

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

***TOXOPLASMA GONDII*'YE ÖZGÜ AŞI ADAYI
ANTİJENLERİN KULLANILDIĞI ADJUVANTE
MULTİVALAN REKOMBİNANT PROTEİN AŞISININ
OLUŞTURDUĞU İMMUN YANIT VE KORUNMANIN
BELİRLENMESİ**

Esra ATALAY ŞAHAR

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Remziye DEVECİ

İkinci Danışmanı : Prof. Dr. Adnan Yüksel GÜRÜZ

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.02.00

Sunuş Tarihi : 13.02.2015

Bornova-İZMİR

2015

Esra ATALAY ŞAHAR tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “*Toxoplasma gondii*”ye Özgü Aşı Adayı Antijenlerin Kullanıldığı Adjuvante Multivalan Rekombinant Protein Aşısının Oluşturduğu İmmun Yanıt ve Korunmanın Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 13.02.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Remziye DEVECİ

.....

Raportör Üye : Doç. Dr. Mert DÖŞKAYA

.....

Üye : Prof. Dr. Ülgen Zeki OK

.....

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi Tezi olarak sunduğum “*Toxoplasma gondii*’ye Özgü Aşı Adayı Antijenlerin Kullanıldığı Adjuvante Multivalan Rekombinant Protein Aşısının Oluşturduğu İmmun Yanıt ve Korunmanın Belirlenmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

13/02 /2015

Esra ATALAY ŞAHAR

ÖZET

TOXOPLASMA GONDII'YE ÖZGÜ AŞI ADAYI ANTİJENLERİN KULLANILDIĞI ADJUVANTE MULTİVALAN REKOMBİNANT PROTEİN AŞISININ OLUŞTURDUĞU İMMUN YANIT VE KORUNMANIN BELİRLENMESİ

ATALAY ŞAHAR, Esra

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Remziye DEVECİ

İkinci Danışmanı: Prof. Dr. Adnan Yüksel GÜRÜZ

Şubat 2015, 128 sayfa

Toxoplasma gondii, hemen hemen her sıcakkanlı hayvanı, kuş türlerini ve insanları enfekte edebilen bir zorunlu hücre içi parazittir. Toksoplazmozis, immün sistemi sağlam kişilerde asemptomatik ilerlerken, immün sistemi baskılanmış ya da immün yetmezliği olan kişilerde ölüme neden olabilmektedir. Bu sebeplerden dolayı *T. gondii*'ye karşı geliştirilecek aşı enfeksiyondan korunmak için büyük önem taşımaktadır. Bu tez çalışmasında *T. gondii*'ye karşı multivalan rekombinant protein aşısı geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla protein mikroyarray taramasıyla belirlenen *T. gondii*'ye ait 49 aşı adayı antijenik protein; biyoinformatik yöntemler, küçük çaplı ekspresyon ve saflaştırma özelliklerine göre analiz edilmiştir. Analiz sonucunda aralarından altı protein aşı adayı olarak seçilmiş ve ilk kez 6-Valantlı adjuvante rekombinant protein aşı formülasyonu geliştirilmiştir [6-Valant (+) Montanide]. Fareler üç hafta arayla iki kez aşılanmış ve daha sonra uyarılan humoral immün yanıt Western blot ve Rec-ELISA ile, hücresel immün yanıt ise flow sitometri ve sitokin ELISA ile belirlenmiştir. Aşılanan fareler *T. gondii* Ankara suşu takizoiti ile intraperitoneal yoldan letal dozda enfekte edilerek oluşturulan korunma belirlenmiştir.

Sonuçlara göre, aşılama sonrası 6-Valant (+) Montanide aşısı kontrollere göre kuvvetli total IgG yanıtı uyarmıştır ($P<0,0001$). IgG1 ve IgG2a yanıtı incelendiğinde polarizasyonun belirgin şekilde T_H1 yönüne doğru olduğu belirlenmiştir ($P<0,001$). IFN- γ salgılayan CD4 T-Yardımcı lenfositleri ile IFN- γ salgılayan CD8 T-Sitotoksik lenfosit oranlarının kontrollere göre sırasıyla 1,45-2

ve 1,6-2 kat arasında arttığı saptanmıştır. Ayrıca lenfositlerin hücre dışına salgıladığı IFN- γ miktarları incelendiğinde 6-Valant (+) Montanide aşısının kontrollere göre belirgin şekilde daha fazla olduğu ($P<0,001$) saptanmıştır. Bu sonuçlar 6-Valant (+) Montanide aşısının güçlü koruyucu T_H1 immün yanıt oluşturduğunu göstermektedir. Aşılanan farelerin yaşam süresininin $8,38\pm2,13$ güne çıkartıldığı ve kontrollere göre belirgin şekilde yüksek olduğu saptanmıştır ($P<0,01$).

Sonuçta bu çalışmada protein mikroyarray taraması ile seçilen aşı adayı antijenlerin kuvvetli humoral ve hücreyel immün yanıtı uyarılabildiği ve letal toksoplazmosize karşı kısmi korunma sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca toksoplazmozise karşı altı ya da daha fazla antijenik protein içeren multivalan rekombinant protein aşısı geliştirilerek kullanılabilir. Böylece gelecek çalışmalarda daha fazla anjenik protein içeren multivalent rekombinant protein aşı formülasyonun geliştirilmesiyle toksoplazmozise karşı tam korunmanın sağlanabileceği öngörülmektedir.

Anahtar sözcükler: Rekombinant protein, Adjuvant, Aşı, Altı-Valant, *Toxoplasma gondii*, Toksoplazmozis.

ABSTRACT

DETERMINATION OF IMMUNE RESPONSE AND PROTECTION ELICITED BY ADJUVANTED MULTIVALENT RECOMBINANT PROTEIN VACCINE USING *TOXOPLASMA GONDII* SPECIFIC VACCINE CANDIDATE ANTIGENS

ATALAY ŞAHAR, Esra

MSc in Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Remziye DEVECİ

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Adnan Yüksel GÜRÜZ

February 2015, 128 pages

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that can infect almost all warm-blooded animals, avian species and humans. Toxoplasmosis is asymptomatic in healthy individuals, whereas may lead to death in immune suppressed or deficient patients. For these reasons, a vaccine against *T. gondii* is important to prevent consequences of the infection. The aim of this thesis is to generate a multivalent recombinant protein vaccine against *T. gondii*.

For this purpose, 49 antigenic proteins of *T. gondii* which were determined by protein microarray screening are analyzed by the bioinformatics approaches as well as expressed and purified in small scale. Among them, six vaccine candidate proteins were selected to generate a six-valent adjuvanted recombinant protein vaccine formulation for the first time [6-Valant (+) Montanide]. Mice were vaccinated two times at three week intervals and then humoral immune response was analyzed by Western blot and Rec-ELISA, cellular immune response was detected by flow cytometry and cytokine ELISA. Mice were infected intra-peritoneally with a lethal dose of the *T. gondii* Ankara strain tachyzoites to determine protection conferred by vaccination.

Results show that 6-Valant (+) Montanide vaccine induced strong total IgG response compared to controls ($P<0,0001$). Analysis of IgG1 and IgG2a responses displayed that polarization was significantly towards T_H1 direction ($P<0,001$). IFN- γ secreting CD4 T-Helper and CD8 T-Cytotoxic lymphocyte ratios increased 1,45 to 2 and 1,6 to 2 times compared to the controls. In addition, 6-Valant (+)

Montanide induced significantly higher extracellular IFN- γ level secretion from lymphocytes compared to the controls ($P<0,001$). These results show that 6-Valant (+) Montanide vaccine induced strong protective T_H1 immune response. The survival time of the vaccinated mice was increased to $8,38 \pm 2,13$ days which was significantly higher than controls ($P<0,01$).

Overall, this study showed that vaccine candidate antigens selected from a protein microarray screening data induced strong humoral and cellular immune response as well as conferred some protection against lethal toxoplasmosis. In addition, multivalent recombinant protein vaccines containing six or more antigenic proteins can be generated and used against toxoplasmosis. Thus, future studies can develop multivalent recombinant protein vaccines and use more antigenic proteins in their formulations to confer full protection against toxoplasmosis.

Keywords: Recombinant protein, Adjuvant, Vaccine, Six-valent, *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmosis

TEŞEKKÜR

Tez danışmanlığımı üstlenerek beni glikobiyoloji konusunda aydınlatan Sayın Doç. Dr. Remziye DEVECİ'ye, beni öğrencisi olarak kabul eden, laboratuvar olanakları ve her türlü desteği sağlayarak kendimi geliştirmeme olanak sağlayan Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı başkanı ikinci tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Adnan Yüksel GÜRÜZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans tez çalışmalarım süresince her türlü yardımı ve desteği vererek, deneyimleriyle bana yol gösteren Sayın Doç. Dr. Mert DÖŞKAYA'ya, Sayın Doç. Dr. Ayşe CANER'e, Sayın Doç. Dr. Aysu DEĞİRMENCİ DÖŞKAYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarımda yardımda bulunan ve dostluğunu esirgemeyen Sayın Dr. Hüseyin CAN'a ve değerli bilgilerini benimle paylaşan Sayın Yrd. Doç. Dr. Sultan GÜLÇE İZ'e çok teşekkür ederim.

Sevgisi, sabrı, desteğiyle her an yanımda olduğunu hissettiğim ve bana varlığıyla güven veren sevgili eşim Umut ŞAHAR'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak her anımda yanımda olan, bu günlere gelmemi sağlayan, yardımlarını, desteklerini, sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen, varlıklarıyla güç bulduğum Babama, Anneme ve Kardeşlerime sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Esra ATALAY ŞAHAR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	.ix
TEŞEKKÜR	.xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	.xix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	.xxi
1. GİRİŞ	.1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	.3
2.1 Aşının Gelişimi	.3
2.2 Aşı İmmunolojisi	.6
2.2.1 Patojenlere karşı gelişen immün yanıt	.7
2.3 <i>Toxoplasma gondii</i> Hakkında Genel Bilgi	14
2.3.1 Morfolojisi ve yaşam döngüsü	15
2.3.2 Toksoplazmozis	17
2.3.3 <i>T. gondii</i> enfeksiyonuna karşı gelişen immün yanıt	18
2.3.4 <i>T. gondii</i> 'ye ait antijenik proteinler	21

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.4 Aşı Adayı Antijenik Proteinlerin Belirlenmesi	24
2.5 Toksoplazmozise Karşı Geliştirilen Aşı Çalışmaları	25
2.5.1 <i>T. gondii</i> 'ye karşı geliştirilen DNA aşılıları	26
2.5.2 <i>T. gondii</i> 'ye karşı geliştirilen rekombinant protein aşılıları	31
2.6 Aşı Çalışmalarında Kullanılan Adjuvantlar	37
3. MATERYAL VE METOT	39
3.1 Araştırmada Kullanılan Deney Hayvanları	39
3.2 <i>T. gondii</i> 'ye Ait Antijenik Proteinleri Kodlayan 49 Plazmitin <i>E. coli</i> BL21 Star (DE3) pLysS Hücrelere Klonlanması	39
3.3 Aşı Formülasyonunda Kullanılacak Rekombinant Proteinlerin Seçimi İçin 49 Antijenik Proteinin Ekspresyonlarının Belirlenmesi	41
3.4 Aşı Formülasyonunda Kullanılacak Rekombinant Proteinlerin Seçimi İçin 49 Antijenik Proteinin Biyoinformatik Yöntemlerle Analizi	42
3.5 <i>T. gondii</i> 'ye Ait Altı Rekombinant Proteinin Büyük Ölçekli Ekspresyonu ...	43
3.6 Rekombinant Proteinlerin Saflaştırılması	54
3.7 Sodyum Dedosil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE) ve Western Blot.....	55
3.8 Saflaştırılmış Rekombinant Proteinlerde Endotoksin Seviyesinin Belirlenmesi	56

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.9 Rekombinant Proteinlerin Miktarlarının Kantitatif Olarak Belirlenmesi	57
3.10 Multivalan Rekombinant Protein Aşı Formülasyonunun Oluşturulması ve Uygulanması.....	57
3.11 Aşılama İle <i>T. gondii</i> Ankara Suşu Takizotilerine Karşı Oluşan Korunmanın Değerlendirilmesi	58
3.12 Humoral İmmun Yanıtın Belirlenmesi	58
3.12.1 Eriyik <i>E. coli</i> proteininin hazırlanması	59
3.13 Hücre İmmun Yanıtın Belirlenmesi	59
3.13.1 Tek hücre süspansiyonlarının hazırlanması.....	60
3.13.2 Hücre dışına salgılanan sitokin miktarının sitokin ELISA ile belirlenmesi.....	61
3.13.3 Flow sitometri ile hücre içi sitokin salgılayan T lenfosit oranının belirlenmesi.....	62
3.14 İstatiksel Analiz	64
4. BULGULAR.....	65
4.1 <i>T. gondii</i> 'ye ait 49 Aşı Adayı Olabilecek Rekombinant Proteini Kodlayan Plazmitlerinin Gösterilmesi	65
4.2 Antijenik Rekombinant Proteinlerin Ekspresyon Seviyeleri.....	65
4.3 Biyoinformatik Analiz	67
4.4 Aşı adayları rH2, rA4, rE4, rD6, rE6 ve rH6 Proteinlerinin Saflaştırılması.....	69

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.5 Humoral İmmun Yanıt	69
4.5.1 Uyarılan total IgG antikor yanıtı	69
4.5.2 Uyarılan IgG1 ve IgG2a antikor yanıtı	70
4.6. Hücresel İmmun Yanıt	71
4.6.1 IFN- γ salgılayan CD4 T-Yardımcı lenfositlerin oranı	72
4.6.2 IFN- γ salgılayan CD8 T-Sitotoksik lenfositlerin oranı	72
4.6.3 IL-4 salgılayan CD4 T-Yardımcı lenfositlerin oranı	73
4.6.4 Lenfositlerin hücre dışına salgıladığı IFN- γ ve IL-4 miktarı	74
4.7 Letal Toksoplazmozise Karşı Korunma	75
5.TARTIŞMA	77
6.KAYNAKLAR DİZİNİ	82
ÖZGEÇMİŞ	104

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Antijenik peptidin MHC ile bağlandığı agretop, TCR ile bağlandığı epitop bölgeleri ve bu bölgelerdeki anchor rezidüleri.....	9
2.2 <i>T. gondii</i> yaşam döngüsü	16
2.3 <i>T. gondii</i> 'ye karşı oluşan CD4 T lenfosit immun yanıtı	19
2.4 <i>T. gondii</i> 'ye karşı oluşan CD8 T lenfosit immun yanıtı	20
2.5 <i>T. gondii</i> takizoiti.....	21
2.6 <i>T. gondii</i> takizoitinin konak hücreye invazyonu	22
4.1 Aşı çalışmalarında kullanılabilecek 49 rekombinant proteini kodlayan plazmitlerin agaroz jel görüntüsü	66
4.2 Aşı adayı 6 rekombinant proteinin optimizasyon amaçlı protein ekspresyonlarının Western blot ile gösterilmesi.....	66
4.3A Aşı adayı olabilecek antijenik 49 rekombinant proteinin B hücre epitoplarının biyoinformatik analiz sonuçları	68
4.3B Aşı adayı olabilecek antijenik 49 rekombinant proteinin MHC-I epitoplarının biyoinformatik analiz sonuçları	68
4.3C Aşı adayı olabilecek antijenik 49 rekombinant proteinin N-bağlı glikozilasyon bölgelerinin biyoinformatik analiz sonuçları	68
4.3D Aşı adayı olabilecek antijenik 49 rekombinant proteinin O-bağlı glikozilasyon bölgelerinin biyoinformatik analiz sonuçları	68
4.4A Aşı adayı 6 rekombinant proteinin saflaştırılma sonrası SDS-PAGE görüntüleri	69

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.4B Aşı adayı 6 rekombinant proteinin saflaştırılma sonrası Western blot görüntüleri.....	69
4.5 Aşı ve kontrol grubu farelerde oluşan total IgG yanıtı	70
4.6 Aşı ve kontrol grubu farelerde oluşan IgG1 ve IgG2a yanıtları	71
4.7 Aşı ve kontrol grubu farelerde IFN- γ salgılayan CD4 T-Yardımcı Lenfositlerinin Oranı.....	72
4.8 Aşı ve kontrol grubu farelerde IFN- γ salgılayan CD8 T-Sitotoksik Lenfositlerinin Oranı.....	73
4.9 Aşı ve kontrol grubu farelerde IL-4 salgılayan CD4 T-Yardımcı Lenfositlerinin Oranı.....	74
4.10 Aşı ve kontrol grubu farelerde hücre dışına salgılanan IFN- γ miktarı ...	75
4.11 Aşı ve kontrol grubu farelerde hücre dışına salgılanan IL-4 miktarı.....	75
4.12 Aşı ve kontrol grubu farelerin ikinci aşılamaadan 3 hafta sonra <i>T. gondii</i> Ankara suşu ile enfekte edilmeleri sonrası gözlenen yaşam süreleri.....	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 İnsan aşılarının kronolojisi	5
2.2 Aşıların Sınıflandırılması	6
2.3 <i>T. gondii</i> 'ye karşı geliştirilen DNA aşıları	28
2.4 <i>T. gondii</i> 'ye karşı geliştirilen rekombinant protein aşıları	34
2.5 Adjuvant çeşitleri.....	38
3.1 <i>T. gondii</i> antijenik proteinlerini kodlayan plazmitler	40
3.2 Biyoreaktörde kullanılan besiyeri karışımı	43
3.3A Rekombinant H2 proteinini kodlayan puET-H2 plazmitinin gen ve aminoasit sekansı.....	44
3.3B Rekombinant A4 proteinini kodlayan puET-A4 plazmitinin gen ve aminoasit sekansı.....	45
3.3C Rekombinant E4 proteinini kodlayan puET-E4 plazmitinin gen ve aminoasit sekansı.....	46
3.3D Rekombinant D6 proteinini kodlayan puET-D6 plazmitinin gen ve aminoasit sekansı.....	48
3.3E Rekombinant E6 proteinini kodlayan puET-E6 plazmitinin gen ve aminoasit sekansı.....	50
3.3F Rekombinant H6 proteinini kodlayan puET-H6 plazmitinin gen ve aminoasit sekansı.....	51
3.4 Multivalan rekombinant protein aşısı ve kontrol grupları.....	58

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

3.5	CD4 ve CD8 reseptörlü T hücrelerin salgıladığı hücre içi sitokinlerin belirlenmesinde kullanılan antikorlar	63
4.1	Aşı adayı 6 proteinin biyoinformatik analiz sonuçları.....	68

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
Ab	Antikor
ADCC	Antikora Bağımlı Hücresel Sitotoksiste
Ag	Antijen
AIDS	Kazanılmış Bağışıklık Yetmezliği Sendromu
APC	Antijen Sunan Hücre
BSA	Sığır Serum Albümini
Ca ²⁺	Kalsiyum İyonu
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GM-CSF	Granülosit Monosit Koloni Stimüle Edici Faktör
GRA	Yoğun Granül Antijeni
HSP	Isı Şok Proteini
IFN- γ	İnterferon Gama
Ig	İmmunoglobulin
IL	İnterlökin
INOS	Uyarılabilir Nitrik Oksit Sentaz
IPTG	Isopropyl β -D-l-Thiogalactopyranoside
LB	Luria Bertani

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
MAC	Membran Atak Kompleksi
Mg ²⁺	Magnezyum İyonu
MHC	Başlıca Doku Uygunluk Kompleksi
MIC	Mikronem Antijeni
NK	Doğal Öldürücü Hücre
NO	Nitrik Oksit
PV	Parazitor Vakuol
ROP	Roptri Proteini
SAG	Yüzey Antijeni
SOC	Katabolit Represyonlu Süper Optimal Besin Ortamı
STAT	Sinyal Dönüştürücü ve Transkripyon Aktivatörü
TAE	Tris Asetat EDTA
TCR	T Hücre Reseptörü
T _C	T-Sitotoksik Lenfosit
T _H	T-Yardımcı Lenfosit
TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü-Alfa

1. GİRİŞ

Toxoplasma gondii, toksoplazmozis enfeksiyonuna neden olan zorunlu hücre içi parazittir. Kesin konağı kedi ve kedigiller olan *T. gondii* insanların da dahil olduğu hemen hemen her memeliyi içeren geniş bir ara konak yelpazesine sahiptir (Wang et al., 2014b).

Toksoplazmozis enfeksiyonunun dünya nüfusunun üçte birini enfekte ettiği belirtilmektedir. İmmün sistemi sağlam kişilerde, genellikle asemptomatik hastalık oluşturmakta, immün sistemi baskılanmış kişilerde ise (organ transplantasyon, AIDS, kanser tedavisi gören hastalar) ciddi klinik tablolara hatta ölüme neden olabilmektedir. Hamilelik sırasında bulaşta ise yeni doğanlarda konjenital anomalilere veya düşüklere neden olabilmektedir (Verma and Khanna, 2013). Koyun, keçi ve domuz gibi çiftlik hayvanlarının da *T. gondii* enfeksiyonuna duyarlı oldukları gösterilmiştir. Bu durum önemli bir ekonomik kayıp oluşturmakta ve bunun yanında az pişmiş etlerin yenmesiyle enfeksiyonun insana bulaşmasında rol almaktadır (Garcia et al., 2014). Bu sebeplerle insanların ve hayvanların *T. gondii* enfeksiyonuna karşı korunması için güvenli ve koruyucu bir aşıya ihtiyaç bulunmaktadır (Wang et al., 2014b).

Aşılama, bulaşıcı hastalıkları kontrol altında tutmakta kullanılan en etkili ve en önemli yöntemlerden biridir (Liljeqvist and Stahl, 1999). Genellikle aşılar ölü ya da zayıflatılmış patojenin kendisi kullanılmaktadır. Ancak günümüz aşı çalışmalarında rekombinant protein teknolojisinin kullanılmasıyla daha güvenli ve etkili aşılar oluşturulabilmektedir (Hansson et al., 2000).

Rekombinant protein aşılarının çalışma prensibinde patojene ait bir kısım antijenik proteinin ya da proteinlerin rekombinant teknoloji ile üretilerek uygulanması sonrası koruyucu immün yanıtın oluşturulmasıdır. Rekombinant protein aşılarının ana avantajı yan etkiler ve patojenik organizmaya ait diğer kısımların neden olduğu immün reaksiyonlar olmaksızın koruyucu bağışıklık sağlayabilmesidir (Hansson et al, 2000).

Toksoplazmozis tedavisinde kullanılan ilaçlar yeteri kadar etkili değildir. Bunun yanında insanlarda ya da *T. gondii*'nin ana konağı olan kedi ve kedigillerde kullanılmak üzere geliştirilmiş herhangi bir aşı da bulunmamaktadır.

Günümüzde yapılan aşı çalışmalarında parazitin takizoit formunun eksprese ettiği proteinler arasından rastgele seçilen proteinler aşı adayı olarak

kullanılmaktadır. Bu sebeple toksoplazmozise karşı denenen birçok aşı denemesi kısmi başarılar ile sonuçlanmış, klinik çalışmalarına geçilememiştir.

Liang et al., (2011) ve Felgner et al. (2015), yaptıkları çalışmada toksoplazmozisli insanlara ait serum örnekleri yanında *T. gondii* sporozoit ve bradizoitleri ile enfekte hayvan modellerinden elde edilen serumları protein mikroyarray taraması ile değerlendirerek *T. gondii* özgü aşı aday antijenik proteinleri belirlemişlerdir.

Bu tez çalışmasında Liang et al. (2011) ve Felgner et al. (2015) tarafından belirlenen *T. gondii*'ye ait antijenik proteinler arasından 49 tanesi aşı geliştirmek amaçlı seçilmiş ve *Escherichia coli*'de üretilmiştir. Bu 49 rekombinant protein içinden biyoinformatik, ekspresyon ve saflaştırma özelliklerine göre seçim yapılarak adjuvante multivalan rekombinant protein aşı formülasyonunun geliştirilmesi amaçlanmıştır. Oluşturulan aşı formülasyonu hayvan modellerine uygulanarak aşılama ile uyarılan immün yanıt ve korunmanın belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Aşının Gelişimi

Tüm aşıların temel prensibi, patojenin (bakteriyel, paraziter, viral ve bazı toksinler) veya bu patojenin bir parçasının canlı vücuduna verilerek enfeksiyon anında vücudun patojenle daha etkin immun yanıt oluşturmalarını sağlamak amacıyla immun sistem duyarlılığını arttırmaktır (Ilchmann et al.,2014).

Bilim tarihinin en parlak bölümlerinden birisi, aşıların insan ömrünü ve sağlığını arttırdığı dönemlerdir (Plotkin, 2014). Aşılanmanın ilk denemeleri VII. yy başlarında Hindistan'daki rahiplerin yılan zehri içerek kendi immun sistemlerini uyardıkları çalışmalara dayanmaktadır (Cha, 2012).

İlk aşının keşfinden bu yana yaklaşık olarak 300 yılın geçtiği belirtilmektedir (Plotkin, 2014). XVI. yy'da Hindistan'da Brahman kastları tarafından çiçek virüsü ile enfekte olmuş hastaların derisinden alınan iltihabın, sağlıklı kişilerin burnundan verildiği belirtilmektedir. Bu yöntemle çiçek aşısı yapmak anlamına gelen “variolizasyon” adının verildiğinden bahsedilmektedir. (Plotkin and Plotkin, 2008).

1670 yılında, İstanbul'daki Türk sultanlarının haremde bulunan Kafkas kadınlarının güzelliklerine olan övgüden dolayı çocuklarına vücutlarının bir parçasını aşıladıkları ifade edilmektedir. Bu kadınların Osmanlı İmparatorluğu'na aşılamayı getirdikleri düşünülmektedir (Riedel, 2005).

Aşılanmanın XVIII. yy'ın başlarında ziyaretçiler tarafından İstanbul'dan Avrupa'ya taşındığı düşünülmektedir (Riedel, 2005). 1721 yılında İstanbul'a kendi oğlunu aşılatmak için geldiği kısa ziyareti sırasında aşılama tekniğinin nasıl uygulandığını öğrenen Lady Mary Wortley Montagu'nun, tekniği İngiltere'ye tanıttığı rapor edilmiştir (Plotkin and Plotkin, 2008).

1796 yılında ise Edward Jenner tarafından modern aşının temelleri olan çiçek aşısı geliştirilmiştir. Sığır çiçek hastalığıyla enfekte olan bir insana ait iltihaplı dokuyu bir başka insana vererek çiçek hastalığına karşı immun direnç oluştuğu ifade edilmektedir (Riedel, 2005).

İnek veya sığır kelimesi Latince’de “vacca”, sığır çiçek hastalığı ise “vaccinia” veya “vaksen” olarak adlandırılmaktadır. Jenner bu bilgilere dayanarak geliştirdiği yönteme “vaccination” yani “aşılama” (Riedel, 2005), aşıda kullandığı zayıflatılmış virüse ise “vaccine” yani “aşı” adını vermiştir (Owen et al., 2013).

Çiçek aşısından yaklaşık olarak 80 yıl sonra Louis Pasteur tarafından zayıflatılmış virüsün kullanılmasıyla kuduz aşısı geliştirilmiştir. Daha sonra sırasıyla tifo, kolera, veba, kızamık, kabakulak gibi bir çok hastalığa karşı da aşılar geliştirilmiş ve Çizelge 2.1’de günümüze kadar geliştirilen insan aşılarının kronolojik sırası verilmiştir (Plotkin, 2014).

Çizelge 2.1 İnsan aşılarının kronolojisi (Plotkin, 2014)

Canlı, Atenüe	Öldürölmüş Tüm Organizma	Protein veya Polisakkarit	Genetik Olarak Deęiştirilmiř
18. yy			
Çiçek Hastalığı (1798)			
19. yy			
Kuduz (1885)			
Tifo (1896)			
	Kolera (1896)		
	Veba (1897)		
20. yy (ilk yarısı)			
Tüberküloz (1927)	Boęmaca (1926)	Difteri toksoid (1923)	
Sarı humma (1935)			
	İnfluenza (1936)	Tetanoz toksoid (1926)	
	Tifüs (1938)		
20. yy (ikinci yarısı)			
Polio (oral) (1963)	Polio (eneksiyon) (1955)	řarbon salgılanan proteinler (1970)	Hepatit B rekombinant yüzey antijenleri (1986)
Kızamık (1963)			Laym OspA (1998)
Kabakulak (1967)	Kuduz (hücre kültürü) (1980)	Menigokok polisakkarit (1974)	Kolera rekombinant toksin B (1993)
Kızamıkçık (1969)	Japon ensafaliti (1992)	Pnömokok polisakkarit (1977)	
Adenovirüs (1980)	Kenelerle bulařan ensefalit (1981)	Haemophilus influenza tip B polisakkariti (1985)	
Tifoid (1989)	Hepatit A (1996)	Haemophilus influenza tip B konjugat (1987)	
Suçiçeęi (1995)	Kolera (WC-rBS) (1991)	Tifoid (Vi) polisakkarit (1994)	
Rotavirüs (1999)	Meningokokkal konjugat (1999)	Asellüler boęmaca (1996)	
Kolera (1994)		Hepatit B (plazma türevli) (1981)	
Soęuęa adapte edilmiş influenza (1999)			
21. yy			
Soęuęa adapte influenza (2003)	Japon ensafaliti (2009)	Pnömokokal konjugatlar (heptavalent) (2000)	Rekombinant İnsan papillomavirüsü (kuadriyalent) (2006)
Rotavirüs (2006)	Kolera (sadece WC) (2009)	Meningokokkal konjugat (kuadriyalent) (2005)	Rekombinant İnsan papillomavirüsü (bivalent) (2009)
Zoster (2006)		Pnömokokal konjugatlar (13-valent) (2010)	Meningokokkal grup B proteinleri (2013)

Aşılar geliştirilirken kullanılan yöntemlerde bir takım farklılıklar oluşmuş ve bu da aşıların sınıflandırılmasına neden olmuştur. Bu sınıflandırma Çizelge 2.2’de verilmiştir (Liljeqvist and Stahl, 1999; Ilchmann et al., 2014).

Çizelge 2.2 Aşıların Sınıflandırılması (Liljeqvist and Stahl, 1999; Ilchmann et al., 2014)

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

2.2 Aşı İmmunolojisi

Aşılamada “immun bellek” ve “bağışık yanıt” geliştirilmesi amaçlanmaktadır (Pier et al., 2004). Aşılar, enfeksiyonları taklit ederek bağışıklık geliştirmeye yardımcı olmaktadır. Bu tür taklit enfeksiyonların hastalığa neden olmadıkları belirtilmiştir. Fakat immun sistem tarafından, T lenositlerin (hücresel immun yanıt) ve antikorların üretilmesine (humoral immun yanı) neden oldukları gösterilmiştir. Aşılama sonrası aşılanan bireyin enfeksiyonla karşılaşması durumunda, oluşan immun bellek sayesinde vücut mikroorganizma ile nasıl savaştığını bilmektedir (CDC, 2013).

Aşı immünolojisini ya da aşının nasıl çalıştığını anlayabilmek için vücudun, bir enfeksiyona yol açan patojenle nasıl savaştığını anlamak gerekmektedir (CDC, 2013). Aşağıda patojene karşı gelişen immun yanıttan, bu immun yanıtı oluşturan hücre ve hücre ürünlerinden bahsedilmiştir.

2.2.1 Patojenlere Karşı Gelişen İmmun Yanıt

Patojenlerin saldırısına ve oluşturdıkları enfeksiyonlarına karşı korunmak için konak organizmadaki immün sisteme ait çeşitli organların veya hücrelerin ve bu hücrelere ait ürünlerin, patojenle ve birbirleriyle olan etkileşimlerine “immün yanıt” denmektedir (Pier et al., 2004; Madigan ve Martinko, 2010). İmmün yanıt, *doğal immün yanıt* ve *adaptif immün yanıt* olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

Doğal İmmün yanıt, bir patojenle daha önceden karşılaşmadan organizmada zaten bulunan hücrelerin ve ürünlerinin oluşturduğu immün yanıttır. Nötrofiller, makrofajlar, mast hücreleri, bazofiller, dendritik hücreler doğal immunitiyi oluşturan hücreler arasında yer almaktadır (Pier et al., 2004; Madigan ve Martinko, 2010).

Adaptif veya antijene özgü immün yanıt ise bir patojene ya da ürünlerine maruz kaldıktan sonra gelişen immün yanıtı denmektedir (Pier et al., 2004; Madigan ve Martinko, 2010). Bu yanıt sırasında antijen sunan hücreler üzerinde bulunan patojene ait antijenlerin tanınması sonrası organizmaya ait hücrelerce enfekte hücrelerin öldürülmesi veya sınırlandırılmasına “Hücreyel İmmün Yanıt” denilmektedir. Antikorların antijenleri nötralize etmesi veya parçalaması ise “Humoral İmmün Yanıt” olarak tarif edilmektedir (Madigan ve Martinko, 2010).

2.2.1.1 Hücreyel İmmün Yanıt

Vücuda giren patojenler, antijen sunan hücreler (APC, *Antigen Presenting Cell*) tarafından peptitlerine ayrılarak APC yüzeyinde bulunan başlıca doku uygunluk kompleksi (MHC, *Major Histocompatibility Complex*) ile T hücrelerine sunulmaktadır. T hücrelerinin yüzeyinde bulunan T-hücre reseptörü (TCR, *T-Cell Receptor*) ve glikoprotein koreseptörleri (CD4 ve CD8) MHC-antijeni (MHC-Ag) tanıyarak immün yanıtı başlatmaktadır (Pier et al., 2004; Madigan ve Martinko, 2010; Owen et al., 2013).

Antijen Sunan Hücreler (APC)

Myeloid öncül hücrelerden gelişen monositler; dokularda, dalakta ve lenf nodüllerinde bulunan makrofajlar ve dendritik hücrelerin öncülleridir. Bu hücrelere antijen sunan hücreler de (APC) denmektedir. Bu hücrelerin endositoz, pinositoz, fagositoz ve lenfositlere antijen sunma gibi rolleri bulunmaktadır.

Makrofajlar, dendritik hücreler ve B hücreleri APC'ler arasındadır (Pier et al., 2004; Madigan ve Martinko, 2010; Owen et al., 2013).

Başlıca Doku Uygunluk Kompleksi (MHC)

APC'ler patojenleri belirli işlemlerden geçirerek peptitlerine ayırdıktan sonra, yüzeylerinde bulunan MHC'lerle T lenfositlerine sunmaktadırlar. MHC'ler adını, organ transplantasyonu sırasında iki kişi arasındaki doku uyumu ya da reddi için başlıca hedef molekül olmasından almaktadır (Madigan ve Martinko, 2010; Owen et al., 2013). İnsanda bu moleküle ilk kez lökositlerde rastlanmasından dolayı insan lökosit antijeni (HLA, *Human Leukocyte Antigen*) adı verilmiştir. Farelerde ise Histokompatibilite-2 antijeni (H-2, *Histocompatibility-2*) adını almaktadır (Owen et al., 2013).

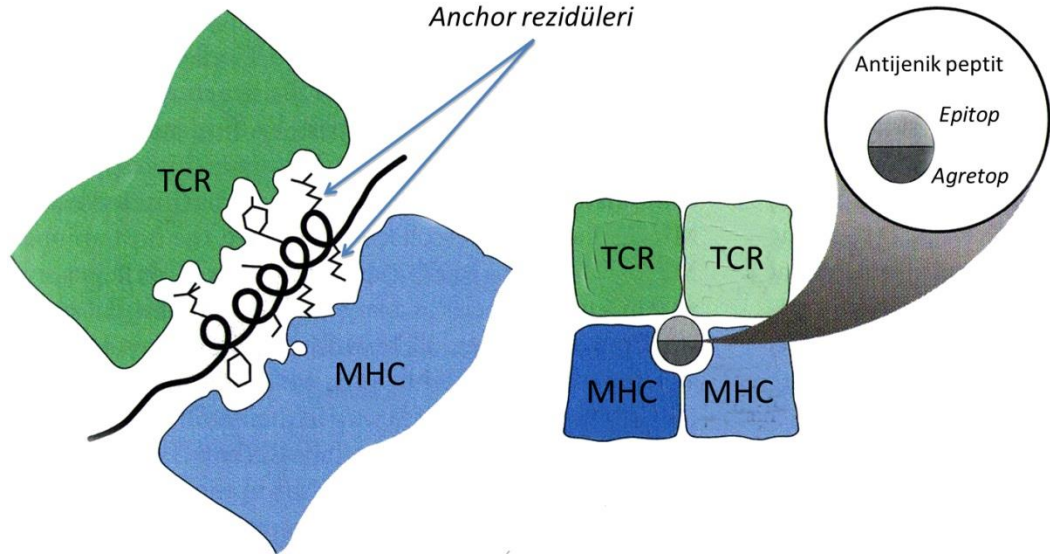
MHC moleküllerinin Sınıf-I MHC'ler (MHC-I) ve Sınıf-II MHC'ler (MHC-II) olmak üzere iki ayrı tipi bulunmaktadır. İki tip arasındaki fark ise eksprese edildikleri hücrelerin ve antijen sundukları T hücrelerinin farklı olmasından kaynaklandığı belirtilmektedir (Owen et al., 2013).

MHC-I molekülleri tüm çekirdekli hücrelerin yüzeyinde bulunmakta ve hücre içi antijenleri CD8 T lenfositlerine sunmaktadır (Owen et al., 2013). MHC-II molekülleri ise APC'ler olan B lenfositleri, makrofajlar ve dendritik hücrelerin yüzeyinde bulunurlar. Bu moleküller ise ekstrasellüler antijenleri CD4 T lenfositlerine sunarak immunitiyi uyarmaktadırlar (Madigan ve Martinko, 2010; Owen et al., 2013).

CD8 T lenfositleri intrasellüler parazitlere karşı hücresel immun yanıtta önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle CD8 T hücre yanıtı, ideal bir aşıda önem taşımaktadır (Tan et al., 2010). MHC-I molekülleri 8-10 aminoasit uzunluğa sahip kısa antijenik peptitleri yani epitoplara CD8 T lenfositlerine sunarak immun yanıtı uyarmaktadırlar (Feliu et al., 2013; Owen et al., 2013).

Peptitlerine ayrılmış olan antijenik proteinin iki yüzeyinden biri MHC molekülüne diğeri ise TCR molekülüne bağlanmaktadır. Antijenik peptidin MHC ile yüzleşen kısmına *agretop*, TCR ile yüzleşen kısmına ise *epitop* denmektedir. Ayrıca antijenik peptit üzerinde "*anchor rezidüleri*" denilen kısımlar bulunmaktadır. Bu rezidülere hem MHC molekülleri hem de TCR molekülleri bağlanmaktadırlar (Şekil 2.1.) (Pier et al., 2004). Anchor rezidüleri patojen

ökaryot ise antijenik peptidin glikozillenmesiyle oluşan oligosakkaritler ya da glikoproteinler de olabilmektedirler (Apostolopoulos et al., 2003).



Şekil 2.1 Antijenik peptidin MHC ile bağlandığı agretop, TCR ile bağlandığı epitop bölgeleri ve bu bölgelerdeki anchor rezidüleri (Pier et al., 2004).

Ökaryotik hücrelerde bir post-translasyonel modifikasyon olan protein glikozilasyonu ile proteine oligosakkaritler eklenmektedir. Başlıca N-bağlı ve O-bağlı olmak üzere iki tip glikozilasyon bulunmaktadır. Her iki tip glikozilasyonda proteinlerin katlanmasında, aktivitesinde, hücre-hücre veya mikroorganizma konak hücre interaksiyonunda önemli rol oynamaktadır (Luk, 2011; Roth et al., 2012).

N-bağlı glikozilasyon, asparajin aminoasidinin amid grubu ile GlcNAc (N-asetilglikozamin) arasında gerçekleşmektedir. Bu bağlantının gerçekleşebilmesi için asparajin-X-serin/treonin'den (N-X-S/T, X prolin dışında herhangi bir aminoasit olabilir.) oluşan korunmuş dizisinin bulunması gerekmektedir (Roth et al., 2012).

O-bağlı glikozilasyon ise serin ya da treonin aminoasidinin hidroksil grubu ile GalNAc (N-asetilgalaktozamin) şekeri arasında gerçekleşmektedir. N-bağlı glikozilasyonun aksine O-bağlı glikozilasyon için herhangi bir korunmuş dizinin bulunması gerekmemektedir (Roth et al., 2012).

Antijenik proteindeki farklı epitop bölgelerine farklı MHC molekülleri bağlanabilmektedir. Örneğin; farelerde 3 farklı MHC-I tipi bulunmaktadır. Bunlar K, D, L'dir ve H-2K, H-2D, H-2L genleri tarafından kodlanmaktadır.

İnsanlarda da HLA-A, HLA-B ve HLA-C olacak şekilde 3 farklı MHC-I geni bulunmaktadır (Pier et al., 2004).

MHC genleri biri anneden gelen haplotip, biri babadan gelen haplotip olacak şekilde iki allel seti halinde bulunmaktadır. İnsanlar gibi *outbred* populasyonlarda MHC lokusunda farklı alleller bulunmasından dolayı heterozigotluk bulunmaktadır. *Inbred* populasyonlardan farelerde ise anneden ve babadan gelen haplotiplerin identik olmasından kaynaklı H-2 lokuslarının homozigot olduğu belirtilmektedir (Owen et al., 2013).

Bugün 1.500'den fazla HLA alleli bilinmektedir. Bu polimorfik HLA molekülleri sadece epitopları hücrelere sunarak hücre ölümüne ya da sitokin salınımlarına neden olmamaktadırlar. Aynı zamanda kendinden olmayanı ayırt edebilen seçilmiş bir T-hücre repertuarı oluşturmaktadırlar. Kısa epitop dizileri aşı dizaynı için oldukça ilginç hedefler oluşturmaktadırlar. Bu yeni nesil yüksek verimli, düşük toksisiteli epitop kaynaklı aşılarda gelişimlerini sürdürmektedirler (Zhao et al., 2007).

Sonuç olarak MHC molekülleri hakkında detaylı bilginin bulunması “epitop kaynaklı aşılarda” önünü açmaktadır. Kısa bir epitop dizisi ile etkili bir immün yanıt oluşturulabilmektedir. Bu durum epitop kaynaklı aşılarda daha spesifik, daha güvenli ve kolay üretilebilmesine yol açmaktadır (Zhao et al., 2007).

T-Yardımcı Hücreler ile İmmün Sistemin Aktive Edilmesi

APC'ler, yabancı antijenleri fagositoz yoluyla alarak fagozoma yapışan lizozomlar ile antijenleri peptitlerine parçalamaktadırlar. Ayrıca mikroorganizmalar tarafından dış ortama salınan ekskretuar-sekretuar antijenleri de endositoz ile makrofaj içine almaktadırlar. Bu antijenik peptitler, MHC-II molekülleri ile hücre içinde birleşerek (MHC-II-Ag) hücre yüzeyine sunulmaktadır (Pier et al., 2004; Weiss and Kim, 2007; Gürüz ve Delibaş, 2007; Madigan ve Martinko, 2010).

Bu arada MHC-II-Ag içeren APC'yi saptayan T_H0 , hücre yüzeyinde bulunan CD3'ün gönderdiği bir sinyalle T_H0 hücresi aktifleşerek TCR ile MHC-II-Ag bağlanmaktadır [TCR-(MHC-II-Ag)]. Ayrıca T_H0 lenfositlerinin uyarımını hem de T hücreleriyle APC'ler arasındaki bağlanma afinitesini arttırmak amacıyla T hücrelerinin yüzeyinde bulunan CD28 reseptörü, APC üzerinde bulunan

CD80/86 ile uyarılmaktadır. Bunun yanında APC üzerinde bulunan CD40 reseptörü ile T hücrelerinin yüzeyinde bulunan CD40L ligantı etkileşime girerek APC üzerindeki CD80/86 ekspresyonunu arttırmakta ve T_H0 lenfositlerinin artarak farklılaşmasına yol açmaktadır. CD4 T_H0 hücre popülasyonunun farklılaşması T_H1 ve T_H2 hücreleri olmak üzere iki farklı grubun oluşmasına neden olmaktadır (Pier et al., 2004; Weiss and Kim 2007; Gürüz ve Delibaş, 2007).

Bu iki grup farklı tipte sitokin salgılamakta ve her sitokin oluşturduğu immün yanıtta da bir takım farklılıklar gözlemlenmektedir. T_H1 ; IL-2, IFN- γ ve Lenfotoksin- α (TNF- β) sitokinlerinin salgılanmasında ve T-Sitotoksik lenfositler, makrofajlar gibi hücrelerin aktifleşmesinde rol almaktadır. T_H2 ise IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 gibi sitokinlerin salgılanmasında ve ayrıca B hücrelerinin aktifleşmesi ile farklılaşmasından sorumlu olduğu belirtilmiştir (Owen et al., 2013).

CD4 T_H1 Hücreleri - Makrofaj Yanıtı

APC'den salgılanan IL-12, CD4 T_H0 hücrelerinde STAT1 ve STAT4'ün (*Signal Transducer and Activator of Transcription*; DNA'ya bağlanarak sitokin salgılanmasından sorumlu genlerin ekspresyonunu değiştiren moleküllerdir. Bu sayede T-Yardımcı hücrelerinin farklılaşmasını sağlamaktadırlar) aktivitelerini uyarmaktadır. STAT1 ve STAT4'ün aktivitesiyle T_H0 hücreleri, CD4 T_H1 'e dönüşmektedirler (Tamiya et al., 2011, O'Shea et al., 2011; Luckheeram et al., 2012). CD4 T_H1 hücreleri, IFN- γ salgılayarak makrofajları uyarmaktadırlar. Uyarılan makrofajlar INOS (uyarılabilir nitrik oksit sentaz; *Inducible Nitric Oxide Synthase*) üreterek mikroorganizmaların ölümüne sebep olmaktadır. Ayrıca makrofajlar IL-12 salgılayarak daha fazla CD4 T_H1 oluşmasına yol açıp immün yanıtı arttırmaktadırlar (Pier et al., 2004; Gürüz ve Delibaş, 2007).

CD4 T_H2 Hücreleri - B Hücre Yanıtı

İmmün yanıtlarından bir diğeri ise; APC'den salgılanan IL-4, CD4 T_H0 hücrelerinden STAT6'nın aktivitesini uyarmaktadır. STAT6 ise CD4 T_H0 hücrelerinin T_H2 hücrelerine dönüşmesini sağlamaktadır (Tamiya et al., 2011, O'Shea et al., 2011; Luckheeram et al., 2012). Dönüşen CD4 T_H2 hücreleri başlıca IL-4, IL-5 ve IL-13 salgılamaktadır (Tamiya et al., 2011). CD4 T_H2 hücreleri tarafından üretilen IL-4; B hücrelerinin farklılaşması ve antikor

üretiminde rol oynamaktadır. Ayrıca uyarılan B hücreleri insanlarda IgE ve IgG4 antikor, farelerde ise IgG1 antikor salgılamaktadır. Bu nedenle farelerde yapılan aşı çalışmalarında IgG1 artışı immun yanıtın CD4 T_H2 yönünde olduğunun dolaylı göstergesi olarak kabul edilmektedir (Weiss and Kim, 2007; Pier et al., 2004; Owen et al., 2013). IL-4 ise mast hücrelerinin çoğalmasını uyararak immun yanıtı arttırmaktadır (Pier et al., 2004). IL-5 eozinofillerin gelişimini, farklılaşmasını kontrol ederek konağın helminth parazitlerle savaşabilmesini sağlamaktadır (Pier et al., 2004; Owen et al., 2013). IL-13 de IL-4 gibi B hücre aktivitesinde ve farklılaşmasında görev almaktadır. Ayrıca B hücrelerinden IgE antikor üretimini uyarmaktadır (Owen et al., 2013).

T-Sitotoksik (T_C) Hücreler ile İmmun Sistemin Aktive Edilmesi

T-sitotoksik (T_C) hücreler, Sitotoksik T lenfositleri (CTL; *Cytotoxic T lymphocyte*) olarak da bilinmektedirler. T_C hücreleri MHC-I moleküllerinin sunduğu yabancı antijenleri tanımaktadırlar (Madigan ve Martinko, 2010).

İntrasellüler bir patojene ait endojen antijenler APC'deki proteozomlarca peptitlerine parçalanarak MHC-I molekülü ile sunulmaktadır (Pier et al., 2004). T hücre yüzeyinde bulunan CD3, gönderdiği bir sinyalle T_C hücrelerinin aktifleşmesini sağlayarak TCR'nin MHC-I-Ag kompleksiyle birleşmesini sağlamaktadır. Ayrıca T_C hücresindeki CD8 koreseptörü MHC-I ile birleşerek güçlü bir kompleks oluşturmaktadır. T hücre yüzeyinde bulunan CD28 reseptörü uyarımı daha da arttırmak amacıyla APC üzerindeki CD80/86 ile birleşmektedir. Ayrıca CD8 T_C hücresindeki FasL (Fas Ligandı), APC üzerindeki Fas reseptörü ile birleşerek APC'de apoptozisi (hücre ölümü) tetiklemektedir (Pier et al., 2004).

Uyarılan CD8 T_C hücrelerinden perforin (hedef hücrede porlar açarak hücrenin ozmotik yıkımına neden olan sitotoksik enzim), granzim (enfekte hedef hücrede kaspaz kaskadını uyararak apoptozisi başlatan serin proteaz enzimi; perforin etkisiyle oluşan porlardan hücre içine girmektedir) ve IFN- γ salgılanmaktadır. Artan IFN- γ APC'de iNOS salgılanmasını sağlayarak mikroorganizmaların ölümüne sebep olmaktadır (Pier et al., 2004; Weiss and Kim, 2007; Gürüz ve Delibaş, 2007; Madigan ve Martinko, 2010).

Doğal Katil (Natural Killer, NK) Hücre Yanıtı

Doğal Katil (NK, *Natural Killer*) hücreler intrasellüler patojenlere karşı savunmada özelleşmiş lenfositlerdir (Medzhitov, 2007). NK hücreler MHC-I-Ag uyarıcısı olmadan bir takım aktive edici reseptörlerle hedef hücreyi tanıyarak yok etmektedirler. Bu yüzden adları “Doğal Katil” hücrelerdir. MHC-I moleküllerinin normal seviyelerini gösteren hücreleri öldürmezler. Ancak MHC-I seviyesi azalan, artan ya da hiç olmayan hücreleri yok ederler. Hedef hücreyi yok ederken perforin, granzim salgılamaktadırlar. Böylece hedef hücre lizis ya da apoptozis ile yok edilmektedir (Madigan ve Martinko, 2010; Vivier et al., 2011)

2.2.1.2 Humoral İmmun Yanıt

Humoral immün yanıtın primer efektör hücresi B lenfositleridir. B hücrelerinin aktivasyonu için iki farklı yol bulunmaktadır. Aktive olan B hücreleri ya plazma hücrelerine ya da bellekli B hücrelerine (*memory B cells*) farklılaşmaktadırlar (Pier et al., 2004).

Bu yollardan ilkinde B hücreleri APC’ler gibi iş görmektedirler. Patojenlere ait antijenler B hücre yüzeyinde bulunan BCR’lere (B hücre reseptörü, *B-cell receptor*) bağlanıp endositozla içeri alınmakta ve ardından B hücre yüzeyindeki MHC-II ile T_H2 hücrelerine sunulmaktadır. T_H2 hücrelerinin aktive olarak ürettikleri sitokinler B hücrelerini uyararak, B hücrelerin antijene spesifik antikor üretimini yapan plazma hücrelerine dönüşerek IgM üretilmelerini sağlamaktadır. Antijenle ikinci kez karşılaşmalarında ise IgM hariç diğer antikorları (IgG, IgA, IgD ve IgE) üreten bellekli B hücrelerine dönüştürmektedir (Pier et al., 2004; Madigan ve Martinko, 2010).

Bu yollardan ikincisinde ise APC hücreleri CD4 T_H hücrelerine bağlanıp B lenfositlerini uyararak bu hücrelerin plazma hücrelerine ve bellekli B hücrelerine dönüşmesini sağlamaktadır (Pier et al., 2004; Madigan ve Martinko, 2010).

B hücreleri tarafından salgılanan ilk antikorlardan biri IgM’dir. IgM’nin primer immün yanıt için önemli olmasının sebebi ise IgG ile birlikte kompleman sistemi klasik yoldan aktive edip membran atak kompleksini (MAC, *Membrane attack complex*) oluşturmasıdır. MAC hedef hücrenin membranında büyük porlar açarak hücreyi lizise götürmektedir. Ayrıca IgM, antikor-patojen kompleksi

oluşturarak patojenin makrofajlar tarafından yutulmasını sağlamaktadır (Pier et al., 2004).

B hücreleri tarafından üretilen, kompleman sistemi için önemli olan bir diğer immunoglobulin ise IgG'dir. IgG'nin insanlarda IgG1, IgG2, IgG3 ve IgG4, farelerde de IgG1, IgG2a, IgG2b ve IgG3 olacak şekilde 4 alt grubu bulunmaktadır. IgG antikorları virüslere ya da bakteriyel toksinlere direkt bağlanarak inaktive etmektedir (Pier et al., 2004; Owen et al., 2013).

IgG alt gruplarının hepsi kompleman sistemi aktive edememektedir. İnsanlarda IgG1 ve IgG3 klasik komplemanı aktive edebilmek ve makrofajların bağlanabilmesini sağlayabilmek için birlikte çalışırken farelerde bunu sadece IgG2a yapabilmektedir. Ayrıca farelerde IgG1 ve IgE immun sistemde önemli rolü olan mast hücrelerinin patojene bağlanabilmesini sağlarken insanlarda bunu yalnızca IgE yapabilmektedir (Pier et al., 2004).

Farelerde IgG1 antikor yanıtı T_H2 immun yanıtını, IgG2a ise T_H1 yanıtının uyarıldığını göstermektedir. T_H1 immun yanıtı makrofaj aktivasyonunu, IgG2a üretimini ve IFN- γ , IL-12 ve TNF üretimini stimüle etmektedir. IgG2a ise diğer antikorlarla birlikte kompleman sistemini aktive etmektedir. T_H2 immun yanıtı ise B hücrelerinden IgG1 antikorlarının üretimini stimüle etmekte, ayrıca IL-4, IL-5 ve IL-10'nun salınımını uyarmakta ve makrofaj aktivitesini azaltmaktadır (Petersen et al., 1998).

2.3 *Toxoplasma gondii* Hakkında Genel Bilgi

1980 yılında Levine et al. tarafından *Toxoplasma gondii*'nin sınıflandırılması yapılmıştır (Kuman ve Altıntaş, 1996).

Phylum : Protozoa
 Subphylum : Apikomplexa
 Classis : Sporozoa
 Subclassis : Coccidia
 Ordo : Eucoccidiida
 Subordo : Eimeriina
 Familia : Sarcocystidae
 Genus : *Toxoplasma*
 Species : *gondii*

T. gondii ilk kez Nicolle ve Manceaux tarafından 1908 yılında tanımlanmıştır. Nicolle ve Manceaux bu paraziti ilk defa *Ctenodactylus gundi* adlı Kuzey Afrika kemirgeninde saptamışlardır. *T. gondii* adını morfolojik yapısı (*tox*: yay; *plasma*: yaşam, görüntü) ve bulunduğu kaynağın adından (*C. gundi*) yola çıkarak almıştır (Weiss and Kim, 2007; Weiss and Dubey, 2009).

İnsanlarda ilk kez 1923 yılında Prag'lı bir oftalmolog olan Janku tarafından bir bebeğin retinasında kistlerin bulunması ile saptanmıştır. Türkiye'deki ilk insan olgusu ise Unat, Alyanak ve Şahin tarafından 1953 yılında saptanmıştır (Kuman ve Altıntaş, 1996). 1972 yılında Ankara'daki bir vakada konjenital toxoplazmozisli bir hastanın Beyin-Omurilik sıvısından parazit izole edilmiş ve izole edilen suşa Ankara suşu adı verilmiştir (Döşkaya et al., 2013).

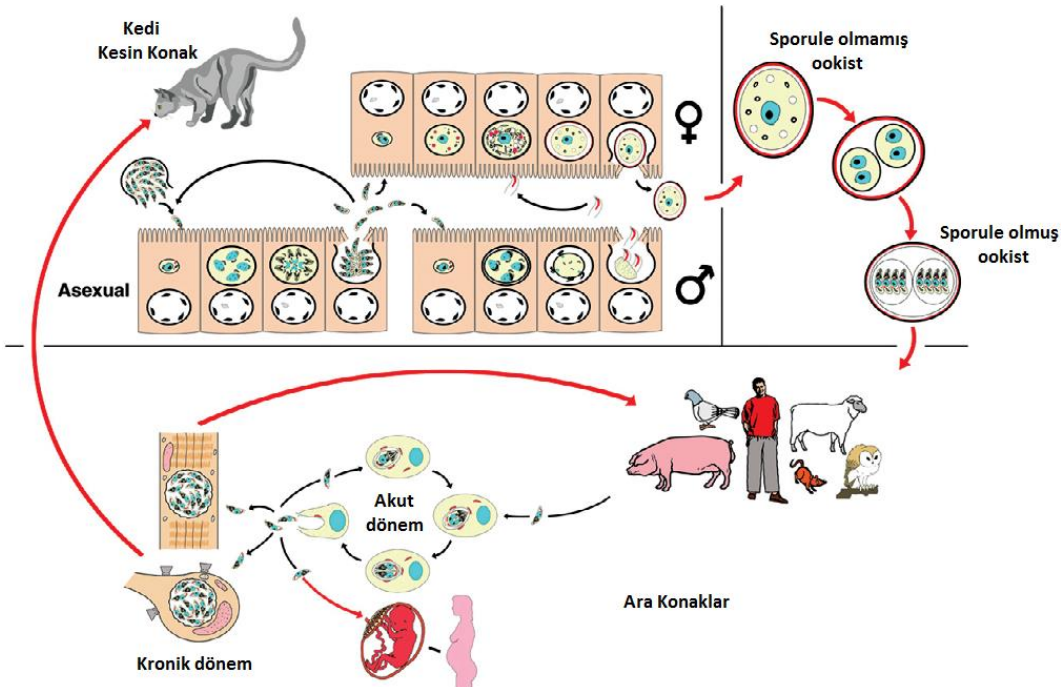
2.3.1 Morfolojisi ve Yaşam Döngüsü

T. gondii tüm sıcakkanlı hayvanları ve kuşları enfekte edebilen bir zorunlu hücre içi parazittir (Nabi et al., 2014). *T. gondii* yaşam döngüsü (Şekil 2.2) boyunca 3 farklı enfektif form şeklinde bulunmaktadır. Bunlar; akut enfeksiyon boyunca görülen takizoit, kronik enfeksiyonda görülen bradizoit (doku kisti oluşturur) ve çevreye yayılmış halde bulunan içinde sporozoitleri barındıran ookist formudur. Takizoitler ve bradizoitler aseksüel üreme sonucu haploitken (n kromozom sayısı), sadece seksüel üreme sonucu oluşan diploit, ookistler ($2n$ kromozom sayısı) mayoz geçirerek haploit sporozoitleri oluşturmaktadır (Sibley et al., 2009)

Ookist; sadece kesin konak olan kedinin ince bağırsağında oluşan formdur. Eşeyli üreme ile 10-12 μm çapında oval ookistler oluşmaktadır. Kedi dışkısı ile dış ortama atılan bu ookistler enfektif değildirler. 1-21 gün içinde dış çevrenin ısı ve oksijen miktarına bağlı olarak sporule olarak enfektif hale gelmektedirler. Enfektif hale gelen ookistlerin içinde $6 \times 8 \mu\text{m}$ boyutlarında iki tane sporokist bulunmaktadır. Her bir sporokist 4 adet sporozoit içermektedir. Sporozoitlerin ise takizoitlere farklılaştığı ve buradan çoğalarak diğer dokulara dağıldığı belirtilmektedir. Ookistlerin nemli toprakta 18 ay boyunca canlı kalabildiği ve akut enfeksiyon sırasında 7-21 gün süresince 10 milyon kist/gün atılabildiği belirtilmiştir. Bu sebeple ookistler, dolayısıyla kediler enfeksiyonun yayılmasında en önemli yerde bulunmaktadır (Montaya and Liesenfeld, 2004; Dubey, 2010).

Takizoit; genellikle hilal şeklinde ve $2 \times 6 \mu\text{m}$ boyutlarında, parazitin hızlı çoğalan, ara konakların nükleuslu hücrelerinde görülen formdur. Takizoitler aktif penetrasyon, fagositoz ya da kimyasal etkileşim ile hücre içine girmektedir. Hücre içine girdikten sonra parazitofor vakuolu (PV) ile kendisini çevreleyerek konak immun sisteminden korunduğu belirtilmektedir. Daha sonra burada sürekli çoğalıp konak hücreyi patlatarak komşu hücreleri işgal ettikleri, bir kısmının ise fagosite edilerek kan ve lenf yoluyla sinir sistemi, göz, iskelet, kalp kası ve plasenta gibi dokulara yayıldığı belirtilmektedir. Bu dokulardaki takizoitler konak immun sisteminden korunabilmek için bradizoitlere dönüşerek aktif enfeksiyondan kronik enfeksiyonu başlatan doku kistlerine dönüşmektedirler (Dubey et al., 1998; Montaya and Liesenfeld, 2004).

Bradizoit ve Doku kistleri; enfeksiyonun başlamasında ortalama 14 gün sonra hücre içinde bulunan takizoitlerin konak immun sisteminin baskısından dolayı daha yavaş bölünen bradizoitlere dönüşmesiyle oluşmaktadır. Doku kistlerinin çapı $5\text{-}20 \mu\text{m}$ aralığında ve içlerinde ortalama 1000-3000 kadar bradizoit bulundurabilmektedirler. Bradizoitler ara konaklarda konak immun sistemine bağlı olarak takizoitlere dönüşerek reaktivasyona neden olabilmektedir (Dubey et al., 1998).



Şekil 2.2 *T. gondii* yaşam döngüsü (Ferguson, 2004)

T. gondii'nin kompleks bir yaşam döngüsü vardır. *T. gondii*'nin kedi veya kedigiller dışında sıcakkanlılar (ara konaklar) olmak üzere iki farklı yaşam döngüsü bulunmaktadır. Bu yaşam döngüleri arasında ise iki farklı geçiş bulunmaktadır (Şekil 2.2'deki kırmızı oklar parazitin konaklar arasındaki geçişini, siyah oklar ise konak içi gelişimini göstermektedir.). İlkinde kesin konak kedilerde oluşan ookistlerin yutulmasıyla, diğerinde ise kronik olarak enfekte olan ara konaklarda oluşan doku kistlerinin yutulmasıyla gerçekleşmektedir. Kesin konak olan kedilerdeki seksüel gelişim ile ince bağırsak epitelinde ookist gelişmekte ve dış ortama atılmaktadırlar. Ookistler uygun çevre koşullarında sporule olarak su ve besinlerle (iyi yıkanmamış, pişmemiş ya da az pişmiş sebzeler) ara konak tarafından alınarak enfeksiyon gerçekleşmektedir. *T. gondii* ara konaklarda (fare, koyun, keçi, insan, kuş) sadece aseksüel olarak çoğalmaktadır. Takizoitlerin oluşturduğu akut enfeksiyonu, bradizoitlerin oluşturduğu kronik enfeksiyonu takip ederek ara konağın beyin ve kas dokusunda kist formuna dönüşmektedir. Bu doku kistlerinin yutulması enfeksiyonu diğer etobur ara konaklara veya kedilere bulaştırmaktadır. Ayrıca gebelik sırasında geçirilen akut enfeksiyon sırasında parazitin plasentayı geçerek fetüsü da enfekte edebildiği bildirilmiştir (Ferguson, 2004).

2.3.2 Toksoplazmozis

T. gondii memelileri ve kuş türlerini enfekte edebilen bir zoonotik protozoondur. Oluşturduğu hastalığa “toksoplazmozis” adı verilmektedir. Hayvanlarda toksoplazmozis dünya çapında büyük ekonomik öneme sahiptir. Çünkü toksoplazmozis çiftlik hayvanlarında keçi ve koyunlarda düşüklere ya da ölü doğumlarına neden olmaktadır. Hayvanların etlerinde bulunan doku kistlerinin alınmasıyla (pişmemiş ya da az pişmiş etlerin yenmesiyle) insanları da enfekte etmektedirler (Beghetto et al., 2005).

İnsanlarda bulaş, genelde kedi dışkısı ile atılan ookistlerle kontamine olmuş su veya besinlerin alımı, doku kisti içeren az pişmiş ya da çiğ etlerin yenmesi (domuz, koyun, keçi, geyik) ile gerçekleşmektedir (Aramini et al., 1999; Aspinall et al., 2002; Arisue and Hashimoto, 2014).

Bir başka bulaş yolu ise organ transplantasyonlarında oluşmaktadır. Enfekte donörden alınan kalp, akciğer, böbrek, karaciğer, pankreas gibi organların nakilleri sırasında enfeksiyonun alıcıya bulaştığı bildirilmektedir. Konjenital toksoplazmozis ise, gebelik sırasında enfekte olan anneden plasenta yoluyla

bebeğe *T. gondii*'nin bulaşmasıdır. Erken dönemlerde oluşan enfeksiyonlar bebeklerin ölümüne ya da düşüklerin oluşmasına neden olmaktadır. Geç dönemlerde oluşan enfeksiyonlar ise hasarın daha az oluşmasına ya da %85 oranında erken doğum riski ile sonuçlanmaktadır (Montaya and Liesenfeld, 2004).

Toksoplazmozis immün sistemi sağlam kişilerde genellikle asemptomatik olarak ilerlemektedir. Bu kişilerde hafif ateş, baş ağrısı, halsizlik gibi belirtiler görülmektedir. Çok seyrek olarak hastalarda ağır tablolar gözlemlenmektedir (Montaya and Liesenfeld, 2004; Gürüz ve Delibaş, 2007). İmmün sistemi baskılanmış veya immün yetmezliği olan kişilerde (AIDS hastaları, Hiper IgM sendromu olan kişiler, kanser tedavisi gören kişiler, immün sistemi baskılayan ilaçlar kullanan transplant hastaları) hayatı tehdit eden, tedavi edilmeyen kişilerde ise ölümle sonuçlanan durumlara yol açmaktadır (Montaya and Liesenfeld, 2004; Dupont et al., 2012).

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda toksoplazmozisin kişilik bozuklukları ya da davranışların değişmesi gibi bir takım psikolojik bozukluklara/anomolilere yol açtığı da rapor edilmektedir. Yapılan bir araştırmada enfekte farelerin davranışlarını değiştirerek parazitin ana konağı olan kediye aktarılma olasılığını arttıran, av olmasına neden olacak davranışlar sergilediği gözlemlenmiştir. Toksoplazmozisin yayılmasındaki kilit faktör kediler olarak görülmektedir. Kedilerin insanlarla olan yakın ilişkileri ve dışkılarında bulunan ookistler çevreyi ve insanları kontamine etmede önemli role sahip olduğu düşünülmektedir (Garcia et al., 2014).

2.3.3 *T. gondii* Enfeksiyonuna Karşı Gelişen İmmün Yanıt

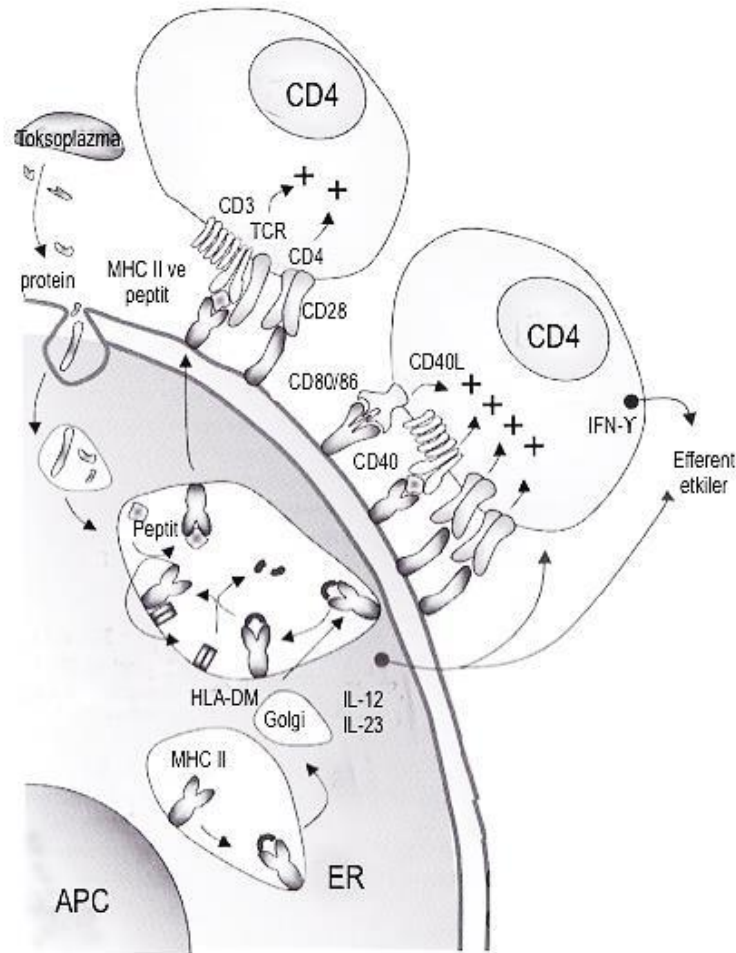
Konakta *T. gondii*'nin yol açtığı enfeksiyona karşı konağı parazitin patolojik etkilerinden koruyan hem hücresel hem de humoral immün yanıt uyarılmaktadır. Gelişen immün yanıttan dolayı takizoitler kendini korumak için bradizoite dönüşerek kist içinde saklanmaktadır (Denkers, 2003).

Hem parazitik enfeksiyonu engellemek hem de ookistlerin oluşmasından kaynaklı re-enfeksiyonun önüne geçebilmek için yapılan aşı çalışmalarında oluşan immün yanıtın detayları çok büyük önem taşımaktadır.

T. gondii enfeksiyonunun kontrolünde görevli en önemli immün yanıt elemanları CD4 T_H hücreleri, CD8 T_C hücreleri ve B hücrelerdir. T hücreleri hem

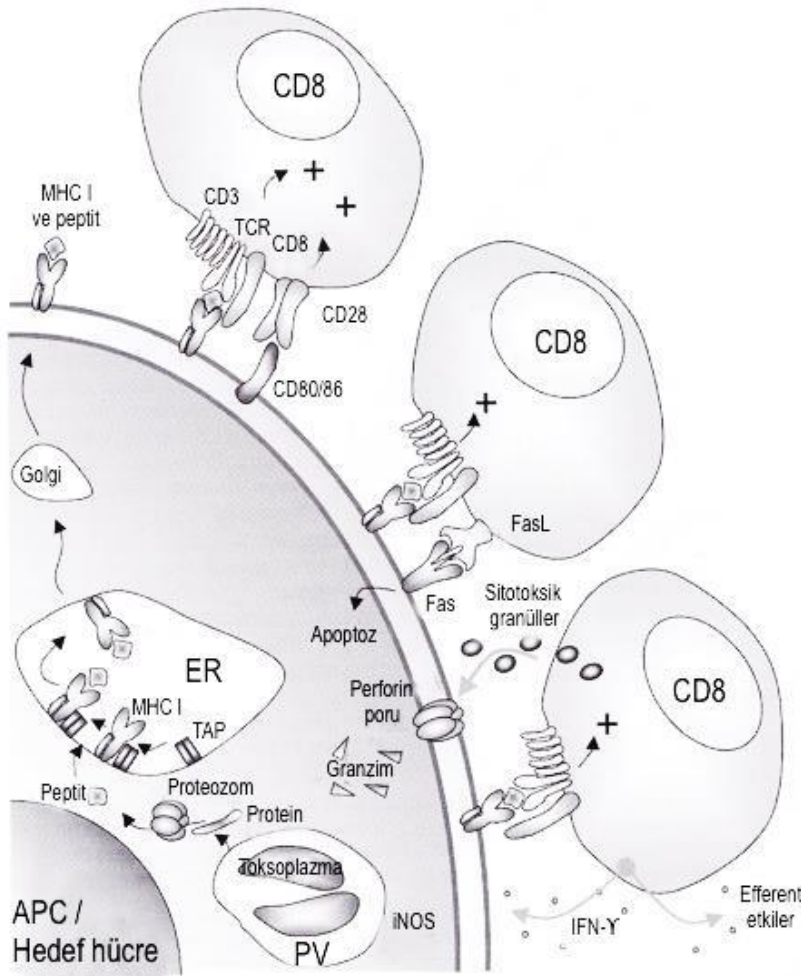
enfeksiyonun yayılmasının engellenmesi hem de immun yanıtın oluşması aşamalarında büyük önem taşımaktadır (Pier et al., 2004).

Fagositoz ile APC içine alınan *T. gondii* antijenleri işlendikten sonra MHC-II ile birleşerek hücre yüzeyinde sunulmaktadır (Şekil 2.3). T hücre yüzeyinde bulunan CD3 koreseptörü ile uyarılan CD4 T_H0 hücreleri TCR-(MHC II-Ag) kompleksi oluşturmak için aktifleşmektedir. Aynı zamanda T hücre yüzeyinde bulunan CD28 reseptörü ile APC yüzeyinde bulunan CD80/86 ile bağlanarak T_H0 uyarımını arttırmaktadır. Ayrıca APC üzerinde bulunan CD40 ile de T hücrelerinde bulunan CD40L reseptörü birleşerek bu uyarımı arttırmaktadır. APC'den salgılanan IL-12 T_H0 hücrelerinin T_H1 hücrelerine dönüşmesini sağlamaktadır. CD4, T_H1 hücrelerinden salgılanan IFN- γ , makrofajları ve NK (*Natural Killer*, Doğal katil hücreler) hücrelerini uyararak hücresel immun yanıtı aktifleştirmektedir. Uyarılan makrofajlar ayrıca IL-12 salgılayarak daha fazla CD4 T_H1 oluşmasını sağlayıp hücresel immun yanıtı güçlendirmektedir (Weiss and Kim, 2007).



Şekil 2.3 *T. gondii*'ye karşı oluşan CD4 T lenfosit immun yanıtı (Weiss and Kim, 2007)

T. gondii'ye ait endojen antijenler ya da parazite ait yüzey proteinleri proteozomlar tarafından peptitlere parçalanarak MHC-I ile hücre yüzeyine sunulmaktadır (Şekil 2.4). T hücre yüzeyindeki CD3'ün gönderdiği sinyalle T_C hücreleri aktifleşerek TCR-(MHC-I-Ag) kompleksini oluşturmaktadır. T_C hücrelerinde bulunan CD8 koreseptörü MHC-I'e tutunarak güçlü bir kompleks oluşturmaktadır. T hücre yüzeyinde bulunan CD28 reseptörü uyarımı daha da arttırmak amacıyla APC'deki CD80/86 ile birleşmektedir. Uyarılan CD8 T_C hücrelerden perforin ve granzim gibi APC için sitotoksik moleküller salgılamaktadır. Aynı zamanda CD8 T_C hücrelerinden salgılanan IFN- γ , APC'den iNOS salgılanmasını uyarak mikroorganizmaların ölümüne neden olmaktadır. CD8 T_C hücrelerindeki FasL, APC üzerindeki Fas ile birleşerek APC'de apoptozu tetiklemektedir (Pier et al., 2004; Filisetti and Candolfi, 2004; Weiss and Kim, 2007).



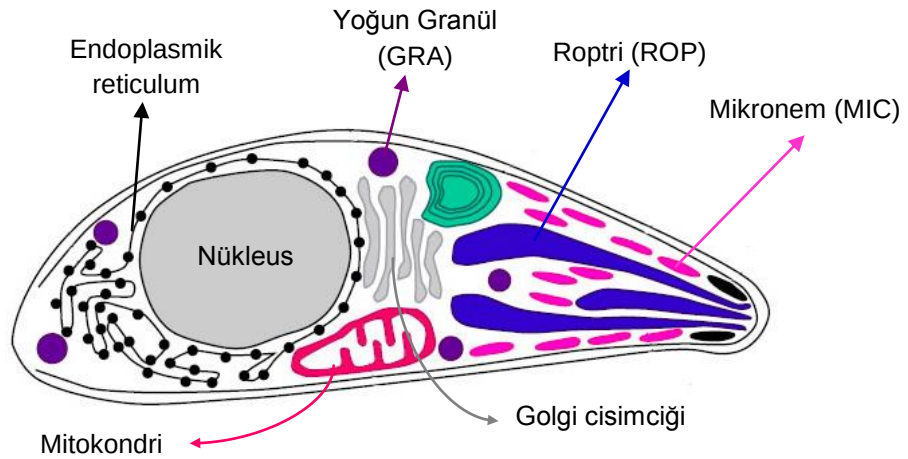
Şekil 2.4 *T. gondii*'ye karşı oluşan CD8 T lenfosit immun yanıtı (Weiss and Kim, 2007)

T. gondii'ye karşı gelişen humoral immün yanıtta ise enfeksiyondan sonraki ilk haftada yani akut dönemde farklılaşan plazma hücreleri tarafından üretilen ilk antikor IgM'dir. Bu immunoglobülin kompleman sistem için en iyi aktivatördür. IgG ve alt grupları ise toksoplazmoziste görülen ikinci antikordur. Bu antikor da ya kompleman sistemin aktivasyonu ile hücreyi sitolizise ya da antikor-bağımlı sitotoksositeye (ADCC, *Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity*) neden olarak makrofajların veya polinükleer hücrelerin aktivasyonuna neden olmaktadır. Sonuç olarak antikor ekstrasellüler takizoitlerin lizisinde, kompleman sistemin aktifleşerek takizoitlerin çoğalmasının engellenmesinde, makrofajları aktive ederek fagositozun artmasında görev almaktadırlar (Filisetti and Candolfi, 2004).

Tüm bu immün sistem yanıtları göz önüne alındığında, *T. gondii*'ye karşı geliştirilen koruma sağlayacak bir aşının CD4 T_H1 ve özellikle IFN- γ salgılayan CD8 T_C lenfositleri uyarması beklenmektedir (Gülçe İz et al., 2014).

2.3.4 *T. gondii*'ye Ait Antijenik Proteinler

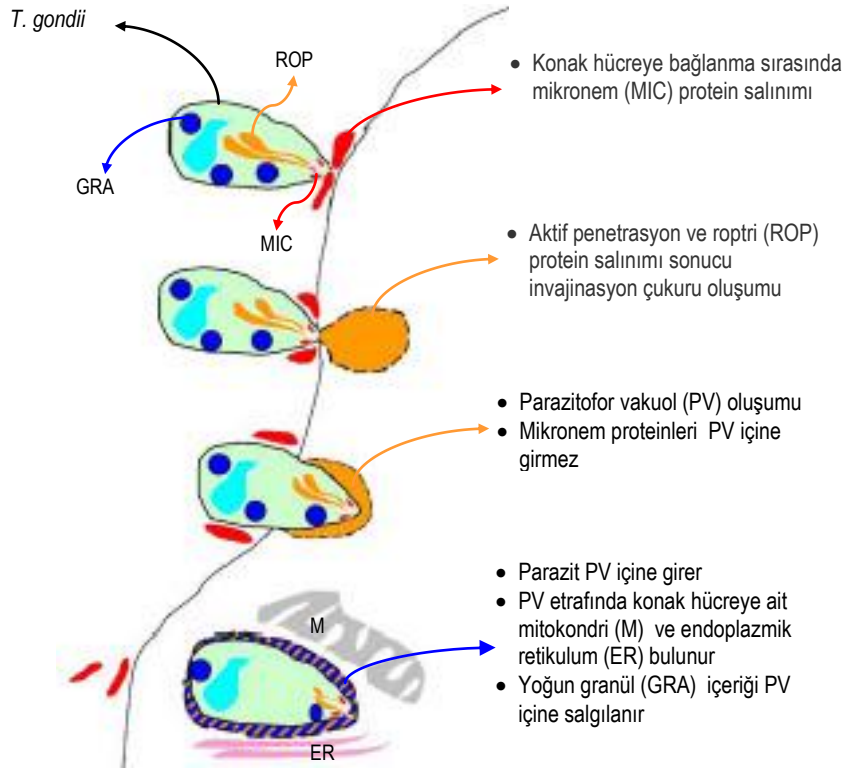
Bir aşının gelişimindeki en önemli aşama immün sistem uyarmada rol alan moleküllere odaklanmaktır (Liu et al., 2006). Genel olarak çalışmalarda bu moleküllerin/proteinlerin salınımından sorumlu 3 ana organelle odaklanılmaktadır. Bunlar mikronem, roptri, yoğun granüllerdir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 *T. gondii* takizoit (Ajioka et al., 2014)

Bunların içinde mikronem proteinleri konak hücreye tutunmada, parazitin invazyonunun en erken aşamasında görev almaktadır. Roptri proteinleri invazyon boyunca salınmakta ve parazitofor vakuol (PV) oluşturarak konak hücrenin

endosom/lizozomlardan gelecek lizozomal enzimlerinden korunmasını sağlamaktadır. Yoğun-granül proteinleri ise PV ortamını modifiye ederek parazitin çoğalması ve intrasellüler yaşamı için PV'nin oluşumu sırasında ve sonrasında PV içine salgılanmaktadır (Şekil 2.6) (Weiss and Kim, 2004; Ajioka et al., 2014).



Şekil 2.6 *T. gondii* takizoitinin konak hücreye invazyonu (Kim, 2004)

Yapılan çalışmalarda, immün yanıtın oluşmasına neden olan genellikle 4 ana antijenik protein ailesi üzerine odaklanılmaktadır. Bunlardan bilinen/tanımlanan antijenler yüzey antijenleri (SAG, *surface antigen*), mikronem antijenleri (MIC, *microneme antigen*), roptri antijenleri (ROP, *rhopty antigens*) ve yoğun granül ekskretuar-sekretuar antijenleri (GRA, *dense granule excreted-secreted antigen*) olarak gösterilmektedir (Beghetto et al., 2005).

T. gondii üzerinde yer alan yüzey antijenleri (SAG), konak hücreye ilk tutunmayı gerçekleştiren proteinlerdir. Bu proteinler *T. gondii*'nin konak hücreye ait ligandlara tutunması ve invazyonun en erken aşamalarında rol almaktadır. *T. gondii*'ye ait yüzey antijenlerin (SAG) süperailesinde 5 adet protein rapor edilmektedir. Bunlar SAG1, SAG2 (22 kDa), p23, p35 ve SAG3 (45kDa) olarak gösterilmektedir (Liu et al., 2006). Bu proteinler içinde en iyi karakterize edilen SAG1 proteinidir. Tüm *T. gondii* suşlarında korunmuş, yüksek miktarda antikor

uyarabilen ve takizoitlerdeki ana yüzey antijeni olarak gösterilmektedir. Bu yüzden özellikle DNA aşısı çalışmalarında, tanı çalışmalarında SAG1 geni veya SAG1 proteini tercih edilmektedir (Liu et al., 2006; Wang and Yin, 2014).

Konak hücreye bağlanma, tutunmada görevli bir diğer protein grubu ise mikronem proteinleridir (MIC). Bu proteinlerin konak hücreyle teması sonrası bol miktarda salgılandığı belirtilmektedir. Bu proteinler genellikle transmembran proteinlerdir. Bu proteinlerden MIC2 konak hücreye tutunmada ve parazitin hareketinde görev almaktadır. MIC1, MIC6 ve MIC4 parazitin invazyonunda hücre içi virulanslığında rol oynamaktadır. MIC8 ve MIC3 parazitin kayma hareketinden ve invazyonun tamamlanmasından sorumlu proteinler olarak gösterilmektedir. AMA1 proteini ise konak hücreye tutunmada görev almaktadır. Yokluğunda parazitin konak hücreye tutunmasında, hareketinde ve roptri proteinlerin salgılanmasında eksiklikler görülmektedir (Sheiner et al., 2010).

Tanımlanan ROP proteinlerinden ROP2, ROP3, ROP4 ve ROP7 antijenik proteinleri PV membranının konak hücre tarafında kalacak şekilde yerleşerek konak ve parazitin biyokimyasal etkileşiminde rol almaktadır. Takizoitin konak hücreye penetrasyonundan sonra PV form değiştirip yeni bir forma dönüşmektedir. Bu sırada takizoitte GRA1, GRA2, GRA3, GRA4, GRA5 ve GRA6 olmak üzere birçok GRA antijenik proteinleri salgılanmaktadır. GRA proteinlerinin salgılanması ve PV modifikasyonu konak hücre sitoplazması tarafından parazitin yabancı olarak görülmemesine ve bu durumda parazitin çoğalmasına neden olmaktadır (Dubey et al., 1998).

Ookistler enfeksiyonun yayılmasında kilit rol oynamaktadır. *T. gondii* ookistlerinin uygulanan dezenfektanlara, UV ışınlarına diğer coccidian parazitlerine göre daha dayanıklı olduğu gösterilmektedir. Fakat bu dayanıklılığın sebebi bilinmemektedir. Ookist duvarı çok katmanlı olup, sporozoitlerin gelişmesi için gerekli gaz değişimlerine izin verecek yapıdadır. Ookistte tanımlanan antijenik proteinler ookist duvarında gözlenmektedir. Ookist duvarında sentezlenen proteinler TgOWP1, TgOWP2, TgOWP3, TgOWP4, TgOWP5, TgOWP6 ve TgOWP7 olarak bildirilmiştir (Posenti et al., 2010).

Takizoitlerin bradizoite dönüşmesini sağlayan aynı zamanda mitokondriyal inhibitörler, makrofajlardan salınan Nitrik Oksit (NO) gibi paraziti stres unsurlarından koruyan HSP30 (Isı şok proteini, *Heat shock protein*,) olarak da bilinen BAG1 antijenik proteinin varlığı *T. gondii* için önem taşımaktadır. Ayrıca

iyi bir aşı adayı olarak da gösterilmektedir (Dubey et al., 1998). Bradizoite özgü MAG1, SAG2D, SAG2C, SAG4, BSR4, LDH2, ENO1 ve p-ATPaz proteinleri de aşı adayı olarak gösterilen proteinlerdir. Doku kisti formuna özgü tanımlanan CST1 ve MAG1 antijenik proteinleri de aşı adayı olarak gösterilmektedir (Lyons et al., 2002; Cristina et al., 2004).

Şu ana kadar *T. gondii*'ye karşı koruyucu bir aşı geliştirememiştir. Bunun nedenlerinden bir de yapılan aşı denemelerinin sadece tanımlanan antijenik proteinlerle sınırlı olmasından kaynaklanmaktadır (Leclerc, 2003). Aşı çalışmalarında kullanılacak olan yeni/farklı antijenik proteinlerin koruyucu bir aşının geliştirilmesine olanak sağlayabileceği düşünülmektedir. *T. gondii*'de toplam 43.010 ekzona ait 8.155 protein kodlanmaktadır (Liang et al., 2011). Rekombinant protein aşılarının ya da DNA aşılarının geliştirilmesinde karşılaşılan en büyük zorluk, antijenik proteinlerin seçimidir. *T. gondii* genomu düşünüldüğü zaman etkili bir immün yanıt oluşturabilecek antijen/lerin saptanmasında protein mikroyarray taraması gibi ileri teknikler gerekmektedir (Davies et al., 2005).

2.4 Aşı Adayı Antijenik Proteinlerin Belirlenmesi

Aşı geliştirmede en kritik nokta antijen keşfi ve doğru antijenin kullanılmasıdır (Leclerc, 2003). İlk aşı çalışmalarında *T. gondii* eriyik proteini ya da organizmanın ölü/zayıflatılmış olarak tamamı kullanılmıştır. Gelişen teknolojiyle yeni antijenik proteinler belirlenmektedir. Bu çalışmalar arasında başta rekombinant protein/DNA teknolojileri, biyoinformatik yöntemler, mikroyarray teknolojileri gelmektedir (Henriquez et al., 2010; Liang et al., 2011; Correia et al., 2014; Garcia et al., 2014).

Bu yöntemlerden geliştirilen “*epitop tabanlı aşılar*” biyoinformatik yöntemlerin kullanılarak patojenin genomunda bulunan antijenik proteinlerin üzerindeki epitop bölgelerinin seçimine dayanmaktadır (Correia et al., 2014).

Bu yönteme benzer bir başka yaklaşım ise protein mikroyarray kullanılarak gerçekleştirilen high-throughput (yüksek işlem hacimli) antijen keşfi yöntemidir. Bu yöntemde de patojenin genomunda antijenik olabilecek proteinler seçilmektedir. Son yapılan çalışmalardan birinde *T. gondii* 43010 ekzonu biyoinformatik yöntemlerle incelenmiş ve aşı hedefi olarak 1387 gene ait 2870 ekzon seçilmiştir. Eksonların eksprese ettiği rekombinant proteinler mikroyarray taramasında insan serumları ile karşılaştırılmış ve *T. gondii*'ye karşı aşı

çalışmalarında koruyucu olabilecek IgG ile bağlanan 186 ve IgM ile bağlanan 108 adet hedef antijen belirlenmiştir (Liang et al., 2011, Felgner et al., 2015).

2.5 Toksoplazmozise Karşı Geliştirilen Aşı Çalışmaları

T. gondii'ye karşı yapılan ilk aşı çalışmaları 1980'li yılların başına dayanmaktadır (Dubey, 2008). *T. gondii* S48, TS-4 ve T-208 mutant suşları aşı adayı olarak tanımlanmıştır. S48 canlı suşundan elde edilen ToxovaxTM (Schering-Plough Animal Health Ltd, Yeni Zelanda) aşısı lisans alarak, ticari kullanıma sunulan tek toksoplazmozis aşısıdır (Bhopale, 2003; Hıszczyńska-Sawicka et al., 2014). Bu canlı aşı mutasyona uğratılarak bradizoit olma özeliğini kaybetmiş suştur. Fakat yine de canlı olması ve re-enfeksiyona neden olabilmesinden dolayı insanlarda kullanılmamaktadır (Innes et al., 2009).

Canlı aşı dışında aşı çalışmalarında immunojenik parazit ekstraktları, antijenik proteinleri kodlayan DNA'lar ve rekombinant proteinler kullanılmıştır.

İmmunojenik protein ekstraktlarının kullanıldığı aşılar da parazitin takizoit formunun (Doğal enfeksiyonlarda parazitin konak hücreye girme anından itibaren immun sistemi en çok uyaran antijenlerin takizoit formunda bulunmasından dolayı takizoit formu tercih edilmiştir) ekstraktının kullanılmasıyla elde edilen bir aşı türüdür. Fakat canlı/zayıflatılmış aşılar kadar başarılı olunamamıştır (Bruna-Romero et al., 2012; Hıszczyńska-Sawicka et al., 2014).

Stanley et al. (2004) yaptığı çalışmada *T. gondii* takizoitlerini nanopartiküller içinde kapsülleyerek mukozal aşılama stratejisiyle koyunlara vermişlerdir. Koyunlar intranasal yoldan aşılanmış ve ookistlerle enfekte edilmişlerdir. Sonuçta hem hücresel hem de güçlü mukozal IgA antikor yanıtları gözlenmiştir. Buna karşın korunma gözlenmemiştir (Hıszczyńska-Sawicka et al., 2014).

Parazit ekstrakt aşılarında, verilen ekstrakt içinde immun sistem aktivatörlerini ortadan kaldıran ya da baskılayan farklı hücresel yapıların da veriliyor olunması bu aşıların yeteri kadar koruyucu olmamasının nedeni olarak düşünülmektedir (Bruna-Romero et al., 2012).

Zayıflatılmış aşılar immun sistemi baskılanmış ya da immun sistem yetmezliği bulunan kişilerde virülant forma dönerek hastalığa neden

olabilmektedirler. İnaktive edilmiş patojenin tamamının kullanıldığı aşılar ise reaktojenik bileşenleri içerebileceği için istenmeyen yan etkiler yaratabilmektedir. Bu yüzden aşı çalışmalarında yeni yaklaşımlar denenmeye başlanmıştır. Bunlar rekombinant protein aşıları, DNA aşıları ve sentetik peptit aşı çalışmalarıdır (Singh and O'Hagan, 1999).

Son 5 yıla ait deneysel aşı çalışmaları araştırıldığı zaman %52'sini DNA aşı çalışmalarının, %36'sının rekombinant protein aşı çalışmalarının, %9'unun zayıflatılmış aşı çalışmaları ve %3'ünü ise heterolog aşı çalışmalarının oluşturduğu görülmektedir (Lim and Othman, 2014). Bunun sebebi ise DNA aşılarının üretilmesinin kolaylığı ve özellikle hücresel immun yanıtı uyarmasındandır.

2.5.1 *T. gondii*'ye Karşı Geliştirilen DNA Aşıları

Wolff et al. (1990) yılında ilk kez çıplak DNA'yı memeli kas hücrelerine enjekte ederek protein ekspresyonunu sağlamıştır (Crampton and Vanniasinkam, 2007). DNA aşıları, hedef olarak seçilen antijenik proteini kodlayan gen bölgesinin uygun bir vektöre yerleştirilerek konak hücreye verilmesiyle oluşturulmaktadır. DNA aşılarının en önemli avantajı verildiği hücrede T_H1 veya T_H2 immun yanıtları oluşturmalarıdır (Hiszczynska-Sawicka et al., 2014). Toksoplazmoze karşı yapılan DNA aşılarının enfeksiyonu sınırlayabilmek için IFN- γ ve IL-2 sitokinleri üreterek genelde T_H1 yanıtı oluşturduğu gözlenmiştir (Lim and Othman, 2014).

DNA aşılarının en büyük dezavantajı ise farelerde yeterli immun yanıt oluştururken primatlar ve insanlarda genellikle yeterli immun yanıt oluşturamamasıdır (Bruna-Romero et al., 2012; Lim and Othman, 2014). Bunun nedeni üretilen antijen miktarının azlığına, verilen plazmit DNA'nın hücrelere düzensiz dağılımına ve immun yanıtın yeterince uyarılamamasına bağlanmaktadır (Bruna-Romero et al., 2012). Bu sorunları ortadan kaldırmak için kodon optimizasyonu, sitokinlerin koekspresyonu, moleküler adjuvantların ya da adjuvant gibi immunomodülatör moleküllerin formüle edilerek mikropartikül/lipozom içinde verilmesi, çoklu antijenlerin kullanılarak aynı anda verilmesi gibi stratejiler test edilmektedir (Bruna-Romero et al., 2012; Lim and Othman, 2014).

T. gondii'ye karşı geliştirilen DNA aşısı çalışmaları Çizelge 2.3'te özetlenmiştir.

Vercammen et al. (2000) *T. gondii*'nin bradizoit ve takizoit formlarına özgü antijenleri kullanarak formla sınırlı korumayı ortadan kaldırmayı hedeflemiştir. Çalışma sonucunda ise immün yanıtta uyarılma ve korunma sürelerinde uzama olduğunu rapor etmiştir.

Hem hücresel hem de humoral yanıtı uyarabilmek için *T. gondii*'ye ait farklı formlara özgü 6 antijenik epitopun kullanıldığı multi-epitop DNA aşısında güçlü bir immün yanıtın uyarıldığı belirtilmiştir.(Liu et al., 2009).

Khosroshahi et al. (2011) SAG1 ve ROP2 proteinlerini kodlayan plazmitleri kullanarak kokteyl bir DNA aşısı oluşturmuştur. Her forma özgü ayrı antijenik proteini kullanmaktansa, her formda salgılanan antijenlerin kullanıldığı kokteyl bir DNA aşısının korunmayı arttırdığını belirtmiştir. Yaptığı çalışmayla oluşan korunmanın oldukça yükseldiğini rapor etmiştir.

Bradizoit formuna özgü antijenlerin kullanıldığı bir başka multivalan aşısı çalışmasında, toksoplazmozis enfeksiyonu sırasında bradizoit formunun esas rol oynadığını düşünerek bu forma özgü SAG2C, -2D, -2X, -2Y antijenleri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda immün yanıtta uyarılma ve kronik enfeksiyona karşı korunma gözleldiği rapor edilmiştir (Zhang et al., 2013).

İlgi çekici araştırmalardan bir tanesi ise *T. gondii*'nin takizoit formuna özgü SAG1, GRA1, ROP2, GRA4 ve ayrıca bradizoit formuna özgü SAG2C ve SAG2X proteinlerinin epitop bölgelerini içeren bir multi-epitop DNA aşısı çalışmasıdır. Bu çalışmada güçlü immün uyarılma ve yüksek oranda korunma sağlandığı belirtilmiştir. (Cong et al., 2014).

Son yıllarda toksoplazmozise karşı yapılan DNA aşısı çalışmalarında kullanılmak üzere birçok farklı/yeni antijenlerle çalışılmaktadır. Bu çalışmalarda da immün yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama ve beyin kistlerinde azalmalar saptanmıştır (Zhang et al., 2013; Chen et al., 2013a; Chen et al., 2013b; Gong et al., 2013; Zhang et al., 2014; Hassan et al., 2015).

Çizelge 2.3 *T. gondii*'ye karşı geliştirilen DNA aşıları

Aşı adayları	Adjuvant	Aşılama Yolu	Sonuçlar	Yazar	Yıl
SAG1 kodlayan plazmit	-	i.m.	% 80–100 koruma	Nielsen et al.	1999
SAG1 kodlayan plazmit	-	i.m.	Beyin kistlerinde % 71 azalma	Angus et al.	2000
GRA1, GRA7, ROP2 kodlayan plazmitler	-	i.m.	Değişik gruplarda fare yaşam oranı % 50–90	Vercammen et al.	2000
ROP2 kodlayan plazmit	-	i.m.	2 gün fazla korunma	Leyva et al.	2001
SAG1 ve ROP2 kodlayan plazmitler	-	i.m.	Kokteyl aşı uygulanan farelerde 9–12 gün yaşam süresi	Fachado et al.	2003
GRA1 kodlayan plazmit	-	i.m.	RH suşuna karşı % 75–100 korunma	Scorza et al.	2003
SAG1 kodlayan plazmit	-	i.m.	Beyin kistleri azalırken, Materno-fötal bulaşı engellemede başarısız	Couper et al.	2003
HSP70, HSP30 ve SAG1 kodlayan plazmitler	-	g.t./i.m./i.p.	En iyi kısmi koruma HSP70 ile sağlanmıştır	Mohamed et al.	2003
MIC3 kodlayan plazmit	pGM-CSF	i.m.	Beyin kistlerinde % 67–74 azalma	Ismael et al.	2003
SAG1/2 kodlayan plazmit	Vet L-10	i.p.	Enfeksiyon sonrası yaşam oranı % 73	Yang et al.	2004
BAG1 ve MAG1 kodlayan plazmit	-	i.m.	Beyin kistlerinde % 62 azalma	Nielsen et al.	2006
GRA1 kodlayan plazmit, rGRA1 proteini	Provax	i.m.	rGRA1 protein aşısı GRA1 kodlayan DNA aşısına göre daha iyi	Döşkaya et al.	2007
GRA1, GRA7 ve ROP2 kodlayan plazmit karışımı	-	i.m.	Akut toxoplazmozise karşı % 89 koruma, beyin kistlerinde azalma	Jongert et al.	2007
ROP2 kodlayan mikobakteriyel ekspresyon plazmiti	-	s.c.	Kontrol grubuna göre ölüm zamanında gecikme	Wang et al.	2007
MIC2, M2AP, AMA1, BAG1 kodlayan plazmitler	-	g.t.	Kısmi korunma (% 12,5-60 aralığında değişen koruma)	Dautu et al.	2007
SAG1 ve ROP2 kodlayan plazmitler	IL-12	i.m.	RH suşuna karşı belirgin korunma	Zhang et al.	2007
GRA1 ve GRA7 kodlayan plazmitler	-	i.d.	Belirgin immun yanıt uyarılmış (humoral ve hücrel)	Jongert et al.	2008
MIC6 kodlayan plazmit	-	i.m.	Korunma zamanında uzama	Peng et al.	2009
MIC3 kodlayan plazmit	-	i.m.	Korunma zamanında uzama	Fang et al.	2009
GRA1, GRA2, GRA4 ve SAG1 kodlayan plazmit	CpG-ODN	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma, %40-100 korunma	Liu et al.	2009
SAG1 eksprese eden baculovirus	-	i.m.	Korunma zamanında uzama	Fang et al.	2010
GRA7 kodlayan plazmit	Lipozom	i.m.	Belirgin immun yanıt uyarılmış	Hiszczynska et al.	2010
MIC8 kodlayan plazmit	-	i.m.	RH suşuna karşı korunmada uzama	Liu et al.	2010
SAG1 kodlayan plazmit	IL-18	i.m.	RH suşuna karşı % 60 korunma	Liu et al.	2010
SAG2 eksprese eden influenza ve adenovirüs	-	i.n.	Beyin kistlerinde %85 azalma	Machado et al.	2010
i.m.: İntramuskuler, kas içine; i.p.: İntraperitoneal, periton içine; s.c.: Subkutan, derialtına; i.n.: İntranazal, burun içine; i.o.: İntraoral, ağız içine; i.d. İntradermal, deri içine; g.t.: Gen tabancası					

Çizelge 2.3 *T. gondii*'ye karşı geliştirilen DNA aşılı (devam)

Aşı adayları	Adjuvant	Aşılama Yolu	Sonuçlar	Yazar	Yıl
HSP70 kodlayan plazmit	-	g.t.	İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama	Kikumura et al.	2010
Rop16 kodlayan plazmit	-	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama	Yuan et al.	2011a
ROP18 kodlayan plazmit	-	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama	Yuan et al.	2011b
RON4 kodlayan plazmit ve rRON4 proteini	Freund	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma olmasına rağmen korunma sağlanamamış	Rashid et al.	2011
SAG1 ve ROP2 kodlayan plazmit	-	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama	Khosroshahi et al.	2011
HSP70 kodlayan plazmit	-	g.t.	İmmun yanıtta uyarılma ve kist sayısında azalma	Makino et al.	2011
TgPLP1 kodlayan plazmit	IL-18	i.m.	Korunma zamanında uzama	Yan et al.	2011
GRA6 kodlayan plazmit	Levamisole	i.m.	Kısmi koruma (%53,3)	Sun et al.	2011
TgIMP1 kodlayan plazmit	-	i.m.	Korunma zamanında uzama	Cui et al.	2012
SAG1 ve MIC3 kodlayan plazmit	-	i.m.	Korunma zamanında uzama	Fang et al.	2012
GRA1 ve SAG1 kodlayan plazmit	-	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma, RH suşuna karşı korunmada uzama	Wu et al.	2012
GRA7 ve ROP1 kodlayan plazmit	IL-12	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma, kist sayısında azalma ve korunma zamanında uzama	Quan et al.	2012
ROP13 kodlayan plazmit	IL-18	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama, kistlerde azalma	Wang et al.	2012
SAG1 ve 14-3-3 proteini kodlayan plazmit	-	i.m.	Korunma zamanında uzama	Meng et al.	2012
SAG1 ve GRA2 kodlayan plazmit	pSPreS2	i.m.	RH suşuna karşı kısmi koruma	Zhou et al.	2012
TgAMA1 kodlayan plazmit ve adenovirüs vektörü	-	i.p.	Beyin kistlerinde %23 azalma, %50 korunma	Yu et al.	2012
TgROM1 kodlayan plazmit	-	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama	Li et al.	2012
TgPLP1 ve MIC6 kodlayan protein	IL-18	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma, Beyin kistlerinde %65,43 azalma	Yan et al.	2012
ROP8 kodlayan plazmit	-	i.m.	Korunma zamanında uzama	Parthasarathy et	2013
SAG1 Ve SAG3 kodlayan plazmit	CTXA ₂ /B	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma, %40 korunma	Cong et al.	2013
GRA4 kodlayan plazmit ve GRA4 sentetik peptit	-	i.m.	%40 korunma	Meng et al.	2013
MIC13 kodlayan plazmit	-	i.m.	Korunma zamanında uzama, %57.14 beyin kistlerinde azalma	Yuan et al.	2013
MIC11 kodlayan plazmit	-	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma, RH suşuna karşı korunma zamanında belirgin uzama	Tao et al.	2013
TgCDPK3 kodlayan plazmit	-	i.m.	Korunma zamanında uzama, %50 beyin kistlerinde azalma	Zhang et al.	2013
SAG2C, SAG2D ve SAG2X kodlayan plazmit	-	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma, beyin kistlerinde %77 azalma	Zhang et al.	2013
i.m.: İntramuskuler, kas içine; i.p.: İntraperitoneal, periton içine; s.c.: Subkutan, derialtına; i.n.: İntranazal, burun içine; i.o.: İntraoral, ağız içine; i.d.: İntradermal, deri içine; g.t.: Gen tabancası					

Çizelge 2.3 *T. gondii*'ye karşı geliştirilen DNA aşılırları (devam)

Aşı adayları	Adjuvant	Aşılama Yolu	Sonuçlar	Yazar	Yıl
eIF4A kodlayan plazmit	-	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama	Chen et al.	2013a
TgIF2 α kodlayan plazmit	-	i.m.	Korunma zamanında uzama, %44,1 beyin kistlerinde azalma	Chen et al.	2013b
TgCyP kodlayan plazmit	-	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında %37,5 uzama	Gong et al.	2013
Katepsin B ve L benzeri proteini kodlayan plazmit	-	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama	Zhao et al.	2013a
Aspartik proteaz 1 kodlayan plazmit	-	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama	Zhao et al.	2013b
MIC8 kodlayan plazmit	IL-12	i.m.	Korunma zamanında uzama	Zhao et al.	2013c
SporoSAG kodlayan plazmit	Bcl-xL	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma (humoral ve hücresele)	Gölçe İz et al.	2014
ROP16 ve GRA7 kodlayan plazmit	B7-2		İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama	Liu et al.	2014
ROP9 kodlayan plazmit	-	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama	Chen et al.	2014
MIC8 kodlayan plazmit	mIL-21 mIL-15	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma, %63,8 beyin kistlerinde azalma	Li et al.	2014
TgCDPK5 kodlayan plazmit	-	i.m.	Korunma zamanında uzama, %40 beyin kistlerinde azalma	Zhang et al.	2014
SAG5D kodlayan plazmit		i.m.	İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama	Lu et al.	2014
TgDPA kodlayan plazmit	-	i.p.	İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama	Hassan et al.	2014
SAG1, GRA1, ROP2, GRA4, SAG2C, SAG2X epitoplarını kodlayan plazmit	-	i.n/ i.p / i.o	Her üç yolla aşılamada, immün yanıtta uyarılma ve korunma zamanında uzama (en fazla korunma zamanında uzama %60 ile intraoral yolla)	Cong et al.	2014
ROP38 kodlayan plazmit	-	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma, %76,6 beyin kistlerinde azalma	Xu et al.	2014
TgGST kodlayan plazmit	-	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama	Hassan et al.	2015
i.m.: İntramuskuler, kas içine; i.p.: İntraperitoneal, periton içine; s.c.: Subkutan, derialtına; i.n.: İntranazal, burun içine; i.o.: İntraoral, ağız içine; i.d.: İntradermal, deri içine; g.t.: Gen tabancası					

2.5.2 *T. gondii*'ye Karşı Geliştirilen Rekombinant Protein Aşıları

Rekombinant protein aşıları, enfeksiyona neden olan mikroorganizmanın bir kısmını kullanarak koruyucu bir immun yanıt oluşturmaya amaçlamaktadır (Hansson et al., 2000). İmunojenik özellikteki antijenleri kodlayan gen bölgelerinin izole edilerek patojenik olmayan vektör sistemlerinde (bakteri, maya, virüs, böcek ve memeli hücreleri) üretilmesi stratejisine dayanmaktadır (Andersson, 2000).

Rekombinant protein teknolojisiyle üretilen ilk aşı Hepatit B virüsüne karşı yapılarak 1986 yılında lisanslanmıştır. Major yüzey antijeni (HBsAg) mayada (*Saccharomyces cerevisiae*) başarıyla üretilmiş ve aşı olarak kullanılmıştır (Andersson, 2000).

Rekombinant protein aşılarının önemli avantajları bulunmaktadır. Bunların içinde en önemlisi patojenin toksik bileşiklerinden kaynaklanan risklerin olmamasıdır (Liljeqvist and Stahl, 1999). Enfeksiyona neden olan patojenin sadece bir kısmının kullanılarak immun yanıtın oluşturulabilmesi, üretim ve saflaştırma aşamalarının değiştirilip tekrar düzenlenmesiyle yüksek verimle büyük ölçekli üretilmesi de rekombinant protein aşılarının avantajları arasındadır. Tüm bunların arasında en büyük dezavantajı ise immun sistemi uyaran antijenik rekombinant proteinin tek başına yeterli olmaması ve tekrarlayan dozların yanı sıra adjuvant kullanımına ihtiyaç duyulmasıdır (Andersson, 2000; Hansson et al., 2000).

Rekombinant protein üretiminde önem taşıyan adımlardan biri hedeflenen antijenik proteini kodlayan gen bölgesinin düzenlenmesi aşamasıdır. Güçlü immun yanıt oluşturan minimum DNA parçasının seçilerek ekspresyon vektörüne yerleştirilmesi gerekmektedir. Bu parça içerisinde toksik peptitleri kodlayan kısımların olmamasına dikkat edilmelidir (Andersson, 2000).

Düzenlemeler yapıldıktan sonra vektör ekspresyon sistemine aktarılmaktadır. Bu aşamada diğer aşamalar kadar önem taşımaktadır. Ekspresyon sistemi olarak bakteri, maya, virüs, böcek veya memeli hücreleri seçilebilmektedir. Ekspresyon sisteminin seçiminde hedef proteinin biyolojik ve biyokimyasal özellikleri, post-translasyonel modifikasyonlarının gerekliliği, ekspresyon seviyesi ve salgılama şekli, proteolitik stabilitesi, üretim maliyeti gibi faktörler önem taşımaktadır (Andersson, 2000; Hansson et al., 2000).

Bakteriyel ekspresyon sistemleri daha fazla tercih edilmektedir. Bunun nedeni kolay ve yüksek seviyede ekspresyon sağlaması buna karşın ucuz olmasıdır. *Escherichia coli* (*E. coli*) en çok kullanılan genetik ve fizyolojik olarak iyi tanımlanmış olan hücrelerdendir (Andersson, 2000).

Ökaryotik ekspresyon sistemleri arasında ise *Saccharomyces cerevisiae* (*S. Cerevisiae*) adlı maya da sıklıkla kullanılmaktadır. Son yıllarda *Pichia pastoris* adlı mayanında kullanımı artmaktadır. Bu maya hücreleri fosforilasyon ve glikozilasyon gibi bazı ökaryotik sistemlerine benzer post-translasyonel modifikasyonları gerçekleştirmektedir. Bakteriyel sistemlerde olduğu gibi maya hücrelerinde de ekspresyonda verim yüksek ve maliyet düşüktür (Hansson et al., 2000).

Böcek hücrelerinin kullanıldığı ekspresyon sistemlerinde, memeli ekspresyon sistemlerine göre üretilen protein miktarının daha fazla olması önemli bir avantajdır. Ancak maliyeti bakteri ve maya ekspresyon sistemlerine göre daha fazla olup, sonuçlar daha uzun sürede alınmaktadır. Memeli ekspresyon sistemlerinde ise glikozilasyon, fosforilasyon ve yağ asit zincirleri gibi post-translasyonel modifikasyonlar yüksek performansla gerçekleşmektedir. Buna rağmen yüksek maliyet, zaman isteyen işlerden dolayı çok yaygınlaşmamışlardır (Andersson, 2000).

Sonuçta rekombinant protein aşısının oluşturulup geliştirilmesini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Aynı şekilde *T. gondii*'ye karşı geliştirilmeye çalışılan rekombinant protein aşılarında da benzer zorluklar bulunmaktadır. Bunlardan ilki *T. gondii*'nin ökaryotik bir organizma olmasından dolayı aşıda kullanılmaya aday birçok proteini, glikoproteini ve lipoproteini bulunması ve bu durumda protein seçimini zorlaştırmasıdır. Ayrıca *T. gondii*'nin yaşam döngüsü boyunca immün sistemi uyaran farklı formları bulunmaktadır. Formlardan birinde bulunan antijen diğer bir formda etkili olmamakta ya da salgılanmamaktadır. Bu durumda aşının etkinliğini etkilemektedir. Karşılaşılan bir diğer zorluk ise doğada *T. gondii*'nin birçok suşunun bulunması ve her suşun patojenitesinin diğerlerinden farklılık göstermesidir. Aynı şekilde antijenik proteinlerin sekansları da birbirlerine göre değişkenlik göstermektedir. Bu durumda bir suşa karşı yapılan aşının diğer suşu da etkilemesi olasılığını azaltmaktadır (Nabi et al., 2014).

Tüm bu zorluklara rağmen *T. gondii* 'nin moleküler ve hücre içi biyolojisinin anlaşılması, son yıllarda yapılan parazitin hücre içi bileşenlerine dayalı aşılarda gelişmesine ivme kazandırmıştır (Lim and Othman, 2014).

T. gondii 'ye karşı yapılan rekombinant protein aşı çalışmaları Çizelge 2.4'de özetlenmiştir.

Golkar et al. (2007) parazitin yaşamsal faaliyetleri ve virulanslığı açısından önemli olan rGRA2 ve rGRA6 proteinleri kullanarak multivalan aşı geliştirmeyi amaçlamıştır. Aşı uygulaması sonrası immün yanıtta uyarılma ve beyin kistlerinde azalma saptanmıştır.

T. gondii 'ye karşı yapılan multi-antijenik rekombinant protein aşı çalışmalarından birisinde rROP2 (+) rGRA4 (+) rSAG1 protein karışımı ile rROP2 (+) rROP4 (+) rGRA4 ve rROP2 (+) rROP4 (+) rSAG1 protein karışımları kullanılmıştır. Bu proteinlerin parazitin üç enfektif (takizoit, bradizoit ve sporozoit) formunda da yer aldığı belirtilmiştir. Yapılan çalışmada beyin kistlerinde azalma olduğu belirtilmiştir (Dziadek et al., 2012).

T. gondii 'ye ait AMA1, RON2 ve RON4 antijenik proteinleriyle yapılan aşı çalışmasında, epitop bölgeleri seçilerek multi-epitop aşı oluşturulmuştur. *T. gondii* 'nin konak hücreyi enfekte etme aşamasında ve parazitin kayma hareketinde görev alan proteinleri hedef aldıklarını belirtmişlerdir. Aşılama ile immün yanıtta uyarılma saptandığı rapor edilmiştir (Zhang et al., 2015).

Gelişen teknoloji, hücre biyolojisi ve immunolojisinin daha iyi anlaşılması rekombinant protein ya da rekombinant alt ünite aşılalarının gelişmesine yol açmaktadır. Böylece patojene ait küçük bir kısmın kullanılmasıyla tüm patojenin oluşturduğu immün yanıtı yakın/benzer immün yanıt oluşturulabilmektedir. Patojenin küçük kısımlarının ya da antijenik kısımlarının kullanılması aşının güvenilirliğini de arttırmaktadır (Andersson, 2000). Son zamanlarda yapılan aşı çalışmalarında multi- antijenik protein formülasyonlarının kullanılması tek protein kullanılan çalışmalardan daha iyi korunma ve sonuç verdiği belirtilmektedir (Lim and Othman, 2014).

Aşı adayları	Ekspresyon Sistemi	Adjuvant	Aşılama Yolu	Sonuçlar	Yazar	Yılı
rSAG1 proteini	<i>E. coli</i>	Alum	i.p.	İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama	Petersen et al.	1998
rSAG1 proteini	<i>E. coli</i>	IL-12	i.p.	İmmun yanıtta uyarılma, beyin kistlerinde % 40 azalma	Letscher Bru et al.	1998
rGRA1 proteini	<i>M. bovis</i>	Freund	i.p.	İmmun yanıtta uyarılma, farelerde korunma zamanında uzama, koyunlarda ise kısmi korunma	Supply et al.	1999
rSAG1 proteini	<i>P. pastoris</i>	SBAS1	s.k.	Konjenital bulaştan % 48 koruma	Haumont et al.	2000
rSAG1, rSAG2, rSAG3, rSRS1, rP54 proteinleri ve karışımı	<i>E. coli</i>	Freund	i.p.	Beyinde kist oluşmadı, korunma zamanında %17 uzama	Mishima et al.	2001
rSAG1 proteini	<i>E. coli</i>	-	s.k.	İmmun yanıtta uyarılma, konjenital bulaşta %50 azalma	Letscher Bru et al.	2003
rGRA4, rROP2 proteinleri ve karışımı	<i>E. coli</i>	Alum	i.m.	GRA4 ile beyin kistinde azalma	Martin et al.	2004
rROP2-Hsp83 füzyon proteini	<i>E. coli</i>	-	ayak tabanı	İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama	Echeverria et al.	2006
rGRA2, rGRA6 proteinleri ve karışimleri	<i>E. coli</i>	MPL	s.k.	İmmun yanıtta uyarılma, GRA2 ile beyin kistinde %69,8 azalma, rGRA2 ve rGRA6 protein karışımı ile beyin kistinde %48,2 azalma	Golkar et al.	2007
rSAG1-GRA2 füzyon proteini	<i>P. pastoris</i>	Freund	s.k.	İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama	Zhou et al.	2007
rGRA1 proteini	<i>E. coli</i>	Provax	i.p.	İmmun yanıtta uyarılma, RH suşuna karşı korunmada uzama	Döşkaya et al.	2007
rROP2 proteini	<i>M. bovis</i>	-	s.k.	İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama	Wang et al.	2007
Serin proteaz inhibitörü-1 proteini	<i>E. coli</i>	Alum	i.m.	İmmun sistemde uyarılma, beyin kistlerinde %58 azalma, %40 korunma zamanında uzama	Cuppari et al.	2008
rROP2, rGRA5, rGRA7 proteinleri karışımı	<i>E. coli</i>	Kolera toksini	i.n.	İmmun yanıtta uyarılma, beyin kistlerinde %58,3 azalma	Igarashi et al.	2008
rSAG1, rGRA1, rMAG1 epitop proteinleri ve karışimleri	<i>E. coli</i>	Freund	s.k. / i.p.	İmmun yanıtta uyarılma, beyin kistlerinde %89 azalma	Gatkowska et al.	2008

i.m.: İntramuskuler, kas içine; i.p.: İntraperitoneal, periton içine; s.k.: Subkutan, derialtına; i.n.: İntranazal, burun içine; i.o.: İntraoral, ağız içine; i.d.: İntradermal, deri içine; i.v.: İntravenöz, damar içine

Çizelge 2.4 *T. gondii*'ye karşı geliştirilen rekombinant protein aşıları (devam)

Aşı adayları	Ekspresyon Sistemi	Adjuvant	Aşılama Yolu	Sonuçlar	Yazar	Yılı
rROP2, rROP4 protein karışımı	<i>E. coli</i>	Freund	s.k.	İmmun yanıtta uyarılma, beyin kistlerinde %46 azalma	Dziadek et al.	2009
rSAG1 proteini	<i>Bakülovirus</i>	-	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında %50 uzama	Fang et al.	2010
rSAG2 proteini	<i>Influenza</i> ve	-	i.n.	Beyin kistlerinde % 85 azalma	Machado et al.	2010
rRON4 proteini	<i>Schneider</i> böcek	Freund	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma	Rashid et al.	2011
rROP2, rGRA4 proteinleri ve karışımı	<i>E. coli</i>	Cpg-ODN	i.m.	Beyin kistlerinde %63-66 azalma	Sanchez et al.	2011
rROP2, rROP4, rGRA4 karışımları rROP2, rROP4, rSAG1 karışımları	<i>E. coli</i>	Freund	s.k.	rROP2 + rROP4+ rGRA4 uygulandığında beyin kistlerinde %59 azalma rROP2 + rROP4 + rSAG1 uygulandığında %90 beyin kistlerinde azalma	Dziadek et al.	2011
rSAG1, rGRA1, rGRA4 epitop peptitleri	-	Freund	i.m.	İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama	Wang et al.	2011
rROP2, rROP4, rGRA4 karışımları rROP2, rROP4, rSAG1 karışımları	<i>E. coli</i>	Freund	s.k.	rROP2 + rROP4 + rGRA4 uygulandığında %84 beyin kistlerinde azalma rROP2 + rROP4 + rSAG1 uygulandığında %77 beyin kistlerinde azalma	Dziadek et al.	2012
rGRA4 proteini	<i>Tütün bitkisi hücreleri</i>	-	i.o.	İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında %59 uzama	Del L Yacono et al.	2012
rGRA7 proteini	<i>E. coli</i>	Freund	s.k. / i.m.	DNA aşısı sonrası protein aşısı uygulandığında; immün yanıtta uyarılma, korunma zamanında %60 uzama	Min J. et al.	2012
rROP5, rSAG1 protein karışımı	<i>E. coli</i>	Freund	s.k.	İmmun yanıtta uyarılma, RH suşuna karşı korunmada uzama	Zheng et al.	2013
rROP18 proteini	<i>E. coli</i>	Ginsenoside Re	s.k.	İmmun yanıtta uyarılma, RH suşuna karşı korunmada uzama	Qu et al.	2013
rSiklofilin proteini	<i>M. bovis</i>	-	i.o. / i.v.	İmmun yanıtta uyarılma, i.v. uygulama ile RH suşuna karşı korunmada %17 uzama	Yu et al.	2013
rDisülfid izomeraz proteini (TgPDI)	<i>E. coli</i>	-	i.n.	İmmun yanıtta uyarılma, RH suşuna karşı korunmada %31 uzama	Wang et al.	2013
rAktin proteini (TgACT)	<i>E. coli</i>	-	i.n.	Beyin kistlerinde %49,75, karaciğer kistlerinde %60,05 azalma, korunma zamanında %50 uzama	Yin et al.	2013

i.m.: İntramuskuler, kas içine; i.p.: İntraperitoneal, periton içine; s.k.: Subkutan, derialtına; i.n.: İntranazal, burun içine; i.o.: İntraoral, ağız içine; i.d.: İntradermal, deri içine; i.v.: İntravenöz, damar içine

Çizelge 2.4 *T. gondii*'ye karşı geliştirilen rekombinant protein aşıları (devam)

Aşı adayları	Ekspresyon Sistemi	Adjuvant	Aşılama Yolu	Sonuçlar	Yazar	Yılı
rSAG1 proteini	<i>E. coli</i>	PLG mikropartikül / Vet L-10	i.p.	PLG mikropartikülüyle yapılan aşıda immun yanıt uyarımı daha fazla, korunma zamanında %80 uzama	Chuang et al.	2013a
rSAG1/2 proteini	<i>E. coli</i>	PLG mikropartikül / Vet L-10	i.p.	PLG mikropartikülüyle yapılan aşıda immun yanıtta uyarılma, korunma zamanında %83 uzama	Chuang et al.	2013b
rSAG1 proteini	<i>Adenovirus</i>	-	s.k.	Modifiye edilmiş SAG1 kodlayan Ankara virüsüyle birlikte, rSAG1 aşısı verildiğinde korunma zamanında uzama ve beyin kistlerinde azalma	Mendes et al.	2013
rC kinaz 1'i aktive eden reseptör proteini (TgRACK-1)	<i>E. coli</i>	-	i.n.	İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında %45 uzama	Wang et al.	2014a
rROP17 proteini	<i>E. coli</i>	-	i.n.	İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında %50 artma	Wang et al.	2014b
rSAG2 proteini	<i>E. coli</i>	PLG mikropartikül / Vet L-10	i.p.	PLG mikropartikülüyle yapılan aşıda immun yanıt uyarımı daha fazla, korunma zamanında %87 uzama	Chuang and Yang	2014
rProfilin proteini (rTgPF)	<i>E. coli</i>	Oligomannoz kaplı lipozom (OML)	s.k.	İmmun yanıtta uyarılma, korunma zamanında %41,7 uzama	Tanaka et al.	2014
rBAG1, rSRS4, rSRS9 proteinleri	<i>E. coli</i>	rMinden proteini Freund	i.m.	rMinden proteinin adjuvant olarak kullanıldığı aşılamalarda immun yanıtta daha fazla uyarılma ve korunma zamanında uzama	Sun et al.	2014
AMA1, RON2, RON4 epitop peptitleri ve karışımları	-	-	i.n.	AMA1 + RON2 karışımı uygulandığında korunma zamanında %70 uzama	Zhang et al.	2015

i.m.: İntramuskuler, kas içine; i.p.: İntraperitoneal, periton içine; s.k.: Subkutan, derialtına; i.n.: İntranazal, burun içine; i.o.: İntraoral, ağız içine; i.d.: İntradermal, deri içine; i.v.: İntravenöz, damar içine

2.6 Aşı Çalışmalarında Kullanılan Adjuvantlar

Rekombinant protein aşılarının birçok avantajının olmasına rağmen tek başlarına immun sistemi zayıf uyarmaları önemli bir dezavantajdır. Bu sebepten dolayı yeni nesil aşılar da dahil olmak üzere güçlü, uyumlu ve güvenilir immünolojik adjuvantlara ihtiyaç duyulmaktadır. Adjuvantlar antijen ile birleştiğinde antijenin tek başına sağladığı immünojenik özelliğin daha fazla olmasını sağlayan maddelerdir. Bu tanımlama ilk kez 1924 yılında Ramon tarafından yapılmıştır (Singh and O'Hagan, 1999).

Adjuvantlar; immun yanıtın süresini uzatmak, hücre aracılı immun yanıtı stimüle etmek ya da arttırmak, antikor spesifitesini, izotipini ve altsınıf dağılımını ayarlayabilmek amacıyla kullanılmaktadırlar. Ayrıca antijen miktarını ya da aşılama sayısının azalmasını sağlayarak maliyeti azaltabilmek amacıyla da kullanılmaktadırlar (Andersson, 2000).

Alüminyum bileşiklerin adjuvant olma özelliği 1926 yılında Glenney et al. tarafından keşfedilmiştir (Petrovsky and Aguilar, 2004). Alum da denilen bu adjuvantlar bir çok lisanslanmış insan aşılarında (Hepatit A, Haemophilus influenza B, Human papilloma virüsü) kullanılmaktadırlar (Reed et al., 2009). Adjuvantların lokal olarak ağrı, enflamasyon, şişlik, nekroz, apse, ülser ya da eosinofili, alerji, anafilaksi, organ spesifik toksisite, immunotoksisite gibi yan etkileri, insan ve hayvanlarda kullanımını sınırlamıştır. Ancak alüminyum tuzlarının (alum) toksisite ve stabilite gibi yan etkilerinin çok daha az olması günümüzde de birçok aşıda kullanılmasına neden olmaktadır (Aguilar and Rodriguez, 2007).

Freund 1936 yılında bilinen en kuvvetli adjuvantı; su, mineral yağları ve ölü mycobacteria bakterilerini içeren emülsiyon adjuvantını geliştirerek adına Freund'un tamamlanmış adjuvantı anlamına gelen "Freund's complete adjuvant (FCA)" adını vermiştir. Fakat bu altın standart değerindeki adjuvant çok fazla lokal reaksiyona ve yan etkilere neden olarak insan için fazla toksik olduğu belirlenmiştir. Bu sebepten dolayı adjuvanttan Mycobacteria bakterilerini çıkararak Freund'un tamamlanmamış adjuvantı anlamına gelen "Freund's incomplete adjuvant (FIA)" geliştirilmiştir. Böylece adjuvant daha az toksisite içeren ve aşı formülasyonlarında insanlar için kullanılabilir hale gelmiştir (Petrovsky and Aguilar, 2004).

Montanide FIA'a benzer yağ içinde su içeren bir başka adjuvant grubudur (Reed et al., 2009). Bu adjuvantlar enjeksiyon bölgesinde bir depo gibi davranarak antijenin yavaşça serbest bırakılmasını sağlamaktadırlar. Bu durumda antikor üreten plazma hücrelerinin daha uzun süre uyarılmasına neden olmaktadır (Petrovsky and Aguilar, 2004). Montanide fiziksel olarak FIA'larına benzemektedir. Ancak hayvan çalışmalarında FIA'nın oluşturduğu güvenlik kaygıları nedeniyle Montanide biyo-bozunur olarak geliştirilmiştir (Reed et al., 2009). Montanide doğal, rekombinant ve sentetik antijen çalışmalarında fare, sıçan, kedi ve köpeklerde kullanılmaktadır (Petrovsky and Aguilar, 2004). Montanide'nin avantajlarından biride güçlü hücresel ve humoral immun yanıt uyarmasıdır. Tüm bunların yanında en önemli dezavantajı, her bir antijen için ayrı ayrı uygulanması gereken yoğun ve masraflı bir emülsiyon prosedürü nedeniyle formüle edilmesinin zor olmasıdır (Reed et al., 2009). Aşı çalışmalarında kullanılan adjuvant çeşitleri Çizelge 2.5'de verilmiştir.

Çizelge 2.5 Adjuvant çeşitleri (Ada, 1999)

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

3. MATERYAL VE METOT

“*Toxoplasma gondii*’ye özgü aşı adayı antijenlerin kullanıldığı adjuvante multivalan rekombinant protein aşısının oluşturduğu immun yanıt ve korunmanın belirlenmesi” adlı tezimin tüm çalışmaları Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Parazitoloji Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen hayvan çalışmaları için Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay alınmıştır (Onay No: 2010-39). Bu tez çalışması ayrıca Tübitak tarafından 110S200 nolu proje ile desteklenmiştir.

Yapılan tüm çalışmalar ayrıntılı olarak aşağıda belirtilmiştir. Çalışmalarda kullanılan kimyasallar aksi belirtilmedikçe “Applichem (Almanya)” adlı firmadan satın alınmıştır.

3.1 Araştırmada Kullanılan Deney Hayvanları

Bu çalışmada 6-8 haftalık dişi *Swiss webster out-bred* fareler kullanılmıştır. Araştırma sırasında kullanılan fareler Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü’nden temin edilmiştir. Fareler, etik kurallara uygun şartlarda Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma Uygulama Merkezi (ARGEFAR) Deney Hayvanları Laboratuvarı’nda bakılıp beslenmiştir. Araştırma sırasında kullanılan hayvan sayısı, istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde etmek amacıyla daha önce yapılan *T. gondii* aşı denemeleri referans alınarak belirlenmiştir.

3.2 *T. gondii*’ye Ait Antijenik Proteinleri Kodlayan 49 Plazmitin *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS Hücrelere Klonlanması

Daha önce Liang et al. (2011) ve Felgner et al. (2015) tarafından *T. gondii* antijenik proteinlerinin protein mikrodarray ile belirlenmesi çalışması yapılmıştır. Antijenik olduğu belirlenen proteinlerin içinden 49 tanesi Doç. Dr. Mert Döşkaya tarafından tez çalışmasında kullanılmak üzere verilmiştir (Çizelge 3.1). İlgili Çizelgede ilk ve üçüncü sütunlarda plazmitlerin “*Toxoplasma* Genomic Resource” adlı veribankasındaki (<http://www.toxodb.org/toxo/>) gen numaraları verilmiştir. İkinci ve dördüncü sütunlarda ise plazmit adları verilmiştir.

Çizelge 3.1 *T. gondii* antijenik proteinlerini kodlayan plazmitler

ToxoDB adı	Plazmit adı	ToxoDB adı	Plazmit adı
TGME49_047370_4	puET-A1	TGME49_034360_1	puET-B4
TGME49_026020_8	puET-B1	TGME49_113440_1	puET-C4
TGME49_053730_9	puET-C1	TGME49_013390_6	puET-D4
TGME49_061020_40	puET-D1	TGME49_073130_2	puET-E4
TGME49_047390_4	puET-E1	TGME49_075490_12	puET-F4
TGME49_024710_6	puET-F1	TGME49_114850_1	puET-G4
TGME49_104950_2	puET-G1	TGME49_047540_5	puET-H4
TGME49_086450_1	puET-H1	TGME49_110780_1	puET-A5
TGME49_021710_4	puET-A2	TGME49_026110_8	puET-B5
TGME49_121520_3	puET-B2	TGME49_093000_2	puET-C5
TGME49_037880_1	puET-C2	TGME49_078100_1	puET-D5
TGME49_093730_6	puET-D2	TGME49_092280_1	puET-E5
TGME49_015980_1	puET-E2	TGME49_026380_1	puET-F5
TGME49_001840_1	puET-F2	TGME49_090680_8	puET-G5
TGME49_039440_1	puET-G2	TGME49_005360_17	puET-H5
TGME49_019310_8	puET-H2	TGME49_109590_1	puET-A6
TGME49_027280_1	puET-A3	TGME49_114500_1	puET-B6
TGME49_003310_1	puET-B3	TGME49_055180_14	puET-C6
TGME49_048540_4	puET-C3	TGME49_055180_7	puET-D6
TGME49_100120_9	puET-D3	TGME49_025340_13	puET-E6
TGME49_095650_3	puET-E3	TGME49_022370_1	puET-F6
TGME49_051630_2	puET-F3	TGME49_026510_1	puET-G6
TGME49_054720_1	puET-G3	TGME49_013390_5	puET-H6
TGME49_005360_12	puET-H3	TGME49_095700_1	puET-A7
TGME49_058660_1	puET-A4		

Plazmitlerin hepsi rekombinant protein ekspresyonu için *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS kompetent (Invitrogen, A.B.D.) hücrelerine transforme edilmiştir. Bunun için 10 ng plazmit 10 µL *E. coli* BL21 Star hücrelerine eklenmiş ve karışım buz üzerinde (+4°C) 35 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra 42°C’de 45 saniye termal şoka uğratılmış ve 2 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Karışım üzerine vakit kaybetmeden 90 µL S.O.C. (*Super Optimal broth with Catabolite repression*, Invitrogen, A.B.D.) besin ortamı ilave edilerek 225 rpm’de (*Rounds Per Minute*: Dakikadaki Devir Sayısı) 1 saat boyunca 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 100 µg/ml ampicilin içeren LB-agar [25 g/L *Luria Bertani* (LB) besin ortamı ve 15 g/L agar] petri plaklarına ekim yapılmış, 37°C’de bir gece boyunca koloni oluşumunu sağlamak amacıyla inkübe edilmiştir. Ertesi gün koloni oluşumu görülen petri plaklarından 3 tek koloni seçilmiş ve 100 µg/ml ampicilin içeren LB sıvı besi ortamına alınmış ve 1 gece boyunca 37°C’de 225 rpm’de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Üreme olan tüplerden 600 µL alınmış ve

üzerine %30 gliserol 1:1 oranında ilave edilerek kriyo tüplerine aktarılmış ve -80 °C’de stoklanmıştır.

Geriye kalan 2,4 ml’den plazmit saflaştırma kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun olarak plazmitler izole edilmiştir. Daha sonra plazmitler %1’lik agaroz jelde (100 ml TAE [Tris-Asetat-EDTA] tampon içine 1 gram agaroz) 80V’ta yaklaşık olarak 45-50 dakika yürütülmüştür (Bio-Rad, A.B.D.). Plazmitlerin jele yüklenmesi sırasında 6x bromfenol mavisi içeren örnek tamponu (%30 gliserol, %0,25 bromfenol mavisi) kullanılmıştır. DNA merdiveni olarak Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas, A.B.D.) kullanılmıştır. Jel, Etidyum Bromür ile boyanmış ve UV ışık altında görüntülenmiştir (MiniBis Pro, İsrail).

3.3 Aşı Formülasyonunda Kullanılacak Rekombinant Proteinlerin Seçimi İçin 49 Antijenik Proteinin Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Transformasyon sonucu elde edilen hücrelerin protein ekspresyonlarının incelenmesi ve içlerinden aşıya uygun olan antijenik proteinleri belirlenmesi amacıyla küçük ölçekli deneme üretimleri yapılmıştır. Her plazmit için işlemler ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

Bunun için öncelikle 100 µg/ml ampisilin içeren 30 ml LB sıvı besin ortamına aktarılan plazmitleri içeren *E. coli* hücreleri 16-24 saat boyunca 37°C’de 225 rpm’de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Süre sonunda üzerlerine 70 ml 100 µg/ml ampisilin içeren LB sıvı besin ortamı eklenmiş ve toplamda 100 ml’ye tamamlanmıştır. Besiyerlerine OD₆₀₀ (600 nm’de ölçülen Optik Dansite) takibi yapılmış ve OD₆₀₀ değeri 0,4 ng/µL olduğunda, son konsantrasyon 0,5 mM olacak şekilde IPTG (*isopropil-β-D-tiogalactopiranoside*) eklenmiştir. Daha sonra 37°C’de 225 rpm’de 4 saat boyunca çalkalanarak inkübe edilmiş ve sonrasında örnekler 5000×g’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atılarak pellet -20 °C’ye kaldırılmıştır.

Ertesi gün pelletler % 0,1 Triton X-100 içeren 50 mM Tris-Cl ve 0,3 M NaCl (pH: 7,4) ile homojenize edilmiş ve -20°C’ye kaldırılarak 3 kez dondurulup çözündürülmüştür. Homejenatlar oda sıcaklığında 15 dakika karıştırıcıda inkübe edildikten sonra 30.000×g’de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen üstsıvı ile küçük ölçekli saflaştırmaya gidilmiştir.

Saflaştırma sırasında Ni^{2+} ile kaplanmış boncuklar kullanılmıştır (Ni-NTA, Qiagen). Bu boncuklardan 1 ml herbir üstsıvıya eklenmiş ve 30 dakika oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübe edilmiştir. Süre sonunda 4000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı atılmıştır. Boncukların üzerine 10 ml 50 mM Tris-Cl, 0,3 M NaCl ve 25 mM imidazol eklenmiş ve 30 dakika oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübe edilmiştir. Yine 4000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek üst sıvı atılmıştır. Bu işlemten sonra Ni^{2+} ile kaplı boncukların üzerine 1 ml 50 mM Tris-Cl, 0,3 M NaCl ve 0,5 M imidazol eklenmiş ve 30 dakika oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübe edilmiştir. En son 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek üst sıvılar toplanmış ve örnekler Western Blot uygulanarak en iyi eksprese olan proteinler görsel olarak belirlenmiştir (Bkz. Bölüm 3.7.).

3.4 Aşı Formülasyonunda Kullanılacak Rekombinant Proteinlerin Seçimi İçin 49 Antijenik Proteinin Biyoinformatik Yöntemlerle Analizi

Aşı antijenlerinin seçimine yardımcı olması açısından biyoinformatik yöntemler kullanılarak aşı adayı 49 antijenik proteinin CD8 Tc hücrelerinin bağlandığı MHC-I ve B hücre epitop bölgeleri ile N- ve O-bağlı glikozilasyon bölgeleri incelenmiştir.

Antijenik proteinler, 8-10 aminoasitlik kısa peptitler halinde MHC-I molekülüleri üzerinde CD8 Tc hücrelerine sunulmaktadırlar (Feliu et al., 2013). Bu yüzden MHC-I epitop analizi yapılırken MHC-I allel uzunluğu 9 olarak seçilmiş ve Immune Epitope Database and Analysis Resource (<http://tools.immuneepitope.org/mhci/>) programı ile analiz edilmiştir. Analiz sonunda çıkan yüzdelik oranlar içinden $1,0 \leq$ olanlar seçilmiştir (Moutaftsi et al., 2006; Kotturi et al., 2007; Paul et al., 2013; Goodswen et al., 2014).

B epitop analizinde SVMTriP (<http://sysbio.unl.edu/SVMTriP/prediction.php>) adlı program kullanılmıştır. Yao et al. (2012) B hücrelerinin bağlanacağı en uygun epitop uzunluğunun 16 aminoasit olduğunun gösterilmesinden dolayı analiz sırasında 16 aminoasit uzunluğunda epitoplar seçilmiştir.

N- ve O- bağli glikozilasyonlar NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) ve NetOGlyc 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) adlı programlar kullanılarak analiz edilmiştir (Frank and Schloissnig, 2010).

3.5 *T. gondii*'ye Ait Altı Rekombinant Proteinin Büyük Ölçekli Ekspresyonu

Küçük ölçekli optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen ekspresyon verilerine ve biyoinformatik analiz sonuçlarına göre aşı formülasyonunda kullanılabilecek altı proteini kodlayan puET-H2, puET-A4, puET-E4, puET-D6, puET-E6, puET-H6 plazmitleri seçilmiş ve büyük ölçekli protein ekspresyonu gerçekleştirilmiştir.

Altı proteinin büyük ölçekli ekspresyonu biyoreaktörde (BioFlo 110, New Brunswick, A.B.D.) gerçekleştirilmiştir. Bunun için plazmitleri içeren *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS stok hücreleri 100µg/ml ampisilin içeren 500 ml LB besin ortamına eklenmiş ve 37°C'de 225 rpm'de çalkalanarak bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün 100µg/ml ampisilin içeren 7.5 litre besiyeri ortamına (Çizelge 3.2'de içeriği tarif edilmiştir) eklenmiştir. Daha sonra kültür ortamı; pH 6.82'de, 37°C'de, 2.5 LPM (liter per minute; dakikada verilen hava litresi) oksijen uygulayarak 400 rpm'de karıştırılarak inkübe edilmiştir. OD₆₀₀ değeri 0.4 olduğunda, *E. coli* BL21 Star (DE3) hücreleri son konsantrasyon 0.5 mM olacak şekilde IPTG ile uyarılmış ve ortalama 5 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda besiyeri, yer tipi soğutmalı santrifüjde 4°C'de, 5000×g'de 10 dakika santrifüj edilmiş, hücreler toplanarak üst sıvılar dökülmüş ve hücre pelletleri kullanılıncaya kadar -80 °C'de depolanmıştır.

Çizelge 3.2 Biyoreaktörde kullanılan besiyeri karışımı

Kimyasallar	Son Konsantrasyon
KH ₂ PO ₄	2 g/L
K ₂ HPO ₄	3 g/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄ (Merck)	5 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g/l
Glukoz	25 g/L
Maya ekstraktı	5 g/L
Köpük kırıcı (Sigma)	0.35-0.4 ml/L
Thiamine	1 mg/L
İz Elementler	Son Konsantrasyon
FeCl ₃ .6H ₂ O	4.75 g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.4 g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1 g/L
MoNa ₂ O ₄ .2H ₂ O	0,5 g/L
BH ₃ O ₃	0.575 g/L
6N Sülfürik asit	12,5 ml/L
MnCl ₂ . 4H ₂ O	4 g/L
NaCl	5 g/L

Aşı formülasyonunda kullanılabilecek altı proteini kodlayan puET-H2, puET-A4, puET-E4, puET-D6, puET-E6, ve puET-H6 plazmitlerinin gen dizilimleri ve kodladıkları proteinlerin aminoasit dizilimleri Çizelge 3.3.A-F’de verilmiştir.

Çizelge 3.3 A. Rekombinant H2 proteinine ait puET-H2 vektörü gen (a) ve protein (b) sekansları

a) puET-H2 vektöründe H2 genini içeren ORF bölgesi (711 bp)

```
CTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAA
TGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCG
CATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACA
CCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAG
ACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGTTCATCACCGAA
ACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTATAGGTAAATGTCATGATAAT
AATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTG
TTTATTTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAAT
GCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTAT
TCCCTTTTTTTCGCGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTTCCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGT
AAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAG
CGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA
AGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCTG
CCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCT
TACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACAC
TGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCA
CAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT
ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCT
ATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGC
GGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGA
TAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGG
TAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACG
AAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTCAGACCA
AGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACCTTCATTTTTTAATTTAAAGGATCTA
GGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCA
CTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCG
CGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTCGCCGA
TCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAA
TACTGTCTCTTAGTGATGACCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCC
TACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTG
TCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAAC
GGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCT
ACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCC
GGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTG
GTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATG
CTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTCCCT
GGCCTTTTTGCTGGCCTTTTTGCTCACATGTTCTTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGA
TAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCG
CAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGC
GCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCCGCGTAGAGGATCGAGATCGATCTCGATCCCGCG
AAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATA
ATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCGTCACCATCATCACCATCATGATG
CCTGTCATGTATCCCTGCCGCCGGCGGAGCCCCAGGAGATCCAGGTGTTTCGTCCACT
```

TGAATTTTTTCGGTCTTCTTCGATTCGCGCGGGTGTGCGTGAAGCAGCGACGAGAAGAAG
 AGAAGACCGTAGAGGCTCCCGAGGTCGCGCAGGGCGGCGAGGAGACAGCCGGAGCAGAGA
 CGGCGCCTGAAGTGAGGAACTGGTCAGAGTCGTGAAGGTCGATGTGCCGTACCAAGTCC
 AGGAGGCGCCGGGCGGCGGACGACTCTGCAGCTCCGAGACTTCCGTGAGGACGAACTGA
 ACATGGACAACGAGGACCGCCTGACACGGGAGAAGATGGATCGTCTGAACGAGTTGGAGT
 CGTACCTCTACGCGCTGCGCGACGACATCTCCGGGAAGATGCGAGACTTCGCGACGCCCG
 AGGAGCGAGCAGAAATTGAGGCGCTTCTGGAGTCTCGCAGCAGTGGGTAGACGACGCTC
 TGGTGGACATTTCCACCGTCGCCAAGAGTGGGTCTGTCGCGAACTCGAGGAACTCCAGG
 CTGTGCGAGGAAAAGTCTCGCGCCGGTTTCAAGAGTACTCCGGCAGACAAGAAGCCAGC
 AACTGCTGCATGCTGCAGTCGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGG
 CTGCTGCCACCGCTGAGCAATACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGTCTTGA
 GGGGTTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACCTATATCCGGAT

Altı çizili kısım: Open reading frame; Kırmızı baz: Hedef gen bölgesi; Yeşil baz: Vektöre ait bölge

b) puET-H2 vektöründe H2 genini içeren ORF bölgesinin kodladığı protein (236 aminoasit)

MRHHHHHDACHVSLPPAAEPQEIQVFVHLNFFGLLRFARVCVKQRREEEKTVEAPEVAQ
 GGEETAGAETAPEVRKLVVRVVKVDVPYQVQVEAPGRPTTLQLRDFREDELNMDNEDRLTRE
 KMDRLNELESYLYALRDDISGKMRDFATPEERAEIEALLESSQWVDDALVDISTVAKSA
 VVAKLEELQAVGGKVSRRFEEYSGRQEAQQLLHAAVDPAANKARKEAELAAATAEQ-

Çizelge 3.3 B Rekombinant A4 proteinine ait puET-A4 vektörü gen (a) ve protein (b) sekansları

a) puET-A4 vektöründe A4 genini içeren ORF bölgesi (942 bp)

CTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAA
 TGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCG
 CATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACA
 CCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAG
 ACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGGTTTTACCGTTCATACCGGAA
 ACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGTTAATGTCATGATAAT
 AATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAATGTGCGCGGAACCCCTATTTG
 TTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAAT
 GCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCCCCTTAT
 TCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGT
 AAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAG
 CGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA
 AGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTG
 CCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACACAGTCACAGAAAAGCATCT
 TACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACAC
 TGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCA
 CAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT
 ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCT
 ATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACTGGATGGAGGC
 GGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGA
 TAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGG
 TAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACG
 AAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTTGGTAACTGTCAGACCA
 AGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCAATTTTAAATTTAAAAGGATCTA
 GGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCTGTTCCA
 CTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCG
 CGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGA
 TCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAA
 TACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCC
 TACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTG
 TCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAAC

GGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCT
 ACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCC
 GGTAAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTG
 GTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATG
 CTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCT
 GGCCTTTTGTGGCCTTTTGTCTACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGA
 TAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCG
 CAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGC
 GCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCCGCGTAGAGGATCGAGATCGATCTCGATCCCCGC
 AAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATA
 ATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCGTCAACATCATCACCATCATATGA
 GGAGCTCAGTAGGGCAGTCTCGTCTGCCGCTCAAGTTTTTCTTGGCGCGTTCTCGGTGA
 AAAATTCGGTTTTTCGCCCTCTTTTTCTGTGTTCTGCTCTTGTCTGCGTCTCCGGTCTGTCTT
 GGAAGATGCTGAGGACGGCGCAGCGTGGGACTCAGTCTCGAACGATTCCGACGACAGCT
 TCGCGAAAGGGTCTGACTTCGGGGAAGTCAAGTTGGGCAGCGCAGGCCAACGGCAGCTCC
 TCAGTCAGCTCCAGAACGAGTTGGGCGGTGAATTTCAGGACGCGAGACGTGAGTATGCTCC
 AGAGGGATCACGGAATCCACGGAGAGGAAGCCGGTTTGTTCGCAAGGCTGTTCCGGGCT
 TGGACGACCCAGCTGAAGACGATGAAGCCGACGGCGAAAGTGCCTCGGATGAGGCAGAAG
 CCGACTCTGACGTCTTGGCGGACGACGAAGAAGGGACATCCCTCATCGAAAATGCGAGTG
 AGGAAGACACAGACAACCTCCGAGGCAGACAGTCAACAGGAGGATGACAGTGTGGGAGAGG
 ATTCTTTTCTCCAGCAGGAGGGGCGAGGACTCCGAGGAAGAAAGAGCAGTCGAGGACCCGT
 ATGCTGCCGCCGAACCTCTTATCTTGAAGAGGACAACACTGTTGACGACAGCGCGGCGG
 AGGATTATGCCCTGCTTCGTTTGTCCAGATCGGCAGTGGAGAGAGAAAAATCCGGGCGC
 ACATGCATCTTGACAGCCGCCAAGTTGCCCCGAAAGATTTCGCGCATGCGTTCAACCAGG
 ATCATGTCAGACTTCTGGACCAGACCGCGTCGAGGACGAACCTCTCGATGAGGCCGCC
 CGGGCGGAGGCATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCA
 CCGCTGAGCAATAA

Altı çizili kısım: Open reading frame; Kırmızı baz: Hedef gen bölgesi; Yeşil baz: Vektöre ait bölge

b) puET-A4 vektöründe A4 genini içeren ORF bölgesinin kodladığı protein (313 aminoasit)

MRHHHHHMRSSVGQSRPLKFFLAPFSVKNSVFALFFVFALVCVSLSWEDAEDGAARD
 SVNSDDSDFAKGSDFGEVKLGSAQRQLLSQLQNELGGEFEDADVSMQLQRDHGIHGEA
 GLFRKAVPGLDDPAEDDEADGESASDEAEADSDVLADDEEGTSLIENASEEDTDNSEADS
 QQEDDSVGEDSFLQEGEDSEEEERAVEDPYAAAEPSTYLEEDNTVDDSAEDYAPASFVQI
 GSGERKIRAHMHLDSRQVAPERFAHAFNQDHVRLLDQTAVEDELLDEAAPGGGDPAANKA
 RKEAELAAATAEQ-

Çizelge 3.3 C. Rekombinant E4 proteinine ait puET-E4 vektörü gen (a) ve protein (b) sekansları

a) puET-E4 vektöründe E4 genini içeren ORF bölgesi (1095 bp)

CTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAA
 TGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCG
 CATATGGTGCATCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACA
 CCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAG
 ACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGGTTTTACCGTTCATACCGAA
 ACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAT
 AATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTG
 TTTATTTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAAT
 GCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTAT
 TCCCTTTTTTTCGCGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGT
 AAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAG
 CGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA
 AGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTG

CCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCT
TACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACAC
TGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGTCA
CAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT
ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCT
ATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGC
GGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGA
TAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGCGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGG
TAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACG
AAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAAGCATTGGTAACTGTCAGACCA
AGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAGGATCTA
GGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCTGTTCCA
CTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCG
CGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGA
TCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAA
TACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCC
TACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTG
TCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGGCTGAAC
GGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCT
ACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCC
GGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTG
GTATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATG
CTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCTT
GGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGA
TAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCG
CAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGC
GCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCCGGCGTAGAGGATCGAGATCGATCTCGATCCCGCG
AAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATA
ATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG - CACCATCATCACCATCATGTTG
GTACCCCGGATGGCGGAGCGTCTGCCACTGACCCAAGCTGTCTCACCGAAGGGACTGAGA
CCCAGTGCACCTTGCCAAGACAAGAATGGTTCTGCGAAGGATCTCGTAGCGACCCTCTCAC
AGAATCAAAATGGCTTGAACATAAGATGCAAAAAGACCGAACTGAAATTTGCGCCTGAAA
GCTCAAAATGGCAAAGCAGTCTGTCCGTCGACCACAACAGAGCTCAAGGACTGCAAACCAG
CTTCGACGCGAAGCGTTCCAAACTCCGTTGAAATTGACACTCTTCTCAGCGGCTCTCCAA
AAGACGTGTCTTGGAAGGATGATGGAGGAGACAATCAGTACACGTCTAAAAAGTTGGTCA
TCCCTCAAGAGTACTTTCCCTCTGTCGACCAAAAGTTTCATTGTGCGCTGCGTCACAAGCG
ACTCCGCGACGCAGGCCACCGCAATGAAGGTGACAGTGACGCTTGAAGCAAAGGCAAGTG
CAACTCAAGAGCAGACTGTCAACTGCGCCTACGGGGCGAATAGCAACAAGGCCACCAAG
CCATCACTCTGACTCCGGAAAATAACAAGTTCACTCTGGTGTGCGGAGATAAAGGACAGA
TTCTGCCGACAACTATCAAGAGACATATTGCGCTCATGAAGACGGAAGGACGCAGCTG
ACACGTGCAAGGACGCGTACAGTGGAATTTCCCGAATTACGAAACAACCTTGGTGGACGA
AAGCCACAGAACCCCCCAGCAACGAGTACACGTTCAAGATTCCAGAGGGTCAGTTCCCGA
CAGAGAAACAGACGTTTCATGGTCCGGTGCCACCGACAGACACCAAGTTCAAGATAATGCAC
AGAAGAACGGAGTTGACAACACCGCCCAAGAAGCGAAGCCGACTGTGTGCACCGTTGATG
TGACGGTTGCAGCCTCTGCACCTTCTCTGCTGCTGAGTTGGCAAGTGGCATATCTCTCA
TGTTGTTGTCCGTTGCATCGATTGCCTTCTCATTTCCTTGTAGGATCCGGCTGCTAACA
AAGCCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAA CTAGCATAACCCC
TTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAAGTATATCCGGAT

Altı çizili kısım: Open reading frame; Kırmızı baz: Hedef gen bölgesi; Yeşil baz: Vektöre ait bölge

b) puET-E4 vektöründe E4 genini içeren ORF bölgesinin kodladığı protein (364 aminoasit)

MRHHHHHVGPDPGGASATDPSCLTEGTETQCTCQDKNGSAKDLVATLSQNQNGLNIRCK
KTELKFAPESSNGKAVCPSTTTTELKDCKPASTRSVPNSVEIDTLLSGSPKDVSWKDDGGD
NQYTSKKLVIPQEYFSPVDQKFIVGCVTSDSATQATAMKVTVTLEAKASATQEQTVNCAAY
GANSNKAHQAITLTPENNKFTLVC GDKGQILPTNYQETYCAHEDGKDAADTCKDAYSGIF

PNYETTWWTKATEPPSNEYTFKIPEGQFPTEKQTFMVGCHRQTPVQDNAQKNGVDNTAQE
AKPTVCTVDVTVAASAPSSAAELASGISLMLLSVASIAFSFAL-
DPAANKARKEAELAAATAEQ-

Çizelge 3.3 D. Rekombinant D6 proteinine ait puET-D6 vektörü gen (a) ve protein (b) sekansları

a) puET-D6 vektöründe D6 genini içeren ORF bölgesi (2184 bp)

CTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAA
TGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCG
CATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACA
CCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAG
ACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGGTTTTTCACCGTCATCACCGAA
ACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTAAATGTCATGATAAT
AATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTG
TTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAAT
GCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTAT
TCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAAACGCTGGTGAAAGT
AAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAG
CGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA
AGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCG
CCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCT
TACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACAC
TGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCA
CAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT
ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCT
ATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGC
GGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGA
TAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGG
TAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACG
AAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTCAGACCA
AGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTA
GGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCA
CTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTTCTGCG
CGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGA
TCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACAAA
TACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCC
TACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTG
TCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAAC
GGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCT
ACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCC
GGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAACGCCTG
GTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTTGTGATG
CTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTCCT
GGCCTTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGA
TAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCG
CAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGC
GCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCCGGCGTAGAGGATCGAGATCGATCTCGATCCCCGCG
AAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCTCTAGAAATA
ATTTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG CACCATCATCACCATCATCTTG
CGGCTTCCATCTCATGCTCGCCTGCCGCTGCCGGAACCGTGTTGTCGCCACAAGATGCCT
TGGTACATCCTCGCTTTCATGCCTGCTCTTCCGTTAAACGCGTCCTCTTTCCACGAAG
CACACCGGCCTTGATCTTCAACTCCATCAGCGAACCGATGAAGAGAAGCTGCTCGCAG
AGCCGTCTTACCCCATCGAGAAGCTTTTGCCTGTACGGAATTTTGTGGCGAGCGTGGAG
TGGATCCTCTCTCGATTTGGACCGGGGAGGCGAAGGCTATTCCCACTGCGCTTTTCTCGG

ACCTCCTTGGCGCTTCGGCCCTTCGGCCTTCCATCCCGGATCCGTCGTTGCTTCCGAATC
 TCTGCAGCGTCTGCAGCGCGCTCTCAGCGGCCTTGTGACTTTTACTCTGAGCAACATC
 GCTCCATCGAAGCCATTCTCGAGGCGCTAAAGAGACAGAAAACGATTCCAACGGTCTGCG
 AGGAGACGCCGGTCTCTCCGGAGCTTGTGAGTCCCTCCTCTGCATGCGCGATTCCAAGTT
 CAACAGCGAATCTTTCAAGTCCGCCAAAAGAAGTGACTGTCTCATCTACGGCCAACGGCG
 AAGCAGATAGAGCCGAGGGTGTGCACCTGCAGTTCGTTACGCTGGGGGGGACGGGGACA
 CTGCGCCTGCTCGTTCCGAGTCAAGTCAGGAAACGGAGAAGAACCAGGAAGAGACAATCC
 ATGCAGAGGTTCTGCCTTCTATCGTGGTGCCTTTACCGTCTCCTGACGACGTGCATCTGC
 GGTCTTCGTCTCAAGAACCTTCTGCCTCGTCTGTGCGCCTGGCGACCAGCAGCAAGGTG
 GTGAGAAAGAGGAAACCAAGGAGGCAGACAGATTAGCTGCGTTGCCAGCCCGTGTGGCG
 TAGGTGCTCTGTGCGCGATCGTCTGCGCAGGCGTCGACGAGGTTCCCGATTCTTCGAAGG
 TGGCGCCTGTCCAAGACGCGGAAGGAAACCGCCAAGTCTCTGTCTCTTCTTCCCAAAGCA
 GAGTTGAGGGGAGTGGTCCGGATAGCGGCGACAACCAGCGCCTGGAGACTGAGGAGCCTT
 TGTCTCCTCGGATTTTGAATGAACACGAGACGCCTGCGACGGATCTTCTAGGGTGCTGCA
 TTCCGTCTGCGTCTCTCTTCTTCCGCCACGAGCCCGCTCCCGCCTTGAATCCGTGGG
 TTCTCGAACATACGGCGACGCTTCCAGAGTTTATTTACGTCTCGCGTCGGCCCCCTTCAGA
 GGGCGTTTTCCCTGCACTCGTGTTCCTCACACTCTGCACGCTTCCCACAGCCTCCTCAC
 CTGCGTCGATTCCCTTCTCGGCGTTGCTGCCTTCTTCGTGAGTCCCTCAGTCGCGAGAGT
 TGAAGGTGTTGCGGGCAAAAATGAAGCGAGAGGGGAAAAGACAGCAGAGAGAAAATATCTCT
 CTTGGCTTACCCTCAGCGACGTGCGTCGCGAAGTGACTCTCGGACGAAAGCTGCCACAGG
 GCGACTCCGATCCAAGCAGGGGAGTGAAGCCCCGAAGAAGGACGCCAGGAAGGATGGCG
 ACTGGGAGCGGGCAGAGGAGGGAATCGAAGAGGGGGAAGCCAGCGATGGCGACGGGACAA
 ACGACGGAAGGAGAAGGCGAAGAAAGAAGGTGAGGACGAGGAACAGGGCGAGGAACAGG
 TCTGCGGGGACGAAGACGTGGAGGATGTCAACATGGATGACGAAGGGGAGGAGTCGGCTT
 CTTTAGGGTCTTTGTTGCATGCAGAAGACGAGGGAAACGCGACGAAAAAACGAGAGTCA
 CACGCGCAAGGAAAGCCGTGTCTTCTCCCCCTGGGGCGAATCGCAAGGCGGTGGCGCACA
 CACTGCATCGGGCGACAAGTCGGCCGCGCAGCGACCATAAGCAGGAAGAGAACGAAGACT
 TGGAGGAGGAAGAAGGAAACACAGAGGAGGGTCAGGGGAACAGTCAGGATGCGCACACCG
 GTCGCGACAATGTCTTCGACTTCGCCTCAGATCTCCTCTGCTGCCACCAAAAACCTCCGTA
 TTCAAGGAGCCGTTGGAAAAAGCAACAACTTCAGCGTTTCTTGGTAAATAAA **GATCCGG**
CTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAG
 CATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTTGTGTAAGGAGGAACATA
 TATCCGGAT

Altı çizili kısım: Open reading frame; Kırmızı baz: Hedef gen bölgesi; Yeşil baz: Vektöre ait bölge

b) puET-D6 vektöründe D6 genini içeren ORF bölgesinin kodladığı protein (727 aminoasit)

MRHHHHHHLAASISCSPPAAAGTVVSPQDALVTSSLMPALPLNASSFHEAHRPWIFNSIS
 EPDEEKLLAEPSYPIEKLLRVTDFCGERGVDPLSIWTGEAKAIPTALFSDLLAASALRPS
 IPDPSLLPNLCSVCSAALSGLVDFYSEQHRSIEAILEALKRQKTIPTVCEETPVSPELVE
 SSSACAIPSSSTANLSSPPKEVTVSSTANGADRAEGVHLQFVHAGGDGDTAPARSESSQE
 TEKNQEETIHAEVLPSIVVPLPSPDDVHLRSSSQEPSASSVAPGDQQQGGGEKEETQGGGQ
 ISCVASPCGVGALSPIVCAGVDEVPDSSKVAPVQDAEGNRQVSVSSSQSRVEGSGPDSGD
 NQRLETEEPLSPRILNEHETPATDLLGCCIPASLSSSPRAAVPALNPWVLEHTATLPEF
 IYVSRRLPQRAFSLHSCFLTTLCTLPTASSPASIPFSALLPSSSSPQSRELKVLRAKMKRE
 GKDSREKYLWLTLSDVRRREVTLGRKLPQGDSDPSRGVKPPKKDARKDGDWERAEEGIEE
 GEASDGDGTNDGRRRRRKKVEDEEQGEEQVCGDEDVEDVNMDDEGEESASLGSLLHAEDE
 GNATKKTRVTRARKAVSSPPGANRKAHAHTLHRATSRPRSDHKQEENEDLEEEEGNTEEG
 QGNSQDAHTGRDNVDFDFASDLLCCHQKLRIQGAVGKSNKLQRFVLNKDPAANKARKEAEL
 AAATAEQ-

Çizelge 3.3 E. Rekombinant E6 proteinine ait puET-E6 vektörü gen (a) ve protein (b) sekansları

a) puET-E6 vektöründe E6 genini içeren ORF bölgesi (2172 bp)

CTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAA
TGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCG
CATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACA
CCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAG
ACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTTCACCGTCATCACCGAA
ACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTAAATGTCATGATAAT
AATGGTTTTCTTAGACGTGAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTG
TTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAAT
GCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTAT
TCCCTTTTTTTCGCGCATTTTGCCTTCCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGT
AAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAG
CGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA
AGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCTG
CCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCT
TACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACAC
TGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCA
CAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT
ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCT
ATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGC
GGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGA
TAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGG
TAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACG
AAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTCAGACCA
AGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACCTTCATTTTTTAATTTAAAGGATCTA
GGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCA
CTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCG
CGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTGCCGGA
TCAAGAGCTACCAACTCTTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAA
TACTGTCCCTTCTAGTGATAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCC
TACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTG
TCTTACCGGTTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAAC
GGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCT
ACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCC
GGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTG
GTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATG
CTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAACGACGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCCT
GGCCTTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGA
TAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCG
CAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGC
GCGTTGGCCGATTCTAATATGCAGCCGGCGTAGAGGATCGAGATCGATCTCGATCCCCGC
AAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATA
ATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG CACCATCATCACCATCATTTCA
AAACCAAGATCGAGAACCTGACGTCTCAGCTGGAGGAGCAGAAGGAGGCGAGGTGGAAGG
CACGCGAGGCACAGGACCAAGCAGAGGTGGAGCGGAAACGTCACCTGGCTGAGCTGGAGC
GACAGCTGCGTGTGGAGACTTTGGAGAAGGACGAACTGCGCGAGGCGTTGGAGCGGCAGA
CCTCGCGGGCGGAGAGTCTCATGGAGGAACTCGGGACAGTGAGGCGGGAAGGAGGCTCTC
CGAATATAGGGCGACTGGCGGATCGCGGGTGTGAGGTGGAGCCGACGGTGCAGGACCGGG
GAACGCAGGTGAGGACACAGTTATGGAGTACATTGCGAGTGCACAGAGATCTCTGAAG
AGGCTATGCAGGGGGACGAGACGGGTGCGGTGCGCTCGAGAGTCAGGGACATGTTGGACG
AGAGAAATGGGAACCTGCGGGGGAGGTGTCTTTTTCGCCACGAACCCACCTTTCTGTCTT
CGCCTCCAGCTGAGGGTCTTTGCTCCAGAAAGGAGTCCGGAGAGAAGTCGAGAAAGCGA

GCGTGCTTGAGGTTGAGGACGACGCTTCGATCGATGGAGCTGTTCAAGCAGTGGAAAATG
 GAGTTCTTAAAACCGCAAGCAAGGCTGGGACGACGACACCATCGGAGGGAAAGGGTCTGA
 AGATGCTTGGGACTCGCACGTCCATCGGGTGTGGAGTAGAAAAGGAAGACCAAGCCGGCA
 AGAAGGAGGCGGACCTGTTTCAGCAAAGTCGCCGACGTGCGGTTTCGAGCAAAGGCAGGAA
 GTGTAGGTCCATTTCAACGCCGCGGCAGTGAGGCAGAACAGAAGGATCAGCAAAGCGGACA
 CGAGTGGGCAATCCCGTGGCGAGAGAGGGGCTGAGATTTTCGGAGAGAAACACAACGAGTG
 ACGGACTGGGTTCTAAGGACCCTTCTGGTCGAGACAAGTCCCCCGCTGTAACCGGTATGA
 AGCATTACCGGGACATAAAAGAAACACCTAGTATTGACAAAAAACTTCACGCGGACGAGG
 ACGAAGGGAGACAAGCTCGCGATTGTGTCGCTCATCTTCTCGCGATGGACCTCGTTTCAT
 CTTCTCGCGATTTTCGATTCTTCGCTGTAGTGAGGTCCAAAGCTCTCGAAGTTCTCCGGC
 GTCAGCGTGCAGACCCTTCAGACTGGGAAGGATGTGAGAATGTGGAAGGATCATTTCG
 GGAGTCGCGAGAGGCACTCGAATGGGGAAGAGTTCAAGACACAGGGAACGTTGGTCGAG
 GTTCACTGAGGCAGGAACCCCTTACCGATGGAGTGACCACGACAGGCAGCAGCGCTTCT
 CAGAGAAAGAACCTGCGAAGCCGATGTTCACTTCCCTCGCGGATCCGAGCGTGAGGAGAC
 ATTTTAAGGAGGAAGAAGAACGACGGAAATTCAGGAAAAGGCAGAAGAGGAGATCTTGC
 GCCTTCTCAAACGCGCAGCTGAGTGACGCGAGGAAGATTTGAAAAGGGAAGAACGCTCCG
 AAAAGGCTACCGAAAAGGGGTCCCGTCTCTTCTCTGGAGAGGAGGTGCGATTCTTCCGG
 CATCTCTCGACTCCGAACCTTGAAAGACTGAAGGAACGGCTGAGGCCGGGGAATTCGGTTC
 TCAAAGCAGTTCGAGACACAGGCGCTTCTCGAAATTCGGAAGCGATGATAACTCTGCCA
 GATCGGATCGCTCTCGACACAACGAGCGCCGTTCTGCTTTGAGTGGGCGGGTACTGGTG
 TGGATGACACTTTTGGGAACCTCCAGAGCAGATAATCTTCGCGTGGAACCGGCGTCACGGC
 GACACACTGGAGAATATGCCCGAGGAACAAGTTTTACGGGAACAGAAGACCAGAAACCG
 TGGAGAGACAGGAAAAATTGGTGGCAGGAAGATCGCTCCGGACCTCGCTCATTGAGACGC
 TTTCCGCCACCTCTCATCAAATTCACGTAGAGCGAAGTGCTGTCAAGTGTGGCCTGGACC
 ACATGCTGCAAAGGCAGGAACACAGCGGCTGGTTTCTGCGCCGACGGAAACTCCAAAG
 AATCCGGCGGCACGCAGGCGACCATTTCTGAACAGATGAGGATCCGGCTGCTAACAAAG
 CCGGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAA CTAGCATAACCCCTTG
 GGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTGTGTAAGGAGGAACCTATATCCGGAT

Altı çizili kısım: Open reading frame; Kırmızı baz: Hedef gen bölgesi; Yeşil baz: Vektöre ait bölge

b) puET-D6 vektöründe D6 genini içeren ORF bölgesinin kodladığı protein (723 aminoasit)

MRHHHHHFKTKIENLTSQLEEQKEARWKAREAQDQAEVERKRHLAELERQLRVETLEKD
 ELREALERQTSRAESLMEELGTVRREGGSPNIGRLADRGCVQVEPTVRSRGTVQVEDTVMY
 IRECTEISEEAMQDETGRVRSRVRDMLDERNGNLRGRCLLRHEPTFLSSPPAEGLC SRK
 ESGEKSRKASVLEVEDDASIDGAVQAVENGVLKTASKAGTTTPSEGKGLKMLGTRTSIGC
 GVEKEDQAGKKEADLF SKVADVAFRKAGSVGPFQRRGSEAEQKDQADTSGQSRGERGA
 EISERN TTS DGLGSKDPSGRDKSPAVTGMKHYRDIKETPSIDKKLHADEDEGRQARDLSR
 SSSRDGPRSSSRDFDSFAVVR SKALEVLRRQRADPSDWE GCENVEKDHF GSRERHSNGEE
 FKTQGNVGRGSLRQEPFTDGVYHDRQQRFSEKEPAKPMFTSLADPSVRRHFKEEEERRKF
 QEKAEE EILRLKRAAECSEEDLKREERSEKATEKGSRLFSGEEVRFPPASLDSELERLK
 ERLRPGNSVLKAVRDTGAFSKFGSDDNSARS DRSRHNERSSLSGAGTGVD DTFGNSRAD
 NLRVEPASRRHTGEYARGTSFHGNRRPETVERQEKL VAGRSLRSLIETLSATSHQIHVE
 RSAVKCGLDHMLQRQEHSGWFPGR TENSKESSGQTATISEQMRDPAANKARKEAELAAAT
 AEQ-

Çizelge 3.3 F. Rekombinant H6 proteinine ait puET-H6 vektörü gen (a) ve protein (b) sekansları

a) puET-H6 vektöründe H6 genini içeren ORF bölgesi (3232 bp)

CTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAA
 TGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCG
 CATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACA
 CCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAG
 ACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATACCGGAA
 ACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGTTAATGTCATGATAAT

AATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTG
 TTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAAT
 GCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTAT
 TCCCTTTTTTTCGCGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGGCTCAGGAGAAACGCTGGTGAAAGT
 AAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAG
 CGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA
 AGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCG
 CCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCT
 TACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACAC
 TGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCA
 CAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT
 ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCT
 ATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGC
 GGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGA
 TAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGG
 TAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACG
 AAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCA
 AGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTTAATTTAAAGGATCTA
 GGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCA
 CTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCG
 CGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGA
 TCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAA
 TACTGTCCCTCTAGTGATAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCC
 TACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTG
 TCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAAC
 GGGGGGTTCTGTCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCT
 ACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCC
 GGTAAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTG
 GTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATG
 CTCGTACAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCT
 GGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGA
 TAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCG
 CAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGC
 GCGTTGGCCGATTCTATTAATGCAGCCGGCGTAGAGGATCGAGATCGATCTCGATCCCGCG
 AAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATA
 ATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG CACCATCATCACCATCATGGTCA
 GAACCGGAGGAGTCTGTACACGGCAACTCCCGGTTTGAGTGTGCGGCCGGCAGCGACGT
 CAACAGCAGCTTCTCTGCCGAAGCCGGCCTTCGTTCTGCCGCCGTTTCGAGCATCGAGAC
 TCGCTGTTTGTCTCCTTCGCTTAGCCAGGAAGCCAGGCTTCTCTCTGCCGCTGGCA
 CTTTACAGAGGAGGACAGGGCAAACGCCCCGCCAGGATCCAGAGACAACGTCGGCGAACGGC
 TGGGCTTCGACGCAGCAGCGAAGGTCTGCGGAGATGCTGGCTCGACAGCAAAGACCGGTC
 AAGACAGCAGCCTGGGCGAGAGTGTCTAAAGGGTGAGAATCTTTCGGAACAACAGACCC
 CGGATCCCTCACTCCAGTCTTCTCCTCCTCTCCAGTGTCTGCGAGCGCTGGATTGTCTC
 AGGCGGCAGCTGCAGGAGGCGCCCGGAGCAGGAACCAAGTGGCCTCGACTTCGAGGGAG
 GAGGATCTTCAGATGGAGTCCATCTTGGAGGATCGACTGTCTCGCGTGAGCCTCGATCTC
 CCTGTCTTTCTGAAAGGAAAAGGACTCAGCCTTCTTGTGCGAAGGACAGAGTGACGGGC
 AAGGCATCCACGTGAAAGGAAGTGGATCTTCGCCGTGTGTGGCGCCGGAGACGTGATTG
 CCTCTCCCTTCGGTCTCCCGGGAGACCCGGCGTCCGTCTCTCTTTCTCCGCCTCTCCCTC
 AGTCTCTGTGACGCCGGGACCTGCGCAGGCTCCTGCCGCGGCACTGATGCCGTCTTCTC
 CCCGTCTGAATGCCGACGCGTTTTCTGCTGATGGTGATCTTCTCTTCCCGACCGCCTTCG
 TTGCCTCGCAGCCAGCTGACGGGGCTGGTCAGGCGTCTTCGCGAGAGGAGACGTTCTCTC
 TGCATGCGTCTGGACGCGCGGGGCGGTCTGTCTGTGCGACTGGAGAGCAGCAGCGGGG
 ACGAAGAGGAGACGAGCAGCGTGACGCTGGACGACTCGAGCGAAGGGTCCCTGAGCTGGA
 GAGACACCTGGCGTCTGCTGAGGAGGAGTGGGTACACGCACCGAAGAGTCTCCGGTG
 GCGAGACAGCAGATGCAGCCTCTCCACAGTTCGCCAGACGAGAGCTCGTCAGAGATCGAC
 AGCAGCGAACTCGCGGGGACGAGCTCTCGAACGCCCGGACTGCAGCCGCGGCAGGCGAG

CCGGGTCTCCAGAAGCCGCAGGCATCCTGCAGACTCCCGCGTACGCTGCAGCTTTAAAGG
 AGTGGATGGAGGAACCCAGTTGCCCGAGAGAAGTCGACCTTGGGCACACACCGGAAGGCG
 AACAGACTCAACCGGATGGCGAAGGACGCCCTGAAGAATCCCGAAGCGTCGACGCGGGAC
 TCGCCGGCGCACGGTCCGAAGCGAAGGTGTCTGGACACCCTGGTGAGGTGTCTGGACACC
 CGAATGAGGAAATGTGCGAGTGGACGGAGGCGCGATTCCGGAGACTGAATCGAACCCTGA
 TTTCGTCTCCTCTTCATGCGCCAGTTCCAGCCGAATTGGCTGGCGGCCAGGGGTCCCAGC
 AGGTTCCCTCCACCCGAGCCTCTGTGCAGTCAGCCGGTCCAGTGTCTCGACACCCCGGAAG
 TCATTGAGGAAGACCTCGTTCTCCAGGATCCTTGAGCCCCGACCGCGTCGGGCCGCGTG
 AGGGGGGGAACCGGACGCGAGCGGGAGTCGGAGTTCCCCGAGGACTTCCGGGGCGTTTCTGAGC
 CTTTCAGCCCGTCTCCTGTGCGAGGCAAGCTTGTCTGTGGCGGGTGCCGGTCTTTCTCAGA
 TCGCACCGTCTGCTTCGTGCTGTGCATCCGTGCTTCTTTGGCACCTTCAGCTGCGTCGC
 CTCCCTCGCATTCTACTCCACCGAGCTCGGTACCGAGGCGTCCCGAAGCCGACTTCCC
 TTGGAGAAGAACCGGCTTTCCAGGGAACGGCTTTTCACGACGACCGCGGAACGCGATTTCG
 GAGAAAGTCTGTGCGCGCGCGCCTGCAGTCGCTCTGCCGGCCGTGTGATCCTCGGTC
 GACTTGACGGCTTTCGCGACGAGCCAAGTCCACTGGGTACGCACCGCACGCAGATTTTCC
 ATCTTGACAGCGCCGACGACGCGGGTGTGGGTGCGTCGAGCGTCCTTTCTCCAGGGGTT
 TCGCTCTCGAGCCTCAGGACGAAGCCGGAGAGCAGAGCCGTCTTCGGGTGGAGGCGCAGG
 CCGCGCAGGGCGAGTTTGCGGGACAGTTGGGCTCCAGTCCTCCGGCGAACGCCAGAGCA
 GCTGGGGAGACGAGAACGGGGAGGCGAAACCGCCGGCGCTGGACGGCGTCGATTGGTTCT
 ACCGCAGCGACGCGGCGGGAGAGAAGCACATGCAGGAGCAGGCTCTCGCGCAGGCGCAGC
 GGGCGGCGTTTTTCGAGCGATTTTCGAGGTAGCTGAGAGTGCAAGTGTCTTCTGTGAAGATG
 CAGGGCTCCAGAGAGAGGGCGTCATCGCGCGTCTCTCGGCGTCTGTGAAGAGCTCGAAC
 GAACCACTGGAAGTGCCTGGAGCAGCTGCAGGAGCAGCGGCGCTTGCCTCTCGAGCTGG
 AGCGTAAGAACACCTGCTTCAGCGTCAACTGCATGCAGTCTTGGTTCTGCTCTCCCGCT
 TTTTCGCTCTCGGGACAAGACCGGAGACGCCTCCTCCACCTCCTGCAGCCCGCTGCGTCGC
 CCAAGAGCGAGCTCATGCATGCGACATTGAATCCCAGCCAACGCGAGGAGACGCGCAGG
 ACCCAGAAGACGCTGGAGACCGGCACCTCGAGGGCGCCGTGCGCCGCTGGACGGAGGCCA
 AAGGCGAGAAGGCGGTGAATTGCCTGGAATCCGAGGTGGCGGCGCTCGCAGGCTGGTCA
 ACGGGAGAGGCGAGGACAGAGACTGGATGGTCAAAAGGACGTTTTAGACGAGGAGGGGA
 GACACCAAGCGGGGCGGTGCCTCTCGCAGCACACCATCGATGCAGCTCAGCTTTCGGGAG
 ATGAAGAAGACGCAGATTTTCGACGCAGACCTCGTCGAGGCCGACGAGGTGAGGGAAGCGT
 TCAACACG **GATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCG**
CTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGC
 TGAAGAGGGAAGTATATCCGGAT

Altı çizili kısım: Open reading frame; Kırmızı baz: Hedef gen bölgesi; Yeşil baz: Vektöre ait bölge

b) puET-H6 vektöründe H6 genini içeren ORF bölgesinin kodladığı protein (1052 aminoasit)

MRHHHHHHGRTARSLYTATPGLSVRPAATSTAASLPKPAFVLPFFAASRLAVCPPSLSQE
 AQASSLPPTSEEDRANAPPGSRDNVGERLGFDAAGKVCAGSTAKTGQDSSLGESVLK
 GENLSEQQTPDPSLPVFSSSPVSASAGLSQAAAAGGARSNRNHSGLDFEGGSSDGVHLGG
 STVSREPRSPCLSERKRTQPSCEGQSDGQGIHVEGSGSSPCVAPETSIASPFGLPGDPA
 SVLSPLPQSLSTPGPAQAPAAALMPSSPRLNADAFPADGDLSPFTAFVASQPADGAGQ
 ASSREETFSLHASGRPRGGLSVALESSSGDEEETSSVTLDDSSSEGLSWRDTWRPAEEAV
 GYTHRRVSGGETADAASPQFARRELVRDRQQRTRGDAALERPDCSRGRRAGSPEAAGILQ
 TPAYAAALKEWMEEPSCPREVDLGHTPEGEQTQPDGEGRPESRSVDAGLAGARSEAKVS
 GHPGEVSGHPNEEMSQWTEAAIPETESNRISPLHAPVPAELAGGQGSQVPPPEPLCSQ
 PVQCLDTPEVIEEDLVLQDPWSPDRVGPREGGNATRESEFPEDFRGVSEPFSPSPVEASL
 SVAGAGLSQIAPSASSCASVASLAPSAASPPSHFYSTELGTEASPKPTSLGEEPAFQGT
 FHDDRGRTRFGESPVARAPAVALPAVSILGRLDGFRDEPSPLGTHRTQIFHLADADDAGVG
 ASSVLSPGGFALEPQDEAGEQSRLRVEAQAAGQEFAGQLGSSPPANAQSSWGDENGAKP
 PALDGVDFYRSDAAGEKHMQEQAQAQRAAFSSDFEVAESASVFCEDAGLQREGVIAA
 FSASVEELERTSGTALEQLQEQRRLRLELERKNTLLQRQLHAVLVLLSRFSLSGQDRRL
 LHLLQPAASPKSELMHATLNPSQREETREDPEDAGDRHLEGAVAAWTEAKGEKAVNCLES
 EVAALAGWSNGRGEDRDWMVTKDVLDEEGRHQAGRCLSQHTIDAAQLSGDEEDADFDADL
 VEAEDEVREAFNTDPAANKARKEAELAAATAEQ-

3.6 Rekombinant Proteinlerin Saflaştırılması

Rekombinant proteinler iki basamakta tarif edildiği gibi saflaştırılmışlardır (Döşkaya et al., 2007; Gedik et al., 2013; Döşkaya et al., 2014). Bunun için öncelikle hücre pelletleri üzerine 300 ml resüspanسیون tamponu (50 mM Tris-Cl, 0,3 M NaCl, pH 7,5) eklenmiş ve homojenizatörde (blender) (Waring, A.B.D.) 30-40 saniye boyunca homojenize edilmiştir. Daha sonra homojenize hücreler soğutmalı ortamda iki kere 18.000 psi basınç altından geçirilerek parçalanmıştır (*Microfluidizer*, Microfluidics M110 L Pneumatic, A.B.D.). Parçalanmış hücreleri içeren homojenat soğutmalı santrifüjde 30.000×g'de 4°C'de 30 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Berrak üst sıvı protein bağlama kapasitesi düşük ve delik çapı 0,45 µm selüloz asetat filtreden (Corning, A.B.D.) geçirilmiştir.

Proteinlerin saflaştırılması ÄKTA Hızlı Protein Sıvı Kromatografi Cihazı (FPLC: *Fast Protein Liquid Chromatography*) ve UNICORN™ programı kullanılarak yapılmıştır (GE Health, A.B.D.). Saflaştırmanın ilk aşamasında 5 ml HiTrap Ni²⁺ şelasyon HP kolonu (*Afinite kolonu*, GE Health A.B.D.) kullanılmıştır. Bu işlem sırasında kolondan, filtre edilmiş ortalama 100 ml üst sıvı geçirilmiştir. Kolona protein yüklenmesi sırasında resüspanسیون tamponu (50 mM Tris-Cl, 0,3 M NaCl, pH 7,5) kullanılmıştır. Yükleme tamamlandıktan sonra kolon, rekombinant proteinleri serbestleştirmek amacıyla yıkama tamponundaki imidazol miktarı 50 mM'dan başlayarak 100 mM, 250 mM ve 500 mM'a kadar arttırılarak yıkanmıştır. Kolondan ayrılan proteinlerin yaptığı pikler UV 280 mAU ile görüntülenmiş ve fraksiyon toplayıcı ile toplanmıştır. Toplanan proteinler %12'lik SDS-PAGE ve Western Blot ile görüntülendikten sonra (Bkz. Bölüm 3.7) 10.000 Dalton (MWCO) delik çaplı polieetersülfon santrifüj filtreleri (Vivaspin 20, Sartorius, Almanya) kullanılarak 8000×g'de 4°C'de 1-2 ml'ye ulaşınca kadar konsantre edilmiştir.

Saflaştırmanın ikinci aşamasında ise konsantre edilen rekombinant proteinler hem daha ileri saflaştırmanın sağlanması hem de endotoksin seviyelerinin azaltılması amacıyla Superdex 200/10-300 GL (100000-600000 MWCO) jel filtrasyon kolonuna yüklenmişlerdir. ayrılan proteinlerin yaptığı pikler UV 280 mAU ile görüntülenmiş ve fraksiyon toplayıcı ile toplanmıştır. Elde edilen saf proteinler %12'lik SDS-PAGE ve Western Blot ile görüntülendikten sonra (Bkz. Bölüm 3.7) 10.000 Dalton (MWCO) delik çaplı polieetersülfon santrifüj filtreleri (Vivaspin 20, Sartorius, Almanya) kullanılarak

8000×g'de 4°C'de 1-2 ml'ye ulaşıncaya kadar konsantre edilmiş ve -80 °C'ye depolanmıştır.

3.7 Sodyum Dedosil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western Blot

Saflaştırılmış proteinler %12'lik SDS PAGE ile ayrılmışlardır. SDS-PAGE uygulanırken ilk olarak alt (ayırıcı) jel daha sonra üst (yığıcı) jel hazırlanmış ve proteinler jellere yüklenerek moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılmışlardır.

%12'lik alt jel; 2,8 ml distile su, 2 ml 0,45 µm'lik filtreden geçirilmiş 1,5 M Tris-Cl pH 8,8 ve %0,4 SDS (w/v)'den oluşan alt jel tamponu, 3,2 ml akrilamid (%30'luk solüsyon), 40 µl %10'luk Amonyum persülfat ve 8 µl TEMED (*tetramethylethylenediamine*) karışımından oluşturulmuştur. Hazırlanan karışım hızlıca, pipet yardımıyla üretici firmanın (Bio-Rad, A.B.D.) tarifine uygun olarak iki cam arasına aktarılmıştır. Alt jelin üzerine 200 µl distile su eklenerek oda sıcaklığında yaklaşık olarak 15-20 dakika beklenmiş ve jelin polimerizasyonu sağlanmıştır.

Üst jel; 1,5 ml distile su, 0,625 ml 0,45 µm'lik filtreden geçirilmiş 0,5 M Tris-Cl pH 6,8 ve %0,4 SDS (w/v)'den oluşan üst jel tamponu, 0,335 ml akrilamid (%30'luk solüsyon), 12,5 µl %10'luk Amonyum persülfat ve 2,5 µl TEMED kullanılarak hazırlanmış ve pipet ile alt jelin üzerine eklenmiştir. Sisteme ait taraklar yerleştirilmiş ve jelin donması için beklenmiştir.

Jellerin polimerizasyonu gerçekleştikten sonra taraklar çıkartılmış ve jeller üretici firmanın tarifine uygun olarak plastik hazne içerisine yerleştirilmiştir. Jeller hazneye yerleştirildikten sonra içerisine yürütme tamponu (62,5 mM Tris, %0,05 SDS (w/v), 200 mM glisin) eklenmiştir. Rekombinant proteinler 2× örnek yükleme tamponuyla (125 mM Tris-Cl pH 6,8, %4'lük SDS, %10'luk bromfenol mavisi, %20'lik gliserol ve %10'luk beta-merkaptotanol) 1:1 oranında karıştırılmışlardır. 95 °C'de 3 dakika bekletilmiş ve jeldeki kuyucuklara ortalama 25 µl yüklenmişlerdir. Her jelin bir kuyucuğuna ise 2 µl protein merdiveni (PAGERuler Plus, Prestained, Fermentas, A.B.D.) yüklenmiştir. Proteinler ilk 20 dakika 60 V'ta daha sonra ise 100-110 V'ta yürütülmüşlerdir.

Proteinler ayrıştıktan sonra jeller boyama solüsyonu (%45 Metanol (v/v), %10 Glasial asetik asit (v/v), %0,1 Coomassie mavisi G-250 (w/v) ve distile su karışımıyla elde edilir) içeren kapalı kaplara alınmış çalkalayıcıda 1 gece boyunca oda sıcaklığında boyanmaları sağlanmıştır. Ertesi gün jel üzerindeki fazla boya alınmış ve üzerine boya uzaklaştırıcı solüsyon (%45 Metanol (v/v), %10 Glasial asetik asit (v/v) ve distile su karışımından oluşur) eklenerek çalkalayıcıda 1 gece boyunca oda sıcaklığında fazla boyanın çıkarılması sağlanmıştır.

Western blot aşamasında %12 jelden PVDF (*Polyvinylidene difluoride*) transfer membranları (Immobilon-P, Millipore, A.B.D.) membrana proteinlerin geçişini sağlamak amacıyla 1 saat boyunca 100 V uygulanmıştır. Transfer tamamlandıktan sonra PVDF transfer membranlar dikkatlice alınmış ve bloklama tamponunda [%6,25 yağsız süt tozu içeren 1×TBS-T tamponu (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl pH:7,8, %0,1 Tween 20)] 1 saat boyunca oda sıcaklığında bloke edilmiştir. Bloklama sonrası membranlar 1/3333 oranında bloklama tamponuyla sulandırılmış monoklonal antipolihistidin antikoru (Sigma-Aldrich, A.B.D) ile 1 buçuk saat boyunca oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edilmiştir. Süre sonunda membranlar 1×TBS-T tamponu ile üç kere kısa ve üç kere 3'er dakika yıkanmıştır. 1×TBS-T tamponu ile 1/3333 oranında sulandırılmış alkalın fosfataz-konjuge edilmiş keçi kaynaklı anti-fare IgG (H+L) antikoru (Sigma-Aldrich, A.B.D.) ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda membranlar 1×TBS-T tamponu ile üç kere kısa ve üç kere 3'er dakika yıkanmıştır. Daha sonra 1×TBS (20 mM Tris-Cl, 0,5 M NaCl pH:7,8) tamponu ile yine üç kere kısa süreli hızlı yıkamayla ve üç kere 3'er dakikalık yıkamalarla yıkanmıştır. Yıkamalar bittikten sonra bantların görüntülenebilmesi amacıyla 250:2:1 oranında dietanolamin tampon (%10 Dietanolamin, 4 M HCl pH9,8, 0,5 mM MgCl₂·6H₂O), %70 Dimetilformamid içinde çözöürölen %4,3 BCIP ile karışırılarak boyama tamponu hazırlanmıştır. Boyama tamponu her bir PVDF membranı üzerine eklenmiş ve karanlık ortamda ortalama 15 dakika oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edilmiştir. Süre sonunda membran, distile su ile yıkanarak reaksiyon durdurulmuştur.

3.8 Saflaştırılmış Rekombinant Proteinlerde Endotoksin Seviyesinin Belirlenmesi

Saflaştırılan rekombinant proteinlerdeki endotoksin seviyesi, Pyrotell Limulus Ameobocyte Lysate (LAL) Gel-Clot Endotoxcin Testi (Cape Cod Inc, A.B.D.) kullanılarak küçük test tüplerinde üretici firmanın protokolüne uygun

olarak ölçülmüştür. Endotoksin seviyesi 0,25 EU/ml hassasiyete sahip test kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak *E. coli* O113:H10 kontrol standart endotoksini (Cape Cod Inc, A.B.D.), negatif kontrol olarak ise LAL reaktif suyu (LRW, Cape Cod Inc, A.B.D.) kullanılmıştır.

3.9 Rekombinant Proteinlerin Miktarlarının Kantitatif Olarak Belirlenmesi

Elde edilen rH2, rA4, rE4, rD6, rE6 ve rH6 proteinlerin içerdiği ml'deki protein miktarlarını belirlemek amacıyla Bradford Protein Analiz Yöntemi kullanılmıştır. Ölçüm ticari kit (Coomassie Plus Protein Assay Reagent Kit, Pierce, A.B.D.) ve spektrofotometre (NanaDrop, A.B.D.) kullanılarak yapılmıştır. Analiz sırasında standart eğri sığır serum albüminin (BSA) sulandırılmasıyla elde edilmiştir.

3.10 Multivalan Rekombinant Protein Aşı Formülasyonunun Oluşturulması ve Uygulanması

Saflaştırılmış rH2, rA4, rE4, rD6, rE6 ve rH6 proteinlerinin herbiri için bir karışım oluşturulmuş ve altı karışım en sonda birleştirilmiştir. Karışımlar tarif edildiği gibi oluşturulmuştur. Kısaca, rekombinant protein (20 µg) + rekombinant protein hacmi kadar Montanide ISA 50V (Seppic, Fransa) birbirine eklenmiş, 30 saniye hızla karıştırılmış ve insülin enjektörü ile 5 defa alınıp verilmiştir.

Aşı denemesi için 6-8 haftalık, her biri 11'şer adet dişi *Swiss outbred* fare içeren birer aşı ve üçer kontrol grubu oluşturulmuştur (Çizelge 3.4). Kontrol gruplarında bir grup fareye intraperitoneal yoldan 100 µl PBS, diğer gruba 50 PBS (+) 50 µl Montanide ISA 50V karışımı uygulanmıştır. Bunun yanında montanide adjuvantı içermeyen altı rekombinant proteinden oluşan kontrol grubu oluşturulmuştur. Son gruba yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan altı rekombinant protein (+) Montanide ISA 50V içeren multivalan rekombinant protein aşısı uygulanmıştır (Çizelge 3.4). Aşılar farelere üç hafta aralıklarla iki defa intraperitoneal yoldan uygulanmıştır.

Fare kuyruk kanları her aşılama 3 hafta sonra anestezi altında [Anestezi için farelere finalde 100 mg/kg ketamine (Ketalar, Parke-Davis, A.B.D.) ve 3mg/kg xylazine (Alfazyne, Alfasan International BV, Hollanda) toplanmıştır.

Çizelge 3.4 Multivalan rekombinant protein aşısı ve kontrol grupları

Aşı adı	Formülasyon	Aşı tipi	İçerik
PBS	PBS	Kontrol	100 µl PBS
Montanide	Montanide ISA 50V	Kontrol	100 µl Montanide (+) 100 µl PBS
6-Valant	rH2 (+) rA4 (+) rE4 (+) rD6 (+) rE6 (+) rH6	Kontrol	Altı farklı rekombinant protein (her biri 20 µg; toplam hacim PBS ile 200 µl yapılmıştır)
6-Valant (+) Montanide	rH2 (+) rA4 (+) rE4 (+) rD6 (+) rE6 (+) rH6 (+) Montanide ISA 50V	Aşı	100 µl içinde altı farklı rekombinant protein (her biri 20 µg) (+) 100 µl Montanide

3.11 Aşılama ile *T. gondii* Ankara Suşu Takizotilerine Karşı Oluşan Korunmanın Değerlendirilmesi

Multivalan rekombinant protein aşısının koruyuculuğunu belirlemek amacıyla her gruptan 8 farenin her biri 1×10^5 *T. gondii* Ankara suşu takizoiti ile ilk aşılamadan 9 hafta sonra intraperitoneal yoldan enfekte edilmişlerdir (Döşkaya et al., 2007). Daha sonra fareler hergün gözlemlenmiş ve yaşam zamanları kayıt edilmiştir.

3.12 Humoral İmmün Yanıtın Belirlenmesi

Aşılamadan sonra farelerde rH2, rA4, rE4, rD6, rE6 ve rH6 proteinlerine karşı oluşan total IgG, IgG1 ve IgG2a antikor yanıtlarını belirlemek amacıyla Rekombinant ELISA (Recombinant Enzyme Linked Immunosorbent Assay; Rec-ELISA) yöntemi tarif edildiği gibi uygulanmıştır (Döşkaya et al., 2014). Öncelikle 96 gözlü mikropalaklarının (Nunc, A.B.D.) kuyucukları 3 kez 300 µl PBS-T (%0,05 Tween-20 içeren PBS, pH:7,4) ile yıkanmıştır. Daha sonra kuyucuklara, son konsantrasyonu 5 µg/ml olacak şekilde $1 \times$ PBS tamponu ile sulandırılan rH2, rA4, rE4, rD6, rE6 ve rH6 protein karışımından 100 µl eklenmiş ve gece boyunca 4°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her kuyucuk 300 µl PBS-T ile 3 kere yıkanmıştır. Yıkama sonrasında her kuyucuğa 200 µl bloklama tamponu (%5'lik yağsız süt tozu içeren %0,05 PBS-T) eklenmiş ve oda sıcaklığında 2 saat boyunca çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Süre sonunda plaklar 300 µl PBS-T ile 3 kez yıkanmıştır. Bu sırada fare serumları 10 mg/ml *E. coli* eriyiğini içeren bloklama tamponu ile 1/100 oranında sulandırılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiş ve sonrasında kuyucuklara 100 µl eklenmiştir. Serum örnekleri çift kuyucukta çalışılmıştır. Plaklar oda sıcaklığında 2 saat boyunca çalkalayıcıda

inkübe edildikten sonra 3 kez 300 µl PBS-T ile yıkanmıştır. Yıkama sonunda kuyucuklara %0,05 PBS-T ile sırasıyla 1/2000, 1/1000 ve 1/1500 oranlarında sulandırılan peroksidaz işaretli anti-fare IgG (γ -bağına spesifik) (Sigma-Aldrich, A.B.D.), peroksidaz işaretli anti-fare IgG1 (Jackson ImmunoResearch, A.B.D.) ve peroksidaz işaretli anti-fare IgG2a (Jackson ImmunoResearch, A.B.D.) antikorundan 100 µl eklenmiştir. Plaklar oda sıcaklığında 1 saat boyunca çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Süre sonunda plaklar 3 kez 300 µl PBS-T ile yıkanmış ve renk oluşturuşu substrat olarak her kuyucuğa 10:1 oranında hazırlanan TMB tampon [(70,4 mM Na₂HPO₄, 36,4 mM sitrik asit, %7 (v/v) dimetilasetamid, %0,016 (v/v) H₂O₂ distile suya eklenerek hazırlanır) ve TMB stok (0,1 mM 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, %4 (v/v) dimetilasetamid distile suya eklenerek hazırlanır. pH: 2,0 4 M HCl ile ayarlanır)] solüsyonundan 100 µl eklenmiştir. Plaklar karanlık ortamda yaklaşık olarak 10 dakika bekletildikten sonra 75 µl durdurma solüsyonu [2 N H₂SO₄ (Merck, A.B.D.)] eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Absorbans değeri (AD) 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucusunda (Bio-Tek EL×808, A.B.D.) belirlenmiştir. Serum örneklerinden elde edilen absorbans değeri (AD) negatif kontrollere ait ortalama AD (+) 2× standart sapma üzerine çıktığında, değeri pozitif kabul edilmiştir.

3.12.1 Eriyik *E. coli* proteininin hazırlanması

Farelerde aşılama ile uyarılan antikor yanıtının araştırılmasında kullanılan Rec-ELISA testinde eriyik *E. coli* proteini tarif edildiği gibi hazırlanmıştır (Liang et al., 2011; Döşkaya et al., 2014). *E. coli* eriyiğı özellikle *E. coli*'ye karşı oluşmuş antikorların çapraz reaksiyon vermemesi için serum örneklerine eklenmekte ve inkübe edilmektedir. Bunun için *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS hücreleri antibiyotik içermeyen 250 ml LB besin ortamında gece boyunca inkübe edilmiş ve sonrasında 5000×g'de 10 dakika santrifüj edilerek, üst sıvı atılmıştır. Tartılan pellet 10 ml TBS tamponu ile homojenize edilmiş, 18.000 psi basınç altında soğutmalı ortamda 2 kere yüksek basınçlı homojenizatörden geçirilmiştir. Sonrasında eriyik protein miktarı 100 mg/ml olacak şekilde TBS ile sulandırılmış, % 0,05 oranında Twenn 20 eklenmiş, karıştırılmış ve -80°C'de kullanıma kadar saklanmıştır.

3.13 Hücresel İmmun Yanıtın Belirlenmesi

İlk aşılamaadan 6 hafta sonra dört gruptan 3'er adet *Swiss webster outbred* farenin dalakları steril olarak çıkarılmıştır. Dalak hücrelerinden hazırlanan tek

hücre süspansiyonları rH2, rA4, rE4, rD6, rE6 ve rH6 proteinleri ile uyarılmıştır. %5 CO₂ ve 37 °C’de inkübe edilen hücrelerden salgılanan sitokin miktarı ELISA ile belirlenmiştir (Döşkaya et al., 2007). Ayrıca IFN- γ ve IL-4 salgılayan CD4 T lenfositlerinin oranı, IFN- γ salgılayan CD8 T lenfositlerinin oranı flow sitometri ile araştırılmıştır (Gölce İz et al., 2013; Polat et al., 2013; Gölce İz et al., 2014).

IFN- γ aktifleşmiş doğal katil (NK) hücreleri ve T hücreleri tarafından salgılanıp viral, bazı bakteriyel ve protozoon enfeksiyonlarında etkili olmaktadır. IFN- γ , antijene özgü immün yanıt geliştiği zaman CD4 T_H ve CD8 Tc hücreleri tarafından da üretilmektedir (BioLegend, 2014).

IL-4 aktifleşmiş T hücreleri, mast hücreleri ve bazofiller tarafından üretilen pleitropik (bir sitokinin birden çok hücre tipi üzerine etkili olması) sitokindir. IL-4 birden fazla biyolojik yanıtta rol oynar fakat iki ana fonksiyonu vardır: 1) CD4 T hücrelerinin T_H2 hücrelerine dönüşmesini sağlamak 2) T_H1 hücreleri tarafından oluşturulan hücre aracılı immün yanıtın bastırıldığı sırada T_H2 hücreleri tarafından IL-4, IL-5, IL-10 ve IL-13 üretilmesi humoral immün yanıt oluşumunu sağlamaktadır. Bunun yanında farelerde B hücrelerinin ürettiği IgE ve IgG1 üretimini regüle etmektedir (BioLegend, 2014).

3.13.1 Tek Hücre Süspansiyonlarının Hazırlanması

Steril şartlar altında alınan fare dalakları, steril edilmiş iki buzlu mikroskop lamı arasında Ca²⁺ ve Mg²⁺ ile fenol kırmızısı içermeyen Hank’ın dengeli tuz solüsyonunda (HBSS, Biochrom, Almanya) ezilerek homojenize edilmiştir. Dalak hücreleri 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılmış ve hücreler 1 ml kırmızı kan hücre yıkıcı solüsyon (15 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA, pH:7,4) ile tekrar süspanse edilerek 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından 5 ml HBSS eklenerek izotonik ortam oluşturularak 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı atılmıştır. Daha sonra hücreler 10 ml geliştirme besiyeri [1×RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen, A.B.D.), %10 yeni doğan buzağı serumu (NBCS, HyClone, Thermo Fisher Scientific, A.B.D.), 2 mM L-glutamin (Gibco, Invitrogen, A.B.D.), 1×penisilin–streptomisin solüsyonu (100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin) (Sigma-Aldrich, A.B.D.), 0,1 mM esansiyel olmayan aminoasitler (Gibco, Invitrogen, A.B.D.) 1,0 mM sodyum piruvat (Gibco, Invitrogen, A.B.D.), 55 µM 2-merkaptetanol] ile süspanse edilmiştir. Hücrelerin canlılığı ve miktarı %0,4 tripan mavisi ve hemositometre ile saptanmıştır. Her bir fareye ait süspansiyon

5×10^6 hücre/ml içerecek şekilde geliştirme besiyeriyle sulandırılmış ve yuvarlak tabanlı 96 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına 100 µl çift çukur olacak şekilde eklenmiştir. Dalak hücre süspansiyonları son konsantrasyonları 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml ve 25 µg/ml olan rH2, rA4, rE4, rD6, rE6 ve rH6 protein karışımı ile uyarılmıştır. Protein karışımı hücrelere eklenmeden önce son konsantrasyonu 50 µg/ml olan polymyxin B ile oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir.

Pozitif kontrol olarak her çeşit aşılama ve kontrol gruplarına ait dalak hücre süspansiyonları son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde Concavalin A (Sigma-Aldrich, Almanya) ile inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak ise geliştirme besiyeri kullanılmıştır. Her bir çukurda bulunan hücreler %5 CO₂ ve 37°C’de 72 saat inkübe edilmiştir.

Flow sitometri uygulanacak plaklardaki kuyucuklara inkübasyonun son 4 saatinde Monensin, son konsantrasyonu 0,66 µl/ml olacak şekilde üretici firmanın protokolüne (BD Biosciences, A.B.D.) uygun olarak eklenmiştir. Monensin; Golgi cisimciğinden intrasellüler protein taşınımını bloklayarak Golgi içindeki sitokin birikimine veya dağılmasına neden olur. Böylece hücre içinde boyanan sitokinlerin doğru sinyaller vermesine neden olmaktadır.

3.13.2 Hücre Dışına Salgılanan Sitokin Miktarının Sitokin ELISA ile Belirlenmesi

Hücre dışına salgılanan sitokin miktarının belirlenmesi amacıyla hazırlanan plaklar 4°C’de 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı ayrı plaklara alınmıştır. Üstsıvıda IFN-γ ve IL-4 miktarının ölçülmesi için ELISA üretici firmanın protokolüne göre uygulanmıştır (BioLegend, A.B.D.). Öncelikle ELISA plağı 4 kez 300 µl yıkama tamponuyla yıkanmıştır. Bu sırada kit ile gelen IFN-γ ve IL-4 standartlar üretici firmanın protokolüne uygun olarak reaktif solüsyon kullanılarak sulandırılmıştır (IFN-γ için 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml ve 0 pg/ml) (IL-4 için 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml, 15,6 pg/ml, 7,8 pg/ml, 3,9 pg/ml, 2 pg/ml ve 0 pg/ml).

Daha sonra ELISA plağının her bir kuyucuğuna 50 µl plak reaktif tamponu ve 50 µl hücre kültürü üst sıvısı veya kontroller çift çukur eklenmiş, çalkalayarak oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklar 4 kez yıkama tamponuyla yıkanıp kit içinde bulunan antikor solüsyonundan her

kuyucuğa 100 µl ilave edilmiş oda sıcaklığında 1 saat boyunca çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Kuyucuklar 4 kez yıkama tamponuyla yıkanmış ve kit içinde bulunan Avidin-HRP A solüsyonundan 100 µl eklenerek oda sıcaklığında, çalkalayıcıda 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra kuyucuklar 5 kez yıkama tamponuyla yıkanmıştır. Yıkama sonrası kite ait substrat solüsyonundan 100 µl kuyucuklara eklenip oda sıcaklığında karanlıkta 15 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda 100 µl durdurma solüsyonuyla reaksiyon durdurulmuş ve absorbans değeri 450 nm mikropalak okuyucu ile ölçülmüştür.

Üretici firma tarafından belirlenen ELISA IFN- γ testinin duyarlılık sınırı 8 pg/ml, test aralığı ise 2000 pg/ml-31,3 pg/ml'dir. ELISA IL-4 testinin duyarlılık sınırı 0,5 pg/ml, test aralığı ise 125 pg/ml-2 pg/ml'dir.

3.13.3 Flow sitometri ile Hücre İçi Sitokin Salgılayan T Lenfosit Oranının Belirlenmesi

Öncelikle T lenfosit kümesinin belirlenmesi amacıyla CD3 yüzey antijeni boyalı hücreler belirlenmiştir. Sonrasında IFN- γ ve IL-4 salgılayan CD4 T_H lenfositler ile IFN- γ salgılayan CD8 Tc lenfositlerinin oranı flow sitometri ile değerlendirilmiştir.

3.13.3.1 Yüzey Antijeni CD3'ün Belirlenmesi

Kontrol ve aşı grubu fare dalak hücrelerinin lenfosit miktarını belirlemek amacıyla; T lenfosit yüzey antijeni olan CD3 reseptörü Alexa flour 647-A işaretli anti-fare CD3 antikoru ile boyanmıştır. Boyama Cytofix/Cytoperm Plus Fiksasyon/Permeabilizasyon kiti (BD Biosciences, A.B.D.) üretici firmanın protokolüne uygun olarak yapılmıştır.

Bölüm 3.13.1'de anlatıldığı gibi hazırlanan tek hücre süspansiyon plakları inkübasyon sonunda 4°C'de 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı dökülmüştür. CD3 reseptör içeren T lenfositlerinin miktarını belirlemek amacıyla her gruba ait 3'er kuyucuk (her kuyucuk ortalama 1×10^6 hücre içerir) 50 µl boyama tamponu içerisinde 0,5 µg anti-fare CD3 antikoru ($0,5 \mu\text{g}/10^6$ hücre oranında olacak şekilde) eklenip karanlıkta, 4°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda hücrelere 250 µl boyama tamponu eklenmiş ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek üst sıvı dökülmüştür. Bu işlem iki kere daha tekrarlanmıştır. Hücreler 100 µl Cytofix/Cytoperm Plus (BD Biosciences, A.B.D.)

fiksasyon/permeabilizasyon solüsyonunda süspanse edilmiş ve karanlıkta 4°C’de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücelere 250 µl permeabilizasyon yıkama tamponu (Perm/Wash, BD, A.B.D.) eklenerek 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı atılmıştır. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Yıkama sonrası hüceler 500 µl boyama tamponunda süspanse edilmiş ve flow sitometriye geçilmiştir.

Yüzey antijenlerinin flow sitometri (BD FACSAria, BD Biosciences, A.B.D.) ile belirlenebilmesi için cihazın floresan ışık algılayan kanallarında 10⁴ dalak hücresi geçirilerek CD3 reseptör içeren T hücreleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler, BD FACSDiva programı (BD Biosciences, A.B.D.) kullanarak analiz edilmiştir.

3.13.3.2 CD4 ve CD8 reseptörlü T Lenfositlere Ait Hücre İçi Sitokinlerin Belirlenmesi

Kontrol ve aşılanmış fare gruplarına ait CD4 reseptörlü T_H ve CD8 Tc lenfositlerinin ürettiği hücre içi sitokinlerin (IFN-γ ve IL-4) belirlenebilmesi için aynı gruba ait 3 ayrı fareye ait hücrelerin bulunduğu 3’er kuyucuk Çizelge 3.5’te belirtilen antikorlar ile boyanmıştır. Boyama Cytofix/Cytoperm Plus Fiksasyon/Permeabilizasyon kiti ile üretici firmanın protokolüne (BD Biosciences, A.B.D.) uygun olarak yapılmıştır.

Çizelge 3.5 CD4 ve CD8 reseptörlü T hücrelerin salgıladığı hücre içi sitokinlerin belirlenmesinde kullanılan antikorlar

Grup	Yüzey reseptör bağlayan antikor	Hücre için sitokin bağlayan antikor
CD4 ve IFN-γ	FITC işaretli anti-fare CD4	PE işaretli anti-fare IFN-γ
CD4 ve IL-4	FITC işaretli anti-fare CD4	PE işaretli anti-fare IL-4
CD8 ve IFN-γ	FITC işaretli anti-fare CD8	PE işaretli anti-fare IFN-γ
FITC: Floresan izosiyanat; PE: R-phycoerythin, fikoeritrin		

Bölüm 3.13.1’de anlatıldığı gibi hazırlanan tek hücre süspanسیون plakları inkübasyon sonunda 4°C’de 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı dökülmüştür. Her gruba ait 3’er kuyucuk (her kuyucuk ortalama 1×10⁶ hücre içerir) 50 µl boyama tamponu içinde 0,5 µg FITC işaretli anti-fare CD4 (iki kuyucuk) ve 0,5 µg FITC işaretli anti-fare CD8a (bir kuyucuk) antikorları eklenerek karanlıkta 4°C’de, 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası

hücreler 250 µl boyama tamponu eklenerek 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş üst sıvı atılmıştır. Bu işlem iki kere daha tekrar edilmiştir. Hücreler 100 µl Cytofix/Cytoperm fiksasyon/permeabilizasyon solüsyonuyla (BD, A.B.D.) süspanse edilmiş ve karanlıkta 4°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda hücelere 250 µl permeabilizasyon yıkama tamponu eklenerek 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı dökülmüştür. Bu işlem iki kere tekrarlanmıştır. Daha sonra 50 µl permeabilizasyon yıkama tamponu içinde 0,5 µg/10⁶ hücre olacak şekilde sulandırılan PE işaretli anti-fare IFN-γ (CD4⁺ ve CD8⁺ boyalı hücrelerin bulunduğu iki kuyucuğa) ve 0,5 µg/10⁶ hücre olacak şekilde sulandırılan PE işaretli anti-fare IL-4 (CD4⁺ boyalı hücrelerin bulunduğu bir kuyucuğa) antikorları eklenerek karanlıkta 4°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücelere 250 µl permeabilizasyon yıkama tamponu eklenerek 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı atılmıştır. Bu işlem iki kere tekrarlanmıştır. Hücreler 500 µl boyama tamponunda süspanse edilmiştir.

Hücre içi sitokinlerin flow sitometri ile belirlenebilmesi için, BD FACSAria cihazının floresan ışın algılayan kanallarında 10⁴ dalak hücresi geçirilerek CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfositlerinin salgıladığı IFN-γ ve IL-4 oranları belirlenmiştir. Elde edilen veriler BD FACSDiva programı (BD Biosciences, A.B.D.) kullanılarak analiz edilmiştir.

3.14 İstatiksel Analiz

Çalışma sırasında elde edilen veriler Microsoft Excel 2010 programı ile işleminden geçirilmiş ve istatiksel analiz Prism 3.03 programı (GraphPad, San Diego, CA) ile gerçekleştirilmiştir. Aşılama grupları arasındaki farkı değerlendirmek için çift kuyruklu *t* testi ve tek yönlü varyans analizinden yararlanılmıştır. Aşının letal toxoplasmozise karşı oluşturduğu korumayı göstermek için Kaplan-Meier yaşam eğrilerinden yararlanılmıştır. Humoral ve hücrel immun yanıt sonuçları ve yaşam süreleri, aritmetik ortalama ± standart sapma olarak verilmiş, aksi belirtilmediği takdirde, 0,05 ve daha küçük *P* değerleri anlamlı olarak yorumlanmıştır.

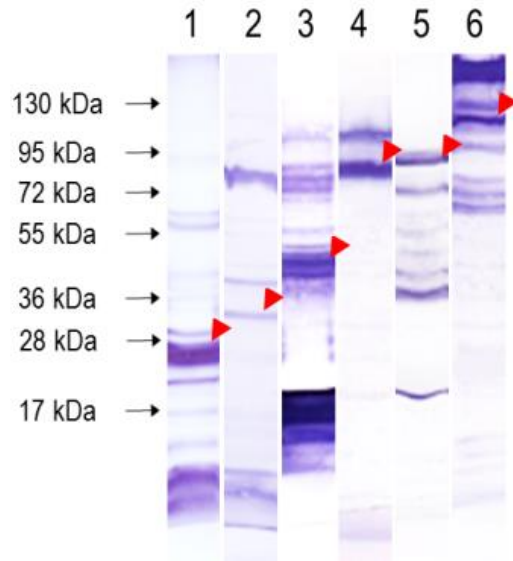
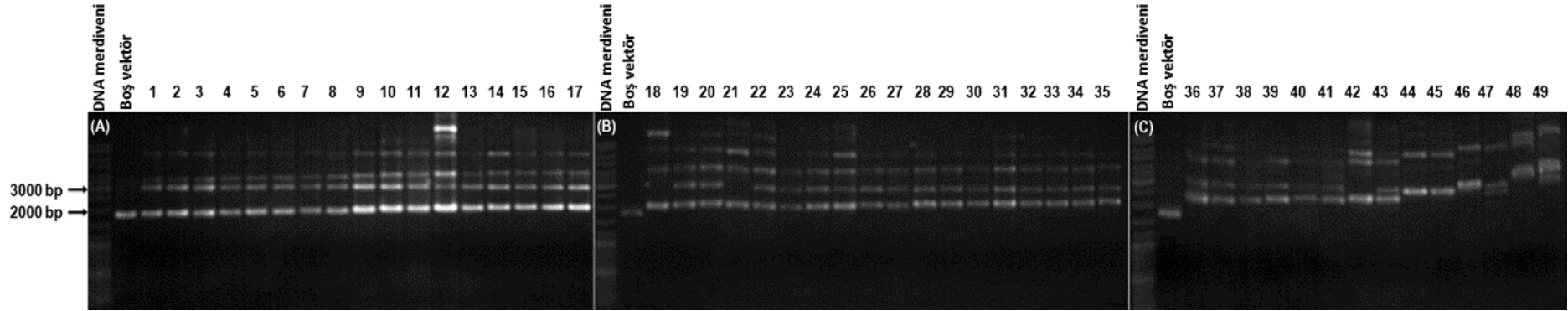
4. BULGULAR

4.1 *T. gondii*'ye ait 49 Aşı Adayı Olabilecek Rekombinant Proteini Kodlayan Plazmitlerinin Gösterilmesi

Bu çalışmada öncelikle aşı adayı olabilecek 49 tane antijenik proteini kodlayan plazmitlerin protein ekspresyonunun yapılacağı *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Seçilen kolonilerde plazmitlerin varlığını göstermek amacıyla kolonilerden plazmit saflaştırma kiti ile izole edilen plazmitler %1 agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 4.1).

4.2 Antijenik Rekombinant Proteinlerin Ekspresyon Seviyeleri

Bu çalışmada 49 ayrı antijenik proteinin üretimini sağlamak ve hangilerinin aşıda kullanılacağını belirleyebilmek amacıyla *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS hücrelerinde küçük ölçekli rekombinant protein ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Eksprese olan rekombinant proteinler Ni^{2+} ile kaplanmış boncuklar kullanılarak saflaştırılmış ve Western Blot ile görüntülenmiştir (Şekil 4.2). Elde edilen sonuçlara göre 49 antijenik protein kodlayan plazmit arasında 6 tanesinin (rH2, rA4, rE4, rD6, rE6 ve rH6) aşı geliştirmeye uygun şekilde eksprese olduğu saptanmıştır. Western blot görüntülerinde 6 rekombinant proteinin ortalama moleküler ağırlıkları rH2: 26,7 kDa, rA4: 33,9 kDa, rE4: 38,8 kDa, rD6: 78,1 kDa, rE6: 81,2 kDa, rH6: 110,2 kDa'dur.



Şekil 4.1 Aşı çalışmalarında kullanılabilecek 49 rekombinant proteini kodlayan plazmitlerin agaroz jel görüntüsü; **(A)** 1-17; sütun: puET-A1; puET-B1; puET-C1; puET-D1; puET-E1; puET-F1; puET-G1; puET-H1; puET-A2; puET-B2; puET-C2; puET-D2; puET-E2; puET-F2; puET-G2; **puET-H2**; puET-A3 **(B)** 18-35; sütun: puET-B3; puET-C3; puET-D3; puET-E3; puET-F3; puET-G3; puET-H3; **puET-A4**; puET-B4; puET-C4; puET-D4; **puET-E4**; puET-F4; puET-G4; puET-H4; puET-A5; puET-B5; puET-C5 **(C)** 36-49; sütun: puET-D5; puET-E5; puET-F5; puET-G5; puET-H5; puET-A6; puET-B6; puET-C6; **puET-D6**; **puET-E6**; puET-F6; puET-G6; **puET-H6**; puET-A7

Şekil 4.2 Aşı adayı 6 rekombinant proteinin optimizasyon amaçlı protein ekspresyonlarının Western blot ile gösterilmesi. 1. sütun: protein merdiveni; 2. sütun: rH2; 3. sütun: rA4; 4. sütun: rE4; 4. sütun: rD6; 5. sütun: rE6; 6. sütun: rH6

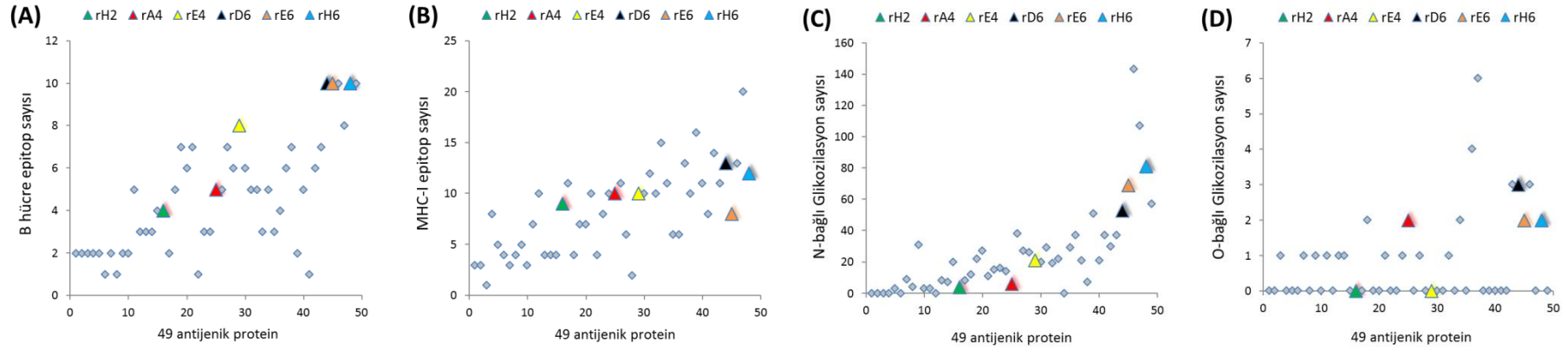
4.3 Biyoinformatik analiz

Western blot analizi ile ekspresyon seviyeleri incelenen aşı adayı olabilecek 49 rekombinant proteinin MHC-I ve B hücre epitop bölgeleri biyoinformatik yöntemlerle incelenmiştir (Şekil 4.3).

Biyoinformatik analiz sonucunda iyi eksprese olmuş ve saflaştırılmış aşı adayı 6 proteinin (rH2, rA4, rE4, rD6, rE6, rH6) hem B epitop bölgeleri ve hemde CD8 T-Sitotoksik lenfositlerinin bağlandığı MHC-I epitop bölgeleri bulunduğu saptanmıştır (Şekil 4.3 A-B). Aşı adayı rD6, rE6, rH6, rE4, rA4 ve rH2 proteinlerinde sırasıyla 10 (%1,38), 10 (%1,38), 10 (%0,95), 8 (%2,2), 5 (%1,6) ve 4 (%1,69) adet B lenfosit epitopu bulunmaktadır. MHC I epitopları ise rD6, rH6, rA4, rE4, rH2 ve rE6 proteinlerinde sırasıyla 13 (%1,79), 12 (%1,14), 10 (%3,19), 10 (%2,75), 9 (%3,81) ve 8 (%1,11) adet bulunmaktadır (Çizelge 4.1).

Aşı adayı olabilecek antijenik 49 rekombinant proteinin N- ve O-bağlı glikozilasyon miktarı Şekil 4.3 C ve D’de verilmiştir. Aşı adayı rD6, rA4, rE6 ve rH6 proteinlerinde sırasıyla 3 (%0,41), 2 (%0,64), 2 (%0,28), 2 (%0,19) adet N-bağlı Glikozilasyon bölgesi bulunmaktadır. rH2 ve rE4 proteinlerinde N-bağlı Glikozilasyon bölgesi bulunmamaktadır. O-bağlı Glikozilasyon bölgeleri ise rH6, rE6, rD6, rE4, rA4 ve rH2 proteinlerinde sırasıyla 81 (%7,7), 69 (%9,54), 53 (%7,29), 21 (%5,77), 6 (%1,92) ve 4 (%1,69) adet bulunmaktadır (Çizelge 4.1).

Aşı adayı 6 proteinin epitop bölgelerindeki glikozilasyon miktarı incelendiğinde B epitop bölgesinde N-bağlı Glikozilasyon bölgesi bulunmadığı, O-bağlı Glikozilasyonun ise rD6, rE6, rH6, rE4, rA4 proteinlerinde sırasıyla 18, 18, 10, 9 ve 2 adet olduğu saptanmıştır. MHC I epitop bölgesinde N-bağlı Glikozilasyon bölgesi rD6 ve rH6 proteinlerinde sadece birer adet bulunduğu, O-bağlı Glikozilasyonun ise rE4, rD6, rH6 ve rE6 proteinlerinde sırasıyla 7, 7, 5 ve 4 adet olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.1).



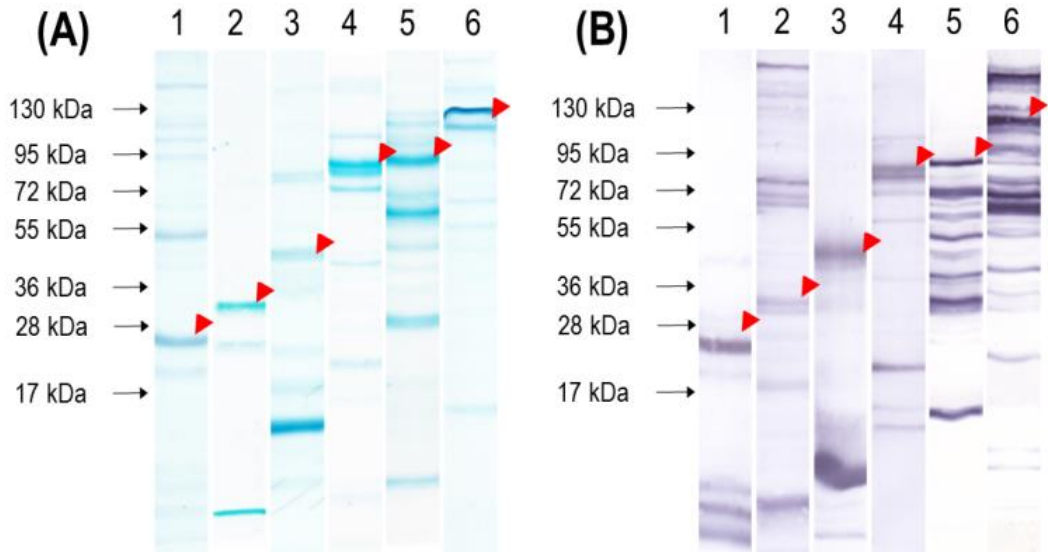
Şekil 4.3 Aşı adayı olabilecek antijenik 49 rekombinant proteinin (A) B hücre ve (B) MHC-I epitopları ile (C) N- ve (D) O-bağlı Glikozilasyon bölgelerinin biyoinformatik analiz sonuçları

Çizelge 4.1 Aşı adayı 6 proteinin biyoinformatik analiz sonuçları

Protein	Aminoasit sayısı	Tüm Proteinde B epitop Bölgesi Sayısı/ Yüzdesi (%)	Tüm Proteinde MHC I Epitop Bölgesi Sayısı/ Yüzdesi (%)	Tüm Proteinde N-bağlı Glikozilasyon Sayısı / Yüzdesi (%)	B Epitopta N-bağlı Glikozilasyon Sayısı	MHC I Epitopta N-bağlı Glikozilasyon Sayısı	Tüm Proteinde O-bağlı Glikozilasyon Sayısı / Yüzdesi (%)	B Epitopta O-bağlı Glikozilasyon Sayısı	MHC I Epitopta O-bağlı Glikozilasyon Sayısı
H2	236	4 (1,69)	9 (3,81)	0 (0,00)	0	0	4 (1,69)	0	0
A4	313	5 (1,60)	10 (3,19)	2 (0,64)	0	0	6 (1,92)	2	0
E4	364	8 (2,20)	10 (2,75)	0 (0,00)	0	0	21 (5,77)	9	7
D6	727	10 (1,38)	13 (1,79)	3 (0,41)	0	1	53 (7,29)	18	7
E6	723	10 (1,38)	8 (1,11)	2 (0,28)	0	0	69 (9,54)	18	4
H6	1052	10 (0,95)	12 (1,14)	2 (0,19)	0	1	81 (7,70)	10	5

4.4 Aşı adayı rH2, rA4, rE4, rD6, rE6 ve rH6 Proteinlerinin Saflaştırılması

Büyük ölçekli ekspresyon sonrası elde edilen *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS hücreleri yüksek basınç altında parçalanmıştır. rH2, rA4, rE4, rD6, rE6 ve rH6 proteinleri Ni^{2+} şelasyon Afinite Kolonu ve sonrasında jel filtrasyon kolonu kullanılarak saflaştırılmıştır. Proteinlerin saflığı SDS-PAGE (Şekil 4.4.A) ve Western blot (Şekil 4.4.B) yöntemleriyle belirlenmiştir. Aşı adayı 6 rekombinant proteinin ortalama moleküler ağırlıkları rH2: 26,7 kDa, rA4: 33,9 kDa, rE4: 38,8 kDa, rD6: 78,1 kDa, rE6: 81,2 kDa, rH6: 110,2 kDa'dur.



Şekil 4.4 Aşı adayı 6 rekombinant proteinin saflaştırılma sonrası **(A)** SDS-PAGE ve **(B)** Western blot görüntüleri. 1. sütun: rH2 proteini; 2. Sütun: rA4 proteini; 3. sütun: rE4 proteini; 4. sütun: rD6 proteini; 5. sütun: rE6 proteini; 6. sütun: rH6 proteini

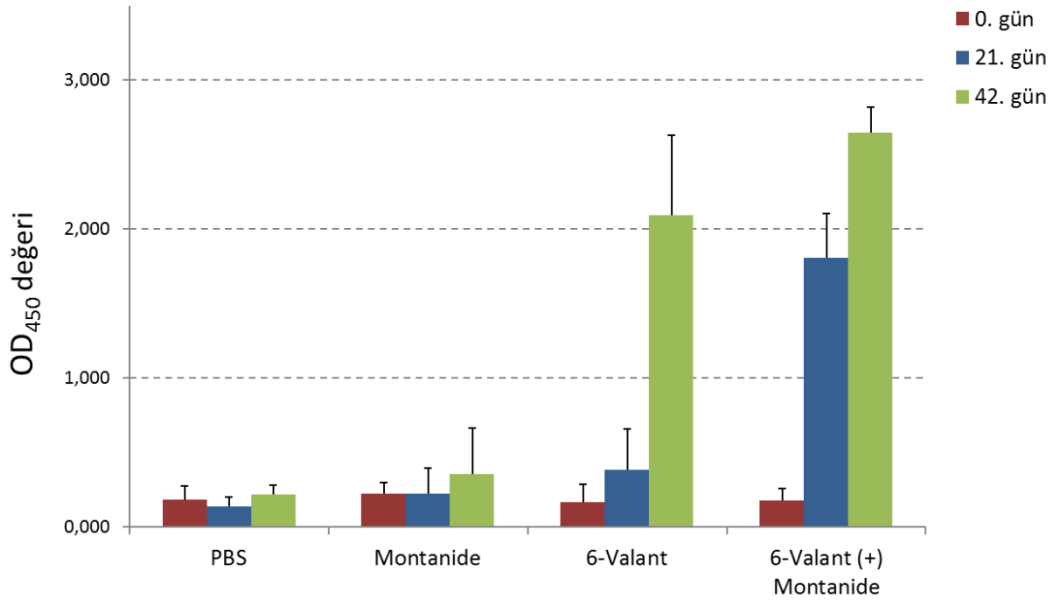
4.5 Humoral İmmun Yanıt

Aşılama ile farelerde uyarılan total IgG yanıtı ve bu yanıtın IgG1 veya IgG2a yönüne kutuplanması rH2, rA4, rE4, rD6, rE6 ve rH6 proteinlerinin kullanıldığı rec-ELISA yöntemiyle araştırılmıştır.

4.5.1 Uyarılan Total IgG Antikor Yanıtı

Rec-ELISA yöntemiyle aşılama öncesi ve sonrasında farelerden alınan serum örneklerinde rH2, rA4, rE4, rD6, rE6 ve rH6 proteinlerine karşı oluşan total IgG antikor yanıtı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PBS ve Montanide kontrol gruplarında 42. gün sonunda total IgG seviyesinde aşılama öncesine göre

anlamlı bir artış saptanmamıştır. 6-Valant kontrol grubunda total IgG yanıtının 42. günde aşılama öncesine göre belirgin bir artış göstermiştir ($P<0,0001$; ***). 6-Valant (+) Montanide aşı grubunda ise 42. günde aşılama öncesine göre belirgin artış sağlanmıştır ($P<0,0001$; ***). 6-Valant (+) Montanide aşı grubunun total IgG yanıtının 6-Valant kontrol grubuna göre belirgin şekilde yüksek olduğu saptanmıştır ($P=0,002$; **) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Aşı ve kontrol grubu farelerde oluşan total IgG yanıtı

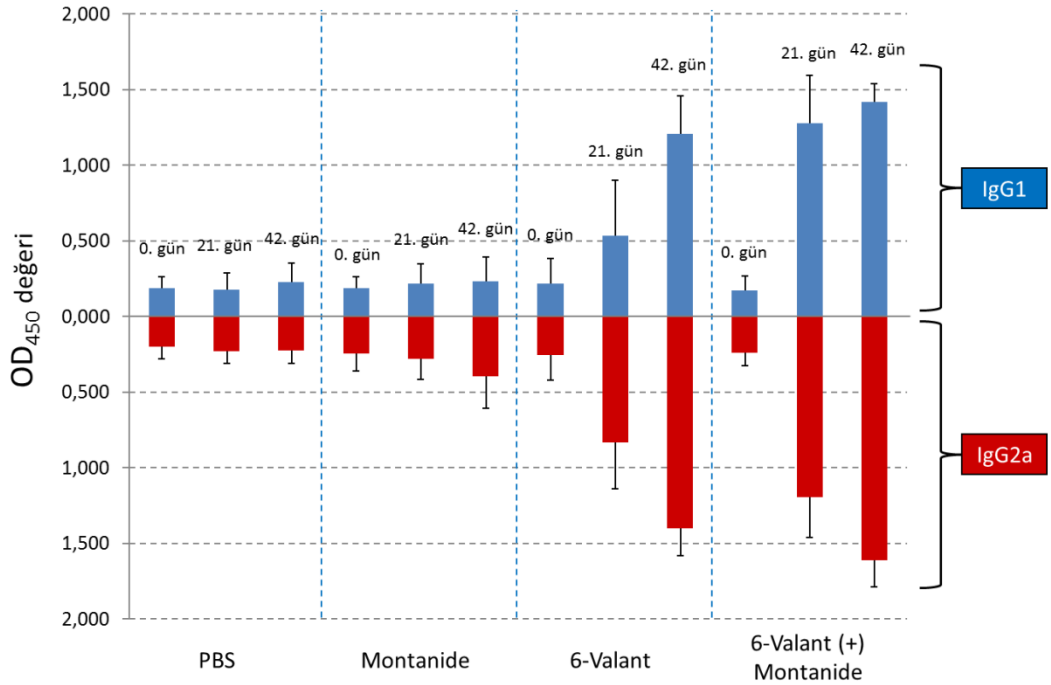
4.5.2 Uyarılan IgG1 ve IgG2a Antikor Yanıtı

Rec-ELISA yöntemiyle aşılama öncesi ve sonrasında farelerden alınan serum örneklerinde rH2, rA4, rE4, rD6, rE6 ve rH6 proteinlerine karşı oluşan IgG1 ve IgG2a antikor yanıtları araştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre PBS ve Montanide kontrol gruplarında 42. gün sonunda IgG1 seviyesinde aşılama öncesine göre anlamlı bir artış saptanmamıştır. 6-Valant kontrol grubunda IgG1 yanıtının 42. günde aşılama öncesine göre belirgin bir artış göstermiştir ($P<0,0001$; ***). 6-Valant (+) Montanide aşı grubunda ise 42. günde aşılama öncesine göre belirgin artış sağlanmıştır ($P<0,0001$; ***). 6-Valant (+) Montanide aşı grubunun IgG1 yanıtının 6-Valant kontrol grubuna göre belirgin şekilde yüksek olduğu saptanmıştır ($P=0,0218$; *) (Şekil 4.6).

IgG2a sonuçları incelendiğinde PBS ve Montanide kontrol gruplarında 42. gün sonunda aşılama öncesine göre anlamlı bir artış saptanmamıştır. 6-Valant kontrol grubunda IgG2a yanıtının 42. günde aşılama öncesine göre belirgin bir artış göstermiştir ($P<0,0001$; ***). 6-Valant (+) Montanide aşı grubunda ise 42. günde aşılama öncesine göre belirgin artış sağlanmıştır ($P<0,0001$; ***). 6-Valant (+) Montanide aşı grubunun IgG2a yanıtının 6-Valant kontrol grubuna göre belirgin şekilde yüksek olduğu saptanmıştır ($P=0,0113$; *) (Şekil 4.6).

6-Valant (+) Montanide aşı grubunun IgG1 ve IgG2a antikor yanıtları karşılaştırıldığında 42. günde IgG2a yanıtının IgG1 yanıtına göre belirgin şekilde daha fazla olduğu saptanmıştır ($P= 0,0067$; **) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Aşı ve kontrol grubu farelerde oluşan IgG1 ve IgG2a yanıtları

4.6 Hücresel İmmün Yanıt

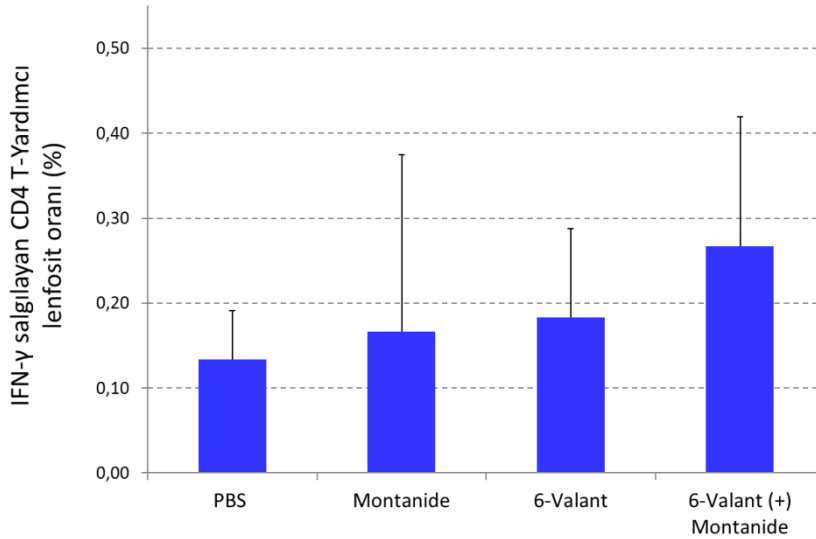
İlk aşılamadan sonra dört gruba ait farelerin dalak hücrelerinden hazırlanan tek hücre süspansiyonları rH2, rA4, rE4, rD6, rE6 ve rH6 proteinleri ile uyarılmıştır. Uyarım sonrası IFN- γ ve IL-4 salgılayan CD4 T-Yardımcı ve IFN- γ salgılayan CD8 T-Sitotoksik lenfositlerin oranı flow sitometri ile incelenmiştir. Ayrıca lenfositlerce hücre dışına salgılanan IFN- γ ve IL-4 miktarı sitokin ELISA ile belirlenmiştir.

Dalak hücrelerini uyuracak protein karışımı konsantrasyonunu belirlemek amacıyla optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Aşı grubuna ait fare dalak hücreleri, hücre kültürü ortamında son konsantrasyonları 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml ve 25 µg/ml olan rH2, rA4, rE4, rD6, rE6 ve rH6 protein karışımı ile uyarılmıştır. Veriler sonucunda dalak hücrelerinin 25 µg/ml konsantrasyonda protein karışımı ile uyarılmasının optimum etkinliği gösterdiği saptanmıştır.

Hücrel immun yanıtın saptanmasında PBS kontrol grubuna ait fare dalak hücreleri anti-CD3 ile işaretlenerek CD3 reseptörlü T lenfosit popülasyonları belirlenmiştir.

4.6.1 IFN- γ salgılayan CD4 T-Yardımcı Lenfositlerin Oranı

Kontrol ve aşı gruplarına ait farelerin dalak hücrelerinin rH2, rA4, rE4, rD6, rE6 ve rH6 protein karışımı ile uyarımı sonrası IFN- γ salgılayan CD4 T-Yardımcı lenfositlerin oranı Şekil 4.7’de verilmiştir. Elde edilen verilere göre, 6-Valant (+) Montanide uygulanan aşı grubunda IFN- γ salgılayan CD4 T-Yardımcı lenfosit oranı PBS, Montanide ve 6-Valant kontrol gruplarına göre sırasıyla 2, 1,6 ve 1,45 kat artmıştır.

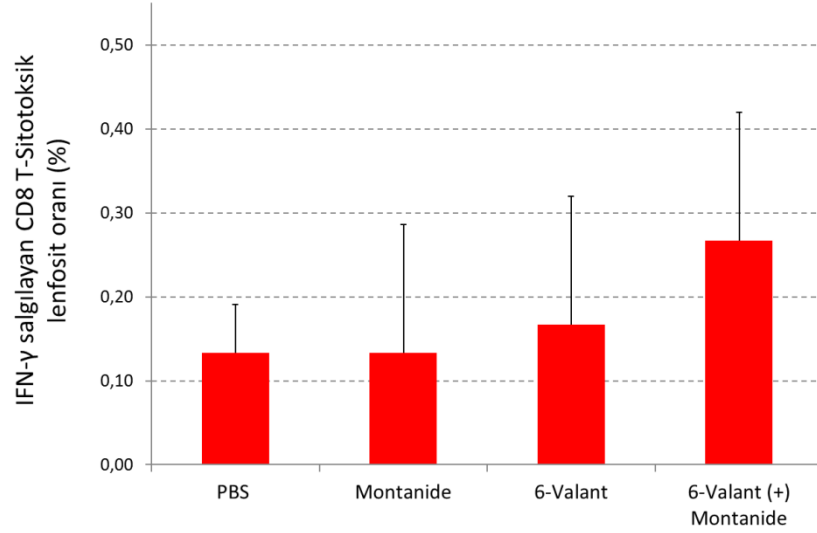


Şekil 4.7 Aşı ve kontrol grubu farelerde IFN- γ salgılayan CD4 T-Yardımcı Lenfositlerini Oranı

4.6.2 IFN- γ salgılayan CD8 T-Sitotoksik Lenfositlerin Oranı

Kontrol ve aşı gruplarına ait farelerin dalak hücrelerinin rH2, rA4, rE4, rD6, rE6 ve rH6 protein karışımı ile uyarımı sonrası IFN- γ salgılayan CD8 T-

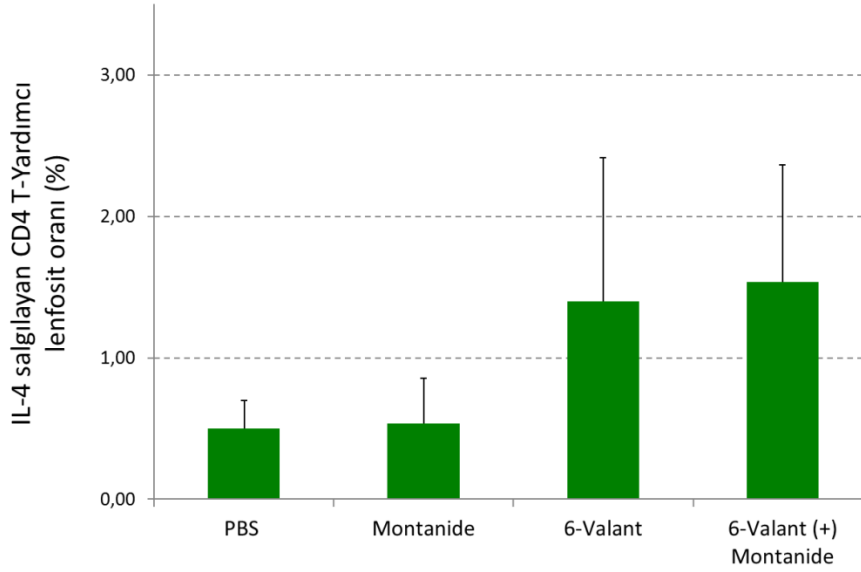
Sitotoksik lenfositlerin oranı Şekil 4.8’de verilmiştir. Elde edilen verilere göre, 6-Valant (+) Montanide uygulanan aşı grubunda IFN- γ salgılayan CD8 T-Sitotoksik lenfosit oranı PBS, Montanide ve 6-Valant kontrol gruplarına göre sırasıyla 2, 2 ve 1,6 kat artmıştır.



Şekil 4.8 Aşı ve kontrol grubu farelerde IFN- γ salgılayan CD8 T-Sitotoksik Lenfositlerini Oranı

4.6.3 IL-4 salgılayan CD4 T-Yardımcı Lenfositlerin Oranı

Kontrol ve aşı gruplarına ait farelerin dalak hücrelerinin rH2, rA4, rE4, rD6, rE6 ve rH6 protein karışımı ile uyarımı sonrası IL-4 salgılayan CD4 T-Yardımcı lenfositlerin oranı Şekil 4.9’da verilmiştir. Elde edilen verilere göre, 6-Valant (+) Montanide uygulanan aşı grubunda IL-4 salgılayan CD4 T-Yardımcı lenfosit oranı PBS, Montanide ve 6-Valant kontrol gruplarına göre sırasıyla ortalama 3,07, 2,88 ve 1,1 kat artmıştır.

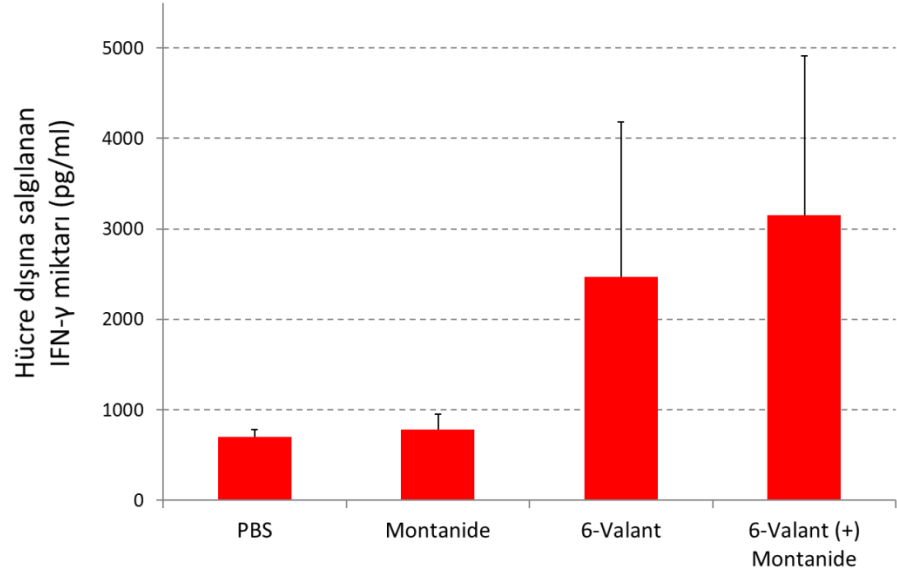


Şekil 4.9 Aşı ve kontrol grubu farelerde IL-4 salgılayan CD4 T-Yardımcı Lenfositlerinin Oranı

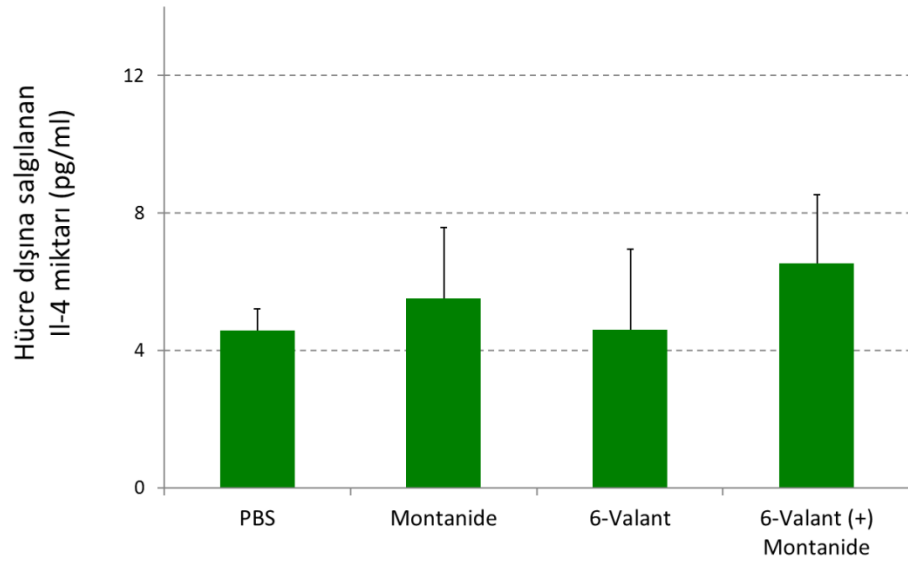
4.6.4 Lenfositlerin Hücre Dışına Salgıladığı IFN- γ ve IL-4 Miktarı

Kontrol ve aşı gruplarına ait farelerin dalak hücrelerinin rH2, rA4, rE4, rD6, rE6 ve rH6 protein karışımı ile uyarımı sonrası lenfositlerce hücre dışına salgılanan IFN- γ ve IL-4 miktarları Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre 6-Valant (+) Montanide aşı grubu IFN- γ miktarı PBS ve Montanide ile aşılanan kontrol gruplarına göre belirgin şekilde artmıştır ($P=0,0007$; $P=0,001$; ***). 6-Valant (+) Montanide aşı grubu IFN- γ miktarının 6-Valant kontrol grubundan daha fazla olduğu saptanmıştır (Şekil 4.10). IL-4 ölçüm sonuçlarına göre 6-Valant (+) Montanide aşı grubu IL-4 miktarı PBS ve Montanide ile aşılanan kontrol gruplarına göre belirgin şekilde artmıştır ($P=0,0133$; $P=0,0183$; *). 6-Valant (+) Montanide aşı grubu IL-4 miktarının 6-Valant kontrol grubundan daha fazla olduğu saptanmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.10 Aşı ve kontrol grubu farelerde hücre dışına salgılanan IFN-γ miktarı

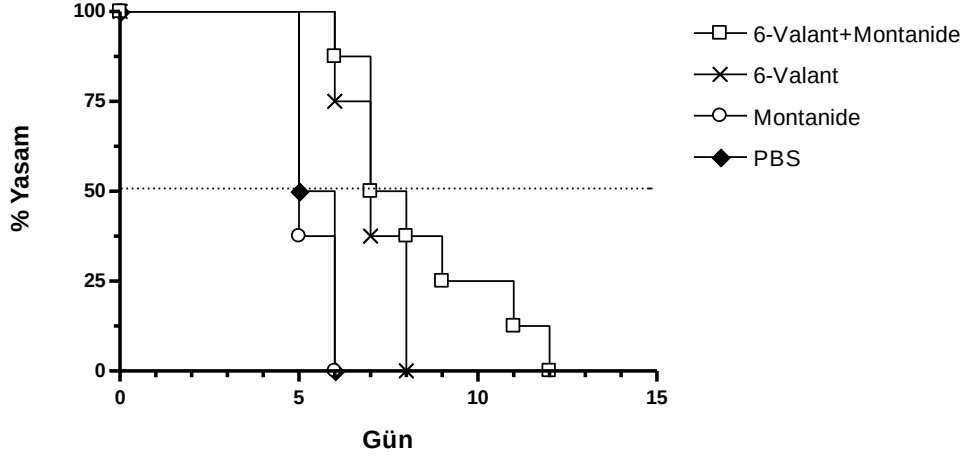


Şekil 4.11 Aşı ve kontrol grubu farelerde hücre dışına salgılanan IL-4 miktarı

4.7 Letal Toksoplazmozise Karşı Korunma

Aşı ve Kontrol grubu fareler, ikinci aşılardan 3 hafta sonra, 1×10^5 *T. gondii* Ankara suşu takizoitleri ile enfekte edilmiştir. Ortalama yaşam süresi PBS ve Montanide uygulanan kontrol gruplarında sırasıyla $5,5 \pm 0,53$ ve $5,38 \pm 0,52$ gün olarak saptanmıştır. 6-Valant (+) Montanide ve 6-Valant aşısı uygulanan farelerde ortalama yaşam süresi sırasıyla $8,38 \pm 2,13$ ve $7,13 \pm 0,83$ olup kontrollerden belirgin şekilde yüksek olduğu saptanmıştır ($P < 0,01$; **). Sonuçlar 6-Valant (+)

Montanide aşısının *T. gondii* Ankara suşu takizoitleri ile oluşturulan letal toksoplazmozise karşı en uzun korunmanın sağlandığını göstermektedir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 Aşı ve kontrol grubu farelerin ikinci aşılardan 3 hafta sonra *T. gondii* Ankara suşu ile enfekte edilmeleri sonrası gözlenen yaşam süreleri

5. TARTIŞMA

Son yıllarda *Toxoplasma gondii*'ye yönelik rekombinant protein aşı çalışmalarında birden fazla rekombinant proteinin kullanıldığı multivalent aşılar geliştirilmektedir. Liang et al. (2011) ve Felgner et al. (2015) yaptıkları çalışmalarda *T. gondii*'ye özgü aşı adayı olabilecek 200 üzerinde antijenin keşfini gerçekleştirmiştir. Bu antijenler içinden aşı adayı olabilecek 49 protein seçilmiş ve küçük ölçekli ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler 6 proteinin (rH2, rA4, rE4, rD6, rE6 ve rH6) aşı formülasyonunda kullanılmaya uygun şekilde eksprese olduğunu göstermiştir (Bkz. Çizelge 3.1; Şekil 4.2).

Toxoplasma gondii'ye karşı korunmada özellikle CD8 T-Sitotoksik lenfositler görev aldığından aşı adayı proteinlerin B hücre ve MHC-I epitop bölgeleri biyoinformatik yöntemlerle incelenmiştir (Moutafsi et al., 2006; Kotturi et al., 2007; Paul et al., 2013; Yao et al., 2012). Elde edilen veriler aşı adayı 6 proteinin B hücre ve MHC-I epitopları içerdiğini göstermiştir (Bkz. Şekil 4.3 A-B; Çizelge 4.1).

Bunun yanında proteinlerin glikozilasyonu proteinin stabilitesi, üç boyutlu yapısı, yüzey ekspresyonu ve antijenitesi açısından büyük önem taşımaktadır (Hounsell and Davies, 1993). Lektin blotlama ile 11 tane *T. gondii* proteininin N-bağlı glikozilasyon ve 15 tane proteinin ise O-bağlı glikozilasyon içerdiği saptanmıştır (Luk, 2011). *T. gondii*'nin N-bağlı glikozilasyonun bulunduğu proteinlerin yaşamsal faaliyetleri için önemli olduğu, O-bağlı glikozilasyonların ise ekskretuar-sekretuar antijenik proteinlerde bulunduğu rapor edilmektedir (Magdalena et al., 2004). Bu sebeplerle aşı adayı olabilecek 49 antijenik proteinin N- ve O-bağlı glikozilasyon bölgeleri biyoinformatik yöntemlerle incelenmiştir (Frank and Schloissnig, 2010). Elde edilen sonuçlara göre rH2 ve rE4 proteinleri dışında bütün proteinlerde N-bağlı glikozilasyon bölgesi bulunmaktadır. O-bağlı glikozilasyon bölgesi ise bütün proteinlerde bulunmaktadır (Bkz. Şekil 4.3 C-D).

Bu aşamada daha ileri bir analiz yapılarak B hücre ve MHC-I epitoplarında bulunan N- ve O-bağlı glikozilasyon bölgeleri biyoinformatik yöntemlerle incelenmiştir. Elde edilen veriler B epitop bölgesinde N-bağlı glikozilasyon bölgesi bulunmayıp O-bağlı glikozilasyonun ise rD6, rE6, rH6, rE4, rA4 proteinlerinde bulunduğunu göstermiştir. MHC-I epitop bölgesinde N-bağlı glikozilasyon bölgesi sadece rD6 ve rH6 proteinlerinde bulunup O-bağlı glikozilasyon ise rE4, rD6, rH6 ve rE6 proteinlerinde saptanmıştır (Bkz Çizelge

4.1). Bu veriler aşı adayı 6 proteinin ve epitoplarının çeşitli oranlarda glikozile olduğunu ve antijenikliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Multivalent rekombinant protein aşı formülasyonu oluşturmak için aşı adayı 6 protein büyük ölçekli eksprese edilmiş ve sonrasında affinite ve jel filtrasyon kolonları ile ileri derecede saflaştırılmış ve endotoksini eksiltirilmiştir. Daha sonra aşı adayı proteinler Montanide ISA 50V adjuvantı ile birleştirilerek *T. gondii*'ye karşı ilk defa 6 rekombinant protein kullanılan aşı formülasyonu (6-Valant (+) Montanide) geliştirilmiştir.

Geliştirilen aşı formülasyonu ve kontrol grubu aşılar *outbred Swiss webster* farelere uygulanmıştır. Aşılama ile 6-Valant (+) Montanide aşı grubunda uyarılan total IgG ikinci aşılamadan 21 gün sonra aşılama öncesine göre belirgin artış sağlamıştır ($P<0,0001$). 6-Valant (+) Montanide aşısı ile uyarılan total IgG yanıtının 6-Valant kontrol grubuna göre belirgin şekilde yüksek olduğu da saptanmıştır ($P=0,002$) (Bkz. Şekil 4.5). IgG1 ve IgG2a altgrup antikor yanıtı incelendiğinde ise 6-Valant (+) Montanide aşı grubunun IgG2a yanıtının IgG1 yanıtına göre belirgin şekilde daha fazla olduğu saptanmıştır ($P<0,001$) (Bkz. Şekil 4.6). Bu sonuçlar adjuvante multivalent rekombinant protein aşısının (6-Valant (+) Montanide) immun yanıtı T_H1 yönüne polarize olduğunu göstermektedir.

Hücrel immun yanıt incelendiğinde 6-Valant (+) Montanide uygulanan aşı grubunda IFN- γ salgılayan CD8 T-Sitotoksik lenfosit oranının kontrollere göre 1,6-2 kat arasında arttığı gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.8). Bunun yanında IFN- γ salgılayan CD4 T-Yardımcı lenfosit oranının da kontrollere göre 1,45-2 kat arasında arttığı saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.7). Lenfositlerin hücre dışına salgıladığı IFN- γ miktarları incelendiğinde 6-Valant (+) Montanide aşının PBS ve Montanide kontrol gruplarına göre belirgin şekilde daha fazla IFN- γ oluşturduğu ($P<0,001$) 6-Valant kontrol grubundan ise daha fazla olduğu saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.10). Ayrıca IL-4 salgılayan CD4 T-Yardımcı lenfositlerin oranı incelendiğinde kontrollere göre ortalama 1,1-3 kat arasında arttığı saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.9). Lenfositlerin hücre dışına salgıladığı IL-4 miktarları incelendiğinde 6-Valant (+) Montanide aşının PBS ve Montanide kontrol gruplarına göre belirgin şekilde daha fazla IL-4 üretimi sağladığı ($P<0,05$) 6-Valant kontrol grubundan daha fazla olduğu saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.11). Bu sonuçlar adjuvante multivalent rekombinant protein aşısının (6-Valant (+) Montanide) immun yanıtı T_H1 yönüne daha fazla kutuplandığını göstermektedir. Ayrıca *T. gondii*'ye karşı korunmada

başlıca önemli olan IFN- γ salgılayan CD8 T-Sitotoksik lenfositlerin aşılama ile artış göstermesi aşının istenilen koruyucu immun yanıtı uyardığını göstermektedir.

Aşılama ile oluşturulan korunmanın belirlenmesinde farelere intraperitoneal yoldan 100.000 *T. gondii* Ankara suşu takizoiti uygulanmıştır. Adjuvante multivalent rekombinant protein aşısının farelerde ortalama yaşam süresini ortalama 5 günden $8,38 \pm 2,13$ güne çıkarttığı ve kontrollerden belirgin şekilde yüksek olduğu saptanmıştır ($P < 0,01$).

Literatürde bu çalışmaya benzer multivalent protein eksprese eden DNA aşısı çalışmasında GRA1, GRA2, GRA4 ve SAG1'e ait 6 antijenik epitopun eksprese edildiği multi-epitop DNA aşısı geliştirilmiştir. Bu aşı ile güçlü humoral ve T_H1 tipi hücresel immun yanıtın uyarıldığı belirtilmiştir. Bu aşamada aşılama ile oluşturulan korunmanın belirlenmesi için BALB/c ve C57BL/6 farelere intraperitoneal yoldan 500 *T. gondii* RH suşu takizoiti uygulandığı rapor edilmiştir. Elde edilen sonuçlar BALB/c farelerde aşılamanın kontrol grubu farelerin %60'ının ve aşılamanın farelerin ise %100'ünün yaşadığı gösterilmiştir. C57BL/6 farelerde ise aşılamanın farelerin en çok 7. güne kadar yaşadıklarını ve aşılamanın farelerin %40'ının yaşadığı gösterilmiştir (Liu et al., 2009). Bu çalışmada aşılamanın farelerin yaşamasının *T. gondii* RH suşunun farelerde öldürücü dozda verilmemesinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Bu şekilde düşük dozda verilen *T. gondii* takizoitlerine karşı farelerde korunma yaşam eğrisi ile belirlenmesi yerine dokularda bulunan *T. gondii* formlarının araştırılmasının daha doğru olacağı düşünülmektedir.

İlgi çekici araştırmalardan bir diğerinde ise *T. gondii*'nin takizoit formuna özgü SAG1, GRA1, ROP2, GRA4 ve ayrıca bradizoit formuna özgü SAG2C ve SAG2X proteinlerinin epitop bölgelerini içeren bir multi-epitop DNA aşısı geliştirilmiştir. Bu aşı çalışmasında aşılama intramuskuler, intraoral, intranazal olacak şekilde üç farklı yolla uygulanmıştır. Bu aşamada aşılama ile oluşturulan korunmanın belirlenmesi için BALB/c farelere intraperitoneal yoldan 1000 *T. gondii* RH suşu takizoiti uygulanmıştır. Çalışma sonucunda intranazal yolla aşılama ile yüksek derece IgA, CD8 T-Sitotoksik lenfositlerinde %1,78 oranında artış ve korunma zamanında %40 uzama saptandığı rapor edilmiştir. İntraoral uygulama sonucunda ise, IgA antikor yanıtında artış, CD8 T-Sitotoksik lenfositlerinde %0,70 oranında artış ve korunma zamanında %60 olduğu belirtilmiştir. İntramuskuler uygulama sonrasında yüksek derece IgG antikor yanıtı, CD8 T-Sitotoksik lenfositlerinde %0,92 oranında artış ve korunma

zamanında %20 uzama olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada aşı uygulanmayan kontrol farelerinin ortalama 3. günde ölmeye başladıkları ve tamamının 5. günde öldüğü bildirilmiştir (Cong et al., 2014). Bu çalışmada aşılınmayan farelerin düşük dozda *T. gondii* RH suşu takizoiti uygulanmasına rağmen 3. günde ölmeye başlaması ilginç olarak değerlendirilmiştir çünkü *T. gondii* ile lethal toksoplazmosis oluşturulmasında her fareye ortalama 100.000 takizoit verilmesi sonrası ölümlerin genelde 4. günde başlaması beklenmektedir (Fachado et al., 2003; Döşkaya et al., 2007).

T. gondii rGRA2 ve rGRA6 proteinleri monofosforil lipid A (MPL) adjuvantı ile birleştirilerek farelere intraperitoneal olarak verildiği çalışmada, aşılama ile total IgG ve IgG2a yanıtlarının arttırdığı belirlenmiştir. Farelere doku kisti oluşturan *T. gondii* PRU suşu intraperitoneal yoldan uygulanmış ve doku kistlerinin rGRA2 proteinin verildiği grupta %69,8, rGRA2 ve rGRA6 protein karışımının verildiği grupta ise %48,2 azaldığı bildirilmiştir (Golkar et al., 2007).

T. gondii'ye karşı geliştirilen üç farklı multi-antijenik rekombinant protein aşı çalışmasında rROP2 (+) rGRA4 (+) rSAG1 protein karışımı ile rROP2 (+) rROP4 (+) rGRA4 ve rROP2 (+) rROP4 (+) rSAG1 protein karışımları Freund adjuvantı ile birleştirilerek oluşturulan immun yanıt ve korunma karşılaştırılmıştır. Her üç aşı grubunda da IgG1 antikor seviyesinde yükselme gözlemlenmiştir. Fareler doku kisti oluşturan *T. gondii* DX suşu intraperitoneal yoldan uygulanmış ve rROP2 (+) rGRA4 (+) rSAG1 uygulanan grupta %46 azalma, rROP2 (+) rROP4 (+) rGRA4 uygulanan grupta %77, rROP2 (+) rROP4 (+) rSAG1 uygulanan grupta ise %84 azalma olduğu belirtilmiştir (Dziadek et al., 2012).

T. gondii'ye ait AMA1, RON2 ve RON4 antijenik proteinleriyle yapılan aşı çalışmasında, bu proteinlerin epitop bölgeleri seçilerek multivalent rekombinant protein aşısı oluşturulmuştur. rRON2 uygulanan grupta yüksek miktarda IgA antikor yanıtı, rAMA1 (+) rRON2 uygulanan grupta ise yüksek miktarda total IgG antikor yanıtı saptandığı bildirilmiştir. rAMA1 (+) rRON2 uygulanan aşı grubunda yüksek miktarda IFN- γ üretimi olduğu rapor edilmiştir. Bu aşamada aşılama ile oluşturulan korunmanın belirlenmesi için BALB/c farelere oral yoldan 40.000 *T. gondii* RH suşu takizoiti uygulandığı belirtilmiştir. Aşı uygulanmayan grupta farelerin 13. güne kadar yaşadıkları bildirilmiş, rAMA1 (+) rRON2 uygulanan grupta farelerin %70, rAMA1 uygulanan grupta %60, rAMA1 (+) rRON2 (+) rRON4 uygulanan grupta %50 ve rRON2 uygulanan grupta %40'ının yaşadığı rapor edilmiştir (Zhang et al., 2015). *T. gondii* ile doğal yoldan

enfeksiyon oral yoldan doku kisti veya ookistlerin alınması ile başlamaktadır. Bu çalışmada ilginç şekilde mide asidine dirençsiz *T. gondii* takizoiti oral yoldan uygulanmıştır.

Sonuç olarak; doğru antijenik proteinlerin kullanıldığı multivalent rekombinant protein aşı formülasyonlarının kuvvetli humoral ve hücrel immun yanıt uyardığı bilinmektedir. Daha önceki çalışmalarda multivalent proteinlerin içeriğinde kullanılan proteinler rastgele seçilmekteydi. Bu çalışmada ise protein mikromarray tarama ile *T. gondii* genomundan seçilmiş 49 aşı adayı olabilecek antijenik protein içinden 6 tanesi seçilmiş ve ilk defa 6-Valanlı rekombinant protein aşısı geliştirilmiştir. Adjuvante 6-Valanlı rekombinant protein aşısının kuvvetli humoral ve hücrel immun yanıt uyardığı ve lethal toksoplazmosize karşı korunma zamanını uzattığı belirlenmiştir. İleride daha fazla rekombinant protein içeren adjuvante multivalent rekombinant protein aşılarının geliştirilmesi ile toksoplazmosize karşı tam korunmanın sağlanabileceği öngörülmektedir. Bu çalışmada da gösterildiği gibi *T. gondii* antijenik proteinlerin epitoplarının çoğunda glikozilasyon bölgeleri bulunmaktadır ve etkin bir immun yanıt için antijenik epitop bölgeleriyle MHC moleküllerinin tam uyuşması gerekmektedir. Bu sebeplerle aşılama kullanılabilecek *T. gondii* rekombinant proteinlerinin post translasyonel modifikasyon yapabilen ekspresyon sistemlerinde üretilmesinin toksoplazmosize karşı korunmada büyük ilerleme sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ada, G.**, 1999, The immunology of vaccination, 28-39, Vaccines, Plotkin S.A. and Orenstein W.A. (Eds), *WB Saunders*, Philadelphia, 1230p.
- Aguilar, J.C. and Rodriguez, E.G.**, 2007, Vaccine adjuvants revisited, *Vaccine*, 25, 3752-3762pp.
- Ajioka, J.W., Fitzpatrick, J.M. and Reitter, C.P.**, “*Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy”, Expert Reviews in Molecular Medicine <http://www.path.cam.ac.uk/~toxop/Publications/PDF%20Files/expert%20rev%202001.pdf> (Erişim tarihi: 23 Aralık 2014).
- Andersson, C.**, 2000, Production and delivery of recombinant subunit vaccines, Department of Biotechnology Royal Institute of Technology (KTH), Sweden, 92 p.
- Angus, C.W., Klivington, Evans, D., Dubey, J.P. and Kovacs, J.A.**, 2000, Immunization with a DNA plasmid encoding the SAG1 (P30) protein of *Toxoplasma gondii* is immunogenic and protective in rodents, *The Journal of Infectious Diseases*, 181(1), 317-324pp.
- Apostolopoulos, V., Yuriev, E., Ramsland, P.A., Halton, J., Osinski, C., Li, W., Plebanski, M., Paulsen, H. and McKenzie, I.F.**, 2003, A glycopeptide in complex with MHC class I uses the GalNAc residue as an anchor, *PNAS*, 100(25):15029-15034pp.
- Aramini, J.J., Stephen, C., Dubey, J.P., Engelstoft, C., Schwantje, H. and Ribble, C.S.**, 1999, Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts, *Epidemiology and Infection*, 122(2):305-315pp.
- Arisue, N. and Hashimoto, T.**, 2014, Phylogeny and evolution of apicomplexans and apicomplexan parasites, *Parasitology International* (in press).
- 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?, *International Journal for Parasitology*, 32:1193-1199pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Beghetto, E., Nielsen, H.V., Del Porto, P., Buffolano, W., Guglietta, S., Felici, F., Petersen, E. and Gargano, N.,** A combination of antigenic regions of *Toxoplasma gondii* microneme proteins induces protective immunity against oral infection with parasite cysts, 2005, *The Journal of Infectious Diseases*, 191:637-645pp.
- Bhopale, .GM.,** 2003, Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status, *Microbes and Infection*, 5:457-462pp.
- BioLegend,** LEGEND MAX™ Mouse IFN- γ ELISA Kit with Pre-coated Plates, <http://www.biolegend.com/legend-max-mouse-ifn-gamma-elisa-kit-5815.html>, (Erişim Tarihi: 19.11.2014).
- BioLegend,** LEGEND MAX™ Mouse IL-4 ELISA Kit with Pre-coated Plates, <http://www.biolegend.com/legend-max-mouse-il-4-elisa-kit-5857.html>, (Erişim Tarihi: 18.11.2014).
- Bruna-Romero, O., Oliveira, D.M and Andrade-Neto, V.F.,** 2012, Toxoplasmosis: Advances and Vaccine Perspectives, 169-184, Current Topics in Tropical Medicine, Rodriguez-Morales, A.(Ed.), *InTech Europe*, 564p.
- CDC,** 2013, Understanding how vaccines work, Atlanta-USA, 2p.
- Cha, S.,** 2012, The history of vaccination and current vaccination policies in Korea, *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 1:3-8pp.
- Chen, J., Huang, S.Y., Li, Z.Y., Yuan, Z.G., Zhou, D.H., Petersen, E., Zhang, N.Z. and Zhu, X.Q.,** 2013a, Protective immunity induced by a DNA vaccine expressing eIF4A of *Toxoplasma gondii* against acute toxoplasmosis in mice, *Vaccine*, 31(13):1734-1739pp.
- Chen, J., Huang, S.Y., Zhou, D.H., Li, Z.Y., Petersen, E., Song, H.Q. and Zhu, X.Q.,** 2013b, DNA immunization with eukaryotic initiation factor-2 α of *Toxoplasma gondii* induces protective immunity against acute and chronic toxoplasmosis in mice, *Vaccine*, 31(52):6225-6231pp.
- Chen, J., Zhou, D.H., Li, Z.Y., Petersen, E., Huang, S.Y., Song, H.Q. and Zhu, X.Q.,** 2014, *Toxoplasma gondii*: protective immunity induced by rhoptry protein 9 (TgROP9) against acute toxoplasmosis, *Experimental Parasitology*, 139, 42-48pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chuang, S.C. and Yang, C.D.**, 2014, Sustained release of recombinant surface antigen 2 (rSAG2) from poly(lactide-co-glycolide) microparticles extends protective cell-mediated immunity against *Toxoplasma gondii* in mice, *Parasitology*, 141, 1657-1666pp.
- Chuang, S.C., Ko, J.C., Chen, C.P., Du, J.T. and Yang, C.D.**, 2013a, Induction of long-lasting protective immunity against *Toxoplasma gondii* in BALB/c mice by recombinant surface antigen 1 protein encapsulated in poly (lactide-co-glycolide) microparticles, *Parasites & Vectors*, 6:34, 1-12pp.
- Chuang, S.C., Ko, J.C., Chen, C.P., Du, J.T. and Yang, C.D.**, 2013b, Encapsulation of chimeric protein rSAG1/2 into poly(lactide-co-glycolide) microparticles induces long-term protective immunity against *Toxoplasma gondii* in mice, *Experimental Parasitology*, 134(4):430-437pp.
- Cong, H., Yuan, Q., Zhao, Q., Zhao, L., Yin, H., Zhou, H., He, S. and Wang, Z.**, 2014, Comparative efficacy of a multi-epitope DNA vaccine via intranasal, peroral, and intramuscular delivery against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice, *Parasites & Vectors*, 7:145, 1-8pp.
- Cong, H., Zhang, M., Xin, Q., Wang, Z., Li, Y., Zhao, Q., Zhou, H. and He, S.**, 2013, Compound DNA vaccine encoding SAG1/SAG3 with A2/B subunit of cholera toxin as a genetic adjuvant protects BALB/c mice against *Toxoplasma gondii*, *Parasites & Vectors*, 6: 63, 2-8pp.
- Correia, B.E., Bates, J.T., Loomis, R.J., Baneyx, G., Carrico, C., Jardine, J.G., Rupert, P., Correnti, C., Kalyuzhniy, O., Vittal, V., Connell, M.J., Stevens, E., Schroeter, A., Chen, M., Macpherson, S., Serra, A.M., Adachi, Y., Holmes M.A., Li, Y., Klevit, R.E., Graham, B.S., Wyatt, R.T., Baker, D., Strong, R.K., Crowe JE, J., Johnson, P.R. and Schief, W.R.**, 2014, Proof of principle for epitope-focused vaccine design, *Nature*, 507(7491):201-206pp.
- Couper, K.N., Nielsen, H.V., Petersen, E., Roberts, F., Roberts, C.W. and Alexander, J.**, 2003, DNA Vaccination with immunodominant tachyzoite surface antigen (SAG1) protects against adult acquired *Toxoplasma gondii* infection but does not prevent maternofetal transmission, *Vaccine*, 21, 2813-2820pp.
- Crampton, A., Vanniasinkam, T.**, 2007, Parasite vaccines: the new generation, *Infection, Genetics and Evolution*, 7, 664-673pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cui, X., Lei, T., Yang, D., Hao, P., Li, B. and Liu, Q.,** 2012, *Toxoplasma gondii* immune mapped protein-1 (TgIMP1) is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis, *Vaccine*, 30(13), 2282-2287pp.
- Cuppari, A.F., Sanchez, V., Ledesma, B., Frank, F.M., Goldman, A., Angel, S.O., Martin, V.,** 2008, *Toxoplasma gondii* protease inhibitor-1 (TgPI-1) is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis, *Vaccine*, 26(39):5040-5045pp.
- Dautu, G., Munyaka, B., Carmen, G., Zhang, G., Omata, Y., Xuenan, X. and Igarashi, M.,** 2007, *Toxoplasma gondii*: DNA vaccination with genes encoding antigens MIC2, M2AP, AMA1 and BAG1 and evaluation of their immunogenic potential, *Experimental Parasitology*, 116, 273-282pp.
- Davies, D.H., Liang, X., Hernandez, J.E., Randall, A., Hirst, S., Mu, Y., Romero, K.M., Nguyen, T.T., Kalantari-Dehaghi, M., Crotty, S., Baldi, P., Villarreal, L.P. and Felgner, P.L.,** 2005, Profiling the humoral immune response to infection by using proteome microarrays: high-throughput vaccine and diagnostic antigen discovery, *PNAS*, 102(3):547-552pp.
- Del L. Yácono, M., Farran, I., Becher, M.L., Sander, V., Sánchez, V.R., Martín, V., Veramendi, J. and Clemente, M.,** 2012, A chloroplast-derived *Toxoplasma gondii* GRA4 antigen used as an oral vaccine protects against toxoplasmosis in mice, *Plant Biotechnology Journal*, 10, 1136-1144pp.
- Denkers, E. Y.,** 2003, From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 39: 193–203pp.
- Di Cristina, M., Del Porto, P., Buffolano, W., Beghetto, E., Spadoni, A., Guglietta, S., Piccolella, E., Felici, F., Gargano, N.,** 2004, The *Toxoplasma gondii* bradyzoite antigens BAG1 and MAG1 induce early humoral and cell-mediated immune responses upon human infection, *Microbes and Infection*, 6:164-171pp.
- Döşkaya, M., Caner, A., Ajzenberg, D., Değirmenci, A., Dardé, M.L., Can, H., Erdoğan, D.D., Korkmaz, M., Uner, A., Güngör, C., Altıntaş, K. and Gürüz, Y.,** 2013, Isolation of *Toxoplasma gondii* strains similar to Africa 1 genotype in Turkey, *Parasitology International*, 62:471-474pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Döşkaya, M., Caner, A., Can, H., Gülçe İz, S., Gedik, Y., Döşkaya, A.D., Kalantari-Dehaghi, M. and Gürüz, Y.,** 2014, Diagnostic value of a Rec-ELISA using *Toxoplasma gondii* recombinant SporoSAG, BAG1, and GRA1 proteins in murine models infected orally with tissue cysts and oocysts, *PLoS One*, 9(9):e108329.
- Döşkaya, M., Kalantari-Dehaghi, M., Walsh, C.M., Hiszczyńska-Sawicka, E., Davies, D.H., Felgner, P.L., Larsen, L.S., Lathrop, R.H., Hatfield, G.W., Schulz, J.R., Gürüz, Y. and Jurnak, F.,** 2007, GRA1 protein vaccine confers better immune response compared to codon-optimized GRA1 DNA vaccine, *Vaccine*, 25 (10):1824-1837pp.
- Dubey, J.P.,** 2008, The history of *Toxoplasma gondii*—the first 100 years, *Journal Eukaryot Microbiology*, 55(6):467-475pp.
- Dubey, J.P.,** 2010, Toxoplasmosis of Animals and Humans, Second Edition, *CRP Press*, 313pp.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S. and Speer, C.A.,** 1998, Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts, *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2), 267-99pp.
- Dupont, C.D., Christian, D.A. and Hunter, C.A.,** 2012, Immune response and immunopathology during toxoplasmosis, *Seminars in Immunopathology*, 34(6):793-813pp.
- Dziadek, B., Gatkowska, J., Brzostek, A., Dziadek, J. and Dzitko, K., Dlugonska, H.,** 2009, *Toxoplasma gondii*: the immunogenic and protective efficacy of recombinant ROP2 and ROP4 rhoptry proteins in murine experimental toxoplasmosis, *Experimental Parasitology*, 123(1):81-89pp.
- Dziadek, B., Gatkowska, J., Brzostek, A., Dziadek, J., Dzitko, K., Grzybowski, M. and Dlugonska, H.,** 2011, Evaluation of three recombinant multi-antigenic vaccines composed of surface and secretory antigens of *Toxoplasma gondii* in murine models of experimental toxoplasmosis, *Vaccine*, 29(4):821-830pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dziadek, B., Gatkowska, J., Grzybowski, M., Dziadek, J., Dzitko, K. and Dlugonska, H.,** 2012, *Toxoplasma gondii*: the vaccine potential of three trivalent antigen-cocktails composed of recombinant ROP2, ROP4, GRA4 and SAG1 proteins against chronic toxoplasmosis in BALB/c mice, *Experimental Parasitology*, 131(1), 133-138pp.
- Echeverria, P., Miguel, N., Costas, M. and Angel, S.,** 2006, Potent antigenspecific immunity to *Toxoplasma gondii* in adjuvant-free vaccination system using Rop2-Leishmania infantum Hsp83 fusion protein, *Vaccine*, 24, 4102-4110pp.
- Fachado A., Rodriguez A. and Angel S.O.,** 2003, Protective effect of a naked DNA vaccine cocktail against lethal toxoplasmosis in mice, *Vaccine* 21, 1327-1335 pp.
- Fachado, A., Rodriguez, A. and Angel, S.O.,** 2003, Protective effect of a naked DNA vaccine cocktail against lethal toxoplasmosis in mice, *Vaccine*, 21, 1327-1335pp.
- Fang, R., Feng, H., Hu, M., Khan, M., Wang, L., Zhou, Y. and Zhao, J.,** 2012, Evaluation of immune responses induced by SAG1 and MIC3 vaccine cocktails against *Toxoplasma gondii*, *Veterinary Parasitology*, 187:140-146pp.
- Fang, R., Feng, H., Nie, H., Wang, L., Tu, P., Song, Q., Zhou, Y. and Zhao, J.,** 2010, Construction and immunogenicity of pseudotype baculovirus expressing *Toxoplasma gondii* SAG1 protein in BALB/c mice model, *Vaccine*, 28(7):1803-1807pp.
- Fang, R., Nie, H., Wang, Z., Tu, P., Zhou, D., Wang, L., He, L., Zhou, Y. and Zhao, J.,** 2009, Protective immune response in BALB/c mice induced by a suicidal DNA vaccine of the MIC3 gene of *Toxoplasma gondii*, *Veterinary Parasitology*, 164(2-4), 134-140pp.
- Felgner, J., Juarez, S., Hung, C., Liang, L., Jain, A., Döşkaya, M., Felgner P.L., Caner, A., Gürüz, Y. and Davies, D.H.,** 2015, Identification of *Toxoplasma gondii* antigens associated with different types of infection by serum antibody profiling, *Parasitology*, 14:1-12pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Feliu, V., Vasseur, V., Grover, H.S., Chu, H.H., Brown, M.J., Wang, J., Boyle, J.P., Robey, E.A., Shastri, N. and Blanchard, N.,** 2013, Location of the CD8 T cell epitope within the antigenic precursor determines immunogenicity and protection against the *Toxoplasma gondii* parasite, *PLoS Pathogens*, 9(6):e1003449.
- Ferguson, D.J.,** 2004, Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host, *International Journal for Parasitology*, 9;34(3), 347-60pp
- Filisetti, D. and Candolfi, E.,** 2004, Immune response to *Toxoplasma gondii*, *Ann. Ist. Super. Sanità*, 40(1):71-80pp.
- Frank, M. and Schloissnig, S.,** 2010, Bioinformatics and molecular modeling in glycobiology, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 16):2749-2772pp.
- Garcia, J., Innes, E. and Katzer, F.,** 2014, Current progress toward vaccines against *Toxoplasma gondii*, *Vaccine: Development and Therapy*, 4:23-27pp.
- Gatkowska, J., Gasior, A., Kur, J. and Dlugonska, H.,** 2008, *Toxoplasma gondii*: chimeric Dr fimbriae as a recombinant vaccine against toxoplasmosis, *Experimental Parasitology*, 118(2):266-270pp.
- Gedik, Y.,** 2013, *Toxoplasma gondii* bradizoit ve takizoit formlarına özgü adjuvante multivalan rekombinant protein aşısının oluşturduğu immun yanıt ve korunmanın saptanması, Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Golkar, M., Shokrgozar, M.A., Rafati, S., Musset, K., Assmar, M., Sadaie, R., Cesbron-Delauw, M.F. and Mercier, C.,** 2007, Evaluation of protective effect of recombinant dense granule antigens GRA2 and GRA6 formulated in monophosphoryl lipid A (MPL) adjuvant against *Toxoplasma* chronic infection in mice, *Vaccine*, 25(21):4301-4311pp.
- Gong, P., Huang, X., Yu, Q., Li, Y., Huang, J., Li, J., Yang, J., Li, H., Zhang, G., Ren, W. and Zhang, X.,** 2013, The protective effect of a DNA vaccine encoding the *Toxoplasma gondii* cyclophilin gene in BALB/c mice, *Parasite Immunology*, 35, 140-146pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Goodswen, S.J., Kennedy PJ and Ellis, J.T.**, 2014, Enhancing In Silico Protein-Based Vaccine Discovery for Eukaryotic Pathogens Using Predicted Peptide-MHC Binding and Peptide Conservation Scores, *PLoS One*, 9(12):e115745.
- Gülçe İz, S., Döşkaya, M., Borrego, B., Rodriguez, F., Gürüz, Y. and Gürhan, I.D.**, 2013, Co-expression of the Bcl-xL antiapoptotic protein enhances the induction of Th1-like immune responses in mice immunized with DNA vaccines encoding FMDV B and T cell epitopes, *Veterinary Research Communications*, 37(3):187-196pp.
- Gülçe İz, S., Döşkaya, M., Caner, A., Değirmenci Döşkaya, A., Rodriguez, F., Gürüz, Y. and Deliloğlu Gürhan, S.İ.**, 2014, A novel dual promoter DNA vaccine induces CD8⁺ response against *Toxoplasma gondii* sporozoite specific surface protein “SporoSAG” through non-apoptotic cells, *Trials in Vaccinology*, 3:81-88pp.
- Gürüz, A.Y. and Delibaş, S.B.**, 2007, Toksoplazmozis ve İmmunolojisi, 167-194, Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji, Özcel, M.A., İnci, A., Turgay, N. Ve Köroğlu, E. (Derl.), *Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları 21*, İzmir, 732s.
- Hansson, M., Nygren, P., and Stahl, S.**, 2000, Design and production of recombinant subunit vaccines, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 32:95-107pp.
- Hansson, M., Nygren, P.A. and Ståhl, S.**, 2000, Design and production of recombinant subunit vaccines, *Biotechnology Applied Biochemistry*, 32:95-107pp.
- Hassan, I.A., Wang, S., Xu, L., Yan, R., Song, X. and Li, X.**, 2014, DNA vaccination with a gene encoding *Toxoplasma gondii* Deoxyribose Phosphate Aldolase (TgDPA) induces partial protective immunity against lethal challenge in mice, *Parasites & Vectors*, 7:431, 1-11pp.
- Hassan, I.A., Wang, S., Xu, L.X., Yan, R., Song, X. And Li, X.**, 2015, Immunological changes induced by *Toxoplasma gondii* Glutathione-S Transferase (TgGST) delivered as a DNA vaccine, *Research in Veterinary Science*, (in press).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Haumont, M., Delhay, L., Garcia, L., Margarita, J., Pasqualina, M., Véronique, D., Vincent, V., Alex, B., Ralph, B. and Alain, J.,** 2000, Protective immunity against congenital toxoplasmosis with recombinant SAG1 protein in a guinea pig model, *Infection and Immunity*, 68(9):4948-4953pp.
- Henriquez, F.L., Woods, S., Cong, H., McLeod, R., Roberts, C.W.,** 2010, Immunogenetics of *Toxoplasma gondii* informs vaccine design, *Trends in Parasitology*, 29(11):550-555pp.
- Hiszczyńska-Sawicka, E., Gatkowska, J. M., Grzybowski, M.M., and Długońska H.,** 2014, Veterinary vaccines against toxoplasmosis, *Parasitology*, 141, 1365-1378pp.
- Hiszczyńska-Sawicka, E., Li, H., Xu, J.B., Olędzka, G., Kur, J., Bickerstaffe, R. and Stankiewicz, M.,** 2010, Comparison of immune response in sheep immunized with DNA vaccine encoding *Toxoplasma gondii* GRA7 antigen in different adjuvant formulations, *Experimental Parasitology*, 124(4):365-372 pp.
- Hounsell, E.F. and Davies, M.J.,** 1993, Role of protein glycosylation in immune regulation, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 52, 22-29pp.
- Igarashi, M., Kano, F., Tamekuni, K., Machado, R.Z., Navarro, I.T., Vidotto, O., Vidotto, M.C. and Garcia, J.L.,** 2008, *Toxoplasma gondii*: evaluation of an intranasal vaccine using recombinant proteins against brain cyst formation in BALB/c mice, *Experimental Parasitology*, 118(3):386-392pp.
- Ilchmann, K., Revill, J., McLeish, C. and Nightingale, P.,** “Vaccine Development & the BWC” S&T Reviews, [http://www.unog.ch/80256EDD006B8954/\(httpAssets\)/1820F9EAAC22FDE9C125787600385C25/\\$file/Ilchmann+et+al+-+Vaccines+and+the+BWC.pdf](http://www.unog.ch/80256EDD006B8954/(httpAssets)/1820F9EAAC22FDE9C125787600385C25/$file/Ilchmann+et+al+-+Vaccines+and+the+BWC.pdf), (Erişim tarihi: 02 Ekim 2014).
- Innes, E.A., Bartley, P.M., Maley, S., Katzer, F. and Buxton, D.,** 2009, Veterinary vaccines against *Toxoplasma gondii*, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(2):246-251pp.
- Ismael, A.B., Sekkai, D., Collin, C., Bout, D. and Mevelec, M.N.,** 2003, The MIC3 gene of *Toxoplasma gondii* is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis, *Infection and Immunity*, 71, 6222-6228pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jongert, E., Craeye, S., Dewit, J. and Huygen, K.,** 2007, GRA7 provides protective immunity in cocktail DNA vaccines against *Toxoplasma gondii*, *Parasite Immunology*, 29 (9):445-453pp.
- Jongert, E., Melkebeek, V., De Craeye, S., Dewit, J., Verhelst, D. and Cox, E.,** 2008, An enhanced GRA1—GRA7 cocktail DNA vaccine primes anti-*Toxoplasma* immune responses in pigs, *Vaccine*, 26, 1025-1031pp.
- Khosroshahi, K., Ghaffarifar, F., D'Souza, S., Sharifi, Z. and Dalimi, A.,** 2011, Evaluation of the immune response induced by DNA vaccine cocktail expressing complete SAG1 and ROP2 genes against toxoplasmosis, *Vaccine*, 29:778-783pp.
- Kikumura, A., Fang, H., Mun, H.S., Uemura, N., Makino, M., Sayama, Y., Norose, K. and Aosai, F.,** 2010, Protective immunity against lethal anaphylactic reaction in *Toxoplasma gondii*-infected mice by DNA vaccination with *T. gondii*-derived heat shock protein 70 gene, *Parasitology International*, 59 (2), 105-111pp.
- Kim, K.,** 2004, Role of proteases in host cell invasion by *Toxoplasma gondii* and other Apicomplexa, *Acta Tropica*, 91, 69–81pp.
- Kotturi, M.F., Peters, B., Buendia-Laysa, F.J., Sidney. J., Oseroff, C., Botten, J., Grey, H., Buchmeier, M.J. and Sette, A.,** 2007, The CD8+ T-cell response to lymphocytic choriomeningitis virus involves the L antigen: uncovering new tricks for an old virus, *Journal of Virology* ,81(10):4928-4940pp.
- Kuman, H.A. ve Altıntaş N.,** 1996, Protozoon Hastalıkları, Bornova-İzmir, 216p.
- Leclerc, C.,** 2003, New approaches in vaccine development, *Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases*, 26:329-341pp.
- Letscher Bru V., Villard O., Risse B., Zauke M., Klein J.P. and Kien T.T.,** 1998, Protective effect of vaccination with a combination of recombinant surface antigen 1 and interleukin 12 against toxoplasmosis in mice, *Infection and Immunity*, 66, 4503-4506 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Letscher Bru, V., Pfaff, A.W., Abou-Bacar, A., Filisetti, D., Antoni, E., Villard, O., Klein, J.P. and Candolfi, E.,** 2003, Vaccination with *Toxoplasma gondii* SAG-1 protein is protective against congenital toxoplasmosis in BALB/c mice but not in CBA/J mice, *Infection and Immunity*, 71, 6615-6619pp.
- Leyva R., Herion P. and Saavedra R.,** 2001, Genetic immunization with plasmid DNA coding for the ROP2 protein of *Toxoplasma gondii*, *Parasitology Research*, 87, 70-79pp.
- Li, J., Han, Q., Gong, P., Yang, T., Ren, B., Li, S., Zhang, X.,** 2012, *Toxoplasma gondii* rhomboid protein 1 (TgROM1) is a potential vaccine candidate against toxoplasmosis, *Veterinary Parasitology*, 1184(2-4):154-16pp.
- Li, Z.Y., Chen, J., Petersen, E., Zhou, D.H., Huang, S.Y., Song, H.Q. and Zhu, X.Q.,** 2014, Synergy of mIL-21 and mIL-15 in enhancing DNA vaccine efficacy against acute and chronic *Toxoplasma gondii* infection in mice, *Vaccine*; 32, 3058-3065pp.
- Liang, L., Döşkaya, M., Juarez, S., Caner, A., Jasinskas, A., Tan, X., Hajagos, B., Bradley, P., Korkmaz, M., Gürüz, Y., Felgner, P. and Davies, H.,** 2011, Identification of potential serodiagnostic and subunit vaccines antigens by antibody profiling of toxoplasmosis cases in Turkey, *Molecular and Cellular Proteomics*, 10(7):M110.006916, 1-17pp.
- Liljeqvist, S. and Stahl, S.,** 1999, Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines, *Journal of Biotechnology*, 73:1-33pp.
- Lim, S.S. and Othman, R.Y.,** 2014, Recent Advances in *Toxoplasma gondii* Immunotherapeutics, *The Korean Journal of Parasitology*, 52(6):581-593pp.
- Liu, K.Y., Zhang, D.B., Wei, Q.K., Li, J., Li, G.P. and Yu, J.Z.,** 2006, Biological role of surface *Toxoplasma gondii* antigen in development of vaccine, *World Journal of Gastroenterology*, 12(15):2363-2368pp.
- Liu, M.M., Yuan, Z.G., Peng, G.H., Zhou, D.H., He, X.H., Yan, C., Yin, C.C., He, Y., Lin, R.Q., Song, H.Q. and Zhu, X.Q.,** 2010, *Toxoplasma gondii* microneme protein 8 (MIC8) is a potential vaccine candidate against toxoplasmosis, *Parasitology Research*, 106(5):1079-1084pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu, Q., Shang, L., Jin, H., Wei, F., Zhu, X. and Gao, H.,** 2010, The protective effect of a *Toxoplasma gondii* SAG1 plasmid DNA vaccine in mice is enhanced with IL-18, *Research in Veterinary Science*, 89:93–97pp.
- Liu, Q., Wang, F., Wang, G., Zhao, Q., Min, J., Wang, S., Cong, H., Li, Y., He, S. and Zhou, H.,** 2014, *Toxoplasma gondii*: immune response and protective efficacy induced by ROP16/GRA7 multicomponent DNA vaccine with a genetic adjuvant B7-2, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10(1):184-191pp.
- Liu, S., Shi, L., Cheng, Y.B., Fan, G.X., Ren, H.X., Yuan, Y.K.,** 2009, Evaluation of protective effect of multi-epitope DNA vaccine encoding six antigen segments of *Toxoplasma gondii* in mice, *Parasitology Research*, 105:267-274pp.
- Lu, G., Zhou, A., Meng, M., Wang, L., Han, Y., Guo, J., Zhou, H., Cong, H., Zhao, Q., Zhu, X. and He, S.,** 2014, Alpha-galactosylceramide enhances protective immunity induced by DNA vaccine of the SAG5D gene of *Toxoplasma gondii*, *BMC Infectious Diseases*, 14:706, 1-21pp.
- Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D. and Xia, B.,** 2012, CD4⁺T cells: differentiation and functions, *Clinical and Developmental Immunology*, 925135, 1-13pp.
- Luk, F.C.,** 2011, Role of Post Translational Modifications: Glycosylation and Palmitoylation in *Toxoplasma gondii*, Doctorate Thesis, University of North Caroline, Department of Cell and Developmental Biology, 203p.
- Lyons, R.E., McLeod, R. and Roberts, C.W.,** 2002, *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion, *Trends in Parasitology*, 18(5):198-201pp.
- Machado, A., Caetanoa, B., Barbosa, R., Salgado, A.P., Rabelo, R., Garcia, C., Bruna-Romero, O., Escriou, N. and Gazzinelli, R.,** 2010, Prime and boost immunization with influenza and adenovirus encoding the *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 (SAG2) induces strong protective immunity, *Vaccine*, 28:3247-3256pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Machado, A., Caetano, B., Barbosa, R., Salgado, A.P., Rabelo, R., Garcia, C., Bruna-Romero, O., Escriou, N. and Gazzinelli, R.,** 2010, Prime and boost immunization with influenza and adenovirus encoding the *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 (SAG2) induces strong protective immunity, *Vaccine*, 28, 3247-3256pp.
- Madigan M.T. and Martinko J.M.,** 2010, Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, Palme Yayıncılık, Ankara, 969s.
- Makino, M., Uemura, N., Moroda, M., Kikumura, A. and Piao, L.,** 2011, Innate immunity in DNA vaccine with *Toxoplasma gondii*-heat shock protein 70 gene that induces DC activation and Th1 polarization, *Vaccine*, 29, 1899-1905pp.
- Martin, V., Supanitsky, A., Echeverria, P., Litwin, S., Tanos, T., Roodt, A., Guarnera, A. and Angel, S.,** 2004, Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the GRA4 gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(4), 704-710pp.
- Medzhitov, R.,** 2007, Recognition of microorganisms and activation of the immune response, *Nature*, 449:819-826pp.
- Mendes, É.A., Fonseca, F.G., Casério, B.M., Colina, J.P., Gazzinelli, R.T. and Caetano, B.C.,** 2013, Recombinant vaccines against *T. gondii*: comparison between homologous and heterologous vaccination protocols using two viral vectors expressing SAG1, *PLoS One*, 8(5):e63201.
- Meng, M., He, S., Zhao, G., Bai, Y., Zhou, H., Cong, H., Lu, G., Zhao, Q. and Zhu, X.Q.,** 2012, Evaluation of protective immune responses induced by DNA vaccines encoding *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (SAG1) and 14-3-3 protein in BALB/c mice, *Parasites & Vectors*, 5:273,1-10pp.
- Meng, M., Zhou, A., Lu G., Wang, L., Zhao G., Han, Y., Zhou, H., Cong, H., Zhao, Q., Zhu, X. and He, S.,** 2013, DNA prime and peptide boost immunization protocol encoding the *Toxoplasma gondii* GRA4 induces strong protective immunity in BALB/c mice, *BMC Infectious Diseases*, 13:494, 1-10pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Min, J., Qu, D., Li, C., Song, X., Zhao, Q., Li, X.A., Yang, Y., Liu, Q., He, S. and Zhou, H.**, 2012, Enhancement of protective immune responses induced by *Toxoplasma gondii* dense granule antigen 7 (GRA7) against toxoplasmosis in mice using a prime-boost vaccination strategy, *Vaccine*, 30(38), 5631-5636pp.
- Mishima, M., Xuan, X., Shioda, A., Omata, Y., Fujisaki, K., Nagasawa, H. and Mikami, T.**, 2001, Modified protection against *Toxoplasma gondii* lethal infection and brain cyst formation by vaccination with SAG2 and SRS1, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 63(4):433-438 pp.
- Mohamed, R., Aosai, F., Chen, M., Mun, H., Norose, K., Belal, U., Piao, L. and Yano, A.**, 2003, Induction of protective immunity by DNA vaccination with *Toxoplasma gondii* HSP70, HSP30 and SAG1 genes, *Vaccine*, 21, 2852–2861pp.
- Montoya, J. G. and Liesenfeld, O.**, 2004, Toxoplasmosis, *Lancet*, 363: 1965–1976pp.
- Moutafsi, M., Peters, B., Pasquetto, V., Tschärke, D.C., Sidney, J., Bui, H.H., Grey, H. and Sette, A.**, 2006, A consensus epitope prediction approach identifies the breadth of murine T(CD8+)-cell responses to vaccinia virus, *Nature Biotechnology*, 24(7):817-819pp.
- Nabi, H., Rashid, M.I., Akbar, H. and Gul, R.**, *Toxoplasma gondii*: An extract of its experimental trials of vaccination using potential vaccine candidates against toxoplasmosis, 2014, *Science International*, 26(1)287-292pp.
- Nielsen H.V., Di Cristina M., Beghetto E., Spadoni A., Petersen E. and Gargano N.**, 2006, *Toxoplasma gondii*: DNA vaccination with bradyzoite antigens induces protective immunity in mice against oral infection with parasite cysts, *Experimental Parasitology*, 112(4):274-279pp.
- Nielsen, H.V., Lauemøller, S.L., Christiansen, L., Buus, S., Fomsgaard, A. and Petersen, E.**, 1999, Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with a plasmid encoding the SAG1 gene, *Infection and Immunity*, 67, 6358-6363pp.
- O'Shea, J.J., Lahesmaa, R., Vahedi, G., Laurence, A. and Kanno, Y.**, 2011, Genomic views of STAT function in CD4⁺ T helper cell differentiation: new technology brings new insights and new questions, *Nature Reviews Immunology*, 11(4):239-250pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Owen, J.A., Punt, J., Stranford S.A. and Jones P.P.**, 2013, Kuby Immunology, The Journal of Experimental Medicine, New York, 691pp.
- Parthasarathy, S., Fong, M.Y., Ramaswamy, K. and Lau, Y.L.**, 2013, Protective immune response in BALB/c mice induced by DNA vaccine of the ROP8 gene of *Toxoplasma gondii*, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(5):883-887pp.
- Paul, S., Kolla, R.V., Sidney, J., Weiskopf, D., Fleri, W., Kim, Y., Peters, B. and Sette, A.**, 2013, Evaluating the immunogenicity of protein drugs by applying in vitro MHC binding data and the immune epitope database and analysis resource, *Clinical and Developmental Immunology*, ID 467852, 1-7pp.
- Peng, G.H., Yuan, Z.G., Zhou, D.H., He, X.H., Liu, M.M., Yan, C., Yin, C.C., He, Y., Lin, R.Q. and Zhu, X.Q.**, 2009, *Toxoplasma gondii* microneme protein 6 (MIC6) is a potential vaccine candidate against toxoplasmosis in mice, *Vaccine*, 5:27(47), 6570-6574pp.
- Petersen, E., Nielsen, H.V., 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*, 16:13, 1283-1289pp.
- Petrovsky, N. and Aguilar, J.C.**, 2004, Vaccine adjuvants: current state and future trends, *Immunology & Cell Biology - Nature*, 82(5):488-496pp.
- Pier, G.B., Lyczak, J.B. and Wetzler L.M.**, 2004, Immunology, Infection and Immunity, American Society for Microbiology, Washington D.C., 697pp.
- Plotkin S.**, 2014, History of vaccination, *PNAS*, 111(34):12283-12287pp.
- Plotkin, S.L., and Plotkin, S.A.**, 2008, A short history of vaccination, 1-17, Vaccines, Plotkin, S.A., Orenstein, W.A. and Offit, P.A. (Eds.), Saunders-Elsevier, Philadelphia, 1691pp.
- Polat, C., Gülçe İz, S., Döşkaya, M., Can, H., Caner, A., Değirmenci, A., Balcan, E. and Gürüz, Y.**, 2013, Comparison of immune responses elicited by adjuvanted tachyzoite lysate vaccines developed from two different *Toxoplasma gondii* strains isolated in Turkey, *Mikrobiyoloji Bülteni*, 47(1), 122-134 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Possenti, A., Cherchi, S., Bertuccini, L., Pozio, E., Dubey, J.P. and Spano, F.,** 2010, Molecular characterisation of a novel family of cysteine-rich proteins of *Toxoplasma gondii* and ultrastructural evidence of oocyst wall localisation, *International Journal for Parasitology*, 40:1639-1649pp.
- Qu, D., Han, J. and Du, A.,** 2013, Enhancement of protective immune response to recombinant *Toxoplasma gondii* ROP18 antigen by ginsenoside Re, *Experimental Parasitology*, 135: 234-239pp.
- Quan, J.H., Chu, J.Q., Ismail, H.A., Zhou, W., Jo, E.K., Cha, G.H. and Lee, Y.H.,** 2012, Induction of protective immune responses by a multiantigenic DNA vaccine encoding GRA7 and ROP1 of *Toxoplasma gondii*, *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(5), 666-674pp.
- Rashid, I., Hedli, D., Moire, N., Pierre, J., Debierre-Grockiego, F., Dimier-Poisson, I. and Mevelec, M.,** 2011, Immunological responses induced by a DNA vaccine expressing RON4 and by immunogenic recombinant protein RON4 failed to protect mice against chronic toxoplasmosis, *Vaccine*, 29, 8838-8846pp.
- Reed, S.G., Bertholet, S., Coler, R.N. and Friede, M.,** 2009, New horizons in adjuvants for vaccine development, *Trends in Immunology*, 30(1):23-32p.
- Riedel S.,** 2005, Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination, *Proc (Baylor University Medical Center)*, 18:21-25pp.
- Roth, Z., Yehezkel, G. and Khalaila, I.,** 2012, Identification and Quantification of Protein Glycosylation, *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 640923, 1-10pp.
- Sánchez, V.R., Pitkowski, M.N., Fernández Cuppari, A.V., Rodríguez, F.M., Fenoy, I.M., Frank, F.M., Goldman, A., Corral, R.S. and Martin, V.,** 2011, Combination of CpG-oligodeoxynucleotides with recombinant ROP2 or GRA4 proteins induces protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection, *Experimental Parasitology*, 128(4):448-453pp.
- Scorza, T., D'Souza, S., Laloup, M., Dewit, J., De Braekeleer, J., Verschueren, H., Vercammen, M., Huygen, K. and Jongert, E.,** 2003, A GRA1 DNA vaccine primes cytolytic CD8 T cells to control acute *Toxoplasma gondii*, *Infection and Immunity*, 71(1):309-316pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sheiner, L., Santos, J.M., Klages, N., Parussini, F., Jemmely, N., Friedrich, N., Ward, G.E. and Soldati-Favre, D.,** 2010, *Toxoplasma gondii* transmembrane microneme proteins and their modular design, *Molecular Microbiology*, 77(4): 92-929pp.
- Sibley, L.D., Khan, A., Ajioka, J.W. and Rosenthal, B.M.,** 2009, Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans, *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364:2749-2761pp.
- Singh, M. and O'Hagan, D.,** 1999, Advances in vaccine adjuvants, *Nature Biotechnology*, 17, 1075-1081pp.
- Stanley, A. C., Buxton, D., Innes, E. A. and Huntley, J. F.,** 2004, Intranasal immunisation with *Toxoplasma gondii* tachyzoite antigen encapsulated into PLG microspheres induces humoral and cell-mediated immunity in sheep, *Vaccine*, 22, 3929-3941pp.
- Sun, X., Mei, M., Zhang, X., Han, F., Jia, B., Wei, X., Chang, Z., Lu, H., Yin, J., Chen, Q. ve Jiang, N.,** 2014, The extracellular matrix protein mindin as a novel adjuvant elicits stronger immune responses for rBAG1, rSRS4 and rSRS9 antigens of *Toxoplasma gondii* in BALB/c mice, *BMC Infectious Diseases*, 14:429, 1-7pp.
- Sun, X.M., Zou, J., AA, E.S., Yan, W.C., Liu, X.Y., Suo, X., Wang, H. and Chen, Q.J.,** 2011, DNA vaccination with a gene encoding *Toxoplasma gondii* GRA6 induces partial protection against toxoplasmosis in BALB/c mice, *Parasites & Vectors*, 4:213, 1-8pp.
- Supply, P., Sutton, P., Coughlan, S.N., Bilo, K., Saman, E., Trees, A.J., Cesbron Delauw, M.F. and Locht, C.,** 1999, Immunogenicity of recombinant BCG producing the GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*, *Vaccine*, 17, 705- 714pp.
- Tamiya, T., Kashiwagi, I., Takahashi, R., Yasukawa, H. and Yoshimura, A.,** 2011, Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 31:980-985pp.
- Tan, T.G., Mui E., Cong, H., Witola, W., Montpetit, A., Muench S.P., Sidney J., Alexander J., Sette, A., Grigg, M., Maewal, A. and McLeod R.,** 2010, Identification of *T. gondii* epitopes, adjuvants, and host genetic factors that influence protection of mice and humans, *Vaccine*, 28(23): 3977-3989pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tanaka, S., Kuroda, Y., Ihara, F., Nishimura, M., Hiasa, J., Kojima, N., Nishikawa, Y.,** 2014, Vaccination with profilin encapsulated in oligomannose-coated liposomes induces significant protective immunity against *Toxoplasma gondii*, *Vaccine*, 32(16):1781-1785pp.
- Tao, Q., Fang, R., Zhang, W., Wang, Y., Cheng, J., Li, Y., Fang, K., Khan, M.K., Hu, M., Zhou, Y. and Zhao, J.,** 2013, Protective immunity induced by a DNA vaccine-encoding *Toxoplasma gondii* microneme protein 11 against acute toxoplasmosis in BALB/c mice, *Parasitology Research*, 112(8):2871-2877pp.
- Vercammen, M., Scorza, T., Huygen, K., De Braekeleer, J., Diet, R., Jacobs, D., Saman, E. and Verschueren, H.,** 2000, DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice, *Infection and Immunity*, 68(1), 38-45 pp.
- Verma, R. and Khanna, P.,** 2013, Development of *Toxoplasma gondii* vaccine: A global challenge, *Human Vaccine & Immunotherapeutics*, 9:2, 291-293pp.
- Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M., Ugolini, S.,** 2011, Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells, *Science*, 331:44-49pp.
- Wang H.L., Liu Q., Liu K., Zhong W., Gao S., Jiang L. and An N.,** 2007, Immune response induced by recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing ROP2 gene of *Toxoplasma gondii*, *Parasitology International*, 56(4):263-268 pp.
- Wang, H.L., Li, Y.Q., Yin, L.T., Meng, X.L., Guo, M., Zhang, J.H., Liu, H.L., Liu, J.J. and Yin, G.R.,** 2013, *Toxoplasma gondii* Protein Disulfide Isomerase (TgPDI) is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis, *PLoS ONE*; 8: e70884.
- Wang, H.L., Pang, M., Yin, L.T., Zhang, J.H., Meng, X.L., Yu, B.F., Guo, R., Bai, J.Z., Zheng, G.P., Yin, G.R.,** 2014a, Intranasal immunisation of the recombinant *Toxoplasma gondii* receptor for activated C kinase 1 partly protects mice against *T. gondii* infection, *Acta Tropica*, 137:58:66pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, H.L., Zhang, T., Yin, L., Pang, M., Guan, L., Liu, H., Zhang, J., Meng, X., Bai, J., Zheng, G. and Yin, G.,** 2014b, Partial protective effect of intranasal immunization with recombinant *Toxoplasma gondii* Rhoptry Protein 17 against toxoplasmosis in mice, *PLoS ONE*, 9 (9), e108377.
- Wang, P.Y., Yuan, Z.G., Petersen, E., Li, J., Zhang, X.X., Li, X.Z., Li, H.X., Lv, Z.C., Cheng, T., Ren, D., Yang, G.L., Lin, R.Q. and Zhu, X.Q.,** 2012, Protective efficacy of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein 13 plasmid DNA vaccine in mice, *Clinical And Vaccine Immunology*, 19(12):1916-1920pp.
- Wang, Y. and Yin, H.,** 2014, Research progress on surface antigen 1 (SAG1) of *Toxoplasma gondii*, *Parasites & Vectors*, 7:180,1-9pp.
- Wang, Y., Wang, M., Wang, G., Pang, A., Fu, B., Yin, H. and Zhang, D.,** 2011, Increased survival time in mice vaccinated with a branched lysine multiple antigenic peptide containing B- and T-cell epitopes from *T. gondii* antigens, *Vaccine*, 29(47):8619-8623pp.
- Weiss, L.M. and Dubey, J.P.,** 2009, Toxoplasmosis: A history of clinical observations, *International Journal for Parasitology*, 39: 895–901pp.
- Weiss, L.M. and Kim K.,** 2007, *Toxoplasma gondii*, The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods, Elsevier Ltd., Great Britain, 800pp.
- Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., Felgner, P.L.,** 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 247, 1465–1468pp.
- Wu, X.N., Lin, J., Lin, X., Chen, J., Chen, Z.L. and Lin, J.Y.,** 2012, Multicomponent DNA vaccine-encoding *Toxoplasma gondii* GRA1 and SAG1 primes: anti-Toxoplasma immune response in mice, *Parasitology Research*, 111(5), 2001-2009 pp
- Xu, Y., Zhang, N.Z., Tan, Q.D., Chen, J., Lu, J., Xu, Q.M and Zhu, X.Q.,** 2014, Evaluation of immuno-efficacy of a novel DNA vaccine encoding *Toxoplasma gondii* rhoptry protein 38 (TgROP38) against chronic toxoplasmosis in a murine model, *BMC Infectious Diseases*, 14:525, 1-8pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yan, H.K., Yuan, Z.G., Petersen, E., Zhang, X.X., Zhou, D.H., Liu, Q., He, Y., Lin, R.Q., Xu, M.J., Chen, X.L., Zhong, X.L. and Zhu, X.Q., 2011,** *Toxoplasma gondii*: protective immunity against experimental toxoplasmosis induced by a DNA vaccine encoding the perforin-like protein 1, *Experimental Parasitology*, 128: 38-43pp.
- Yan, H.K., Yuan, Z.G., Song, H.Q., Petersen, E., Zhou, Y., Ren, D., Zhou, D.H., Li, H.X., Lin, R.Q., Yang, G.L. and Zhu, X.Q., 2012,** Vaccination with a DNA vaccine coding for perforin-like protein 1 and MIC6 induces significant protective immunity against *Toxoplasma gondii*, *Clinical Vaccine Immunology*, 19(5):684-689pp.
- Yang, C.D., Chang, G.N. and Chao, D., 2004,** Protective immunity against *Toxoplasma gondii* in mice induced by a chimeric protein rSAG1/2, *Parasitology Research*, 92, 58-64pp.
- Yao, B., Zhang, L., Liang, S. and Zhang, C., 2012,** SVMTriP: a method to predict antigenic epitopes using support vector machine to integrate tripeptide similarity and propensity, *PLoS One*, 7(9):e45152.
- Yin, L.T., Hao, H.X., Wang, H.L., Zhang, J.H., Meng, X.L. and Yin, G.R., 2013,** Intranasal immunisation with recombinant *Toxoplasma gondii* actin partly protects mice against Toxoplasmosis, *PLoS ONE*; 8: e82765.
- Yu, L., Yamagishi, J., Zhang, S., Jin, C., Aboge, G.O., Zhang, H., Zhang, G., Tanaka, T., Fujisaki, K., Nishikawa, Y. and Xuan, X., 2012,** Protective effect of a prime-boost strategy with plasmid DNA followed by recombinant adenovirus expressing TgAMA1 as vaccines against *Toxoplasma gondii* infection in mice, *Parasitology International*, 61, 481-486pp.
- Yu, Q., Huang, X., Gong, P., Zhang, Q., Li, J., Zhang, G., Yang, J., Li, H., Wang, N. and Zhang, X., 2013,** Protective immunity induced by a recombinant BCG vaccine encoding the cyclophilin gene of *Toxoplasma gondii*, *Vaccine*, 31(51):6065-6071pp.
- Yuan, Z.G., Ren, D., Zhou, D.H., Zhang, X.X., Petersen, E., Li, X.Z., Zhou, Y., Yang, G.L. and Zhu, X.Q., 2013,** Evaluation of protective effect of pVAX-TgMIC13 plasmid against acute and chronic *Toxoplasma gondii* infection in a murine model, *Vaccine*, 31(31):3135-3139pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yuan, Z.G., Zhang, X.X., He, X.H., Petersen, E., Zhou, D.H., He, Y., Lin, R.Q., Li, X.Z., Chen, X.L., Shi, X.R., Zhong, X.L., Zhang, B. and Zhu, X.Q.,** 2011a, Protective immunity induced by *Toxoplasma gondii* rhoptry protein 16 against toxoplasmosis in mice, *Clinical And Vaccine Immunology*, 18:1,119-124pp.
- Yuan, Z.G., Zhang, X.X., Lin, R.Q., Petersen, E., He, S., Yu, M., He, X.H., Zhou, D.H., He, Y., Li, H.X., Liao, M. and Zhu, X.Q.,** 2011b, Protective effect against toxoplasmosis in mice induced by DNA immunization with gene encoding *Toxoplasma gondii* ROP18, *Vaccine*, 29, 6614-6619pp.
- Zhang, J., He, S., Jiang, H., Yang, T., Cong, H., Zhou, H., Zhang, J., Gu, Q., Li, Y. and Zhao, Q.,** 2007, Evaluation of the immune response induced by multiantigenic DNA vaccine encoding SAG1 and ROP2 of *Toxoplasma gondii* and the adjuvant properties of murine interleukin-12 plasmid in BALB/c mice, *Parasitology Research*, 101(2):331-338pp.
- Zhang, M., Zhao, L., Song, J., Li, Y., Zhao, Q., He, S. and Cong, H.,** 2013, DNA vaccine encoding the *Toxoplasma gondii* bradyzoite-specific surface antigens SAG2CDX protect BALB/c mice against type II parasite infection, *Vaccine*, 31: 4536-4540pp.
- Zhang, N.Z., Huang, S.Y., Xu, Y., Chen, J., Wang, J.L., Tian, W.P. and Zhu, X.Q.,** 2014, Evaluation of immune responses in mice after DNA immunization with putative *Toxoplasma gondii* calcium-dependent protein kinase 5, *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(7), 924-929pp.
- Zhang, N.Z., Huang, S.Y., Zhou, D.H., Chen, J., Xu, Y., Tian, W.P., Lu, J. and Zhu, X.Q.,** 2013, Protective immunity against *Toxoplasma gondii* induced by DNA immunization with the gene encoding a novel vaccine candidate: calcium-dependent protein kinase 3. *BMC Infectious Diseases*, 13:512, 1-8pp.
- Zhang, T.E., Yin, L.T., Li, R.H., Wang, H.L., Meng, X.L. and Yin, G.R.,** 2015, Protective immunity induced by peptides of AMA1, RON2 and RON4 containing T-and B-cell epitopes via an intranasal route against toxoplasmosis in mice, *Parasites & Vectors*, 8:15, 1-9pp.
- Zhao, B., Sakharkar, K.R., Lim C.S., Kanguane P. and Sakharkar M.K.,** 2007, MHC-Peptide binding prediction for epitope based vaccine design, *International Journal of Integrative Biology*, 1(2):127-140pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zhao, G., Zhou, A., Lv, G., Meng, M., Sun, M., Bai, Y., Han, Y., Wang, L., Zhou, H., Cong, H., Zhao, Q., Zhu, X.Q. and He, S.,** 2013b, Identification and characterization of *Toxoplasma gondii* aspartic protease 1 as a novel vaccine candidate against toxoplasmosis, *Parasites & Vectors*, 6:175, 1-13pp.
- Zhao, G., Zhou, A., Lv, G., Meng, M., Sun, M., Bai, Y., Han, Y., Wang, L., Zhou, H., Cong, H., Zhao, Q., Zhu, X.Q. and He, S.,** 2013a, *Toxoplasma gondii* cathepsin proteases are undeveloped prominent vaccine antigens against toxoplasmosis, *BMC Infectious Diseases*, 13:207, 1-11pp.
- Zhao, H., Huang, F.Y., Guo, J.L. and Tan, G.H.,** 2013c, Evaluation on the immune response induced by DNA vaccine encoding MIC8 co-immunized with IL-12 genetic adjuvant against *Toxoplasma gondii* infection, *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 31: 284-289pp.
- Zheng, B., Lu, S., Tong, Q., Kong, Q. and Lou, D.,** 2013, The virulence-related rhoptry protein 5 (ROP5) of *Toxoplasma gondii* is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis in mice, *Vaccine*, 31(41):4578-4584pp.
- Zhou, H., Gu, Q., Zhao, Q., Zhang, J., Cong, H., Li, Y. and He, S.,** 2007, *Toxoplasma gondii*: expression and characterization of a recombinant protein containing SAG1 and GRA2 in *Pichia pastoris*, *Parasitology Research*, 100, 829–835 pp.
- Zhou, H., Min, J., Zhao, Q., Gu, Q., Cong, H., Li, Y. and He, S.,** 2012, Protective immune response against *Toxoplasma gondii* elicited by a recombinant DNA vaccine with a novel genetic adjuvant, *Vaccine*, 30(10):1800-1806pp.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Doğum Yeri ve Tarihi: İzmir, 20/06/1988

Elektronik posta adresi: esra.atalay.sahar@gmail.com

Medeni Hali: Evli

Eğitim Bilgileri

- | | |
|-----------|--|
| 2012–2015 | Yüksek Lisans Derecesi: Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Bilim Dalı, Bornova/İzmir, Türkiye |
| 2007-2012 | Lisans Derecesi: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Bornova/İzmir, Türkiye |

Yayınlar [SCI (Science Citation Index) tarafından taranan dergilerde yayınlanan makaleler]

- Can H., Döşkaya M., Ajzenberg D., Özdemir H.G., Caner A., İz S.G., Döşkaya A.D., **Atalay E.**, Çetinkaya Ç., Ürgen S., Karaçalı S., Ün C., Dardé M.L., Gürüz Y. (2014). Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates and toxoplasmosis seroprevalence in stray cats of İzmir, Turkey. *PLOS One*, 9(8):e104930.

Uluslararası Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında sunulan sözlü bildirileri

- Döşkaya M., **Atalay E.**, Liang L., Caner A., Can H., İz S.G., Davies H., Değirmenci Döşkaya A., Felgner P., Gürüz Y. (2014). Development of a novel six-valent recombinant protein vaccine against toxoplasmosis using antigens discovered by high-throughput protein microarray analysis of patient and infected murine model sera. *Kısa Sözlü sunum-ePoster*, 22nd ECCMID (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) Barselona, İspanya, 10-14 Mayıs 2014. Abstract book p. 96.

Uluslararası Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında sunulan poster bildirileri

- Şahar U., Döşkaya M., Caner A., Can H., **Atalay E.**, Değirmenci Döşkaya A., Deveci R., Gürüz Y., 2014, "Preliminary analysis of monosaccharides in virulent *T. gondii* Ankara and Ege-1 strains by Cap LC-ESI-MS/MS". Poster, 22nd ECCMID (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) Barselona, İspanya, 10-14 Mayıs (2014). Abstract book p.169
- Can H., Döşkaya M., Özdemir H.G., Caner A., **Atalay E.**, Pektaş B., Gülce İz S., Değirmenci Döşkaya A., Ün C., Gürüz Y. (2014). Demonstration of *Leishmania* spp. by nested PCR in stray cats of İzmir located in western Turkey. *Poster*, 22nd ECCMID (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) Barselona, İspanya, 10-14 Mayıs (2014). Abstract book p.168
- Gülçe İz S., Döşkaya M., Elaldı N., Pablo J., Davies H., Caner A., Değirmenci Döşkaya A., Can H., **Atalay E.**, Nakajima R., Jasinskas A., Deliloğlu Gürhan S.İ., Gürüz Y., Felgner P. (2013). Antigen Discovery from Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Genome using Protein Microarray Chips. *Poster*, VI. Bioengineering Congress, Kuşadası, Türkiye, 12-15 Kasım 2013. Abstract book p. 115.

Ulusal ve uluslararası katılımlı bilimsel toplantılarda sunulan sözlü bildiriler

- Can, H., Döşkaya, M., Ajzenberg, D., Özdemir, H.G., Caner, A., Gülce, İ.S., Değirmenci, D.A., **Atalay, E.**, Çetinkaya, Ç., Ürgen, S., Ün, C., Dardé, M.L., Gürüz, Y. (2014). Dünyada *Toxoplasma gondii* Genotiplerinin Coğrafik Dağılımı: Türkiye’de Son Durum. *Sözlü Bildiri*, 22.Ulusal Biyoloji Kongresi 23- 27 Haziran 2014, Eskişehir, Özet kitabı s. 397

- **ATALAY E. (2014).** İmmünsüpresif Hastalar için Önem Taşıyan Bazı Etkenlerin Mikrobiyolojik Tanısı: *Strongyloides stercoralis*. *Panel*, 8. Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi, 4-7 Haziran 2014, Ankara, Özet kitabı s. 77.
- Döşkaya, M., Caner, A., Değirmenci, D.A., Gülce, İ.S., Can, H., Gedik, Y., **Atalay, E.**, Gürüz, Y., **(2013),** “Aşı Geliştirmede Rekombinant Proteinler ve Post Translasyonel Modifikasyonun Önemi” *Sözlü Bildiri*. II. Ulusal Glikobiyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı) 11-14 Haziran 2013, İzmir, Türkiye. Özet kitabı s. 20.
- **Atalay E.,** Deveci R., **(2012)** “N- ve O- Glikozilasyonu Engellenmiş Denizkestanesi Germ Hücrelerinin Döllenmesinde Glikozilasyonun Öneminin Deneysel Olarak Araştırılması” *Sözlü Bildiri*. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı) 3-7 Eylül 2012, İzmir, Özet kitabı s. 78.

Ulusal ve uluslararası katılımlı bilimsel toplantılarda sunulan poster bildirileri

- Can, H., **Atalay, E.**, Döşkaya, M., Özdemir, H.G., Caner, A., Değirmenci, D.A., Gürüz, Y., Ün, C., **(2014).** Kedilerde CMAH Geni Analizi. *Poster bildiri*, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi 23-27 Haziran 2014, Eskişehir, Özet kitabı s. 1344.
- Can, H., Döşkaya, M., Ajzenberg, D., Özdemir, H., Caner, A., Gülce, İ.S., Değirmenci, A., Çetinkaya, Ç., Ürgen, S., **Atalay, E.**, Karaçalı, S., Ün, C., Deveci, R., Dardé, M.L., Gürüz, Y., **(2013),** “İzmir İli Sokak Kedilerinde Toxoplasmosis Seroprevalansı”. *Poster*, 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi 29 Eylül- 5 Ekim 2013, Denizli, Türkiye. Özet kitabı s.264.
- Can, H., Döşkaya, M., Özdemir, H., Caner, A., **Atalay, E.**, Pektaş, B., Töz, Ö.S., Gülce, İ.S., Değirmenci, D.A., Çetinkaya, Ç., Ürgen, S., Karaçalı, S., Ün, C., Deveci, R., Gürüz, Y., **(2013),** “İzmir İli Sokak Kedilerinde Leishmania spp. Varlığının Moleküler Yöntemlerle Araştırılması”. *Poster*, 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi 29 Eylül- 5 Ekim 2013, Denizli, Türkiye. Özet kitabı s.204.
- Kıvrak, E.E., Taşbakan, I.M., Döşkaya, M., Caner, A., Pullukçu, H., Değirmenci D.A., Yılmaz, M., Can, H., **Atalay, E.**, Alver, O., Töz, H., Gürüz Y., **(2013),** “Dışkı örneklerinde Strongyloides stercoralis’in Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Tanısı”. *Poster*, 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi 29 Eylül- 5 Ekim 2013, Denizli, Türkiye. Özet kitabı s.183 (18. Ulusal Parazitoloji Kongresinde Poster Birincilik ödülü almıştır).
- **Atalay E.,** Deveci R., **(2013),** “Denizkestanesi *Paracentrotus lividus*’da N- ve O- Glikozilasyonun Döllenmedeki Etkisinin Araştırılması”. *Poster*, II. Ulusal Glikobiyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı) 11-14 Haziran 2013, İzmir, Türkiye. Özet kitabı s. 43.

Projeler

- **Proje başlığı:** N- ve O- Glikozilasyonu Engellenmiş Deniz Kestanesi Germ Hücrelerinin Döllenmesinde Glikozilasyonun Öneminin Deneysel Olarak Araştırılması
Görevi: Yürütücü
Proje tarihi: 2011-2012
Projeyi destekleyen kuruluş: TÜBİTAK 2209
- **Proje başlığı:** İzmir ili sokak kedilerinde *Leishmania* spp. varlığının moleküler ve serolojik yöntemlerle araştırılması
Görevi: Araştırmacı
Proje tarihi: 2013-2014
Projeyi destekleyen kuruluş: Ege Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fon Saymanlığı (2013TIP099)
- **Proje Başlığı:** Toxoplasmosise Karşı Adjuvante Multivalan Rekombinant Protein Aşısının Oluşturulması
Görevi: Bursiyer
Proje tarihi: 2010-2013
Projeyi destekleyen kuruluş: TÜBİTAK SBAG 1001 (Proje No:110S200)

- **Proje Başlığı:** Doğal hayatta saptanan *Toxoplasma gondii* suşlarının izolasyonu ve mikrosatellit genotiplendirilmesi
Görevi: Araştırmacı
Proje tarihi: 2014-2017
Projeyi destekleyen kuruluş: Ege Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fon Saymanlığı (2014 TIP 073)

Kongreler ve Diğer Eğitimler

I. ULUSAL VE ULUSLARARASI KONGRE VE SEMPOZYUM

- 11. Ege Diyabet Günleri Kursu 14-15 Kasım 2013, İzmir, Türkiye
- 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi 29 Eylül- 5 Ekim 2013, Denizli, Türkiye
- Uluslararası Katılımlı Genotiplendirme Sempozyumu 19 Haziran 2013, İzmir, Türkiye
- II. Ulusal Glikobiyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı) 11-14 Haziran 2013, İzmir, Türkiye
- 21. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı) 3- 7 Eylül 2012, İzmir, Türkiye
- Kanseri Biyolojisi ve İmmunolojisi Kursu 29-30 Mart 2012, İzmir, Türkiye
- Discussion Meeting on Sialoglycobiology 26-27 Kasım 2011, İzmir, Türkiye

II. KONGRE VE SEMPOZYUM DÜZENLEMEDE ALINAN GÖREVLER

- 19 Haziran 2013 tarihinde İzmirde düzenlenen “Uluslararası Katılımlı Genotiplendirme Sempozyumu” organizasyon komitesinde yer almıştır.

III. DİĞER EĞİTİMLER

- Malign Hastalıklarda Klinik Araştırmalar Çalıştayı, 12-13 Eylül 2013, T.C. Sağlık Bakanlığı ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir.
- Temel İyi Klinik Uygulamalar Eğitimi, 6-7 Eylül 2013, T.C. Sağlık Bakanlığı ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir.
- Glikobiyolojide Optik ve Analitik Yöntemler Çalıştayı, II. Ulusal Glikobiyoloji Kongresi, Uluslararası Katılımlı, 11-14 Haziran 2013, İzmir.
- Pedagojik Formasyon Sertifikası Programı, Ege Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, 2010-2011, İzmir.

KAZANILAN BURSAR

- TÜBİTAK Araştırmacı Proje Bursu (8 ay), 15/ 02 /2013-15 / 10 /2013

Patent Başvuruları

- 2014, 2014/11565, Kurutulmuş meyve ve sebzelerde H₂O₂ (hidrojen peroksit) tayini.

Üğeliği Bulunan Dernekler

- Türkiye Aşı Bilimi Derneği, Üye, Denetleme Kurulu yedek üyesi
- Türkiye Parazitoloji Derneği, Üye