

Toxoplasma gondii'nin Çeşitli Suşlarının Proteinlerinin Karakterizasyonu

Characterization of *Toxoplasma gondii* Proteins From Various Strains

Kerem Yaman¹, Gülay Aral Akarsu¹, Çiğdem Güngör¹, Haluk Ataoğlu²

¹Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Bilim Dalı, Ankara, Türkiye

²Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

ÖZET

Amaç: *Toxoplasma gondii* dünyada yaygın olarak görülen ve toksoplazmoza yol açan protozoon bir parazittir. Zorunlu hücre içi yerleşim göstermekte ve insanlar dahil tüm sıcak kanlıları enfekte etmektedir. Özellikle immunkompromize olanlarda ve konjenital bulaş sonucunda ciddi klinik tablolara yol açabilmektedir. Hayvanlarda meydana getirdiği düşüklerle de hayvancılığın yaygın olduğu ülkelerde ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Tanısı direkt veya dolaylı olarak yapılabilmektedir. Dolaylı tanıda, referans test olan Sabin-Feldman boya testi, ELISA ve immun floresan antikor testi (IFA) gibi serolojik testlerden faydalanılmaktadır. Serolojik testlerde saptanan antikorlar, sentezlenmelerine yol açan antijen yapısıyla ilişkilidir, bu yüzden farklı suşlardaki protein yapılarının incelenmesi önem taşımaktadır. Bu çalışmada *T. gondii*'nin RH, Ankara ve TS-4 suşları kullanılmış ve protein yapılarındaki farklılıklar incelenmiştir.

Yöntemler: Virulan RH ve Ankara suşları fare peritonuna inoküle edilerek, TS-4 suşu ise Vero hücre kültüründe üretilmiştir. İnokülasyondan üç gün sonra, takizoitler periton yıkanarak toplanmış ve parçalanmıştır. Lizatlar yoğunlaştırmak amacıyla liyofilize edildikten sonra protein içerikleri saptanmıştır. Suşların protein yapıları SDS-PAGE ile ayrılmıştır. Yürütülen lizatlar polikromatik gümüş boyası ile boyanmış ve ortaya çıkan bantlar moleküler ağırlık standardı ile karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Karşılaştırma sonucunda, Ankara ve RH suşunda 60-70 kDa arasında ve 15 kDa seviyesinde yoğunlaşma gözlenirken, TS-4 suşunda 60 ve 115 kDa ağırlığında olanlar en belirgindi.

Sonuç: RH ve Ankara suşlarının aynı protein bantlarını içerdiği, TS-4 suşunun daha farklı ve diğer iki virulan suşa oranla daha az protein bantına sahip olduğu anlaşılmıştır. (*Türkiye Parazitol Derg* 2011; 35: 133-6)

Anahtar Sözcükler: *Toxoplasma gondii*, RH, TS4, Ankara suşu, antijen

Geliş Tarihi: 01.12.2010

Kabul Tarihi: 21.07.2011

ABSTRACT

Objective: *Toxoplasma gondii* the causative agent of toxoplasmosis, is a worldwide intracellular protozoan parasite that infects all warm blooded animals including humans. It can be devastating to immunocompromised humans and congenital transmission may result in severe clinical spectrum. It causes economic losses due to abortus in animals. Toxoplasmosis diagnosis depends on direct and indirect methods. Besides the Sabin-Feldman test, which is accepted to be the reference test, serologic tests such as ELISA and immunofluorescence antibody tests are means of indirect diagnosis. As detected antibodies in serologic tests are correlated with antigens that cause their synthesis, it is important to know different proteins of different strains. In this study RH, Ankara and TS-4 strains were used and differences between their proteins were examined.

Methods: RH and Ankara strains were inoculated into the peritoneal cavity of mice. TS-4 strain was produced in Vero cell culture. Tachyzoites collected by peritoneal wash were lysed and lyophilised. This was run on SDS-PAGE gel and protein bands were compared with a standard protein ladder after staining with polychromatic silver stain.

Results: It was observed that, while Ankara and RH strains had dense bands between 60-70 kDa and at 15 kDa, the most prominent bands of TS-4 strain were 60 ve 115 kDa bands.

Bu çalışma, 15. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 18-23 Kasım 2007, Kayseri'de sunulmuştur.

Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Dr. Gülay Aral Akarsu, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Bilim Dalı, Ankara, Türkiye

Tel: +90 312 310 30 10 Faks: +90 312 310 63 70 E-posta: gakarsu@yahoo.com

doi:10.5152/tpd.2011.33

Conclusion: RH and Ankara strains have the same protein bands while TS-4 strain has different and fewer protein bands than the others. (Türkiye Parazit Derg 2011; 35: 133-6)

Key Words: Toxoplasma gondii, RH, TS-4, Ankara strain, antigen

Received: 01.12.2010

Accepted: 21.07.2011

GİRİŞ

Toksoplazmoz etkeni *Toxoplasma gondii*, dünyada yaygın olarak gözlenen zorunlu hücre içi protozoonudur. İmmunokompromize kişilerde ve primer enfeksiyonu gebelik sırasında geçiren kadınların fetuslarında ciddi klinik belirtilere sebep olurken, hayvanlarda da düşük ve ölü doğumlara yol açmakta ve ülke ekonomisine zarar vermektedir. Bulaş, sıklıkla doku kistlerini barındıran et ve et ürünleri veya kedi dışkıyla dış ortama atılan ookistlerle kontamine yiyecek ve içeceklerle olmaktadır. Enfeksiyonun prevalansı, farklı bölgelerde, coğrafi koşullar ve kişilerin yaşam tarzlarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (1, 2).

Hem serolojik tanı hem de aşı çalışmaları için duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek antijenlere ihtiyaç duyulmaktadır (3). *T. gondii*'nin antijenik yapıları suşlar arasında farklılıklar göstermektedir. Her suş virulan olarak kabul edilmemekte ve virulan suşlar arasında da antijenik farklılıklar görülmektedir (4, 5). Yapılan ilk çalışmalarda yüzey antijenleri tanımlanmıştır. Molekül ağırlıkları 22, 23, 30, 35 ve 43 kDa olarak belirlenen bu yapılar membranda bulunmakta ve glikozil fosfatidilinositol dizisi içermektedir. Görevleri konak hücreyi invaze etmek, immunomodülasyon ve virulansı sağlamaktır (6, 7). *T. gondii*'nin yoğun granül (GRA), mikronem (MIC) ve rhoptri (ROP) adlı özelleşmiş organelleri, takizoitin apikal bölgesinde yerleşir ve hücre invazyonu için gerekli olan proteinleri salgılar (8).

1941 yılında izole edilen ve daha sonra yapılan genotiplendirme çalışmalarında tip I suşlar arasında yerini alan RH suşu virulan bir suştur. İlk defa 1973 yılında Ekmen ve Altıntaş (9) tarafından izole edilen Ankara suşunun da farelerdeki virulansı RH suşuna benzerdir. Isıya duyarlı bir *T. gondii* suşu olarak 1976 yılında elde edilen ve 10^5 takizoit verildiğinde bile farede öldürücü olmayan TS-4 suşu ise virulansı daha düşük bir suştur (10).

Bu çalışmada *T. gondii*'nin RH suşu, Ankara suşu ve hücre kültüründe seri pasajlarla devamı sağlanabilen virulansı düşük TS-4 suşunun protein yapılarının birbiriyle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

RH (ATCC katalog no:50174) ve Ekmen ve Altıntaş (9) tarafından ilk defa Ankara'da bir köpekten izole edilip 1973 yılından beri laboratuvarımızda farelere pasajla devam ettirilen Ankara suşu, virulan suşlar olarak Swiss albino deney farelerine intraperitoneal olarak inoküle edildi. Fareler, 25°C'de sabit nem koşullarında, gece-gündüz döngüsü ayarlanmış dolapta bekletildi. İnokülasyondan 3 gün sonra, fare peritonları 3 ml PBS ile yıkılarak *T. gondii* takizoitleri toplandı. Tüp içine aktarılan takizoitli periton sıvıları, fare kaynaklı hücrelerin ayrılması için 40 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Ardından üst sıvı alınarak 950 xg'de 10 dk santrifüj edildi. Üst sıvı atılarak toplam 3 defa yıkandı. TS-4 (ATCC katalog no:40050) suşunu üretmek için Vero hücresi kullanıldı (11). Kültürler, ekim yapıldıktan sonra 10 gün boyunca düzenli olarak

kontrol edildi. Hücreler, takizoitlerin çoğalmaları nedeniyle parçalandığında takizoitler alındı. Takizoitler hücre ve hücre artıklarından arındırmak için 40xg'de 5 dk çevrildi. Çökelti atıldı ve alınan üst sıvı 900xg'de 10 dk santrifüj edilerek 3 defa yıkandı 5 ml PBS ile 1×10^6 takizoit/ml olacak şekilde sulandırıldı, çalışılana kadar +4° C'de saklandı.

Üç suşa ait takizoitler, önce 4 defa-80°C'de dondurma 37°C'de çözme ve ardından sonifikasyon işlemi ile parçalandı. Sonifikasyon, Branson marka ultrasonifikasyon aleti kullanılarak 60 Hz frekansta dalga 15 saniyelik döngüler halinde beş kez uygulandı. Parçalama işleminin gerçekleştirildiği mikroskop incelemesiyle doğrulandıktan sonra, takizoit lizat 1 ml miktarlarda ependorf tüplerine dağıtıldı. Bu işlemler her suş için tekrarlandı. Hazırlanan karışımlar çalışılana kadar-20°C'de saklandı. Protein içeriklerini yoğunlaştırmak için liyofilize edilen lizatların protein miktarı Bradford yöntemiyle tayin edildi.

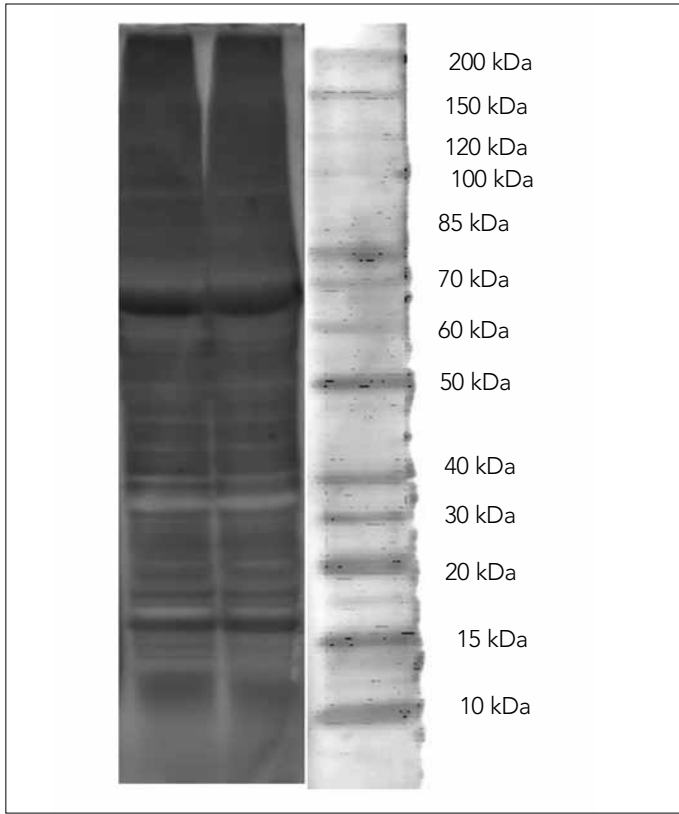
SDS-PAGE için, Amersham Pharmacia marka mini elektroforez aleti kullanılarak elektroforez yapıldı. Gradient jel (%5-%20) 70 ml hacminde döküldü ve 30-40 dakika polimerize olması beklendi. Üstteki butanol döküldü ve 1-2 defa distile suyla yıkandı. Jel içine kuyucuk açıcı 8'li tarak konarak polimerizasyonu beklendi. Birinci kuyucuğa 10 µl Fermantas marka boyanmamış moleküler ağırlık standardı ve 10 µl örnek tampon karışımı yüklendi. Lizatlardan 20'şer µl, 10'ar µl örnek tamponu ile karıştırılarak, ikinci kuyucuğa Ankara suşu, üçüncü kuyucuğa RH suşu ve dördüncü kuyucuğa TS-4 suşu lizatı yüklendi. Yürütme tamponu tanka döküldükten sonra, jel başına 20 mA akım sabit kalmak üzere elektroforez işlemi başlatıldı. Proteinlerin hareketleri tamamlanınca güç kaynağı kapatılarak jeller alındı (12). Jeller, polikromatik gümüş boyası ile boyandıktan sonra, oluşan bantlar moleküler ağırlık standardı ile karşılaştırılarak Ankara, RH ve TS-4 suşlarında meydana gelen bantların protein büyüklükleri karşılaştırıldı.

BULGULAR

Jel boyandıktan sonra oluşan bantlar moleküler ağırlık standardı ile karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonucu Ankara, RH ve TS-4 suşlarında meydana gelen bantların protein büyüklükleri belirlendi. Ankara suşunun RH suşuyla aynı protein yapıları içerdiği anlaşıldı. TS-4 suşunda daha az sayıda bant görüldü ve belirgin olarak gözlenen bantlar ise daha farklı idi. Ankara ve RH suşunda 60-70 kDa arasında ve 15 kDa seviyesinde belirgin yoğunlaşma gözlemlendi. Diğer belirgin bantlar 35, 40 ve 55 kDa seviyesinde yer almaktaydı. TS-4 suşunda ise 60 ve 115 kDa ağırlığında olanlar en belirgindi. Ayrıca 80 ve 150 kDa seviyesinde de bantlar gözlemlendi. Bu üç suşta ortaya çıkan protein bantları Şekil 1 ve Şekil 2'de görülmektedir.

TARTIŞMA

Toksoplazmoz tanısının zamanında ve doğru yöntemle konulması önemlidir. Serolojik testlerin yapılması için canlı parazitlere veya duyarlı ve özgül antijenlere ihtiyaç duyulmaktadır.

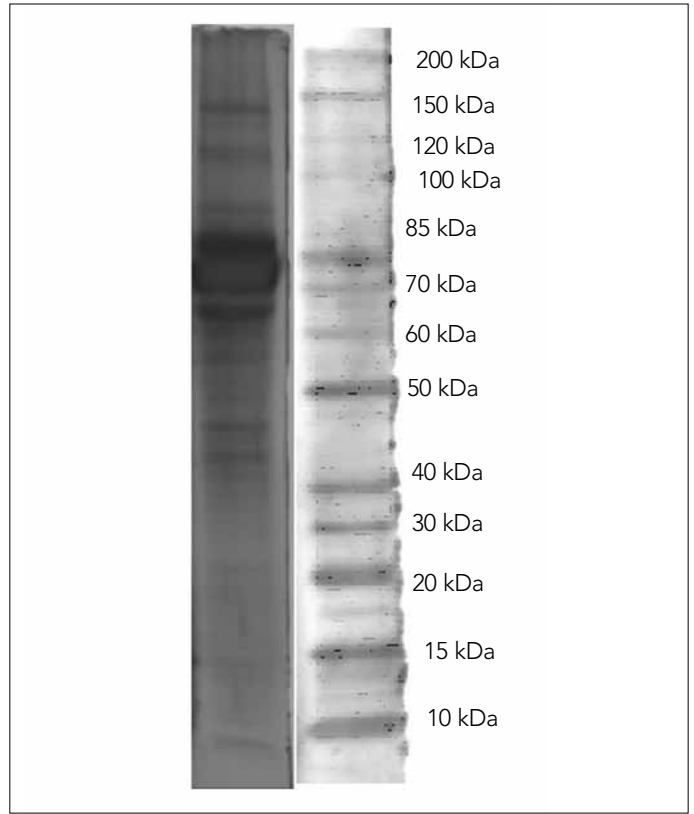


Şekil 1. RH ve Ankara suşlarının jel görüntüsü

T. gondii suşlarının virulansı farelerde yapılan çalışmalarda farelerin yarısını öldüren doz (LD_{50}) miktarına bağlı olarak belirlenmektedir. Virulans farkı, etkenin yerleşeceği konak ve doku seçimini etkilemektedir. *T. gondii*'nin üç temel genotipi; RH ve GT-1 suşlarını örnek olarak verebileceğimiz tip I, ME49 suşu gibi suşları içeren tip II ve CEP ve VEG suşlarının yer aldığı tip III'tür (5). İnsanları etkileyen toksoplazmoz olgularının çoğundan tip II suşunun sorumlu olduğu bulunmuştur (13). Tip I suşlar, virulansları daha yüksek olduğu için bazı ciddi konjenital ve oküler vakalardan sorumlu tutulmaktadır (11). Burada virulansı sağlayan faktörleri sentezleyen genlerin ekspresyon seviyeleri de önemlidir. SAG3, GRA2, karbomil fosfat sentetaz II, MIC1 ve MIC3 proteinlerinde eksilmeler virulansı düşürerek farede deneysel olarak oluşturulan enfeksiyonun şiddetini azaltmaktadır (7).

Tip I suşlar, hücreleri daha hızlı enfekte etmekte, daha uzun süre enfektif kalmakta ve bir hücreyi parçaladıktan sonra diğerini daha çabuk invaze etmektedir (5). Antijen yapıları konaktaki doğal savunma bariyerlerini geçerken de görev alan yapılarıdır. Bu bariyer yerleşim yerine göre kan-beyin bariyeri veya plasenta olabilmektedir. Bu açıdan bakıldığında suşların yayılım kapasitesi de önemlidir. In vitro ortamda tip I suşların, tip II ve tip III'e oranla daha iyi yayılım gösterdikleri ve daha fazla hücreyi enfekte ettikleri gösterilmiştir (14).

Suşlar arasındaki farklılıklar antijenik yapıya yansımaktadır. Virulan ve avirulan suşlarda belli gen dizilerinin varlığının etkenin patojenitesini etkilediği saptanmıştır. Virulan ve avirulan olan *T. gondii* suşları arasında doğadaki döngüleri açısından da fark vardır. Virulan olan suşlar daha seyrek ookist veya doku kisti oluşturmaktadırlar (15).



Şekil 2. TS-4 suşunun jel görüntüsü

Ware ve Kasper (16), *T. gondii* için suşa özgü antijenleri belirtmişlerdir. Bu çalışmada 1941 yılında izole edilmiş ve farelerde seri pasajlarla devam ettirilen RH, P ve C suşları kullanılmıştır. RH suşu virulan, P ve C suşları avirulandır. Bu suşlarla enfekte edilen tavşanlardan elde edilen antiserumla immunoblot yapıldığında, oluşan antikorların çoğunlukla RH suşuna ait takizoitlerin antijenlerine karşı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. RH suşunun 22 kDa ve 30 kDa ağırlığındaki antijenleri konak immun sistemini daha iyi uyartırlar. Avirulan P ve C suşu antijenleri daha çok IgM antikorlarına bağlanırlarken, RH suşu antijenlerinin IgG antikorlarına bağlanma potansiyelinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (16).

Bir çalışmada, RH suşu ve RH Ankara (TRH) adı verilmiş olan suşun westernblot yöntemi kullanılarak antijenik karşılaştırması yapılmıştır. RH Ankara (TRH) adı verilen suşun Ankara'daki sokak kedilerinin bağırsak ekstraktları ile enfekte edilen farelerden izole edilmiş olduğu ifade edilmiştir. Bu iki suş ve özgül IgG antikorları olan hasta serumları kullanılarak yapılan çalışmada TRH suşu ile, RH suşundan farklı 3 adet bant (48-60 kDa aralığında) gözlemlendiği bildirilmiştir (4).

Yaptığımız çalışmada virulan ve düşük virulanslı suşların antijenik potansiyele sahip olabilecek proteinleri arasındaki farklılıklar araştırılmıştır. Ankara ve RH suşunda idantik bantlar saptanmıştır. En belirgin bant 60-70 kDa arasına denk gelen banttir. Bu bantın konak hücreye yapışma aşamasında görev alan MIC1 olması olasıdır. Deneysel olarak MIC1 eksikliği hücreleri enfekte etme hızında %50'ye varan azalma yol açarken, replikasyon oranında herhangi bir azalmaya neden olmamıştır (17). *T. gondii*'nin en baskın yüzey antijeni olan SAG1 olabileceği tahmin edilen bant, 30 kDa seviyesinde ince bir bant olarak gözlemlenmiştir. SAG3 oldu-

ğu düşünülen bant ise 40 kDa hizasının biraz üstünde belirlenmiştir. Virulan olan suşlarda bulunan bu antijenin işlevi tam olarak bilinmese de, hücreye bağlanma aşamasında görev aldığı düşünülmektedir. Görevi anlaşılammış diğer bir yüzey antijeni olan SAG4 35 kDa civarında SAG3'ün altında yer almaktadır (7). Yaklaşık 55 kDa ağırlığında bulunan kalın fakat soluk bantın ROP2 ve homoloğu ROP8 olabileceği düşünülmüştür. Hücre invazyonu sırasında başta mitokondri olmak üzere konak hücre organellerinin membranlarıyla etkileşim kurmak ROP2'nin görevidir. ROP2 eksikliği olan suşlar farelerde deneysel olarak oluşturulan enfeksiyonlarda invazyonda yetersiz kalmaktadır (18). Belirgin bir başka bant da 15 kDa seviyesinde gözlenmiştir. Daha önceki yayınlarda saptanmış olan önemli antijenik yapılar 20 kDa üzerinde yer almaktadır. Bizim çalışmamızda 15 kDa seviyesinde elde edilen yoğunlaşmanın küçük miktarlardaki düşük molekül ağırlıklı antijenler olarak yorumlanmıştır.

Virulansı düşük TS-4 mutant suşuna ait bantlar daha az sayıda gözlenmiştir. En belirgin olarak gözlenen bant 80 kDa hizasına denk gelmektedir. Altında 60 kDa seviyesindeki bantın ROP1 olması olasıdır. ROP1 penetrasyon arttırıcı faktör olarak adlandırılırsa da virulansla direk ilgisi olmadığı belirtilmiş, ROP1 eksik mutantların da enfeksiyona yol açabildikleri gösterilmiştir (19). Bantlar arasında 100 kDa seviyesini geçen bantlar sadece TS-4 suşunda görülmüştür. Soluk olarak gözlenen bantlar 115 kDa ve 150 kDa hizasındadır. MIC2, 115 kDa ağırlığında olup parazitin konak hücredeki ekstrasellüler matris elemanlarıyla etkileşmesini sağlamaktadır. Laminin ve kollajen proteinleriyle etkileşime girer. *T. gondii*'nin geniş konak yelpazesinden sorumludur. Virulansla direkt ilgisi olmayan bir proteindir (20).

Yapılan bu çalışmada RH ve Ankara suşlarının benzer protein paternine sahip olduğu ve virulan karakterdeki suşlarda bulunan bantları taşıdıkları, virulansı daha düşük olan TS-4 suşunun ise farklı bant paterni gösterdiği gözlenmiştir. Daha sonraki çalışmalarda, saptanan protein bantlarından antijenik özelliklere sahip olanların hastalığın hangi evresinde antikor cevabı oluşturduğunun araştırılması amaçlanmaktadır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

- Altıntaş K. Tıbbi Parazitoloji. 1. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Yayınları. 2002. p. 142-62.
- Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. Int J Parasitol 2009; 39: 895-901. [CrossRef]
- Zenner L, Estaquier J, Darcy F, Maes P, Capron A, Cesbron-Delauw MF. Protective immunity in the rat model of congenital toxoplasmosis and the potential of excreted-secreted antigens as vaccine components. Parasite Immunol 1999; 21: 261-72. [CrossRef]
- Delibaş SB, Ertabaklar H, Ertug S. Evaluation of antigenic variations between two virulent strains of *Toxoplasma gondii*. J Med Microbiol 2006; 55: 1333-5.
- Saeij JPJ, Boyle JP, Boothroyd JC. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with infected host. Trends Parasitol 2005; 21: 476-81. [CrossRef]
- Handman E, Goding JW, Remington JS. Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. J Immunol 1980; 124: 2578-83.
- Lekutis C, Ferguson DJP, Grigg ME, Camps M, Boothroyd JC. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. Int J Parasitol 2001; 31: 1285-92. [CrossRef]
- Carruthers VB. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. Parasitol Int 1999; 48: 1-10.
- Ekmen H, Altıntaş K. Bir köpekte *Toxoplasma gondii* izolmanı. Türk Hij Tec Biol Derg 1973; 33: 17.
- Waldeland H, Pfefferkorn ER, Frenkel JK. Temperature-sensitive mutants of *Toxoplasma gondii*: pathogenicity and persistence in mice. J Parasitol 1983; 69: 171-5. [CrossRef]
- Grigg ME, Ganatra J, Boothroyd JC, Margolis TP. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. J Infect Dis 2001; 184: 633-9. [CrossRef]
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-5. [CrossRef]
- Darde ML. Genetic analysis of diversity in *Toxoplasma gondii*. Ann 1st Super Sanita 2004; 40: 57-63.
- Barragan A, Sibley LD. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. Trends Microbiol 2003; 11: 426-30. [CrossRef]
- Sluys R. Species concepts, process analysis and the hierarchy of nature. Experientia 1991; 47: 1162-70. [CrossRef]
- Ware PL, Kasper LH. Strain specific antigens of *Toxoplasma gondii*. Infect Immun 1987; 55: 778-83.
- Cérède O, Dubremetz JF, Soète M, Deslée D, Vial H, Bout D, et al. Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. J Exp Med 2005; 201: 453-63.
- El Hajj H, Demey E, Poncet J, Lebrun M, Wu B, Galéotti N, et al. The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhopty proteins: Proteomic and genomic characterization and molecular modeling. Proteomics 2006; 6: 5773-84. [CrossRef]
- Kim K, Boothroyd JC. Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker. Science 1993; 262: 911-4. [CrossRef]
- Wan KL, Carruthers VB, Sibley DL, Ajioka JW. Molecular characterization of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding micronemal protein MIC2. Mol Biochem Parasitol 1996; 84: 203-14.