

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***TOXOPLASMA GONDII* GRA1 PROTEİNİNİN TANIMLANMASI:
AŞI ÇALIŞMALARINDAKİ YERİ**

Doktora Tezi

Doktor
Mert DÖŞKAYA

DANIŞMAN
Prof. Dr. Yüksel GÜRÜZ

İZMİR
2006

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

	Adı Soyadı	İmza
Başkan (Danışman)	: Prof. Dr. Yüksel Gürüz
Üye	: Prof. Dr. Ziya Alkan
Üye	: Prof. Dr. Mucide Ak
Üye	: Prof. Dr. Ahmet Özbilgin
Üye	: Doç. Dr. Çiler Akısü

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih:

ÖNSÖZ

Doktora tezim hakkındaki araştırmalar *Toxoplasma gondii* GRA1 protein tanımlanması ve GRA1'in aşı çalışmalarındaki yeri üzerine yoğunlaşmıştır. Tez danışmanım Prof. Dr. Yüksel Gürüz ve anabilim dalımızın diğer öğretim üyeleri ile yaptığımız ön araştırmalar sonucunda tez konum ile ilgili araştırmalarımı gerçekleştirmek için Amerika Birleşik Devletleri California Üniversitesi, Irvine Tıp Fakültesi'nde öğretim üyesi olan Prof. Dr. Frances Jurnak ile görüşmelere başladık ve davet üzerine çalışmalarımı yapmak için 2 yıl süreyle A.B.D.'ye gittim. Projemize ayrıca TÜBİTAK Bilim Adamı Yetiştirme Grubu Yurtdışı Araştırma Bursu (NATO-A2) ile destek verdi.

Bu araştırmanın bilimsel olarak planlanmasında, gerçekleştirilmesinde ve aynı zamanda bilim adamı olarak yetişmemde büyük katkıları olan, başta tez danışmanım Prof. Dr. Yüksel Gürüz'e, Prof. Dr. Frances Jurnak, ve Dr. Philip Felgner'e, anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Ziya Alkan'a ve tüm değerli öğretim üyelerine, bilime olan ilgimin uyanmasına yardım eden Doç. Dr. Metin Korkmaz'a çok teşekkür ederim. Parazitoloji ailesine katılmamda büyük desteğini gördüğüm değerli büyüğüm, Prof. Dr. Aydın Kuman'ı rahmetle anıyorum.

Doktora eğitimim sırasında hoşgörüsünü eksik etmeyen T.C. Sağlık Bakanlığına, özellikle araştırmalarıma destek veren Dr. Cihanser Erel'e ve Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Başkan ve çalışanlarına da teşekkürü bir borç bilirim. Son olarak, çalışmalarım sırasında bilimsel tartışmalarla beni teşvik eden çalışma arkadaşlarıma ve moral desteklerini eksik etmeyen aileme şükranlarımı sunarım.

İzmir, 7.3.2006

Dr. Mert Döşkaya

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
GRAFİKLER DİZİNİ	xi

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ	1
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> Genel Bilgi	8
1.1.1. Tarihçe ve Sınıflandırma.....	8
1.1.2. Morfoloji	9
1.1.2.1. Moleküler Yapı	11
1.1.3. Epidemiyoloji.....	16
1.1.4. Patogenez	20
1.1.5. Patoloji	23
1.1.6. İmmunite	25
1.1.7. Klinik	28
1.1.8. Tanı	33
1.1.8.1. İndirekt tanı	33
1.1.8.2. Direkt tanı.....	35
1.1.9. Tedavi.....	38
1.1.10. Korunma.....	42
1.1.10.1. Aşı Çalışmaları.....	43

İKİNCİ BÖLÜM

GEREÇ ve YÖNTEM.....	51
2.1. GRA1 Protein Tanımlanması	52
2.1.1. Biyoinformatik Değerlendirme	53
2.1.2. GRA1 Protein Ekspresyonu ve FPLC Cihazı ile Saflaştırma	54
2.1.3. MALDI-TOF Kütle Spektrometrisi	56
2.1.4. Alkalin Fosfataz ile Defosforilasyon Çalışması	56
2.1.5. EGTA-rekombinant GRA1 Proteinini Etkileşiminin Araştırılması.....	56
2.1.6. Protein Sindirme Testi	57
2.1.7. Makromoleküler Kristalizasyon.....	57
2.2. GRA1 Aşı Çalışması	59
2.2.1. Araştırma Sırasında Kullanılan Hayvanlar	59
2.2.2. <i>T. gondii</i> Parazit Üretimi ve Antijen Hazırlama	60
2.2.3. GRA1 Geninin Bilgisayar Aracılığı ile Optimize Edilmiş DNA Birleşmesi.....	61
2.2.3.1. Kodon Optimize GRA1 Geninin Orta Büyükükte Oligonükleotid Parçaların PZR ile Birleştirilmesi	62
2.2.3.2. TOPO PZR Klonlama	64
2.2.3.3. Tam Uzunlukta Kodon Optimize GRA1 Geninin PZR ile Oluşturulması	65

2.2.4. Memeli Ekspresyon Vektörünün Klonlama için	
Hazırlanması	66
2.2.5. Vt-GRA1 ve Ko-GRA1 PZR Amplifikasyonu ile	
İzolasyonu	67
2.2.6. <i>In vivo</i> Rekombinasyon Klonlaması	68
2.2.7. İnsan Embryojenik Böbrek Hücrelerinde <i>in vitro</i>	
Transfeksiyon	69
2.2.8. İmmunfloresan Mikroskopi Yöntemi.....	70
2.2.9. Doğal Jel Elektroforezi, Sodyum Dodesil Sülfat-	
poliakrilamid Jel Elektroforezi ve Western Blotting	71
2.2.10. Saflaştırılmış Protein Örneklerinde Endotoksin	
Eksiltmesi ve Seviyesinin Ölçümü	72
2.2.11. Aşılama ve Enfekte Etme	72
2.2.12. Protein Mikroarray Yöntemi Kullanılarak Antikor	
Cevabının Ölçülmesi	74
2.2.13. Protein Mikroarray Yöntemi Kullanılarak IgG	
Altgruplarının Değerlendirilmesi.....	75
2.2.14. Antijene Özgü Proliferatif İmmun Cevabın Ölçümü.....	75
2.2.15. Sitokin Ölçümü	77
2.2.16. İstatistiksel Analiz.....	78

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR..... 79

3.1. Rekombinant GRA1 Protein Tanımlanması

3.1.1. Biyoinformatik Değerlendirme Sonuçları.....	79
3.1.2. Rekombinant GRA1 Protein Ekspresyonu, Saflaştırması ve MALDI-TOF Kütle Spektrometrisi	83
3.1.3. Saflaştırılmış Protein Örneklerinde Endotoksin Eksiltmesi.....	84
3.1.4. Alkalen Fosfataz ile Defosforilasyon	85
3.1.5. EGTA-GRA1 Proteini Etkileşimi	86
3.1.6. Protein Sindirme Testi	87
3.1.7. Makromoleküler Kristalizasyon.....	88
3.2. GRA1 Aşı Denemeleri	89
3.2.1. Tam Uzunlukta Kodon Optimize GRA1 Geninin PZR ile Oluşturulması ve <i>in vivo</i> Rekombinasyon Klonlaması	90
3.2.2. <i>In vitro</i> Transfeksiyon	93
3.2.3. GRA1 Aşılarına Karşı Gelişen Humoral İmmun Yanıt	94
3.2.4. GRA1 Aşıları ile Oluşan Hücresel İmmun Yanıt	98
3.2.5. Letal Toxoplasmosise Karşı Korunma.....	99

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

TARTIŞMA	101
----------------	-----

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ ve ÖNERİLER.....	118
------------------------	-----

ÖZET.....	119
ABSTRACT	121
YARARLANILAN KAYNAKLAR.....	123
EK - Aminoasitler için Bir Harf ve Üç Harflik Kısaltma Kodları	143
ÖZGEÇMİŞ.....	144

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	<i>T. gondii</i> hayat döngüsü	10
Şekil 1.2.	<i>T. gondii</i> takizoiti	12
Şekil 1.3.	Konak Hücrenin <i>T. gondii</i> tarafından invazyonu	22
Şekil 2.1.	Rekombinant GRA1 proteini ve kristalizasyon solüsyonlarının karıştırıldığı iç içe geçen iki çukurlu plak	58
Şekil 3.1.	Jel filtrasyon kolonundan elde edilen saflaştırılmış rekombinant GRA1 proteininin SDS-PAGE analizi	84
Şekil 3.2.	Rekombinant GRA1 protein defosforilasyon sonuçları	86
Şekil 3.3.	Rekombinant GRA1 protein EGTA etkileşimi	87
Şekil 3.4.	Rekombinant GRA1 protein ile yapılan tripsin sindirim testi.....	88
Şekil 3.5.	Kristalizasyon deneme sonuçları.....	89
Şekil 3.6.	Ko-GRA1 geni birleştirilmesi sırasında uygulanan PZR ve TOPO klonlama reaksiyonları.....	92
Şekil 3.7.	Kodon optimize GRA1 geninin PZR reaksiyonu ile birleştirilmesi.....	92
Şekil 3.8.	Vt-GRA1 ve ko-GRA1'in CMV vektöre <i>in vivo</i> rekombinasyon klonlaması	92
Şekil 3.9.	İmmunofloresan mikroskopi yöntemi	93
Şekil 3.10.	Vt-GRA1 ve ko-GRA1 protein ekspresyon seviyelerinin western blot ile karşılaştırılması.....	94
Şekil 3.11.	<i>T. gondii</i> eriyik antijenin aşılınmış farelere ait serum havuzları ile karşılaştırılması	95

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.1.	<i>T. gondii</i> 'ye özgü tanımlanmış proteinler	14
Tablo 1.2.	<i>T. gondii</i> konak hücre invazyonunda rol alan proteinler.....	21
Tablo 1.3.	Toxoplasmosis tanısında indirekt ve direkt tanı yöntemlerinin yeri	37
Tablo 1.4.	Toxoplasmosis tedavi protokolleri.	40
Tablo 1.5.	İmmun sistemi baskılı veya yetmezliği olanlarda primer/sekonder toxoplasmosis profilaksisi.....	41
Tablo 1.6.	<i>T. gondii</i> enfeksiyonundan korunma yolları	43
Tablo 1.7.	Adjuvan tipleri ve immün sisteme etkileri	45
Tablo 1.8.	Aşı denemeleri ve adaylarını içeren araştırmalar (kronolojik sıralı)	50
Tablo 2.1.	GRA1 makromoleküler kristalizasyon çalışmasında kullanılan kimyasallar	58
Tablo 2.2.	ko-GRA1 ve vt-GRA1 kodon karşılaştırması	63
Tablo 3.1.	Rekombinant GRA1 proteinin üretimini sağlayan pUETΔGRA1 vektörü gen (A) ve protein (B) sekansları	80
Tablo 3.2.	Proscan patern yorumlama anahtarı	81
Tablo 3.3.	Rekombinant GRA1 proteini olası fosforilasyon bölgeleri.....	86
Tablo 3.4.	Rekombinant GRA1 proteini olası fosforilasyon bölgeleri.....	87
Tablo 3.5.	Rekombinant GRA1 proteininde tripsin enziminin kestiği aminoasitler	88
Tablo 3.6.	Vt-GRA1 ve ko-GRA1 genlerinin karşılaştırılması.....	91
Tablo 3.7.	GRA1 aşılamalarına karşı oluşan hücrel immün yanıt	99

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 3.1. Rekombinant GRA1 protein katlanma indeksi	82
Grafik 3.2. Rekombinant GRA1 protein olası antijenik eğilim grafiği	83
Grafik 3.3. Rekombinant GRA1 protein MALDI-TOF kütle spektrometrisi sonucu örneği	85
Grafik 3.4. GRA1 aşılarına karşı oluşan IgG antikor yanıtı	96
Grafik 3.5. IgG1 ve IgG2a alt grup antikorlarının protein mikroarray analizi ile saptanması	97
Grafik 3.6. BALB/c farelerin ikinci aşılanmadan 6 hafta sonra <i>T. gondii</i> RH suşu ile enfekte edilmeleri sonrası gözlenen yaşam süreleri	100

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Toxoplasma gondii geniş konak çeşitliliği sebebiyle medikal önemi yüksek bir protozoon parazit olarak kabul edilmektedir. İnsanlarda enfeksiyon genelde kedi dışkı ile atılan *T. gondii* ookistleri ile kontamine olmuş su ve besinlerin yenilmesi, doku kisti içeren etlerin çiğ veya az pişmiş şekilde yenilmesi veya hamilelik sırasında enfekte olan anneden fetusa transplasental olarak bulaşması sonucu geliştiği gösterilmiştir (123). Başlıca ciddi klinik tablolar, fetal anomalilere yol açan konjenital toxoplasmosis, körlüğe sebep olan kazanılmış veya konjenital toxoplasmik retinokoroidit ve immun sistem yetmezlikli kişilerde ölüme sebebiyet veren toxoplasmik ensefalit gelmektedir (81, 123, 124).

T. gondii'nin epidemiler ve sporadik vakalarla insanlarda birçok sağlık sorununa sebep olduğu gözlenmektedir. İmmun sistemi sağlam insanlarda semptomlar genelde belli belirsiz olduğu için, bir epidemiyoloji veya sporadik vakanın tanısı ancak ciddi komplikasyonlar oluştuğundan sonra konulabilmektedir. Dünyada 500 milyon insanın, *T. gondii* ile enfekte olduğu ileri sürülmektedir (81). Avusturya, Belçika, Fransa, Almanya ve İsviçre gibi ülkelerde 1990'lı yıllarda doğurgan yaştaki kadınlarda yapılan seroprevalans çalışmalarında oran % 37 ile % 58 arasında bulunmuş, Paris çevresindeki hamile kadınlarda ise % 67.3 olarak saptanmıştır (81, 84, 90). Yurdumuzda toxoplasmosis prevalansı hakkında yapılan epidemiyolojik bir çalışma yoktur. Amerika Birleşik Devletleri'nde (A.B.D.) toxoplasmosis prevalansı genel nüfus içinde % 22.5 ile Avrupa ülkelerine göre göreceli olarak daha düşük olduğu izlenmiştir. Buna rağmen her yıl binlerce infantın konjenital toxoplasmosis

ile doğduğu ve toxoplasmik retinokoroidit tanısı almış hastaların sayısının ise 1.26 milyonu bulduğu yayınlanmıştır (81, 93). Toxoplasmosise bağlı oluşan f3tal anomalilerin azaltılması için her yıl y3z milyonlarca doların harcanmakta olduğu g3r3lm3řt3r (90, 93, 153). Toxoplasmosis ile enfekte kişilerin tedavisine yılda 7.7 milyar dolar harcandığı istatistiğe yansımıştır (91, 93). A.B.D. ve Avrupa'da yapılan epidemiyolojik araştırmalar sonucunda elde edilen prevalans değerleri, toxoplasmosise bağlı oluşan komplikasyonlar ve oluşan ekonomik etki g3z 3n3ne alındığında, yurdumuzdaki tablonun da bundan farklı olmayacağı açıktır. Bunlara ek olarak toxoplasmosisin b3t3n d3nyada, koyunlarda d3ř3k, erken doğum ve yeni doğan 3l3mleriyle yol açtığı ekonomik kayıplar g3z ardı edilmemelidir (14, 123).

T. gondii'nin b3t3n formlarına % 100 etkili bir ilaç bulunamamıştır. Kullanımdaki ilaçların birçok yan etkisi olduğu, reaktivasyon oluşumunu tamamen engelleyemediği g3r3lmektedir. Bu sebeple akut enfeksiyonun olası sonuçlarını engelleyecek koruyucu aşı 3nemli bir alternatif olarak karşımızda oluşmaktadır. Koruyucu aşıya olan ihtiyaç, *T. gondii*'nin besin ve su kaynaklarını tehdit etmesi sonucu kategori B bioter3rizm ajanı kabul edilmesi ile bir kat daha artmıştır (131). Bu sınıflamanın başlıca sebeplerinden birisi Kanada İngiliz Columbia'sında 7718 insanın etkilediği su kaynaklı toxoplasmosis salgınıdır (21). Yakın zamanda 3lkemizde de bu salgına benzer fakat daha ufak boyutta bir salgın saptanmıştır (168).

3zetle denilebilir ki, toxoplasmosise karşı geliştirilecek koruyucu aşının yeni doğanlarda, erişkinlerde ve hayvanlarda toxoplasmosise ait komplikasyonların gelişmesini 3nleyeceğine, ekonomik ve sosyal kayıpların azalmasına yol aacağına inanmaktayız.

Araştırmanın Konusu

Toxoplasmosise karşı koruyucu bir aşı oluşturabilmek için 1990'lı yıllardan sonra birçok çalışmada mutant *T. gondii* suşları, saflaştırılmış proteinler ve DNA aşıları araştırılmıştır (14). Günümüzde kullanımda olan tek aşı S48 suşunu içeren canlı aşıdır (26). Bu aşı yan etkileri, kısa raf ömrü ve yüksek maliyeti sebebiyle yaygın şekilde kullanıma girememiştir. Ayrıca insanlarda uygulanan canlı aşılar da hem patojenik formun reaktivasyonu, hem de beklenmeyen zararlı ters mutasyonlar gözlenebilmektedir. Bu olasılıkları ortadan kaldırmak için güncel aşı denemelerinde saflaştırılmış proteinler ve DNA aşıları üzerine yoğunlaşmıştır. Bu araştırmalardan elde edilen sonuçlar ışığında *T. gondii*'ye karşı koruyucu bir aşının gerçekleştirilebilir olduğu kanısı oluşmuştur. Yüzey antijeni 1 (SAG1), SAG2, dense granül antijeni 1 (GRA1), GRA4, GRA7, roptri proteini 2 (ROP2), mikronem proteini 3 (MIC3) ve ısı şok proteini (HSP70) içeren rekombinant protein aşıları ve DNA aşıları hayvanlarda, kimi zaman kısmi, kimi zaman tam koruma sağlamış veya nadiren hiç koruma sağlamamışlardır (6, 15, 18, 36, 45, 57, 58, 76, 83, 105, 106, 108, 113, 121, 122, 132, 136, 148, 155, 167, 174, 180, 181). Toxoplasmosise karşı var olan bütün aşı denemelerinde GRA1 iyi bir aşı adayı olarak ön plana çıkmaktadır. GRA1'in hayvanlarda immun cevap oluşturduğunu ve toxoplasmosise karşı koruma sağladığı ilk defa Supply ve arkadaşları tarafından saptanmıştır (167). Bacillus Calmette-Guerin (BCG) vektörü tarafından eksprese edilen GRA1, OF1 farelerde ve koyunlarda düşük virülanslı *T. gondii* suşlarına karşı korunma sağlamış ve belirgin T hücre cevabı oluşturmuştur. BCG-tarafından eksprese edilen GRA1'in, farelerde ve koyunlarda antikor cevabı oluşturmadığı fakat saflaştırılmış GST-GRA1 füzyon proteininin antikor oluşumuna yol açtığı gözlenmiştir (167). Vercammen ve arkadaşları üç değişik fare türünde vahşi tip GRA1 DNA aşısı denemişler, vahşi tip

GRA1 (vt-GRA1) DNA aşısının farelerin türüne göre değişken fakat kuvvetli şekilde IgG2a cevabı oluşturduğunu saptamışlardır. Ayrıca vt-GRA1 DNA aşısı, 2 tür farede belirgin lenfoproliferasyon ve IFN- γ üretimine yol açan kuvvetli hücrel immun cevap oluşturmuş ve farelerde yüksek enfektif dozlarda verilen IPB-G ve 76K *T. gondii* suşlarına karşı korunma sağlamıştır (155, 174). Bivas-Benita ve arkadaşları, saflaştırılmış rekombinant GRA1 protein aşısını ve vt-GRA1 DNA aşısını sırasıyla mikro ve nano parçacıklar kullanarak C3H/HeN farelerinde denemişler, önceki çalışmaların aksine, farelerdeki kuvvetli antikor yanıtının IgG1 antikorları lehine olduğunu saptamışlardır (15).

T. gondii ile enfeksiyon sonrası humoral (salgısal) ve hücrel immun yanıt oluşmaktadır. Bununla birlikte farelerde *T. gondii*'ye karşı immun korunma primer olarak Th1 hücrel immun cevap (42, 137) ve IFN- γ (43) salgılanması ile doğrudan bağlantılı olduğu gözlemlenmiştir. GRA1 proteini veya DNA'sı kullanılarak hazırlanan aşı adaylarının Th1 cevabını uyarmaları ve belirgin korunma sağlamaları sebebiyle umut verici kabul edilmektedir. Bununla birlikte toxoplasmosise karşı geliştirilecek koruyucu aşıda hedefe ulaşmak için oluşacak immun cevabın karmaşıklığını, aşı tiplerini, uygulama yollarını, parazit suşları/dozları ve konak türü gibi çeşitli değişkenler arasındaki olası ilişkilerin kontrol edilmesi, virülan *T. gondii* suşlarına karşı korunmanın daha da geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Özetle, bu araştırmada fare hayvan modelinde akut toxoplasmosise karşı etkili bir aşı geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla üç çeşit GRA1 kökenli aşı adayı hazırlanmıştır: vahşi tip GRA1 DNA aşısı (CMV/vt-GRA1); kodon-optimize GRA1 DNA aşısı (CMV/ko-GRA1) ve Provac ile adjuvante edilmiş rekombinant GRA1 protein aşısı (rGRA1-Provac). Projenin hipotezi, "***memeli kodon-optimizasyonu ile oluşturulan sentetik genden hazırlanan GRA1 DNA aşısı ve adjuvan eşliğinde***

kullanılan rekombinant GRA1 protein aşısının korumalarının, var olan vahşi tip GRA1 geni ile hazırlanan DNA aşısına göre daha üstündür” kuramı üzerine kurulmuştur. Araştırmanın amaçları kısaca dört ana başlık altında özetlenebilir;

1. Biyoinformatik teknikler kullanılarak GRA1 geninin incelenmesi, rekombinant proteinin tanımlanması ve rekombinant protein aşısı geliştirilmesi.

T. gondii'ye ait GRA1 geninin seçimi aşamasında biyoinformatik tekniklerle GRA1 proteini katlanma, immunolojik yapı ve içerdiği olası bölgeler (kalsiyum bağlama, fosforilasyon ve myristoylasyon bölgeleri) açısından incelenmiştir. Safılaştırılmış rekombinant GRA1 proteinin tanımlanması sırasında sırasıyla Matrix-assisted laser desorption ionization-time of light (MALDI-TOF) kütle spektrometrisi, karides alkalin fosfatase ile defosforilasyon, kalsiyum iyonunun ethylene glycol tetraasetik asit (EGTA) ile şelasyonu ve protein sindirme testleri uygulanmıştır. Tanımlanma sonrası rekombinant GRA1 proteini ilk defa kuvvetli bir adjuvan olan Provac ile birlikte aşı denemesinde kullanılmıştır.

2. Vahşi tip ve kodon optimize GRA1 gen ekspresyonlarının karşılaştırılması.

Öncelikle CODA kullanılarak tasarlanan ko-GRA1 genine ait oligonükleotidiler seri Polimeraz Zincir Reaksiyonları ile birleştirilmiştir. Daha sonra CMV/vt-GRA1 ve CMV/ko-GRA1 vektörlerinin eksprese ettikleri protein miktarı *in vitro* transfeksiyon yöntemi ile insan embriyogenik böbrek hücre kültürü ortamında karşılaştırılmıştır. *In vitro* transfeksiyon (*in vitro* şartlarda DNA vektörünün hücre içine sokulması) sırasında kullanılan CMV/ko-GRA1 DNA aşısı *T. gondii*'ye karşı geliştirilmiş ilk memeli kodon-optimize DNA aşı adayıdır. Kodon-optimizasyonu

DNA aşılarının *in vivo* antijen ekspresyon seviyesini arttırmak için geniş çaplı olarak kullanılmaktadır. Kodon-optimizasyonu sonrası üretilen DNA aşıları çok çeşitli mikroorganizmalarda, HIV antijenlerinden gag, gp120/160 ve tat yanında ters transkriptaz ve integras genleri, insan papilloma virüs 11'e ait L1 geni ve insan papilloma virüsü 16'ya ait E5 geni, *Plasmodium yoelii*, *P. falciparum*, *Schistosoma mansoni*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* ve *Clostridium tetani*'ye ait genlerin kodon optimizasyonu sonucu elde edilen sentetik genlerin, fare ve primat modellerinde protein ekspresyonunun artırılması, immun cevabın geliştirilmesinde kullanıldığı belirtilmiştir (5, 28, 41, 46, 73, 125, 127, 130, 146, 164, 166, 172, 175, 185). CMV/ko-GRA1 DNA aşısında bulunan memeli hücreye kodon optimize GRA1 geni CODA (computationally optimized DNA assembly) algoritmi ile tasarlanmıştır. Bu teknik sırasında öncelikle vahşi tip GRA1'in genetik kodu bozulup, termodinamik özellikleri sayesinde birbiri üstüne binip kendiliğinden bir araya gelecek DNA oligonükleotid sekansları dizayn edilmiş tek zincirli, lineer ve memeli hücre kodon kullanımına göre optimize sentetik GRA1 geni tasarlanmıştır.

3. BALB/c farelerde humoral (salgısal) ve hücrel immun cevabın ölçümü.

İlk iki amaçta elde edilen CMV/vt-GRA1, CMV/ko-GRA1 DNA aşı adayları ve rGRA1-Provax protein aşı adayının BALB/c farelere uygulanması sonrası oluşan humoral (salgısal) ve hücrel immun cevap ölçülmüştür. Humoral immun cevap fare serum örneklerinde western blot tekniği ve protein ile işaretlenmiş mikroarray analizi ile saptanmıştır. Hücrel immun cevap ise fare dalak hücrelerinin rekombinant GRA1 ile uyarılması sonucu çoğalan lenfositler radyo aktif ³[H]-thymidine eklendikten sonra sıvı ışına sayımı ve sitokin yanıtı ELISA ile ölçülmüştür.

Rekombinant GRA1 proteini içeren aşilar daha önceden hayvan modelleri üzerinde denenmiştir (15, 167). Bu çalışmalarda rekombinant GRA1 protein aşısının lenfoproliferasyon ve sitokin cevabı üzerine etkisini gösteren bir sonuç yayınlanmamıştır. Bu çalışmada ilk defa rekombinant GRA1 protein aşısının oluşturduğu hücrel immun cevap geniş bir profilde incelenmiştir.

4. *T. gondii* RH suşu ile enfekte edilen BALB/c farelerde aşılamların sağladığı korunmanın değerlendirilmesi.

BALB/c fare gruplarına CMV/vt-GRA1, CMV/ko-GRA1 DNA aşıları ve rGRA1-Provax protein aşısı uygulandıktan sonra letal dozda *T. gondii* RH suşuna ait takizoitler inoküle edilmiş, iatrojenik akut toxoplasmosisdeki yaşam süreleri kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak gözlenmiştir.

Araştırmamızın sonucunda rekombinant GRA1 proteininin yapısı, katlanması ve içerdığı bölgelerinin proteinin kinetiğine etkisi hakkında genel bilgiler elde etmeyi, aşı denemelerinde ise pratik uygulamalara katkısı ortaya konulacaktır. İlk kazanım toxoplasmosise karşı geliştirilecek koruyucu aşı denemelerinde memeli kodon-optimizasyonun önemli alternatif olabileceğidir. Olası sonuçlardan biride GRA1 protein aşısının koruyucu etkisinin bir adjuvan ile birleştirildiğinde nasıl geliştiğinin ortaya çıkacak olmasıdır. Araştırma sırasında GRA1 proteinin tanımlanması ve aşı geliştirilmesinde kullanılan metotlara geçmeden önce *T. gondii* hakkında genel bilgilerin hatırlanmasının yararlı olacağı kanaatindeyiz.

1.1. *Toxoplasma gondii* Genel Bilgi

1.1.1. Tarihçe ve Sınıflandırma

Toxoplasma gondii ilk kez Charles Nicolle tarafından 1908 yılında tanımlanmıştır. Nicolle ve Monceaux, paraziti ilk defa *Ctenodactylus gundii* adlı Afrika kemirgeninde saptamışlar ve bu kemirgen *T. gondii* tür adının kaynağını oluşturmuştur. Cins ismi ise takizoitlerin yay şekline benzemesi sebebiyle Yunancada *toxon* kelimesinden türemiştir. İlk insan olgusu 1923 yılında, Prag'lı bir oftalmolog olan Janku tarafından konjenital hidrosefali ve mikroftalmili bir bebeğin retinasında kistlerin bulunması ile tanımlanmıştır. Kuman'a göre Türkiye'de ilk insan olgusu 1953 yılında Unat ve ark. tarafından teşhis edilmiş ve *T. gondii*'nin sınıflandırması Kuman ve Altıntaş'tan alınmıştır (98).

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

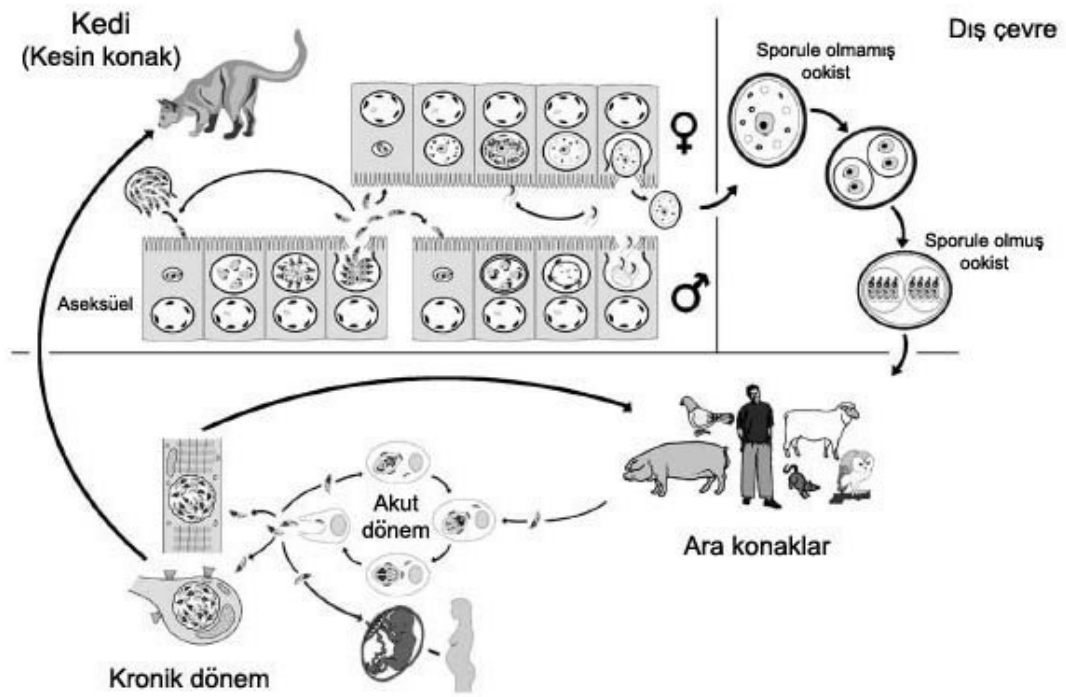
1.1.2. Morfoloji

T. gondii kendine ait golgi, ribozom ve mitokondrisi olmasına rağmen takizoit formu hayatta kalabilmek, çoğalmak için hücre içi habitata ihtiyaç duymaktadır. *T. gondii*, yaşam döngüsünde (Şekil 1.1) üç formda karşımıza çıkmaktadır. Bunlar sporozoitleri barındıran **ookist**, hızlı bölünen **takizoit** ve yavaş bölünen bradizoitleri içeren **doku kistidir** (93, 123).

Ookist: Ookistlerin sadece kesin konak kedinin ince bağırsağında oluştuğu bildirilmiştir. Parazit kedi tarafından yutulmasından sonra, ince barsak epitelyal hücrelere girdiği, aseksüel ve seksüel üreme döngülerini başlattığı izlenmiştir. Seksüel üreme sonucunda oluşan ookist, dışkı ile dış ortama atılmakta (Şekil 1.1), sporule olmamış bu ookistlerin 10–12 µm çapta olduğu ve enfeksiyöz olmadığı bilinmektedir. Bulunduğu dış çevrenin ısı ve oksijen miktarına bağlı olarak çapları bir miktar artan ookistlerin (11–13 µm) 1–21 gün içinde sporule olduğu görülmüştür. Enfeksiyöz hale gelen (sporule olmuş) ookistlerin içinde, 6×8 µm boyutlarında elips şekilli iki adet sporokist izlenir. Her bir sporokistin dört adet sporozoit içerdiği, 2×6–8 µm boyutlarındaki sporozoitlerin, takizoitlere benzediği saptanmıştır (48). Sporozoitlerin (Şekil 1.1) takizoit formuna dönüştüğü izlenmiştir. Ookistlerin nemli toprakta 18 ay boyunca canlı kalabildiği, akut enfeksiyon sırasında kedi dışkısında 7–21 gün süreyle 10 milyon kist/gün atılabildiği, bu sebeple kedilerin enfeksiyonun doğada yayılmasının en önemli kaynağı olduğu ileri sürülmüştür (123, 124).

Takizoit: Genelde hilal şekilli ve 2×6 µm boyutlarında, nükleuslu, aktif penetrasyon ile hücreleri istila edebilen formudur. Girdikleri hücrede ilk önce sitoplasmik vakuol oluşturup, burada sürekli çoğalarak, konak hücreyi patlattıkları, daha sonra serbest kalan takizoitlerin bir kısmının komşu hücreleri işgal ederken, bir

kısının da fagosite edildikten sonra kan ve lenf yolu ile en sık santral sinir sistemi, göz, iskelet, kalp kası, plasenta gibi dokulara yayıldığı yayınlanmıştır. Takizoitlerin kuvvetli inflamatuvar reaksiyona ve doku yıkımına sebep olduğu ve bu yüzden hastalığın kliniğinden sorumlu oldukları görülmüştür. Primer enfeksiyon veya reaktivasyon sırasında görüldüğünden, saptanması aktif enfeksiyon işareti olarak kabul edilmektedir (123, 124).



Şekil 1.1. *T. gondii* hayat döngüsü. *Ferguson'dan alınmıştır* (60).

T. gondii'nin kompleks bir hayat döngüsü vardır. Hayat döngüsünde iki geçiş mekanizması tarif edilmiştir; birincisi kesin konak kedilerde coccidian gelişme sonucu oluşan ookistlerin yutulması, diğer mekanizma ise kronik olarak enfekte olan ara konaklarda oluşan doku kistlerinin yutulmasıdır. Bu döngüde kesin konak olan kedilerin ince bağırsak enterositlerde seksüel üreme sonucunda mikrogametosit ve makrogametosit oluştuğu görülmüştür. Bu iki ara formun birleşmesi ile enterositler içinde ookistler meydana geldiği ve bu şekilde sporule olmamış ookistler kedi dışkısı ile çevreyi kontamine ederler. Dışarıda sporule olduktan sonra besinler veya su yolu ile konakları enfekte ettikleri gözlemlenmiştir. Ara konakta parazitin sadece aseksüel olarak ürettiği, ara konakta akut enfeksiyon dönemini kronik enfeksiyon takip ettiği bu dönemde parazitin başlıca beyin ve kas dokusunda, kist formuna dönüştüğü görülmüştür. Bu doku kistlerinin yutulması ile enfeksiyon diğer etobur ara konaklara veya kedilere bulaşmaktadır. Ayrıca gebelik sırasında geçirilen akut enfeksiyon sırasında parazitin plasentayı geçip fetusu enfekte ettiği bilinmektedir. Kalın oklar parazitin konaklar arasında geçişini ve ince oklar ise konak içi gelişimini göstermektedir (60, 123).

Doku kistleri: Hastalığın başlamasından ortalama 14 gün sonra hücre içinde bulunan takizoitlerin, immun cevabın baskısı ile daha yavaş bölünen bradizoitlere dönüştüğü görülmüş, bu sürecin sonunda doku kistlerinin oluştuğu bildirilmiştir (48, 111). Doku kistlerinin çapları 5–100 µm arasında ve içerdikleri bradizoit sayısının da 2 ile yüzlerce arası olabileceği bildirilmiştir. Bradizoitler genelde hilal şekilli ve 7×1.5 µm boyutta formlardır. Bradizoit içeren doku kistleri konak hücre içinde kalarak, konak immun sisteminden korunup, latent enfeksiyona yol açmaktadırlar. Santral sinir sistemi, göz, iskelet kası, düz kas ve kalp kası doku kistlerinin en sık görüldüğü organlar ve dokulardır (123, 124). Genelde doku kistleri hücre içinde kalmasına rağmen beyinde yerleşen doku kistleri, konak hücre (*in vivo* şartlarda genellikle konak hücre nöron iken, *in vitro* ortamda astrositlerinde tutulduğu saptanmıştır) ölümüne sebep olup hücre dışına yerleşmektedir (124).

1.1.2.1. Moleküler Yapı

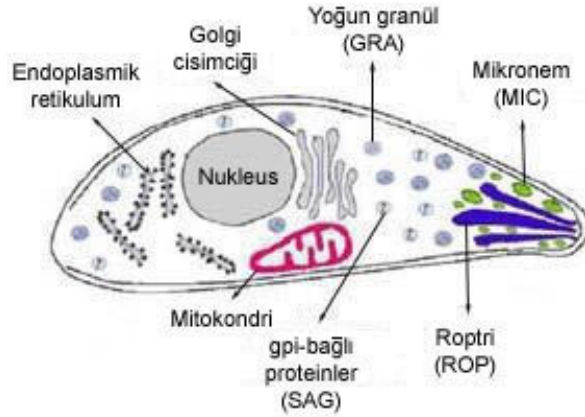
(a) *Toxoplasma gondii* genomu

T. gondii genomu kedilerde gözlenen seksüel döngü dışında haploit yapıda olduğu görülmüştür. Nükleer genomun ortalama 80 milyon nükleotid içerdiği (80 Mb) ve suşlar arası çok az varyasyon gösteren 11 kromozomu olduğu saptanmıştır (2, 160). *T. gondii*'nin ayrıca ekstra kromozomal 35 Kb (kilobaz) büyüklüğünde sınırlı protein ekspresyon kapasitesi olan sirküler DNA'ya sahip olduğu bulunmuştur. *T. gondii*'nin patolojik etkilerinin nükleer genomu tarafından kodlanan proteinlerle oluştuğu belirlenmiştir. ToxoDB (*T. gondii* veri tabanı) *T. gondii* RH ve ME49-B7 adlı suşlara ait bütün genomik verileri araştırmacıların kullanımına açmıştır (95). *T. gondii* genomunun sekans analizi Pennsylvania Üniversitesinden Dr.

David Roos, The Institute for Genomic Research (TIGR), Washington Üniversitesinden Dr. David Sibley, Montana State Üniversitesinden Dr. Michael White ve Sanger Enstitüsü tarafından gerçekleştirilmektedir. NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanında tezin yazıldığı tarih itibariyle *T. gondii*'ye ait 126,738 gen bölgesi tanımlanmış olup, bunlardan 7666'sı transkripsiyonu olmuş bölgelerdir. Bu bölgelere ait 697 protein çeşitli yöntemlerle kanıtlanmıştır.

(b) *Toxoplasma gondii* organeller

Sporozoit içeren ookistlerin veya bradizoit içeren doku kistlerinin oral yolla alındıktan sonra takizoit formuna dönüştüğü yayınlanmıştır (Şekil 1.2) (48).



Şekil 1.2. *T. gondii* takizoiti

Konak hücrenin istilası sırasında takizoit içeriği parazitofor vakuol (PV) içine ve aynı zamanda PV dış çevresine serbestlenmekte, konak hücre istilasında başlıca rolü takizoitin şimdiye kadar tanımlanmış 21 yüzey antijeni (SAG'lar), mikronemler, roptriler ve yoğun granüllerin oynadığı belirlenmiştir. SAG'lar ve mikronemlerden salgılanan 12 çeşit mikronem antijeni (MIC) parazitin konak hücreye tutunmasında

rol alırken, roptrilerden salgılanan 9 çeşit roptri antijeni (ROP'lar) ise konak hücrenin işgali ve PV oluşumu sırasında görev aldığı düşünülmektedir (27, 104, 119). Yoğun granüllerden salgılanan 8 çeşit yoğun granül antijeni (GRA'lar) ise tüm konak hücreye yayılmakta ve yoğun granüllerin içeriğinden PV içine salgılandığı, PV içinde çözülmüş şekilde, PV ağı üzerinde veya PV membran üzerinde saptandığı bildirilmiştir (29). Takizoitin içinde bulunduğu PV paraziti lizozomal füzyon ve sonucunda gelişen konak hücre asidifikasyonundan korumaktadır (124).

(c) Parazitin dönemlerine özgü antijenler

T. gondii'ye ait GRA1 geninin seçimi aşamasında parazitin bütün organellerine ait antijenik proteinler hakkında ToxoDB ve NCBI veritabanlarında yapılan araştırmalar sonucunda hedef antijenler belirlenmiştir. Parazitin dönemlerine özgü antijenler bir başka deyişle *T. gondii*'nin hayat döngüsü süresince görüldüğü formlar, bu bölümde sınıflandırılmıştır. Bazı genlerin parazitin gelişimine bağlı olarak ekspresyonları düzenlediği, parazitin farklılaştığı her döneme özgü proteinlerin üretildiği gözlemlenmiştir (35, 104, 144, 110). Tablo 1.1'de *T. gondii* dönemlerine özgü proteinler özetlenmiştir. Parazitin sporozoit dönemine özgü sekiz antijen çoğunlukla enfeksiyonun ilk 24 saatinde eksprese edildiği görülmüştür. Enfeksiyon başladıktan 72 saat sonra, sporozoitin takizoite dönüşmeye başladığı ve sporozoite özgü antijenlerin kaybolduğu gözlenmiştir (92, 144). Bu güne kadar ookiste özgü tanımlanmış tek protein ookist duvar proteini TgOWP'tur (169). Takizoit dönemine özgü saptanan dokuz antijenden altısının yüzey antijeni olduğu, üç tanesinin de metabolik enzim olduğu gösterilmiştir. Bradizoite ait olduğu saptanan 19 proteinden dokuzunun antijen, 10 tanesinin de metabolik enzim olduğu anlaşılmıştır (17, 35, 44, 53, 54, 96, 103, 104, 135, 179). Bradizoitleri içinde

barındıran doku kistlerine özgü sadece kist duvarı proteini CST1 tanımlanmıştır (182).

Tablo 1.1. *T. gondii* 'ye özgü tanımlanmış proteinler (111)

Dönem	Protein	Tanımlama Metodu	Referans	Dönem	Protein	Tanımlama metodu	Referans	
Sporozoit	21 kDa SAG	mAb ve IS	144	Bradizoit	BSR4	Gen yakalama	96	
	22 kDa SAG	mAb ve IS	144		SAG2C	HBI	103	
	25 kDa SAG	mAb ve IS	144		SAG2D	HBI	103	
	SporoSAG	serum ve WB	92, 144		SAG4A	klonlama	133	
	36-40 kDa Ag	mAb ve IS	144		SAG5A	klonlama	104	
	67 kDa SAG	serum ve WB	92		SRS9	cDNA mikroarray	35	
	116 kDa APA	mAb ve IS	144		Enolaz 1	klonlama	54	
	120 kDa Ag	mAb ve IS	144		HSP30/BAG1	PPA	17, 135	
	Takizoit	SAG1	mAb ve IS		24	BAG5	klonlama	17
SAG2A		mAb ve IS	143	LDH 2	A-EST, klonlama	179		
SAG2B		HBI	103	Mucin homologu	cDNA mikroarray	35		
SAG5B		klonlama	104	VEE-repeat protein	cDNA mikroarray	35		
SAG5C		klonlama	104	MET aminopeptidaz	cDNA mikroarray	35		
SRS1		Genome yürüme	77	Oligopeptidaz	cDNA mikroarray	35		
SRS 2-3		A-EST, klonlama	112	C-II PPDat	cDNA mikroarray	35		
Enolaz 2		klonlama	54	PtdIns (b)	Gen knock out	53		
LDH 1		A-EST, klonlama	179	Pyruvate kinaz	Spectrofotometri	44		
PtdIns (t)		Gen knock out	53	P type-ATPaz	Spectrofotometri	44		
NTP az		PPA	128	ICD	Spectrofotometri	44		
ICD		Spectrofotometri	44					
Ookist		TgOWP	A-EST, klonlama	169	Doku kisti	CST1	mAb ve IS	182

Kısaltmalar: mAb; monoklonal antikor, IS; immün boyama, WB; western blot, HBI; homology tabanlı tanımlama, PPA; öncü promotör analizi, EST; Expressed sequence tag analizi, SAG; yüzey antijeni, SRS; yüzey antijeni ilişkili sekans, LDH; laktat dehidrogenaz, ICD; isositrat dehidrogenaz, BSR; bradizoit özgü rekombinant protein, APA; apical antijen, PtdIns; fosfatidilinositol sentetaz, HSP; ısı şok proteini, BAG; bradizoit antijeni, MET; Methionine, PPDat; piridoksal fosfat'a bağlı aminotransferaz, TgOWP; ookist duvar proteini, CST1; doku kist glikoproteini.

Yukarıda ifade edilen proteinler parazitin belli dönemlerine ait olup, parazitin birkaç döneminde de eksprese edilen bazı proteinler gözlemlenmiştir. Yüzey antijeni SAG3'ün parazitin tüm dönemlerinde eksprese edildiği (29, 104), bazı yüzey antijenlerinin parazitin iki döneminde de eksprese edilmesine rağmen sadece bir dönemde rölatif olarak yüksek olduğu gözlenmiştir. SAG1 ve SRS3'ün takizoit döneminde ekspresyonları çok yoğun olduğu, sporozoit döneminde saptanan ekspresyonlarının ise çok az miktarda olduğu yayınlanmıştır (104, 144). *T. gondii*'nin mikronem (MIC), roptri (ROP) ve yoğun granül (GRA) organellerinden de antijenik proteinlerin eksprese edildiği görülmüştür. Bunların parazitin konak hücreyi işgal ederken bağlanma, penetrasyon ve internalizasyon basamaklarında rol aldığı

gösterilmiştir (29, 66, 67, 107). MIC1, ROP1, NTP1 ve 8 adet yoğun granül antijeni immunohistokimyasal metotlarla parazitin hem takizoit, hem de bradizoit dönemlerinde saptanmıştır (29, 60). Bunlardan ROP1, NTP1, GRA1 ve GRA5 ekspresyonu bradizoitlerde zaman içinde baskılandığı (35) ve bu sebeple bradizoitlerde çok önemli fonksiyonlarının bulunmadığı düşünülmektedir. GRA1, GRA2, GRA4, GRA5, GRA6, GRA7'nin ayrıca sporozoitlerde de eksprese edildiği görülmüştür (60).

Parazitin dönemine özgü çoğu protein immunohistokimyasal yöntemlerle tanımlanmıştır. Az sayıda protein, özellikle metabolik enzimler, gen knock-out deneyleri, döneme özgü eksprese sekans tag (EST) kütüphaneleri promotör analizi, döneme özgü cDNA mikroarraylerin hibridizasyonu veya yarışmalı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gibi metotlarla tanımlanmıştır (110). Stanford Üniversitesinde yapılan detaylı bir araştırmada, takizoitten bradizoite dönüşüm sırasında gen ekspresyonunda oluşan değişiklikler cDNA mikroarray'leri kullanılarak incelenmiştir (35). Araştırma sırasında takizoit ve bradizoite özgü EST kütüphaneleri kullanılmıştır. Daha sonra *T. gondii* kültürlerinden elde edilen takizoit ve bradizoitlerden mRNA transkriptleri belli dönem aralıkları ile toplanmış ve transkript seviyelerindeki değişiklikler incelenmiştir. Araştırmacılar takizoitten bradizoit formuna dönüşüm sırasında 39 genin uyarıldığı, 20 genin baskılandığını ve 312 yapısal genin ise aynı miktarda sürekli eksprese edildiğini rapor etmişlerdir (35). Uyarılan veya baskılanan genlerin % 66'sının sekretuar organellerden salgılanan antijenik proteinleri kodlandığı anlaşılmıştır. Bu araştırmadan, toxoplasmosise karşı geliştirilmesi planlanan aşı yapımında kullanılacak hedef genin/hedef antijenin seçiminde parazitin hangi formu/formlarına ait olması gerektiği ve antijenik yapıda olup olmadığının belirlenmesinde faydalanılmıştır.

1.1.3. Epidemiyoloji

İnsanlarda enfeksiyon, genelde kedi dışkısı ile atılan ookistlerle kontamine olmuş su veya besin alımı sonrasında, doku kisti içeren az pişmiş veya çiğ etlerin yenmesi (başlıca domuz ve koyun) veya deri bütünlüğü bozulmuş çıplak ellerle teması sonrasında, ya da transplasental yolla oluşmaktadır. Tüm dünyada yapılan seroprevalans çalışmalarında saptanan toplumlar arası farklılıklar, bulaşın toplumun beslenme alışkanlıklarına, kişisel hijyene bağlı olduğunu göstermektedir. Seroprevalans verilerinin A.B.D.'de, yurdumuza göre daha düşük olmasına rağmen, ciddi klinik tablolara yol açtığı bildirilmektedir.

Toxoplasmosis salgınlarına az pişmiş veya çiğ sığır, koyun, domuz, geyik eti yemenin (10, 34, 47, 62, 114, 150), pastörize edilmemiş keçi sütü (149) ve kontamine içme suyu içmenin (7, 12, 13, 21), kontamine toprak (163) ve havayla temasın sebep olduğu yayınlanmıştır (170). 2000 yılında Avrupa'da yapılan çok merkezli bir çalışmaya göre hamile kadınlarda saptanan toxoplasmosis olgularının % 30 ile % 63'ü az pişmiş et yemesine, % 6 ile % 17 ise toprakla temasa bağlanmıştır. Hastalığın sıklıkla görüldüğü yaş grubu da ülkelere göre değişkenlik göstermektedir. Fransa'da hastalığın sıklığı her yaşta benzer olarak saptanırken, Panama'da çocuklarda seroprevalansın ileri yaş gruplarına göre daha hızlı arttığı görülmüştür (81). Bu değişikliğin sebebi Panama'da toprakla temasın çocuklarda erişkinlere göre daha sık olmasına, Fransa'da çiğ, az pişmiş et tüketiminin yaygın olmasına bağlanmaktadır (90). A.B.D.'de *T. gondii* koyun etlerinde de sıklıkla saptanmakta fakat A.B.D.'de koyun etinin domuz etine göre daha az tüketilmesi, bulaşta domuz etinin daha önemli bir kaynak olarak kabul edilmesine neden olmaktadır (81, 123). Son yıllarda yenilen domuz etlerinde parazitin görülme sıklığı çok azalmasına

rağmen, modernizasyonu tam olmayan domuz çiftliklerinden alınan et örneklerinde prevalansın hala % 93 olduğu yayınlanmıştır (47). Benzer verilerin elde edildiği Hollanda'da yapılan bir çalışma organik domuz üretiminin (domuzların doğada serbest beslenmesi) seroprevalansı arttırdığı düşünülmektedir. *T. gondii*'nin inekleri de enfekte ettiği gözlemlenmiştir fakat önemli bir bulaş etkeni olarak ön plana çıkmadığı vurgulanmıştır. Et kesme tahtalarının, bıçaklarının ve kıyma makinelerinin uygulama sonrası temizlemeden kullanılması enfekte bir hayvandan, temiz bir hayvan etine çapraz kontaminasyon oluşturabileceği, çiğ et tüketiminin salgınların oluşmasında önemli bir faktör olduğu ve etlerin iyi pişirilerek yenmesinin hastalığın önlenmesinde önemli olduğu anlaşılmıştır (81).

Toxoplasma salgınlarının önemli bir kaynağı da kontamine sulardır. 1979 yılında Panama'daki bir A.B.D. askeri birliğinde ortaya çıkan toxoplasmosis salgınında ormandaki kontamine bir su kaynağının sorumlu olduğu düşünülmüştür (81). Su kaynaklı en büyük toxoplasmosis salgını 1995 yılında İngiliz Kolumbia'sı, Büyük Victoria'da saptanmıştır. Bu bölgede kısa süre içinde 100 kişide akut toxoplasmosis saptanmış, epidemiyolojik araştırmada 7718 kişinin *T. gondii* ile enfekte olduğu tahmin edilmiştir. Bu salgının sebebini açık içme suyu deposunun sokak kedileri tarafından kontamine edilmesine bağlamışlardır (21, 25, 82). Güney Brezilya'nın Parana eyaleti Santa Isabel do Ivai şehrinde 2001 yılında yüzlerce insanı enfekte eden salgında da sebep kontamine olan içme suyu deposundaki suyun filtre edilmeden tüketilmesine bağlanmıştır (81). Son zamanlarda Brezilya kuzey Rio de Janerio eyaletinde yapılan bir araştırmada alt ve orta sosyoekonomik düzeydeki insanlarda seroprevalansın, filtre edilmemiş kuyu sularının içilmesine bağlı arttığı saptanmıştır (12). Yapılan başka bir çalışmada, az pişmiş etin, dinsel ve kültürel alışkanlıklar sebebiyle tüketilmediği toplumlarda, *T. gondii* ile kontamine suyun

başlıca enfeksiyon kaynağı olduğu belirtilmiştir (72). Kuzey Amerika ve Avrupa'daki içme suyuna belediyeler tarafından flokulasyon/sedimentasyon uygulandıktan sonra 4 mikronluk parçacıkların % 99'unu tutan bir filtre sisteminden geçirilmektedir. Böylece çapları 12 mikron olan *T. gondii* ookistlerinin filtre edilmesi sağlanmakta, su hastalık kaynağı olarak düşünülmemektedir. Fakat suyu filtre eden sistem arızalarında cryptosporidiosis salgınlarının gelişmesi *T. gondii* salgınlarının da görülebilmesini olanaklı kılmaktadır (81). Su kaynaklı salgınlar hayvanları da etkilemekte, Wisconsin'de bir çiftlikte yetiştirilen 7800 vizonun % 26'sı toxoplasmosis salgını ile yavrularını düşürmüştür (65). Su kaynaklı salgınların fok balıklarını da etkilediği 1997–2001 yılları arasında 223 California deniz fokunda yapılan incelemede, canlı fok balıklarında toxoplasmosis seroprevalansının % 42 ve ölmüş fok balıklarında % 62 olduğu ortaya konmuştur (118).

A.B.D.'de NHANES'in (Ulusal Sağlık ve İnceleme Araştırması) 1988–1994 yılları arasında toplanan serum örnekleri Jones ve ark. tarafından *T. gondii*'ye özgü IgG antikorları açısından incelenmiştir. 12 yaşından büyük 17658 bireyde toxoplasmosis prevalansının % 22.5, 15–44 yaş arası kadınlarda ise % 15 olduğu görülmüştür. 1999–2000 yılları arasında toplanan serum örneklerinde yapılan benzer bir çalışmada 12 yaşından büyük bireylerde toxoplasmosis prevalansı % 23.6, doğurgan yaştaki kadınlarda ise % 14.9 bulunmuştur. Bu sonuçlar A.B.D.'de toxoplasmosis prevalansının 10 yıllık dönemde değişmediğini göstermektedir. A.B.D.'de her yıl ortalama 750 kişinin toxoplasmosis veya yol açtığı klinik tablolar nedeniyle öldüğü bildirilmektedir (90). Toxoplasmosis tanısı alan hastaların tedavi masraflarının yıllık 7.7 milyar doları bulunduğu yayınlanmıştır (91, 93). Yurdumuzda hamile kadınlarda toxoplasmosis prevalansı; Şanlıurfa'da % 60.4, İzmir ve

çevresindeki kadınlarda % 55, Malatya'da % 39.6, Aydın'da % 30.1 saptanmıştır (4, 51, 55, 74, 134, 162).

Konjenital toxoplasmosis A.B.D.'de her 10000 canlı doğumdan 1 ile 10'u arasında görülmekte iken (14, 69, 91, 85, 100), Norveç, Belçika ve Fransa'da her 1000 doğumun 2 veya 3'ünde gözleendiği yayınlanmıştır (139). *T. gondii* ile konsepsiyondan en fazla üç ay önce karşılaşan hamilelerde fetal enfeksiyon riski oluştuğu gözlemlenmiştir (68, 176). Konsepsiyon döneminde veya gestasyonun ilk iki haftası içinde enfekte olan annelerde spiramycin kullanımının vertikal geçişi azalttığı, fakat son trimester de geçiş oranının % 60'lara kadar yükseldiği izlenmiştir (49, 80, 147). Birinci ve ikinci trimesterde gelişen maternal enfeksiyonun ciddi konjenital toxoplasmosis tablolarına yol açtığı, son trimesterde gelişen maternal enfeksiyonların bebekte çok belirgin anomalilere yol açmadığı izlenmektedir. Bu dönemde enfekte olan fetuslarda, yeni doğan döneminde % 85 subklinik konjenital toxoplasmosisin oluştuğu saptanmıştır (39, 49, 80). Başlangıçta sinsi ilerleyen enfeksiyonların, bebekler tedavi edilmediği takdirde, gelişme geriliğine, yaşamın 2 veya 3. dekadında retinokoroidite neden olduğu görülmektedir (124, 177). Kronik toxoplasmosisli hamilelerde vertikal geçiş, ancak annenin immun sisteminin baskılandığı (AIDS, kortikosteroid ve immunsupresiv tedavi alanlar) durumlarda söz konusu olabilmektedir (56, 120).

Toxoplasmik retinokoroidit tüm dünyada posterior üveitin en önemli sebepleri arasında gösterilmektedir. Sporadik veya salgınlarla ortaya çıkabileceği yayınlanmıştır. Brezilya'da posterior üveitlerin % 85'inden sorumlu tutulmaktadır. 2001 yılında Amerikan oftalmologlar birliği ve Bulaşıcı hastalık merkezlerinin (CDC: Centers for Disease Control) yaptığı bir araştırmada 2 yıl boyunca aktif toxoplasmik retinokoroidit saptanan vaka sayısının 30.000 olduğu ve buna ek olarak

250.000 hastada inaktif toxoplasmik retinokoroidit tanısı konduğu görülmüştür. A.B.D.'de toxoplasmosis prevalansının % 22.5, nüfusun da 280 milyon olduğu göz önüne alındığında, en az 1.26 milyon insanda toxoplasmik retinokoroidit olabileceği tahmin edilmiştir (81). Yurdumuzda üveitli hastalarda yapılan bir çalışmada, 59 hastanın 23'ünde (% 39) üveit sebebin *T. gondii* olduğu belirtilmiştir (162).

Toxoplasmosis organ transplantasyon alıcılarında da dikkat edilmesi gereken önemli bir hastalıktır. Seropozitif donörden, seronegatif alıcıya (D+/R-) bulaş genelde kalp, kalp-akciğer, böbrek, karaciğer ve karaciğer-pankreas nakillerinde sık gözlenmektedir. Latent enfeksiyonun reaktivasyonu (D-/R+ veya D+/R+) daha çok kemik iliği, hematopoetik kök hücre, karaciğer transplantasyonu yapılanlarda ve AIDS hastalarında görülmektedir. Nadir olmakla birlikte *T. gondii* kan ürünlerinin bağışlanması ile de bulaşmaktadır. Kontamine iğne, kırık cam parçaları ve enfekte hayvanlarla temas, laboratuvar çalışanlarında toxoplasmosise yol açabilmektedir (123).

1.1.4. Patogenez

T. gondii'nin insan ve hayvan modellerinde oluşturduğu patogenezde, parazit süşunun virülansı, parazitin konağa giriş miktarı, genetik altyapı, cinsiyet ve immunolojik durumun etkili olduğu görülmüştür (123). Parazitin ookist veya doku kisti formu ağız yolu ile alındıktan sonra yavaşça takizoit forma dönüştüğü, takizoitlerin bu dönüşüm sırasında barsak epitelyal hücrelerini aktif olarak işgal ettiği veya bir hücre tarafından fagosite edildiği anlaşılmıştır. Makrofajların aktif olarak işgal edilmesinin oksidatif öldürme mekanizmalarını uyarmadığı izlenmiştir (124). Parazitin hücre içinde kendi çevresinde bir parazitofor vakuol (PV) oluşturduğu,

konak hücre işgali sırasında takizoit içeriğinin PV'e ve PV dışına yayıldığı bildirilmiştir. PV içinde parazit tarafından salgılanan proteinler varken, konak hücreye ait normalde fagosome olgunlaşmasını uyaran, lizozomal füzyon-asidifikasyon sürecine yol açacak proteinler ise saptanamamıştır. Konak hücreyi işgal sırasında bugüne kadar parazite ait 21 yüzey antijeni (SAG), 12 mikronem antijeni (MIC), sekiz yoğun granül antijeni ve dokuz roptri antijeni gösterilmiştir. Bu proteinlerin bazılarının görevleri tablo 1.2'de tanımlanmıştır (123, 124).

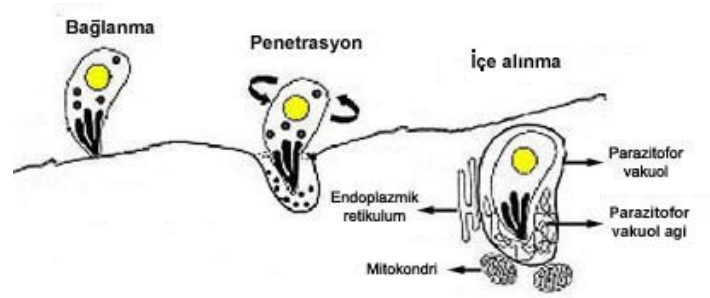
Tablo 1.2. *T. gondii* konak hücre invazyonunda rol alan proteinler

Protein	Görev	Referans
SAG1	Kuvvetli immunojen olmasına rağmen parazitin hücreye bağlanmasındaki görevi bilinmemektedir	119
SAG4A	Bradizoite özgü immunojenik protein	133
GRA1	PV ağında ve PV içinde serbest olarak bulunan kalsiyum bağlayan protein	29, 30
GRA2	Hem PV içinde çözülmüş olarak bulunup hem de PV ağına bağlı bulunur	159
GRA3	PV membranında yer aldığı izlenmiştir	1, 63, 101
GRA4	PV ağında bulunan ve mukozal IgA salınımını uyaran protein	29, 88, 117
GRA5	PV membranında yer aldığı saptanmıştır	1, 63, 101
GRA6	Transmembran kısımları ile PV ağında bulunduğu saptanmıştır	1, 102
GRA7	PV membranında yer aldığı izlenmiştir	1, 63, 101
NTPase	PV içinde çözülmüş olarak bulunduğu saptanmıştır	158
ROP1	PV oluşumunda yer alan ama transmembran kısmı olmayan protein	27
ROP2	PV oluşumunda görev alıp ve konak hücre mitokondrisi ile PV membran arasında ilişkiyi kurduğu izlenmiştir	129, 161
MIC2	TRAP* ailesinden adhesin proteini olup, parazit apikal bölgeden konak hücreye bağlanmada rol aldığı belirtilmiştir	27
MIC3	Kuvvetli adhesin proteini olup, parazitin konak hücreye tutunmasında rol aldığı görülmüştür	67
BAG1	Bradizoite özgü ısı şok proteini olup doku kisti oluşumunu uyardığı anlaşılmıştır	17
HSP70	Konak immun sistemini NO üretimini inhibe ederek baskıladığı gözlenmiştir	83

* Apikompleksa özgü trombospondin ilişkili anonim protein

T. gondii'nin bir hücreyi invazyonunu üç basamakta gerçekleştirdiği gösterilmiştir; **bağlanma**, parazitin aktin-myozin sistemi tarafından sağlanan **penetrasyon** ve **içe alınma** (Şekil 1.3). İlk basamakta, parazit konak hücreyle temasa geçmekte, bu aşamada SAG1'in bu bağlantıdaki varlığı gösterilmesine rağmen hala fonksiyonu tam olarak tanımlanamamıştır. Bağlanma sonrası *T. gondii*'den sırayla mikronem, roptri ve yoğun granül proteinlerinin salgılandığı (67, 104), parazit ile

konak hücre arasında oluşan sıkı bağlanma bölgesine, parazitin apikal bölgesinden mikronemal protein salgılandığı izlenmiştir. İkinci basamak olan konak hücre membranına penetrasyon sırasında parazitten roptri proteinleri salgılandığı ve PV oluşumunun tetiklendiği gösterilmiştir. İnvazyon sonunda tüm roptri proteinlerinin PV içine salgılandığı, invazyon başlangıç fazında gerçekleşen mikronem ve roptrilerden yapılan hızlı protein salınımına rağmen, yoğun granüllerden yapılan protein salınımının parazit tamamıyla PV içine alınana kadar oluşmadığı ve yaklaşık 20 dakika kadar geç başladığı gözlemlenmiştir. Takizoitin konak hücre içinde canlı kalmasında ve buna bağlı olarak toxoplasmosis patogenezinin oluşmasında, tarif edilen proteinlerin kritik rolleri olduğu belirlenmiştir (29).



Şekil 1.3. Konak Hücrenin *T. gondii* tarafından invazyonu (66)

Kronik enfeksiyondan sorumlu doku kistleri başlıca beyin ve kas dokusuna yerleşmektedir. Doku kisti oluşumu enfeksiyonun ilk haftası içinde herhangi bir organ veya dokuda başlayabilmektedir. Kronik enfekte insanların beyininden *T. gondii* izolasyonunun zor olduğu görülmüştür. Buna rağmen beyinden yapılan histolojik preparatlarda bazen kist formuna rastlanıldığı, klinik veya patolojik hiçbir bulgusu olmayan *T. gondii* seropozitif 52 hastanın yapılan otopsilerinde, beyin ve kas dokusundan % 10 oranında kist izole edildiği yayınlanmıştır (124).

1.1.5. Patoloji

Toxoplasmosis AIDS epidemisinden sonra daha da önem kazanmıştır. İmmun sistemi sağlam kişilerin patolojik bilgileri genelde lenf biyopsilerinden veya otopsi materyallerinden elde edilmekteydi. İmmun sistemi sağlam bireylerde toxoplasmosis en sık olarak lenfadenit şeklinde bulgu vermektedir. Histopatolojik kesitlerde; reaktif follüküler hiperplazi, kortikal ve parakortikal merkezlerde epiteloid histiosit infiltrasyonu, epiteloid histiositlerin oluşturduğu düzensiz kümelerin folikül sınırlarına birikip sınırı belirsizleştirmesi, subkapsüler sinüslerin mononükleer hücrelerce fokal distansiyonu tipik görünümü oluşturmaktadır (71, 123, 124).

İmmun sistemi sağlam bireylerde retinokoroiditin ciddi inflamasyon ve nekroza yol açtığı, nekrotizan retinit üzerine sekonder olarak koroidin granümatöz inflamasyonunun eklendiği bildirilmektedir. Granülomlarda histiositler, lenfositler ve plazma hücrelerinin görüldüğü, vitröz sıvı içine doğru eksüdasyon gelişebildiği veya vitröz içine doğru dallanan kapiller bir kitle geliştiği gözlenebilmektedir. Retinada nadiren de olsa takizoit veya doku kistine rastlandığı bildirilmiştir. Tekrarlayan retinokoroiditlerin patogenezi tartışmalıdır. Bazı otörler doku kistiden çıkan canlı parazitlerin inflamasyon ve nekrozu uyardığını, diğerleri ise bilinmeyen nedenle oluşan hipersensitivitenin retinokoroidite yol açtığını savunmaktadır. İmmun sistemi sağlam bireylerde kronik kardiomyopati, deri lezyonları ve dermatomyozit gelişebildiği yayınlanmıştır. AIDS hastalarında retinokoroiditin takizoit ve kist varlığına bağlı olarak oluşan panoftalmite ve koagülasyon nekrozuna neden olduğu görülmüştür. Konjenital toxoplasmosis doğumda veya çocukluk döneminde ortaya çıkıp tüm göz katmanlarını tutarak körlüğe yol açabilmektedir (71, 123, 124).

T. gondii'ye bağlı gelişen santral sinir sistemi hasarının özellikle bazal ganglion, orta beyin bölgeleri ve medulla spinaliste yoğunlaştığı izlenmektedir. Oluşan hasarda büyüklükleri milimetre ile 5 cm arası değişen çapta nekroz odakları, mikrogliya nodülleri ve lezyonların damarları tutması ile karakterizedir. Yeni doğanlarda periakuaduktal ve periventriküler vaskulit ve buna bağlı gelişen nekroz tipiktir. Nekrotik alanlar daha sonradan kalsifiye olup radyolojik tanıya uygun hale gelirken, bu bulgu patognomonik olarak kabul edilmektedir. Aqueductus Sylvius'un veya monro deliğinin tıkanmasının hidrosefali gelişimine neden olduğu görülmüştür. Takizoitler ve kistler genelde glial nodüller, perivasküler bölgeler ve inflamasyon gelişmemiş beyin dokusundaki nekrotik odaklar içinde veya yakınında gözlemlenmektedir. Periakuaduktal ve periventriküler vaskülitler toxoplasmosis için tanı koydurucu kabul edilmektedir. Nekrotik beyin dokusunun otoliz ile yıkılıp ventriküllere atılmasıyla, ventriküler sıvının protein içeriğinin arttığı ve bol miktarda *T. gondii* antijeninin saptanabildiği bildirilmiştir (71, 123, 124).

Toxoplasmik ensefalit, immün sistemi ciddi şekilde baskılanmış kişilerde multipl beyin apseleri ile kendini göstermektedir. Histopatolojik incelemeler beyin apselerinde üç farklı yapılaşma olduğunu saptamıştır. Bu tip hastalarda görülen lezyonlarda üç ayrı bölge gözlenmektedir. Merkezde avasküler alan, onun çevresinde bulunan hiperemik inflamasyon alanı, perivasküler alanda lenfositler, plazma hücreleri ve makrofajlar bulunmaktadır. Nekrotik alanların sınırlarında bol takizoit veya kist gözlenebilir. En dışta bulunan alanda *T. gondii* kistlerine rastlanılmaktadır. Apse çevresinde damar tutuluşuna bağlı olarak sekonder ödem, vaskulit, hemoraji ve infarkt bölgeleri bulunabileceği yayınlanmıştır (124, 165). AIDS'li bir olguda yaygın serebral hemisfer, özellikle bazal ganglia tutuluşu saptanmıştır (123). Konjenital

toxoplasmosiste beyinde nekroz en sık olarak korteks, bazal ganglia ve periventriküler alanlarda gözlemlenmiştir (123).

İmmun sistemi baskılanmış kişilerde toxoplasmosis santral sinir sisteminden sonra en çok kalbi tutmaktadır. Toxoplasmik myokardit özellikle kalp transplantasyonu ile önem kazanmıştır. Diğer myokardit, vakalarından ayrımının zor olduğu bildirilmiştir. İmmun sistemi baskılanmış hastalarda pulmoner toxoplasmosis interstisyel pnömoni, nekrotizan pnömoni, konsolidasyon ve pleural effüzyona sebep olduğu, takizoitlerin pneumositlerde, alveolar makrofajlarda, pleural sıvıda ve alveolar eksudada saptanabildiği yayınlanmıştır (71, 123). Bronkoalveoler lavaj (BAL) sıvısında PZR ile *T. gondii* DNA'sı saptanabilmektedir. İzole pankreas tutuluşu bu güne kadar sadece bir vakada saptanmışken, yaygın tutuluşların parçası olarak sık olarak karşımıza çıkmaktadır. İmmun sistemi baskılanmış kişilerde yaygın toxoplasmosise bağlı deri döküntüsü ve purpurik deri nodülleri görülebilmektedir. İmmun sistemi baskılanmış kişilerde gastrointestinal tutuluş mide antrum daralması, ince barsak mukozasında nekroz ve kolit olarak karşımıza çıkmaktadır. AIDS hastalarında myozit sık rastlanılan tablolar arasında sıralanmakta, karaciğer, testis, prostat, adrenal bezler, böbrekler, kemik iliği, mesane, periton ve pituitar bezinde toxoplasmosisten etkilendiği bildirilmektedir (71, 123, 124).

1.1.6. İmmunite

T. gondii'nin yol açtığı enfeksiyon konağı parazitin patolojik etkilerinden koruyan humoral ve hücreyel immunitiyi uyarmaktadır. Humoral ve hücreyel immunitenin gelişmesi ile sadece hücre veya kist içindeki parazitlerin kaldığı görülmüştür. Kuvvetli ve etkili bir immün yanıt *T. gondii*'nin periferik kandan

tamamıyla ortadan kalkmasına ve tüm dokulardaki takizoit miktarının önemli ölçüde azalmasına yol açmaktadır. İmmun sistemi sağlam kişilerde kazanılan immunitenin ömür boyu sürdüğü, reenfeksiyonun klinik olarak belirgin bir hastalığa yol açmadığı saptanmıştır (14, 42, 124).

T. gondii'ye karşı oluşan hücresele immunitede T hücrelerin rolü önce deney hayvanlarında saptanmış, daha sonra da AIDS hastalarından elde edilen verilerle doğrulanmıştır (124). *T. gondii* vücuda girdikten sonra bir şekilde parazitleri asidik vakuollerinde yıkan makrofajları aktive ettiği ve oluşan antijenik peptidlerin major histokompatibilite kompleks sınıf II'ye bağlanıp makrofaj yüzeyinden sunulduğu izlenmiştir (71). Antijenin CD4⁺ T lenfositine sunumu ile CD4⁺ T lenfositlerin, T helper 1 (Th1) hücreye dönüştüğü, hücre içi Th1 dönüşümünü uyararak T-bet (ana regüle edici protein), transkripsiyon sinyal transduser ve aktivatörü (STAT) 1 ve STAT4 adlı regülatörlerin belirgin şekilde uyarıldığı anlaşılmıştır. Hemen sonra IFN- γ salgılayan Th1 hücrelerin sayısındaki artış yanı sıra IFN- γ salgılayan ve *T. gondii* ile enfekte olmuş hücrelere karşı sitolitik etki gösteren CD8⁺ T hücrelerin oluşumunun artması gerçekleşir. Organizmanın *T. gondii* ile mücadele etmesi ve hayatta kalması için gerekli olan IFN- γ , *T. gondii* 'ye karşı geliştirilen dirençte en önemli sitokin olarak kabul edilmektedir (42, 93). Düşük IFN- γ salınımı, IL-12 yokluğunda da gerçekleşmesine rağmen, optimal IFN- γ salınımının IL-12 bağımlı olduğu bilinmektedir. Makrofajlar, dendritik hücreler ve nötrofiller başlıca IL-12 kaynakları olmasına rağmen, *T. gondii* bütün bu hücrelerden *in vitro* ortamda doğrudan IL-12 salınımını uyarabilmektedir. IL-12'ün ana rolü STAT4'ü aktive ederek, CD4⁺ hücrelerin Th1 hücrelere dönüşümünü arttırmak olarak hesaplanmıştır. IL-12 ayrıca doğal katil (NK) hücreleri ve Th1 hücreleri doğrudan uyararak, bu iki hücreden IFN- γ salınımını artmakta, IFN- γ salınımı makrofajları aktive edip, paraziti

öldürmektedir (42, 137). Fare çalışmaları, IL-12'nin antikorlarla bloke edildiği durumlarda toxoplasmosise karşı direncin azaldığını göstermiştir. Başka bir çalışmada Th1 farklılaşmasında ana regüle edici protein olan T-bet'in *T. gondii* enfeksiyonu sırasında oluşan IFN- γ ile uyarıldığı saptanmıştır (42, 43, 137).

T. gondii'nin oluşturduğu patogenez ve toxoplasmosise karşı oluşan, korunmada rol alan sitokinlerden bir diğeri de tümör nekroz faktör alfa'dır (TNF- α). Nitrik oksit (NO) makrofajın *T. gondii*'yi öldürürken kullandığı en önemli mekanizma olduğu bulunmuştur. Makrofajların NO üretmesi için TNF- α 'nın gerekli olduğu görülmüştür. TNF- α bloke eden antikor verilen farelerin *T. gondii*'ye karşı dirençlerinin azaldığı ve beyinde saptanan kist sayısı arttığı gösterilmiştir (7, 31, 87, 137). Toxoplasmosise karşı geliştirilen korunmada IL-1, IL-4, IL-6, IL-7 IL-10 ve IL-15'in rolleri de belirlenmiştir. Toxoplasmosise karşı gelişen hücrel immunité, Th1 ve özellikle CD8⁺ T hücreler tarafından oluşturulduğu ve bu yanıtta IL-12'nin anahtar rolü oynadığı görülmüştür (124).

Humoral immün cevap sırasında konak hücreden parazitin serbestlenmesi sonucunda immunglobulin G (IgG), IgM, IgA ve IgE gibi spesifik antikorların kompleman ile birleşmesi sonrasında takizoitleri yıkıldığı gösterilmiştir. Bu özellik Sabin Feldman Dye testinin hazırlanmasında kullanılmıştır. Fare modellerinde humoral immunitenin, düşük virülanslı *T. gondii* suşlarına karşı kısmi koruma sağladığı, virülanslı yüksek suşlara karşı korunma sağlamadığı izlenmiştir. *T. gondii* spesifik IgM antikorları varlığının akut enfeksiyonun göstergelerinden biridir. Enfeksiyonun ilk bir haftasında artış gösteren IgM antikorları, hızla yükselip daha sonra bir iki yıl içinde azalarak kaybolurken, IgG antikorları arttıktan sonra ömür boyu yüksek kaldığı gösterilmiştir. IgA antikorlarının bir yıl veya daha fazla süre ile pozitif kalabildiği gözlenmiştir (124). Chardes ve ark. *T. gondii* ile enfekte edilmiş

farelerde oluşan antikor yanıtı incelemişler, IgG antikorların ilk olarak enfeksiyonun 14. gününde saptandığını, 28. günde plato seviyesine ulaştığını ve araştırma sonuna kadar bu seviyede kaldığını görmüşlerdir. Buna karşın *T. gondii* spesifik IgM antikorları 14. günde ani bir artış yapmış ve kaybolana kadar giderek azalmıştır. IgA antikorları da ilk olarak 14. günde saptanmış, 42. günde ani artış göstermiş ve deney süresince yüksek kalmıştır. (32).

1.1.7. Klinik

Klinik semptomların hastanın immun durumu ile çeşitlilik gösterdiği bildirilmektedir (123). İmmun sistemi sağlam olanlarda hastalığın belli belirsiz bulgularla geçebileceği, immun sistem yetmezliği olanlarda ise hastalığın şiddetli semptomlarla seyrettiği gözlemlenmektedir. Parazitin yarattığı klinik tablolar; 1) İmmun sistemi sağlam kişilerde oluşan toxoplasmosis, 2) İmmun sistemi baskılanmış kişilerde oluşan toxoplasmosis, 3) Oküler toxoplasmosis (toxoplasmik retinokoroidit), 4) Konjenital toxoplasmosis şeklinde sınıflandırılabilir.

İmmun sistemi sağlam erişkinler (hamileler dahil) ve çocuklarda primer *T. gondii* enfeksiyonun genelde asemptomatik seyrettiği bilinmektedir. Sadece % 10–20 vakada kendiliğinden iyileşen, tedaviye gerek olmayan hastalık bulgularına yol açtığı bildirilmiştir. En sık gözlenen bulgunun, izole servikal veya oksipital lenfadenopati olduğu, ama diğer lenf bezlerinin de tutulabileceği yayınlanmıştır. Ayrıca subfebril ateş, gece terlemesi, halsizlik, boğazda yanma gibi gribal enfeksiyonu taklit eden bulgular yanında, kas ağrısı, makulopapüler deri döküntüsü, karaciğer ve dalak büyümesi gibi bulgular da saptanabilmektedir. Lenfadenopati sırasında bezlerin hassas olmadığı, sertliklerinin değişken olduğu, nadiren 3 cm çaptan büyük oldukları, süpüre

olmadıkları ve genellikle 4-6 hafta içinde küçüldükleri bildirilmektedir. Kronik lenfadenopatide ise lenf bezinin aylarca büyüüp daha sonra küçülerek kalabildiği, nadiren bir yılı aşan lenfadenopati vakalarının olabileceği ve bu hastalarda myokardit, polmyozit, pneumonit, hepatit veya ensefalit oluşabileceği yayınlanmıştır (123, 124). Lenfadenopati, Hodgkin ve diğer lenfomalar, enfeksiyöz mononükleoz, *Cytomegalo virüs* (CMV) enfeksiyonu, kedi tırnığı hastalığı (cat scratch disease), sarkoidozis, tüberküloz, tularemi, metastatik karsinom veya lösemi ile karışabilmektedir. Bossi ve Bricaire, Fransız Guyanası'nda yeni bir virülan *T. gondii* suşunun immun sistemi sağlam 19 kişide ciddi yaygın toxoplasmosise sebep olduğunu belirtmişlerdir. Hastalarda yüksek ateş (39–40°C), myalji, arthralji, halsizlik, kuru öksürük, dispne, yaygın lenfadenopati, hepatosplenomegali, ve makülopapüler deri döküntüsü sonrası bazı hastalarda akut respiratuar distress sendromu tablosuna yol açan iki taraflı interstisyel pnömoni, iki taraflı perikardial effüzyon, myozit, myokardit, retinokoroidit, Guillain-Barré sendromu ve konfüzyon saptamışlardır (19, 123, 124). Son zamanlarda yapılan araştırmalarda da toxoplasmosis ile şizofreni arasında bir ilişki kurulmaya çalışılmaktadır (11, 22, 171).

İmmun sistemi baskılanmış veya yetmezlik olan hastalarda oluşan klinik hayati tehdit eder nitelikte seyredilmekte, tedavi edilmeyen olgularda ölüm vakaları görülebilmektedir. Bu şekilde tedavi olmamış 89 hastanın % 99'unun öldüğü bildirilmiştir (124). Bu hastalarda klinik tablo genelde kronik enfeksiyonun reaktivasyonu şeklindedir, nadiren kazanılmış enfeksiyon şeklinde de oluşabilir. AIDS dışı nedenlerle immun sistemi baskılanan kişilerde (organ transplantasyonu veya kanser hastalarında) sırasıyla santral sinir sistemi, kalp, akciğerin en sık tutulan organlar olduğu görülmüştür. Kemik iliği transplant alıcılarında toxoplasmosisin genelde latent enfeksiyonun reaktivasyonu şeklinde oluştuğu, kalp transplant

alıcılarında ise genelde seronegatif alıcının, seropozitif donörden kalp alması sonucu olduğu yayınlanmıştır. AIDS hastalarında ise en sık tutulan organların beyin (toxoplasmik ensefalit), akciğer (pnömoni) ve göz (retinokoroidit) olduğu yayınlanmıştır (123). Toxoplasmik ensefalit (TE) klinik bulguları, mental durum değişikliği, epilepsi nöbetleri, kuvvet azalmasına yol açan fokal motor hasarlar, beyin sapı tutuluşu, kafa çifti bozuklukları, duyu bozukluğu, serebellar semptomlar, hareket bozuklukları ve nöropsikiatrik semptomlar (paranoid psikoz, demans, anksiyete ve ajitasyon) şeklinde özetlenebilmekte, meninks tutuluşu nadir görülmektedir (123, 124). Hastalığın başladıktan sonra günler, haftalar içinde yavaşça geliştiği belirtilmekle birlikte, % 15–25 vakada kliniğin daha hızlı oturduğu görülmektedir. Genelde ilk bulguların hemiparezi ve/veya konuşma bozukluğu olduğu saptanmıştır. Nadiren parkinsonizm, fokal distoni, tremor, hemikore-hemiballismus, panhipopituitarizm veya diabetes insipidus izlenebilmektedir. Diffuz TE, AIDS hastalarında nadir görülmesine rağmen yaygın serebral disfonksiyon ile karakterize olup, ölümün hızlı geliştiği bir tablodur. Toxoplasmosisin multiorgan tutuluşuna yol açması, akut solunum yetmezliği ve septik şok benzeri klinik tablolara da zemin hazırlamaktadır. Medulla spinalis tutuluşları tek veya daha fazla eklemi tutan motor ve duysal bozukluklara, mesane ve kolon disfonksiyona yol açabilmektedir. Servikal-torasik myelopati ve conus medullaris sendromunun gelişebildiği yayınlanmıştır. Ayırıcı tanıda santral sinir sistemi lenfoması, progresif multifokal lökoensefalopati, CMV ensefaliti, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus spp.*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Nocardia spp.* ve bakterial beyin abseleri göz önünde bulundurulmalıdır (98, 123, 124).

Toxoplasmik pnömoninin anti toxoplasma tedavisi almayan AIDS hastaları ile kemik iliği transplant alıcılarında sık görüldüğü izlenmiştir. Uzamış ateş, öksürük ve dispne önemli klinik bulgulardır. Ayırıcı tanıda *Pneumocystis carinii* pnömonisi,

tüberküloz, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis* ve *Histoplasma capsulatum* düşünülmesi önerilmektedir (124). Toxoplasmik retinokoroidit TE birlikte AIDS hastalarında sık gözlenmektedir. Gözde ağrı, görme kaybı ve fundoskopik incelemede multifokal veya bilateral nekrotizan lezyonlar görülebilir. Ayırıcı tanıda CMV retinit, Sifiliz, *Herpes simplex*, *varisella zoster* ve mantar enfeksiyonlarının göz önünde tutulması tavsiye edilmektedir. AIDS hastalarında gastrointestinal tutuluş sonucu karın ağrısı, asit (mide, periton veya pankreas tutulumuna bağlı) veya diyare oluşabildiği, akut karaciğer yetmezliğinin görülebildiği bilinmektedir (71, 98, 123, 124).

Oküler toxoplasmosis, konjenital veya doğum sonrası akkiz enfeksiyona bağlı gelişmektedir. Akut retinokoroidit sırasında görmenin bozulduğu, skotom, ağrı, fotofobi ve epifora gelişebildiği, makula tutuluşunda santral görmenin azaldığı veya kaybolduğu görülmüştür. Anne karnında enfekte olmuş hastalarda retinokoroidit hayatın geç 2. ve 3. dekatlarında bilateral tutuluş yapan, eski retinal skarlarla beraber yeni alanların da görüldüğü ve sıklıkla makula tutuluşunun eşlik ettiği olgular şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Akkiz toxoplasmosise bağlı oluşan retinokoroiditin hayatın daha çok 4. ve 6. dekatları arasında, tek taraflı ama makulayı tutmayan ve eski skarlar içermeyen lezyonlar şeklinde karşımıza çıktığı bildirilmektedir. Erişkinlerde akut toxoplasmosis genellikle subklinik seyreden, glokoma, kısmi veya tamamen görme kaybına yol açabilen, enükleasyon gerektirebilen tablolara yol açmaktadır. Tekrarlayan lezyonların genelde eski retinokoroidal lezyonların çevresinde kümeler şeklinde oluştuğu bildirilmiştir. Göz muayenesinde, beyaz fokal lezyonlar ve yoğun vitreal inflamasyon oluşmakta, sisteki far bulgusu tipik kabul edilmektedir. Retinada sarı-beyaz renkte, pamuk parçasına benzer, sınırları belirsiz aktif lezyon ve vitreustaki yoğun inflamasyon tanı koydurucu olarak yorumlanmıştır. İyileşen lezyonların

soluklaştığı, atrofiye olduğu ve siyah pigmentasyona yol açtığı görülmüş, ayırıcı tanıda tüberküloz, sifiliz, lepra, histoplasmosis sendromunun araştırılması önerilmiştir (71, 98, 123, 124).

Konjenital toxoplasmosis gebelik sırasında enfekte olan anneden plasenta yolu ile bebeğe *T. gondii* bulaşması sonucu meydana gelen klinik tablodur. Fötal bulaş için tehlikeli dönemin konsepsiyondan 6–8 hafta önce başladığı saptanmıştır (68, 78, 124, 176). Hasarın şiddeti, oluşma riski, annenin enfekte olduğu trimestere bağlıdır. Birinci ve ikinci trimesterde enfekte olan annelerin bebeklerinde daha ciddi patolojilerin olduğu, üçüncü trimesterde enfekte olan annelerin bebeklerinde ise hastalığın nispeten basit patolojilere yol açtığı ve subklinik seyrettiği anlaşılmıştır. Erken tedavi edilmeyen olguların yaklaşık % 85’inde gelişme geriliği veya ileri yaşlarda retinokoroidit görülmektedir. En ciddi fötal patolojilerin gebeliğin 10–24 haftalarında geçirilen akut toxoplasmosise bağlı olduğu gözlemlenmiştir. 26–40 hafta arası bulaşlarda fötal hasarın en az olduğu yayınlanmıştır (124). Tedavi edilmeyen gebelerin bebeklerinde konjenital toxoplasmosis riski birinci trimesterde % 10–25, ikinci trimesterde % 30–54, üçüncü trimesterde % 60–65 olarak hesaplanmıştır. Sonuçta gebelik ilerledikçe bulaş riskinin arttığı, gelişen patolojilerin şiddetinin ise azaldığı saptanmıştır.

Yeni doğanda saptandığında konjenital toxoplasmosis tanısı koyduran bulgular arasında: hidrosefali, intrakranial kalsifikasyonlar, retinokoroidit (klasik triad), mikrosefali, strabismus, körlük, epilepsi, psikomotor veya mental retardasyon, trombositopeniye bağlı peteşiler, anemi, sarılık, ensefalit, duyma bozukluğu, pnömoni, diyare, hipotermi ve deri döküntüsü ön plana çıkmaktadır. Bazen doğumda tamamen sağlıklı görülen bebeklere rastlanmakta, bunlarda ileri yaşlarda sekeller gelişmektedir. Fötal toxoplasmosis spontan düşüklere, ölü doğumlara veya erken doğumlara sebep

olabilmektedir. HIV ile enfekte annelerde reaktivasyon sonucu fötal bulaş bildirilmiştir. Bu bebeklerde AIDS kliniğine bağlı olarak konjenital toxoplasmosisin yarattığı klinik tablonun şiddetinin arttığı ve gelişme geriliği, ateş, hepatosplenomegali, retinokoroidit, epilepsi atakları ve multiorgan tutuluşları (santral sinir sistemi, kalp ve akciğer) bildirilmektedir. Ayırıcı tanıda *Herpes simplex virüs* enfeksiyonu, CMV, Kızamıkçık, Sifiliz ve Listeriosis'in göz önünde bulundurulması önerilmektedir (124).

1.1.8. Tanı

Toxoplasmosis tanısında yaklaşım hastanın immun durumu ile yakından ilgilidir. Tanı yöntemleri direkt ve indirekt tanı teknikleri olarak ikiye ayrılır. İmmun sistemi sağlam olan bireylerde toxoplasmosis tanısı genelde indirekt tanı teknikleri ile sağlanırken, immun sistemi baskılanmış olan hastalarda ise toxoplasmosis tanısında genelde direkt tanı teknikleri tercih edilmektedir. İndirekt tanı teknikleri serolojik testler yardımı ile toxoplasmosise karşı oluşan antikorların varlığını araştırırken, PZR, hibridizasyon, izolasyon ve histoloji gibi direkt tanı teknikleriyle parazitin kendisi veya parçalarının varlığı gösterilmeye çalışılmıştır.

1.1.8.1. İndirekt tanı

T. gondii'ye özgü antikorların serolojik yöntemlerle saptanması primer tanı metodudur. İndirekt tanı sırasında çok sayıda serolojik yöntemden faydalanılır. Yöntemlerin fazlalığı *T. gondii*'ye özgü antikorların sağlıklı kişilerde uzun süre yüksek titrede seyretmesine bağlıdır. Bunun yanında, var olan yöntemlerin yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuç verme olasılıklarını en aza indirmek için birden

fazla yöntemin birlikte kullanılması önerilmektedir. *T. gondii* tanısını tek başına koyacak bir serolojik test yoktur. Örneğin Kalifornia, Palo Alto'da bulunan Toxoplasma Referans Merkezi, serolojik tanıda içinde altı farklı serolojik test bulunan bir panel yapmaktadır (124).

T. gondii'ye özgü IgG antikor saptanmasında kullanılan serolojik testler; Sabin-Feldman Dye testi, İndirekt Florösan antikor testi (IFA), modifiye direkt aglütinasyon testi (formalin ile korunmuş takizoit kullanır), differential aglütinasyon testi (AC/HS testi, aseton ve formalin ile korunmuş takizoit kullanır) ve IgG ELISA, IgG Avidite testidir. Anti-toxoplasma IgM antikorunun saptanmasında ise İndirekt Florösan antikor testi (IFA), IgM ELISA ve IgM immunosorbent aglütinasyon testi (IgM-ISAGA), anti-toxoplasma IgA antikorları için IgA ELISA ve IgA-ISAGA, anti-toxoplasma IgE antikorları için ise IgE ELISA ve IgE-ISAGA tercih edilmektedir.

İndirekt ve direkt tanı yöntemlerinin toxoplasmosis tanısındaki önemi Tablo 1.3'de özetlenmiştir. IgG antikor taraması hamile kadınlarda ve immun sistemi baskılanan hastalara önerilmektedir. Gebelik öncesi ve erken gebelik döneminde IgG antikorların saptanmaması bize gebelik sırasında enfekte olabilecek kadın prevalansını verir. Diğer bir önemli nokta ise AIDS veya AIDS dışı nedenle immun sistemi baskılanmış (Kİ transplant hastaları) kişilerde IgG saptanması bu kişilerdeki latent enfeksiyonun reaktivasyonu riski altında olduğunu göstermesidir. IgM varlığına rağmen, yüksek avidite hastalığın 3–4 aydan daha eski bir geçmişi olduğunu belirtmektedir. Böylelikle tanı ve tedaviye yön verici veriler elde edilir. IgM antikorlarının enfeksiyonun başlangıcından yıllar sonra bile pozitif kalabilmesi veya yanlış pozitif sonuçlar elde edilmesi hekimlerin hastaya yaklaşımlarında yanlış yorumlamalara sebep olmaktadır. IgM ISAGA yeni doğanlarda konjenital enfeksiyon

tanısında spesifik ve sensitif kabul edilen bir testtir. Yeni doğanlarda anneden gelen IgG antikorları kanda 6–12 ay kalabildiği için en iyi sonuçlar IgM ve IgA testlerinin birlikte yapılması ile alınmaktadır. Konjenital toxoplasmosis şüpheli bebekte IgG pozitif, IgM ve IgA negatif ise anne ve bebekten alınan serum örneklerinde western blot kullanılarak IgG antikor karşılaştırmasının yararlı olacağı belirtilmiştir. IgE antikorlar seviyesinin ölçümünün serolojik tanıda diğer serolojik testlerle birlikte yapılmasının anlamlı olacağı üzerinde durulmaktadır (123, 124).

1.1.8.2. Direkt tanı

Hasta kişiden elde edilen doku (kemik iliği aspirasyon materyali, plasenta, beyin ve endomyokard biyopsi örneği) veya vücut sıvısı (amnion sıvısı, periferik kan, beyin omurilik sıvısı, idrar, vitröz sıvı, BAL, pleural sıvı, asit) örneğinde *T. gondii*'nin görüldüğü, izolasyonu veya DNA'sının gösterildiği yöntemler direkt tanı yöntemlerini oluşturur. Son yıllarda PZR çalışmalarında B1 ve AF146527 genleri hedeflenmektedir. Plasenta veya fetustan alınan örneklerin fare veya hücre kültürüne inokülasyonu ile takizoit izolasyonu, takizoitlerin veya doku kistlerinin biyopsi veya vücut sıvısı örneklerinde histolojik yöntemlerle (Floresan antikor, immunperoksidaz, florescein-işaretli monoklonal antikorlar, Wright-Giemsa boyama ve elektron mikroskopi) incelemesi yapılmaktadır. Ayrıca toxoplasmosis tanısında antijen spesifik lenfosit transformasyonu ve lenfosit tiplmesi (lenfositlerin *T. gondii* antijenleri ile uyarılması sonucu oluşan lenfosit proliferasyonu ölçümü ve lenfosit alt tiplerinin belirlenmesi), oftalmolojik muayene, radyoloji ve beyin omurilik sıvısının (BOS) incelenmesinden de faydalanılmaktadır (71, 98, 123, 124).

Radyolojik yöntemler genelde santral sinir sistemi tutuluşu olan toxoplasmosis vakalarında yararlı kabul edilmektedir. Ultrasonografi konjenital toxoplasmosisin prenatal tanısında değerli bir yardımcı tanı yöntemidir. Ultrasonografi ile yapılan muayenede intrakranial kalsifikasyonlar, ventriküler genişleme, karaciğer büyümesi, asit ve plasenta kalınlığının artması konjenital toxoplasmosis lehine kabul edilmektedir. Kalsifikasyonların saptanmasında radyografi ve bilgisayarlı tomografi (BT) anlamlı sonuçlar vermektedir. TE olan hastalarda BT’de multipl bilateral, nadiren tek ve büyük serebral lezyonlar saptanabilir. Lezyonların genelde bazal ganglionu içine alan kortikomedüller bölgede yoğunlaştığı ve tipik olarak hipodens görüntü verdiği bilinmektedir. Gadolinium ile yapılan Manyetik rezonans görüntülemenin (MRG) TE tanısında BT’den daha değerli olduğu bildirilmiştir. MRG ile TE’de tipik multipl halka tarzı lezyonlar saptanmaktadır. Şartların uygun olduğu hastalarda MRG ilk tanı metodu olarak kullanılması önerilmektedir. BT ve MRG gibi gelişmiş radyolojik teknikler bile TE kesin tanısını koymakta yetersiz kalabilmektedir. Ayırıcı tanıda santral sinir sistemi lenfomasının ekarte edilmesi gerekmektedir. Tek lezyonların santral sinir sistemi lenfoması olma olasılığı daha yüksek kabul edilmekte, TE kesin tanısı için beyin biyopsisi değerli ama invazif bir yöntem olduğundan son çare olarak yapılması önerilmektedir. Bunların yanında pozitron emisyon tomografi (PET) taraması, radyonüklid tarama (santral sinir sistemi lenfoması Thallium 201’i daha çok tutar) ve manyetik rezonans spektroskopi’si TE tanısında kullanılmaktadır. Bazı hastalarda ampirik tedaviye olumlu cevap alınmasıyla da TE tanısı konulabilmektedir (71, 98, 123, 124). TE hastalarındaki oluşan BOS değişiklikleri toxoplasmosise özgü olmamakla birlikte hafif mononükleer pleositoz ve hafif-orta derecede protein artışı görülmekte, toxoplasmosisli yeni doğanlarda ventriküler sıvıda protein içeriğinin çok yüksek olması anlamlı kabul edilmektedir (124).

Tablo 1.3. Toxoplazmosis tanısında indirekt ve direkt tanı yöntemlerinin yeri. *Montoya*'dan alınmıştır (123).

	Antikor tipi / test	Tarama	Gebelik	Yeni doğan	Göz tutuluşu	İmmün yetmezlik
İndirekt tanı	IgG	+	+ (risk altındaki kadınların ve korunanların)	+ (maternal antikorlar bebekte 12. aya kadar kalabilir; maternal veya fetal IgG ayrımının WB ile yapılması)	+ (düşük titrede pozitiflikler genelde konjenital enfeksiyonun reaktivasyonunda saptanır; göz içi antikor üretimi [göz ve kan antikor titresi oranı])	+ (reaktivasyon riski olan hastaların tanısında; AIDS ve KI transplant hastaları)
	IgG avidite	-	+ (yüksek avidite sonucu 3-4 ay öncesi enfeksiyon düşündürmez; düşük avidite antikorlar kalabilir)	-	+ (yüksek avidite sonucu 3-4 ay öncesi enfeksiyon düşündürmez; düşük avidite antikorlar kalabilir)	-
	IgM*	-**	+ (IgM antikorları uzamış sürelerde kalabilir, negatif IgM hamile kadında ilk 2 trimesterde enfeksiyon olmadığını gösterir)	+ (ISAGA enzim immün assay'den daha sensitif; maternal veya fetal IgG ayrımının WB ile yapılması)	+ (yüksek titrede pozitiflik akut kazanılmış enfeksiyon, negatif sonuç konjenital enfeksiyonun reaktivasyonunda saptanır)	+ (IgM sonucunun değeri düşüktür; aktif veya latent hastalık olabilir veya olmayabilir)
	IgA	-	+ (IgA antikorları uzun süre kalabilir)	+ (IgM testlerine göre daha değerlidir)	-	-
	IgE	-	+ (yüksek spesifite, düşük sensitivite)	-	-	-
Direkt tanı	PZR	-	+ (amnion sıvısı)	+ (kan, idrar)	+ (özellikle atipik retinal lezyonlu hastalarda önemli veya tedaviye suboptimum cevap verenler [vitreous veya aköz sıvı, vitröz sıvı tercih edilir])	+ (Beyin omurilik sıvısı, BAL, oküler sıvılar, asit, pleural sıvı, periton sıvısı, KI aspirasyonu, periferik kan ve/veya doku)
	Histoloji (immuno-histo kimyasal***) / hücre kültürü veya hayvan inokülasyonu	-	+ (fötal kayıp durumunda plasenta ve fetal dokular)	-	-	+ (herhangi etkilenmiş doku)
Tavsiyeler / amaçlar		Seroprevalans tespiti / epidemiyolojik çalışmalar	Erken gebelikte tarama için IgG ve IgM antikorlarının birlikte aranması	IgM ve IgA antikorların birlikte aranması sensitiviteyi artırır	Yeni kazanılmış ve konjenital hastalık arasında serolojik ayırım yapılabilir	Direkt tanı yöntemleri indirekt tanı yöntemlerinden daha sensitif

* Ticari kit sonuçlar çok değişken.

** IgM saptanması yeni doğan taraması için kullanılabilir.

*** *T. gondii*'ye özgü antikorlar ile.

1.1.9. Tedavi

Mevcut tedavi ajanlarının primer olarak takizoitleri hedeflediği, doku kistlerinin eradikasyonunda başarısız olduğu bilinmektedir. Klasik tedavi protokolünde 4–6 hafta boyunca uygulanan pyrimethamine, sulfadiazine ve folinic asit (kemik iliği depresyonunu azaltmak için) kombinasyonu akut enfeksiyonda en etkili tedavi seçeneği olarak kabul edilmektedir (70, 98, 123, 124).

Konu tartışmalı olsa da, akut toxoplasmosis tanısı alan hamilelerin en kısa sürede spiramycin ile tedavisine başlanılıp gebelik sonuna kadar devam edilmesi önerilmektedir. Spiramycin plasentayı geçemediğinden için fetal enfeksiyon tanısının kesinleşmesi durumunda tedavide pyrimethamine, sulfadiazine ve folinic asit kombinasyonu tercih edilmekte fakat bu kombinasyon teratojenik olduğu için gebeliğin ilk 12–14 haftasında kullanımından kaçınılması önerilmektedir. Otoriteler, gebelikte ilk trimester ve ikinci trimesterin erken döneminde saptanan veya şüpheli akut toxoplasmosis olgularında spiramycin, ikinci trimester geç dönemde veya üçüncü trimesterdeki benzer tablolarda ise pyrimethamine, sulfadiazine ve folinic asit kombinasyonunu tavsiye etmektedirler. Ultrasonografik ve serolojik sonuçlar akut toxoplasmosis lehineyken, PZR'nin negatif olduğu olgularda 17. haftaya kadar spiramycin (A.B.D.'de ve Fransa'da gebelik sonuna kadar; Almanya ve Avusturya'da 17. hafta sonunda ek olarak 4 haftalık pyrimethamine/sulfadiazine) kullanılmaktadır. PZR sonucu pozitif veya fetusun enfekte olması büyük olasılık ise (gebeliğin 12–18 ayları sonrası) gebelik sonuna kadar pyrimethamine ve sulfadiazine kullanması önerilmektedir (Tablo 1.4). Ultrasonografi ile fetusun muayenesinde hasar saptanmadıysa, doğuma kadar her ay ultrasonografi ile fetus incelenmeli ve hidrosefali gibi toxoplasmosis tanısı koyduracak bir bulgu elde edilirse gebelik sonlandırılması önerilmektedir. Fötal hayatta konjenital toxoplasmosis tedavisi

olan infantların, doğduktan sonra bir yıl süre ile özgün tedavi almalarının iyi olacağı bildirilmiştir (70, 98, 123, 124).

Toxoplasmik retinokoroidit tedavisinde pyrimethamine, sulfadiazine ve folinic asit kombinasyonunun yanında inflamasyonun azaltılması için kortikosteroid (prednisone) tedavisi de önerilmektedir (Tablo 1.4). Oftalmologlar şiddetli inflamasyon, retinal lezyonların fovea veya optik diske yaklaşması durumunda tedaviye başlamakta, immun sistemi sağlam bireylerde ufak periferik lezyonlar görme açısından tehdit oluşturmuyorsa hastalık kendini sınırladığı için tedavi vermekten kaçınılmaktadırlar. Göz tutuluşlarında klindamycin veya trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) 3 hafta boyunca uygulandığında olumlu sonuçlar alınmıştır. İmmun sistemi baskılanmış (transplant alıcıları) veya immun sistem yetmezliği (AIDS) olanlarda, akut toxoplasmosis sonucunda, TE gelişmesi durumunda uygulanan klasik tedavi; pyrimethamine, sulfadiazine ve folinic asit kombinasyonudur (Tablo 1.4). İmmun yetmezlikli kişilerde akut toxoplasmosis tedavisine rağmen % 80'den fazla relaps görüldüğü yayınlanmıştır (124). Bu hastalarda sekonder profilaksinin çok önemli olduğu, immun yetmezliği olan hastaların (AIDS) ömür boyu, transplant hastalarının immunsupresyon bitene kadar sekonder profilaksiye alınmasının doğru olacağı bildirilmektedir (Tablo 1.5). Ancak bu hastaların % 20-30'unda ilaç toleransı sonucu TE relapsları görülmüştür (70, 98, 123, 124).

İmmun yetmezlik veya baskılanma sırasında akut toxoplasmosis geçirmeden uygulanan tedaviye primer profilaksi denmektedir. Seropozitif donör (D+) ve seronegatif alıcı (R-) toxoplasmosis gelişme riski en yüksek hasta grubu olup, TMP-SMX ile bu hasta grubunda yapılan profilaksinin başarısı yayınlanmıştır. D-/R-, D-/R+ veya D+/R+ transplant gruplarında toxoplasmosis oluşumu nadiren bildirilmiştir. Transplantasyon sonrası pyrimethamine'nin her gün 25 mg 6 hafta boyunca kullanılması etkili bulunmuştur (70).

Tablo 1.4. Toxoplazmosis tedavi protokolleri. *Gürüz ve Montoya'dan alınmıştır (70, 123)*

	İlaç	Doz	Süre
Akut semptomatik kazanılmış enfeksiyon	Tedavi tavsiye edilmez	–	–
Akut semptomatik kazanılmış enfeksiyon (semptomlar ciddi ise veya hayati organlara zarar olursa)	Pyrimethamine	200 mg/gün yükleme dozundan sonra 50–75 mg/gün	Semptomlar yatıştıktan sonra 1–2 hafta
	<i>artı</i> Sulfadiazine	1–1.5 gr/gün PO	Semptomlar yatıştıktan sonra 1–2 hafta
	<i>artı</i> Folinic asit (Leucovorin)	5–20 mg haftada üç kere	Pyrimethamine tedavisi süresince ve bittikten sonra 1 hafta
Alternatif tedavi protokolü	TMP-SMX	TMP: ilk üç hafta 16 mg/kg/gün, takiben 5 mg/kg/gün SMX: : ilk üç hafta 80 mg/kg/gün, takiben 25 mg/kg/gün	21–52 gün
Hamilelerde akut toxoplazmosis¹	Spiramycin	1 grx3/gün, aç karnına	Doğum sonuna kadar ² veya fetal enfeksiyon kanıtlanana kadar
Tanısı konmuş fetal enfeksiyon (gestasyonun 12 veya 18. haftaları sonrası)³	Pyrimethamine	Yükleme dozu: 100 mg/gün iki dozda 2 gün süreyle, takiben 50 mg/gün	Doğuma kadar
	<i>artı</i> Sulfadiazine	Yükleme dozu: 75mg/kg/gün iki dozda 2 gün süreyle (maks. 4 gr/gün), takiben 100 mg/kg/gün iki dozda (maks. 4 gr/gün)	Doğuma kadar
	<i>artı</i> Folinic asit (Leucovorin)	Günde 5–20 mg	Pyrimethamine tedavisi süresince ve bittikten sonra 1 hafta
İnfansta konjenital toxoplazmosis⁴	Pyrimethamine	Yükleme dozu: 2 mg/kg/gün 2 gün süre ile, takiben 1 mg/kg/gün 2–6 hafta ve sonra bu doz gün aşırı verilecek	1 yıl
	<i>artı</i> Sulfadiazine	100 mg/kg/gün iki dozda	1 yıl
	<i>artı</i> Folinic asit (Leucovorin)	10 mg haftada üç kere	Pyrimethamine tedavisi süresince ve bittikten sonra 1 hafta
	Kortikosteroidler * (Prednisone)	1 mg/kg/gün iki dozda	Bulgular yatışana kadar
Erişkinde toxoplazmik retinokoroidit	Pyrimethamine	200 mg/gün yükleme dozundan sonra 50–75 mg/gün	Semptomlar yatıştıktan sonra 1–2 hafta
	<i>artı</i> Sulfadiazine	1–1.5 gr/gün PO	Semptomlar yatıştıktan sonra 1–2 hafta
	<i>artı</i> Folinic asit (Leucovorin)	5–20 mg haftada üç kere	Pyrimethamine tedavisi süresince ve bittikten 1 hafta sonraya kadar
	Kortikosteroidler * (Prednisone)	Günde 1 mg/kg iki doza bölünerek verilecek	Semptomlar ve bulgular yatışana kadar
İmmün sistem yetmezliği olan hastalarda TE'in akut tedavisi	Pyrimethamine	200 mg/gün yükleme dozundan sonra 50–75 mg/gün	Semptomlar ve bulguların yatıştıktan sonra 4–6 hafta
Standard tedavi protokolü	<i>artı</i> Folinic asit (Leucovorin)	10–20 mg/gün PO, IV veya IM (50 mg/gün çıkılabilir)	Pyrimethamine tedavisi süresince ve bittikten sonra 1 hafta
	<i>artı</i> Sulfadiazine	1–1.5 grx4/gün PO	**
	<i>veya</i> Klindamisin (sülfa alerjisi varsa)	450-600 mgx4/gün PO veya IV (IV yol ile 1200 mg/gün çıkılabilir)	**
Alternatif tedavi protokolü	Trimethoprim	PO veya IV 5 mg/kg x gün (trimethoprim-sulfamethoxazole). Trimethoprim'de 15–20 mg/kg/gün seviyesine çıkılmıştır.	**
	Pyrimethamine (P) + Folinic asit (Leucovorin)	Standard tedavi protokolünde olduğu gibi	**
	<i>Artı aşağıdaki seçeneklerden birisi</i>		
	Sulfadoxine (S)	500 mg/gün PO (Fansidar® içerik: P+S)	**
	Klaritromisin	1 grx2/gün PO	**
	Atovaquone ⁵	750 mgx4/gün PO	**
	Azitromisin	900–1500 mg/gün PO	**
	Dapsone (D)	100 mg/gün PO (Maloprim® içerik: P+D)	**

¹ merkezler arası tedavi protokolleri değişkendir. ² Almanya ve Avusturya'da 17. hafta sonunda ek olarak 4 haftalık pyrimethamine / sulfadiazine / leucovorin profilaktik olarak kullanılmaktadır. ³ merkezler arası tedavi protokolleri değişkendir. Pyrimethamine ve sulfadiazine bazı merkezlerde kullanılır, Pyrimethamine+sulfadiazine ve spiramycin protokolleri her ay dönüşümlü uygulanır. ⁴ merkezler arası tedavi protokolleri değişkendir. Aylık Pyrimethamine ve sulfadiazine ve spiramycin protokolleri her ay dönüşümlü uygulanır. * Beyin omurilik sıvısında protein \geq 1g/dl ve aktif retinokoroidit görmeyi bozduğunda (makula, optik sinir başı papillomaküler bölge tutulmuş) ** uygulama süresi TE'li hastalarda Pyrimethamine için uygulanan süre kadardır. ⁵ Atovaquone emilimini ve etkinliğini arttırmak için % 23 yağ içeren kahvaltı sonrası alınır

Tablo 1.5. İmmun sistemi baskılı veya yetmezliği olanlarda primer/sekonder toxoplasmosis profilaksisi. *Gürüz'den* alınmıştır (70).

İlaç	Doz	Kullanım şekli
Pyrimethamine	25 mg	Haftada 2 kez
<i>arti</i> Sulfadiazine	75 mg	Haftada 2 kez
<i>arti</i> Folinic asit	10 mg	Her gün
Dapson	50 mg/gün veya 200 mg/gün	Her gün veya haftada 1 kez
<i>arti</i> Pyrimethamine	50-75mg PO	Haftada 1 kez
<i>arti</i> Folinic asit	25 mg	Her pyrimethamine alındığında
Pyrimethamine	25 mg	Haftada 2 kez
<i>arti</i> Klindamisin	2.4 gr	
TMP-SMX	1 normal veya forte tablet 1 forte tablet TMP: 150 mg/m ² , SMX: 750 mg/m ² / 2 dozda	Her gün Haftada 3 kez/haftada ardışık 3 gün
Dapson	50 mg/günde 2 kez 100 mg/gün PO 2mg/kg PO (maksimum 100 mg)	Her gün Her gün
Pyrimethamine	25 gr	Gün aşırı
Spiramycin	3 gr	Her gün
Atovaquone	750 mg	Her gün

AIDS hastalarına, CD4⁺ T hücre sayısı 100/mm³ altına indiğinde, TMP-SMX tedavisi almıyorsa, günde 3 mg spiramycin ile primer toxoplasmosis profilaksisi yapılabilmektedir. Tarif edilen klinik tablolar dışında toxoplasmosis şüphesi olan tüm seropozitif, semptomatik ve immün sistemi baskılanmış ve yetmezliği olan hastaların tedavi olması tıbben gerekliliktir. MRG ile beyinde halka benzeri tutuluş gösteren lezyonları olanlar, IgG antikor pozitifliği olanlar ve ileri immün yetmezliği olanlarda ampirik tedaviye başlanılabilmektedir. Tedaviye olumlu cevap TE tanısını destekler nitelikte kabul edilir. Avrupa'da yaygın olarak AIDS'li hastaların tedavisinde ve konjenital toxoplasmosis vakalarında pyrimethamine-sulfadoxine (Fansidar) kullanılmaktadır (124). Tetracycline'lerden doxycycline TE tedavisinde alternatifler arasında kabul edilmektedir. Bazı TE vakalarında 5-fluorouracil ve klindamisin ile başarı elde edilmiştir. İmmünoteröpatik ajanlardan IFN- γ (roxithromisin, pyrimethamine, azitromisin veya klindamisin kombinasyon) ve IL-12

(klindamisin veya atovaquone kombinasyon) hayvan modellerinde toxoplasmosise karşı etkili bulunmuştur. Rifamisin türevi rifabutin ve rifapentin, fluoroquinolone'lardan trovafloxacin hayvan modellerinde başarı ile kullanılmıştır (70, 98, 123, 124).

1.1.10. Korunma

Korunma özellikle seronegatif hamileler, immun yetmezliği olan hastalar (AIDS), transplantasyon adayı alıcılar ve immun sistemi baskılayan tedavi alanlar için önemlidir. Ayrıca *T. gondii* kaynaklı salgınlar veya sporadik vakalar normal toplumda körlüğe kadar varabilecek komplikasyonlara yol açtığı için korunma tedbirlerinin önemini giderek artmaktadır. Sonuçta bütün bu anlatılan faktörler ve toplumdaki prevalans göz önüne alınacak olursa, korunması gereken popülasyon kalabalıklaşmaktadır. Toxoplasmosisten korunma denildiğinde iki konu ön plana çıkmaktadır. Birincisi eğitim, ikinci ise aşılama. Şu anda tek kullanılabilir ticari lisans almış aşı, koyunlar için üretilmiş canlı atenüe S48 suşu ile hazırlanan aşıdır (26). Bu yüzden hala korunmada eğitim ön plana çıkmakta fakat koruyucu aşı geliştirme araştırmaları da, yeni teknolojilerin gelişmesi ile hızlanmaktadır (98, 123, 124). Korunma için öncelikle risk altındaki popülasyonun belirlenmesi gerekir. Hamile kadınların gebeliğin hemen öncesinde ve hamilelik süresince sistematik olarak taranması, seronegatif hamilelerin saptanmasını sağlar. Aynı şekilde immun sistemi yetmezliği olanlar ve transplant hastalarının sıkı takibi önemlidir. Toxoplasmosisten korunma yolları tablo 1.6'da özetlenmiştir.

Tablo 1.6. *T. gondii* enfeksiyonundan korunma yolları

Etler 66°C de pişirilmeli veya -20°C de dondurulmalıdır (doku kistleri etkisiz hale gelir)
Çiğ et ve sebzelerin çıplak elle tutulduktan sonra ellerin yıkanmalıdır
Müköz membran ile çiğ et temasının önlenmelidir
Çiğ ve kurutulmuş et yenmemelidir
Hayvanların derisi çıplak elle yüzülmemelidir
Çiğ et ile temas eden mutfak yüzeyleri ve aletleri temizlenmelidir
Sebze ve meyvelerin iyice yıkanıp yenmelidir
Yumurta çiğ yenmemelidir
Pastörize olmamış süt içilmemelidir (özellikle keçi sütü)
Vektör sinekler ve hamamböceklerinin kontrolü sağlanmalıdır
Kedi dışkısı ile kontamine olmuş bölgelerden uzak durulmalıdır
Kedi dışı kabı temizlenirken el değmeden 5 dakika kaynatılmalıdır
Kedi dışı kabı her gün temizlenirse, ookistlerin sporule olma şansı olmadığı belirtilmiştir
Bahçede çalışırken, kedi dışı kabı tutarken veya çocuk kum havuzu temizlerken eldiven giyilmelidir

1.1.10.1. Aşı Çalışmaları

Dünyadaki yüksek seroprevalansı düşünenecek olursak, toxoplasmosis riskinin sadece eğitimle aşılamayacağı, etkin aşı ve tedavi ajanlarının geliştirilmesi gereği ortaya çıkmaktadır. Bilindiği gibi bireyler bir mikroorganizmalara karşı doğal enfeksiyon yada aşılama ile immun hale gelmektedir. Aşılama sonrası oluşan immun yanıtı **aktif immunizasyon**, insan (kızamık, kuduz, tetanus), hayvan (difteri) veya laboratuvar ortamında (monoklonal antikor) elde edilen antikorların bireye verilmesi ile oluşturulan immun yanıtı **pasif immunizasyon** denilmektedir (107, 137, 140). Aktif immunizasyonun avantajı hem antikor yanıtını, hem de hücreli immunitiyi uyarmasıdır. Bu şekilde koruyucu immunitenin yanı sıra aşılama bireyde immünolojik hafıza da oluşturmaktadır. Aşı geliştirmede iki önemli basamaktan biri antijenik hedef/hedeflerin tanımlanmasıdır. Bunun nedeni, hedef mikrobun, immun sisteme birçok antijenik hedef sunmasına rağmen bunlardan sadece ufak bir kısmının koruyucu immun yanıtı tetiklemesidir. İkinci önemli konu ise seçilen antijenin vücuda verilirken kullanılan aşılama stratejisidir. Bu güne kadar insanda başarı ile

kullanılmış aşılar arasında bakterilere ait saflaştırılmış ve protein konjuge edilmiş kapsüller polisakkaridler, inaktive toksinler (toxoid), rekombinant protein antijenleri (hepatit B virüsü), öldürülmüş, atenüe edilmiş bakteri hücreleri, viral partiküller ve pasif immunizasyonda kullanılan immun serumlar sayılabilir. Bunların dışında deneysel aşamada anti-idiotip aşılar, peptid aşılar, DNA aşıları, enfekte veya transfekte edilmiş antijen sunan hücrelerden antijen sunumu, canlı, rekombinant ve atenüe virüs aşıları, başka organizmalara ait aşı antijenlerini eksprese eden rekombinant bakteri hücre aşıları sayılabilir. Bu yaklaşımlara ek olarak adjuvanlar, saflaştırılmış sitokinler veya sitokin genleri birçok aşı denemesinde yardımcı olarak kullanılmaktadır. Günümüzde gelecek vaat eden aşılama stratejisi DNA aşıları olup, yakın zamanda yapılan birçok araştırma bu strateji üzerine yoğunlaşmaktadır. DNA aşıları genelde rekombinant bakteriyel plasmid olup içine yerleştirilen mikrobial antijeni memeli hücrede ekspresyonunu kontrol eden kuvvetli promotörler içermektedirler. Enjekte edilen DNA, konak hücre tarafından alınmakta, bilinmeyen bir yol ile nükleusa girip, transkripsiyon ile mRNA'ya dönüşmektedir. Bundan sonra oluşan tam büyüklükteki antijenler humoral immun yanıtı, hücre yüzeyinden sunulan antijenik peptidlerde hücrel immun yanıtı uyarmaktadır.

Adjuvanlar (Latince *adjuvare*, anlamı yardım etmek) birlikte verildiği antijenin immunojenliğini arttıran maddelerdir. İnsanlarda kullanıma izin verilen tek adjuvan, alüminyum tuzları $[Al(OH)_3]$ veya Alum'dur. Kullanım güvenliğine rağmen ideal adjuvan olarak kabul edilmemektedir. Th2 cevabı yönüne kuvvetle polarize olduğu, antikor yanıtını arttırdığı (özellikle IgA ve IgE) fakat hücrel immun yanıtın oluşmasında yeterli uyarıyı yapamadığı anlaşılmıştır. Bazı adjuvanlar ve immun sisteme etkileri tablo 1.7'de özetlenmiştir (107, 137, 140).

Tablo 1.7. Adjuvan tipleri ve immun sisteme etkileri

Kategori	Adjuvan	MHC I sunum	MHC II sunumu	Sitokin yanıtı	IgG alt grup oluşumu
Mineral tuzlar	Al(OH) ₃	-	+ Zayıf Hİ	IL-3, IL-4, IL-5, IL-6	IgG1 ve/veya IgE
Yağ emulsiyonları	Freund'un yarım adjuvanı (mineral yağı), montanide, specol, squalane*, susam yağı, zeytinyağı, fıstık yağı	-	+ Kuvvetli Hİ	IL-4	IgG1 ve/veya IgE
Mikrobakteriyel ürünler	Freund'un tam adjuvanı (ölü <i>Mycobacterium tuberculosis</i>), BCG, kolera toksin, LPS, LT	-	+ Kuvvetli Hİ	IFN- γ , IL-4	IgG2a, 2b IgG1 ve/veya IgE
Sentetik ürünler, yüzey aktif ajanlar ve mikropartiküller	Liposome, saponin (Quil-A), ISCOMS, noniyonik block kopolimerler (Pluronic L121*)	-	+ Kuvvetli Hİ	?	IgG2a veya IgG2b

BCG: Bacillus Calmette-Guerin, ISCOMS: immun stimulan kompleksler, LPS: lipopolisakarid, LT: *E. coli* ısıyla değişken enterotoksin, Hİ: hücrel immunite, * Squalane, Pluronic L121 ve Tween 80 karışımı Provac adjuvanını oluşturur

Toxoplasmosise karşı koruyucu aşı çalışmaları 1990'lı yıllarda hızlanmıştır. Etkin kabul edilen aşının Th1 immun cevabını, CD8⁺ T hücreleri ve humoral immun yanıtı uyarması beklenmektedir. Burada amaç doğal enfeksiyonu en iyi taklit edecek aşı adayının ve/veya stratejisinin bulunmasıdır. Aşı adayları arasında SAG1, SAG2, SAG3, SRS1, GRA1, GRA4, GRA7, ROP2, MIC3, HSP30, HSP70, 6K, ve P54 gen ve proteinleri bulunmaktadır (Tablo 1.8). Aşılama stratejileri saflaştırılmış veya rekombinant teknoloji ile üretilip saflaştırılmış *T. gondii*'nin antijenik yapıdaki proteinlerini, canlı atenüe veya mutant suşları veya DNA aşılarını içermektedir. Çalışmalar gelecek vaat etmesine rağmen insanlar için etkin bir aşı stratejisi halen elde edilmemekle birlikte toxoplasmosise karşı güvenilir ve etkili aşı için araştırmalara devam edilmelidir.

(a) Toxoplasmosise karşı denenen aşı stratejileri

T. gondii Mutant suşlar kullanılarak üretilen aşılarda: *T. gondii* S48, TS-4 ve T-208 mutant suşları aşı adayları olarak tanımlanmıştır (8, 26). Bu güne kadar lisans alınıp, koyunlar için ticari kullanıma sunulan tek toxoplasmosis aşısı S48 suşundan

elde edilmiştir. Bu aşı Avrupa'da ve Yeni Zelanda'da kullanıma sunulmasına rağmen yan etkileri, kısa raf ömrü ve yüksek maliyeti sebebiyle yaygın olarak kullanılamamıştır. S48 aşısı canlı atenüe edilmiş organizmalardan elde edildiğinden ve insan vücudunda reaktivasyon sonucunda patolojik forma dönme olasılığı taşıdığından insanlarda kullanılması sakıncalı bulunmuştur (14).

T. gondii'den izole edilen proteinler ile geliştirilen aşular: İlk aşı denemesi 1991 yılında vaccinia virüsü içinde eksprese edilen GRA1 ile sıçanlarda yapılmış, ve kısmi korunma sağlanmıştır (50). Bundan sonra çoğu aşı denemesinde takizoitlerde eksprese edilen SAG1 kullanılmıştır, saflaştırılmış SAG1 ve liposomun adjuvan olarak kullanıldığı aşı örneğinde, farelerde belirgin korunma sağlanmıştır (23, 141). Takizoit eriyiğinin santrifüj edilmesi ile elde edilen yüzey antijenleri SAG1, SAG2 ve 6K proteini, ISCOM (quil A, immun uyarıcı bileşik) adlı adjuvan ile birleştirilip farelerde uygulandığında yüksek titrede antikor oluştuğu görülmüştür (109). İki farklı çalışmada SAG1 ve kolera toksini burun içine uygulanmış, kısmi fakat uzun süreli direnç sağlamıştır (40, 173). SAG1 ve ısıyla değişken enterotoksinlerin iki toksik olmayan mutantının (LTR72 ve LTK63) adjuvan olarak kullanıldığı bir başka araştırmada, farelerde oluşan kist sayısında belirgin azalma saptanmıştır (18). Salbutamol (anti-astmatik ilaç) eşliğinde SAG1 uygulanmış farelerde serebral kist sayısında belirgin azalma gözlemlenmiştir (61). Bir başka çalışmada SAG2'ye karşı geliştirilmiş monoklonal antikor TGCM5 ile farelerde % 75–87.5 oranında korunma elde edildiği bildirilmiştir (181).

T. gondii rekombinant protein kullanan aşular: Bu çalışmalarda sıklıkla rekombinant SAG1 (rSAG1) proteini kullanıldığı görülmektedir. *E. coli*'de eksprese edilen rSAG1 proteininin alum adjuvanı ile birlikte verildiğinde farelerde kısmi korunma sağladığı izlenmiştir (136). Bir başka çalışmada rSAG1 ile IL-12 kombine

edilmiş, uygulama sonrasında beyinde parazit miktarında % 40 azalma tespit edilmiştir (105). Kobayların kullanıldığı bir araştırmada rSAG1 ve Th1 cevabı uyarıcı adjuvan SBAs1 birlikte kullanıldığında, materno-fötal geçişin belirgin şekilde azaldığı yayınlanmıştır (76). 1998 yılında, ilk defa GRA1 salgılayan atenuë edilmiş *Mycobacterium bovis* suşu BCG ile yapılan aşı denemesinde OF1 fareler ve koyunlarda *T. gondii* 76K suşuna karşı kısmi koruma sağladığı saptanmıştır. Aynı çalışmada GST-GRA1 füzyon proteinin, incomplete Freund adjuvanı ile birleştirilerek elde edilen aşının farelerde ve koyunlarda belirgin antikor yanıtı oluşturduğu görülmüş ama koruyucu etkisi araştırılmamıştır (167). Rekombinant SAG1, SAG2, SAG3, SRS1 ve P54 proteininin, Freund ve incomplete Freund ile birleştirilmesi ile hazırlanan bir aşıda farelerde denenmiş, SAG2, SRS1, P54 ve tüm antijenlerin karışımı ile elde edilen kokteyl aşının letal toxoplasmosise karşı koruyucu olduğu gözlemlenmiştir (121). Değişik genetik yapıdaki farelerde rSAG1 proteini içeren bir aşının konjenital toxoplasmosis oluşumunu engelleyip engelleyemediğini araştıran bir çalışmada BALB/c farelerin fetuslarının CBA/J fare fetuslarına göre daha iyi korunduğu bildirilmiştir (106). Bir başka denemede, SAG1 ve SAG2 genini aynı anda kodlayan chimeric plasmidin *E. coli*'de eksprese ettiği protein kullanılmış, rSAG1 proteini ile aşılanmış farelerin % 60'ı, rSAG2 ile aşılanmış farelerin % 53'ü letal toxoplasmosise karşı korunmuşken, SAG1 ve SAG2 proteininin birlikte uygulandığı farelerde korunma oranı % 73 olarak bulunmuştur (180). Rekombinant GRA4 proteininin, rROP2'nin ve her ikisinin karışımının (rGRA4-rROP2) alum ile adjuvante edilerek kullanıldığı bir çalışmada, rGRA4 ve rGRA4-rROP2 ile aşılanan farelerin beyinde daha az kist sayısı olduğu saptanmış, aynı çalışmada denen GRA4 DNA aşısının farelerde korunma açısından rGRA4 Alum kombinasyonuna benzer sonuçlar oluşturduğu bildirilmiştir (113).

DNA aşıları: Son yıllarda toxoplasmosise karşı geliştirilecek aşı çalışmaları DNA üzerine yoğunlaşmıştır. DNA aşıları *in vivo* şartlarda picogram-nanogram arası protein eksprese edebilmelerine rağmen uzun süreli, güçlü humoral ve hücrel immunité sağladığı, mikroplara karşı korunmanın etkin olduğu anlaşılmıştır (3, 59, 107, 137, 140). *T. gondii*'ye ait SAG1 (6, 149), GRA1 (155, 174), GRA7 (174), GRA4 (45), ROP2 (108, 174) ve ROP1 (33) antijenlerini içeren DNA aşıları çeşitli hayvan modellerinde denenmiştir. SAG1 genini kodlayan DNA aşısının kemirgenlerde beyinde oluşan kist sayısını azalttığı, yaşam süresi uzattığı görülmüştür (6). Başka bir denemede SAG1 kodlayan plasmid ile % 80–100 korunma elde edildiği bildirilmiştir. Nielsen ve arkadaşlarına göre 1999 yılına kadar yapılan aşı çalışmalarında en çok umut vaat eden bu aşıdır (132). İlk DNA kokteyl aşı SAG1 ve ROP2 genlerini kodlayan plasmidlerle yapılmış ve DNA kokteyl aşının tek DNA içeren aşı denemelerine göre daha etkin korunma sağladığı görülmüştür. Fachado ve ark. bu çalışma sonrasında *T. gondii* genomik ekspresyon kütüphanesini aşılama da kullanmış, aşının zamanla azalan koruyucu immunitéyi uyardığını saptamışlardır. Bu çalışmaların sonucunda, ileride yapılacak DNA aşısının multi gen DNA aşısı olması gerektiği kanaatine varmışlardır (57, 58). Konjenital toxoplasmosis odaklı SAG1 kodlayan DNA aşı çalışmasında, aşının erişkin farede kazanılmış enfeksiyonun oluşmasını önlediği, ama materno-fötal geçişi engelleyemediği gözlemlenmiştir (36). Bir başka çalışmada, üç çeşit fare grubunda (C57BL/6, C3H ve BALB/c) GRA1, GRA7 ve ROP2 kodlayan plasmidlerle yapılan aşı adayları kullanılmış, standard olmayan dozda 76K ve IPB-G suşları ile enfekte edilen farklı fare tiplerinde % 50–90 arası değişen oranda koruyuculuk sağladığı izlenmiştir (174). Aynı grup araştırmacılar, bir başka çalışmada, GRA1 kodlayan plasmidi kullanarak, sadece C3H tip fareleri aşlamışlar, korunmanın dört farelik grupların birisinde % 75,

diğerinde ise % 100 olduğunu belirtmişlerdir (155). ROP2 kodlayan plasmidden hazırlanan aşının farelerde ölümü belirgin olarak geciktirdiği yayınlanmıştır (108). GRA4, IL-12 veya GM-CSF (granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör) kodlayan plasmidin denendiği aşılamaalarda farelerin yaşam süresinin anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir (45). *T. gondii* HSP70, HSP30 ve SAG1 genini kodlayan plasmidler ile farede yapılan aşilar, önemli bir immunojen olan HSP70 kodlayan plasmidlerle yapılan aşilar karşılaştırıldığında, HSP70 ile aşılanan farelerin organlarında daha az sayıda parazit saptanmıştır (122, 126). MIC3 genini kodlayan plasmid ile GM-CSF kodlayan plasmidin birlikte kullanıldığı aşiların, farelerde beyinde kist oluşumunu belirgin olarak azalttığı gözlemlenmiştir (83).

Tablo 1.8. Aşı denemeleri ve adaylarını içeren araştırmalar (kronolojik sıralı)

Aşı adayları	Adjuvan	Sonuçlar	Yıl, Araştırmacı	
GRA1 eksprese eden Vaccinia virüsü		Şıçanlarda % 0 koruma	1991, Duquesne ve ark.	50
SAG1	Liposome	Belirgin koruma	1991, Bulow ve ark.	23
Takizoit eriyiğinden elde edilen SAG1, SAG2, 6K	ISCOM	12. ve 25. günler arasında 8 fareden yedisi öldü	1993, Lunden ve ark.	109
Eriyik takizoit	Kolera toksin	9. günde canlı fare oranı % 78.5 ve 60. günde % 50	1993, Bourguin ve ark.	20
SAG1	Kolera toksin	Farede % 85 daha az beyin kisti	1996, Debard ve ark.	40
r-SAG1 <i>E. coli</i>	Alum	11. günde canlı fare oranı % 55.6	1998, Petersen ve ark.	136
r-SAG1 <i>E. coli</i>	IL-12	Beyin kistlerinde % 40 azalma	1998, Letscher-Bru ve ark.	105
GRA1 antijeni üreten r-BCG ve GST-GRA1 proteini	Incomplete Freund	12. günde canlı fare oranı % 10	1999, Supply ve ark.	167
SAG1	Salbutamol	Beyin kistlerinde % 60 azalma	1999, Fermin ve ark.	61
SAG1 kodlayan plasmid		% 80–100 koruma	1999, Nielsen ve ark.	132
SAG1 kodlayan plasmid		RH suşu takizoitlerle enfekte edilme sonrası bütün fareler ölmüş	2000, Angus ve ark.	6
GRA1, GRA7, ROP2 kodlayan plasmidler		Değişik gruplarda fare yaşam oranı % 50–90 arası	2000, Vercammen ve ark.	174
SAG1	Kolera toksin	Beyin kistlerinde % 80 azalma	2000, Velge-Roussel ve ark.	173
GRA4 kodlayan plasmid	pGM-CSF ve pIL-12	Değişik gruplarda fare yaşam oranı % 62–75	2000, Desolme ve ark.	45
r-SAG1 <i>P. pastoris</i>	SBA1	Fare hayvan modelinde materno-fötal bulaştan % 70 koruma	2000, Haumont ve ark.	76
ROP2 kodlayan plasmid		Fare ölümünde kontrollere göre 2 gün gecikme	2001, Leyva ve ark.	108
SAG1 geni aşılansmış deri graftı		Etkili koruma	2001, Saito ve ark.	151
SAG1	LTR72 ve LTK63	Beyin kistlerinde % 77–85 azalma	2001, Bonenfant ve ark.	18
SAG1, SAG2, SAG3, SRS1, P54 ve hepsinin karışımı	Freund	SAG2, SRS1, P54 ve hepsinin karışımı verilen farelerde yaşam % 100	2001, Mishima ve ark.	121
Enzim eksikliği olan mutant		Uzun süreli koruma	2002, Fox ve ark.	64
SAG1 ve ROP2 kodlayan plasmidler		Kokteyl aşı uygulanan farelerde 9–12 gün yaşam	2003, Fachado ve ark.	57
GRA1 kodlayan plasmid		% 75–100 koruma	2003, Scorza ve ark.	155
SAG1 kodlayan plasmid		Materno-fötal bulaşı engellemede başarısız	2003, Couper ve ark.	36
r-SAG1 <i>E. coli</i>		Fare yavruları konjenital toxoplasmosise karşı %50 korundu	2003, Letscher-Bru ve ark.	106
HSP70, HSP30 ve SAG1 kodlayan plasmidler		En etkin koruma HSP70	2003, Mohamed ve ark.	122
<i>T. gondii</i> genomik kütüphane kodlayan plasmid		Uzun süreli koruma, sonuçlar multi gen aşığı destekler yönde	2003, Fachado ve ark.	58
MIC3 kodlayan plasmid	pGM-CSF	Beyin kistlerinde % 67–74 azalma	2003, Ismael ve ark.	83
SAG2'ye karşı mAb		% 75–87.5 koruma	2003, Yang ve ark.	181
ROP2 eksprese eden rekombinant Vaccinia virüsü		Letal toxoplasmosise karşı tam koruma	2004, Roque-resendiz ve ark.	148
r-SAG1/2 kodlayan plasmid		Enfeksiyon sonrası yaşam oranı % 73	2004, Yang ve ark.	180
r-GRA4, r-ROP2 ve karışımı	Alum	GRA4 aşılması sonucunda daha az beyin kisti saptandı	2004, Martin ve ark.	113
GRA4 kodlayan plasmid	Alum	Beyin kistlerinde azalma	2004, Martin ve ark.	113

İKİNCİ BÖLÜM

GEREÇ ve YÖNTEM

“*T. gondii* GRA1 proteininin tanımlanması; aşı çalışmalarındaki yeri” adlı tezimin tüm aşamaları California Üniversitesi, Irvine (UCI), Tıp Fakültesinde 15.11.2003–8.11.2005 tarihleri arasında Prof. Dr. Frances Journak’a ait Protein Ekspresyon Merkezi ve Dr. Philip Louis Felgner’in laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Araştırmayı gerçekleştirebilmek için 1) Laboratuvarında *T. gondii*’ye ait rekombinant DNA kullanımı için Kurumsal Biyogüvenlik komitesinden (IUA, Institutional Biosafety Committee), 2) *T. gondii* takizoitleri ile laboratuvar ortamında çalışabilmek ve hücre kültüründe üretmek için biyolojik madde kullandırma komitesinden (BUA, Biological Use Authorization), 3) Hayvan deneyleri için UCI kurumsal hayvan bakımı ve kullanımı komitesinden (IUCUC, Institutional Animal Care and Use Committee), 4) Antijene özgü proliferatif immün cevabın sıvı ışıma sayımı ile ölçümünde radyoaktif ³[H]-thymidine kullanımı için Radyasyon Kullandırma Komitesinden (RUA, Radiation Use Authorization) izinler alınmıştır. Araştırma sırasında kullanılan yöntemleri iki ana başlık altında inceleyeceğiz.

İlk aşama GRA1 geni ile ilgili yapılan klonlama, saflaştırma ve kristalizasyon yolu ile tanımlanması, hedef genin bioinformatik teknikler kullanılarak belirlenmesi, GRA1 saflaştırma çalışmaları, protein sindirme testleri, kristal solüsyonları oluşturma ve ekim işleminden oluşmaktadır. İkinci aşamada öncelikle toxoplasmosise karşı geliştirilen memeli hücreye kodon optimize sentetik GRA1 geni içeren DNA aşı adayı, vahşi tip GRA1 geni içeren DNA aşı adayı ve saflaştırılmış

GRA1 proteini içeren subunit aşı adayının geliştirme çalışmalarından oluşmaktadır. Bu aşamadan sonra aşı adaylarının farelerde oluşturduğu humoral ve hücrel immunitenin ölçülmesi ve akut toxoplasmosisteki koruyuculukları incelenmiştir. Araştırmada kullanılan hayvanların örnekleme, her bir deneye uygun şekilde daha önceden yapılan aşı çalışmaları göz önüne alınarak belirlenmiştir. Yapılan deneylerde kullanılan gereçler ve kimyasallar aksi belirtilmediği takdirde A.B.D.'den alınmıştır. Çalışmada kullanılan kimyasallar parantez içinde üretici firma belirtilmemiş ise Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, A.B.D.) firmasının ürünleridir. Gereçler ve kimyasalların ait olduğu firmalar yöntem bölümünde parantez içinde belirtilmiştir.

2.1. GRA1 Protein Tanımlanması

Cesbron-Delauw ve ark. tarafından tanımlanan GRA1 geni, 23 kDa büyüklüğündeki doğal GRA1 proteinini kodladığı, GRA1 proteininin de 2 adet Ca^{+2} bağlayan EF eli içeren, immunojen yapıda bir protein olduğu yayınlanmıştır (29, 30). Rekombinant GRA1 proteinin yapısı biyoinformatik tekniklerle değerlendirilip, daha sonra rekombinant GRA1 proteininin pUETΔGRA1 vektörü ile *E. coli* Rosetta™ 2(DE3) pLysS hücrelerde üretimi ve ÄKTA FPLC, sıvı kromatografi sistemi ile saflaştırılması yapılmıştır. Saflaştırılan proteinin tanımlanması için öncelikle MALDI-TOF kütle spektrometrisi ile moleküler büyüklüğü saptanmıştır. Daha sonra rekombinant proteinin tanımlanması için kristalizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bir proteinin kristal hale gelebilmesinin ön şartı, saflaştırma sonucunda elde edilen proteinin katlanmış olması gerekliliğidir. Katlanmanın rekombinant GRA1 proteininde gerçekleşip gerçekleşmediği, protein sindirme testleri ile araştırılmıştır.

GRA1 proteininin içerdiği fosfat bağlayan bölgelerin kristal oluşumunu olumsuz etkileyebileceği düşünüldüğünden alkalen fosfataz ile defosforilasyon denenmiştir. Defosforilasyon sonucu proteinden ayrıştırılan fosfat miktarı SDS-PAGE ve doğal jel elektroforezi ile saptanmıştır. GRA1 proteini literatürde Ca^{+2} bağlayan bir protein olarak tanımlandığından kalsiyum varlığında (5 mM $CaCl_2$) ve kalsiyum yokluğunda (5 mM EGTA) rekombinant proteinin doğal jel elektroforezi ile hareketi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğal halinde katlanmış olduğu saptanan aktif proteinin, aşı çalışmalarında kullanılabilceğini göstermiştir.

2.1.1. Biyoinformatik Değerlendirme

Hedef proteinin belirlenmesi için öncelikle veritabanlarında bioinformatik teknikler kullanılarak geniş tabanlı araştırma yapılmıştır. *T. gondii* genomunda 7666'dan fazla protein kodlayabilecek bölge varlığı gösterilmiş, 697'sinin immunojenik olduğu çeşitli çalışmalarla saptanmıştır (kaynak: NCBI veri tabanı, <http://www.ncbi.nih.gov/>). Geriye kalan gen bölgeleri ORF (open reading frame) olarak adlandırılan, bir proteini kodlayabilecek fakat bu proteinin görevinin saptanamadığı bölgelerdir. ORF bölgeleri antijenik bir proteini kodlayabileceği gibi, bir enzim veya yapısal bir proteini de kodlayabilmektedir. Antijenik proteinler tanı veya aşı geliştirmede kullanılabilirken, enzimlerden veya yapısal proteinlerden ilaç geliştirmede yararlanılmaktadır. Çalışmamızda hedef olarak seçilen GRA1 proteinin immunojenik bir protein olduğu daha önceden yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır (15, 30, 155, 167, 174). Rekombinant GRA1 proteininin sekonder yapısının biyoinformatik değerlendirmesinde, proteinin katlanması, olası immunolojik kısımları ve içerdiği diğer olası bölgeler (kalsiyum bağlama, fosforilasyon ve

myristoylasyon bölgeleri) incelenmiştir. Rekombinant GRA1 proteinin biyoinformatik incelemesi sırasında aşağıdaki aşamalardan geçilmiştir.

1) Proscan benzerlik araştırması ile proteinin içerdiği olası bölgelerin belirlenmesinde http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_prosite.html

2) Proteinin katlanma indeksinin FoldIndex programı ile belirlenmesinde <http://bioportal.weizmann.ac.il/fldbin/findex>

3) Proteinin antijenik yapısının antijenik bölgeleri ön gören program ile belirlenmesinde <http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.pl> sitelerinden yararlanılmıştır.

2.1.2. GRA1 Protein Ekspresyonu ve Hızlı Protein Sıvı Kromatografi Cihazı ile Saflaştırma

T. gondii GRA1 protein ekspresyonu için gerekli pUETΔGRA1 vektör, Dr. Elżbieta Hiszczyńska-Sawicka, Gdansk Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim dalı, Polonya'dan sağlanmıştır. *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) pLysS kimyasal kompetent hücreler (Novagen) pUETΔGRA1 ile tarif edildiği gibi transforme edilmiştir (79). Transformasyon sonunda elde edilen tek koloniler 100 µg/ml ampisilin ve 50 µg/ml kloramfenikol eklenmiş 50 ml Luria Bertani (LB) besiyeri (Fisher, CA) içinde 37°C'de bir gece boyunca karıştırılarak üretilmiştir. Ertesi gün 100 µg/ml ampisilin ve 50 µg/ml kloramfenikol içeren 1 L LB besiyerine, 50 ml bir gecelik besiyeri eklenmiş ve 600 nm'de ölçülen optik dansitenin 0.4'e gelmesi ile isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) 1mM final konsantrasyonda eklenerek, 20°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Sonraki gün, hücreler 5000×g santrifüj edilmiştir. Elde edilen çökelti 50 ml resüspanسیون tamponu ile (50mM Tris-Cl pH: 7.5, 0.3 M NaCl ve 0.5 mM CaCl₂) tekrar süspansiyon edilmiş ve sonrasında doku ezicisi ile

homojenize edilmiştir. Homojenize hücre süspansiyonu M-110L microfluidizer işlemcisinden geçirilmiş (Microfluidics Corporation) ve yıkılmış hücreleri içeren süspansiyon 30.000×g'de bir saat boyunca 4°C'de santrifüj edilmiştir. Berrak üst sıvı 0.45µm filtre'den (Nalgene) geçirilmiştir.

Proteinin saflaştırılması ÄKTA Hızlı Protein Sıvı Kromatografi Cihazı (FPLC: Fast Protein Liquid Chromotography) ve UNICORN™ programı ile sağlanmıştır (Amersham Biosciences). Saflaştırmanın ilk aşamasında 5 ml HiTrap Ni²⁺ Şelasyon HP kolonu (Amersham Biosciences) kullanmıştır. Kolona protein yüklemesi sırasında 50mM Tris-Cl, pH 7.5, 0.3 M NaCl, ve 0.5 mM CaCl₂ içeren tampon konulmuştur. Daha sonra kolon, 100 mM imidazole içeren 50mM Tris-Cl, pH 7.5, 0.3 M NaCl, ve 0.5 mM CaCl₂'lık tamponla bir gece boyunca, 4°C'de yıkanmıştır. Rekombinant GRA1 proteinini kolondan serbestleştirmek için 50mM Tris-Cl, pH 7.5, 0.3 M NaCl, ve 0.5 mM CaCl₂ içeren tampondaki imidazole konsantrasyonu 100 mM'dan önce 300 mM'a sonra 500 mM'a 4°C'de yükseltilmiştir. Kolondan ayrılan proteinlerin yaptığı pikler UV280 ile görüntülenmiştir. Her pikten alınan örnekler % 12 SDS-PAGE ile ayrıştırılmış ve rekombinant GRA1 protein saflığı belirlenmiştir.

Saf rekombinant GRA1 protein içeren örnekler Ultrafree-MC Centrifugal Filtreler (Millipore) ile konsantre edilmiştir. Bundan sonra konsantre protein, hem daha ileri saflaştırmanın sağlanması, hem de endotoksin seviyesinin azaltılması için ÄKTA FPLC sistemi yardımı ile jel filtrasyon Superdex 200 kolonuna yüklenmiştir. Daha sonra ileri saflaştırılmış rekombinant GRA1 proteini tekrar Ultrafree-MC Centrifugal Filtreler (Millipore) ile konsantre edilmiştir. Konsantre örnekteki protein miktarı Commasie Plus Protein Assay reagent (Pierce, Rockford Ill) ve spektrofotometre (Beckman-Coulter, CA) ile üretici firmanın tavsiye edilen

protokolü kullanılarak belirlenmiştir. Standart eğrinin belirlenmesi için seri sulandırılmış Bovine Serum Albumin (BSA) kullanılmıştır.

2.1.3. MALDI-TOF Kütle Spektrometrisi

Saflaştırılmış rekombinant GRA1 proteininin moleküler büyüklüğü matrix-assisted laser desorption ionization-time of light (MALDI-TOF) kütle spektrometrisi (Applied Biosystems) ve sinapinic asit matriksi kullanılarak 3 farklı saflaştırma örneğinde ölçülmüştür.

2.1.4. Alkalen Fosfataz ile Defosforilasyon Çalışması

Defosforilasyonda karides alkalen fosfataz enzimi kullanılmıştır (89). Rekombinant GRA1 proteini saflaştırıldıktan sonra, 50 µg konsantrasyonda iki örneğe 10U karides alkalen fosfataz (KAP) ve 10×KAP reaksiyon tamponu karıştırıldıktan sonra 37°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler % 12 SDS-PAGE ve % 12 doğal jel elektroforezi ile yürütülmüştür.

2.1.5. EGTA-rekombinant GRA1 Proteini Etkileşiminin Araştırılması

100 µg rekombinant GRA1 proteini 5mM EGTA ve 5mM CaCl₂ (son konsantrasyon) varlığında % 12 SDS-PAGE ve % 12 doğal jel elektroforezi ile yürütülmüştür.

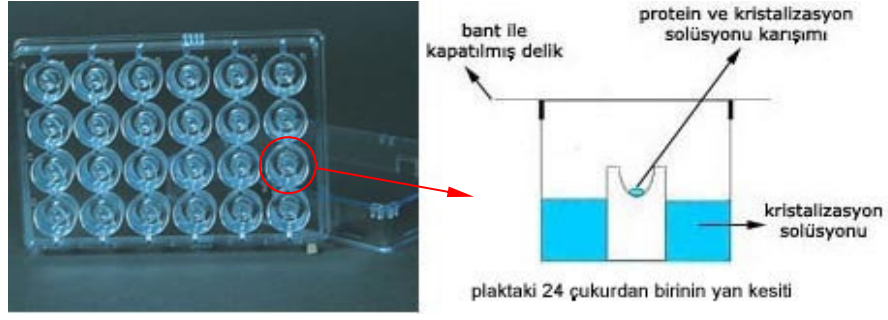
2.1.6. Protein Sindirme Testi

Protein sindirme testinde, trypsin (Sigma) kullanılmıştır. Trypsin Lizin (K) ve Arginin (R) aminoasitlerine özgü bir endopeptidaz olup polypeptidin ortasından kesime başlamaktadır. Bu testte kullanılan rekombinant GRA1 proteini/trypsin/trypsin inhibitörü oranı 40/1/0.33 olarak hesaplanmıştır. 120 µg rekombinant GRA1 proteini içine 3 µg trypsin eklendikten sonra oda sıcaklığında inkübe edilmiş, 0., 1, 5., 10., 15., 20. ve 30. dakikada 15µl örnekler alınıp, içinde 0.33µg trypsin inhibitörü olan tüplere eklenmiştir. Daha sonra örnekler % 12 SDS-PAGE ile yürütülmüştür.

2.1.7. Makromoleküler Kristalizasyon

Saflaştırılmış rekombinant GRA1 proteinini kristal hale getirme aşamasında 24 delikli, iç içe geçen iki çukurlu plaklar kullanılmıştır (Şekil 2.1). Rekombinant GRA1 proteini ve kristalizasyon solüsyonu karışımı deliğin ortasında bulunan bölüm içine eklenmiştir. Bu bölüm çevresinde rezervuar denilen kısma 1 ml kristalizasyon solüsyonu konulmuştur. Bu rezervuardaki solüsyon, protein ve kristalizasyon solüsyonu karışımının kurumasını önlemek amacıyla ortama konulmuştur. Her delik üzeri hava almayacak şekilde kapatılarak, ortamda rezervuardaki solüsyonun oluşturduğu bir atmosfer yaratılmıştır (Şekil 2.1).

Kristalizasyon aşamasında çeşitli kristalizasyon rezervuar solüsyonları, saflaştırılmış rekombinant GRA1 proteini ile 1/1, 1/2 ve 2/1 oranlarında karıştırılmıştır. Kristalizasyon solüsyonları oluşturulurken kullanılan kimyasallar Tablo 2.1'de özetlenmiştir.



Şekil 2.1. Rekombinant GRA1 proteini ve kristalizasyon solüsyonlarının karıştırıldığı iç içe geçen iki çukurlu plak

Rezervuar solüsyon kombinasyonları, 8 çeşit tampon [çeşitli konsantrasyonlarda (0.1 ile 1M) ve çeşitli pH derecelerinde (pH: 5-9 arası)], 35 çeşit tuz (% 30 ile % 90 arasında değişen konsantrasyonlarda), 6 çeşit çöktürücü madde (% 25 w/v ile % 80 w/v arasında) kullanılarak oluşturulmuştur. Ayrıca Hampton Research firmasına ait 14 tarama paneli kullanılmıştır (Natrix, Nükleik asit mini tarama, Quik tarama, Grid tarama Malonate, Grid tarama Polyethylene glycol/LiCl, Polyethylene glycol iyon tarama, Grid tarama Polyethylene glycol 6000, Grid tarama ammonium sulfate, Grid tarama sodium chloride, Kristal tarama I ve II, İndeks tarama, SaltRx tarama, kristal tarama cryo kokteyl).

Tablo 2.1. GRA1 makromoleküler kristalizasyon çalışmasında kullanılan kimyasallar

Tamponlar	pH	Tuzlar			Çöktürücüler
Sodium citrate	4	CaCl ₂ *2H ₂ O	Mg(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ *4H ₂ O	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	2-methyl-2, 4-pentanediol
Sodium acetate	5	NH ₄ Br	MnCl ₂ *4H ₂ O	NaNO ₃	Polyethylene glycol 400
MES	6	NH ₄ Cl	KC ₂ H ₃ O ₂	NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	Polyethylene glycol 1000
MOPS	7	NH ₄ NO ₃	KBr	Na ₂ S ₂ O ₃ *5H ₂ O	Polyethylene glycol 4000
HEPES	7	NH ₄ H ₂ PO ₄	K ₂ CO ₃	Zn(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	Polyethylene glycol 8000
Tris	8	(NH ₄) ₂ HPO ₄	KCl	K ₂ HPO ₄	Polyethylene glycol 20000
TAPS	9	(NH ₄) ₂ SO ₄	KNO ₃	CoSO ₄ *7H ₂ O	
CAPS	10	Ca(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	KH ₂ PO ₄	Li ₂ SO ₄ *H ₂ O	
		LiBr	KSCN	K ₃ PO ₄	
		LiCl	RbCl	NH ₄ SCN	
		MgSO ₄ *7H ₂ O	NaBr	MnSO ₄ *H ₂ O	
		MgCl ₂ *6H ₂ O	NaCl		

Sonuçta rekombinant GRA1 proteinini kristal hale getirebilmek için ortalama 2000 solüsyon kombinasyonu denenmiştir. Yapılan ekimler sonrası plaklar oda sıcaklığında ve ışık görmeyen ortamda inkübe edilmiş, periyodik olarak inverted mikroskop altında kristal varlığı açısından kontrol edilmiştir. Gözlem sürecinde elde edilen kristaller x-ışını difraksiyon analizi ile incelenmiştir.

2.2. GRA1 Aşı Çalışması

Araştırmanın bu kısmında, fare modelinde 3 çeşit GRA1 kökenli aşı adayı denenmiştir. Bunlar sırasıyla vahşi tip GRA1 DNA aşısı (CMV/vt-GRA1); kodon-optimize GRA1 DNA aşısı (CMV/ko-GRA1) ve Provac ile adjuvante edilmiş rekombinant GRA1 protein (rGRA1-Provac) aşısıdır. Aşılamalar sonucunda BALB/c farelerde oluşturulan humoral immun yanıt (IgG, IgG1 ve IgG2a) protein mikroarray yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Hücrel immun yanıt sırasında oluşan antijene özgü lenfoproliferatif cevap, ³[H]-thymidine eklenmesi sonrası sıvı ışımaya sayımı (liquid scintillation counting) ile ölçülmüş, sitokinlerin belirlenmesinde ELISA yöntemi kullanılmıştır. Daha sonra aşılanmış BALB/c fareler *T. gondii* RH suşu takizoitleri ile enfekte edilmiş ve aşılardan oluşturduğu koruma negatif kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır.

2.2.1. Araştırma Sırasında Kullanılan Hayvanlar

Aşıların oluşturduğu immunolojik cevabın ölçümü ve *T. gondii*'ye karşı aşılardan oluşturduğu koruma test tüplerinde saptanamayacağı için, önceki çalışmalarını baz alarak bizde çalışmamızı BALB/c fareleriyle gerçekleştirmeyi hedefledik.

Araştırma sırasında kullanılan 6 haftalık dişi BALB/c fareler Charles River laboratuvarından (Wilmington, MA) temin edilmiştir. Fareler standart ve konforlu şartlarda bakılıp beslenmiştir. Deneysel plan, hayvan etiği açısından UCI bünyesinde yer alan, “Kurumsal Hayvan Bakımı ve Kullanımı Komitesi” (IUCUC) tarafından kontrol edilmiş ve onaylanmıştır. Araştırma sırasında kullanılan hayvan sayısı, istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde etmek ve gereksiz yere hayvan kullanımı önlemek amacı ile daha önceden yapılan *T. gondii* aşı denemelerinde kullanılan hayvan sayıları referans alınarak belirlenmiştir.

2.2.2. *T. gondii* Parazit Üretimi ve Antijen Hazırlama

T. gondii RH suşu takizoitleri, UCI bünyesinde çalışan Dr. Naomi Morrissette'den sağlanmış olup, aşılınmış fareler korumanın saptanması için bu suş ile enfekte edilmiş ayrıca, *T. gondii* antijenide RH suşundan hazırlanmıştır. RH suşu takizoitleri insan sünnet derisi fibroblast (HFF: Human Foreskin Fibroblast) hücrelerinde Dulbeccos modified Eagle medium (DMEM), % 10 (v/v) ısı ile inaktive fetal bovine serum (Hyclone), 2mM L-glutamine ve ml başına 50 mg gentamycin (Invitrogen-Gibco) içeren besiyeri kullanılarak, 37°C'de, % 5 CO₂'li ortamda üretilmiştir. Hücre kültüründen elde edilen takizoitler, farelere verilmeden önce steril serum fizyolojik ile yıkanmış, hemositometre ile sayılmış ve canlılıkları tyrpan mavi boyası ile saptanmıştır. *T. gondii* antijeni (TAg) hazırlanırken, HFF hücre artıkları 500×g ile 5 dakika santrifüj edilerek elimine edilmiştir. Saf takizoit içeren üst sıvı alındıktan sonra 3000×g ile 10 dakika santrifüj edilmiştir. Çökelti üç defa fosfat tamponlu saline (PBS) ile yıkanmış, son olarak da distile suda süspanse edilip, ısıtma-dondurma işlemine tabii tutulmuştur. Bu aşama sonrasında hücre eriyiği

10.000×g ile 10 dakika santrifüjlenmiş, üst sıvı 0.2 porlu filtreden geçirilmiştir. TAG'in protein miktarı, Commasie Plus Protein Assay reagent (Pierce) ve spektrofotometre ile (Beckman-Coulter) üretici firmanın protokolü kullanılarak belirlenmiş, standart eğrinin belirlenmesi için seri sulandırılmış BSA kullanılmıştır.

2.2.3. GRA1 Geninin Bilgisayar Aracılığı ile Optimize Edilmiş DNA Birleşmesi

GRA1 protein sekansı GENBANKASI veritabanından (giriş numarası M26007) elde edilmiştir. GRA1 protein sekansının sinyal peptidi çıkarılmış hali ile (25 ila 190'inci aminoasitler arası) UCI Genomik ve Biyoinformatik Enstitüsünde yer alan Bilgisayarlı Biyoloji Araştırma laboratuvarının web sitesine elektronik ortamda gönderilmiştir (<http://cbml.igb.uci.edu/>). Burada bilgisayar aracılığı ile optimize edilmiş DNA yapımı tekniği kullanılarak (CODA: Computationally optimized DNA Assembly) memeli hücreye optimize sentetik GRA1 geni tasarlanmıştır. Özetle optimizasyonun başında, sekonder DNA yapıları ve erime dereceleri Mfold bilgisayar programı (183, 184) ile en yakın komşu termodinamik parametreler kullanılarak tespit edilmiştir (152). Kodon kullanımı Sharp ve Li tarafından tarif edilen kodon adaptasyon indeksi (CAI: codon adaptation index) ile optimize edilmiştir (157). Bilgisayarlı optimizasyon üst üste binen ve yan yana tasarlanmış ko-GRA1 DNA oligonükleotidleri kendi kendine birleşmeleri için Lathrop ve ark. tarafından tanımlanan çok sıralı, dallanan ve bağıl algoritmi kullanmıştır (99). Bu algoritma, doğru aminoasidi kodlamak için gerekli tüm olası sessiz yer değiştirmeleri denemektedir. Doğru şekilde kendi kendine birleşme işlemi [herhangi doğru hibridizasyon minimum erime ısısı] eksi [herhangi doğru olmayan maksimum erime ısısı] şeklinde hesaplanan erime ısısı farkı kavramı ile

gerçekleştirilmiştir. Doğru hibridizasyonlar sadece birbirine komşu tasarlanmış üst üste gelen bölgelerin bir gen oluşturmak üzere doğrusal bir şekilde sıralanmaları sonucunda gerçekleşmektedir. Doğru olmayan hibridizasyonlar ise (a) Firkete (U şeklinde kıvrılan, hairpin), bir oligonükleotidin geriye katlanması ve kendi üstüne hibridize olması; (b) dimerler, bir oligonükleotidin kısmi olarak kendi ile tamamlayıcı olması; (c) oligonükleotidler arası uygunsuzluklar, bir oligonükleotid kısmi olarak bir başka oligonükleotid ile komplementer olması ve (d) kaymış doğru birleşmeler, yanlış yerleşmiş bir üst üste gelme bölgesi, yine aynı üst üste gelme bölgesi içinde bir başka kısım ile kısmi olarak komplementer olması olarak tarif edilmektedir (99). Eskiden kullanılan yaklaşımlar firkete ve palindrome gibi bölgesel DNA yapılarını uzaklaştırırken, CODA algoritmasının anahtar özelliği ile tüm doğru olmayan hibridizasyonlar bulunup, ortadan kaldırılmaktadır. Bütün bilgisayar hesapları 3 GHz Xeon dual işlemcinin 64-düğüm kümesi ile yapılmıştır.

Sonuçta CODA algoritması 39 ile 64 nükleotid boyutunda, 36 adet, birbirleri ile kendiliğinden birleşebilen ve GRA1 geninin *homo sapiens* hücrelerinde eksprese edilmesi arttıracak, oligonükleotid optimize etmiştir. Oligonükleotidler Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) şirketinden alınmıştır. Sekansı değiştirilmiş memeli (fare) hücreye optimize GRA1 geninde (ko-GRA1) vahşi tip GRA1 (vt-GRA1) genine göre değişen kodonların sıklığı Tablo 2.2’de gösterilmiştir.

2.2.3.1. Kodon Optimize GRA1 Geninin Orta Büyüklükte Oligonükleotid Parçaların PZR ile Birleştirilmesi

Memeli hücreye optimize sentetik GRA1’in iki aşamada oluşturulması planlanmıştır. Özetle tam uzunluktaki ko-GRA1 geni, her biri kısa, üst üste gelen, 12

adet komşu oligonükleotidden meydana gelen, üç adet orta büyüklükte DNA oligonükleotid parçasından oluşmaktaydı [orta parça 0: 237 baz çifti (bp: base pair); orta parça 1: 196 bp; orta parça 2: 196 bp]. Her bir orta büyüklükte DNA oligonükleotid parçası bir diğeri ile 65 nükleotid üst üste gelecek şekilde tasarlanmıştır.

Tablo 2.2. ko-GRA1 ve vt-GRA1 kodon karşılaştırması

Amino asit	Kodon	vt- GRA1		ko- GRA1		Amino asit	Kodon	vt- GRA1		ko- GRA1	
		sayı	fraksiyon	sayı	fraksiyon			sayı	fraksiyon	sayı	fraksiyon
Ala	GCG	5	0.42	0	0	Lys	AAG	4	0.5	7	0.88
	GCA	2	0.17	0	0		AAA	4	0.5	1	0.13
	GCT	2	0.17	3	0.25	Met	ATG	5	1	5	1
	GCC	3	0.25	9	0.75		Phe	TTT	1	0.33	1
Arg	AGG	1	0.17	0	0	TTC	2	0.67	2	0.67	
	AGA	2	0.33	0	0	Pro	CCG	1	0.5	0	0
	CGG	1	0.17	1	0.17		CCA	0	0	0	0
	CGA	0	0	0	0		CCT	0	0	0	0
	CGT	2	0.33	0	0		CCC	1	0.5	2	1
	CGC	0	0	5	0.83	Ser	AGT	1	0.08	0	0
Asn	AAT	2	0.29	0	0		AGC	4	0.31	8	0.62
	AAC	5	0.71	7	1		TCG	3	0.23	0	0
Asp	GAT	7	0.44	2	0.13		TCA	2	0.15	0	0
	GAC	9	0.56	14	0.88		TCT	3	0.23	4	0.31
Gln	CAG	6	0.55	9	0.82		TCC	0	0	1	0.08
	CAA	5	0.45	2	0.18	Thr	ACG	1	0.14	0	0
Glu	GAG	10	0.53	15	0.79		ACA	4	0.57	0	0
	GAA	9	0.47	4	0.21		ACT	1	0.14	1	0.14
Gly	GGG	5	0.29	1	0.06		ACC	1	0.14	6	0.86
	GGA	6	0.35	3	0.18	Tyr	TAT	1	0.5	1	0.5
	GGT	1	0.06	0	0		TAC	1	0.5	1	0.5
	GGC	5	0.29	13	0.76	Val	GTG	8	0.53	12	0.8
Ile	ATA	0	0	0	0		GTA	2	0.13	0	0
	ATT	4	0.5	0	0		GTT	3	0.2	0	0
	ATC	4	0.5	8	1		GTC	2	0.13	3	0.2
Leu	TTG	4	0.27	0	0	CTC	CTG	3	0.2	11	0.73
	TTA	1	0.07	0	0		CTA	1	0.07	0	0
	CTG	3	0.2	11	0.73		CTT	4	0.27	0	0
	CTA	1	0.07	0	0		CTC	2	0.13	4	0.27
	CTT	4	0.27	0	0						
	CTC	2	0.13	4	0.27						

Ko-GRA1 iki aşamada birleştirilmiştir. Öncelikle 12 adet kısa oligonükleotid parçası Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile birleştirilerek, üç adet orta büyüklükte DNA oligonükleotid parçası haline getirilmiştir. Sonrasında üç adet orta büyüklükte oligonükleotid birleştirilerek tam uzunluktaki GRA1 geni oluşturulmuştur. Üç adet orta büyüklükte GRA1 DNA oligonükleotid parça birleştirilmesi için, her bir orta oligonükleotid parçasını oluşturacak 12 adet kısa

oligonükleotid parçası içeren oligonükleotid setleri primer uzama reaksiyonuna son konsantrasyonları 0.1 µM olacak şekilde eklenmiştir. Bunun yanında 0.5 µM son konsantrasyonda lider ve izleyici primer oligonükleotidleri (en uzak 5'- ve 3'- DNA oligonükleotidleri) eklenmiştir. Reaksiyonlar ayrıca 2.5U *Pfu*Ultra High-Fidelity DNA polymeraz enzimi (Stratagene, La Jolla, CA), 300 µM dNTP, ve 1×*Pfu*Ultra reaksiyon tamponu içermektedir. Primer uzama ve PZR amplifikasyon reaksiyonu Eppendorf Mastercycler (Hamburg, Almanya) cihazında yürütülmüştür: 95°C'de 5 dk başlangıç denatürasyonu sonrası, 20 sn 95°C, 30 sn 62°C, ve 1 dk 72°C'lik 25 döngü uygulanmış ve son uzama basamağında 5 dk 72°C uygulanmıştır. PZR ürünleri agarose jel elektroforezi ile görüntülenmiştir.

2.2.3.2. TOPO PZR Klonlama

GRA1 geninin her bir orta büyüklükte oligonükleotid parçası için, 1 µl PZR ürünü pCRII-Blunt-TOPO vektörüne 5dk içinde, oda sıcaklığında, üretici firmanın tavsiye edilen protokolü kullanılarak klonlanmıştır (Invitrogen, Carlsbad, CA). 2 µl TOPO klonlama reaksiyonu, 50 µl tek kullanımlık elektro kompetent Top 10 *Escherichia coli* hücre (Invitrogen) ile karıştırılıp elektroporasyon uygulanmıştır. Hemen sonrasında 250 µl of SOC (super optimal catabolizer) besiyeri eklenip ve 37°C'de bir saat inkübe edilmiştir. Daha sonra 50 µl transformasyon reaksiyonu, 50 µg/ml kanamycin içeren LB (Luria Bertani Medium) agar plağa ekilip ve 37°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün birkaç tek koloni 50 µg/ml kanamycin içeren 3ml LB besiyerlerine eklenmiş (LB-Kan 50) ve 37°C'de bir gece boyunca 250 rpm'de (rounds per minute: dakikada ki devir sayısı) çevrilerek inkübe edilmiştir. Plasmid saflaştırması öncesinde üreme olan tüm tüplerden alınan örneklerle, istenilen

orta oligonükleotid parçasını içerip içermediğini belirlemek için koloni PZR reaksiyonu uygulanmıştır. PZR ürünleri agarose jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. Orta büyüklükte oligonükleotid parçası içeren tüm plasmidler DNA sekans analizi yapılması için plasmid miniprepler ile üretici firmanın protokolüne uygun olarak saflaştırılmıştır (Aurum Plasmid Mini Kit, Bio-Rad, Hercules, CA).

2.2.3.3. Tam Uzunlukta Kodon Optimize GRA1 Geninin PZR ile Oluşturulması

Sekans analiz ile hasarsız [eksilme (=delesyon) veya mutasyon olmayan] ko-GRA1 orta oligonükleotid parçası içerdiği saptanan pCR-Blunt II TOPO vektörlerden 5'- ve 3'- en uzak oligonükleotidlerin primer (0.1µM son konsantrasyon) olarak kullanıldığı, PZR amplifikasyonu ile orta büyüklükteki oligonükleotid parçaları izole edilmiştir. Amplifikasyon reaksiyonu ayrıca 0.5µM lider ve izleyici primer oligonükleotidler, 2.5U *Pfu*Ultra High-Fidelity DNA polymeraz enzimi (Stratagene), 150 µM dNTP, ve 1×*Pfu*Ultra reaksiyon tamponu içermektedir. Primer uzama ve PZR amplifikasyon reaksiyonu tarif edilen protokol ile yürütülmüştür: 95°C'de 5 dk başlangıç denatürasyonu sonrası, 20 sn 95°C, 30 sn 68°C, ve 1 dk 72°C'lik 25 döngü ve son uzama basamağında 5 dk 72°C uygulanmıştır. PZR ürünleri agarose jel elektroforezi ile görüntülenmiştir.

Daha sonra her bir orta büyüklükte oligonükleotid parçası içeren PZR reaksiyonundan 1 µl alınarak bir tüp içinde 1 µM lider (5'- 45 nükleotidlik en uzak oligonükleotid) ve izleyici (3'- 44 nükleotidlik en uzak oligonükleotid) primer oligonükleotidler ile karıştırılmıştır. Tam uzunlukta kodon optimize GRA1 geni (531 bp) elde etmek için yukarıda tarif edilen PZR protokolü kullanılmıştır. PZR ürünleri agarose jel elektroforezi ile görüntüledikten sonra TOPO PZR klonlaması ve sekans

analizi amaçlı plasmid miniprepler, orta büyüklükte oligonükleotidlerin oluşturulması sırasında kullanılan protokol ile yapılmış, mutasyon ve esiksiz vektörler bir sonraki aşamada kullanılmıştır.

2.2.4. Memeli Ekspresyon Vektörünün Klonlama için Hazırlanması

CMV promotörü içeren memeli ekspresyon vektörü (10 µg; 5.1 kb; kanamycin dirençli; Gene Therapy Systems, CA A.B.D.) *Bam*HI restriksiyon enzimi kullanılarak 0.1 µg/µl DNA, 0.1 mg/ml BSA, 0.2 units/µl *Bam*HI enzimi içeren reaksiyonda 37°C'de 4 saat inkübe edilerek doğrusal hale getirilmiştir. Elde edilen ürün PCR saflaştırma kiti (Qiagen) ile saflaştırılıp, spektrofotometre ile miktarı belirlendikten sonra agarose jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. Sonrasında homolog klonlama için uygun, doğrusal kabul edici vektörü oluşturmak için primerler, 5'-CACCATCACCATCACCATCACCATCACGTCGAC-3' (forward primer, 33 nükleotid) ve 3'-TGATCTTTTATTAGCCAGAAGTGATCTGGATCC-5' (reverse primer, 33 nükleotid) düzenlenmiştir. Doğrusal alıcı vektör, 1 ng *Bam*HI ile sindirilmiş ve saflaştırılmış vektör, primerler (her biri 0.5 µM), 2.5U AccuPrime *Pfx* DNA polimeraz enzimi (Invitrogen), 1× AccuPrime *Pfx* reaksiyon tamponu içeren karışım ve tarif edilen PZR protokolü ile oluşturulmuştur; 95°C'de 2 dk başlangıç denatürasyonu sonrası, 15 sn 95°C, 30 sn 55°C, ve 6 dk 68°C'lik 35 döngü ve son uzama basamağında 10 dk 68°C uygulanmıştır. PZR ürünleri agarose jel elektroforezi ile görüntülenmiş ve *in vivo* rekombinasyon klonlamasında kullanılmıştır.

2.2.5. Vt-GRA1 ve Ko-GRA1 PZR Amplifikasyonu ile İzolasyonu

Vt-GRA1 ve ko-GRA1 rekombinant plasmidlerinden uygun primerlerle izole edilmiştir. Primerlerin oluşturulmasında 1) Yapışıcı uçların PZR ürünlerine uygun olması 2) Homolog rekombinasyon klonlaması için ise birbirine uyan ve serbest 5'- ve 3'- uçlarının doğrusal alıcı CMV vektörüne uygun halde olmasına dikkat edilmiştir. Vt-GRA1 izolasyonunda 5'-CACCATCACCATCACCATCACCATCAC
GTCGACGCCGAAGGCGGCGACAACCA-3' (forward primer, 53 nükleotid; üst üste gelen kısımların altı çizilmiştir) ve 3'-TGATCTTTTATTAGCCAGAAGTGAT
CTGGATCCCTCTCTCTCTCCTGTTAGGA-5' (reverse primer, 56 nükleotid; üstüste gelen kısımların altı çizilmiştir) primerleri kullanılmıştır. Ko-GRA1 izolasyonu için ise 5'-CACCATCACCATCACCATCACCATCACGTCGACGCAG
AGGGAGGCGACAACCA-3' (forward primer, 53 nükleotid; üstüste gelen kısımların altı çizilmiştir) ve 3'-TGATCTTTTATTAGCCAGAAGTGATCTGGATC
CCTCCCTCTCGCCGGTCAGGA-5' (reverse primer, 56 nükleotid; üstüste gelen kısımların altı çizilmiştir) primerleri kullanılmıştır. Ko-GRA1 ve vt-GRA1 genleri kendi plasmidlerinden yukarıda tarif edilen primerler (her biri 0.5 µM), 2U *Taq*DNA polimeraz (Fisher), 150 µM dNTP ve 1×*Taq*DNA polimerase reaksiyon tamponu ve tarif edilen PZR protokolü ile izole edilmiştir; 95°C'de 5 dk başlangıç denatürasyon sonrası, 30 sn 95°C, 30 sn 50°C, ve 3.5 dk 72°C'lik 35 döngü ve son uzama basamağında 10 dk 72°C uygulanmıştır. PZR ürünleri, PZR saflaştırma kiti (Qiagen) ile saflaştırılmış, spektrofotometre ile DNA miktarı ölçüldükten sonra, agarose jel elektroforezi ile görüntülenmiştir.

2.2.6. *In vivo* Rekombinasyon Klonlaması

In vivo rekombinasyon klonlaması Davies ve ark. tarif ettiği gibi yapılmıştır (38). Her transformasyon reaksiyonunda: 4 µl doğrusal kabul edici CMV vektör (10 ng/µl), 1 µl vt-GRA1 veya ko-GRA1 (10 ng/µl) ve 10 µl DH5α kompetent hücre kullanılmıştır (38). Daha sonra karışım 45 dk boyunca buz üstünde inkübe edilmiş, 42°C'lik su banyosunda 1 dk ısı şokuna maruz bırakılmıştır. Ardından 1 dk buz üstünde soğutulup üzerine 200 µl SOC besiyeri eklenmiştir. 37°C'de 250 rpm ile çevrilerek 1 saat inkübe edilen karışım, 3 ml LB-Kan 50'ye ekilmiş ve tekrar 37°C'de, bir gece boyunca 250 rpm'de çevrilerek inkübe edilmiştir. Ertesi gün vt-GRA1 ve ko-GRA1 genlerinin doğrusal CMV vektörü ile uygun şekilde birleşip birleşmediğini doğrulamak için 100 µl bir gecelik kültür, 100 µl phenol/chloroform/isoamyl alkol (Fisher) 1.5 ml tüp içine konularak, vorteksle karıştırılmış, 14.100 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra tüpün üst kısmından (yıkılmış hücre DNA içerir) alınan örnek agarose jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. Fenol jel sonuçlarında vt-GRA1 ve co-GRA1 içeren plasmidler saptandığında, 50 µl transformasyon kültürleri 50 µg/ml kanamycin içeren LB agar plağa ekilmiş ve 37°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün seçilen birkaç koloni 3ml LB-Kan 50'ye ekilmiş ve 250 rpm ile çevrilerek bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Gecelik kültürden elde edilen plasmidler, plasmid miniprepler (Aurum plasmid mini kit, Bio-Rad) ile üretici firma protokolüne göre saflaştırılmış, agarose jelde görüntülenmiş ve sekans analizi yapılarak CMV içinde yer alan vt-GRA1 ve ko-GRA1 genlerinde mutasyon ve eksilme olmadığı saptanmıştır. Oluşan plasmidlere CMV/vt-GRA1 ve CMV/ko-GRA1 adları verilmiştir.

2.2.7. İnsan Embryojenik Böbrek Hücrelerinde *in vitro* Transfeksiyon

İnsan Embryojenik böbrek hücreleri (Human embryonic kidney 293; HEK 293), American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)'den temin edilmiştir. HEK 293 hücreleri, Dulbeccos modified Eagle medium (DMEM), % 10 (v/v) ısı ile inaktive edilmiş fetal bovine serum (Hyclone), 2mM L-glutamine ve ml başına 100 IU of penisilin ve 100 gr streptomisin (Invitrogen-Gibco) içeren geliştirme besiyeri kullanılarak 37°C'de, % 5 CO₂'li ortamda üretilmiştir. Kültürün 5. gününde hücreler iç içe girecek kadar sıklaşan tek kat tabaka yapınca % 0.25 trypsin-EDTA (Invitrogen-Gibco) ile serbestleştirilmiş, hemositometre ve trypan mavisi kullanılarak canlı hücre miktarı sayılmıştır. Dört çukurlu lamların her bir deliğine, 2×10⁵ canlı hücre, 600µl antibiyotiksiz geliştirme besiyerinde süspansiyon edilerek ekilmiş (Nalge Nunc) 37°C'de, % 5 CO₂'li ortamda bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler flaskın tabanında % 95–100 oranında iç içe girecek kadar sıklaşınca besiyeri opti-MEM'e çevrilmiştir. 2µl Lipofectamine-2000 (Invitrogen) ve 50µl opti-MEM (Invitrogen-Gibco) bir tüpte karıştırılıp ve 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra bu karışıma ayrı ayrı tüplerde, 0.8 µg CMV/vt-GRA1 ve CMV/ko-GRA1 eklenip yine oda sıcaklığında 20 dk boyunca CMV/vt-GRA1-Lipofectamine ve CMV/ko-GRA1-Lipofectamine komplekslerinin oluşması için inkübe edilmiştir. Sonrasında karışımlar HEK 293 hücreleri içeren dört çukurlu lamların her bir çukuruna ilave edilip 37°C'de, % 5 CO₂ bulunan ortamda 4 saat inkübe edildikten sonra, hücre kültürü üst sıvısı taze geliştirme besiyeri ile değiştirilmiş ve 37°C'de, % 5 CO₂'li ortamda 48 saat daha inkübe edilmiştir. Dört çukurlu lamlarda transfekte edilen HEK 293 hücrelerdeki protein ekspresyon seviyesi immunfloresan mikroskopi yöntemi ile saptanmıştır. Ayrıca 10 cm-çaplı

kültür plaklarında aynı protokol ile transfekte edilmiş HEK 293 hücreleri ise eritildikten sonra protein ekspresyon seviyeleri western blot yöntemi kullanılarak karşılaştırılmıştır.

2.2.8. İmmunfloresan Mikroskopisi Yöntemi

CMV/vt-GRA1 veya CMV/ko-GRA1 plasmid ile dört çukurlu lamlarda transfekte edilmiş HEK 293 hücrelerine ait besiyeri boşaltılıp, ısıtılmış 1×PBS (Ph: 7.4) ile yıkanmış, soğuk metanol ile 5 dk, ardından soğuk aseton ile 30 sn fikse edilmiştir. Daha sonra lamalar 1×PBS ile oda sıcaklığında 5 dk yıkanmış ve soğuk % 1 BSA ile (1×PBS ile sulandırılmış) 30 dk süreyle bloke edilmiştir. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Lamalar % 1 BSA ile 1/200 oranında dilüe edilmiş monoklonal anti-polyhistidine antikor (Sigma) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra lamalar 1×PBS ile 3 kere 5 dk süreyle yıkanıp, % 1 BSA ile 1/100 oranında dilüe edilmiş, koyun kaynaklı, FITC ile konjuge edilmiş, anti-mouse IgG antikor ile bir saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir (clone, His-1; Sigma). Bundan sonra lamalar 1×PBS ile 3 kere 5 dk süreyle FITC'nin solmaması için, karanlık ortamda yıkanıp, hava ile kurutulduktan sonra immunfloresan mikroskop (Zeiss Axiomat, Thornwood, NY) ile görüntülenmiştir. 10 cm çaplı kültür plaklarından elde edilen CMV/vt-GRA1 ve CMV/ko-GRA1 ile transfekte edilmiş HEK 293 hücreleri, hemositometre ile sayıldıktan sonra 1×PBS ile 3 kere yıkanmış ve sonrasında dondurma çözündürme uygulanmıştır. Hücre eriyiği 10.000×g ile 10 dk santrifüj edilmiştir. Üst sıvıda bulunan protein miktarı Commasie Plus Protein Assay reagent (Pierce) ve spektrofotometre (Beckman-Coulter) ile üretici firmanın tavsiye edilen

protokolü kullanılarak belirlenmiş ve western blot için kullanılmıştır. Standart eğrinin belirlenmesi için seri sulandırılmış BSA kullanılmıştır.

2.2.9. Doğal Jel Elektroforezi, Sodyum Dodesil Sülfat-poliakrilamid Jel Elektroforezi ve Western Blotting

Araştırma sırasında rekombinant GRA1 proteinine uygulanan karides AP ile defosforilasyon ve EGTA ile etkileşim sonrası eşit miktarda protein örnekleri hem % 12 doğal jel elektroforezi ile hem de % 12 sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid (SDS-PAGE) ile yürütülmüştür. HEK 293 hücre eriğinde CMV/vt-GRA1 ve CMV/ko-GRA1 tarafından eksprese edilen protein miktarını karşılaştırmak için, eşit miktarda protein % 12 SDS-PAGE ile ayrıştırılmıştır. Aşıların etkisi ile üretilen antikorların immunoreaktivitesini belirlemek için TAg % 12 SDS-PAGE ile ayrıştırılmıştır. Ayrıştırılmış protein örnekleri, polyvinylidene difluoride (PVDF) transfer membranına aktarılmış, (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA) daha sonra membran % 6 (w/v) yağsız süt içeren 1×TBS-T tamponunda (% 0.5 Tween-20, 20 mM Tris-HCl, 0.5M NaCl) bir saat bloke edilmiştir. HEK 293 eriyiklerini içeren membranlar 1/1000 oranında sulandırılmış monoklonal anti-polyhistidine antikor ile (Sigma) bir gece boyunca 4°C’de inkübe edilmiştir. İmmunoreaktiviteyi belirlemek için, TAg içeren membranlar dört değişik aşlamadan elde edilen 1/100 oranında sulandırılmış serum havuzları ve kontrol havuzu ile bir gece boyunca 4°C’de inkübe edilmiştir. Ertesi gün membranlar 3 kere 1×TBS-T tamponu ile yıkanmış ve 1/1000 oranında sulandırılmış alkaline fosfataz-konjuge edilmiş keçi kaynaklı anti-fare IgG (H+L) antikorunu (Bio-Rad) ile bir saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra blotların görüntülenmesi için alkaline fosfataz geliştirme tamponu (0.1 M Na₂CO₃,

pH: 9.5, 0.1 M NaCl, 5 mM MgCl₂) içinde çözdürülen 5-bromo-4-kloro-3-indolyl fosfat (BCIP) ve Nitro-BT (Fisher Scientific) kullanılmıştır.

2.2.10. Saflaştırılmış Protein Örneklerinde Endotoksin Eksiltmesi ve Seviyesinin Ölçümü

İmmobilize Polymyxin B içeren Detoxi-gel affinite kolonu, üretici firma protokolüne göre, saflaştırılmış rekombinant GRA1 proteininden endotoksin eksiltme amacı ile kullanılmıştır (Pierce). Kolon öncelikle % 1 sodium deoxycholate ile rejenere edilmiş ve endotoksin içermeyen distile su ile yıkanmıştır. Kolon endotoksin içermeyen 1×PBS ile dengelendikten sonra 750 µl protein örneği kolona yüklenmiş ve 30 dk 4°C’de inkübe edilmiştir. Örnek içindeki endotoksin seviyesi Limulus Ameobocyte Lysate Gel-Clot testi içeren Pyrotell tek test tüplerinde üretici firmanın protokolüne göre saptanmıştır (Associates of Cape Cod, East Falmouth, MA). Endotoksini azaltılmış, saflaştırılmış rGRA1 örneklerinin içerdiği protein miktarı Commasie Plus Protein Assay reagent (Pierce) ve spektrofotometre (Beckman-Coulter) ile üretici firmanın tavsiye edilen protokolü kullanılarak belirlenmiş ve –80°C’de saklanmıştır. Standart eğrinin belirlenmesi için seri sulandırılmış BSA kullanılmıştır.

2.2.11. Aşılama ve Enfekte Etme

6 haftalık, üç grup dişi BALB/c fare ve kontrol gruplarına üç hafta aralıklarla iki defa CMV/vt-GRA1, CMV/ko-GRA1 ve rGRA1-Provax aşısı adayları uygulanmıştır. DNA aşısı endo-free plasmid saflaştırma kiti ile saflaştırılmış (Qiagen) ve anestezi altındaki farelerin tibialis anterior kasına tüberkülin şırıngası

kullanılarak i.m. olarak uygulanmıştır. Her iki kasa 1 mg/ml konsantrasyondaki stoktan, toplam 100 µl enjekte edilmiştir.

rGRA1-Provax aşısı, tarif edildiği gibi yapılan Provax ve rekombinant GRA1 proteini kullanılarak formüle edilmiştir (75). Provax adjuvanı, squalane, Tween 80 ve Pluronic L121 distile su içinde sırasıyla % 15, % 0.6 ve % 3.75 (w/v) oranlarında karıştırılarak hazırlanmıştır. Karışım M-110T Microfluidizer'dan 12,000–14,000 psi iç basınçta, homojenize olana kadar geçirilmiştir (Microfluidics Corporation). Sonrasında 66 µl steril 1×PBS içinde bulunan 33 µg rekombinant GRA1 proteini 33 µl Provax adjuvanı ile karıştırılmış ve intraperitoneal yol ile farelere uygulanmıştır. Ayrıca, rekombinant GRA1-Provax aşısının etkinliğini değerlendirmek için üç fare içeren iki gruptan ilki sadece 33 µg rekombinant GRA1 proteini ile iki kere aşılanmıştır. İkinci grupta ise ilk aşılama Freund'un tam adjuvanı ile birleştirilmiş 33 µg rekombinant GRA1 proteini ve ikinci aşılama Freund'un yarım adjuvanı ile birleştirilen aynı miktar protein (rGRA1-Freund) içeren aşılar intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

Negatif kontroller 3 grupta tasarlanmıştır. İlk gruba 1 mg/ml konsantrasyondaki boş vektör stoğundan, toplam 100 µl uygulanmıştır, ikinci gruba intraperitoneal yol ile 33µl Provax adjuvanı, son grup hayvana ise aşılama yapılmamış, antijene özgü proliferatif immun cevap ve sitokin ölçümünde kontrol olarak kullanılmıştır. Üç fare içeren bir fare grubuna ise sadece Freund adjuvanı uygulanmıştır. Kuyruk kanları her aşılama 3 hafta sonra toplanmış, her gruptan 8 fare intraperitoneal olarak 1×10^5 canlı *T. gondii* RH takizoiti ile ilk aşılama 9 hafta sonra enfekte edilmiştir.

2.2.12. Protein Mikroarray Yöntemi Kullanılarak Antikor Cevabının Ölçülmesi

Protein mikroarray lamaları Davies ve ark. tarif ettiği gibi yapılmıştır (37, 38). Özetle, 15 µl saflaştırılmış rekombinant GRA1 proteini (2.5 mg/ml) 10µl % 0.125 Tween 20 ile karıştırılmış, 1,600×g'de santrifüj edilmiştir. Rekombinant GRA1 proteini içeren üst sıvı OmniGrid 100 microarray yazıcı (Genomics Solutions, Ann Arbor, MI) ile nitroselüloz kaplı FAST™ cam lamlara yazdırılmıştır (Schleicher & Schuell, Keene, NH). Lamlar 100 µl Protein Array bloklama tamponu ile 30 dk süreyle oda sıcaklığında hafifçe çalkalayarak bloke edilmiştir (PABT, Schleicher & Schuell). Hazırlanan lamlar 1. ve 2. aşılardan 3 hafta sonra farelerden alınan serum örnekleri ile muamele edilmiştir. Saflaştırılmış rekombinant GRA1 proteini, anti-*E. coli* antikor uyaraabilecek eser miktarda *E. coli* proteinleri içerebileceği ve buna bağlı olarak art alan parlamasının non-spesifik olarak artabileceği için fareden alınan serum örneklerine *E. coli* eriyiği eklenmiştir. *E. coli* eriyiği Davies ve ark. tarif ettiği gibi hazırlanmıştır (38). *E. coli* eriyiği PABT içinde son konsantrasyon % 10 olacak şekilde sulandırıldıktan sonra fare serumlarını dilüe etmekte kullanılmıştır. Rekombinant GRA1 protein içeren mikroarray lamalar (proteom lam) 1/50 oranında sulandırılmış serum örnekleri ile iki saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 3 kere 1×TBS-T tampon yıkanmıştır. Daha sonra kompleks oluşturmuş antikorlar 1/200 oranında PABT ile sulandırılmış, Cy3-konjuge edilmiş IgG antikor (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) ile bir saat karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Son olarak proteom lamalar iki kere 1×TBS-T tamponu ve 2 kerede 1×TBS tamponu ile yıkandıktan sonra ScanArray 4000 lazer konfokal tarayıcı (GSI Lumonics, Billerica, MA) ile taranmıştır. Proteom lamaların üstünde protein içeren noktaların floresan yoğunluğu (FY) QuantArray programı (GSI Lumonics) ile ölçülmüştür.

Eğer herhangi bir aşılanmış fareden alınan 1/50 oranında sulandırılmış serum örneğinin FY değeri o aşılama grubuna ait 1/50 oranında sulandırılmış negatif kontrol grubu serum örneğinden FY+5S.D. (S.D.: Standard deviation; Standart sapma) yüksekse antikor cevabı var kabul edilmiştir.

2.2.13. Protein Mikroarray Yöntemi Kullanılarak IgG Altgruplarının Değerlendirilmesi

Aşılanmış farelerden elde edilen serum örneklerinde anti-rekombinant GRA1 proteine özgü IgG1 ve IgG2a altgrup saptanması protein mikroarray analizi ile yukarıda tarif edildiği gibi yapılmıştır. Rekombinant GRA1 protein içeren proteom lamalar aşılanmış farelere ait 1/50 oranında sulandırılmış serumlar ile karşılaştırılmıştır. Daha sonra proteom lamalar 1/200 oranında PABT ile sulandırılmış Cy3-konjuge edilmiş IgG1 ve IgG2a antikorları ile (Jackson ImmunoResearch) bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Proteom lamalar ScanArray 4000 lazer konfokal tarayıcı (GSI Lumonics) ile taranıp, FY QuantArray programı ile (GSI Lumonics) ölçülmüştür.

2.2.14. Antijene Özgü Proliferatif İmmün Cevabın Ölçümü

İlk aşılama 9 hafta sonra usullere uygun olarak öldürülen farelerin dalakları steril olarak çıkarılmıştır (grup başına 3 fare). Tek hücre süspansiyonları hazırlamak için dalaklar iki buzlu mikroskop lamı vasıtasıyla Hank'in dengeli tuz solüsyonunda (HBSS: Hank's balanced salt solution) (Cellgro, Herndon, VA) ezilmiştir. Dalak hücreleri 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılmış

ve hücreler 1 ml kırmızı kan hücre yıkıcı solüsyon (15mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1mM EDTA, pH 7.4) ile tekrar süspansiyon edilip 3 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Hemen sonra 5 ml HBSS eklenip izotonik ortam oluşturulmuştur. Dalak hücreleri 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılmış ve hücreler 10 ml geliştirme besiyeri ile süspansiyon edilmiştir. Geliştirme besiyeri 1×RPMI 1640, % 10 fetal calf serum, 55µM 2-mercaptoethanol (Invitrogen-Gibco), 1 mM sodyum pyruvate, 0.1 mM MEM non-essential aminoasit, 2 mM L-glutamine, penisilin (100 U/ml) ve streptomisin (100 µg/ml) (Cellgro) oluşmuştur. Hücrelerin canlılığı ve miktarı trypan mavisi ve hemositometre ile saptanmıştır. Yuvarlak tabanlı 96 çukurlu plakların her bir çukuruna 5×10⁵ canlı hücre 100 µl geliştirme besiyeri içinde üç kopya halinde eklenmiştir. Dalak hücreleri uyarılmadan önce endotoksini azaltılmış rekombinant GRA1 proteinine 50µg/ml son konsantrasyonda polymyxin B ilave edildikten sonra yarım saat inkübe edilmiştir. Hücreler 0.6 ile 50 µg/ml oranında saflaştırılmış rekombinant GRA1 proteini veya kontrol proteini olarak *T. gondii* ile ilişkisi olmayan çiçek virüsüne ait rekombinant H3L proteini ile 15 µg/ml oranında uyarılmıştır. Pozitif kontrol olarak her çeşit aşılama ve kontrol gruplarından elde edilen hücreler Concanavalin A ile son konsantrasyon 10 µg/ml olacak şekilde inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak sadece 200µl geliştirme besiyeri kullanılmıştır. Her bir çukurda bulunan hücreler, toplam 200µl geliştirme besiyeri içinde % 5 CO₂ ve 37°C'lik ortamda 72 saat inkübe edilmiştir. Deneyin son 16 saatinde dalak hücresi içeren her bir çukura, 50µl geliştirme besiyeri içinde sulandırılmış, 1µCi ³[H]-thymidine (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences) eklenmiştir. Daha sonra dalak hücreleri, hücre toplayıcı (TOMTEC, manual harvester 96, Mac IIM, Hamden, CT) ile cam filtre kâğıdına (Wallac, Turku, Finlandiya) toplanmış ve kâğıttaki radyoaktivite, sıvı ışımaya sayımı (BETA Plate

liquid scintillation counter, Wallac) ile ölçülmüştür. Sonuçlar stimülasyon indeksi (SI) olarak ifade edilmiştir. SI, rekombinant GRA1 proteini ile uyarılan hücrelerden elde edilen dakika başına sayım ortalamasının (cpm: counts per minute), kontrollerden elde edilen hücrelerin dakika başına sayımı ortalamasına bölünerek bulunmuştur.

2.2.15. Sitokin Ölçümü

Aşılanmış ve aşılanmamış farelerden (grup başına 3 fare) alınan dalak hücreleri yuvarlak tabanlı 96 çukurlu plakların her bir çukuruna, 5×10^5 canlı hücre gelecek şekilde, üç kopya halinde eklenmiştir. Yukarıda anlatıldığı gibi hücreler rekombinant GRA1 proteini ve *T. gondii* ile ilişkisi olmayan rekombinant H3L proteini ile uyarılmıştır. Hücre içermeyen üst sıvı IL-4 aktivitesi için 24. ve 72. saatlerde ve gamma interferon (IFN- γ) aktivitesinin ölçümü için 72. saatte toplanmıştır. Üst sıvılardaki IL-4 ve IFN- γ konsantrasyonu ELISA kiti üretici firmanın tampon solüsyonları ve tavsiye edilen protokolü kullanılarak (eBioscience, San Diego, CA) saptanmıştır. Özetle, NUNC Maxisorp 96 çukurlu ELISA plakları 100 μ l/çukur oranında IFN- γ veya IL-4 capture antikoru solüsyonu ile kaplanıp bir gece boyunca 4°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün plaklar 1xPBS içeren % 0.05 Tween 20 (PBS-T) tamponu ile yıkanıp ve bir saat bloke edilmiştir. PBS-T ile yıkama sonrası seri sulandırılmış standartlar ve 100 μ l üst sıvılar, her bir deliğe eklenip, gece boyunca 4°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün plaklar PBS-T ile yıkanıp, her deliğe 100 μ l Biotin ile konjuge edilmiş anti-fare IL-4 veya IFN- γ saptama antikoru eklenmiş ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Plaklar yıkandıktan sonra her deliğe 100 μ l avidin-horseradish peroxidaz eklenip, 30 dk oda

sıcaklığında tutulmuştur. En son olarak plaklar yıkandıktan sonra her deliğe 100 µl tetramethylbenzidine eklenip, 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve sonrasında enzimatik reaksiyon 2N sulfuric asit ile durdurulmuştur. Absorbans, ELISA plak okuyucusu (Dynex Technologies, Chantilly, VA) ile 450nm dalga boyunda okunmuştur. ELISA için sensitivite limiti seri sulandırılmış rekombinant fare IFN-γ ve rekombinant fare IL-4 standartlarından elde edilen standart eğrilerle saptanmıştır. IFN-γ için 100 pg/ml'den, IL-4 için 10 pg/ml yüksek değerler pozitif sayılmıştır.

2.2.16. İstatistiksel Analiz

Çalışma sırasında elde edilen veriler Microsoft Excel 2000 programı ile işlemden geçirilmiş ve istatistiksel analiz Prism 3.03 programı (GraphPad, San Diego, CA) ile gerçekleştirilmiştir. Aşılama grupları arasındaki farkı değerlendirmek için Two-tailed unpaired *t* testi veya % 95 güvenlik aralığı bulunan one-way varyans analizi kullanılmıştır. Aşı adaylarının letal toxoplasmosise karşı oluşturdukları korumayı göstermek için Kaplan-Meier yaşam eğrilerinden yararlanılmıştır. Humoral ve hücrel immun cevap sonuçları ve yaşam süreleri, aritmetik ortalama ± standart sapma olarak verilmiş, aksi belirtilmediği takdirde, 0.05 ve daha küçük *P* değerleri anlamlı olarak yorumlanmıştır.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR

Deneylemler sonucunda elde ettiğimiz veriler iki ana başlık altında incelenmiştir. Birinci bölümde rekombinant GRA1 proteininin tanımlanması aşamasında yapılan rekombinant GRA1 proteininin biyoinformatik çalışmaları, rekombinant GRA1 proteininin *E. coli* Rosetta™ 2(DE3) pLysS hücrelerde ekspresyonu ve saflaştırılması sonuçları, kütle spektrometrisi, defosforilasyon çalışması, rekombinant GRA1 protein-EGTA etkileşimi, protein sindirme testleri ve kristalizasyon deneme sonuçları verilmiştir. İkinci bölümde ise üç tip GRA1 kökenli aşı adayının (Memeli hücreye kodon-optimize GRA1 DNA aşısı, vahşi tip GRA1 DNA aşısı ve Provac ile adjuvante edilmiş rekombinant GRA1 protein aşısı) BALB/c farelerde oluşturduğu immunolojik yanıt ve koruma sonuçları değerlendirilmiştir.

3.1. Rekombinant GRA1 Protein Tanımlanması

3.1.1. Biyoinformatik Değerlendirme Sonuçları

Rekombinant GRA1 proteininin üretimini sağlayan pUETΔGRA1 vektöründe yer alan GRA1 genini içeren ORF bölgesinin 669 bp büyüklüğünde olduğu bilinmektedir. Bu bölgenin kodladığı proteinin 222 aminoasitten oluşmaktadır. Vektör içinde vahşi tip GRA1 genini kodlayan kısım 495 bp büyüklüğünde olup, kodladığı protein 165 aminoasitten oluşmaktadır. Vektörün 5' ve 3' ucunda toplam iki adet, her birisi 6 histidin aminoasidi içeren bölge bulunmaktadır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Rekombinant GRA1 proteinin üretimini sağlayan pUETΔGRA1 vektörü gen (A) ve protein (B) sekansları

A) pUETΔGRA1 vektöründe yer alan GRA1 genini içeren ORF bölgesi (669 bp)*

```
ATGCACCATCATCATCATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGC
TGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCCCGAAGGCGGCGACAACCAGTCGAGCGCCG
TCTCAGATCGGGCGTCTCTCTTTGGTTTGGCTGAGTGGAGGGACAGGGCAGGGATTAGGAATCGGAGAA
TCTGTAGATTTGGAGATGATGGGGAACACGTATCGTGTGGAGAGACCCACAGGCAACCCGGACTTGCT
CAAGATCGCCATTAAAGCTTCAGATGGATCGTACAGCGAAGTCGGCAATGTTAACCTGGAGGAGGTGA
TTGATACTATGAAAAGCATGCAGAGGGACGAGGACATTTTCCTTCGTGCGTTGAACAAAGGCGAAACA
GTAGAGGAAGCGATCGAAGACGTGGCTCAAGCAGAAGGGCTTAATTCGGAGCAAACCTGCAACTGGA
AGATGCAGTGAGCGCGGTGGCGTCTGTTGTTCAAGACGAGATGAAGGTGATCGACGATGTGCAGCAGC
TTGAAAAGGACAAACAACAGCTTAAGGATGACATTTGGGTTCTTAACAGGAGAGAGAGGGAATTAAT
TCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGC GGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA
```

B) pUETΔGRA1 vektörü ORF bölgesinin kodladığı protein (222 aminoasit) **

```
MHHHHHSSGLVPRGSGMKETAAAKFERQHMDSPDPEGGDNQSSAVSDRASLFGLLSGGTGQGLGIGE
SVDLEMMGNTYRVERPTGNPDLLKIAIKASDGSYSEVGNVNVVEEVIDTMKSMQRDEDIFLRALNKGET
VEEAIEDVAQAEGLNSEQTLQLEDAVSAVASVVQDEMKVIDDVQQLKDDIGFLTGEREGIN
SSSVDKLAAALEHHHHHH-
```

* kırmızı renkli kısım 495 bp büyüklüğündeki GRA1 genine aittir.

** kırmızı renkli kısım 165 aminoasitten oluşan GRA1 proteinine, yeşil kısımlar histidin bölgelerine (2 adet, her birisi 6 aminoasit) aittir.

Rekombinant GRA1 protein sekansında Proscan ile yapılan sekonder yapısal analizinde 5 farklı patern ile % 100 benzerlik saptanmıştır. Bunlar sırasıyla

- 1 adet N-glikozilasyon bölgesi: N-{P}-[ST]-{P}, 41 ile 44 aminoasit arası (NQSS), 204 ile 207 aminoasit arası (NSSS)
- 3 adet Protein kinaz C fosforilasyon bölgesi: [ST]-x-[RK], 47 ile 49 aminoasit arası (SDR), 78 ile 80 arası (TYR), 116 ile 118 aminoasit arası (TMK)
- 3 adet Kazein kinaz II fosforilasyon bölgesi: [ST]-x(2)-[DE], 101 ile 104 aminoasit arası (SYSE), 136 ile 139 aminoasit arası (TVEE), 206 ile 209 aminoasit arası (SSVD)
- Tyrosine kinaz fosforilasyon bölgesi: [RK]-x(2,3)-[DE]-x(2,3)-Y, 96 ile 102 aminoasit arası (KASDGSY).
- 7 adet N-myristoylasyon bölgesi: G-{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAGCN]-{P}, 17 ile 22 aminoasit arası (GMKETA), 54 ile 59 aminoasit arası (GLLSGG), 59 ile 64 aminoasit arası (GTGQGL), 61 ile 66 aminoasit arası (GQGLGI), 63 ile 68

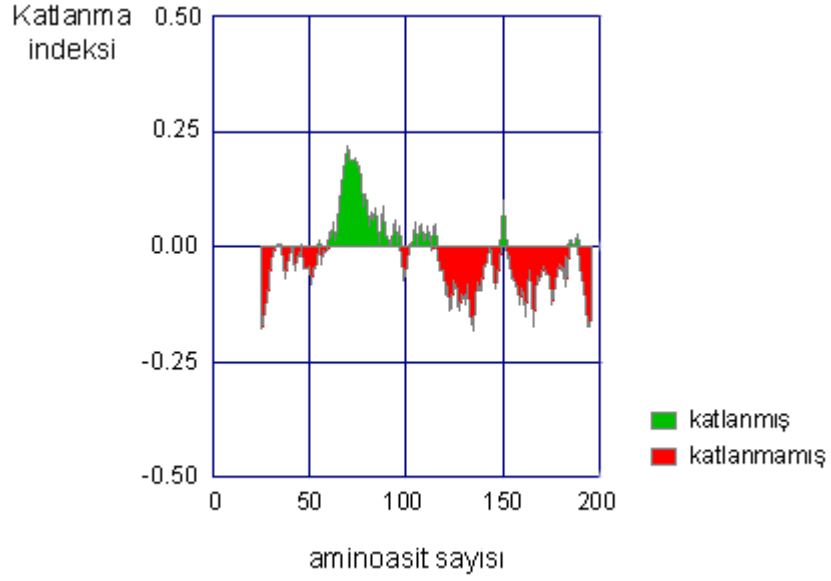
aminoasit arası (GLGIGE), 65 ile 70 aminoasit arası (GIGESV), 202 ile 207 aminoasit arası (GINSSS).

Bu bölgeler dışında rekombinant GRA1 proteininde 2 adet, Cesbron-Delauw ve ark. tarafından tanımlanan, EF-eli kalsiyum bağlama bölgesi saptanmıştır (30). EF-eli kalsiyum bağlama bölgesinin paterni D-x-[DNS]-{ILVIFYW}-[DENSTG]-[DNQG HRK]-{GP}-[LIVMC]-[DENQSTAGC]-x(2)-[DE]-[LIVMIFYW] şeklinde Proscan programında tanımlanmıştır. Rekombinant GRA1 proteininde bu paterne uyan bölgeler ve benzerlikler: 101 ile 113 aminoasit arası bölgede % 68 benzerlik (sYSEvGNVNVVEEV) ve 149 ile 161 aminoasit arası bölgede % 67 benzerlik (gLNSEQTLQLEDa) bulunmuştur. Proscan patern yorumlama anahtarı tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Proscan patern yorumlama anahtarı

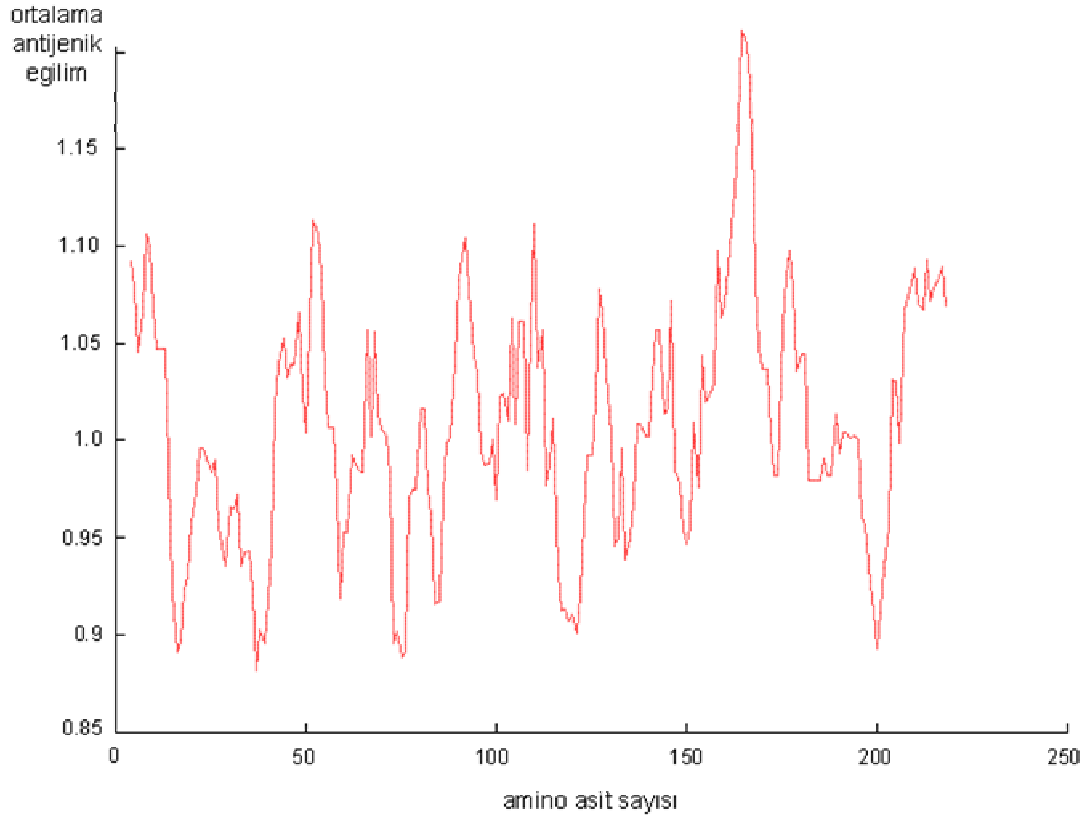
Sembol	Anlamı
x	her hangi bir aminoasit kabul edilir
[]	bu pozisyonda kabul edilen aminoasit
{}	bu pozisyonda kabul edilmeyen aminoasit
()	parantez içinde sayı paternin tekrarlama sayısıdır
-	her bir paternin elementini ayırır

Rekombinant GRA1 protein sekansının FoldIndex programı ile yapılan katlanma indeksi hesaplaması sonrası (142), 6 bölgede proteinin katlanmadığı ön görülmüştür. Bu bölgelerde bulunan toplam aminoasit sayısı 143 olarak hesaplanmıştır. Katlanmayan bölgelerin sırasıyla 1–31, 47–54, 97–101, 116–148, 152–184 ve 190–222 aminoasitler arası olduğu belirlenmiştir (Grafik 3.1).



Grafik 3.1. Rekombinant GRA1 protein katlanma indeksi. Pozitif katlanma indeksi değerleri proteinin katlanma olasılığının yüksek olduğu bölgelerken, negatif katlanma indeksi proteinin katlanma olasılığının düşük olduğu bölgelerdir.

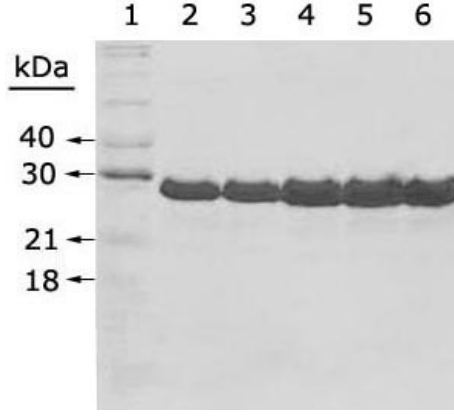
Rekombinant GRA1 protein sekansının Harvard Üniversitesi Moleküler İmmünoloji Kurumunun Biyoinformatik sayfasında yer alan antijenik bölgeleri ön gören program ile yapılan analiz sonucunda, 8 bölgede antijenik yapı saptanmıştır. Ortalama antijenik eğilimi, Kolaskar ve Tongaonkar'ın geliştirdiği yaklaşım ile hesaplayan bu program göre, eğer ortalama antijenik eğilim 1.0 üzerinde ise, 1.0 üzerinde kalan bütün aminoasitler potansiyel antijenik kabul etmektedir (97). Program rekombinant GRA1 proteinin ortalama antijenik eğilim değerini 1.0094 bulmuştur (Grafik 3.2). Programa göre 4–13, 42–57, 88–95, 101–107, 137–146, 154–172, 175–181 ve 207–218 aminoasitler arası kalan bölgelerin potansiyel antijenik olduğu saptanmıştır.



Grafik 3.2. Rekombinant GRA1 protein olası antijenik eğilim grafiği

3.1.2. Rekombinant GRA1 Protein Ekspresyonu, Saflaştırması ve MALDI-TOF Kütle Spektrometrisi

pUETΔGRA1 vektörünü içeren *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) pLysS hücre büyümesi 600 nm.'de ölçülen optik dansite 0.4'e ulaştığında vektör 1 mM son konsantrasyondaki IPTG ile uyarılmıştır. Hücreler 16 saat sonra toplanmış, yıkılmış ve işlemden geçirilmiştir. Rekombinant GRA1 proteini iki basamakta saflaştırılmıştır. İlk olarak HiTrap Ni²⁺ şelasyon HP kolonu ve sonrasında jel filtrasyon Superdex 200 kolonunda saflaştırılan proteinin saflığı SDS-PAGE ile belirlenmiştir (Şekil 3.1). Protein saflaştırma protokolü, 1 L hücre kültüründen 2.5 mg saf rekombinant GRA1 proteininin elde edilmesini sağlamıştır.



Şekil 3.1. Jel filtrasyon kolonundan elde edilen saflaştırılmış rekombinant GRA1 proteininin SDS-PAGE analizi. 1. örnek: Protein standart (QuantPro, Expression Technologies, San Diego, CA); 2–6. örnekler arası: giderek artan (250-400µg arası) konsantrasyonda saflaştırılmış rekombinant GRA1 proteini

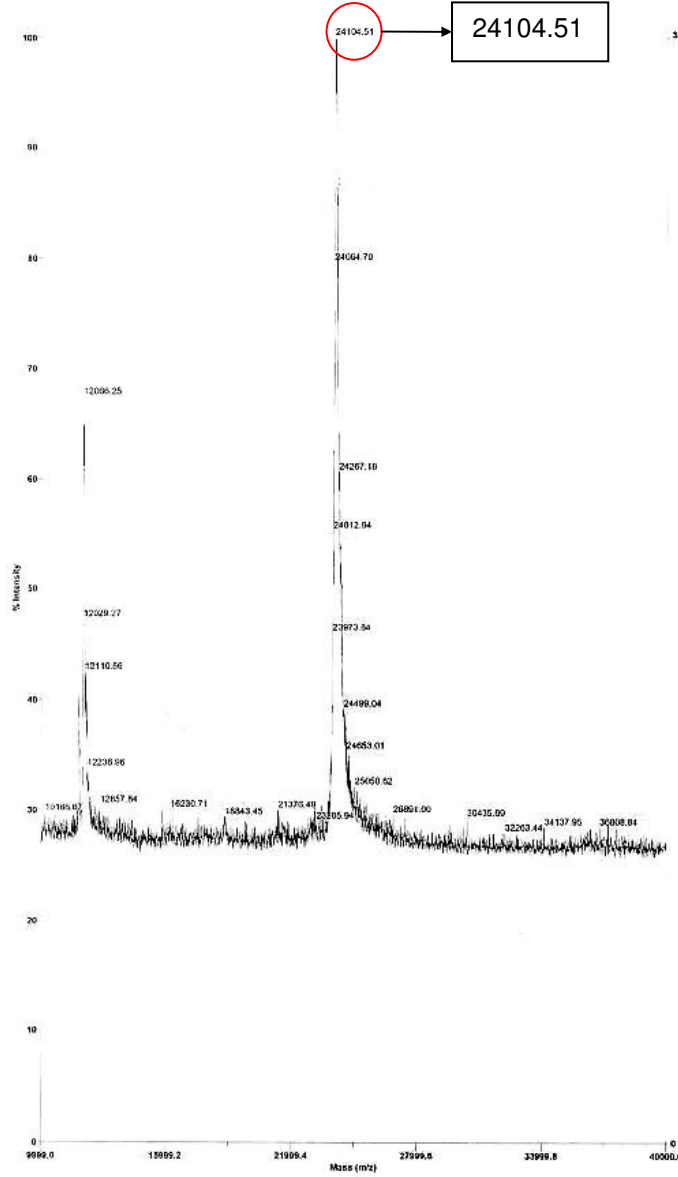
SDS-PAGE veya anti-polyhistidin monoklonal antikor kullanılan western blot incelemelerinde saflaştırılmış rekombinant GRA1 proteininin görünür moleküler ağırlığı 26 kD olarak hesaplanmıştır. Rekombinant GRA1 proteininin hesaplanmış moleküler ağırlığı, pUETΔGRA1 vektörde 669 bp'lik ORF bölgesinden eksprese edildiği şekliyle 24,085'dir. Bu uyumsuzluğun çözümlenmesi için 3 farklı saflaştırmayla elde edilen saf rekombinant GRA1 proteini, MALDI-TOF kütle spektrometrisi ile incelenmiş ve örneklerin ortalama 24,120 de pik yaptığı görülmüştür (Grafik 3.3).

3.1.3. Saflaştırılmış Protein Örneklerinde Endotoksin Eksiltmesi

Saflaştırılmış rekombinant GRA1 proteinindeki endotoksin seviyesi immobilize Polymyxin B içeren Detoxi-gel affinite kolonu ile aşlamaya uygun seviyeye düşürülmüştür (50 endotoksin Unit (EU)/50 µg protein). Endotoksin seviyesi Limulus Ameobocyte Lysate Gel-Clot testi içeren Pyrotell tek test tüpleri ile ölçülmüştür.

PE Biosystems Voyager System 4124

Spec #1[BP = 24104.5, 3338]



Mode of operation: Linear
Extraction mode: Delayed
Polarity: Positive
Acquisition control: Manual

Accelerating voltage: 20000 V
Grid voltage: 94%
Guide wire 0: 0.05%
Extraction delay time: 100 nsec

Acquisition mass range: 10000 -- 40000 Da
Number of laser shots: 500/spectrum
Laser intensity: 2782
Calibration type: Default
Calibration matrix: Sinapinic acid
Low mass gate: 2000 Da

Digitizer start time: 99.6293
Bin size: 2 nsec
Number of data points: 50000
Vertical scale: 1000 mV
Vertical offset: 0%
Input bandwidth: 500 MHz

Sample well: 12
Plate ID: 100
Serial number: 4124
Instrument name: Voyager-DE STR
Plate type filename: C:\VOYAGER\100 well plate.p
Lab name: UCI

Absolute x-position: 6483.14
Absolute y-position: 42539.9
Relative x-position: -184.356
Relative y-position: 312.391
Shots in spectrum: 102
Source pressure: 5.393e-007
Mirror pressure: 2.923e-008
TC2 pressure: 0.001
TIS gate width: 10
TIS flight length: 1133.5

Acquired: 14:44, April 19, 2005

Printed: 14:45, April 19, 2005

D:\data\Cocco\Nogo\m0001.dat

Grafik 3.3. Rekombinant GRA1 protein MALDI-TOF kütle spektrometrisi sonucu örneği

3.1.4. Alkalen Fosfataz ile Defosforilasyon

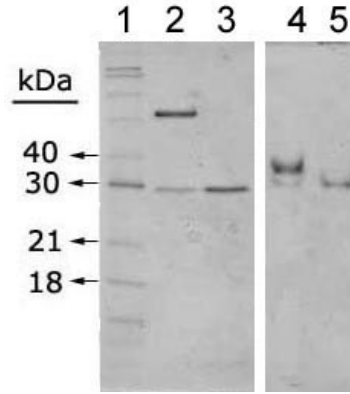
Rekombinant GRA1 proteininin Proscan ile yapılan analizinde 7 adet olası fosforilasyon bölgesi içerdiği saptanmıştır (Tablo 3.3). Karides alkalen fosfataz ile

30 dk 37°C'de inkübasyon sonrası, örnekler, % 12 SDS-PAGE ve doğal jel elektroforezinde ayrıştırılmış, defosforile edilen örnekler ile defosforile edilmeyen örnekler arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 3.2).

Tablo 3.3. Rekombinant GRA1 proteini olası fosforilasyon bölgeleri

```
MHHHHHHSSGLVPRGSGMKETAALKFERQHMDSPDPEGGDNQSSAVSDRASLFGLLSGGTGQGLGIGE  
SVDLEMMGNTRYRVERPTGNPDLLKIAIKASDGSYSEVGNVNVVEEVIDTMKSMQRDEDIFLRALNKGET  
VEEAIEDVAQAEGLNSEQTLQLEDAVSAVASVVQDEMKVIDDVQQLKDDIGFLTGEREGIN  
SSSVDKLAAALEHHHHHHH-
```

Proscan analizine göre kırmızı renkli bölgeler olası protein kinaz C fosforilasyon bölgeleri, yeşil renkli bölgeler olası kazein kinaz II fosforilasyon bölgeleri, altı çizili bölge olası tyrosine kinaz fosforilasyon bölgesi olarak kabul edilmiştir.



Şekil 3.2. Rekombinant GRA1 Protein defosforilasyon sonuçları. 1. örnek: Protein standart (QuantPro, Expression Technologies, San Diego, CA); 2. örnek: SDS-PAGE'de defosforilasyon uygulanan rGRA1 proteini; 3. örnek: SDS-PAGE'de defosforilasyon uygulanmayan rGRA1 proteini; 4. örnek: doğal jel elektroforezi'nde defosforilasyon uygulanan rGRA1 proteini; 5. örnek: doğal jel elektroforezi'nde defosforilasyon uygulanmayan rGRA1 proteini.

3.1.5. EGTA-GRA1 Proteini Etkileşimi

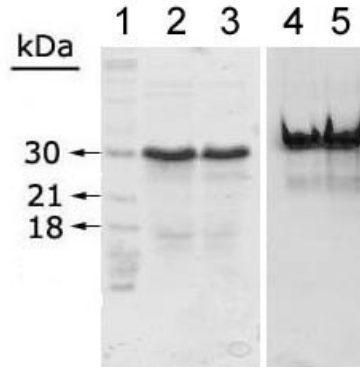
Rekombinant GRA1 proteininin Proscan ile yapılan analizinde 2 adet olası EF-eli kalsiyum bağlama bölgesi (% 67 ve 68 benzerliği olan) içerdiği saptanmıştır (Tablo 3.4). EGTA (ethylene glycol tetra asetik asit) ve CaCl₂ ile karıştırılan rekombinant GRA1 protein örnekleri, % 12 SDS-PAGE ve doğal jel elektroforezi ile

yürütülmüş, EGTA ve CaCl₂ içeren örnekler arasında belirgin bir fark saptanamamıştır (Şekil 3.3).

Tablo 3.4. Rekombinant GRA1 Proteini olası fosforilasyon bölgeleri

```
MHHHHHSSGLVPRGSGMKETAAAKFERQHMDSPDPEGDNQSSAVSDRASLFGLLSGGTGQGLGIGE  
SVDLEMMGNTYRVERPTGNPDLLKIAIKASDGSYSEVGNVNVVEEVIDTMKSMQRDEDIFLRALNKGET  
VEEAIEDVAQAEGLNSEQTLQLEDAVSAVASVVQDEMKVIDDVQQLKDDIGFLTGEREGIN  
SSSVDKLAAALEHHHHHHH-
```

Proscan analizine göre kırmızı renkli bölgeler, olası EF-eli kalsiyum bağlama bölgeleridir.



Şekil 3.3. Rekombinant GRA1 Protein EGTA etkileşimi. 1. örnek: Protein standart (QuantPro, Expression Technologies, San Diego, CA); 2. örnek: SDS-PAGE'de 5mM EGTA ile karıştırılan rGRA1 proteini; 3. örnek: SDS-PAGE'de 5mM CaCl₂ ile karıştırılan rGRA1 proteini; 4. örnek: 5mM EGTA ile karıştırılan rGRA1 proteini; 5. örnek: 5mM CaCl₂ ile karıştırılan rGRA1 proteini.

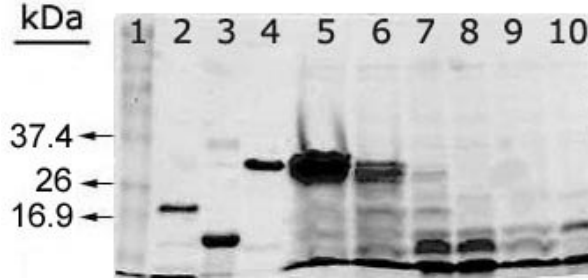
3.1.6. Protein Sindirme Testi

Rekombinant GRA1 proteini trypsin enzimi ile Lizin (K) ve Arginin (R) aminoasitlerinin bulunduğu yerlerden kesilmesi için aynı tüp içinde 37°C inkübe edilmiştir. Rekombinant GRA1 proteini 11 adet Lizin ve 6 adet Arginin aminoasidi içerdiği belirlenmiştir (Tablo 3.5). Oda sıcaklığında gerçekleştirilen sindirme sırasında rekombinant GRA1 proteininden 0., 1., 5., 10., 15. ve 20. dakikada alınan örneklerde elde edilen bantlar şekil 3.4'de gözlenmektedir. 30. dakikada alınan örnekte ise sadece trypsin ve trypsin inhibitörüne ait bantların kaldığı anlaşılmıştır (Şekil 3.4).

Tablo 3.5. Rekombinant GRA1 Proteininde trypsin enziminin kestiği aminoasitler

MHHHHHSSGLVPRGSGMKETAAAKFERQHMDSPDPEGGDNQSSAVSDRASLFGLLSGGTGQQLGIGE
SVDLEMMGNTYRVERPTGNPDLLKIAIKASDGSYSEVGNVNVVEEVIDTMKSMQRDEDIFLRALNKGET
VEEAIEDVAQAEGLNSEQTLQLEDAVSAVASVVQDEMKVIDDVQQLKDKQQLKDDIGFLTGEREGIN
SSSVDKLAAALEHHHHHHH-

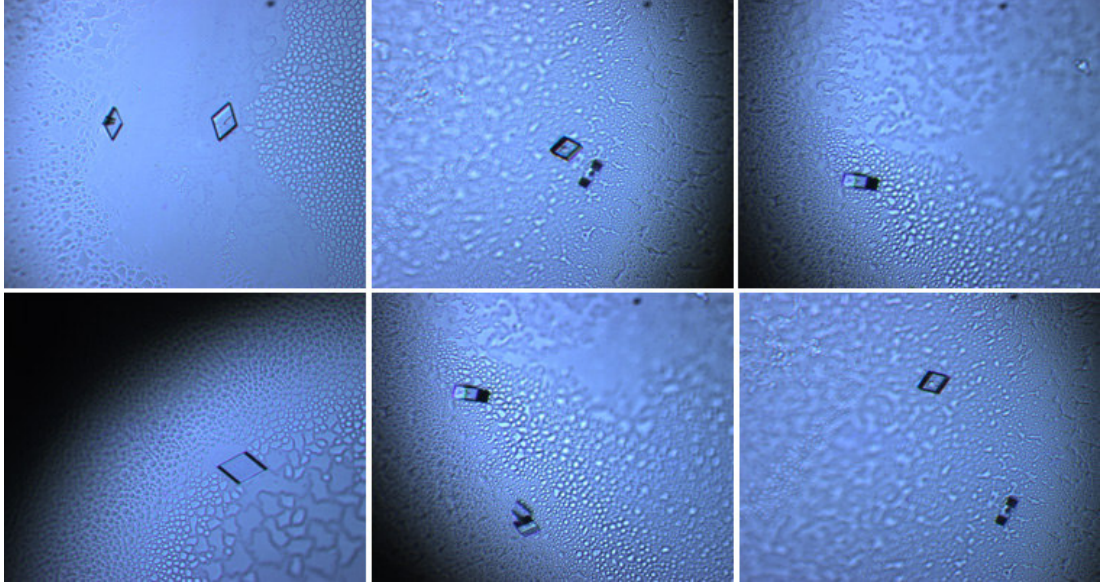
Kırmızı renkli aminoasitler Lizin, altı çizili aminoasitler Arginin'dir.



Şekil 3.4. Rekombinant GRA1 protein ile yapılan trypsin sindirim testi. 1. örnek: protein standart (Invitrogen, CA); 2. örnek: trypsin; 3. örnek: trypsin inhibitörü; 4. örnek: sindirimin 0. dakikası; 5. örnek: sindirimin 1. dakikası; 6. örnek: sindirimin 5. dakikası; 7. örnek: sindirimin 10. dakikası; 8. örnek: sindirimin 15. dakikası; 9. örnek: sindirimin 20. dakikası; 10. örnek: sindirimin 30. dakikası

3.1.7. Makromoleküler Kristalizasyon

Kristalizasyon aşamasında, çeşitli kristalizasyon solüsyonları, saflaştırılmış rekombinant GRA1 proteini ile farklı oranlarında karıştırılmış, plaklar oda sıcaklığında ve ışık görmeyen ortamda inkübe edilmiştir. Plaklar periyodik olarak inverted mikroskop altında kristal varlığı açısından 6 ay boyunca gözlenmiştir. Bu dönem içinde, 50mM Tris-Cl, pH: 8, 2-methyl-2,4-pentenediol (% 20 – 60 v/v) ve 5 mM CaCl₂ içeren kristalizasyon solüsyonları ile rekombinant GRA1 protein karışımı sonucunda plaklarda 10-15 gün içinde kristallerin oluştuğu saptanmıştır (Şekil 3.5). Inverted mikroskopta yapılan incelemede, kristallerin makromoleküler görüntüleri protein kristaline benzemesine rağmen, x-ışını difraksiyon analizi sonuçları, bu kristallerin tuz kristali olduğunu göstermiştir.



Şekil 3.5. Kristalizasyon deneme sonuçları. 50mM Tris-Cl, pH: 8, 2-methyl-2,4-pentenediol (% 20 – 60 v/v) ve 5 mM CaCl₂ içeren kristalizasyon solüsyonları ile rekombinant GRA1 protein karışımı sonucunda elde edilen tuz kristalleri.

3.2. GRA1 Aşı Denemeleri

Çalışmanın bu aşamasında, öncelikle memeli hücreye kodon-optimize GRA1 geninin elde edilmesine, daha sonra PZR ile izole edilen vt-GRA1 ve ko-GRA1 genlerinin DNA aşısı oluşturmak için CMV vektörüne *in vivo* rekombinasyon klonlamasının yapılmasına çalışılmıştır. Daha sonra geliştirilen üç tip aşı adayının [vahşi tip GRA1 DNA aşısı (CMV/vt-GRA1), kodon-optimize GRA1 DNA aşısı (CMV/ko-GRA1) ve Provac ile adjuvante edilmiş rekombinant GRA1 protein aşısı (rGRA1-Provac)] fare modelinde oluşturduğu immun yanıt ve sağladıkları korumadan bahsedilecektir.

3.2.1. Tam Uzunlukta Kodon Optimize GRA1 Geninin PZR ile Oluşturulması ve *in vivo* Rekombinasyon Klonlaması

Vahşi tip GRA1, sinyal peptidi olmadan, 498 bp uzunluğunda, % 52 G/C içermektedir. GRA1 geninin memeli hücreler için optimizasyonu sırasında, 19 kodon tamamen çıkarılmıştır, 6 kodonun sıklığı azaltılmıştır ve % 23.1 kodon değiştirilmiştir (Tablo 3.6). Optimizasyon sonunda elde edilen ko-GRA1 geninin G/C içeriği % 63'e çıkmıştır. *Homo sapiens* kodon kullanımı, vt-GRA1 ve ko-GRA1 kodonlarının, kodon adaptasyon indeksinin (CAI: codon adaptation index) hesaplanması için kullanılacaktır. Vt-GRA1'in CAI'i 0.697 iken ko-GRA1'in CAI'i 0.917'ye yükselmiştir.

Ko-GRA1 geninin birleştirilmesi 2 adet PZR ve TOPO klonlama reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.6). Üst üste geldiğinde kendi kendine birleşmeyi kolaylaştıran oligonükleotidlerin primer uzama ve PZR amplifikasyon ürünleri, 3 adet orta büyüklükte oligonükleotid parçasının (bir adet 237 bp uzunluğunda ve iki adet 196 bp uzunluğunda) oluşumunu sağlamıştır (Şekil 3.7, 3–5. örnekler arası). Tam uzunluktaki 531 bp'lik ko-GRA1 geni, bu üç adet orta büyüklükte oligonükleotid parçasının primer uzaması ve PZR amplifikasyonu ile oluşturulmuştur (Şekil 3.7, 2. örnek).

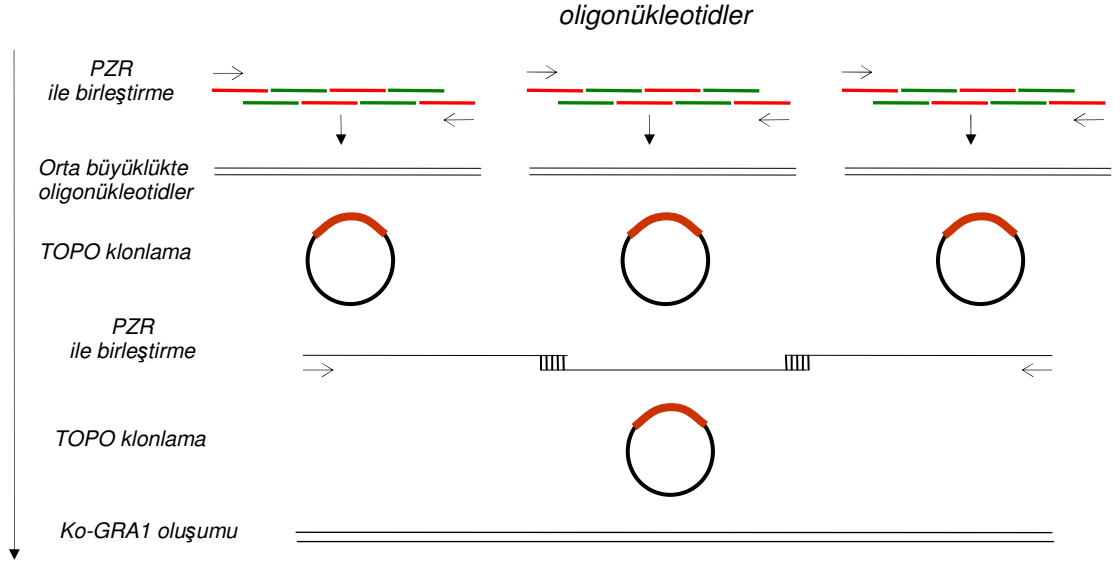
Daha sonra vt-GRA1 ve ko-GRA1 genleri sırasıyla pUETΔGRA1 ve pCR-Blunt II TOPO vektörlerinden, 33 nükleotid uzunluğundaki CMV vektöre uygun serbest kısım içeren, gene özgü primerler ile izole edilmiştir. Saflaştırma ve saptama amacı ile CMV vektörüne başlama kodonundan hemen sonra, ORF ile aynı çerçevede, polyhistidin etiketi (10 HIS) eklenmiştir. İçinde kimyasal kompetent *E. coli* hücreleri, doğrusal alıcı CMV vektörü ve PZR ürünleri olan karışım ile vt-GRA1

ve ko-GRAl hızla CMV vektöre yerleştirilmişlerdir (Şekil 3.8). Oluşan kanamisine dirençli *E. coli* hücre klonlarının, ya vt-GRAl geninin çerçevede bozukluk yaratmadan oluşturduğu CMV/vt-GRAl plasmidini, ya da ko-GRAl içeren CMV/ko-GRAl plasmidini içerdiği belirlenmiştir.

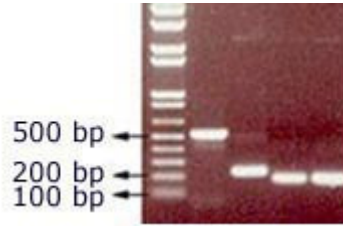
Tablo 3.6. Vt-GRAl ve ko-GRAl genlerinin karşılaştırılması

vt-GRAl*	GCC	GAA	GGC	GGC	GAC	AAC	CAG	TCG	AGC	GCC	GTC	TCA	GAT	CGG	GCG	TCT	CTC	TTT	GGT	TTG
ko-GRAl	GCT	GAG	GGA	GGA	GAC	AAC	CAG	AGC	TCT	GCT	GTG	TCC	GAT	CGC	GCC	TCT	CTG	TTC	GGC	CTG
Fark (19)	..T	..G	..A	..A	AGC	TCT	..T	..G	..CC	..CG	..C	..C	C..
	A	E	G	G	D	N	Q	S	S	A	V	S	D	R	A	S	L	F	G	L
vt-GRAl	CTG	AGT	GGA	GGG	ACA	GGG	CAG	GGA	TTA	GGA	ATC	GGA	GAA	TCT	GTA	GAT	TTG	GAG	ATG	ATG
ko-GRAl	CTG	TCT	GGC	GGC	ACC	GGC	CAA	GGC	CTC	GGA	ATC	GGC	GAG	TCT	GTG	GAC	CTG	GAG	ATG	ATG
Fark (15)	...	TC.	..C	..C	..C	..C	..A	..C	C.CC	..GG	..C	C..
	L	S	G	G	T	G	Q	G	L	G	I	G	E	S	V	D	L	E	M	M
vt-GRAl	GGG	AAC	ACG	TAT	CGT	GTG	GAG	AGA	CCC	ACA	GGC	AAC	CCG	GAC	TTG	CTC	AAG	ATC	GCC	ATT
ko-GRAl	GGC	AAC	ACC	TAT	CGC	GTC	GAA	CGC	CCC	ACT	GGC	AAC	CCC	GAC	CTG	CTG	AAG	ATC	GCC	ATC
Fark (13)	.G.C.G.	.T.	.AA	.G.C.C.	..CT.TC
	G	N	T	Y	R	V	E	R	P	T	G	N	P	D	L	L	K	I	A	I
vt-GRAl	AAA	GCT	TCA	GAT	GGA	TCG	TAC	AGC	GAA	GTC	GGC	AAT	GTT	AAC	GTG	GAG	GAG	GTG	ATT	GAT
ko-GRAl	AAG	GCC	AGC	GAC	GGC	AGC	TAC	AGC	GAG	GTG	GGC	AAC	GTG	AAC	GTC	GAG	GAG	GTG	ATC	GAC
Fark (17)	..G	..C	AGC	..C	..C	AGCG	..GC	..GCC	..C
	K	A	S	D	G	S	Y	S	E	V	G	N	V	N	V	E	E	V	I	D
vt-GRAl	ACT	ATG	AAA	AGC	ATG	CAG	AGG	GAC	GAG	GAC	ATT	TTC	CTT	CGT	GCG	TTG	AAC	AAA	GGC	GAA
ko-GRAl	ACC	ATG	AAG	AGC	ATG	CAG	CGC	GAC	GAG	GAC	ATC	TTT	CTG	CGG	GCT	CTG	AAC	AAG	GGC	GAG
Fark (12)	..CG	C.CC	..T	..G	..G	..T	C..GG
	T	M	K	S	M	Q	R	D	E	D	I	F	L	R	A	L	N	K	G	E
vt-GRAl	ACA	GTA	GAG	GAA	GCG	ATC	GAA	GAC	GTG	GCT	CAA	GCA	GAA	GGG	CTT	AAT	TCG	GAG	CAA	ACC
ko-GRAl	ACC	GTG	GAG	GAA	GCC	ATC	GAG	GAC	GTC	GCC	CAG	GCC	GAG	GGG	CTC	AAC	AGC	GAG	CAG	ACC
Fark (15)	..C	..GCGC	..C	..G	..C	..GC	..C	AGCG	...
	T	V	E	E	A	I	E	D	V	A	Q	A	E	G	L	N	S	E	Q	T
vt-GRAl	CTG	CAA	CTG	GAA	GAT	GCA	GTG	AGC	GCG	GTG	GCG	TCT	GTT	GTT	CAA	GAC	GAG	ATG	AAG	GTG
ko-GRAl	CTC	CAG	CTG	GAA	GAT	GCC	GTG	AGC	GCC	GTG	GCC	AGC	GTG	GTG	CAG	GAC	GAG	ATG	AAG	GTG
Fark (11)	..C	..GCCC	AGC	..G	..G	..G
	L	Q	L	E	D	A	V	S	A	V	A	S	V	V	Q	D	E	M	K	V
vt-GRAl	ATC	GAC	GAT	GTG	CAG	CAG	CTT	GAA	AAG	GAC	AAA	CAA	CAG	CTT	AAG	GAT	GAC	ATT	GGG	TTC
ko-GRAl	ATC	GAC	GAC	GTG	CAG	CAG	CTG	GAA	AAG	GAC	AAA	CAG	CAA	CTC	AAG	GAC	GAC	ATC	GGC	TTC
Fark (8)CGG	..A	..CCC	..C	...
	I	D	D	V	Q	Q	L	E	K	D	K	Q	Q	L	K	D	D	I	G	F
vt-GRAl	CTA	ACA	GGA	GAG	AGA	GAG														
ko-GRAl	CTG	ACC	GGC	GAG	CGC	GAG														
Fark (5)	..G	..C	..C	...	C.C	...														
	L	T	G	E	R	E														

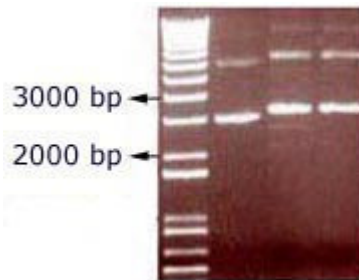
* İlk sıra vt-GRAl geni sekansı; ikinci sıra ko-GRAl geni sekansı; üçüncü sıra her kodonda modifiye olan bazlar. Kodonların değişmesine rağmen, her iki geninde kodladığı GRAl protein sekansının aynı kaldığı dördüncü sırada gösterilmiştir.



Şekil 3.6. Ko-GRA1 geni birleştirilmesi sırasında uygulanan PZR ve TOPO klonlama reaksiyonları



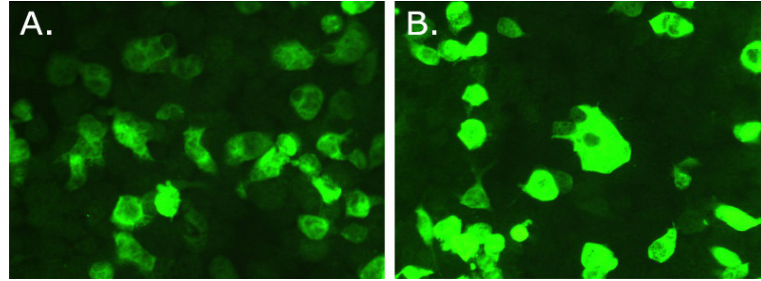
Şekil 3.7. Kodon optimize GRA1 geninin PZR reaksiyonu ile birleştirilmesi. 1. örnek: DNA merdiveni (Invitrogen); 2. örnek: tam uzunluktaki 531 bp'lik ko-GRA1 geni; 3. örnek: 237 bp'lik orta büyüklükte oligonükleotid parçası; 4-5 örnekler: 196 bp'lik orta büyüklükte oligonükleotid parçaları.



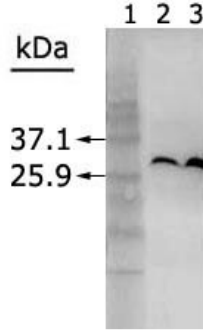
Şekil 3.8. Vt-GRA1 ve ko-GRA1'in CMV vektöre *in vivo* rekombinasyon klonlaması. 1. örnek: DNA merdiveni (Invitrogen); 2. örnek: boş CMV vektörü; 3. örnek: CMV/vt-GRA1 plasmidi; 4. örnek: CMV/ko-GRA1 plasmidi.

3.2.2. *In vitro* Transfeksiyon

Ko-GRA1 ve vt-GRA1'in *in vitro* protein ekspresyonlarını karşılaştırmak için HEK 293 memeli hücreleri, CMV/vt-GRA1 ve CMV/ko-GRA1 plasmidleri ile transfekte edilmiştir. Yeşil floresan protein içeren CMV vektörü (CMV/GFP) pozitif kontrol, boş CMV vektörü ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır (veriler gösterilmedi). Protein ekspresyon seviyeleri anti-polyhistidin antikor kullanılarak immunfloresan mikroskopi yöntemi ve western blotting ile belirlenmiştir. Şekil 3.9 ve 3.10'da gözlenen sonuçlara göre, CMV/ko-GRA1 plasmidleri ile transfekte edilen HEK 293 hücrelerde oluşan rekombinant GRA1 proteininin ekspresyon seviyesinin, CMV/vt-GRA1 plasmidleri ile transfekte edilen HEK 293 hücrelere oranla belirgin şekilde yüksek olduğu saptanmıştır.



Şekil 3.9. İmmunfloresan mikroskopi yöntemi. A.CMV/vt-GRA1 ile transfekte edilen HEK 293 hücrelerde oluşan rekombinant GRA1 protein ekspresyonu; B. CMV/vt-GRA1 ile transfekte edilen HEK 293 hücrelerde oluşan rekombinant GRA1 protein ekspresyonu.

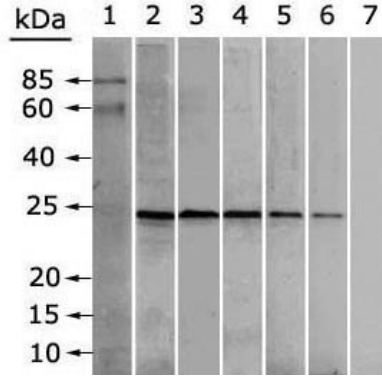


Şekil 3.10. Vt-GRA1 ve ko-GRA1 protein ekspresyon seviyelerinin western blot ile karşılaştırılması. CMV/vt-GRA1 ve CMV/ko-GRA1 plasmidleri ile transfekte edilen HEK 293 hücrelerin ürettiği rekombinant GRA1 seviyesi, hücreler eritildikten sonra western blotting analizi ile karşılaştırılmıştır. 1. örnek: Protein standart (Invitrogen); 2. örnek: CMV/vt-GRA1 plasmid ile transfekte edilmiş HEK 293 hücre eriyiği; 3. örnek: CMV/ko-GRA1 plasmid ile transfekte edilmiş HEK 293 hücre eriyiği

3.2.3. GRA1 Aşılarına Karşı Gelişen Humoral İmmun Yanıt

Çalışmamızda kullanılan rekombinant GRA1 proteininin insanlarda *T. gondii*'ye özgü antikorlara bağladığı daha önceden yapılan çalışmalarda saptanmıştır (138). Bu çalışmada BALB/c farelere üç tip aşı adayı uygulanmıştır; vt-GRA1 DNA aşısı (CMV/vt-GRA1), ko-GRA1 DNA aşısı (CMV/ko-GRA1), saflaştırılmış rekombinant GRA1 protein ile adjuvante edilen Provac aşısı (rGRA1-Provac). Ayrıca rGRA1-Provac aşının immunojenliğini değerlendirmek amacı ile üç fare içeren iki grubunun ilkinde sadece rekombinant GRA1 proteini, ikinci gruba ise Freund'un tam ve yarım adjuvanı ile birleştirilmiş rekombinant GRA1 proteini (rGRA1-Freund) içeren aşılar uygulanmıştır. Her bir aşı adayına karşı oluşan humoral immun yanıtı değerlendirmek için seri deneyler yapılmış, ilk deneyde *T. gondii* eriyik antijenleri, aşılanmış hayvanlardan alınan serum havuz örnekleri ile karşılaştırılmış ve TAg içinde bulunan 24kD'luk bir proteine, fare serumunda bulunan antikorların kuvvetle bağlandığı izlenmiştir (Şekil 3.11). Boş vektörle

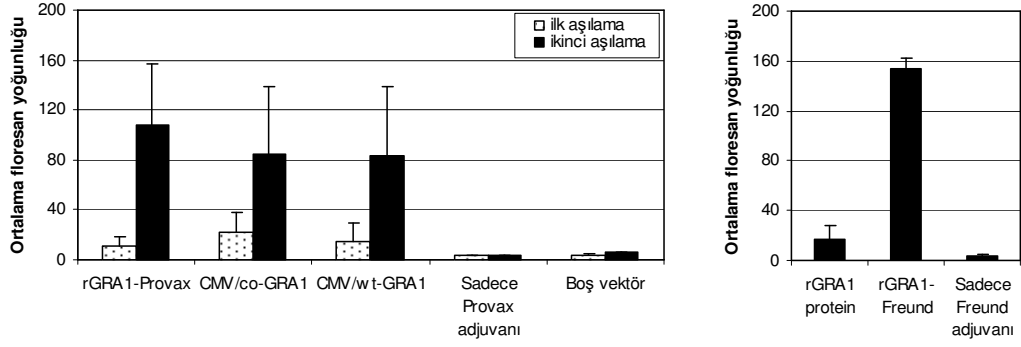
aşılana ve sadece adjuvan verilen kontrol gruplarından alınan serum örnekleri, TAG'de herhangi bir bağlanma göstermemişlerdir.



Şekil 3.11. *T. gondii* eriyik antijenin aşılanmış farelere ait serum havuzları ile karşılaştırılması. 1. örnek: Protein standart (Invitrogen); 2. örnek: rGRA1-Provax serum havuzu; 3. örnek: rGRA1-Freund serum havuzu; 4. örnek: CMV/ko-GRA1 serum havuzu; 5. örnek: CMV/vt-GRA1 serum havuzu; 6. örnek: sadece rGRA1 serum havuzu; 7. örnek: Provax, Freund adjuvanları ve boş vektör ile aşılanmış negatif kontrol gruplarına ait serum havuzu.

İkinci deneyde; bütün aşılanmış fare gruplarından alınan serum örnekleri anti-GRA1 IgG antikorlarının varlığı açısından, protein mikroarray yöntemi ile incelenmiştir. Rekombinant GRA1 protein içeren mikroarray lamalar her bir farenin ilk ve ikinci aşılamasından sonra alınan serumlarla karşılaştırılmıştır. Sonrasında kompleks oluşturan antikorlar, Cy3 ile konjuge edilmiş IgG antikorları ile görüntülenerek floresan yoğunlukları belirlenmiştir. Bütün gruplarda IgG antikorları negatif kontrol gruplarına göre belirgin olarak yüksek bulunmuştur ($P < 0.01$). Her bir aşılama grubundan toplanan ortalama floresan yoğunluğu verileri grafik 3.4'te özetlenmiştir. Sonuçta en yoğun immun yanıtın rGRA1-Provax aşısından elde edildiği görülmüştür. CMV/ko-GRA1 aşısının, CMV/vt-GRA1 aşısına göre daha çok, ama rGRA1-Provax'e göre daha az antikor yanıtı oluşturduğu izlenmiştir. rGRA1-Provax aşısı ile rGRA1-Freund aşısı karşılaştırıldığında rGRA1-Provax

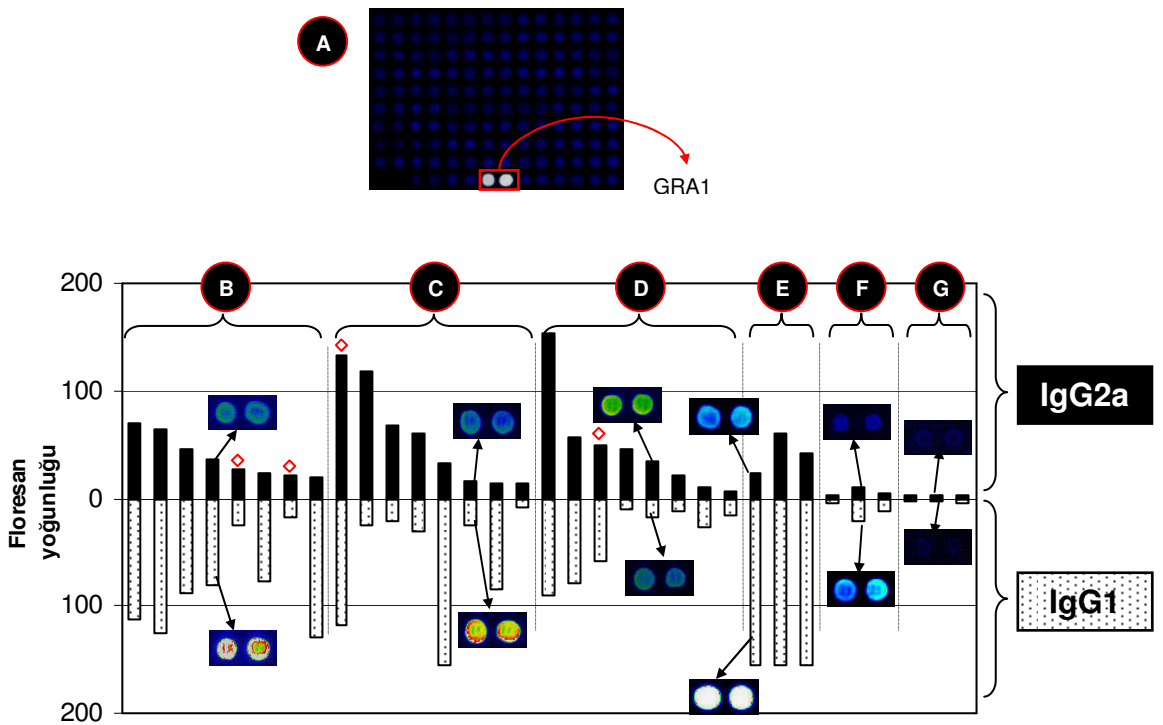
aşısının da anti-*GRA1* IgG antikor yanıtı uyarmakta en az *rGRA1*-Freund aşısı kadar kuvvetli olduğu saptanmıştır.



Grafik 3.4. *GRA1* aşılara karşı oluşan IgG antikor yanıtı. (A) CMV/vt-*GRA1*, CMV/ko-*GRA1*, *rGRA1*-Provax ile aşılanmış farelerden ve kontrol gruplarından alınan serum örneklerinde bulunan anti-*GRA1* IgG antikor miktarının protein mikroarray ile ölçülmesi sonucu elde edilen ortalama FY. (B) Sadece *GRA1* proteini ve *rGRA1*-Freund aşısı ve kontrol grubu olarak da sadece Freund adjuvanı uygulanan farelerden alınan serum örneklerinde bulunan anti-*GRA1* IgG antikor miktarının protein mikroarray ile ölçülmesi sonucu elde edilen ortalama FY. Bu grupta ilk aşılamadan sonra serum örneği toplanmamıştır.

En son olarak, aşılamaların sonucunda farelerde Th1 veya Th2 yanıtının oluştuğunun işareti olan IgG1 ve IgG2a polarizasyonunun frekansı saptanmıştır. IgG antikorlarının saptanmasına benzer olarak IgG alt grup antikor tayininde protein mikroarray analizi kullanılmıştır. Sonuçlar grafik 5'te özetlenmiştir. *rGRA1*-Provax ile aşılanan 8 farenin altısı kuvvetli IgG1 yanıtı yanında, daha zayıf IgG2a yanıtı da oluşturmuş; iki farenin de zayıf fakat birbirine yakın IgG1 ve IgG2a yanıtı oluşturduğu saptanmıştır (Grafik 3.5B). DNA aşılama gruplarının her ikisinde de benzer polarizasyon saptanmıştır. Dört farede kuvvetli IgG2a yanıtı; üç farede kuvvetli IgG1 yanıtı ve bir tane farede de benzer paternde IgG1 ve IgG2a yanıtı oluşmuştur (Grafik 3.5C ve 3.5D). Sonuçta *GRA1* DNA aşılarının bir miktar Th1 cevabına doğru polarize olmalarına rağmen benzer Th1 ve Th2 paternini uyardıkları saptanmıştır. Provax adjuvanının immun sistemi ne kadar uyardığını değerlendirmek için üç fareden oluşan üç gruba, sadece rekombinant *GRA1* proteini, *rGRA1*-Freund aşısı ve kontrol grubu olarak da sadece Freund adjuvanı uygulanmıştır. *rGRA1*-

Freund aşısı kuvvetli IgG1 yanıtı yanında zayıf IgG2a yanıtı uyarırken (Grafik 3.5E), sadece rGRA1 verilen farelerde ise IgG1'e zayıf bir şekilde polarize olmuş immun cevap oluşmuştur (Grafik 3.5F). Bütün kontrollerin (boş vektör, sadece Provac veya sadece Freund adjuvanı) ölçülebilir immun yanıtları, IgG1 veya IgG2a'ya polarize olmayıp, eşik değerlerin altında kalmıştır (Grafik 3.5G). Sonuçta tüm aşı grupları IgG1 yanıtı yönünde polarize olmakla birlikte, IgG2a yanıtını da uyarılmaktadır.



Grafik 3.5. IgG1 ve IgG2a alt grup antikorlarının protein mikroarray analizi ile saptanması. (A) Protein mikroarray lamı örneğinde rekombinant GRA1 proteini ile kompleks yapmış antikorlar parlak görülmektedir. Her lamda rekombinant GRA1 proteini yanında, boş vektör içeren kontroller, HPV (İnsan papilloma virüs) ve çiçek virüsüne ait 68 değişik protein çift nokta olarak yazdırılmıştır. (B)-(G) arasında ise sırasıyla rGRA1-Provac, CMV/ko-GRA1, CMV/vt-GRA1, rGRA1-Freund, sadece rekombinant GRA1 proteini ile aşılananlar ve kontrol gruplarına ait (boş vektör, Provac ve Freund adjuvanları) sonuçlar yer almaktadır. Her kolon bir farede saptanan immun cevabı temsil etmektedir. Siyah kolonlar immun yanıtın IgG2a yönünde olduğunu, noktalı kolonlar ise immun yanıtın IgG1 yönünde olduğunu göstermektedir. (◊) sembolü birbirine benzer IgG1 ve IgG2a yanıtı veren serum örneklerini temsil etmektedir.

3.2.4. GRA1 Aşıları ile Oluşan Hücresel İmmun Yanıt

Aşılanmış farelerden elde edilen dalak hücreleri *in vitro* şartlarda saflaştırılmış rekombinant GRA1 proteini, mitojen Con A ve kontrol proteini olarak *T. gondii* ile ilişkisi olmayan rekombinant H3L proteini ile uyarılmıştır. Hücreler radyoaktif ³[H]-thymidine ile birleştirilerek lenfosit proliferasyonu ölçülmüştür. Ayrıca IFN- γ ve IL-4 ELISA oluşan sitokin yanıtının ölçülmesi için kullanılmıştır. BALB/c farelerde aşılamalara karşı oluşan hücresel immün yanıt tablo 3.7’de özetlenmiştir. Kontrol grupları, boş vektör, Provax ve Freund adjuvanı uygulanmış fareler ile aşılanmamış farelerden oluşmaktadır.

Lenfosit proliferasyonu sonuçlarına göre, stimülasyon indeksi (SI) rGRA1- Provax ve rGRA1-Freund ile aşılanan farelerde, ko-GRA1 DNA veya vt-GRA1 DNA aşısı yapılan hayvanlara göre belirgin şekilde yüksek bulunmuştur ($P<0.001$). Bunun yanında CMV/ko-GRA1 ve CMV/vt-GRA1 aşılarının oluşturduğu immün cevaplar arasında istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır. Con A ile uyarılan hücrelerde lenfosit proliferasyonunda belirgin artış saptanırken, çiçek virüsüne ait rekombinant H3L ile uyarılan hücrelerde lenfosit proliferasyonunda artış saptanmamıştır.

Th1 ve Th2 immün yanıtını değerlendirmek için, aşılanmış farelerde IFN- γ ve IL-4 miktarı ölçülmüştür. Dalak hücrelerinin rekombinant GRA1 ile uyarılmasından 72 saat sonra, IFN- γ seviyesinin, rGRA1-Provax ve rGRA1-Freund ile aşılanan farelerde, her iki DNA aşısı ile aşılanan farelere göre anlamlı şekilde daha yüksek olduğu saptanmıştır ($P<0.01$). IFN- γ seviyesi CMV/ko-GRA1 ile aşılanan farelerde, CMV/vt-GRA1 ile aşılananlara göre daha az miktarda arttığı, IL-4 seviyesinde 24 saatte belirgin bir artış saptanmadığı belirlenmiştir (veri gösterilmemiştir). 72 saat

sonra rGRA1-Provax ve rGRA1-Freund ile aşılanan farelerde, aşılanmamış, sadece Provax veya Freund adjuvanı uygulanan farelerin oluşturduğu kontrol gruplarına göre IL-4 seviyesinde belirgin artış olduğu izlenmiştir ($P<0.0001$). IL-4 seviyesi, her iki DNA aşısı ile aşılanan farelerde, boş vektör uygulanan farelerin oluşturduğu kontrol grubuna göre daha az artış göstermiştir. Sonuçta tüm aşılardan IFN- γ yapımını, IL-4'e göre çok daha fazla uyardığı, en fazla artışında rekombinant GRA1 proteini içeren aşılardan elde edildiği gözlemlenmiştir.

Tablo 3.7. GRA1 aşılamalarına karşı oluşan hücresel immün yanıt

Aşı tipi	Stimulasyon indeksi*	konsantrasyon (üst sıvıda pg/ml)**	
		IFN- γ	IL-4
rGRA1-Provax	4.7 \pm 0.2	1502 \pm 301	28 \pm 0
rGRA1-Freund	4.8 \pm 0.8	1558 \pm 112	30 \pm 1
CMV/ko-GRA1	3.4 \pm 0.6	565 \pm 22	16 \pm 4
CMV/vt-GRA1	2.8 \pm 0.4	481 \pm 25	15 \pm 2

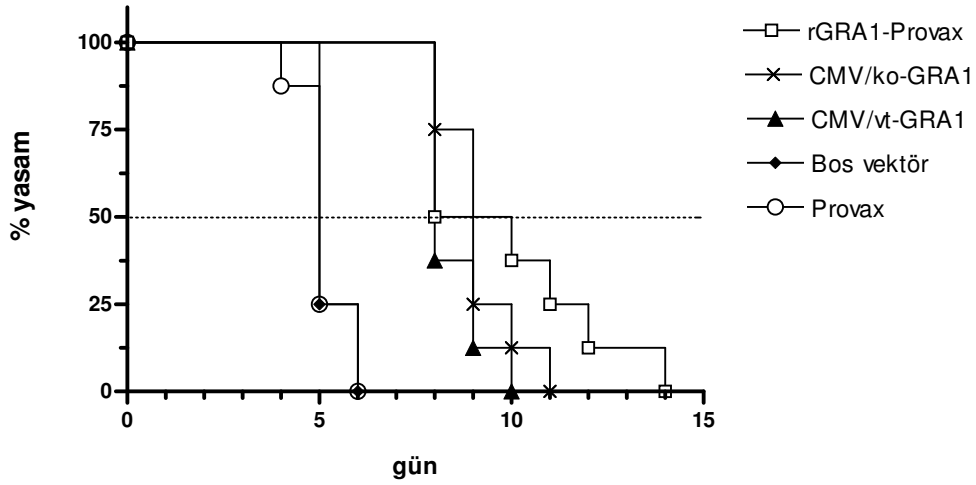
* GRA1 aşılamaının uygulandığı farelere ait uyarılmayan hücrelerde oluşan ortalama cpm 2607 \pm 349 olup, aşılanmamış farelerin ortalama cpm 2586 \pm 406 değerine ve aşılanmış farelere ait dalak hücrelerinin rekombinant H3L proteini ile uyarılması ortalama 2866 \pm 403 cpm değerlerine yol açmıştır. Sadece rekombinant GRA1 proteini ile aşılanan farelerin ortalama cpm değerinde kontrollere göre az miktarda artış saptanmıştır (veri gösterilmemiştir). Her grupta Con A cpm değeri 50.000'in üzerinde saptanmıştır.

** Boş vektör ile aşılanan fareler 243 \pm 48 pg/ml seviyesinde nonspesifik IFN- γ üretimi saptanmıştır. Provax ve Freund adjuvanı uygulanan farelerde IFN- γ seviyesi, aşılanmamış farelerden elde edilen eşik değeri (100 pg/ml) altında kalmış olup, sırasıyla 89 \pm 12 ve 78 \pm 4 pg/ml olarak hesaplanmıştır. Aşılanmamış farelerden elde edilen IL-4 eşik değeri 10 pg/ml saptanmış olup, boş vektör, Provax veya Freund adjuvanı uygulanan farelerde IL-4 seviyesi sırasıyla 12 \pm 2 pg/ml, 13 \pm 2 ve 15 \pm 1 pg/ml olarak hesaplanmıştır. Sadece rekombinant GRA1 proteini ile aşılanmış farelerde sitokin seviyeleri eşik değerin üstüne az miktarda çıkmıştır (veri gösterilmemiştir). Aşılanmış farelere ait dalak hücrelerinin rekombinant H3L proteini ile uyarılması sonucu oluşan sitokin seviyeleri eşik değerin altında saptanmıştır.

3.2.5. Letal Toxoplasmosise Karşı Korunma

BALB/c fareler, ikinci aşılamaadan 6 hafta sonra, 1×10^5 *T. gondii* RH suşu takizoitleri ile enfekte edilmiştir. Kontrol gruplarını boş vektör ve sadece Provax uygulanan fareler oluşturmaktadır. Ortalama yaşam süresi boş vektör ve sadece Provax uygulanan gruplarda sırasıyla 5.3 ± 0.5 ve 5.1 ± 0.6 gün olarak saptanmıştır.

Her hangi bir GRA1 aşısı uygulanan farelerde kontrollere göre, yaşam sürelerinde belirgin şekilde artış olduğu görülmüştür. Çalışmamızda incelenen aşı çeşitlerinde en iyi korumayı ortalama 9.8 ± 2.3 gün ile rGRA1-Provax aşısının sağladığı anlaşılmıştır ($P < 0.0001$). CMV/ko-GRA1 ve CMV/vt-GRA1 ile aşılanma sonrası farelerde ortalama yaşam süresi sırasıyla 9.1 ± 1 ve 8.5 ± 0.8 gün olarak saptanmıştır. Sonuçlar DNA aşıları ile sağlanan yaşam süresinin, rGRA1-Provax aşısı ile sağlanan yaşam süresine göre daha az olduğunu göstermektedir (Grafik 3.6).



Grafik 3.6. BALB/c farelerin ikinci aşılanmadan 6 hafta sonra *T. gondii* RH suşu ile enfekte edilmeleri sonrası gözlenen yaşam süreleri

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

TARTIŞMA

Araştırmanın konusunu oluşturan yoğun granül 1 (GRA1) geninin kodladığı protein, *T. gondii*'nin patogeneğinde ve immunogeneğinde önemli bir yer tutar. Yoğun granüllerin içeriğinde bulunan GRA1 proteinini konak hücre işgali sırasında parazitofor vakuole (PV) salgılandığı saptanmıştır. PV'un *T. gondii*'yi konak hücre lizozomal yıkımından koruduğu bilinmektedir. GRA1 proteini PV lümeninde çözülmüş bir şekilde bulunabileceği gibi PV ağı içinde de yer alabildiği belirtilmiştir (29). GRA1 protein sekansının sekonder yapısal analizi sonucunda heliks-loop-heliks yapıda EF-eli denilen iki adet kalsiyum bağlayıcı bölgenin varlığı saptanmıştır. Cesbron-Delauw ve ark. hem rekombinant hem de doğal GRA1 proteininin Ca^{+2} bağlama özelliği olduğunu belirtmişlerdir (29, 30). Bu sebepten dolayı GRA1 proteini PV membran ağının stabilizasyonu sağlayan, bir başka deyişle Ca^{+2} ihtiyacını ayarlayan bir nevi “ Ca^{+2} tamponu” olarak görev yaptığı ileri sürülmüştür (29). Araştırmanın ilk bölümünde pUETΔGRA1 vektörü ile *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) pLysS hücrelerde üretilen GRA1 proteininin tanımlanmasına hedeflenmiştir. Bu amaçla ilk önce proteinin sekonder yapısı biyoinformatik yöntemlerle değerlendirilmiştir. Bunun sonucunda proteinin yapısında saptanan % 100 benzerlik gösteren 7 adet fosforilasyon bölgesi ve N-myristoylasyon bölgesi dikkati çekmiştir. Aynı zamanda GRA1 protein yapısında var olan iki adet Ca^{+2} bağlama bölgesinin, EF-eli'ne % 67–68 benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Bu veriler sonrasında ilk olarak rekombinant GRA1 proteinini saflaştırdık ve SDS-PAGE üzerinde ayrıştırılmıştır. Rekombinant GRA1 proteinin hesaplanmış moleküler ağırlığı 24kD civarında beklenmesine rağmen SDS-PAGE'lerinde

ortalama 26kD olarak saptanmıştır. Bunun üzerine yapılan MALDI-TOF kütle spektrometrisi ile rekombinant GRA1 proteinin moleküler ağırlığının 24kD civarında olduğu görülmüştür. Proteinin SDS-PAGE’de beklenenden yüksek molekül ağırlığı olması, içerdiği EF-eli Ca^{+2} bağlama bölgelerindeki Ca^{+2} miktarının proteinin jelde yürümesine etkilediği kanaatine varılmıştır. Buna benzer bir uyumsuzluk *T. gondii*’ye ait Ca^{+2} bağlayıcı protein olan rekombinant calmodulin proteinin SDS-PAGE’de ayrıştırmasında da gözlenmiştir (156). Bu aşamada kuvvetli Ca^{+2} şelasyonu yapan EGTA ile rekombinant GRA1 protein örneği karıştırılmış, sonrasında SDS-PAGE ve doğal jel elektroforezinde yürütülmüştür. Beklenenin aksine ne SDS-PAGE’de ne de doğal jel elektroforezinde calmodulin proteinindeki gibi bantlar arasında ayrışma farkı oluşmamıştır. Burada calmodulin proteinin sekonder yapısında 4 adet % 100 benzerlik gösteren EF-eli olmasının etkisinin olduğu düşünülmektedir. Her bir EF-eli’nin o anda bağlandığı proteine göre sıfır, iki veya dört adet Ca^{+2} bağladığı saptanmıştır (16, 115, 154, 178). Buna göre GRA1 proteininin içerdiği % 67–68 benzerlikte olan iki adet EF-elinin bağladığı Ca^{+2} miktarının, proteinin SDS-PAGE’de moleküler ağırlığına ve doğal jel elektroforezinde ise elektrik yüküne etkilediği düşünülmüştür.

Kristal oluşumu sağlamak için kalsiyum bağlayıcı proteinlerden fosfat (PO_4^{-3}) arındırılmalıdır, çünkü Ca^{+2} ile PO_4^{-3} ’ün birleşip $Ca_3(PO_4)_2$ tuzu oluşturma olasılığı vardır. Bunun sonucunda proteininin kristalizasyonu etkilenebilir. Bu sebeple kalsiyum bağlayıcı proteinlerin kristal oluşturmak üzere saflaştırılma aşamasında PO_4^{-3} içermeyen tamponlar kullanılmasına dikkat edilmiştir (16, 115, 154, 178). Rekombinant GRA1 proteinin kristalizasyon amaçlı saflaştırılma aşamasında da bu sebeple Tris tamponu kullanılmıştır. Ayrıca kristal oluşumunu desteklemek amacı ile proteindeki fosforilasyon bölgelerinde bulunan fosfatları uzaklaştırmak için karides

alkalen fosfataz ile defosforilasyon yapılmaya çalışılmıştır. Defosforilasyon sonucunda elde edilen örnekler SDS-PAGE ve doğal jel elektroforezi ile incelenmiş ve defosforile edilen örnekler ile defosforile edilmeyen örnekler arasında belirgin bir fark saptanmamıştır. Bu şartlar altında rekombinant GRA1 proteinin kristalizasyona etkiyecek kadar fosfat içermediği düşünülmüş ve saflaştırılmış protein örneklerine defosforilasyon uygulanmamasına karar verilmiştir. Rekombinant GRA1 protein yapısında bulunan 7 adet N-myristoylasyon bölgesi ile proteinin N-terminalinde bulunan glisin aminoasidine, myristic asitin $[CH_3(CH_2)_{12}COOH]$ kovalent bağlanması sağlanmaktadır. Myristic asit doymuş bir yağ asidi olup sistematik adı tetradekanoik asit'tir. Myristic asit ile kalsiyum arasındaki ilişki Jeromin ve ark. tarafından nöronal kalsiyum sensör 1 adlı Ca^{+2} bağlayan proteinde incelenmiştir. Yapılan araştırmada proteinde myristoylasyon arttıkça daha kuvvetli Ca^{+2} bağladığı saptanmıştır (86). Bu sonuçlar ışığında rekombinant GRA1 yapısında bulunan 7 adet N-myristoylasyon bölgesi, proteinin daha kuvvetli kalsiyum bağlamasını sağlar, düşüncesini doğurmaktadır.

Saflaştırılmış protein örneklerinde endotoksin veya LPS (lipopolisakkarid) seviyesinin yüksek olması proteinin kristalleşmesini zorlaştırdığı bilindiğinden, rekombinant GRA1 proteininde bulunan endotoksin seviyesi öncelikle jel filtrasyon kullanılarak düşürülmüştür. Bir sonraki basamak olan aşılama çalışmaları sırasında protein içindeki endotoksin seviyesi Polymyxin B kolonları ile aşılama izin verilebilir seviyelere çekilmiştir (52).

Makromoleküler kristalizasyon, proteinler, nükleik asitler ve daha büyük makromoleküler yapıları, örneğin virüs ve ribozomları kapsar ve bazı önemli değişkenlerin aynı anda oluşması kristal oluşumuna sebep olmaktadır (9). Kristal oluşturmayı tarif eden bir yol, yöntem veya teori halen ortaya konulmamıştır. Bunun

sonucu olarak makromoleküler kristal büyütme yöntemleri genelde ampiriktir ve dünyaca tanınan bir kristalografın dediği gibi “kristal büyütme sabır, direnme ve sezgilerin kuvvetli olmasını gerektirir” (116). Rekombinant GRA1 proteini ile yapılan kristalizasyon denemelerinde kristalizasyonu sağlamak için aşağıdaki önlemler alınmıştır; 1) Araştırma sırasında üretilen rekombinant GRA1 proteininin Ca^{+2} bağlayan bir protein olduğu bilindiğinden, katlanması için kristalizasyon ortamında Ca^{+2} olması gerektiği ön görülmüştür. Bu sebeple Ca^{+2} bağlayan proteinlerin saflaştırılması sırasında kullanılan tamponların genelde $CaCl_2$ içermesi ve kalsiyum bağlayan fosfat yerine de Tris içermesi uygun bulunmuştur (16, 115, 154, 178). Bizde saflaştırma sırasında 50mM Tris-Cl, pH 7.5, 0.3 M NaCl, ve 0.5 mM $CaCl_2$ içeren tampon kullanılması uygun bulunmuştur. 2) Rekombinant GRA1 proteinin saflaştırılmasının tam olarak sağlanması gerekmektedir. Yabancı proteinlerin veya rekombinant GRA1 proteinin dimer, tetramer ve vb formları kristal oluşturabilecek bir çekirdeğin etrafını sarıp yüzeyi zehirlediği ve çekirdeğin daha büyümesini engellediği için, rekombinant GRA1 protein örneğindeki yabancı proteinler iki basamaklı saflaştırma ve uzun yıkamalarla uzaklaştırılmıştır. (şekil 3.1). 3) Rekombinant GRA1 proteininin katlanması, kristal oluşumunun ön koşullarından birisidir. GRA1 proteininin FoldIndex programı ile yapılan biyoinformatik değerlendirmesinde proteinin bir kısmının katlanırken, bir kısmının katlanmadığı ön görülmüştür. GRA1 proteininin katlanması laboratuvar ortamında trypsin ile yapılan protein sindirme testi ile araştırılmıştır. Proteinin oda sıcaklığında trypsin ile 20 dk muamele edilmesine rağmen, hala proteine ait bantlar içermesi, proteinin katlandığını kanıtı olarak kabul edilmiştir. Gerekli çalışmalardan sonra rekombinant GRA1 proteini, kristalizasyon solüsyonları ile karıştırılmıştır. Hangi proteinin, hangi solüsyon varlığında kristal büyümesine yol açacağı bilinmediğinden

kristalizasyon solüsyonları tamamıyla ampirik olarak seçilmiştir. Kristal solüsyonundaki değişkenler 1) Proteinin konsantrasyonu 2) Ortam ısısı 3) Tampon çeşidi, konsantrasyonu ve pH'sı, 4) Seçilen tuzun çeşidi, konsantrasyonu ve iyonik kuvveti [Tuzlar etkilerini, protein yapısında bulunan su molekülleri için yarışarak, dehidratasyon yolu ile göstermekte, oluşan etkinin derecesi iyonik kuvvet olarak tarif edilmektedir. İyonik kuvvet solüsyonda bulunan her bir iyonun molaritesinin kendi değerliklerinin karesi ile çarpılması sonucu hesaplanmaktadır (116). Sonuçta bütün multivalan iyonlar, özellikle anyonlar en iyi çökticiler arasında kabul edilirler. Sülfatlar, fosfatlar ve sitratlar bu nedenle kristalizasyon için ideal kimyasallardır]. 5) 2-methyl-2,4-pentanediol gibi organik çözücülerin konsantrasyonu 6) Polyethylene glycol gibi çöktici polimerlerin konsantrasyonu olarak özetlenir. Bunlar dışında yer çekimi, ortamın basıncı, kristal oluşumu için beklenen zaman ve örneğin dondurma ve çözme miktarı gibi birçok değişken daha göz önünde bulundurulmaktadır (116). Saflaştırılmış rekombinant GRA1 proteininden kristal geliştirme aşamasında tamamen ampirik olarak yukarıda anlatılan değişkenleri en geniş kapsamı ile içine almaya çalışan 2000'e yakın kombinasyon denenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda bu güne kadar ekim yapılan plaklarda tezimin basım aşamasına kadar sadece tuz kristalleri saptanmıştır. Ekim yapılan plaklarda kristal oluşumu halen takip edilmektedir. Kristal oluşumunda önemli bir değişkenin zaman olduğunu düşünecek olursak, aksi kanıtlanmadığı takdirde rezervuarında bulunan kristalizasyon solüsyonu bitene kadar ekim yapılan plakların gözlenmesine karar verilmiştir.

Toxoplasmosise karşı aşı çalışmaları ümit vaat etmekle birlikte, etkili, güvenilir ve uzun süreli koruyuculuk sağlayan bir aşı geliştirmesi için daha çok çalışılması gerekmektedir. *T. gondii* S48 mutant suşunu içeren ve sadece koyunlarda oluşan toxoplasmosise karşı koruyucu olan aşı dışında ticari kullanıma uygun bir aşı

yoktur (26). Bu aşının da kısa raf ömrü, yüksek maliyeti ve patojenik forma dönüşme riski sebebiyle kullanımı yaygınlaşmamıştır (14). Bu riskleri bertaraf etmek için güncel araştırmalar DNA parçaları veya *T. gondii* antijenik proteinlerin adjuvanlarla birleştirilmesi ile geliştirilen DNA veya subünit aşı denemelerine odaklanmıştır. GRA1 proteini, GRA1 DNA aşılarının kodladığı rekombinant GRA1 proteininin immünojenliği ve sağladığı korunma sebebiyle, önemli bir aşı adayı olarak ön plana çıkarılmıştır (15, 155, 167, 174). Rekombinant GRA1 proteinin (222 aminoasit) ortalama antijenik eğilim grafiğinde, protein sekansının 8 bölgesinde, toplam 81 aminoasidin, antijenik olduğu ön görülmüştür (Grafik 3.2). Bu bilgilerin ışığında araştırmamızın ikinci kısmında yapılan aşı denemelerinde hedef antijen olarak GRA1 belirlenmiş, üç çeşit GRA1 kaynaklı aşı adayının (CMV/vt-GRA1, CMV/ko-GRA1 DNA aşıları ve rGRA1-Provax protein aşısı) BALB/c farelerde oluşturduğu immünite ve sağladıkları koruma değerlendirilmiştir. *T. gondii* RH suşu ise oluşan korumanın saptanmasında kullanılmıştır.

DNA aşı teknolojisi 1990'lı yıllarda popüler olmuştur. Teknik olarak kolay üretilmesinin yanında, intramüsküler (I.M.) uygulanan DNA aşılarının uzun süreli yüksek IgG2a ve IFN- γ seviyeleri ile karakterize Th1 yanıtı oluşturmalarının yanı sıra IL-4 düzeyinde de hafif bir artış sağladıkları saptanmıştır (59, 107, 137, 140). DNA aşılarının etkisini kısıtlayan etkenlerden birisi, hedef genin ait olduğu organizmanın kodon kullanımının, aşının uygulanacağı konak hücre ile aynı olmaması durumunda, o konakta antijen ekspresyonunun az olmasıdır. Klonlanmış genlerdeki nadir kodonların varlığının protein ekspresyon seviyesine, mRNA ve plasmid dengesine etki ettiği saptanmıştır. Nadir kodonların klonlanan gende çok fazla olması durumunda, ribozomda işlerin yavaşladığı, translasyon yavaşlaması sonucunda translasyon hatalarının olduğu bildirilmiş, hatta bazı durumlarda nadir

kodonların protein sentezini ve hücre büyümesini bile inhibe ettikleri saptanmıştır (59, 107, 137, 140). Bazı çalışmalar DNA aşılarının ancak pikogram ile nanogram arasındaki miktarlarda protein sentez ettikleri belirlenmiş, doğal olarak oluşturdukları immun yanıtında zayıf kaldığı görülmüştür (107, 140). Memeli hücrelerde DNA aşısının protein ekspresyonunu, gelişen immun yanıtı kuvvetlendirmenin bir yolunun da gen sekanslarına uygulanan kodon optimizasyonu olduğu bildirilmiştir (107, 140). Parazit antijenlerinde bu teknik kullanılarak protein ekspresyon seviyesinde, hücresel ve humoral immunitede artış sağlanmıştır. Örneğin *Plasmodium falciparum* eritrosit bağlama proteini ve merozoit yüzey protein 1 geni, *Plasmodium yoleii* sirkumsporozoit geni DNA aşılması için kodon optimize edildikten sonra protein ekspresyonu artmıştır. *Shistosoma mansoni* cDNA'sının kodon optimizasyonu ile heterolog ekspresyonda artma saptanmıştır. Bir başka çalışmada sıtma aşısı adayı *P. falciparum* FALVAC geni *E. coli* sistemi için optimize edilmiş ve *E. coli*'den elde edilen protein seviyesinin belirgin şekilde arttığı görülmüştür. Benzer gelişmeler virüslerde de saptanmış, HIV antijenlerinden gag, gp120/160, tat, reverse transkriptaz ve integras genleri, insan papilloma virüs 11'e ait L1 geni ve insan papilloma virüsü 16'ya ait E5 geni ekspresyonları kodon optimizasyonu sonucu arttığı bildirilmiştir. Kodon optimizasyonu ayrıca *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* ve *Clostridium tetani* gibi bakterilere ait *in vivo* protein ekspresyon seviyesini ve oluşan antikor yanıtını da arttırmaktadır (5, 28, 41, 46, 73, 125, 127, 130, 146, 164, 166, 172, 175, 185). Çalışmamızda yeni bir kodon optimizasyon yöntemi olan CODA (computationally optimized DNA assembly), GRA1 DNA aşısının farelerde letal toxoplazmosise karşı etkisinin artırılması için kullanılmıştır. CODA'nın çalışma prensibi, kodon değiştirmeleri yaparak, birkaç kısa

reaksiyonda, hatasız, kendi kendine birleşebilecek oligonükleotidler ile tam uzunlukta genin oluşturulması olarak özetlenmektedir (99).

Aşılama çalışmamızın sonuçlarını tartışmadan önce, daha önce GRA1 ile yapılan aşılama sonuçlarını incelemek yararlı olacaktır. Supply ve ark. rekombinant BCG'ye klonlanan rekombinant GRA1 proteini üreten mikobakteriyel ekspresyon vektörünü ve *E. coli*'de üretilen glutathione *S*-transferaz ile füzyon edilmiş hibrid proteininin (GST-GRA1) oluşturduğu immunojenliği araştırmışlardır. 7–8 haftalık dişi OF1 fareleri rekombinant GRA1 proteini üreten rekombinant BCG ve GST-GRA1 proteini Freund'un yarım adjuvanı ile birleştirilerek, 9 adet Suffolk melez dişi koyun ise sadece rekombinant GRA1 proteini üreten rekombinant BCG ile aşılanmışlardır. Korunmanın saptanması için fareler, *T. gondii* 76K suşuna ait doku kistleri ile koyunlar ise, M3 (Moredun) suşu ookistleri ile enfekte edilmişlerdir. Rekombinant GRA1 proteini üreten rekombinant BCG ile yapılan aşılama sonrası fare ve koyunlarda antikor yanıtının oluşturmadığı, fakat GST-GRA1 ile aşılanmış farelerde antikor yanıtının olduğu görülmüştür. Lenfosit proliferasyonu sadece koyunların periferik kan mononükleer hücrelerinden ölçülmüştür. Koyunlarda antikor yanıtı saptanamamasına rağmen, periferik kan mononükleer hücreleri GST-GRA1 ile karşılaştırılınca, antijene özgü immun cevabın ve buna bağlı olarak IFN- γ miktarının artışına sebep olduğu gözlenmiştir. Sadece rekombinant GRA1 proteini üreten rekombinant BCG ile aşılanmış OF1 fareler (grup 8 fare içerir) *T. gondii* 76K suşu kistleri ile ikinci aşılama 2 hafta sonra enfekte edilmiş, bir fare dışında bütün hayvanların öldüğü gözlenmiştir. Rekombinant GRA1 proteini üreten rekombinant BCG ile aşılanan koyunlarda ise T hücre yanıtının arttığı, *T. gondii* M3 (Moredun) suşu ookistleri ile enfekte edilmeleri sonrası enfeksiyonun kontrol grubuna göre daha hafif geçtiği gözlenmiştir (167). Bu çalışmada ilk defa araştırmacılar rekombinant

GRA1 proteininin antikor ve T hücre yanıtını uyardığını ve bir miktar korunma sağladığının altını çizmişlerdir. Buna ek olarak saflaştırılmış GST-GRA1 proteini aşı adayı olarak ilk defa bu çalışmada denenmiştir. Fakat iyi antikor yanıtı alınmasına rağmen T hücre yanıtı ölçülmemiş, sağlanan korunmanın saptanması için aşılınmış OF1 fareler *T. gondii* ile enfekte edilmemişlerdir.

Vercammen ve ark. GRA1 ve iki farklı *T. gondii* genini aşı adayı olarak 3 değişik fare türünde, Vical şirketine ait VR1020 vektörü ile denemişlerdir. GRA1 geninin VR1020 vektörüne eklenmesi ortaya insan doku plasminojen aktivatörü ile füzyon olmuş GRA1 proteinini çıkartmıştır. 6 haftalık dişi inbred fareler (C57BL/6, BALB/c ve C3H) 3 hafta ara ile 3 kere 100 µg DNA ile aşılınmışlardır. Fareler ağız yolu ile 76K ve IPB-G suşları ile enfekte edilmiştir. C3H fareler 50 adet IPB-G veya 76K suşları kistleriyle, BALB/c fareler 50–200 arası IPB-G suşu kistleri ile, C57BL/6 fareler ise 10 adet IPB-G suşu kistleri ile enfekte edilmiştir. GRA1 proteinini kodlayan plasmid kuvvetli antikor yanıtı uyarmıştır. Elde edilen antikor yanıtının farelerin türüne göre değişmekte olduğu saptanmıştır. Seropozitiflik BALB/c grubunda % 100 (42 fare), C3H farelerde % 88.6 (35 farenin 31'i) iken C57BL/6 farelerde % 74.4 (39 farenin 29'u) olarak saptanmıştır. En yüksek antikor titresi BALB/c farelerde saptanmıştır. Beş adet BALB/c fare ve C3H fareden alınan serum örnekleri IgG1 ve IgG2a alt grup antikorların oranının saptanması için kullanılmış, C3H grubunda beş fareden dördünde predominant IgG2a yanıtı ve bir farede eşit IgG1 ve IgG2a yanıtı saptanmıştır. BALB/c farelerde ise beş fareden ikisinde predominant IgG2a yanıtı, bir farede predominant IgG1 yanıtı ve kalan iki farede ise eşit yanıt saptanmıştır. Sonuçta C3H farelerde BALB/c farelere göre daha kuvvetli IgG2a polarizasyonu olduğu belirtilmiştir. Her bir fare türünden elde edilen dalak hücreleri *T. gondii* eriyik antijen ile karşılaştırılmış, oluşan lenfosit

proliferasyonu ve sitokin miktarı ölçülmüştür. C3H ve BALB/c farelerde belirgin lenfosit proliferasyonu saptanırken C57BL/6 farelerde lenfosit proliferasyonu oluşmadığı izlenmiştir. BALB/c ve C3H farelerde IFN- γ yapımının belirgin şekilde arttığı ve buna karşılık C57BL/6 farelerde IFN- γ seviyesinde kontrol farelerine oranla anlamlı bir artış olmadığı bildirilmiştir. Hiçbir farede 24 saatlik stimülasyon sonrasında IL-4 yanıtı gelişmemiş, BALB/c farelerde en yüksek olmak üzere kronik enfekte tüm fare türlerinde kuvvetli IL-4 yanıtı oluşumu uyarmıştır. Her tür fare aşılamanın oluşturduğu korumanın araştırılması için *T. gondii* IPB-G ve 76K suşları ile değişik yoğunlukta enfekte edilmiştir. 50 adet IPB-G suşu kisti ile enfekte edilen 10 adet GRA1 ile aşılansın C3H fareden yedi tanesi yaşamıştır ve aynı doz kist ile enfekte edilen boş vektör ile aşılansın 10 fareden 9'u ölmüştür. 50 adet 76K suşu ile enfekte edilen 10 adet C3H faresinden 9'u yaşamış, kontrol grubunda ise aynı doz 76K suşu farelerin % 50'sinin yaşayabildiği saptanmıştır. BALB/c ve C57BL/6 türü fareler sadece IPB-G suşu ile enfekte edilmişlerdir. 10 adet IPB-G suşu kisti ile enfekte edilen C57BL/6 farelerden % 30'nun yaşadığı ve boş vektör ile aşılansın kontrol grubunun da yaşam oranının % 25 olduğu izlenmiştir. BALB/c farelerin, IPB-G suşunun yol açtığı enfeksiyona yanıtları farklı olmuştur. En az 200 IPB-G suşu kisti, boş vektör ile uygulansın farelerin % 100'ünü 8–12 gün içinde, GRA1 ile aşılansın BALB/c farelerin % 100'ü de 8–18 gün içinde öldüğü yayınlanmıştır. Doz 50 kiste düşürüldüğünde boş vektör ile aşılansın farelerin % 80'inde koruma oluşurken GRA1 ile aşılansın farelerde sağlansın koruma % 70'te kalmıştır. Kronik enfeksiyona karşı oluşansın direnç C3H ve BALB/c farelerde düşük doz *T. gondii* ile enfeksiyon sonrası beyinde oluşansın kist sayısı hesaplanarak belirlenmiştir. C3H farelerde, kontrollere göre kist miktarında belirgin bir azalma saptanırken, BALB/c farelerde anlamlı bir düşüş görülmemiştir (174). Bu seçkin DNA aşısı çalışması üç

değişik fare türünde DNA aşısı sonucu oluşan humoral ve hücrel immun yanıt yanında aşı adaylarının oluşturduğu korumanın da IPB-G ve 76k suşları ile değerlendirilmesi açısından önemlidir. Scorza ve ark. yine GRA1 kodlayan VR1020 vektörü kullanarak T hücre alt tiplerinin gelişen korumaya etkisini bu sefer 40 adet IPB-G suşu kisti ile C3H farelerde karşılaştırarak incelemiştir. İlk deney grubunda dört fareden üçü yaşarken, ikinci deney grubunda dört farenin dördünün de yaşadığı görülmüş, aynı doz kist ile enfekte edilen boş vektör ile aşılanmış sekiz adet kontrol faresinden bir tanesinin de yaşadığını bildirmiştir (155).

Bivas-Benita ve ark. aynı GRA1 kodlayan VR1020 vektörü ve buna ek olarak saflaştırılmış GRA1 proteini ile yüklenmiş chitosan parçacıklarını kullanarak yaptıkları aşılama çalışmasında 6–8 haftalık C3H/HeN fareleri kullanmışlardır. İlk doz aşılama intragastrik yol ile bir grup fareye saflaştırılmış GRA1 proteini yüklenmiş mikroparçacıklar ve bir başka gruba da GRA1 kodlayan VR1020 vektörünün yüklendiği nanoparçacıklar vermişlerdir. İkinci aşılama saflaştırılmış GRA1 proteini veya GRA1 kodlayan VR1020 vektörü parçacıklara yükleyerek yine intragastrik yoldan verilirken, bir başka gruba GRA1 kodlayan VR1020 vektörü I.M. yoldan uygulanmıştır. Saflaştırılmış GRA1 proteini yüklü mikroparçacıklarla ve sonrasında GRA1 kodlayan VR1020 vektörü I.M. yoldan aşılanan grubun en yüksek antikor yanıtını oluşturduğu izlenmiştir. Alt grup IgG antikor yanıtının genelde IgG1 yönünde olduğu bildirilmiştir. GRA1 kodlayan VR1020 vektörünün yüklendiği nanoparçacıklar ile ilk aşılması yapılan ve ikinci aşılama i.m. yol ile GRA1 kodlayan VR1020 vektör uygulanan grupta ise daha önce aynı vektör ile yapılan ve predominant IgG2a yanıtının saptandığı çalışmalarının aksine, predominant IgG1 yanıtı olduğu görülmüştür. Buna ek olarak yüklenmiş chitosan parçacıklarının başka antijenlerle IgG2a yanıtı oluşturdukları daha önceki yayınlarda bildirilmiştir.

Saflaştırılmış GRA1 proteini yüklenmiş mikroparçacıklar ise, daha önce saflaştırılmış proteinlerle yapılan çalışmalarda IgG1 yanıtı oluşturmalarına rağmen, karışık IgG1 ve IgG2a yanıtı oluşturduğu saptanmıştır (15). Bu çalışma, antijene özgü lenfosit proliferasyonu, sitokin miktarı ve korunma çalışması eksik bırakılarak tamamlanmıştır.

Çalışmamızda kullanılan DNA aşı adaylarından ilki CMV memeli ekspresyon vektörüne eklenen vahşi tip GRA1 genini içeren CMV/vt-GRA1 aşısı, diğeri ise GRA1 geninin memeli hücreler için optimize edilmiş oligonükleotidlerin seri PZR ve TOPO klonlama reaksiyonlarından sonra birleştirilmiş, tam uzunlukta sentetik versiyonunun CMV vektörüne eklenmesi ile oluşturulan CMV/ko-GRA1 aşısıdır. HEK 293 hücrelerde CMV/ko-GRA1 ve CMV/vt-GRA1 DNA aşı adaylarının *in vitro* protein ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmış ve ko-GRA1 geninin vt-GRA1'e göre belirgin şekilde daha fazla protein ekspresyonu yaptığı saptanmıştır. Her iki DNA aşısının da negatif kontrollere göre humoral ve hücrel immunité de anlamlı artış sağladığı, *T. gondii* RH suşuna karşı korumada kontrollere göre belirgin artışa yol açtığı izlenmiştir. BALB/c farelere uygulanan DNA aşıları sonrasında hem CMV/vt-GRA1 hem de CMV/ko-GRA1 ile aşılanan farelerde kontrollere göre daha fazla IgG antikor yanıtı oluşmuştur. CMV/ko-GRA1 ile aşılanan farelerde ortalama IgG miktarı CMV/vt-GRA1 ile aşılanan farelere oranla bir miktar daha fazla gerçekleşmiştir. IgG antikorların alt grup tayininde her iki DNA aşısında da benzer yanıtlar alınmasının yanında % 50 oranında Th1 yönüne polarizasyon saptanmış, benzer polarizasyonun Vercammen ve ark. yaptığı çalışmada, BALB/c farelerde % 40 civarında olduğu bildirilmiştir (174). Bir başka çalışmada GRA1 aşısının nanoparçacıklar ile uygulanması sonrası alt grup IgG antikor tayininde belirgin Th2 polarizasyonu gözlenmiştir (15). Antijene özgü

lenfosit proliferasyonu ve IFN- γ seviyesi de daha önceki yayınlarda bildirildiği gibi negatif kontrollere göre yüksek seviyede saptanmıştır (174). Vercammen ve ark yaptığı çalışmada BALB/c farelerin bir tanesinde daha fazla IgG1 ve diğer ikisinde IgG2a ile eşit miktarda IgG1 yanıtı olmasına rağmen hiçbir farede 24 saatlik stimulasyon sonrasında IL-4 yanıtı saptanmamıştır. Çalışmamızda ise her iki DNA aşısının da uygulandığı farelerden alınan dalak hücrelerinin 72 saat stimulasyonundan sonra ölçülen IL-4 seviyelerinin kontrollere göre daha yüksek olduğu, IL-4 yanıtının az miktarda artışının kimi aşılarda IgG1 yönüne polarize olma eğiliminden kaynaklandığı kanaatine varılmıştır. Bu sonuçlara göre alt grup IgG antikor yanıtı az miktarda Th1 polarizasyonu gösterirken, hücrel immunitenin hangi yöne polarize olduğunu daha spesifik gösterdiği belirtilen sitokin seviyesi ölçümleri de DNA aşılarda Th1 yönüne polarize olduğu tekrar göstermiştir. Çalışmamızda ve önceki GRA1 DNA aşı çalışmalarında gözlenen IgG1 ve IgG2a yanıtının hayvanlar arasında farklı olmasının sebebi henüz açıklığa kavuşmamıştır. DNA aşılı ile önceden yapılan çalışmaların sonuçları, antijenin nereden immün sistemi uyardığı, konağın immunitesi veya doğuştan gelen immün sisteminin farklı şekillerde uyarılması gibi birçok değişkenin IgG antikor alt grup polarizasyonuna etki ettiğini işaret etmektedir (107, 140).

Letal dozlarda *T. gondii* RH suşuna ile karşılaştırılan DNA aşısı uygulanmış farelerde oluşan koruma, negatif kontrollere göre belirgin şekilde fazla olmasına karşın, beklenenin aksine, *in vitro* protein ekspresyonunda sağlanan belirgin şekilde artış, oluşan korumaya aynı oranda yansımamıştır. Bununla birlikte CMV/ko-GRA1 DNA aşısı ile sağlanan korumanın, CMV/vt-GRA1 ile sağlanan korumaya göre daha fazla olduğu görülmüştür. Daha önceden aynı grup araştırmacılar tarafından yapılan iki çalışmada belli bir standartta kullanılmayan *T. gondii* IPB-G ve 76K kistleri ile

oluşturulan enfeksiyona karşı oluşan koruma, C3H farelerde % 100 seviyesine ulaştığı belirtilmiştir (155). Bunun yanında aynı doz kist ile enfekte edilen kontrol farelerinde % 12.5 oranında yaşadıkları bildirilmiştir. Aynı aşının kullanıldığı BALB/c farelerde oluşan koruma, düşük doz kist ile yaratılan enfeksiyonda oluşan koruma % 70 seviyesinde iken kontrollerde % 80 seviyesinde olduğu bildirilmiş, yüksek doz ile enfekte edilen tüm farelerin ise öldüğü belirtilmiştir. C57BL/6 farelerde daha da düşük kist dozu ile enfekte edilmesine rağmen, oluşan koruma kontrol grubunda % 25 iken aşılınmış farelerde % 30 seviyesinde gerçekleştiği bildirilmiştir (174). Bir başka çalışmada rekombinant GRA1 proteini üreten rekombinant BCG ile yapılan aşılama sonrası 1000 adet 76K suşu kisti ile enfekte edilen OF1 farelerde aşılama ile sağlanan koruma % 12.5 seviyesinde kalmıştır (167). Bu çalışmada kontrol grubu farelerinin 4-5 gün içinde ölümüne sebep olan letal dozda RH suşu takizoitleri, aşılınmış BALB/c farelere uygulandığında, aşılardan oluşturduğu koruma süresi CMV/ko-GRA1 DNA aşısında, CMV/vt-GRA1 DNA aşısına göre biraz daha fazla olmak üzere, sırasıyla ortalama 1.7 ve 1.6 kat arttığı saptanmıştır. DNA aşılarının geliştirdiği koruma başka çalışmalarda da, çalışmamızda olduğu gibi letal doz RH suşu ile değerlendirilmiştir. Fachado ve ark. ROP2 ve SAG1 kodlayan plasmidleri hem ayrı ayrı, hem de kokteyl şeklinde BALB/c farelere uygulamışlar. ROP2 ve SAG1 kodlayan DNA aşıları tek başına iki doz uygulandığında letal doz RH suşuna karşı korumayı kontrollere göre uzatmazken, ROP2 ve SAG1 kodlayan plasmidlerden oluşan kokteyl aşı korunmayı kontrollere göre ortalama 4.1 kat uzatmıştır (57). Fachado ve ark. yaptığı diğer bir çalışmada, genomik kütüphane kodlayan plasmid ile yapılan 2 doz ve 3 doz aşı uygulamaları sonrası letal doz RH suşu ile enfekte edilen farelerde oluşan koruma sürelerinin kontrollere göre sırasıyla ortalama 3 ve 4 kat arttığı yayınlanmıştır (58).

ROP2 kodlayan plasmid ile 3 tür farenin (CBA/J, BALB/c ve C57BL/6J) aşılandığı bir çalışmada, letal doz RH suşu ile enfekte edilen farelerde, oluşan koruma süreleri kontrollere göre sadece BALB/c farelerde istatistiksel olarak anlamlı artış sağlamış ($P=0.04$) ve ortalama 1.1 kat artmıştır (108). 1999 yılında Nielsen ve ark. tarafından SAG1 kodlayan plasmid ile C3H ve BALB/c farelerde yapılan aşı denemesinde, letal doz RH suşuna karşı oluşan koruma, boş plasmid uygulanan C3H ve BALB/c farelerde sırasıyla % 30 ve % 20 iken, aşılanmış farelerde oluşan koruma % 100 ve % 80 olarak saptanmıştır (132).

Sonuçlar CMV/ko-GRA1 DNA aşısının, CMV/vt-GRA1 DNA aşısına göre *in vitro* ortamda ekspresyonunun daha üstün olduğunu ortaya koymakta, BALB/c farelerde kontrollere göre daha fazla antikor yanıtı, antijene özgü lenfosit proliferasyonu, sitokin yanıtı ve daha uzun korunma oluştuğunu göstermektedir. Fakat *in vitro* ekspresyonda oluşan fark immun yanıtın artması ve korunmanın uzamasına yansımamıştır. DNA aşılarının *in vivo* şartlarda protein ekspresyon kabiliyetini ölçen çalışmalarda, aşılama sonrasında sadece pikogram ve nanogram seviyesinde protein ekspresyonu geliştiği belirtilmiştir (107, 137, 140). Bu nedenle ko-GRA1 ile *in vitro* ortamda vt-GRA1'e göre sağlanan yüksek protein ekspresyonunun immun yanıtı ve korunmayı istatistiksel olarak belirgin şekilde artıracak seviyeye ulaştıramadığı düşünülebilir.

Rekombinant GRA1 proteini içeren subunit aşı, Provac adlı adjuvanın 48 saat içinde seri olarak saflaştırılabilen GRA1 proteini ile birleştirilmesi ile oluşturulmuştur. Provac adjuvanı aslında daha önceden adjuvan özelliği bilinen squalane ve pluronic L121 adlı adjuvanlara tween 80'in eklenmesi ile oluşturulmuş yeni bir adjuvandır. Yapılan araştırmalarda bu adjuvanın Th1 yanıtını IFN- γ ölçümlerine dayanarak kuvvetle uyardığı saptanmıştır (145). Bizim çalışmamızda da

benzer bir sonuç elde edilmiştir. Provax eklenen rekombinant GRA1 protein aşısının oluşturduğu IgG2a ve IFN- γ yanıtını sadece rekombinant GRA1 proteini uygulanan farelere göre belirgin şekilde arttırmıştır. rGRA1-Provax aşısının etkinliğini değerlendirmek için, rekombinant GRA1 proteinin Freund adjuvanı ile birleştirilip farelere uygulandığında rGRA1-Freund aşısının oluşturduğu IgG2a ve IFN- γ yanıtının sadece rekombinant GRA1 proteini uygulanan farelere göre belirgin şekilde fazla olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda rGRA1-Provax aşısı da en az rGRA1-Freund aşısı kadar IgG2a ve IFN- γ arttırmada etkin olduğu gösterilmiştir. Sonuçta rGRA1-Provax aşısı DNA aşılara göre daha fazla IgG antikor yanıtı oluşturmuş, IgG alt grup tayininde IgG1 predominansı olmasına rağmen daha az fakat kuvvetli IgG2a yanıtı oluşturmuştur. rGRA1-Provax aşısı, DNA aşılara göre yaklaşık üç kat daha fazla IFN- γ üretimine sebep olmuştur. Aşılama sırasında oluşan IgG1 antikor yanıtına paralel olarak az miktarda IL-4 yanıtı da saptanmıştır. rGRA1-Provax aşısının letal toxoplasmosise karşı oluşturduğu koruma süresi DNA aşılardan daha fazla olup, kontrol grubuna göre neredeyse iki kat fazladır. Supply ve ark. GST-GRA1 protein aşısının OF1 farelerde antikor yanıtı uyardığı belirtilmişler fakat bu çalışmada aşının uyardığı T hücre yanıtı ölçülmemiş ve aşılama ile oluşan korunmanın saptanması için fareler *T. gondii* ile enfekte edilmemiştir (167). Yine bir başka saflaştırılmış rGRA1 proteini kullanılan aşı çalışmasında sadece IgG1/IgG2a oranı saptanmış fakat fareler *T. gondii*'ye ait herhangi bir suş ile enfekte edilip, oluşan koruma belirlenmemiştir (15). Kato ve ark. yaptığı çalışmada fareler sadece rekombinant GRA1 proteini ile aşılanmış ve bu çalışmada olduğu gibi IgG alt grup antikorlarında IgG1 predominansı ve IFN- γ miktarında üretiminde artış saptanmış ama oluşan korumanın belirlenmesi açısından bir çalışma yapılmamıştır (94). Letal toxoplasmosise karşı protein aşılarının sağladığı

koruma, Petersen ve ark. tarafından üretilen alumla konjuge edilmiş SAG1 protein aşısı ile de araştırılmıştır. Rekombinant SAG1 proteini ile adjuvante edilmiş alum aşısı NMRI farelerde % 44 korunma sağlarken, negatif kontrol gruplarında aynı doz RH suşu takizotlerine karşı korunma % 20 oranında kalmıştır (136). Bu çalışma rekombinant GRA1 proteinin bir adjuvan ile birleştirilip oluşturduğu immunité ve RH suşuna karşı sağlanan korumanın bir arada değerlendirildiği ilk araştırma dır. Ayrıca toxoplasmosis'e karşı geliştirilen aşı adayları içinde kodon optimizasyon yaklaşımının kullanıldığı ilk çalışma olup, araştırmamızda GRA1 geni memeli hücreye kodon optimize edilerek, DNA aşı adayı olarak kullanılmıştır. Alınan sonuçlara göre, rekombinant GRA1 proteininin bir adjuvanla birleştirilmesi ile oluşan aşı adayının sağladığı koruma, DNA aşı adaylarına göre daha fazla olduğu için, gelecekte planlanan aşı çalışmalarında, saflaştırılmış *T. gondii* rekombinant proteinleri ve adjuvan kombinasyonlarının formüle edildiği aşı çalışmaların hızlandırılmasında yarar olacağı kanaatindeyiz.

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada *T. gondii* rekombinant GRA1 proteinin yapısı çeşitli yöntemlerle tanımlanmış, toxoplasmosise karşı GRA1 DNA aşısı adayları ve GRA1 protein aşısı adayının oluşturduğu immunojenlik ve sağladığı koruma araştırılmıştır. Çalışmamız, rekombinant GRA1 proteinin bir adjuvan ile birleştirilip oluşturduğu immunité ve RH suşuna karşı korumanın bir arada değerlendirildiği ilk araştırmadır. Bunun yanında *T. gondii*'ye ait bir gen ilk defa memeli hücreye kodon optimize edilerek kodon-optimize GRA1 DNA aşısı adayı olarak denenmiştir. Sonuçta rekombinant GRA1 proteininin bir adjuvan ile birleştirildiğinde, DNA aşılara göre daha iyi immun yanıt oluşturduğu, daha uzun süre koruma sağladığı görülmüş olmasına rağmen letal toxoplasmosise karşı tam koruma oluşmamıştır. Memeli hücreye kodon optimize edilen GRA1 DNA aşısı adayı, vahşi tip GRA1 DNA aşısı adayına göre beklenen oranda immun sistemi uyarmamış ve korumayı arttırmamış, sadece immunité ve korumayı bir miktar arttırabilmiştir. Protein aşısının DNA aşılara göre neden daha fazla immunojen olduğu ve daha iyi koruma sağladığı bilinmemekle birlikte fareye verilen protein miktarının, kullanılan adjuvanın tipinin, adjuvanın parçacık büyüklüğünün değiştirilmesinin, başka proteinlerle birleştirilip kokteyl aşılarda denemesinin immun yanıtı ve letal toxoplasmosise karşı oluşan korumayı ne kadar arttıracağına araştırılması gerekmektedir.

ÖZET

***TOXOPLASMA GONDII* GRA1 PROTEİNİN TANIMLANMASI: AŞI ÇALIŞMALARINDAKİ YERİ**

GRA1, *Toxoplasma gondii*'nin yoğun granül organelinden salgılandığı gösterilmiş bir proteindir. Bu çalışmada rekombinant GRA1 proteininin tanımlanması sonrasında, GRA1 kökenli üç tip aşı adayının BALB/c farelerde oluşturduğu immun yanıt ve letal toxoplasmosise karşı koruma gücünün değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalarda rekombinant GRA1 proteininin katlanan, 24kD moleküler büyüklükte, immunojenliği yüksek bir protein olduğu görülmüştür. Aşı çalışmasında, vahşi tip GRA1 DNA aşı adayı (CMV/vt-GRA1), memeli hücreye kodon optimize edilen GRA1 DNA aşı adayı (CMV/ko-GRA1) ve rekombinant GRA1 proteininin Provac ile adjuvante edildiği aşı adayı (rGRA1-Provac) kullanılmıştır. CMV/ko-GRA1 ekspresyon seviyesinin CMV/vt-GRA1'e göre daha iyi olduğu HEK 293 hücrelerde saptanmıştır. Bütün aşı adaylarının farelerde kuvvetli humoral immun yanıt oluşturduğu, ancak rGRA1-Provac aşısı ve DNA aşılarının her iki IgG antikör alt grubunu uyarmasına rağmen rGRA1-Provac aşısının IgG1 yönüne polarize olduğu, DNA aşılarının ise daha çok IgG2a yönüne polarize oldukları görülmüştür. Hücrel immünite çalışmalarında denenen tüm aşı adaylarının farelerde kuvvetli lenfosit proliferasyonu ve interferon-gamma oluşumunu uyardığı, bu özelliğin rGRA1-Provac aşısında çok belirgin olduğu izlenmiştir. Koruyucu etkinin araştırılması için aşılanan fareler letal doz *T. gondii* RH suşu takizoitleri ile enfekte edilmiş, bunlar içinde en uzun koruma rGRA1-Provac ile sağlanmıştır. Özetle test edilen üç aşı içinde en iyi aşı adayının

rGRA1-Provax aşısı olduğu ve CMV/ko-GRA1 DNA aşısının da CMV/vt-GRA1 DNA aşısına göre daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada *T. gondii*'ye ait bir gen ilk defa kodon-optimize edilerek GRA1 DNA aşısı adayı olarak kullanılmıştır. Ayrıca rekombinant GRA1 proteininin ilk defa bir adjuvan eşliğinde aşısı adayı olarak oluşturduğu immünite ve letal toxoplasmosise karşı sağladığı koruma araştırılmıştır.

ABSTRACT

***TOXOPLASMA GONDII* GRA1 PROTEIN CHARACTERIZATION: ITS VALUE IN VACCINE DEVELOPMENT**

GRA1 is a protein secreted from the dense granule organelle of *Toxoplasma gondii*. Our aim was to characterize recombinant GRA1 protein and evaluate the immunogenicity and protection potency of GRA1 derived vaccine candidates in BALB/c mice against lethal toxoplasmosis. Results showed that recombinant GRA1 protein is folded, has a 24kD molecular weight and highly immunogenic. During the vaccination study, a wild type GRA1 DNA vaccine (CMV/wt-GRA1), a GRA1 DNA vaccine codon optimized for expression in mammalian cells (CMV/co-GRA1), and a GRA1 recombinant protein vaccine adjuvanted with Provac (rGRA1-Provac) were used. Protein expression level of CMV/co-GRA1 was better than CMV/wt-GRA1 in HEK 293 cells. In mice, all vaccines induced a strong humoral response, while rGRA1-Provac and DNA vaccines induced both subgroup IgG antibodies in which rGRA1-Provac was polarized towards IgG1 antibody and DNA vaccines were polarized towards IgG2a antibody. On the cellular immune response, a strong lymphocyte proliferation and interferon-gamma production was achieved in all vaccinated mice groups in which rGRA1-Provac vaccinated group showed the highest response. All vaccinated mice groups were challenged with lethal doses of *T. gondii* RH strain tachyzoites and rGRA1-Provac achieved the highest prolonged survival. Overall, rGRA1-Provac vaccine is the best vaccine candidate against toxoplasmosis and CMV/co-GRA1 is a more potent vaccine than CMV/wt-GRA1. In the present study, a *T. gondii* gene was codon-optimized first time and used as a

GRA1 DNA vaccine candidate. Moreover, an adjuvanted recombinant GRA1 protein vaccine candidate's immunogenicity and protection potency against lethal toxoplasmosis were evaluated the first time.

YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Achbarou, A., Mercereau-Puijalon, O., Sadak, A., et al. (1991). Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*, *Parasitology*, 103: 321–329.
2. Ajioka, J.W., Boothroyd, J.C., Brunk, B.P., et al. (1998). Gene discovery by EST sequencing in *Toxoplasma gondii* reveals sequences restricted to the Apicomplexa, *Genome Res*, 8: 18–28.
3. Alarcon, J.B., Waine, G.W., and McManus, D.P. (1999). DNA vaccines: technology and application as anti-parasite and anti-microbial agents, *Adv Parasitol*, 42: 343–410.
4. Altıntaş, N., Kuman, H.A., Akisü, Ç., et al. (1997). Toxoplasmosis in last four years in Aegean region, Turkey, *J Egypt Soc Parasitol*, 27: 439–443.
5. Andre, S., Seed, B., Eberle, J., et al. (1998). Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage, *J. Virol*, 72: 1497–1503.
6. Angus, C.W., Klivington-Evans, D., Dubey, J.P., and Kovacs, J.A. (2000). Immunization with a DNA plasmid encoding the SAG1 (P30) protein of *Toxoplasma gondii* is immunogenic and protective in rodents, *J Infect Dis*, 181: 317–324.
7. Aramini, J.J., Stephen, C., Dubey, J.P., et al. (1999). Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts, *Epidemiol Infect*, 122: 305–315.
8. Araujo, F.G. (1994). Immunization against *Toxoplasma gondii*, *Parasitol Today*, 10: 358–360.
9. Asherie, N. (2004). Protein crystallization and phase diagrams, *Methods*, 34: 266–72.

10. Aspinall, T.V., Marlee, D., Hyde, J.E., and Sims, P.F. (2002). Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction--food for thought? *Int J Parasitol*, 32: 1193–1199.
11. Bachmann, S., Schroder, J., Bottmer, C., et al. (2005). Psychopathology in first-episode schizophrenia and antibodies to *Toxoplasma gondii*, *Psychopathology*, 38: 87–90.
12. Bahia-Oliveira, L.M., Jones, J.L., Azevedo-Silva, J., et al (2003). Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil, *Emerg Infect Dis*, 9: 55–62.
13. Benenson, M.W., Takafuji, E.T., Lemon, S.M., et al. (1982). Oocyst transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water, *N Engl J Med*, 307: 666–669.
14. Bhopale, G.M. (2003). Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status. *Mic. Infect*, 5: 457–462.
15. Bivas-Benita, M., Laloup, M., Versteyhe, S. et al. (2003). Generation of *Toxoplasma gondii* GRA1 protein and DNA vaccine loaded chitosan particles: preparation, characterization, and preliminary in vivo studies, *Int. J. Pharm*, 266: 17–27.
16. Blamey, C.J., Ceccarelli, C., Naik, U.P., and Bahnson, B.J. (2005). The crystal structure of calcium and integrin-binding protein 1: insights into redox regulated functions, *Protein Sci*, 14: 1214–1221.
17. Bohne, W., Gross, U., Ferguson, D.J., and Heesemann, J. (1995). Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (hsp30/bag1) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants, *Mol Microbiol*, 16: 1221–1230.
18. Bonenfant, C., Dimier-Poisson, I., Velge-Roussel, F., et al. (2001). Intranasal immunization with SAG1 nontoxic mutant heat labile enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*, *Infect immun*, 69: 1605–1612.

19. Bossi, P. and Bricaire, F. (2004). Severe acute disseminated toxoplasmosis, *Lancet*, 364: 579.
20. Bourguin, I., Chardes, T., and Bout, D. (1993). Oral immunization with *Toxoplasma gondii* antigens in association with cholera toxin induces enhanced protective and cell mediated immunity in C57BL/6 mice, *Infect Immun*, 61: 2082–2088.
21. Bowie, W.R., King, A.S., Werker, D.H., et al. (1997). Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC Toxoplasma Investigation Team, *Lancet*, 350: 173–177.
22. Brown, A.S., Schaefer, C.A., Quesenberry, C.P. Jr, et al. (2005). Maternal exposure to toxoplasmosis and risk of schizophrenia in adult offspring, *Am J Psychiatry*, 162: 767–773.
23. Bulow, R. and Boothroyd, J.C. (1991). Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes, *J Immunol*, 147: 3496–3500.
24. Burg, J.L, Perelman, D., Kasper, L.H., et al. (1988) Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*, *J Immunol*, 141: 3584–3591.
25. Burnett, A.J., Shortt, S.G., Isaac-Rentom, J., et al. (1998). Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak, *Ophthalmology*, 105: 1032–1037.
26. Buxton, D. and Innes, E.A. (1995). A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis, *Parasitology*, 110: 11–16.
27. Carruthers, V.B. and Sibley, L.D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts, *Eur J Cell Biol*, 73: 114–123.

28. Casimiro, D. R., Tang, A., Perry, H. C. et al. (2002). Vaccine-induced immune responses in rodents and nonhuman primates by use of a humanized human immunodeficiency virus type 1 pol gene, *J. Virol*, 76: 185–194.
29. Cesbron-Delauw, M.F. (1994). Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: Their role in the host-parasite relationship, *Parasitol Today*, 10: 293–296.
30. Cesbron-Delauw, M.F., Guy, B., Torpier, G. R., et al. (1989). Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*, *Proc Natl Acad Sci*, 86: 7537–7541.
31. Chang, H., Pechere, J., and Piguet, P. (1992). Role of tumour necrosis factor in chronic murine *Toxoplasma gondii* encephalitis, *Immunol Infect Dis*, 2: 61–68.
32. Chardes, T., Bourguin, I., Mevelec, M.N., et al. (1990). Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigens, *Infect Immun*, 58: 1240–1246.
33. Chen, G., Guo, H., Lu, F., and Zheng, H. (2001). Construction of a recombinant plasmid harbouring the rhoptry protein 1 gene of *Toxoplasma gondii* and preliminary observation on DNA immunity, *Chin Med J*, 114: 837–840.
34. Choi, W.Y., Nam, H.W., Kwak, N.H., et al. (1997). Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis, *J Infect Dis*, 175: 1280–1282.
35. Cleary, M.D., Singh, U., Blader, I.J., et al. (2002). *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression, *Eukaryot Cell*, 1: 329–340.
36. Couper, K.N., Nielsen, H.V., Petersen, E., et al. (2003). DNA vaccination with the immunodominant tachyzoite surface antigen (SAG-1) protects against adult acquired *Toxoplasma gondii* infection but does not prevent maternofetal transmission, *Vaccine*, 21: 2813–2820.
37. Davies D. H., McCausland M. M., Valdez, C. et al. (2005). Vaccinia virus H3L envelope protein is a major target of neutralizing antibodies in humans and elicits protection against lethal challenge in mice, *J Virol*, 79: 11724–11733.

38. Davies, D. H., Liang, X. Hernandez, J. E. et al. (2005). Profiling the humoral immune response to infection by using proteome microarrays: high-throughput vaccine and diagnostic antigen discovery, *Proc Natl Acad Sci*, 102: 547–552.
39. Daffos, F., Forestier, F., Capella-Pavlovsky, M., et al. (1988). Prenatal management of 746 pregnancies at risk for congenital toxoplasmosis, *N Engl J Med*, 318: 271–75.
40. Debard, N., Buzoni, D., and Bout-Gatel, D. (1996). Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection, *Infect Immun*, 64: 2158–2166.
41. Deml, L., Bojak, A. Steck, S. et al. (2001). Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein, *J Virol*, 75: 10991–11001.
42. Denkers, E. Y. (2003). From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 39: 193–203.
43. Denkers, E.Y. and Gazzinelli, R.T. (1998). Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection, *Clin Microbiol Rev*, 11: 569–588.
44. Denton, H., Roberts, C.W., Alexander, J., et al. (1996). Enzymes of energy metabolism in the bradyzoites and tachyzoites of *Toxoplasma gondii*, *FEMS Microbiol Lett*, 137: 103–108.
45. Desolme, B., Mevelec, M.N., Buzoni-Gatel, D., and Bout, D. (2000). Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by DNA immunization with a plasmid encoding *Toxoplasma gondii* GRA4 gene, *Vaccine*, 18: 2512–2521.
46. Disbrow, G. L., Sunitha, I. Baker, C. C., Hanover, J., and Schlegel, R. (2003). Codon optimization of the HPV-16 E5 gene enhances protein expression, *Virology*, 311: 105–114.

47. Dubey, J.P., Gamble, H.R., Hill, D., et al. (2002). High prevalence of viable *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in Massachusetts, *J Parasitol*, 88: 1234–1238.
48. Dubey, J.P., Lindsay, D.S., and Speer, C.A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts, *Clin Microbiol Rev*, 11: 267–99.
49. Dunn, D., Wallon, M., Peyron, F., et al. (1999). Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling, *Lancet*, 353: 1829–1833.
50. Duquesne, V., Auriault, C., Gras-Masse, H., et al. (1991). Identification of T cell epitopes within a 23-kD antigen (P24) of *Toxoplasma gondii*, *Clin Exp Immunol*, 84: 527–534.
51. Durmaz, R., Durmaz, B., Taş, I., and Rafiğ, M. (1995). Seropositivity of toxoplasmosis among reproductive-age women in Malatya, Turkey, *J Egypt Soc Parasitol*, 25: 693–698.
52. Dutta, S., Lalitha, P.V., Ware, L.A., et al. (2002). Purification, characterization, and immunogenicity of the refolded ectodomain of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 expressed in *Escherichia coli*, *Infect Immun*, 70: 3101–3110.
53. Dzierszinski, F., Mortuaire, M., Cesbron-Delauw, M.F., and Tomavo, S. (2000). Targeted disruption of the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3 gene in *Toxoplasma gondii* decreases host cell adhesion and drastically reduces virulence in mice, *Mol Microbiol*, 37: 574–582.
54. Dzierszinski, F., Mortuaire, M., Dendouga, N., et al. (2001). Differential expression of two plant-like enolases with distinct enzymatic and antigenic properties during stage conversion of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*, *J Mol Biol*, 309: 1017–1027.
55. Ertuğ, S., Okyay, P., Türkmen, M., and Yüksel, H. (2005). Seroprevalence and risk factors for toxoplasma infection among pregnant women in Aydın province, Turkey, *BMC Public Health*, 5: 66.

56. European Collaborative Study and Research Network on Congenital Toxoplasmosis. Low incidence of congenital toxoplasmosis in children born to women infected with human immunodeficiency virus (1996). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 68: 93–96.
57. Fachado, A., Rodriguez, A., and Angel, S.O. (2003). Protective effect of a naked DNA vaccine cocktail against lethal toxoplasmosis in mice, *Vaccine*, 21: 1327–1335.
58. Fachado, A., Rodriguez, A., Molina, J., et al. (2003). Long-term protective immune response elicited by vaccination with an expression genomic library of *Toxoplasma gondii*, *Infect Immun*, 71: 5407–5411.
59. Felgner, P.L., (1998). DNA vaccines, *Curr Biol*, 8: 551–553.
60. Ferguson, D.J. (2004). Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host, *Int J Parasitol*, 34: 347–360.
61. Fermin, Z., Bout, D., Ricciardi-Castagnoli, P., and Hoebeke, J. (1999). Salbutamol as an adjuvant for nasal vaccination, *Vaccine*, 17: 1936–1941.
62. Fertig, A., Selwyn, S., and Tibble, M.J. (1977). Tetracycline treatment in a food-borne outbreak of toxoplasmosis, *Br Med J*, 1: 1064.
63. Fischer, H.G., Stachelhaus, S., Sahm, M., et al. (1998). GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected ost cells, *Mol Biochem Parasitol*, 15: 251–262.
64. Fox, B.A. and Bzik, D.J., (2002). De novo pyrimidine biosynthesis is required for virulence of *Toxoplasma gondii*, *Nature*, 415: 926–929.
65. Frank, R.K. (2001). An outbreak of toxoplasmosis in farmed mink (*Mustela vison* S.), *J Vet Diagn Invest*, 13: 245–249.
66. Furtado, G.C., Slowik, M., Kleinman, H.K., and Joiner, K.A. (1992). Laminin enhances binding of *Toxoplasma gondii* tachyzoites to J774 murine macrophage cells, *Infect Immun*, 60: 2337–2342.

67. Garcia-Reguet, N., Lebrun, M., Fourmaux, M.N., et al. (2000). The microneme protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesin which binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite, *Cell Microbiol*, 2: 353–364.
68. Gavinet, M.F., Robert, F., Firtion, G., et al. (1997). Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy, *J Clin Microbiol*, 35: 1276–1277.
69. Guerina, N., Hsu, H-W., Meissner, H., et al. (1994). Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection, *N Engl J Med*, 330: 1858–63.
70. Gürüz, Y. (2005). Toxoplasmosis Tedavisi. p. 50–64. Akisü Ç. ve Korkmaz M. (ed.), *Tıbbi Parazitolojide Tedavi*, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:20, Meta Basım, İzmir.
71. Gutierrez, Y. (2000). *Diagnostic Pathology of Parasitic infections with clinical correlations*, 2nd ed. Oxford University Press, New York.
72. Hall, S.M., Pandit, A., Golwilkar, A., and Williams, T.S. (1999). How do Jains get Toxoplasma infection? *Lancet*, 354: 486–487.
73. Hamdan, F. F., Mousa, A., and Ribeiro, P. (2002). Codon optimization improves heterologous expression of a *Schistosoma mansoni* cDNA in HEK293 cells, *Parasitol Res*, 88: 583–586.
74. Harma M., Harma, M., Güngen, N., and Demir, N. (2004). Toxoplasmosis in pregnant women in Şanlıurfa, Southeastern Anatolia City, Turkey, *J Egypt Soc Parasitol*, 34: 519–525.
75. Hariharan, K. and Hanna, N. (1998). Development and application of PROVAX adjuvant formulation for subunit cancer vaccines, *Adv Drug Deliv Rev*, 32: 187–197.
76. Haumont, M., Delhaye, L., Garcia, L., et al. (2000). Protective immunity against congenital toxoplasmosis with recombinant SAG1 protein in a Guinea pig model, *Infect Immun*, 68: 4948–4953.

77. Hehl, A., Krieger, T., and Boothroyd, J.C. (1997). Identification and characterization of SRS1, a *Toxoplasma gondii* surface antigen upstream of and related to SAG1, *Mol Biochem Parasitol*, 89: 271–282.
78. Hennequin, C., Dureau, P., N'Guyen, L., et al. (1997). Congenital toxoplasmosis acquired from an immune woman, *Pediatr Infect Dis*, 16: 75–76.
79. Hiszczyńska-Sawicka, E., Brillowska-Dabrowska, A., Dabrowski, S., et al. (2003). High yield expression and single-step purification of *Toxoplasma gondii* SAG1, GRA1, and GRA7 antigens in *Escherichia coli*, *Protein Expr Purif*, 27: 150–157.
80. Hohlfeld, P., Daffos, F., Costa, J-M., et al. (1994). Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with polymerase-chain reaction test on amniotic fluid, *N Engl J Med*, 331: 695–99.
81. Holland, G.N. (2003). Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease, *Am J Ophthalmol*, 136: 973–988.
82. Isaac-Renton, J., Bowie, W.R., King, A., et al. (1998). Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water, *Appl Environ Microbiol*, 64: 2278–2280.
83. Ismael, A.B., Sekkai, D., Collin, C., et al. (2003). The MIC3 gene of *Toxoplasma gondii* is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis, *Infect Immun*, 71: 6222–6228.
84. Jeannel, D., Niel, G., Costagliola, D., et al. (1988). Epidemiology of toxoplasmosis among pregnant women in the Paris area, *Int J Epidemiol*, 17: 595–602.
85. Jenum, P.A., Stray-Pedersen, B., Melby, K.K., et al. (1998). Incidence of *Toxoplasma gondii* infection in 35,940 pregnant women in Norway and pregnancy outcome for infected women, *J Clin Microbiol*, 36: 2900–2906.
86. Jeromin, A., Muralidhar, D., Parameswaran, M.N., et al. (2004). N-terminal myristoylation regulates calcium-induced conformational changes in neuronal calcium sensor-1, *J Biol Chem*. 279: 27158–27167.

87. Johnson, L. (1992). A protective role for endogenous tumor necrosis factor in *Toxoplasma gondii* infection, *Infect Immun*, 60: 1979–1983.
88. Johnson, A.M. and Illana, S. (1991). Cloning of *Toxoplasma gondii* gene fragments encoding diagnostic antigens, *Gene*, 99: 127–32.
89. Jonas, B.A. and Privalsky, M.L. (2004). SMRT and N-CoR corepressors are regulated by distinct kinase signaling pathways, *J Biol Chem*, 279: 54676–54686.
90. Jones, J.L., Kruszon-Moran, D., and Wilson, M. (2003). *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999–2000, *Emerg Infect Dis*, 9: 1371–1374.
91. Jones, J.L., Lopez, A., Wilson, M., et al. (2001). Congenital toxoplasmosis: a review, *Obstet Gynecol Surv*, 56: 296–305.
92. Kasper, L.H. and Ware, P.L. (1985). Recognition and characterization of stage-specific oocyst/sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by human antisera, *J Clin Invest*, 75: 1570–1577.
93. Kasper, L.H. and Boothroyd, J.C. (1993). *Toxoplasma gondii* and toxoplasmosis. In *Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections*. (Warren K. S., Ed.) Blackwell Science, Inc., 3rd ed. p. 269–300
94. Kato, M., Claveria, F.G., Maki, Y., et al. (2005). *Toxoplasma gondii* antigens GRA1 (p24) and SAG1 (p30): a comparison of their stimulatory influence on T-cell activation and cytokine expression in in vitro cultures, *Pathobiology*, 72: 160–164.
95. Kissinger, J.C., Gajria, B., Li, L., et al. (2003). ToxoDB: accessing the *Toxoplasma gondii* genome, *Nucleic Acids Res*, 31: 234–236.
96. Knoll, L.J. and Boothroyd, J.C. (1998). Isolation of developmentally regulated genes from *Toxoplasma gondii* by a gene trap with the positive and negative selectable marker hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase, *Mol Cell Biol*, 18: 807–814.

97. Kolaskar, A.S. and Tongaonkar, P.C. (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens, *FEBS Lett*, 276: 172–174.
98. Kuman, A. ve Altıntaş, N. (1996). Protozoon Hastalıkları, Bornova – İzmir.
99. Lathrop, R. H., Sazhin, A., Sun, Y., et al. (2001). A multi-queue branch-and-bound algorithm for anytime optimal search with biological applications, *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform*, 12: 73–82.
100. Lebech, M., Andersen, O., Christensen, N.C., et al. (1999). Feasibility of neonatal screening for toxoplasma infection in the absence of prenatal treatment, *Lancet*, 353: 1834–1837.
101. Lecordier, L., Mercier, C., Sibley, L.D., and Cesbron-Delauw, M.F. (1999). Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell, *Mol Biol Cell*, 10: 1277–1287.
102. Lecordier, L., Moleon-Borodowsky, I., Dubremetz, J.F., et al. (1995). Characterization of a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* (GRA6) associated to the network of the parasitophorous vacuole, *Mol Biochem Parasitol*, 70: 85–94.
103. Lekutis, C., Ferguson, D.J., and Boothroyd, J.C. (2000). *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2, *Exp Parasitol*, 96: 89–96.
104. Lekutis, C., Ferguson, D.J.P., Grigg E.M., et al. (2001). Surface Antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme, *Int J Parasitol*, 31: 1285–1292.
105. Letscher Bru, V., Villard, O., Risse, B., et al. (1998). Protective effect of vaccination with a combination of recombinant surface antigen 1 and interleukin 12 against toxoplasmosis in mice, *Infect Immun*, 66: 4503–4506.
106. Letscher-Bru, V., Pfaff, A.W., Abou-Bacar, A., et al. (2003). Vaccination with *Toxoplasma gondii* SAG-1 protein is protective against congenital

- toxoplasmosis in BALB/c mice but not in CBA/J mice, *Infect Immun*, 71: 6615–6619.
107. Levine M. M., Kaper, J. B. Rappuoli, R. Liu, M. A. and Good M. F. (ed.), New generation vaccines, 3rd ed. Marcel Dekker, New York.
108. Leyva, R., Herion, P., and Saavedra, R. (2001). Genetic immunization with plasmide DNA coding for the ROP2 protein of *Toxoplasma gondii*, *Parasitol Res*, 87: 70–79.
109. Lunden, A., Lovgren, K., Uggla, A., and Araujo, F.G. (1993). Immune responses and resistance to *Toxoplasma gondii* in mice immunized with antigens of the parasite incorporated into immunostimulating complexes, *Infect Immun*, 61: 2639–2643.
110. Lyons, R.E. and Johnson, A.M. (1998). Gene sequence and transcription differences in 70 kDa heat shock protein correlate with murine virulence of *Toxoplasma gondii*, *Int J Parasitol*, 28: 1041–1051.
111. Lyons, R.E., McLeod, R., and Roberts, C.W. (2002). *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion, *Trends Parasitol*, 18: 198–201.
112. Manger, I.D., Hehl, A.B., and Boothroyd, J.C. (1998). The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1, *Infect Immun*, 66: 2237–2244.
113. Martin, V., Supanitsky, A. Echeverria, P. C. (2004). Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the GRA4 gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis, *Clin Diagn Lab Immunol*, 11: 704–710.
114. Masur, H., Jones, T.C., Lempert, J.A., and Cherubini, T.D. (1978). Outbreak of toxoplasmosis in a family and documentation of acquired retinochoroiditis, *Am J Med*, 64: 396–402.

115. Matsubara, M., Nakatsu, T., Kato, H., and Taniguchi, H. (2004). Crystal structure of a myristoylated CAP-23/NAP-22 N-terminal domain complexed with Ca²⁺/calmodulin, *EMBO J*, 23: 712–718.
116. McPherson, A. (2004). Introduction to protein crystallization, *Methods*, 34: 254–265.
117. Mevelec, M.N., Chardes, T., Mercereau-Puijalon, O., (1992). Molecular cloning of GRA4, a *Toxoplasma gondii* dense granule protein, recognized by mucosal IgA antibodies, *Mol Biochem Parasitol*, 56: 227–238.
118. Miller, M.A., Gardner, I.A., Kreuder, C., et al. (2002). Coastal freshwater runoff is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*), *Int J Parasitol*, 32: 997–1006.
119. Mineo, J.R., Mcleod, R., Mack, D., (1993). Antibodies to *Toxoplasma-gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection, *J Immunol*, 150: 3951–3964.
120. Minkoff, H., Remington, J.S., Holman, S., et al. (1997). Vertical transmission of toxoplasma by human immunodeficiency virus-infected women, *Am J Obstet Gynecol*, 176: 555–559.
121. Mishima, M., Xuan, X., Shioda, A., et al. (2001). Modified protection against *Toxoplasma gondii* lethal infection and brain cyst formation by vaccination with SAG2 and SRS1, *J Vet Med Sci*, 63: 433–438.
122. Mohamed, R.M., Aosai, F., Chen, M., et al. (2003). Induction of protective immunity by DNA vaccination with *Toxoplasma gondii* HSP70, HSP30 and SAG1 genes, *Vaccine*, 21: 2852–2861.
123. Montoya, J. G. and Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis, *Lancet*, 363: 1965–1976.

124. Montoya, J.G. and Remington, J. S. (2000). *Toxoplasma gondii*. Mandell: Principles and Practice of Infectious Diseases 5th ed. Churchill Livingstone, Inc. <http://home.mdconsult.com/das/body/0/883/2293.html>.
125. Mossadegh, N., L. Gissmann, M. Muller, H. (2004). Codon optimization of the human papillomavirus 11 (HPV 11) L1 gene leads to increased gene expression and formation of virus-like particles in mammalian epithelial cells, *Virology*, 326: 57–66.
126. Mun, H.S., Aosai, F., and Yano, A. (1999). Role of *Toxoplasma gondii* HSP70 and *Toxoplasma gondii* HSP30/bag1 in antibody formation and prophylactic immunity in mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii*, *Microbiol Immunol*, 43: 471–479.
127. Nagata, T., Uchijima, M. Yoshida, A. et al. (1999). Codon optimization effect on translational efficiency of DNA vaccine in mammalian cells: analysis of plasmid DNA encoding a CTL epitope derived from microorganisms, *Biochem Biophys Res Commun*, 261: 445–451.
128. Nakaar, V., Bermudes, D., Peck, K.R., and Joiner, K.A. (1998). Upstream elements required for expression of nucleoside triphosphate hydrolase genes of *Toxoplasma gondii*, *Mol Biochem Parasitol*, 92: 229–239.
129. Nakaar, V., Ngo, H.M., Aaronson, E.P., (2003). Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rhoptry protein ROP2 in *Toxoplasma gondii*, *J Cell Sci*, 116: 2311–2320.
130. Narum, D. L., Kumar, S. Rogers, W. O. et al. (2001). Codon optimization of gene fragments encoding *Plasmodium falciparum* merzoite proteins enhances DNA vaccine protein expression and immunogenicity in mice, *Infect Immun*, 69: 7250–7253.
131. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Biodefense Research Agenda for Category B and C Priority Pathogens, June 2003. [Online].

132. Nielsen, H. V., Lauemoller, S. L., Christiansen, L., et al. (1999). Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with a plasmid encoding the SAG1 gene, *Infect Immun*, 67: 6358–6363.
133. Odberg-Ferragut, C., Soete, M., Engels, A., et al. (1996). Molecular cloning of the *Toxoplasma gondii* sag4 gene encoding an 18 kDa bradyzoite specific surface protein, *Mol Biochem Parasitol*, 82: 237–244.
134. Özcan K, Ay S, Akan E, Yiğit S, and Köksal F. (1988). The prevalence of *Toxoplasma* antibodies among the patients with symptoms of toxoplasmosis at the hospital of the Faculty of Medicine, University of Cukurova. *Mikrobiyol Bul.* 22: 45–50.
135. Parmley, S.F., Weiss, L.M., and Yang, S. (1995). Cloning of a bradyzoite-specific gene of *Toxoplasma gondii* encoding a cytoplasmic antigen, *Mol Biochem Parasitol*, 73: 253–257.
136. Petersen, E., Henrik, V.N., Christiansen, L., and Spenter, J. (1998). Immunization with *E. coli* produced recombinant *T. gondii* SAG1 with alum as adjuvant protect mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*, *Vaccine*, 16: 1283–1289.
137. Pier, G. B., Lyczak, J. B., and Wetzler, L. M. (2004). Vaccines and Vaccination, Immunology, Infection, and Immunity, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
138. Pietkiewicz, H., Hiszczyńska-Sawicka, E. Kur, J. (2004). Usefulness of *Toxoplasma gondii*-specific recombinant antigens in serodiagnosis of human toxoplasmosis, *J Clin Microbiol*, 42: 1779–1781.
139. Pinard, J.A., Leslie, N.S., and Irvine P.J. (2003). Maternal serologic screening for toxoplasmosis. *J Midwifery Womens Health*, 48(5): 308–316
140. Plotkin, S. A. and Orenstein, W. A. (2004). Vaccines, 4th ed. Saunders, Elsevier Inc. Pennsylvania.

141. Powers, D.C., Manaing, M.C., Hanscome, P.J., Pietrobon, P.J. (1995). Cytotoxic T lymphocyte responses to a liposome adjuvant influenza. A virus vaccine in the elderly, *J Infect Dis*, 172: 1103–1107.
142. Prilusky, J., Felder, C.E., Zeev-Ben-Mordehai, T., et al. (2005). FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded, *Bioinformatics*, 21: 3435–3438.
143. Prince, J.B., Auer, K.L., Huskinson, J., et al. (1990). Cloning, expression, and cDNA sequence of surface antigen P22 from *Toxoplasma gondii*, *Mol Biochem Parasitol*, 43: 97–106.
144. Radke, J.R., Gubbels, M.J., Jerome, M.E. (2004). Identification of a sporozoite-specific member of the Toxoplasma SAG superfamily via genetic complementation, *Mol Microbiol*, 52: 93–105.
145. Rajanathanan, P., Attard, G. S. Sheikh, N. A. and Morrow, W. J. (1999). Novel aggregate structure adjuvants modulate lymphocyte proliferation and Th1 and Th2 cytokine profiles in ovalbumin immunized mice, *Vaccine*, 18: 140–152.
146. Ramakrishna, L., Anand, K. K. Mohankumar, K. M. and Ranga, U. (2004). Codon optimization of the tat antigen of human immunodeficiency virus type 1 generates strong immune responses in mice following genetic immunization, *J Virol*, 78: 9174–9189.
147. Romand, S., Wallon, M., Franck, J., et al. (2001). Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis, *Obstet Gynecol*, 97: 296–300.
148. Roque-Resendiz, J. L., Rosales, R., and Herion, P. (2004). MVA ROP2 vaccinia virus recombinant as a vaccine candidate for toxoplasmosis, *Parasitology*, 128: 397–405.
149. Sacks, J.J., Roberto, R.R., and Brooks, N.F. (1982). Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk, *JAMA*, 248: 1728–1732.

150. Sacks, J.J., Delgado, D.G., Lobel, H.O., and Parker, R.L. (1983). Toxoplasmosis infection associated with eating undercooked venison, *Am J Epidemiol*, 118: 832–838.
151. Saito, S., Aosai, F., Rikihisa, N., et al. (2001). Establishment of gene-vaccinated skin grafting against *Toxoplasma gondii* infection in mice, *Vaccine*, 19: 2172–2180.
152. SantaLucia, J. Jr. (1998). A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics, *Proc Natl Acad Sci*, 95: 1460–1465.
153. Schantz, P.M. and McAuley, J. (1991). Current status of food-borne parasitic zoonoses in the United States, *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 22: 65–71.
154. Schumacher, M.A., Rivard, A.F., Bachinger, H.P., and Adelman, J.P. (2001). Structure of the gating domain of a Ca²⁺-activated K⁺ channel complexed with Ca²⁺/calmodulin, *Nature*, 410: 1120–1124.
155. Scorza, T., D'Souza, S., Laloup, M., et al. (2003). A GRA1 DNA vaccine primes cytolytic CD8 T cells to control acute *Toxoplasma gondii* infection, *Infect Immun*, 71: 309–16.
156. Seeber, F., Beuerle, B., Schmidt, H.H. (1999). Cloning and functional expression of the calmodulin gene from *Toxoplasma gondii*, *Mol Biochem Parasitol*, 99: 295–299.
157. Sharp, P. M. and Li, W. H. (1987). The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications, *Nucleic Acids Res*, 15: 1281–1295.
158. Sibley L.D., Niesman, I.R., Asai, T., and Takeuchi, T. (1994). *Toxoplasma gondii*: secretion of a potent nucleoside triphosphate hydrolase into the parasitophorous vacuole, *Exp Parasitol*, 79: 301–311.

159. Sibley L.D., Niesman I.R., Parmley S.F., and Cesbron-Delauw M.F. (1995). Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci*, 108: 1669–1677.
160. Sibley, L.D. and Boothroyd, J.C. (1992). Construction of a molecular karyotype for *Toxoplasma gondii*, *Mol Biochem Parasitol*, 51: 291–300.
161. Sinai, A.P. and Joiner, K.A. (2001). The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane, *J Cell Biol*, 154: 95–108.
162. Soylu, M., Özdemir, G., and Anlı, A. (1997). Pediatric uveitis in southern Turkey, *Ocul Immunol Inflamm*, 5: 197–202.
163. Stagno, S., Dykes, A.C., Amos, C.S., et al. (1980). An outbreak of toxoplasmosis linked to cats. *Pediatrics*, 65: 706–712.
164. Stratford, R., G. Douce, L. Zhang-Barber, N., et al. (2000). Influence of codon usage on the immunogenicity of a DNA vaccine against tetanus, *Vaccine*, 19: 810–815.
165. Strittmatter, C., Lang, W., Wiestler, O.D., and Killehues, P. (1992). The changing pattern of human immunodeficiency virus associated cerebral toxoplasmosis: A study of 46 postmortem cases, *Acta Neuropathol*, 83: 475–481.
166. Strugnell, R. A., Drew, D. Mercieca, J., et al. (1997). DNA vaccines for bacterial infections, *Immunol Cell Biol*, 75: 364–369.
167. Supply, P., Sutton, P. Coughlan, et al. (1999). Immunogenicity of recombinant BCG producing the GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*, *Vaccine*, 17: 705–714.
168. Tanyuksel, M., Guney, C., Araz, E., et al. (2004). Performance of the immunoglobulin G avidity and enzyme immunoassay IgG/IgM screening tests

- for differentiation of the clinical spectrum of toxoplasmosis, *J Microbiol*, 42: 211–215.
169. Templeton, T.J., Lancto, C.A., Vigdorovich, V., et al. (2004). The *Cryptosporidium* oocyst wall protein is a member of a multigene family and has a homolog in *Toxoplasma*. *Infect Immun*, 72: 980–987.
170. Teutsch, S.M., Juranek, D.D., Sulzer, A., et al. (1979). Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. *N Engl J Med*, 300: 695–699.
171. Torrey, E.F., and Yolken, R.H. (2003). *Toxoplasma gondii* and schizophrenia. *Emerg Infect Dis*, 9: 1375–1380.
172. Uchijima, M., Yoshida, A. Nagata, T. and Koide, Y. (1998). Optimization of codon usage of plasmid DNA vaccine is required for the effective MHC class I-restricted T cell responses against an intracellular bacterium, *J Immunol*, 161: 5594–5599.
173. Velge-Roussel, F., Marcelo, P., Lepage, A.C., et al. (2000). Intranasal immunization with *Toxoplasma gondii* SAG1 induces protective cells into both NALT and GALT compartments, *Infect Immun*, 68: 969–972.
174. Vercammen, M., Scorza, T., Huygen, K., et al. (2000). DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7 and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice, *Infect Immun*, 68: 38–45.
175. Vinner, L., Nielsen, H. V. Bryder, K., et al. (1999). Gene gun DNA vaccination with Rev-independent synthetic HIV-1 gp160 envelope gene using mammalian codons, *Vaccine*, 17: 2166–2175.
176. Vogel, N., Kirisits, M., Michael, E., et al. (1996). Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception, *Clin Infect Dis*, 23: 1055–1060.

177. Wilson, C.B., Remington, J.S., Stagno, S., and Reynolds, D.W. (1980). Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital *Toxoplasma* infection, *Pediatrics*, 66: 767–774.
178. Yamauchi, E., Nakatsu, T., Matsubara, M., et al., (2003). Crystal structure of a MARCKS peptide containing the calmodulin-binding domain in complex with Ca²⁺-calmodulin, *Nat Struct Biol*, 10: 226–231.
179. Yang, S., Parmley, S.F. (1997). *Toxoplasma gondii* expresses two distinct lactate dehydrogenase homologous genes during its life cycle in intermediate hosts, *Gene*, 184: 1–12.
180. Yang, C. D., Chang, G. N. and Chao, D. (2004). Protective immunity against *Toxoplasma gondii* in mice induced by a chimeric protein rSAG1/2, *Parasitol Res*, 92: 58–64.
181. Yang, C.D., Chang, G.N., and Chao, D. (2003). Protective immunity against *Toxoplasma gondii* in mice induced by the SAG2 internal image of anti-idiotypic antibody, *Parasitol Res*, 91: 452–457.
182. Zhang, Y.W., Halonen, S.K., Ma, Y.F., et al. (2001). Initial characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein, *Infect Immun*, 69: 501–507.
183. Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, *Nucleic Acids Res*, 31: 3406–3415.
184. Zuker, M., Mathews, D. H. and Turner, D. H. (1999). Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide, pp. 11–43. In J. Barciszewski and B. F. C. Clark (eds.), *RNA Biochemistry and Biotechnology*, NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
185. zur Megede, J., Chen, M. C. Doe, B. M. et al. (2000). Increased expression and immunogenicity of sequence-modified human immunodeficiency virus type 1 gag gene, *J Virol*, 74: 2628–2635.

EK

Aminoasitler için Bir Harf ve Üç Harflik Kısaltma Kodları

Tek harfli kod	Üç harfli kod	Aminoasit adı
A	Ala	Alanin
R	Arg	Arginin
N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartik asit
C	Cys	Sistein
Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutamik asit
G	Gly	Glycine
H	His	Histidin
I	Ile	İsolösin
L	Leu	Lösin
K	Lys	Lizin
M	Met	Methionin
F	Phe	Fenilalanin
P	Pro	Prolin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonine
W	Trp	Triptofan
Y	Tyr	Tirozin
V	Val	Valin
B	Asx	Aspartik asit veya Asparagin
Z	Glx	Glutamik asit veya Glutamin
X	Xaa	Herhangi aminoasit

ÖZGEÇMİŞ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden 1996 yılında mezun oldum. 2001 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim dalında Doktora eğitimime başladım. Doktora tezimin çalışmalarını TÜBİTAK Bilim Adamı Yetiştirme Grubundan Yurtdışı Araştırma Bursuyla (NATO-A2), 2003–2005 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri California Üniversitesi, Irvine Tıp Fakültesinde gerçekleştirdim. Halen Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim dalında doktora eğitimime devam etmekteyim.