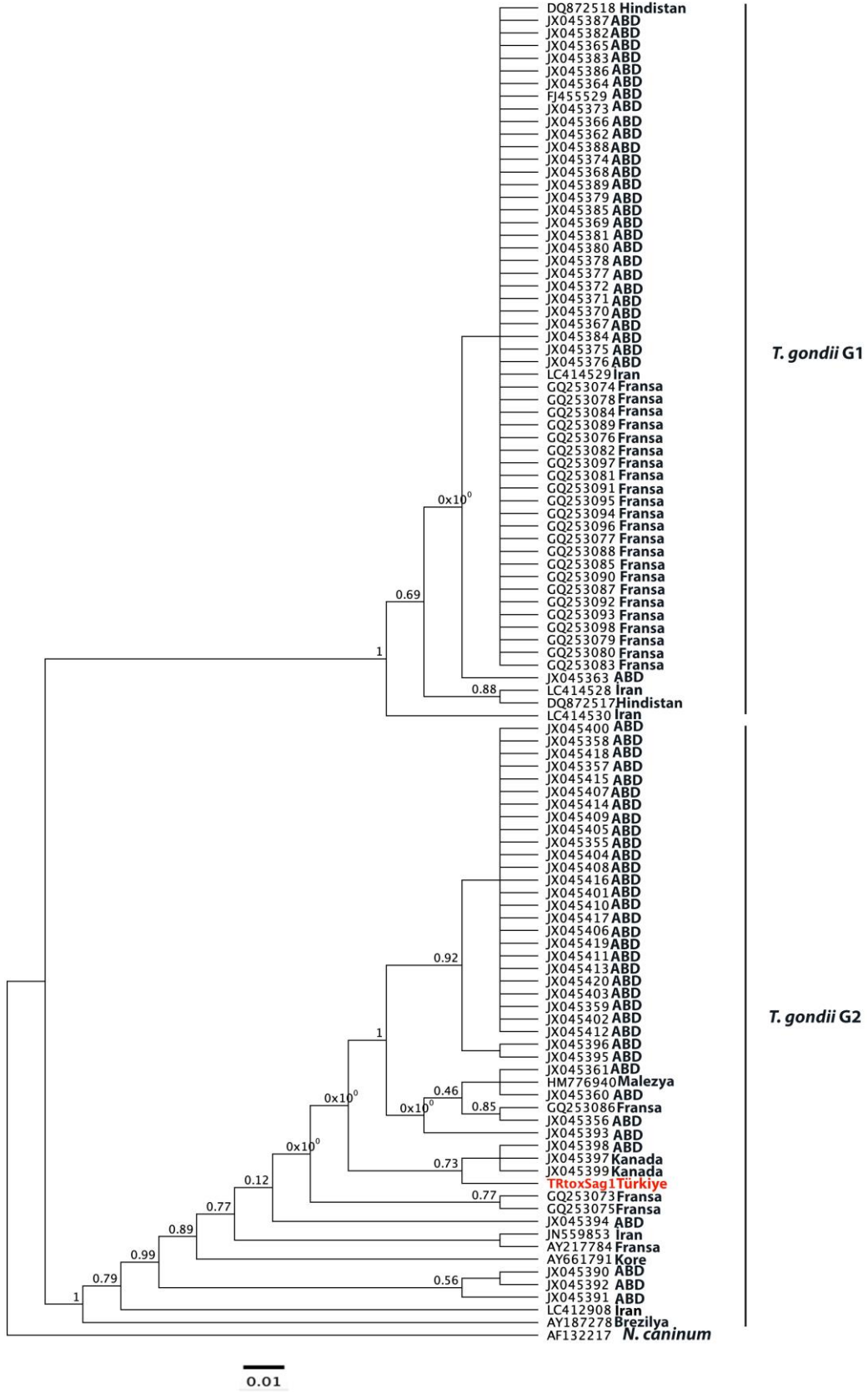
Şekil 4.7. SAG1 data setindeki izolatlara ait nükleotid sekanslarının çoklu hizalama analiz sonucu

**Tablo 4.1.** SAG1 geninin *T. gondii* ve *N. caninum* arasındaki nükleotid farklılığı

	<i>T. gondii</i>	<i>N. caninum</i>
<i>T. gondii</i>		0,052
<i>N. caninum</i>	0,618	

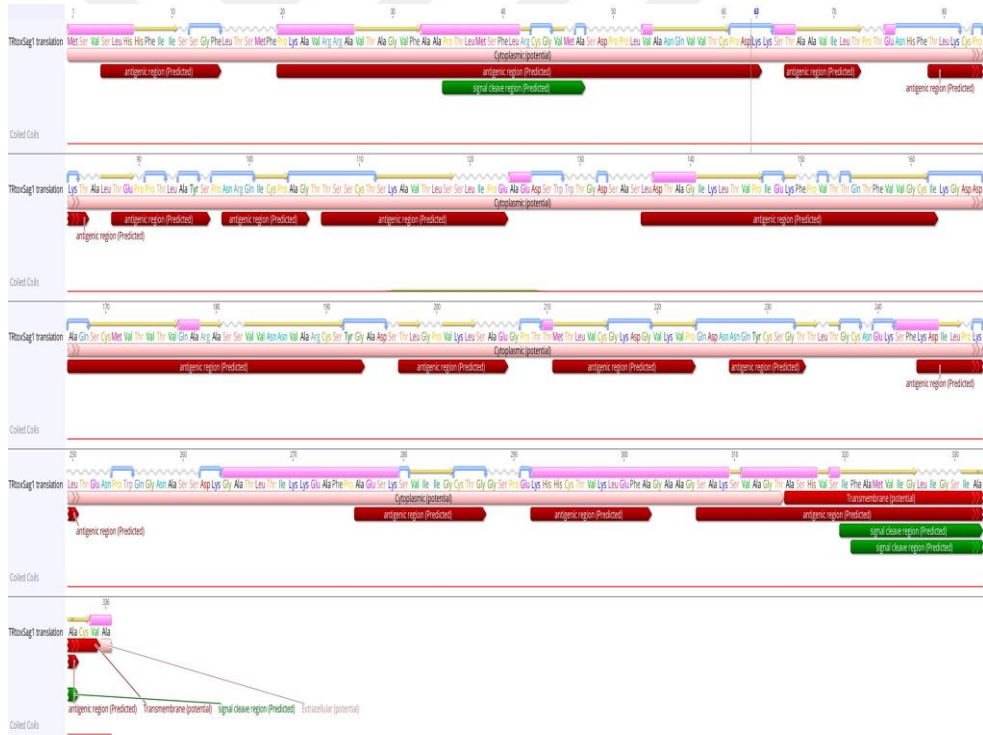
Sol alt sütündeki değerler nükleotid farklılığını, sağ üst kolondaki değerler ise standart sapmayı göstermektedir.

SAG1 data setinin filogenetik analizi sonucunda maximum likelihood ağacı üzerinde (Şekil 4.8) izolatların iki grup içerisinde küme oluşturdukları ve bu gruplanmanın filogenetik çözünürlüğünün yüksek bootstrap değerleri (1.00) ile desteklendiği tespit edilmiştir. Çalışmada elde ettiğimiz *T. gondii* TRtoxSag1 izolatının Grup 2’de yer aldığı belirlenmiş olup, ilgili izolatın Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada’da pumalardan rapor edilmiş izolatlarla (JX045397-9) daha yüksek identiklik gösterdiği ve birlikte küme oluşturdukları belirlenmiştir. İlgili izolatların oluşturduğu filogenetik kümelenme de yüksek bootstrap değeri (0.73) ile desteklenmiştir.



**Şekil 4.8.** SAG1 data setindeki izolatların ML analizine göre filogenetik analiz sonuçları. Nodların önündeki rakamlar bootstrap (1000 tekrar) desteğini göstermektedir. Çalışmada elde edilen izolat kırmızı ve kalın karakterde gösterilmiştir. Ölçek çizgisi bölgeye göre nükleotid değişimini göstermektedir.

Translasyon analizinde TRtoxSag1 izolatının nükleotid diziliminin 336 aa bölgeyi kodladığı tespit edilmiştir (Şekil 4.8). İlgili amino asit diziliminin in silico analizinde izoelektrik noktasının 7,70 olduğu ve 34,857 kDA büyüklüğünde proteini eksprese ettiği belirlenmiştir. SAG1 proteinin amino asit dizilimi analizinde büyük bölümünün sitoplazmik olduğu, yalnızca 315 ve 335 aa arasının transmembran özellikte olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 35-47. aa ve 320-335. aa arasının sinyal peptid karakterde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9). *Toxoplasma gondii* SAG 1 proteini, antijenite açısından incelendiğinde puanı 1.070 ile 1.179 arasında, aminoasit uzunlukları ise 7 ile 44 arasında değişkenlik gösteren 16 antijenik bölge tespit edilmiş bunların 5 tanesinde aminosit uzunluğunun 15 ve üzerinde olduğu görülmüştür (Tablo 4.2). Antijenik bölgelerin amino asit sekansı üzerinde dağılımı Şekil 4.9’da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. *T. gondii* TRtoxSag1 izolatının SAG 1 amino asit sekansı ve özellikleri

**Tablo 4.2.** *T. gondii* SAG 1 proteininde tespit edilen antijenik bölgeler

Sıra No	Aminoasit Dizisi	Başlangıç	Bitiş	Aminoasit Sayısı	Antijenik Puan
1	SLHHFISSGF	4	14	11	1.157
2	PKAVRRRAVTAGVFAAPTLMSFLRCGVMASDP PLVANQVVTC PDK	20	63	44	1.179
3	TAAVILT	66	72	7	1.127
4	TLKCPKT	79	85	7	1.109
5	TEPPTLAYS	88	96	9	1.075
6	NRQICPAG	98	105	8	1.070
7	TSSCTSKAVTLSSLIPE	107	123	17	1.137
8	LDTAGIKLTVPIEKFPVTTQTFVVGCI	136	162	27	1.175
9	AQSCMVTVTVQARASSVVNNVARCSYG	167	193	27	1.172
10	TLGPVKLSAE	197	206	10	1.109
11	MTLVCGKDGVKVP	211	223	13	1.103
12	NQYCSGT	227	233	7	1.075
13	KDILPKL	244	250	7	1.063
14	AESKSVIIGCTG	276	287	12	1.131
15	KHHCTVKLEFA	292	302	11	1.156
16	SAKSVAGTASHVSIFAMVIGLIGSIAA	307	333	27	1.164

SAG1 data seti amino asit sekanslarının hizalama analizlerinde ikili hizalama identiklik oranı %98,6 olarak belirlenmiş ve 312 identik bölge saptanmıştır. *T. gondii* SAG1 geni amino asit sekanslarının çoklu hizalama analizi sonucu amino asit farklılıkları Şekil 4.10.'da gösterilmiştir. *T. gondii* SAG1 amino asit kompozisyonunda alenine, serine ve threonine amino asitlerinin sırasıyla %11,2, %10,7 ve %10,6 ile en yüksek dağılımı gösterdiği belirlenmiştir. Çoklu hizalama analizlerinde ana amino asit varyasyonları sırasıyla 16. aa'de T-A, 45. aa'de V-A, 195. aa'de D-N, 251. aa'de T-S, 263. ve 270. aa'lerde K-N, 298. aa'de K-Q, 311. aa'de A-S ve 330. aa'de I-T olarak tespit edilmiştir.





*Toxoplasma gondii* SAG1 proteininin in-slico üç boyutlu yapısı Şekil 4.11’de gösterilmiştir. 336 aminositten oluşan 1010 nükleotidin kodladığı SAG 1 proteininin üç boyutlu yapısında yer alan katlanmalar belirlenmiş ve korunmuş bir yapıya sahip olduğu görülmüştür. Çalışmada elde edilen izolata ait protein yapısının SWISS-MODEL yazılımı ile protein veri bankasındaki analiz sonuçları Major Surface Antigen P30 olarak nitelenen diğer *T. gondii* SAG1 proteinleri ile yapısal olarak %99,3-%100 benzer olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.11. *T. gondii* SAG 1 proteininin 3 boyutlu görünümü ve aminoasit dizisi

### 4.3 *T. GONDII* SAG 1 GENİNİN DNA AŞISI OLARAK PCDNA3.1 VEKTÖRÜNE KLONLAMASI

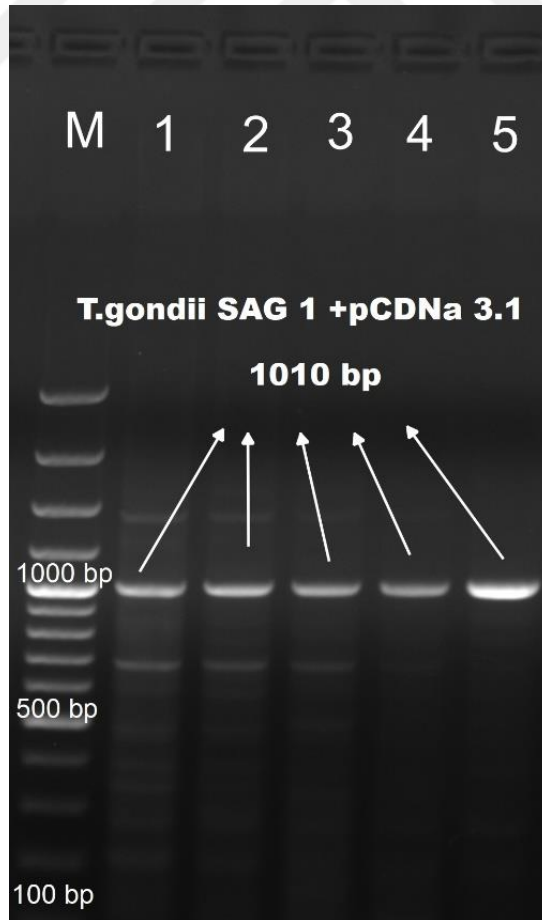
*Toxoplasma gondii* genomik DNA’sından elde edilen 1010 bp PCR ürünü pcDNA™3.1/V5-His TOPO® ekspresyon vektörüne (Invitrogen, ABD) başarılı bir şekilde klonlanmıştır. Ligasyon ürünü OneShot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, ABD) kompetan hücrelerine transformasyonu sonrası katı besi yerinde oluşan koloniler görüntülenmiştir (Şekil 4.12).





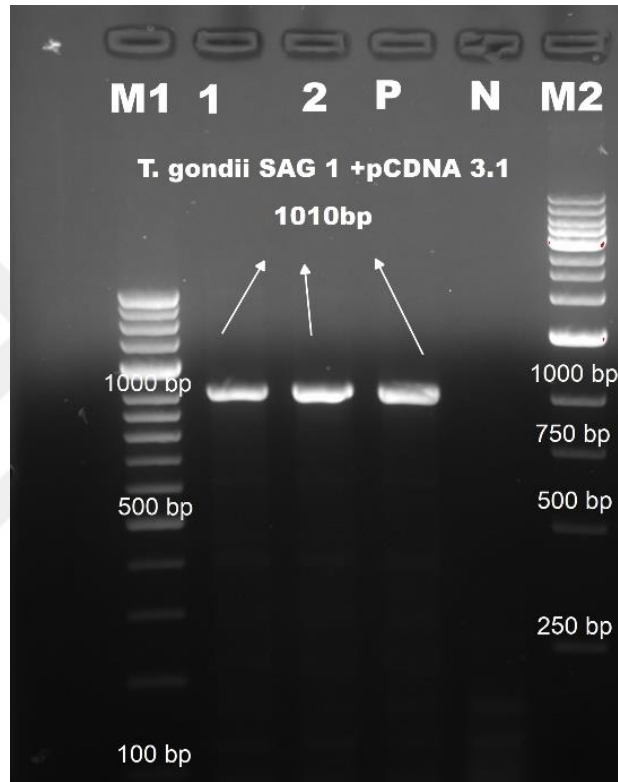
**Şekil 4.12.** PCR ürünü *T. gondii* SAG 1 geninin *E. coli* kompetan hücrelerine transformasyonu sonrası üretilen koloniler

Transformasyon sonrası gen spesifik primerlerle koloni PCR analizlerinde katı besiyerinden seçilen 5 koloniden hepsinin rekombinant plazmidi içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.13).



**Şekil 4.13.** PCR tarama ile kolonilerde rekombinant plazmid varlığının doğrulanması. M: 100 bp.'lik marker (SolisBio Dyne FIREPol, Estonya) 1-5: Pozitif örnekler

Protokolde beş numaralı kuyucukta ampikonu görülen (Şekil 4.13) koloniden alınan transformantlar sıvı besi yerine geçilerek rekombinant plazmid izolasyonu yapılmıştır. Rekombinant plazmin gen spesifik primerlerle PCR analizleri ile hedef gen bölgesinin plazmid içerisindeki konfirmasyonu sağlanmıştır (Şekil 4.14). Elde edilen rekombinant plazmid, pcDNA 3.1+SAG 1 olarak isimlendirilerek rekombinant DNA aşısı denemeleri üzerine sonraki proje çalışmaları için muhafaza altına alınmıştır.



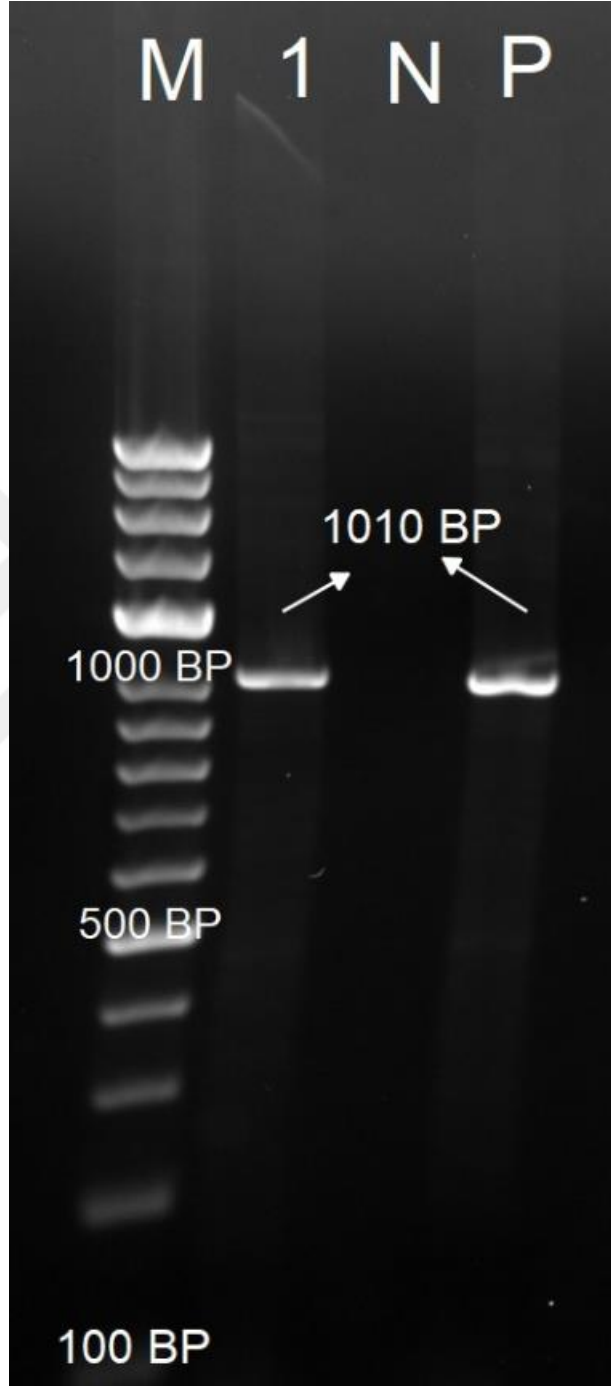
**Şekil 4.14.** Rekombinant pcDNA 3.1+SAG 1 plazmidin gen spesifik primerlerle PCR sonucu belirlenen ampikonların agaroz jel üzerinde görünümü. M1: 100 bp.'lik marker (SolisBio Dyne FIREPol, Estonya); M2: 250 bp.'lik marker (SolisBio Dyne FIREPol, Estonya); P: Pozitif kontrol (gDNA PCR ürünü), N: Negatif kontrol, 1-2: Rekombinant plazmidin kullanıldığı 1010 bp.'lik PCR ürünü.

#### 4.4 *T. GONDII* SAG 1 GENİNİN EKSPRESYON ANALİZİ SONUÇLARI

##### 4.4.1 pET100 Directional TOPO Ekspresyon Vektörüne Klonlama

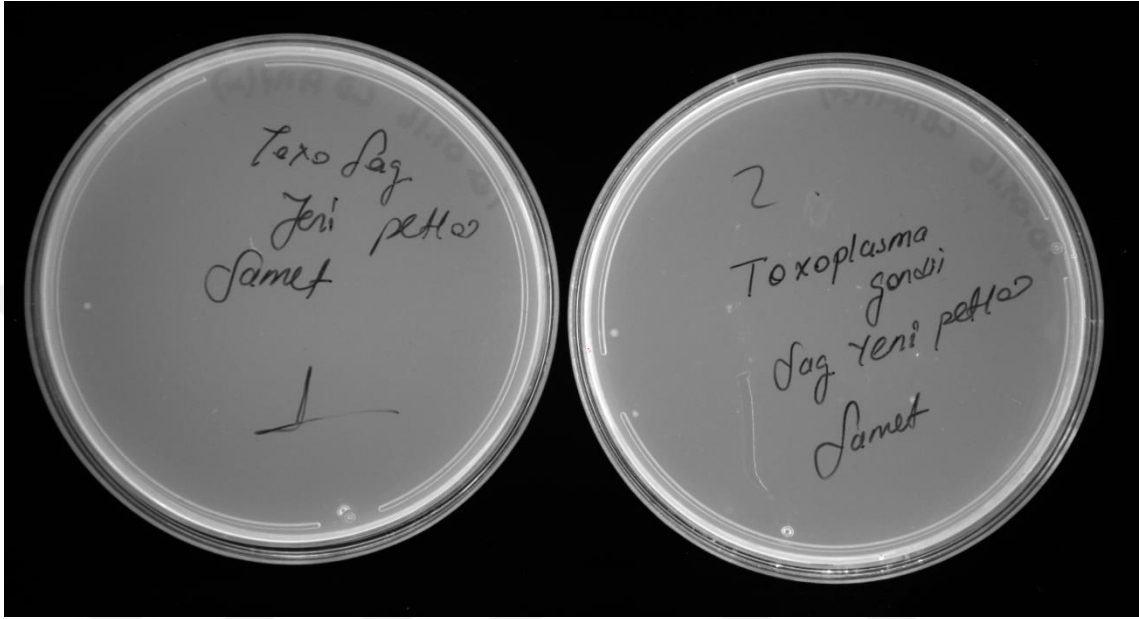
SAG 1 geninin pET100 Directional TOPO (Thermo Scientific, ABD) plazmidine yerleştirilmesi için CACC ön bölgesini içeren SAG1 F primeri ve SAG 1 R primeri ile uygulanan PCR'da TRtoxSag1 izolatına ait SAG1 geni amplifiye edilmiştir. PCR ürünü

%1,5'luk etidyum bromidli agaroz jelde elektroforez sonrası BioRad ChemiDoc Mp görüntüleme cihazında (BioRad, Almanya) görüntülenmiştir (Şekil 4.15).



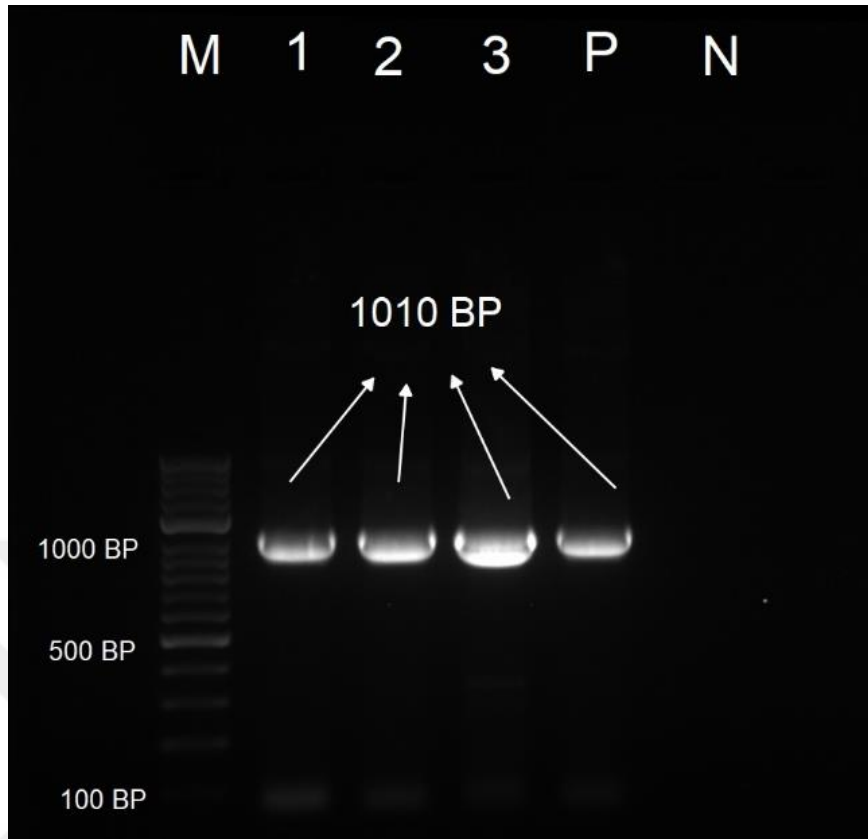
**Şekil 4.15.** Agaroz jel elektroforezde pET100 ekspresyon vektörüne ligasyon için modifiye edilen primerlerle TRtoxSag1 izolatına ait SAG1 PCR ürününün görünümü. M: 100 bp.'lik marker (SolisBio Dyne FIREPol, Estonya) 1:1010 bp. SAG 1 Pozitif örnekler, P: Pozitif kontrol (gDNA PCR ürünü), N: Negatif kontrol.

pET100 Directional TOPO (Thermo Scientific, ABD) ekspresyon plazmidine *T. gondii* SAG 1 PCR ürünü başarılı bir şekilde klonlanmıştır. Rekombinant plazmid One Shot TOP10 kompetan *E. coli* hücrelerine transforme edilmiş ve 37 °C'de bir gece inkübasyon sonrası LB agar'da koloniler tespit edilmiştir (Şekil 4.16).



**Şekil 4.16.** *T. gondii* SAG 1 PCR ürününün One Shot Top10 *E. coli* kompetan hücrelerine transformasyonu sonrası üretilen koloniler

Transformasyon sonrası gözlenen kolonilerin rekombinant pET100+ SAG1 plazmidini içerip içermediğini tespit etmek için koloni PCR tarama yapılmıştır. Katı besiyerinden seçilen 3 koloniden hepsinin rekombinant plazmidini içerdiği PCR tarama ile gösterilmiştir (Şekil 4.17).



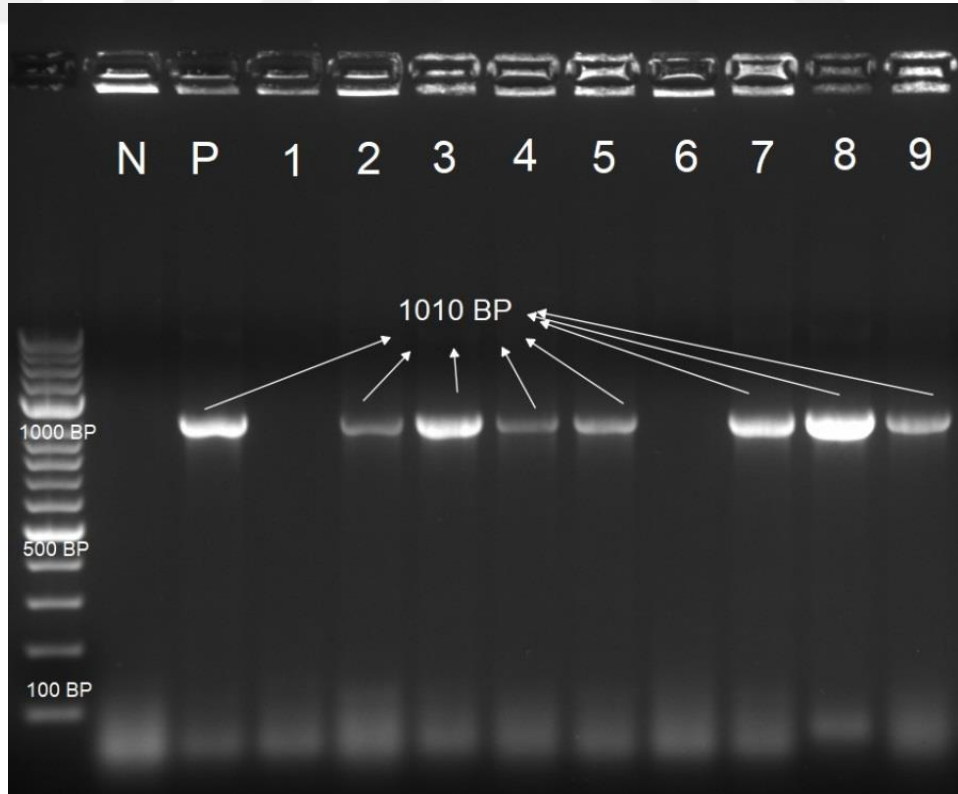
**Şekil 4.17.** PET100 ekspresyon sisteminde PCR tarama ile kolonilerde rekombinant plazmid varlığının doğrulanması. M:100 bp.'lik marker (SolisBio Dyne FIREPol, Estonya), P: Pozitif kontrol (gDNA PCR ürünü), 1-3: SAG 1 Pozitif örnekler, N: Negatif kontrol.

#### 4.4.2 Rekombinant *T. gondii* SAG 1 geninin One Shot BL21 Star (DE3) *E. coli* hücrelerine transformasyonu

Pozitif olarak belirlenen kolonilere ait rekombinant SAG1 plazmidinin One Shot BL21 Star (DE3) *E. coli* hücrelerine (Invitrogen, ABD) transformasyonu sonucu LB katı besiyerinde koloniler tespit edilmiştir (Şekil 4.18). Transformasyon sonrası gözlenen kolonilerin rekombinant pET100+SAG 1 plazmidini içerip içermediğini tespit etmek için yapılan koloni PCR taramada kolonilerin tamamında rekombinant plazmidin varlığı belirlenmiştir (Şekil 4.19).



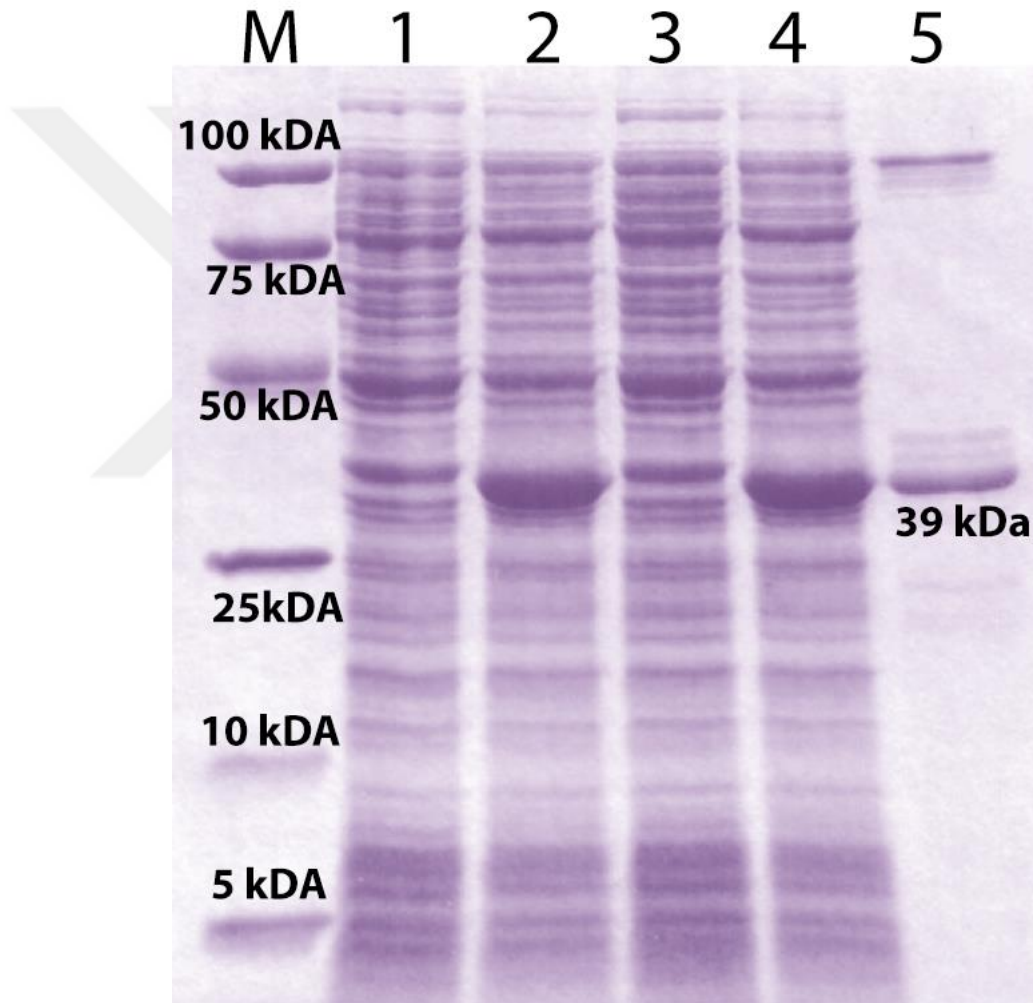
Şekil 4.18. SAG1 rekombinant plazmitinin One Shot BL21 Star (DE3) *E. coli* kompetan hücrelerine transformasyonu sonrası LB besi yerinde belirlenen koloniler



Şekil 4.19. One Shot BL21 Star (DE3) kolonilerinde rekombinant plazmid varlığının koloni PCR tarama ile doğrulanması. M: 100 bp.'lik marker (SolisBio Dyne FIREPol, Estonya) P: Pozitif kontrol (gDNA PCR ürünü), 2-5,7-9: SAG 1 Pozitif örnekler, N: Negatif kontrol

#### 4.4.3 SDS-PAGE ve Western Blot Analiz Sonuçları

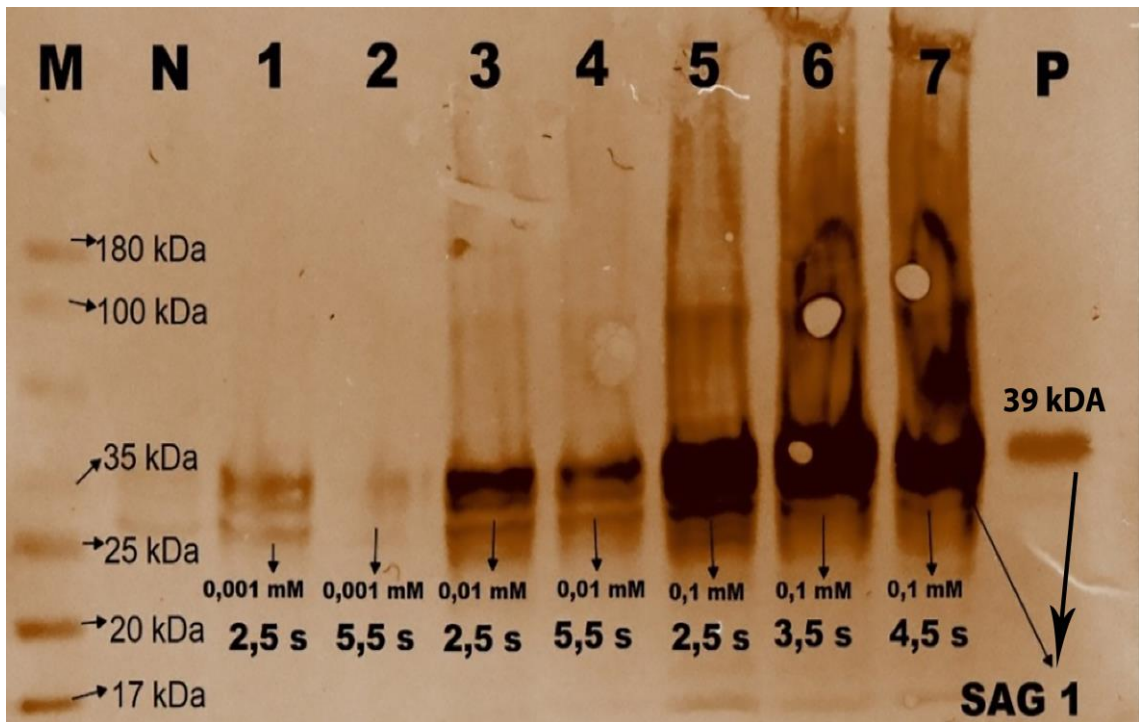
Farklı IPTG oranlarında yapılan pilot indüklenme denemelerinde farklı saatlerde alınan örneklerin ekspresyon durumları SDS-PAGE analizleri ile belirlenmiştir (Şekil 4.20). Pürifiye edilen TrToxSAG1 izolatına ait SAG1 rekombinant proteininin SDS-PAGE analizi sonucu jel üzerindeki görünümü de Şekil 4.20’de verilmiştir. SDS-PAGE analizinde rekombinant SAG1 proteininin 39 kDA büyüklüğünde olduğu belirlenmiş olup elde edilen sonuç in-silico analiz sonuçlarını konfirme etmiştir.



**Şekil 4.20.** TrToxSAG1 izolatının pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin saatlere göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin SDS-PAGE analizi görüntüsü. 1: 2,5. saat, IPTG indüklemesi yok; 2: 2,5. saat, 0,01 mM IPTG indükleme; 3: 3,5. saat IPTG indüklemesi yok; 4: 3,5. saat 0,1 mM IPTG indükleme; 5: Pürifiye SAG1; M: Marker (Precision Plus Protein Marker, BioRad)



SDS-PAGE’de rekombinant protein ekspresyonu sonucu elde edilen örnekler yürütülmüş ve nitrosellüloz membrana aktarılmıştır. 0,001-0,1 mM IPTG indüklemesi yapılan rekombinant proteinlerin Western blot analizinde anti-HisG-HRP antikoru (Invitrogen, ABD) ile inkübasyonu ve DAB tablet solüsyonu ile boyaması sonucu 39 kDa SAG1 proteininin immun reaktif olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.21). Rekombinant SAG1 proteini affinite kromatografide HisTrap kolonlar kullanılarak saflaştırılmış ve pürifiye antijen SDS-PAGE ve Western Blot analizleri ile gösterilmiştir (Şekil 4.20, Şekil 4.21).



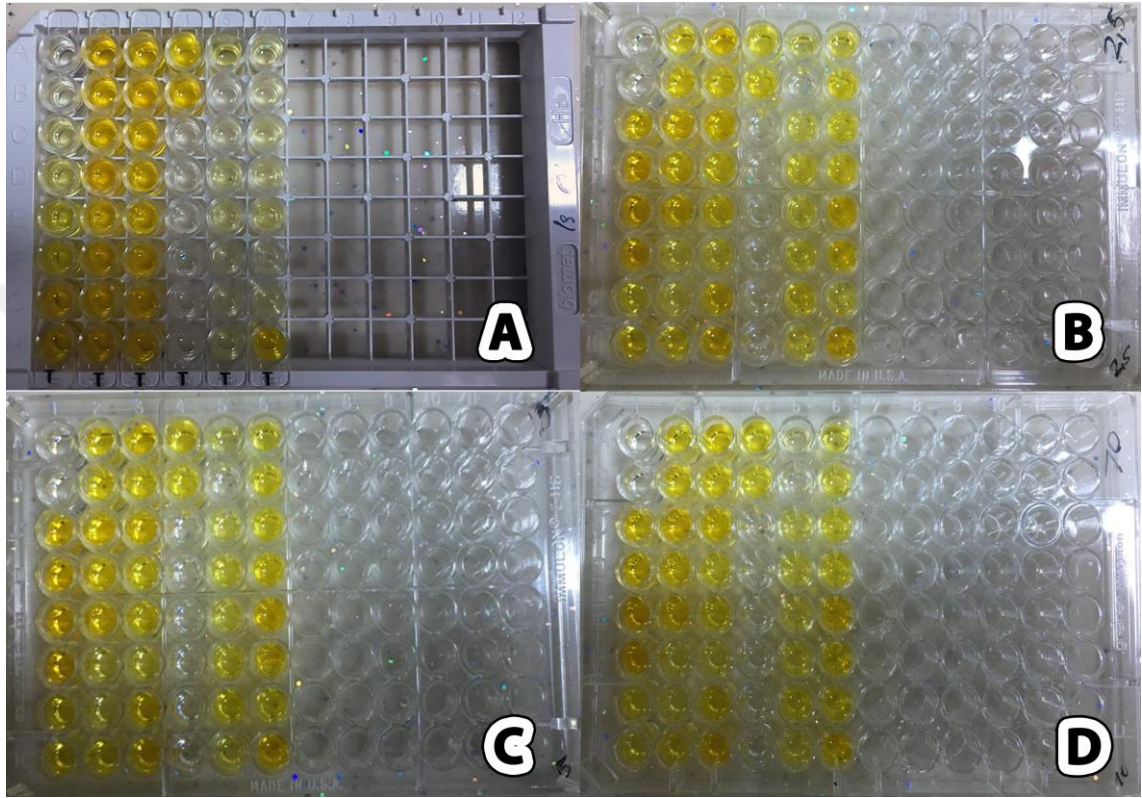
**Şekil 4.21.** 0,001-0,1mM IPTG konsantrasyonu ile indüklenen rekombinant proteinlerin Western Blot analizi sonrası membran üzerinde görünümü. M. Protein marker (SolisBio Dyne FIREPol, Estonya)1, 2: 0,001 mM 2,5 ve 5,5 saat indüklenen örnekler, 3-4: 0,01 mM 2,5-5,5 saat indüklenen örnekler, 5,6,7: 0,1 mM 2,5-3,5-4,5 saat indüklenen örnekler, P: Pürifiye rekombinant SAG1 antijeni, N: Negatif kontrol.

#### 4.5 REKOMBİNANT *T. GONDII* SAG 1 ANTİJEN ELISA SONUÇLARI

Çalışmada elde edilen rekombinant SAG1 antijeninin 2,5 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml konsantrasyonda ELISA pleytlerine kaplanması ve işlenmesi sonucunda pleytlerde reaksiyon şekillendiği belirlenmiştir. ELISA pleytlerinde şekillenen reaksiyonlar TOXO IgG ELISA kiti (DIA:PRO, İtalya) ile birlikte Şekil 4.22’de gösterilmiştir. Her üç antijenik konsantrasyonda elde edilen OD değerlerinin ROC analizi sonucunda elde edilen cutoff değerleri %95 güven aralığında Tablo 4.3’de verilmiştir. Tablo 4.3’de



görüldüğü üzere 2,5 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml antijen konsantrasyonlarının cutoff değerleri sırasıyla 0,817, 0,893 ve 0,893 olarak belirlenmiş ve her cutoff değeri için anlamlılık düzeyi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0,01$ ).

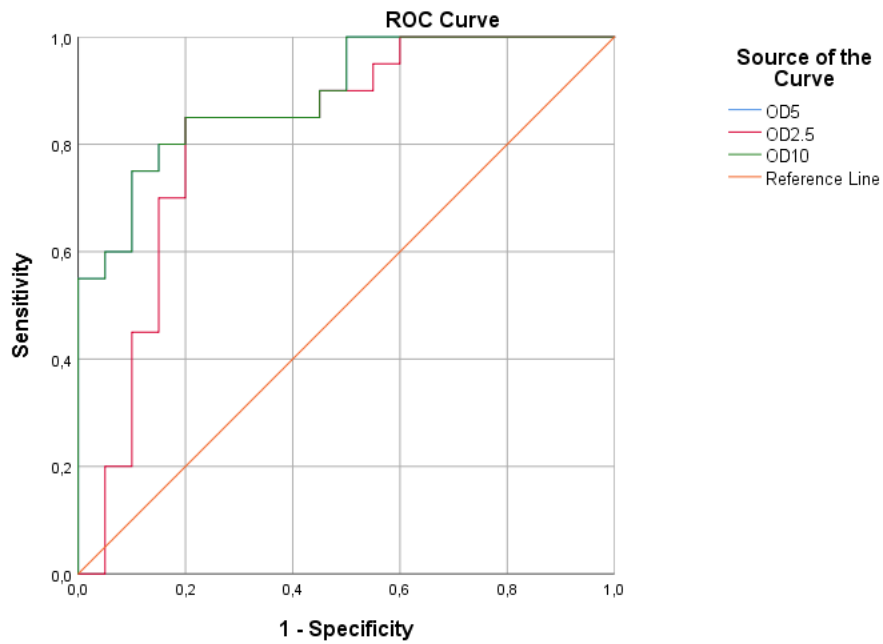


**Şekil 4.22.** TOXO IgG ELISA kiti ve SAG1 antijen ELISA analizi sonucu pleytlerde şekillenen reaksiyonların görünümü. A: TOXO IgG ELISA kiti; B: 2,5 µg/ml SAG1; C: 5 µg/ml SAG1; D: 10 µg/ml SAG1

**Tablo 4.3.** SAG 1 antijeninin farklı konsantrasyonları ile elde edilen OD değerlerinin ROC analizleri sonucu belirlenen cutoff değerleri ve istatistiksel analizi

Eğri Altındaki Alan						
Test Değişkenleri	Sonucu	Alan	Std. Hata	Asemt. Sig.	Asemt. %95 Güven Aralığı	
					Alt Bant	Üst Bant
OD5		,893	,049	,000	,796	,989
OD2.5		,817	,071	,001	,677	,958
OD10		,893	,049	,000	,796	,989

2,5 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml konsantrasyonda SAG1 ELISA analizlerinde saptanan OD değerlerinin ROC analizleriyle belirlenen sensitivite ve spesifite tabanlı eğrileri Şekil 4.23'de verilmiştir. Her üç konsantrasyonun ROC eğri analiz sonuçları, 5 µg/ml ve 10 µg/ml antijenik konsantrasyonların 2,5 µg/ml'a göre daha duyarlı ve özgün sonuçlar verdiğini ortaya çıkarmıştır.



Şekil 4.23. SAG 1 antijeninin farklı konsantrasyonları ile elde edilen ROC eğrileri

ROC analizleri sonucu duyarlılığı yüksek belirlenen 10 µg/ml antjen konsantrasyondaki SAG1 ELISA'nın referans TOXO IgG ELISA sonuçlarına göre %84,2 duyarlılığa ve %81,0 özgünlüğe sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.4). Kappa istatistik testi (Tablo 4.5), SAG1 ELISA ve TOXO IgG ELISA kiti sonuçları arasında iyi bir korelasyon ( $k=0,65$ ) olduğunu göstermiştir.

Tablo 4.4. SAG1 ELISA'nın referans TOXO IgG ELISA sonuçlarına göre özgünlük ve duyarlılığı

		TOXO IgG ELISA			Sensitivite %	Spesifite %
		+	-	Total		
SAG1 ELISA	+	16	3	19	84,2	81,0
	-	4	17	21		
	Total	20	20	40		

**Tablo 4.5.** SAG1 ELISA'nın referans TOXO IgG ELISA sonuçlarıyla Kappa analizine göre uyumu

Simetrik Ölçümler					
		Değer	Asemp. Standart Hata	Yaklaşık T	Yaklaşık önemlilik
Uyumun ölçümü	Kappa	,650	,120	4,116	,000
N geçerli olgular		40			

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

*T. gondii* insan dahil birçok sıcak kanlı hayvanı enfekte edebilen ve intrasellüler yerleşim gösteren yaygın bir protozoondur. *T. gondii*'nin kompleks hayat döngüsü sonkonak ve arakonakları içermektedir. Tüm konaklarda aseksüel faz görülürken, seksüel faz sadece sonkonak kedilerin sindirim sisteminde gerçekleşir (89). Bu obligat parazit immun yetmezliği olan ya da bağışıklığı baskılanmış bireylerde ve ayrıca fetüste ölümlere yol açar. Hastalığın mücadelesi zor ve maliyetli olup ayrıca çiftlik hayvanı yetiştiriciliğinde oluşturduğu stres faktörleri ve koyun sürülerinde yol açtığı abortlarla önemli problemlere neden olmaktadır. Bu açıdan parazitin insan sağlığına olumsuz etkisini minimize etmek açısından kontrol yaklaşımları önem kazanmıştır. *T. gondii*, aşı geliştirilmesinde ve öncü tanıda daha çok kullanılan çeşitli antijenlere sahiptir (89, 90).

Parazitin yüzeyi, yüzey antijenleri (SAGS) familyasına ait olan bir çeşit glycosylphosphatidyl inositol (GPI)-bağlı antijenlerle kaplıdır (91). Bunlar arasında SAG1 antijeni, parazitin konak hücresi içerisine invazyonunda hayati önemi olan immunodominant ligandlardan birisidir. SAG1'in subunit aşılarda ve hızlı tanı kitleri geliştirilmesinde en önemli proteinlerden biri olduğu gösterilmiştir (92). Türkiye'de günümüze kadar *T. gondii* antijenik genlerinin karakterizasyonu üzerine herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu açıdan mevcut tez çalışması ile immunizasyon ve serolojik tanıda oldukça önemli olan SAG1 geninin Türkiye *T. gondii* izolatlarında karakterizasyonu ilk kez gerçekleştirilmiştir. *T. gondii*'nin hayat döngüsünde enfeksiyona yol açan ve anahtar dönem olarak nitelenen takizoitler konakta güçlü bir immun yanıt oluşturarak parazitlerin büyük çoğunluğunun elimine edilmesini sağlarlar. Takizoitlerin yüzeyi konak hücrenin immun yanıtının ana hedefi olup SAG 1 bu procesteki en önemli majör yüzey antijenlerinden biridir. SAG1, *T. gondii* total proteinlerinin % 3-5'inde bulunmasına karşın antikorların büyük bir kısmı enfeksiyon sürecinde SAG1'e karşı reaktive olurlar (93). Parazitten pürifiye edilen çeşitli SAG1 izolatları (94, 95) *E. coli* (96)veya maya (97) rekombinant ekspresyon sistemleri ile

üretilmiş ve sonrasında SAG1'in peptid bileşenlerinin konak humoral ve hücrel bağışıklığını sitümile ettiği gösterilmiştir (98-100). Dolayısıyla SAG1'in *T. gondii*'ye karşı koruma sağladığı ortaya çıkarılmıştır (101).

*T. gondii*'nin çeşitli ülkelerden izole edilmiş farklı suşlarında SAG1 nükleotid sekanslarının yüksek düzeyde identik olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (102-105). Bununla birlikte SAG1 sekanslarının bazı suşlar arasında nükleotid ve amino asit tabanında polimorfizm gösterdiği kaydedilmiştir (103,104,106,107). Çalışmamızda TRtoxSag1 izolatının nükleotid ve amino asit dizilimlerinin hizalama ve filogenetik analizleri, GenBank veri tabanında mevcut olan *T. gondii*'ye ait farklı ülkelerden bildirilmiş 104 SAG1 sekansı ve *Neospora caninum* türüne ait mevcut bir izolat kullanılarak oluşturulan data seti üzerinde yürütülmüştür. SAG1 data setinin analizinde SAG1 genin *T. gondii*'nin farklı ülkelerden bildirilmiş izolatları arasında ortalama %99,5 identiklik gösterdiği ve yukarıdaki çalışmaların (102,103-105) sonuçlarına paralel olarak nükleik asit sekansları temelinde oldukça korunmuş bir gen bölgesi olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında *T. gondii* SAG 1 sekanslarının hizalama analizlerinde 10'un üzerinde nükleotid varyasyonu belirlenmiştir. Diğer yandan SAG1 geninin *T. gondii* ile *N. caninum* arasında oldukça değişken olduğu görülmüştür. Bu sonuç da ilgili genin tür içinde yüksek düzeyde korunmuş olduğunu göstermiştir. SAG1 data setinin filogenetik analizi *T. gondii* izolatlarının Hartati ve ark. (106) bulguları ile paralel olarak iki ana grup içerisinde kümelendiğini göstermiş olup elde edilen bu sonuç yüksek bootstrap değerleri (1.00) ile desteklenmiştir. Çalışmada elde ettiğimiz *T. gondii* TRtoxSag1 izolatının Grup 2'de yer aldığı belirlenmiş olup, ilgili izolatın Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'da pumalardan rapor edilmiş izolatlarla (JX045397-9) daha yüksek identiklik gösterdiği ve birlikte küme oluşturdukları belirlenmiştir. Neticede çeşitli araştırmacıların (106,107) kaydettiği gibi *T. gondii* suşlarının SAG1 gen bölgesine göre coğrafik orijin ile ilgili olarak anlamlı bir ilişki göstermediği ancak suş bazlı filogenetik anlamlılık ortaya koyduğu görülmüştür.

Çalışmamızda *T. gondii* takizoitlerinden izole ettiğimiz gDNA PCR analizleri sonucu 1010 bp uzunluğunda ampikonlar elde edilmiştir. Burg ve ark. (102), 1988 yılında *T. gondii* SAG1 genini klonlamışlar ve ilgili genin 1.1 kb uzunluğunda olduğunu rapor etmişlerdir. Sonraki çalışmalarda (105,108,109), SAG1 cDNA sekans analizleri dizilim içerisinde iki ATG başlangıç kodonunun varlığı ortaya çıkarılmış ve bunlarında

sırasıyla 47 ve 30 amino asit olmak üzere sinyal sekansı oluşturduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda TrToxSAG1 olarak isimlendirilen izolatın plazmid vektörlere klonlanması ve akabinde elde edilen rekombinant plazmitin sekans analizleri sonucu açık okuma çerçevesi konfirme edilmiş ve intronların sekans dizisi içerisinde bulunmadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte 35-47. aa ve 320-335. aa arasının sinyal peptid karakterde olduğu tespit edilmiştir. Tüm bu sonuçlar yukarıdaki çalışmaların (105,108,109) sonuçları ile paralellik göstermiştir. Nitekim amino asit sekanslarının in-silico analizlerinde hedef gen bölgesinin 34,857 kDa büyüklüğünde bir proteini kodladığı ortaya çıkarılmıştır. Ancak Burg ve ark. (102), yaptıkları çalışmada amino asit sekans büyüklüğünün aynı olmasına karşın protein büyüklüğünü 30 kDa olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacıların bu sonucu çalışmanın yürütüldüğü zaman dilimi dikkate alındığında muhtemelen teknolojik yetersizlik ile ilişkili olarak doğru sonuçları yansıtmadığı düşünülmüştür. Nitekim sonraki çalışmalarda (105,109) karakterize edilen izolatların ORF sekansları da SAG1 protein büyüklüğünün benzer olduğunu göstermiştir. Yine translasyon sonucu TRtoxSag1 izolatının amino asit diziliminin in silico analizinde izoelektirik noktasının 7,70 olduğu, büyük bölümünün sitoplazmik, yalnızca 315 ve 335 aa arasının transmembran özellikte olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda ilgili proteinin antijenite açısından skoru yüksek uzunlukları 7 ile 44 arasında değişkenlik gösteren 16 antijenik bölge içerdiği belirlenmiştir. SAG1 data seti amino asit sekanslarının hizalama analizlerinde nükleotid sekanslarına benzer olarak identiklik oranı yüksek bulunmuş (%98,6), ve dokuzun üzerinde kodonda varyasyonlar görülmüştür. Bunun yanında TRtoxSag1 izolatına ait SAG 1 proteininin SWISS-MODEL yazılımı ile protein veri bankasındaki analiz sonuçları Major Surface Antigen P30 olarak nitelenen diğer *T. gondii* SAG1 proteinleri ile yapısal olarak %99,3-%100 benzer olduğunu ortaya çıkarmıştır. TRtoxSag1 izolatı üzerinde yürütülen tüm bu in-silico analiz sonuçları rekombinant SAG1 proteininin antijenik öneminin yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrıca pürifiye edilen TrToxSAG1 izolatına ait SAG1 rekombinant proteininin SDS-PAGE analizi sonucu 39 kDa büyüklüğünde olduğu belirlenmiştir. Nitekim füzyon protein olarak pet100 ekspresyon sisteminde elde edilen rekombinant proteinin 6xhis N terminal bağlantı bölgesi dikkate alındığında protein büyüklüğünün yaklaşık 35 kDa'dan 39 kDa çıktığı in-silico analizlerde de konfirme edilmiş olup elde edilen sonuç in-silico analiz sonuçlarını konfirme etmiştir.

TrToxSAG1 izolatına ait SAG1 rekombinant proteininin immun reaktif olduğu Western blot analizleriyle gösterilmiştir.

SAG antijenler familyasında SAG1 dışında diğer bazı önemli antijenik bölgeler de tanımlanmıştır. Bunlardan biri SAG2 olup *T. gondii*'ye karşı doğal ve kazanılmış bağışıklık mekanizmalarında serolojik olarak immunodominant bir protein olduğu gösterilmiştir (110). Diğer bir antijenik protein SAG3 olup yapısal olarak SAG1'e benzemektedir ve konak hücreye bağlanma ile ilişkilidir (111). Son yirmi yılda yapılan çalışmalarda SAG antijenleri dışında *T. gondii* enfeksiyonunun tanısında kullanılabilecek diğer bazı proteinler rekombinant olarak elde edilmiştir. Bunlar arasında GRA antijenleri (rGRA1, rGRA2, rGRA4, rGRA6, rGRA8), ropri proteinleri (rROP1, rROP2), matriks protein rMAC1 ve mikronem proteinleri (rMIC2, rMIC3, rMIC4, rMIC5) çalışılan antijenik varyantlar olmuştur. Ancak tüm bu çalışmalar sonucu SAG1 rekombinant protein tabanlı tanı testlerinin, spesifitesi ve sensitivitesinin diğer proteinlere göre daha yüksek olduğu kaydedilmiştir (112-120).

IgG antikorlarının saptanması temelinde serolojik testler insan ve hayvanlarda *T. gondii* enfeksiyonlarının teşhisinde yaygın olarak kullanılmakta ve güvenli sonuçlar ortaya çıkarmaktadır (121,122). Mevcut çok sayıdaki serolojik testler arasında enzyme-linked immuno- sorbent assay (ELISA) basit, hızlı ve ekonomik olması gibi avantajları ile klinik teşhis uygulamalarına daha uygun bir yöntem olarak ifade edilmektedir (123). MIC2, MIC3, M2AP, GRA3, GRA7 ve SAG1 gibi rekombinant antijenler tabanlı ELISA testleri *T. gondii* ile enfekte bireylerin teşhisinde efektif olarak kullanılmıştır (124). Bununla birlikte ELISA metodları ayrıca *T. gondii*'ye karşı farklı Ig antikorlarını (IgG, IgM ve IgA) saptamada da başarıyla kullanılmıştır (125). Çalışmamızda HisTrap kolonlar kullanılarak affinite kromatografide saflaştırılmış rekombinant SAG1 antijeni farklı konsantrasyonlarda ELISA pleytlerine kaplanmış ve ticari TOXO IgG ELISA kiti (DIA: PRO, İtalya) ile birlikte sonuçları değerlendirilmiştir. 2,5 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml antijenik konsantrasyonda elde edilen OD değerlerinin ROC analizi sonucunda cutoff değerleri sırasıyla 0,817, 0,893 ve 0,893 olarak belirlenmiş ve her cutoff değeri için anlamlılık düzeyi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0,01$ ). Her üç konsantrasyonun ROC eğri analiz sonuçları, 5 µg/ml ve 10 µg/ml antijenik konsantrasyonların 2,5 µg/ml'a göre daha duyarlı ve özgün sonuçlar verdiğini göstermiştir. Çalışmamızda geliştirilen SAG1 tabanlı ELISA'nın referans TOXO IgG

ELISA sonuçlarına göre duyarlılığı %84,2, özgünlüğe de %81,0 olarak belirlenmiştir. Ayrıca Kappa istatistik testi, SAG1 ELISA ve TOXO IgG ELISA kiti sonuçları arasında iyi bir korelasyonun ( $k= 0,65$ ) olduğunu göstermiştir. Diğer yandan İran’da akut ve kronik toxoplasmosis’li bireyler üzerinde yürütülen bir araştırmada (126) rekombinant SAG1 tabanlı ELISA’nın ticari bir kitle kıyaslanması sonucunda duyarlılığı %93, özgünlüğü ise %95 olarak bulunmuştur. Jalallou ve ark. (127) pET32a ekspresyon sisteminde elde ettikleri rekombinant SAG1 antijeninin insanlarda *T. gondii* IgG antikorlarını saptamada sensitivite ve spesifitesini sırasıyla %88,4 ve %88 olarak bildirmişlerdir. Benzer şekilde Velmurugan ve ark. (128) keçilerde toxoplasmosis’in tanısında pET-32(b) ekspresyon vektörlerinde elde ettikleri SAG1 rekombinant antijeninin sensitivite ve spesifitesini sırasıyla %83 ve %88,4 olarak kaydetmişlerdir. Buffolano ve ark. (129), kongenital enfekte bebeklerden alınan serum örneklerinin %75’inin SAG1 ile reaksiyon verdiğini rapor etmiştir. Pietkiewiez ve ark. (130) kronik toxoplasmosis’li hastalardan aldıkları serumlarda SAG1 antijeninin hastalığı saptamadaki duyarlılığının antikor titresindeki artış ile doğru orantılı olarak arttığını belirtmişlerdir. Buna karşın Nigro ve ark. (131) rSAG1 antijenine karşı düşük veya reaksiyon şekillenmediğini kaydetmişlerdir. Ancak araştırmacıların ilgili genin yalnızca bir fragmentini kullandıkları ve rekombinant proteinin doğru olarak katlanmasında pürifikasyon yönteminin uygun olmadığı görülmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sensitivite ve spesifite değerlerinin yukarıda bazı araştırmacıların bulguları ile paralel seyrettiği görülmüştür. Bunun yanında sensitivite ve spesifite oranlarındaki farklılıkların farklı ekspresyon vektörlerinin kullanılması ve pürifiye rekombinant antijenlerin kalitesi ve protein katlanmaları ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Diğer yandan toxoplasmosis tanısında SAG1 proteininin, GRA1 ve GRA7 gibi diğer rekombinant proteinlerle ELISA’da kombine kullanılması ile sensitivite ve spesifitenin daha yüksek olduğu kaydedilmiştir (132,133). *T. gondii*’nin son konak kedilerde güvenilir tanısı için insanlardaki kullanılan testlerin pratik ve güvenilir serolojik testlere de gereksinim duyulmaktadır. Yapılan bir araştırmada (134); SAG1, SAG2, GRA3 ve GRA6 rekombinant proteinleri üretilmiş, saflaştırılmış ve Western-Blot analizleri ile kedilerde toxoplasmosis tanısındaki etkinlikleri değerlendirilmiştir. İlgili çalışmada (134) rSAG1’in diğer antijenlere oranla en güçlü antijenik aktiviteye ve en yüksek spesifiteye sahip olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar (134), çevre koşullarında *T. gondii* ile enfekte



kedilerdeki antikorların saptanmasında rSAG1 tabanlı hızlı tanı testinin güvenilir olarak kullanılabilceğini bildirmişlerdir (134).

Son 10 yıl içerisinde toxoplasmosis'e karşı DNA aşlarının geliştirilmesi üzerine umut verici birçok gelişme kaydedilmiştir. Bir dizi *Toxoplasma*-spesifik genler (SAG, ROP, MIC, GRA, vb.) DNA aşı adayları olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır (135-140). Başta SAG1 olmak üzere *T. gondii*'nin özel yüzey proteinlerini kodlayan SAG ailesi genleri başarılı DNA aşı adayları olarak nitelenmiştir. Nitekim SAG1 geninin tek başına (141, 142) veya multi genler (143, 144) olarak enjeksiyon uygulanan farelerde üst düzey immun koruma sağlandığı tespit edilmiştir. Diğer yandan SAG2, SAG3 ve SAG5 proteinlerinin de ayrıca göze çarpan bir immunojeniteye sahip oldukları ve aşı geliştirilmesinde umut vaat ettikleri kaydedilmiştir (145,146,147). Ayrıca DNA aşı korumasının artırılmasında a-GalCer gibi uygun adjuvantların kullanılabilirliği belirtilmiştir. İlgili adjuvantların konağın hücresel immun yanıtını artırdığı ve çelinc enfeksiyonlar sonrası farelerin hayatta kalma süresini artırdığı tespit edilmiştir (148). Çalışmamızda TrToxSag1 izolatından amplifiye ettiğimiz SAG1 geni pcDNA™3.1/V5-His TOPO® ekspresyon vektörüne başarılı bir şekilde klonlanmıştır. Elde edilen rpcDNA 3.1+SAG 1 plazmiti rekombinant DNA aşı denemeleri üzerine sonraki araştırmalar için muhafaza altına alınmıştır.

Sonuç olarak; bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez *T. gondii*'nin antijenik değeri yüksek olan aşı adayları yüzey antijeni genlerinden SAG1'in moleküler karakterizasyonu yapılmış ve rekombinant protein elde edilerek immun reaktivitesi gösterilmiştir. Ayrıca çalışma ile rSAG1 tabanlı ELISA'nın toxoplasmosis'in serolojik teşhisteki etkinliği ortaya konulmuştur. Elde edilen sonuçlar yöresel izolatlardan elde edilecek SAG1 ve diğer antijenlerin etkin ekspresyon sitemlerinde izole edilerek kombine halinde kullanılması ile ülkemizde insan ve hayvanlarda toxoplasmosis'in yüksek duyarlılık ve özgünlükte teşhisinin sağlanabileceğini ve yerli ve milli tanı kitlerinin geliştirilebileceğini göstermiştir. Diğer yandan çalışma ile elde edilen rekombinant SAG1 antijeni ve rekombinant SAG1 plazmit DNA'sı ileriki proje çalışmalarında aşı adayları olarak tek başına veya diğer moleküllerle kombine edilerek prime-boost yaklaşım çerçevesinde kullanılacak hale getirilmiştir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Wang YH, Yin H. Research advances in microneme protein 3 of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Vector*. 2015 Jul 22;8.
2. Robert-Gangneux F, Darde ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical microbiology reviews*. 2012 Apr;25(2):264-96.
3. Ryan KJ RC. *Sherris Medical Microbiology*. New York: McGraw Hill Medical Publishing Division; 2004.
4. Özcel MA. *Tıbbi Parazit Hastalıkları*. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları No:22; 2007.
5. Carruthers V, Boothroyd JC. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Current opinion in microbiology*. 2007 Feb;10(1):83-9.
6. Nicolle C, Manceaux LH. On a leishman body infection (or related organisms) of the gondi. 1908. *International journal for parasitology*. 2009 Jul 1;39(8):863-4.
7. KB. D. Gebelerde *Toxoplasma gondii* Ve CMV Seropozitiflik, Serokonversiyon Ve Fetuse Geçiş Oranının Değerlendirilmesi. Malatya: İnönü; 2006.
8. 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 Aug;2(4):426-32.
9. Yazar S, Kuk S, Miman Ö, Saygı G. Saygı'nın Temel Tıbbi Parazitoloji'si, Ocak 2016, 1. Baskı. Erciyes Üniversitesi Yayınları, Kayseri, Türkiye.
10. Garcia L S. *Diagnostic medical Parasitology*, pp: 130-41. 2007, Vol:5. ASM Pres, Washington.

11. Ferguson DJ. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *International journal for parasitology*. 2004 Mar 9;34(3):347-60.
12. Mai K, Sharman PA, Walker RA, Katrib M, De Souza D, McConville MJ, et al. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009 Mar;104(2):281-9.
13. DO H-Y. *Human Toxoplasmosis*: Oxford Medical Publishing; 1992.
14. Afonso E, Thulliez P, Gilot-Fromont E. Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (*Felis catus*). *International journal for parasitology*. 2006 Nov;36(13):1373-82.
15. Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology*. 1998 Jul;28(7):1019-24.
16. Ferguson DJ. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? *Trends in parasitology*. 2002 Aug;18(8):355-9.
17. Dubey JP, Frenkel JK. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *The Journal of protozoology*. 1972 Feb;19(1):155-77.
18. Jones JL, Dubey JP. Waterborne toxoplasmosis--recent developments. *Experimental parasitology*. 2010 Jan;124(1):10-25.
19. Duncanson P, Terry RS, Smith JE, Hide G. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. *International journal for parasitology*. 2001 Dec;31(14):1699-703.
20. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004 Jun 12;363(9425):1965-76.
21. Derouin F, Devergie A, Auber P, Gluckman E, Beauvais B, Garin YJ, et al. Toxoplasmosis in bone marrow-transplant recipients: report of seven cases and review. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1992 Aug;15(2):267-70.
22. Desmonts G, Couvreur J. Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. *The New England journal of medicine*. 1974 May 16;290(20):1110-6.
23. Leport C, Remington JS. [Toxoplasmosis in AIDS]. *Presse medicale*. 1992 Jul 4-11;21(25):1165-71.

24. Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1992 Aug;15(2):211-22.
25. Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Orefice F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerging infectious diseases*. 2003 Jan;9(1):55-62.
26. El Hajj H, Lebrun M, Arold ST, Vial H, Labesse G, Dubremetz JF. ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens*. 2007 Feb;3(2):e14.
27. Laliberte J, Carruthers VB. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2008 Jun;65(12):1900-15.
28. Mercier C, Adjogble KD, Daubener W, Delauw MF. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *International journal for parasitology*. 2005 Jul;35(8):829-49.
29. Sibley LD. How apicomplexan parasites move in and out of cells. *Current opinion in biotechnology*. 2010 Oct;21(5):592-8.
30. Rabaud C, May T, Lucet JC, Leport C, Ambroise-Thomas P, Canton P. Pulmonary toxoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus: a French National Survey. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1996 Dec;23(6):1249-54.
31. Correa D, Canedo-Solares I, Ortiz-Alegria LB, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite immunology*. 2007 Dec;29(12):651-60.
32. Roberts F, Mets MB, Ferguson DJ, O'Grady R, O'Grady C, Thulliez P, et al. Histopathological features of ocular toxoplasmosis in the fetus and infant. *Archives of ophthalmology*. 2001 Jan;119(1):51-8.
33. Delair E, Latkany P, Noble AG, Rabiah P, McLeod R, Brezin A. Clinical manifestations of ocular toxoplasmosis. *Ocular immunology and inflammation*. 2011 Apr;19(2):91-102.

34. Chapey E, Wallon M, Debize G, Rabilloud M, Peyron F. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by using a whole-blood gamma interferon release assay. *Journal of clinical microbiology*. 2010 Jan;48(1):41-5.
35. Kang YA, Lee HW, Hwang SS, Um SW, Han SK, Shim YS, et al. Usefulness of whole-blood interferon-gamma assay and interferon-gamma enzyme-linked immunospot assay in the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *Chest*. 2007 Sep;132(3):959-65.
36. Grossman PL, Remington JS. The effect of trimethoprim and sulfamethoxazole on *Toxoplasma gondii* in vitro and in vivo. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1979 May;28(3):445-55.
37. Baril L, Ancelle T, Goulet V, Thulliez P, Tirard-Fleury V, Carme B. Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a case-control study in France. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 1999;31(3):305-9.
38. Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, et al. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. Bmj*. 2000 Jul 15;321(7254):142-7.
39. Jones JL, Dargelas V, Roberts J, Press C, Remington JS, Montoya JG. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009 Sep 15;49(6):878-84.
40. Dubey JP. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. *American journal of veterinary research*. 1988 Jun;49(6):910-3.
41. Verma R, Khanna P. Development of *Toxoplasma gondii* vaccine: A global challenge. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2013 Feb;9(2):291-3.
42. Jongert E, Roberts CW, Gargano N, Forster-Waldl E, Petersen E. Vaccines against *Toxoplasma gondii*: challenges and opportunities. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009 Mar;104(2):252-66.

43. Beauvillain C, Juste MO, Dion S, Pierre J, Dimier-Poisson I. Exosomes are an effective vaccine against congenital toxoplasmosis in mice. *Vaccine*. 2009 Mar 10;27(11):1750-7.
44. Elsaid MM, Vitor RW, Frezard FJ, Martins MS. Protection against toxoplasmosis in mice immunized with different antigens of *Toxoplasma gondii* incorporated into liposomes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999 Jul-Aug;94(4):485-90.
45. Innes EA, Bartley PM, Maley S, Katzer F, Buxton D. Veterinary vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009 Mar;104(2):246-51.
46. Bulow R, Boothroyd JC. Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. *Journal of immunology*. 1991 Nov 15;147(10):3496-500.
47. Khan IA, Ely KH, Kasper LH. A purified parasite antigen (p30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Journal of immunology*. 1991 Nov 15;147(10):3501-6.
48. Lourenco EV, Bernardes ES, Silva NM, Mineo JR, Panunto-Castelo A, Roque-Barreira MC. Immunization with MIC1 and MIC4 induces protective immunity against *Toxoplasma gondii*. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2006 Apr;8(5):1244-51.
49. Velge-Roussel F, Marcelo P, Lepage AC, Buzoni-Gatel D, Bout DT. Intranasal immunization with *Toxoplasma gondii* SAG1 induces protective cells into both NALT and GALT compartments. *Infection and immunity*. 2000 Feb;68(2):969-72.
50. Vercammen M, Scorza T, Huygen K, De Braekeleer J, Diet R, Jacobs D, et al. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. *Infection and immunity*. 2000 Jan;68(1):38-45.
51. Leroux-Roels G. Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. *Vaccine*. 2010 Aug 31;28 Suppl 3:C25-36.
52. Allison AC, Byars NE. Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects. *Molecular immunology*. 1991 Mar;28(3):279-84.

53. Morefield GL, Sokolovska A, Jiang D, HogenEsch H, Robinson JP, Hem SL. Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro. *Vaccine*. 2005 Feb 18;23(13):1588-95.
54. Lambrecht BN, Kool M, Willart MA, Hammad H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Current opinion in immunology*. 2009 Feb;21(1):23-9.
55. Aucouturier J, Dupuis L, Deville S, Ascarateil S, Ganne V. Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. *Expert review of vaccines*. 2002 Jun;1(1):111-8.
56. Barve M, Bender J, Senzer N, Cunningham C, Greco FA, McCune D, et al. Induction of immune responses and clinical efficacy in a phase II trial of IDM-2101, a 10-epitope cytotoxic T-lymphocyte vaccine, in metastatic non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008 Sep 20;26(27):4418-25.
57. Feyerabend S, Stevanovic S, Gouttefangeas C, Wernet D, Hennenlotter J, Bedke J, et al. Novel multi-peptide vaccination in Hla-A2+ hormone sensitive patients with biochemical relapse of prostate cancer. *The Prostate*. 2009 Jun 15;69(9):917-27.
58. Pedroza A, Huerta JG, Garcia Mde L, Rojas A, Lopez-Martinez I, Penagos M, et al. The safety and immunogenicity of influenza vaccine in children with asthma in Mexico. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2009 Jul;13(4):469-75.
59. Aguilar JC, Rodriguez EG. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*. 2007 May 10;25(19):3752-62.
60. Moser C, Amacker M, Kammer AR, Rasi S, Westerfeld N, Zurbriggen R. Influenza virosomes as a combined vaccine carrier and adjuvant system for prophylactic and therapeutic immunizations. *Expert review of vaccines*. 2007 Oct;6(5):711-21.
61. Al-Attayah R, Mustafa AS, Abal AT, El-Shamy AS, Dalemans W, Skeiky YA. In vitro cellular immune responses to complex and newly defined recombinant antigens of Mycobacterium tuberculosis. *Clinical and experimental immunology*. 2004 Oct;138(1):139-44.

62. Brandt L, Skeiky YA, Alderson MR, Lobet Y, Dalemans W, Turner OC, et al. The protective effect of the Mycobacterium bovis BCG vaccine is increased by coadministration with the Mycobacterium tuberculosis 72-kilodalton fusion polyprotein Mtb72F in M. tuberculosis-infected guinea pigs. *Infection and immunity*. 2004 Nov;72(11):6622-32.
63. Harandi AM, Medaglini D, Shattock RJ, Working Group convened by E. Vaccine adjuvants: a priority for vaccine research. *Vaccine*. 2010 Mar 11;28(12):2363-6.
64. Higgins D, Marshall JD, Traquina P, Van Nest G, Livingston BD. Immunostimulatory DNA as a vaccine adjuvant. *Expert review of vaccines*. 2007 Oct;6(5):747-59.
65. Moser M, Leo O. Key concepts in immunology. *Vaccine*. 2010 Aug 31;28 Suppl 3:C2-13.
66. Zuber AK, Brave A, Engstrom G, Zuber B, Ljungberg K, Fredriksson M, et al. Topical delivery of imiquimod to a mouse model as a novel adjuvant for human immunodeficiency virus (HIV) DNA. *Vaccine*. 2004 Apr 16;22(13-14):1791-8.
67. Garcon N, Heppner DG, Cohen J. Development of RTS,S/AS02: a purified subunit-based malaria vaccine candidate formulated with a novel adjuvant. *Expert review of vaccines*. 2003 Apr;2(2):231-8.
68. Newman MJ, Wu JY, Gardner BH, Anderson CA, Kensil CR, Recchia J, et al. Induction of cross-reactive cytotoxic T-lymphocyte responses specific for HIV-1 gp120 using saponin adjuvant (QS-21) supplemented subunit vaccine formulations. *Vaccine*. 1997 Jun;15(9):1001-7.
69. Duedwell P, Kisser U, Heckelsmiller K, Hoves S, Stoitzner P, Koernig S, et al. ISCOMATRIX adjuvant combines immune activation with antigen delivery to dendritic cells in vivo leading to effective cross-priming of CD8+ T cells. *Journal of immunology*. 2011 Jul 1;187(1):55-63.
70. Garcon N, Vaughn DW, Didierlaurent AM. Development and evaluation of AS03, an Adjuvant System containing alpha-tocopherol and squalene in an oil-in-water emulsion. *Expert review of vaccines*. 2012 Mar;11(3):349-66.
71. Lekutis C, Ferguson DJ, Grigg ME, Camps M, Boothroyd JC. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int J Parasitol*. 2001; 31:1285-92.



72. Liu S, Shi L, Cheng YB, et al. Evaluation of protective effect of multi-epitope DNA vaccine encoding six antigen segments of *Toxoplasma gondii* in mice. *Parasitol Res.* 2009; 105:267–74.
73. Wu XN, Lin J, Lin X, et al. Multicomponent DNA vaccine-encoding *Toxoplasma gondii* GRA1 and SAG1 primes: anti-Toxoplasma immune response in mice. *Parasitol Res.* 2012; 111:2001-9.
74. Li B, Oledzka G, McFarlane RG, et al. Immunological response of sheep to injections of plasmids encoding *Toxoplasma gondii* SAG1 and ROP1 genes. *Parasite Immunol.* 2010; 32:671–83.
75. Liu S, Shi L, Cheng YB, et al. Evaluation of protective effect of multi-epitope DNA vaccine encoding six antigen segments of *Toxoplasma gondii* in mice. *Parasitol Res.* 2009; 105:267–74.
76. Wang H, He S, Yao Y et al. *Toxoplasma gondii*: protective effect of an intranasal SAG1 and MIC4 DNA vaccine in mice. *Exp Parasitol.* 2009; 122:226–32.
77. Nagel SD, Boothroyd JC. The major surface antigen, P30, of *Toxoplasma gondii* is anchored by a glycolipid. *J Biol Chem.* 1989; 264:5569-74.
78. Burg JL, Perelman D, Kasper LH, Ware PL, Boothroyd JC. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1988; 141:3584-91.
79. Odberg-Ferragut C, Soete M, Engels A, et al. Molecular cloning of the *Toxoplasma gondii* SAG4 gene encoding an 18kDa bradyzoite specific surface protein. *Mol Biochem Parasitol.* 1996; 82:237-44.
80. Ajioka JW, Boothroyd JC, Brunk BP, et al. Gene discovery by EST sequencing in *Toxoplasma gondii* reveals sequencing restricted to the Apicomplexa. *Genome Res.* 1998; 8:18-28.
81. Kasper LH, Ware PL. Recognition and characterization of stage-specific oocyst/sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by human antisera. *J Clin Invest.* 1985; 75:1570-7.
82. Kasper LH. Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* 1989; 57:668-72.

83. Lunde MN, Jacobs L. Antigenic differences between endozoites of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol. 1983; 69:806-8.
84. Tomavo S, Fortier B, Soete M, et al. Characterization of bradyzoit-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. Infect Immun. 1991; 59:3750-3.
85. Lekutis C, Ferguson DJP, Boothroyd JC. *T.gondii* identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. Exp Parasitol. 2000; 96:89-96.
86. Kotresha D, Noordin R. Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. APMIS. 2010; 118:529-42.
87. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. J Infect Dis. 1995; 172:1561-6.
88. Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. Parikh R, Mathai A, Parikh S, Chandra Sekhar G, Thomas R Indian J Ophthalmol. 2008 Jan-Feb; 56(1):45-50
89. Hide G. Role of vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in prevalence of infection. Expert Rev Anti Infect Ther 2016;14:335-344
90. Smith JE. A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol 1995;25:1301-1309.
91. Lekutis C, Ferguson DJ, Grigg ME, Camps M, Boothroyd JC. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. Int J Parasitol 2001;31:1285-1292.
92. Wang Y, Yin H. Research progress on surface antigen 1 (SAG1) of *Toxoplasma gondii*. Parasit Vectors 2014;7:180.
93. Velge-Roussel F, Chardès T, Mévélec P, Brillard M, Hoebeke J, Bout D: Epitopic analysis of the *Toxoplasma gondii* major surface antigen SAG1. Mol Biochem Parasit 1994, 66:31–38.
94. Debard N, Buzoni-Gatel D, Bout D: Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection. Infect Immun 1996, 64:2158–2166.
95. Bulow R, Boothroyd JC: Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with P30 antigen in liposomes. J Immunol 1991, 147:3496–3500.

96. Petersen E, Nielsen HV, Christiansen L, Spenter J: Immunization with E. coli-produced recombinant T. gondii SAG1 with alum as adjuvant protect mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. *Vaccine* 1998,16:1283–1289.
97. Biemans R, Gregoire D, Haumont M, Bosseloir A, Garcia L, Jacquet A, Dubeaux C, Bollen A: The conformation of purified *Toxoplasma gondii* SAG1 antigen, secreted from engineered *Pichia pastoris*, is adequate for serorecognition and cell proliferation. *J Biotechnol* 1998, 66:137–146.
98. Darcy F, Maes P, Gras-Masse H, Auriault C, Bossus M, Deslee D, Godard I, Cesbron MF, Tartar A, Capron A: Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction derived from *Toxoplasma gondii* P30 antigen. *J Immunol* 1992, 149:3636–3641.
99. Godard I, Estaquier J, Zenner L, Bossus M, Auriault C, Darcy F, Gras-Masse H, Capron A: Antigenicity and immunogenicity of P30-derived peptides in experimental models of toxoplasmosis. *Mol Immunol* 1994, 31:1353–1363.
100. Velge-Roussel F, Dimier-Poisson I, Buzoni-Gatel D, Bout D: Anti-SAG1 peptide antibodies inhibit the penetration of *Toxoplasma gondii* tachyzoites into enterocyte cell lines. *Parasitol* 2001, 123:571–578.
101. Khan IA, Ely KH, Kasper LH: A purified parasite antigen (P30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J Immunol* 1991, 147:3501–3506
102. Burg JL, Perelman D, Kasper LH, Ware PL, Boothroyd JC: Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *Immunol* 1988, 141:3584–3591.
103. Nam HW, Im KS, Baek EJ, Choi WY, Cho SY: Analysis of antigenic domain of GST fused major surface protein (p30) fragments of *Toxoplasma gondii*. *Korean J Parasitol* 1996, 34:135–141.
104. Johnson Alan M, McDonald PJ, Neoh SH: Molecular weight analysis of soluble antigens from *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 1983, 69:459–464
105. Wang, Yanhua, and Hong Yin. "Research progress on surface antigen 1 (SAG1) of *Toxoplasma gondii*." *Parasites & vectors* 7.1 (2014): 180.
106. Hartati, Sri, et al. "Primary structure of mature SAG1 gene of an Indonesian *Toxoplasma gondii* and comparison with other strains." *Journal of veterinary science* 7.3 (2006): 263-270.

107. Khan, Asis, et al. "Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America." *International journal for parasitology* 41.6 (2011): 645-655.
108. Soldati D, Boothroyd JC: A selector of transcription initiation in the protozoan the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Cell Biol* 1995,15:87–93.
109. Windeck T, Gross U: *Toxoplasma gondii* strain specific transcript level of SAG1 and their association with virulence. *Parasitol Res* 1996, 82:715–719.
110. Macedo AG, Cunha JP, Cardoso TH, Silva MV, Santiago FM, Silva JS, et al. SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* interacts with both innate and adaptive immune compartments of infected hosts. *Parasit Vectors* 2013;6:163.
111. Jacquet A, Coulon L, De Neve J, Daminet V, Haumont M, Garcia L, et al. The surface antigen SAG3 mediates the attachment of *Toxoplasma gondii* to cell-surface proteoglycans. *Mol Biochem Parasitol* 2001;116:35- 44.
112. Holec L, Hiszczyn'ska-Sawicha E, Gasior A, Brillowska-Dabrowska A, Kur J. Use of MAG1 recombinant antigen for diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in humans. *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14:220-5.
113. Jacobs D, Vercammen M, Saman E. Evaluation of recombinant dense granule antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6:24-9.
114. Li S, Maine G, Suzuki Y, et al. Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection with recombinant antigen. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:179-84.
115. Martin V, Arcavi M, Amendoeria MRR, et al. Detection of human anti-*Toxoplasma* specific immunoglobulins A, M and G by a recombinant *Toxoplasma gondii* Rop2 protein. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998; 5:627-31.
116. Redlich A, Muller WA. Serodiagnosis of acute toxoplasmosis using a recombinant from of the dense granule antigen GRA6 in an enzymelinked immunosorbent assay. *Parasitol Res.* 1988; 84:700-6.
117. Suzuki Y, Ramirez R, Press C, et al. Detection of immunoglobulin M antibodies to P35 antigen of *Toxoplasma gondii* for serodiagnosis of recently acquired infection pregnant women. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:3967-70.

118. Van Gelder F, Bosman F, De Meuter F, et al. Serodiagnosis of toxoplasmosis by using a recombinant from of the 54 kDa rhostry antigen expressed in *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 1993; 31:9-15.
119. Buffolano W, Beghetto E, Del Pezzo M, et al. Use of recombinant antigens for early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 2005; 43:5916-24.
120. Jalallou N, Bandehpour M, Khazan H, Haghghi, Kazemi B. Evaluation of Recombinant SAG1 Protein for Detection of *Toxoplasma gondii* Spesific Immunoglobulin M by ELISA Test. *Iran J Parasitol*. 2012; 7:17-21
121. Kotresha, D. And R. Noordin. 2010. Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 118: 529–542.
122. Holec-Gasior, L. 2013. *Toxoplasma gondii* recombinant antigens as tools for serodiagnosis of human toxoplasmosis: Current status of studies. *Clinical and Vaccine Immunology* 20: 1343– 1351.
123. Zhuo, Xunhui, et al. "Development and Application of an Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Mag1 for Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* In Dogs." *Journal of Parasitology* 103.3 (2017): 237-242.
124. Beghetto, E, A. Spadoni, L. Bruno, W. Buffolano, And N. Gargano. 2006. Chimeric antigens of *Toxoplasma gondii*: Toward standardization of toxoplasmosis serodiagnosis using recombinant products. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 2133–2140.
125. Montoya, J. G. 2002. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *Journal of Infectious Diseases* 185(Suppl. 1): S73–S82.
126. Selseleh MM, Keshavarz H, Moheballi M, et al. Production and Evaluation of *Toxoplasma gondii* Recombinant Surface Antigen 1 (SAG1) for Serodiagnosis of Acute and Chronic *Toxoplasma* Infection in Human Sera. *Iran J Parasitol*. 2012; 7:1-9.
127. Jalallou N, Bandepour M, Khazan H. Recombinant SAG1 Antigen to detect *Toxoplasma gondii* Specific Immunoglobulin G in human Sera by ELISA Test. *Iranian J Parasitol*. 2010; 5(2):1-9.

128. Velmurugan G, Anup KT, Jammi R. High expression of SAG1 gene of *Toxoplasma gondii* (Izantnagar isolate) and their application in serodiagnosis of goat toxoplasmosis. *Vet Parasitol.* 2008; 154: 185-192.
129. Buffolano W, Beghetto D, Pezzo M, Spadoni A. Use of recombinant antigens for early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:591624.
130. Pietkiewicz H, Hiszczyńska SE, Kur J, Petersen E, Nielsen H. Usefulness of *Toxoplasma gondii* recombinant antigens in serodiagnosis of human toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:2504-2508.
131. Nigro M, Gutierrez A, Hoffer AM, Clemente M, Kaufer F, Carral L. Evaluation of *Toxoplasma gondii* recombinant proteins for the diagnosis of recently acquired toxoplasmosis by an immunoglobulin G analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003; 47:609-613.
132. Kotresha D, Noordin R. Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. *APMIS.* 2010; 118:529-42.
133. Lekutis C, Ferguson DJP, Boothroyd JC. *T.gondii* identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. *Exp Parasitol.* 2000; 96:89-96.
134. Zhang J, He S, Jiang H, et al. Evaluation of the immune response induced by multi-antigenic DNA vaccine encoding SAG1 and ROP2 of *Toxoplasma gondii* and the adjuvant properties of murine interleukin-12 plasmid in BALB/c mice. *Parasitol Res.* 2007; 101:331-8.
135. Yuan ZG, Zhang XX, Lin RQ, Petersen E, He S, Yu M, He XH, Zhou DH, He Y, Li HX, Liao M, Zhu, XQ: Protective effect against toxoplasmosis in mice induced by DNA immunization with gene encoding *Toxoplasma gondii* ROP18. *Vaccine* 2011, 29(38):6614–6619.
136. Min J, Qu D, Li C, Song X, Zhao Q, Li XA, Yang Y, Liu Q, He S, Zhou H: Enhancement of protective immune responses induced by *Toxoplasma gondii* dense granule antigen 7 (GRA7) against toxoplasmosis in mice using a prime-boost vaccination strategy. *Vaccine* 2012, 30(38):5631–5636.
137. Vercammen M, Scorza T, Huygen K, De Braekeleer J, Diet R, Jacobs D: DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and

- ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. *Infect Immun* 2000, 68(1):38–45.
138. Cui X, Lei T, Yang D, Hao P, Li B, Liu Q: *Toxoplasma gondii* immune mapped protein-1 (TgIMP1) is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis. *Vaccine* 2012, 30(13):2282–2287.
139. Hiszczyńska-Sawicka E, Olećdzka G, Holec-Gąsior L, Li H, Xu JB, Sedcole R, Kur J, Bickerstaffe R, Stankiewicz M: Evaluation of immune responses in sheep induced by DNA immunization with genes encoding GRA1, GRA4, GRA6 and GRA7 antigens of *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasit* 2011, 177:281–289.
140. Sun XM, Zou J, A A ES, Yan WC, Liu XY, Suo X, Wang H, Chen QJ: DNA vaccination with a gene encoding *Toxoplasma gondii* GRA6 induces partial protection against toxoplasmosis in BALB/c mice. *Parasit Vectors* 2011, 4:213.
141. Liu Q, Shang L, Jin H, Wei F, Zhu XQ, Gao H: The protective effect of a *Toxoplasma gondii* SAG1 plasmid DNA vaccine in mice is enhanced with IL-18. *Res Vet Sci* 2010, 89(1):93–97.
142. Wang Y, Wang G, Zhang D, Yin H, Wang M: Screening and identification of novel B cell epitopes of *Toxoplasma gondii* SAG1. *Parasit Vectors* 2013,6:125.
143. Dautu G, Munyaka B, Carmen G, Zhang G, Omata Y, Xuenan X, Igarashi M: *Toxoplasma gondii*: DNA vaccination with genes encoding antigens MIC2, M2AP, AMA1 and BAG1 and evaluation of their immunogenic potential. *Exp Parasitol* 2007, 116(3):273–282.
144. Meng M, He S, Zhao G, Bai Y, Zhou H, Cong H, Lu G, Zhao Q, Zhu XQ: Evaluation of protective immune responses induced by DNA vaccines encoding *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (SAG1) and 14-3-3 protein in BALB/c mice. *Parasit Vectors* 2012, 5:273.
145. Machado AV, Caetano BC, Barbosa RP, Salgado AP, Rabelo RH, Garcia CC, Bruna-Romero O, Escriou N, Gazzinelli RT: Prime and boost immunization with influenza and adenovirus encoding the *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 (SAG2) induces strong protective immunity. *Vaccine* 2010, 28(18):3247–3256.
146. Cong H, Zhang M, Xin Q, Wang Z, Li Y, Zhao Q, Zhou H, He S: Compound DNA vaccine encoding SAG1/ SAG3 with A2/B subunit of cholera toxin as a genetic adjuvant protects BALB/c mice against *Toxoplasma gondii*. *Parasit Vectors* 2013, 6:63.

147. Tinti M, Possenti A, Cherchi S, Barca S, Spano F: Analysis of the SAG5 locus reveals a distinct genomic organisation in virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 2003, 33(14):1605–1616.
148. Lu, Gang, et al. "Alpha-galactosylceramide enhances protective immunity induced by DNA vaccine of the SAG5D gene of *Toxoplasma gondii*." *BMC infectious diseases* 14.1 (2014): 3862.





## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Abdüssamed AKŞİT  
Uyruğu : Türkiye (T.C.)  
Doğum Tarihi ve Yeri : 13.04.1992,Kayseri  
Medeni Hali : Evli  
Email : abdussamedaksit@yahoo.com.tr  
Yazışma Adresi : Kılıçaslan Mah Molla Sok 33/4 Melikgazi / KAYSERİ

### EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2014
Lisans	Anadolu Üniversitesi İktisat Fakültesi Kamu Yönetimi	2015
Lise	Melikgazi Mustafa Eminoğlu Anadolu Lisesi	2009

### YABANCI DİL

İngilizce

### KATILDIĞI KURSLAR SINAVLAR

Erciyes Üniversitesi DEKAM Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası  
Microsoft Office Program Kullanım Sertifikası

## TOXOPLASMA GONDII AŞI ADAYI SAG 1 GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU, PROTEİN EKSPRESYONU VE ANTİJENİK YAPISI

### ORJİNALLIK RAPORU

<b>%7</b>	<b>%6</b>	<b>%2</b>	<b>%</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<b>www.turkiyeparazitolderg.org</b> İnternet Kaynağı	<b>%3</b>
<b>2</b>	<b>turkiyeparazitolderg.org</b> İnternet Kaynağı	<b>%1</b>
<b>3</b>	<b>vetkontrol.tarim.gov.tr</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>4</b>	<b>KORKMAZ, Seval, YILDIRIM, Alparslan, DÜZLÜ, Önder, ÇİLOĞLU, Arif, ÖNDER, Zuhale and İNCİ, Abdullah. "Kayseri Yöresinden Toplanmış Culex pipiens Komplekse ait Sivrisinek (Diptera: Culicidae) Örneklerinin Kan Beslenme İdentifikasyonu", Türkiye Parazitoloji Derneği, 2016.</b> Yayın	<b>&lt;%1</b>
<b>5</b>	<b>waikato.researchgateway.ac.nz</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>6</b>	<b>biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com</b>	