

Toxoplasma gondii'nin İnvazyonundan Sorumlu Hedef Rhoptry Neck Protein (RON) Geninin siRNA Transfeksiyonu ile Susturulması

Silencing the Target Rhoptry Neck Protein (RON) Gene Responsible For the Invasion of *Toxoplasma gondii* with siRNA Transfection

Merve YÜRÜK¹, Tülay AKSOY², Eda SİVCAN¹, Hilal NERGİZ³

¹ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

¹ Erciyes University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Kayseri.

² İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Malatya.

² İnönü University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Malatya, Turkey.

³ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kayseri.

³ Erciyes University Faculty of Medicine, Kayseri, Turkey.

* Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (Proje no: TDK-15-6147) desteklenmiş ve çalışmanın sonuçları Uluslararası Katılımlı 20. Ulusal Parazitoloji Kongresi (25-29 Eylül 2017, Eskişehir)'nde sözlü bildiri olarak sunulurken ikincilik ödülü almıştır.

Makale Atfı: Yürük M, Aksoy T, Sıvcan E, Nergiz H. *Toxoplasma gondii*'nin İnvazyonundan Sorumlu Hedef Rhoptry Neck Protein (RON) Geninin siRNA Transfeksiyonu ile Susturulması. Mikrobiyol Bul 2019;53(1):81-95

ÖZ

Koksidiyan bir protozoon olan *Toxoplasma gondii*'nin sebep olduğu toksoplazmozis tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de yaygın bir hastalıktır. İmmün sistemin durumuna, yaşa veya yerleştiği bölgeye göre çok farklı klinik belirtilere sebep olmaktadır. Parazitin ön ucunda apikal kompleks adı verilen organeller bulunmaktadır. Bu organellerin bir bileşeni olan "rhoptry neck protein (RON)"leri konak hücreye invazyon sürecinde "moving junction" formasyonunda ve parazitoforik vakuolün oluşumunda kritik bir role sahiptir. Öte yandan son yıllarda geliştirilen interferens RNA (iRNA) teknikleri ile yeni tedavi seçenekleri ortaya çıkmıştır. Small iRNA (siRNA) ile paraziter hastalıkların tedavisi ve kontrolünün yapılabilmesi de mümkün görülmektedir. Buradan hareketle toksoplazmozise karşı bu yöntemin kullanılması düşünülmüştür. Çalışma kapsamında, *T.gondii*'nin invazyon molekülü olan RON1 geninin siRNA transfeksiyonu ile susturulması amaçlanmıştır. Çalışmada, negatif kontrol grubunu oluşturan HeLa hücreleri, pozitif kontrol grubunu oluşturan *T.gondii* takizoitleri ile enfekte HeLa hücreleri ve deney grubunu oluşturan siRNA transfeksiyonu yapıldıktan sonra *T.gondii* takizoitleri ile enfekte edilen HeLa hücreleri kullanılmıştır. Her çalışma grubundan 30. saniye, 1. dakika, 5. dakika, 15. dakika, 30. dakika, 1. saat, 6. saat, 12. saat, 24. saat, 36. saat ve 48. saat sürelerinde örnekler toplanmıştır. Deney içi kontrol grupları ile deney grupları arasındaki parazit yüklerinin orantısız değişimini hesaplamak üzere, bu örneklerden RNA izolasyonu yapılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRt-PCR) ve protein izolasyonu yapılarak Western Blot (WB) analizleri gerçekleştirilmiştir. Kontrol grupları ile deney grupları arasındaki istatistiksel fark hesaplanmıştır. siRNA1 (p< 0.0055), siRNA2 (p< 0.0003), siRNA3 (p< 0.0001), siRNA4 (p< 0.0001), siRNA5 (p< 0.0001), siRNA6 (p< 0.0001), siRNA7 (p< 0.0182), siRNA9 (p< 0.0011) ve siRNA10 (p< 0.0004) ile yapılan deneylerde gen

İletişim (Correspondence): Dr. Merve Yürük, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Melikgazi, 38039, Kayseri, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 352 207 6666, **E-posta (E-mail):** yuruk_merve@hotmail.com

ifadesinde anlamlı fark olduğu fakat siRNA8 ($p < 0.4049$) ile yapılan deneyde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir. RON1 geninin susturulması sonucu total anti-*T.gondii* ve anti-*T.gondii* RON1 antikorları ile yapılan WB analizlerinde, deney grubuna ait hücre lisatlarında parazit antijeninin üretilmemesine bağlı olarak invazyonun engellendiği tespit edilmiştir. Anti-toksoplazmozis aşılarda ve terapötik ajanların geliştirilmesi için TgRON1 gen ifadesinin bu yöntem ile baskılanması umut verici bir basamak niteliğindedir.

Anahtar kelimeler: *Toxoplasma gondii*; siRNA; transfeksiyon; rhoptry neck protein.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a coccidian protozoan that causes toxoplasmosis is a common disease in Turkey as well as all over the world. It causes various clinical symptoms depending on the immune system status, age, or location of the disease. There is an organelle called the apical complex at the anterior end of the parasite. Rhoptry Neck Proteins (RONs), a component of this organelle, play a critical role in the formation of "moving junction" and parasitophorous vacuoles during host cell invasion. On the other hand, interfering RNA (iRNA) treatment options developed in recent years have emerged. With small iRNAs (siRNA) it is also possible to treat and control parasitic diseases, too. From here it is thought to use this method against toxoplasmosis. Within the scope of the project, it is aimed to silence RON1 gene the target invasion molecules of *T.gondii* with siRNA transfection. In the study, the negative control group constitute HeLa cells, the positive control group constitute HeLa cells infected with *T.gondii* tachyzoites and the experimental group constitute HeLa cells infected with *T.gondii* tachyzoites after siRNA transfection were used. Samples were collected in each study group at 30 seconds, 1 minute, 5 minutes, 15 minutes, 30 minutes, 1 hour, 6 hours, 12 hours, 24 hours, 36 hours and 48 hours. In order to calculate the proportional change of the parasite loads between control groups and experimental groups, RNA and protein isolations were performed from these samples for real time polymerase chain reaction (qRt-PCR) and WB analyzes, respectively. The statistical difference between control groups and experimental groups was calculated. Significant difference in gene expression in experiments with siRNA1 ($p < 0.0055$), siRNA2 ($p < 0.0003$), siRNA3 ($p < 0.0001$), siRNA4 ($p < 0.0001$), siRNA5 ($p < 0.0001$), siRNA6 ($p < 0.0001$), siRNA7 ($p < 0.0182$), siRNA9 ($p < 0.0011$) and siRNA10 ($p < 0.0004$) but there was no significant difference statistically in the experiment with siRNA8 ($p < 0.4049$) was detected. Thus, it has been detected that invasion was inhibited due to the lack of production of parasite antigen in the cell lysate belongs to experimental groups at WB assays with anti-*T.gondii* RON1 and total anti-*T.gondii* antibodies resulting in silencing of the RON1 gene. The suppression of the TgRON1 gene expression by this method is a promising step in the development of anti-toxoplasmosis vaccines and therapeutic agents.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; siRNA; transfection; Rhoptry neck protein.

GİRİŞ

Toksoplazmozis, zorunlu hücre içi protozoon parazit *Toxoplasma gondii*'nin neden olduğu, dünya genelinde yaygın görülen zoonotik karakterli bir hastalıktır. Bu hastalık insan vücudundaki tüm hayati organları tutabilmektedir. Kansere hastalarında, kemik iliği ve soliter organ nakli yapılan ve immün sistemi baskılanmış kimselerde çok ağır seyredebilmekte hatta ölümlü sonuçlanabilmektedir¹. Parazitin invazyon molekülleri bu patolojilere neden olabilmektedir. Konak hücreye invaze olan *T.gondii* takizoitlerinin etrafında halka benzeri yapıda daralmaya neden olan RON proteinleri 2005 yılında tanımlanmıştır. Api-kompleksan şubesinde korunmuş proteinler olan AMA1 ve RON'lar ortak çalışırlar. AMA1 proteinin ektodomaini, konak hücre membranından içeriye girişi sağlayan ve hücrenin kortikal iskeletinde bulunan diğer RON proteinlerine bağlandığı düşünülen RON2'ye bağlanır². Bununla beraber, konak hücreye tutunma ile ilişkili olan mikronem proteinleri, parazitin ön kısmından boşaldıktan sonra RON molekülleri ile konak hücre membranında oluşturdukları "moving junction" [hareketli bağlantı (MJ)] formasyonundan hücre içine doğru itilerek parazitoforik vakuölü oluşturmaktadırlar^{3,4}.

İmmün sistemi sağlam veya baskılanmış kimselerde, gebelerde ve çocuklarda ve oküler toksoplazmoziste uygulanan farklı tedavi yaklaşımları ve bu esnada kullanılan anti-Toxoplasma ilaçlarının olası yan etkileri tedaviyi güçleştirmektedir. Bu nedenle tedavisi kritik olan hasta gruplarına ortak uygulanabilen, yan etkisi daha az veya yan etkisi olmayan alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ihtiyacı ortaya çıkmaktadır^{5,6}. Son yıllarda, kanser gibi farklı hastalıklarda interferens RNA'lar (iRNA) ile tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmalar, small iRNA'lar (siRNA) ile toksoplazmozisin tedavisinde alternatif bir yöntem geliştirilebileceği fikrini doğurmuştur^{7,8}. Çalışmada, rhoptry neck protein (RON) moleküllerinin siRNA transfeksiyonu ile genetik olarak susturulması, dolayısıyla *T.gondii*'nin konak hücreye invazyonunun engellenmesi ve bu teknik ile parazitin ortaya çıkardığı patolojilerin, engellenebileceği hipotezi geliştirilmiştir. Bu çalışmada, HeLa hücre kültüründe in vitro kültivasyonu yapılmış olan *T.gondii*'nin hücrelere invazyonundan sorumlu RON1 genine ait RNA'lar için tasarlanan siRNA'lar ile RON1 geninin susturulması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Toxoplasma gondii Takizoitleri, HeLa Hücresi ve siRNA Dupleksleri

Çalışmada kullanılan Hela hücreleri ATCC'den ve *Toxoplasma gondii* Ankara suşu takizoitleri; 1973 yılında Altıntaş tarafından izole edilen ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji laboratuvarında deney faresine sürekli pasajlarla devam ettirilen kültürden satın alınarak temin edildi. Hücreler ve takizoitler kriyo tüplerde deney süresince kullanılmak üzere -80°C'de saklandı. RON1 genine ait mRNA'ları hedefleyen siRNA ve kontrol dizilerini belirlemek üzere BLOCK-iT RNAi Designer programı (<https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>) kullanıldı. ORF üzerindeki olası bölgelerin başlangıçları ve GC yüzdeleri belirlendi (Tablo I). Bu bölgelere komplementer 10 farklı siRNA dupleksi tasarlandı ve deneyde kullanıldı (Tablo II).

Hücre Kültürü ve Enfeksiyon

Hücre kültürü, %10 deaktive FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamine içeren RPMI-1640 besiyeri ortamında gerçekleştirildi. Hücreler, 4 ml besiyeri bulunan 25 cm² flasklarda 37°C'lik, %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Düzenli olarak hücrelerin flask yüzeyini kapladıkları alan invert mikroskop ile kontrol edildi. Hücreler flask yüzeyinin %80'ini kapladığında tripsin ile muamele edilerek pasajlandı. Daha sonra sayımı yapılan hücreler, içinde 10 ml besiyeri bulunan flasklara ekildi ve enfeksiyon dozajını belirlemek için kullanıldı. Hücre çoğaltımı sağlandıktan sonra pasajlanan hücreler, 24 kuyucuklu mikrolaplara geçirilerek deneye devam edildi. Belirlenen hücre yoğunluklarındaki flasklara sırasıyla 10:1, 5:1, 1:1 hücre/parazit oranlarında takizoit ekimi yapıldı. Flasklardaki besiyerleri üç gün boyunca değiştirilmedi. Her gün parazit yoğunluğu invert mikroskopa gözlemlenerek takizoit sayısı ve canlı hücre sayısı trypan blue ile boyanarak sayıldı. Buna göre; deneyi için optimal koşul olarak belirlenen 1:1 (2 x 10⁵ hücre: 2 x 10⁵ takizoit) oranına göre transfeksiyon sonrasında enfeksiyon deneyi yapıldı. Negatif kontrolü oluşturan

Tablo I. RON1 Geni Üzerindeki Olası siRNA Bölgeleri

Başlangıç	Dizi (siRNA/kontrol)	Bölge	%GC
333	TCCCGACAACAAGAGTACTAGTGAA	ORF	44.0
529	GAGAAACGAATAGGCAAGAAATTCA	ORF	36.0
873	CGGTCACATTGAGCTAATGTGGAA	ORF	48.0
972	CAAGAGGTCTGGATCGGATGTTCTT	ORF	48.0
1439	ACCAGGGATCTTGAAGCATGATTT	ORF	44.0
1605	CATGAACCACGAGGATTCTGCTGTT	ORF	48.0
1694	CACCATACGCCAAGCAGAAATCGTT	ORF	48.0
1887	CGCAGCGAATGGAACAGAAGGTGAA	ORF	52.0
1943	CAGGAGGGTCTGCAGAGAAAGATAA	ORF	48.0
3448	GGAGTTTCAGCAATCGTCAAGACAT	ORF	44.0

Tablo II. RON1 Genini Hedefleyen siRNA Dupleksleri

siRNA no	Sense iplik	Antisense iplik
siRNA1	UCCCGACAACAAGAGUACUAGUGAA	UUCACUAGUACUCUUGUUGUCGGGA
siRNA2	GAGAAACGAUAGGCAAGAAUUA	UGAAUUCUUGCCUUAUUCGUUUCUC
siRNA3	CGGUCACAUUCAGGCUAAUGUGGAA	UUCCACAUUAGCCUGAAUGUGACCG
siRNA4	CAAGAGGUCUGGAUCGGAUGUUCU	AAGAACAUCCGAUCCAGACCUCUUG
siRNA5	ACCAGGGAUCUUGGAAGCAUGAUUU	AAAUCAUGCUUCCAAGAUCCUGGU
siRNA6	CAUGAACACGAGGAUUCUGCUGUU	AACAGCAGAAUCCUCGUGGUUCAUG
siRNA7	CACCAUACGCCAAGCAGAAUUCGUU	AACGAUUUCUGCUUGGCGUAUGGUG
siRNA8	CGCAGCGAUGGAACAGAAGGUGAA	UUCACCUUCUGUCCAUCUGCUGCG
siRNA9	CAGGAGGGUCUGCAGAGAAAGAUAA	UUAUCUUUCUGCAGACCCUCCUG
siRNA10	GGAGUUUCAGCAAUCGUCAAGACAU	AUGUCUUGACGAUUGCUGAAACUCC

HeLa hücreleri deney başlayana kadar devam ettirildi. Pozitif kontrolü oluşturan HeLa hücreleri ise deney grubu ile aynı anda, belirtilen oranda takizoitler ile enfekte edildi.

siRNA Duplekslerinin Hazırlanması ve Transfeksiyonu

Liyofilize edilmiş siRNA dupleksleri (METABION, Steinkirchen, Almanya) üretici firma önerisine göre hazırlanan 1X annealing buffer (1X: 60 mM KCl, 6 mM HEPES-pH 7.5, 0.2 mM MgCl₂) eklenerek çözündürüldü. 100 µM konsantrasyonunda hazırlanan stok çözeltisinden 10 pmol konsantrasyonda çözelti hazırlandı. Deney, her kuyuda 2 x 10⁵ (%100) hücre konsantrasyonu olacak şekilde Opti-MEM besiyeri içeren 24 kuyucuklu mikrolaplarda gerçekleştirildi. Seyreltilen siRNA ve lipofektamin RNAiMAX ayracı (Invitrogen, Callifornia, ABD) ile firma önerisine göre hazırlanan karışım 5 dakika boyunca oda

sıcaklığında inkübe edildi ve siRNA-lipid (50 pmol) kompleksi HeLa hücrelerine eklendi. Hücreler üç gün boyunca 37°C'de %5'lik CO₂'li etüvde inkübe edildi. Deney, her siRNA dubleks için dublike edilerek gerçekleştirildi. siRNA transfeksiyonu yapılan HeLa hücreleri üçüncü günün sonunda 200 µl PBS ile yıkandı ve hücreler enfekte edildi.

Hücre Kültürlerinden RNA Kantifikasyonu

Pozitif kontrol, negatif kontrol ve deney grubunu oluşturan hücre kültürlerinden farklı zaman aralıklarında toplanan örnekler, RNA ve protein izolasyonu yapılabildiye kadar 4°C'de TRIzol (Sigma Aldrich, ABD) içinde bekletildi.

Hücre kültüründen RNA izolasyonu, TRIzol ile kit protokolüne göre gerçekleştirildi. İzole edilen RNA kalite ve miktarları ölçülerek intakt ve yeterli miktarda olduğu görülen örnekler, cDNA sentezi yapılabildiye kadar -80°C'de saklandı. cDNA sentezi kit (Transcriptor High Fidelity cDNA Syntesis Kit-Roche, Indianapolis, ABD) kullanılarak önerilen işleme göre uygulandı. Elde edilen cDNA'lar ile qRt-PCR yapıldı. qRt-PCR'de kullanılan primer ve UPL prob dizileri ProbFinder Software üzerinden (<https://lifescience.roche.com>), DQ096562 GenBank numaralı *T.gondii* RON1 dizisine göre tasarlandı (Tablo III). Deneyde kullanılan RON1 özgün primerlerin hassasiyeti, B1 geni primerleri ile qRt-PCR yapılabildiye karşılaştırmalı test edildi⁹.

10 µl prob reaksiyon karışımı (2x) (Roche, Mannheim, Almanya), 0.4 µl primer F ve R (20 µM) (Roche, Mannheim, Almanya), 0.4 µl prob (10 µM) (Roche, Mannheim, Almanya), 5 µl cDNA (60 ng), 3.8 µl dH₂O kullanılarak toplam reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde karışım hazırlandı. qRt-PCR (Roche Light Cyclers 480II, Mannheim, Almanya) cihazında bir döngü; 95°C'de 10 dakika ilk denatürasyonun ardından 45 döngü 95°C'de 10 saniye denatürasyon, 59°C'de 30 saniye primer bağlanması, 72°C'de 1 saniye uzama sonrası 40°C'de 30 sn son uzamadan oluşan qRt-PCR programı optimize edilerek gerçekleştirildi. Daha sonra örneklerin "quantification cycle (Cq)" değerleri hesaplandı ve rölative kantifikasyon yapıldı.

Hücre Kültürlerinin Western Blot Analizleri

TRIzol protokolü uygulanan örneklerden, RNA izolasyonun ardından protokole devam edilerek protein izolasyonu yapıldı. Örnekler için proteinler, hazırlanan %8'lik jelle (TGX Stain Free Fastcast Acrylamid kit, BioRad, ABD) yüklenerek 180 V'ta 1 saat SDS-PAGE

Tablo III. *Rhoptry Neck Protein Genini Hedefleyen qRt-PCR Prob ve Primerleri*

Primer	Uzunluğu	Pozisyonu	Tm	%GC	Dizi
F Primeri	22	1956-1977	59	45	AGA GAA AGA TAA GGA CGC TTC G
R Primeri	20	2003-2022	60	55	CCC ATC CGT CTT CTC ACT TG
Prob	8	1990-1998	-	-	CAG AGG AA
Amplikon (67 nt)					
agagaaagataaggacgcttcggaagcagagggtgcagaggaagcctcaagtgaagacggatggg					

yapıldı. Proteinler jelden 0.2 µm nitroselüloz membrana (TransBlot Turbo Transfer Pack mini format, BioRad, ABD) transfer edildi. Membran %5 yağsız süt tozu (500 ml PBS, 250 µl Tween 20, 25 g yağsız süt tozu) ile bir gece oda sıcaklığında bloklandı. Bloklama sonrasında membran %0.02 Tween 20 içeren PBS'de beş kez 5 dakika yıkandı. Yıkama sonrası membran 1/80.000 oranında peroksidaz işaretli spesifik anti-*T.gondii* RON1 ve anti-*T.gondii* antikoru ile 1 saat oda sıcaklığında 37°C'de inkübe edildi. Yıkama basamağı tekrar edilerek yıkanan membran ECL ile muamele edildi ve reaksiyon görüntülendi (ChemiDoc MP, BioRad, ABD).

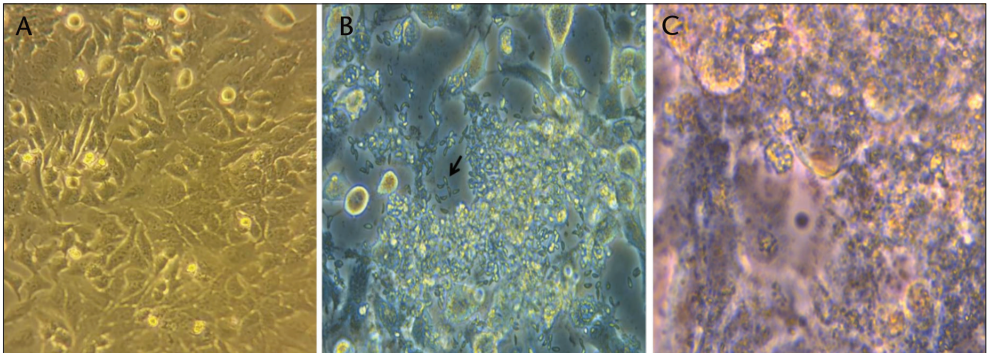
İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada deney iki kere tekrarlandı ve her deneyde örnekler dublike edilerek çalışıldı. Verilerin ortalaması alınarak One Sample T Test analizi ile p değerleri tespit edildi ve istatistiksel olarak $p < 0.05$ değerinde anlamlılıkları değerlendirildi. İstatistiksel analizler Minitab version 17.1.0 (Minitab, Kanada) istatistik programları kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

Çalışmada negatif kontrol grubunu oluşturan HeLa hücreleri (Şekil 1A), pozitif kontrol grubunu oluşturan *T.gondii* takizoitleri ile enfekte HeLa hücreleri (Şekil 1B) ve deney grubunu oluşturan siRNA transfeksiyonu yapıldıktan sonra *T.gondii* takizoitleri ile enfekte edilen HeLa hücreleri kullanılmıştır (Şekil 1C). Negatif kontrol grubu, pozitif kontrol grubu ve deney grupları arasında morfolojik farklılıkların olup olmadığı invert mikroskop yardımıyla gözlemlenmiştir. Buna göre, deney grubundaki hücrelerin morfolojik olarak sağlam HeLa hücrelerinden oluşan negatif kontrolle benzer olduğu görülmüştür. Pozitif kontrole ait hücrelerde ise deney süresince hasar olduğu gözlemlenmiştir.

HeLa hücreleri, 24 kuyucuklu hücre kültür plağında 2×10^5 hücre sayısı elde edildikten sonra RON1 genine göre tasarlanan siRNA'lar ile transfeke edilmiştir. Transfeksiyondan sonraki 3. günde 1:1 oranında *T.gondii* takizoitleriyle enfekte edilmiştir. Her çalışma



Şekil 1. Hücre kültür görüntüleri (invert mikroskop 40X); A. Negatif kontrol grubunu oluşturan HeLa hücre Kültürü (pasajdan 5 gün sonra), B. Pozitif kontrol grubunu oluşturan *T.gondii* takizoitleri ile enfekte HeLa hücreleri, C. Deney grubunu oluşturan siRNA transfeksiyonu yapıldıktan sonra *T.gondii* takizoitleri ile enfekte edilen HeLa hücreleri.

grubundan 30. saniye, 1. dakika, 5. dakika, 15. dakika, 30. dakika, 1. saat, 6. saat, 12. saat, 24. saat, 36. saat ve 48. saat sürelerinde örnekler toplanmıştır. RNA kantifikasyonu yapmak için 1.5 µg/µl olarak ölçülmüş sulandırılmamış DNA ile 10'ar kat sulandırma yapılarak beş seri dilüsyon hazırlanmış ve kopya/ml oranları belirlenmiştir. Seri dilüsyonlardan elde edilen kopya sayılarına göre her deney için standart eğriler oluşturulmuş ve deney gruplarının pozitiflik oranları belirlenmiştir. Belirlenen saatlerde alınan lizatlardan RNA ve protein izolasyonu yapılarak reverse transkripsiyon gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRt-PCR) ve WB analizleri yapılmıştır.

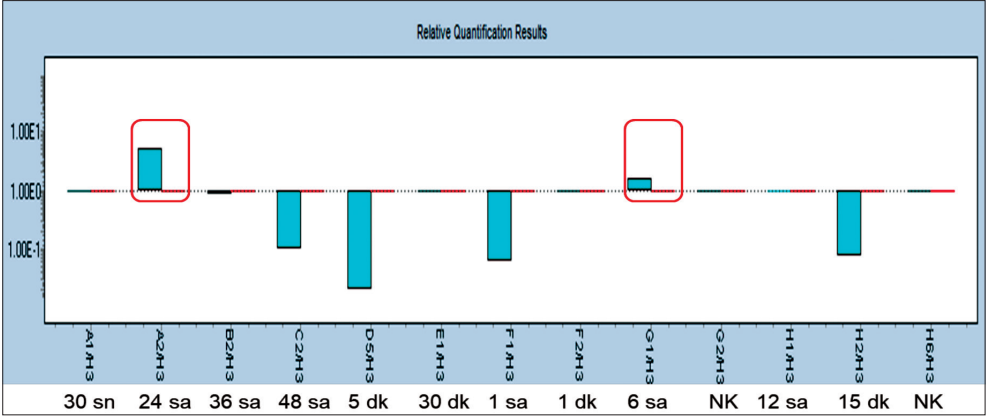
qRt-PCR analizlerinde, konsantrasyonu bilinen standartlarla oluşturulan standart eğri üzerindeki Cq değerleri, konsantrasyonu bilinmeyen örnek ile karşılaştırılarak örneğe ait parazit yükü hesaplanmaktadır. Böylece, pozitif ve negatif kontrol arasındaki farka dayalı sayısal hesaplamalar ile örneklerin rölatif kantifikasyonu yapılmaktadır. Dolayısıyla, parazit yükü bulunmayan negatif kontroller ile aynı olan 45 Cq ve üzerinde değer gösteren örnekler negatif olarak tespit edilmiştir.

Deney içi negatif ve pozitif kontrol grupları ile deney gruplarındaki parazit yüklerinin orantısal değişimi hesaplanmıştır (Tablo IV).

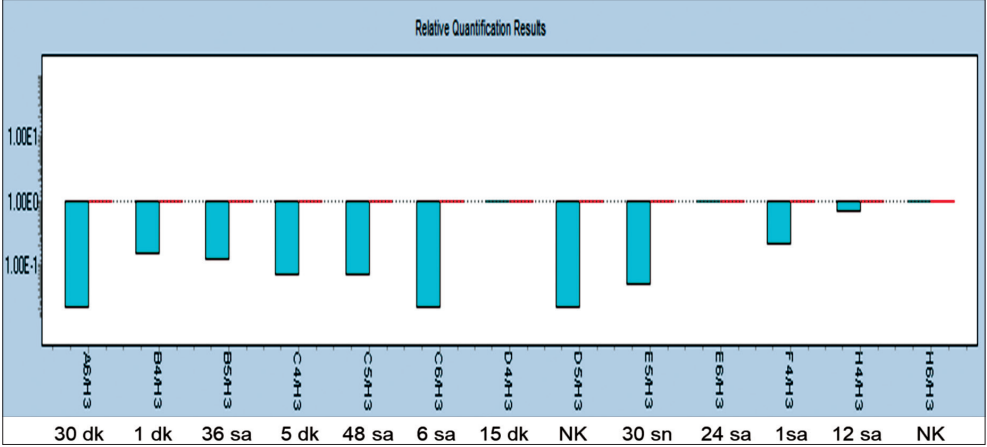
Pozitif kontroldeki *T.gondii* (0.015 µg) yüküne göre deney grupları ve negatif kontrol gruplarının belirtilen saatlerde toplanan örneklerindeki parazit yükleri grafiksel olarak qRt-PCR ile hesaplanmış ve barlarla gösterilmiştir (Şekil 2-11). 45 Cq ve üzeri değerlerde parazite ait DNA yükü negatif olup "0" olarak kantifikasyon yapılmıştır. Bu nedenle grafiklerde negatif örnekler barlarla gösterilmemiştir.

Tablo IV. Deney Grubu ile Kontrol Gruplarının Karşılaştırmalı Cq Değerleri

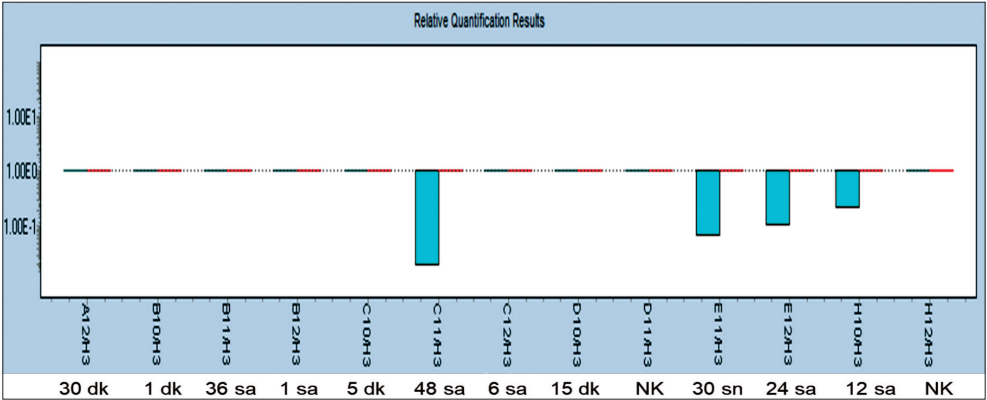
Süreler	siRNA1	siRNA2	siRNA3	siRNA5	siRNA4	siRNA6	siRNA7	siRNA8	siRNA9	siRNA10
0. saniye	45.00	38.77	45.00	45.00	45.00	40.00	45.00	37.79	37.12	37.26
1. dakika	45.00	37.21	45.00	45.00	36.61	45.00	36.99	36.03	40.03	37.83
5. dakika	45.00	38.27	45.00	45.00	45.00	45.00	36.63	35.74	36.16	37.65
15. dakika	38.12	45.00	45.00	45.00	45.00	37.99	45.00	36.24	37.86	35.86
30. dakika	45.00	40.00	45.00	45.00	40.00	38.17	38.12	34.70	35.69	45.00
1. saat	38.37	36.68	45.00	45.00	45.00	45.00	36.67	34.92	45.00	36.23
6. saat	33.67	40.00	45.00	45.00	45.00	45.00	33.79	35.90	34.12	34.15
12. saat	34.42	34.95	45.00	45.00	40.00	34.15	34.72	34.33	37.54	45.00
24. saat	31.97	45.00	45.00	38.25	40.00	45.00	45.00	38.22	37.85	45.00
36. saat	34.54	37.52	45.00	45.00	45.00	45.00	36.50	35.98	33.08	38.22
48. saat	37.69	38.25	45.00	45.00	45.00	45.00	36.49	31.82	45.00	36.14
Negatif kontrol	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00
Pozitif kontrol	33.75	34.65	34.95	34.95	32.11	34.42	33.95	36.13	33.44	32.80



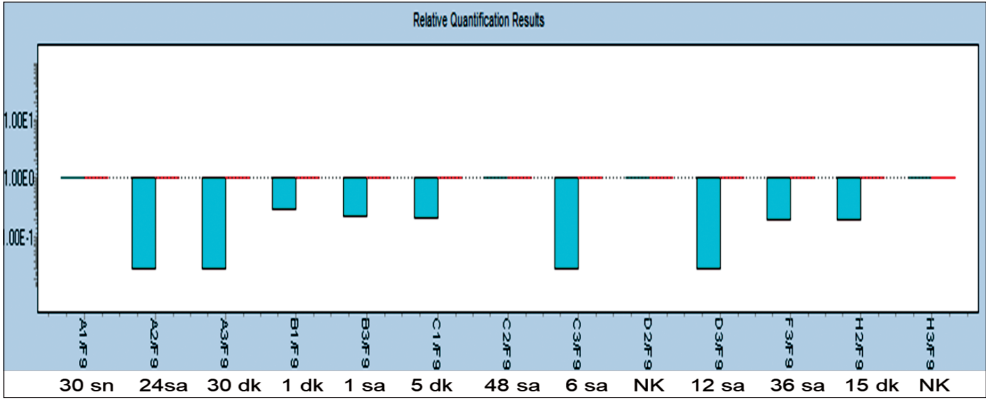
Şekil 2. siRNA1 transfekte edilen enfekte hücrelerde *T.gondii* RON1 geninin rölatif kantifikasyon analizi; hücre parazit yükünün en yoğun olduğu enfeksiyondan sonraki 6. ve 24. saatlerdeki sapmalar.



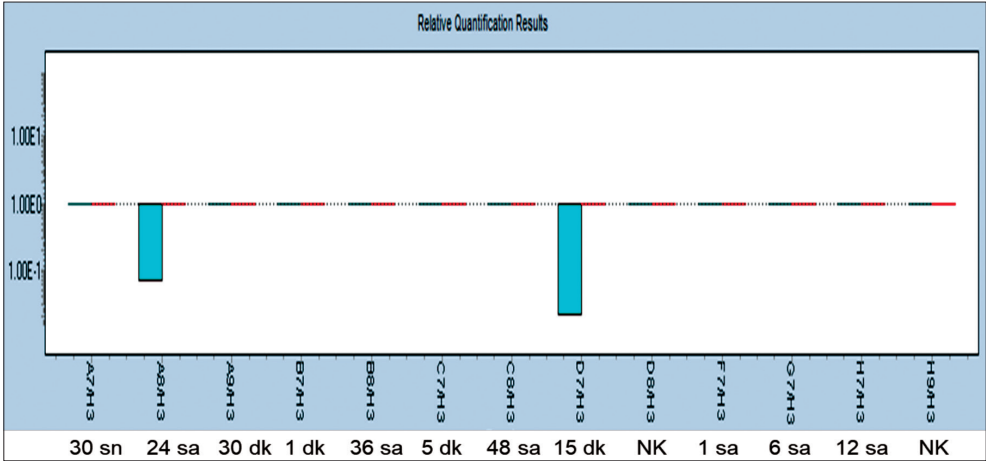
Şekil 3. siRNA2 transfekte edilen enfekte hücrelerde *T.gondii* RON1 geninin rölatif kantifikasyon analizi.



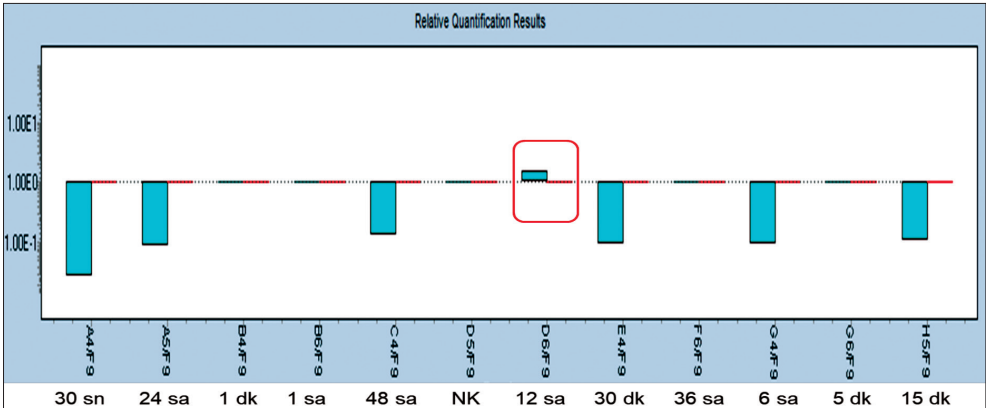
Şekil 4. siRNA3 transfekte edilen enfekte hücrelerde *T.gondii* RON1 geninin rölatif kantifikasyon analizi.



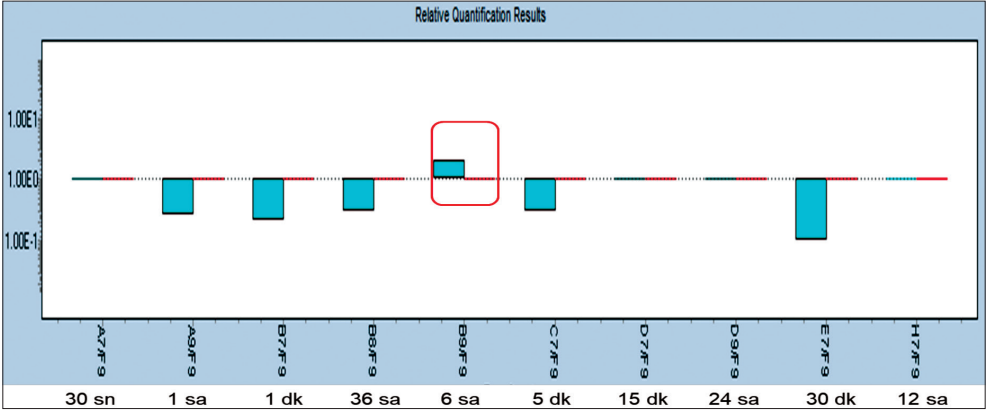
Şekil 5. siRNA4 transfeke edilen enfekte hücrelerde *T.gondii* RON1 geninin rölatif kantifikasyon analizi.



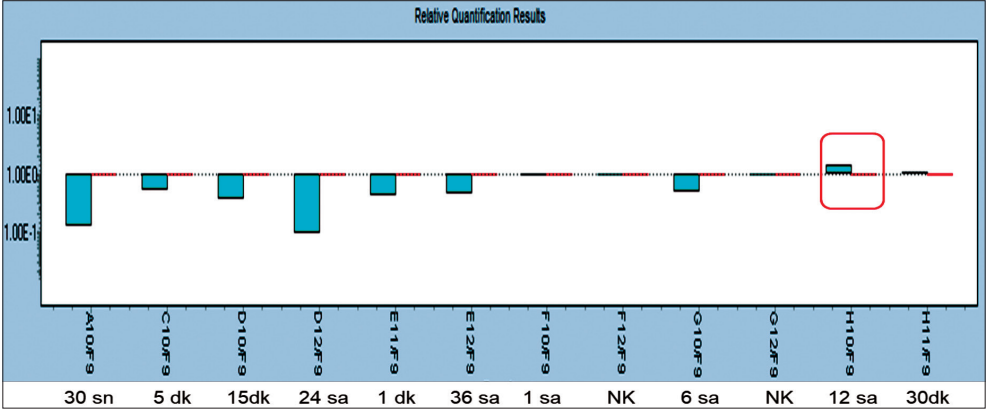
Şekil 6. siRNA5 transfeke edilen enfekte hücrelerde *T.gondii* RON1 geninin rölatif kantifikasyon analizi.



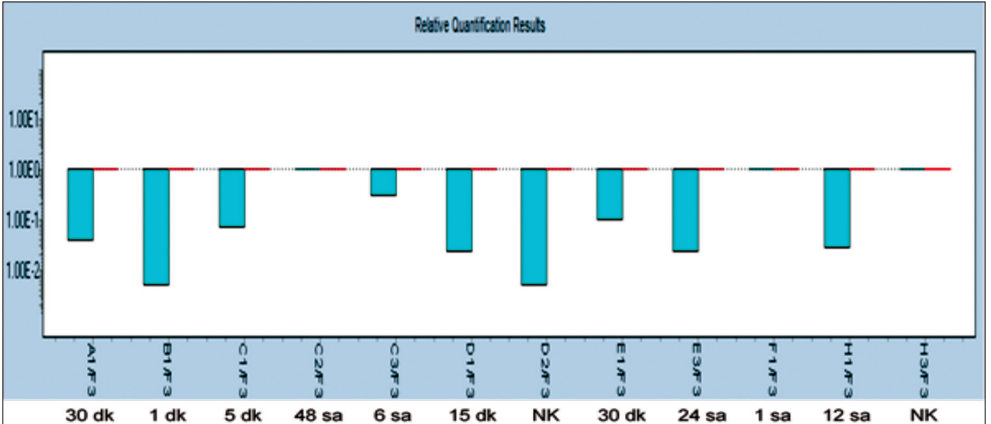
Şekil 7. siRNA6 transfeke edilen enfekte hücrelerde *T.gondii* RON1 geninin rölatif kantifikasyon analizi; hücre parazit yükünün en yoğun olduğu enfeksiyondan sonraki 12. saatte sapma.



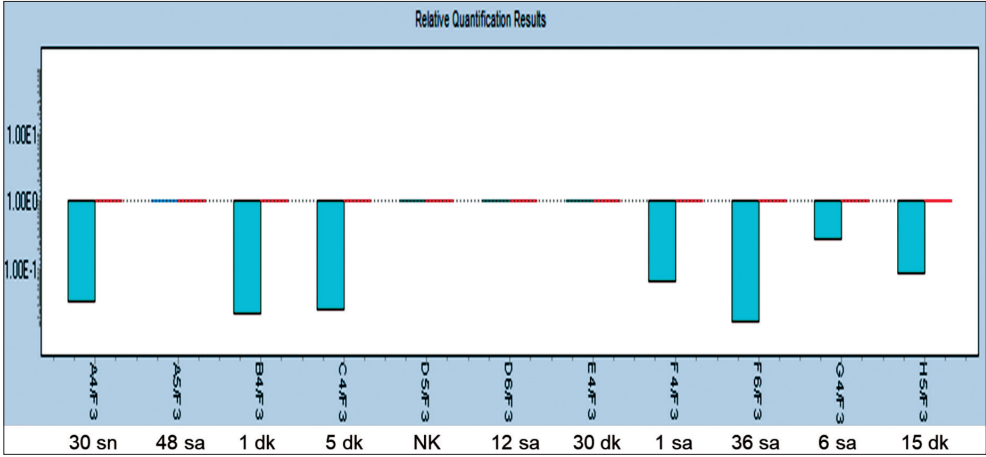
Şekil 8. siRNA7 transfekte edilen enfekte hücrelerde *T.gondii* RON1 geninin rölatif kantifikasyon analizi; hücre parazit yükünün en yoğun olduğu enfeksiyondan sonraki 6. saatte sapma.



Şekil 9. siRNA8 transfekte edilen enfekte hücrelerde *T.gondii* RON1 geninin rölatif kantifikasyon analizi; hücre parazit yükünün en yoğun olduğu enfeksiyondan sonraki 12. saatte sapma.



Şekil 10. siRNA9 transfekte edilen enfekte hücrelerde *T.gondii* RON1 geninin rölatif kantifikasyon analizi.



Şekil 11. siRNA10 transfekte edilen enfekte hücrelerde *T.gondii* RON1 geninin rölatif kantifikasyon analizi.

qRt-PCR verilerine göre; kontrol grupları ile deney grupları arasındaki ekspresyon düzeylerinin farkı istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. RON1 proteinini hedef alan deneyde kullanılan farklı siRNA'lardan siRNA1, siRNA6 ve siRNA7 ile yapılan gen susturma çalışmalarında toplanan veriler istatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen, deneyde hücre parazit yükünün en yoğun olduğu enfeksiyondan sonraki 6. ve 12. saatlerde sapmalar olmuştur. Ancak deneyin ilerleyen saatlerinde gen ifadesinde düşüş olduğu ve deneyin sonlandırıldığı 48. saate kadar gen ifadesinin susturulduğu tespit edilmiştir. siRNA8 ile yapılan deneyde ise gen ifadesindeki azalma anlamlı bulunmamıştır ($p < 0.4049$). siRNA2, siRNA3, siRNA4, siRNA5, siRNA9, siRNA10 ile yapılan deneylerde belirlenmiş saatlerde alınan örneklerde gen ifadesinin anlamlı oranda azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$) (Tablo V).

Tablo V. siRNA Transfekte Edilen Enfekte Hücrelerin One Sample T Test Analizi

siRNA	N*	Mean	StDev**	SE Mean***	95% CI for μ ****	T-Value	P-Value
siRNA1	14	39.552	5.187	1.386	(36.55-42.54)	3.32	0.0055
siRNA2	14	39.757	3.749	1.002	(37.59-41.92)	4.80	0.0003
siRNA3	14	43.925	2.906	0.776	(42.24-45.60)	11.55	< 0.0001
siRNA4	14	42.695	3.393	0.907	(40.73-44.65)	7.24	< 0.0001
siRNA5	14	43.800	3.118	0.833	(41.99-45.60)	10.62	< 0.0001
siRNA6	14	42.246	4.029	1.077	(39.92-44.57)	5.68	< 0.0001
siRNA7	14	39.360	4.475	1.196	(36.77-41.94)	2.70	0.0182
siRNA8	14	36.985	3.719	0.993	(34.83-39.13)	0.86	0.4049
siRNA9	14	38.806	4.449	1.189	(36.23-41.37)	4.18	0.0011
siRNA10	14	39.441	4.472	1.195	(36.85-42.02)	4.69	0.0004

*N: Ortalama, ** StDev: Standart sapma, ***SE-Mean: (Aritmetik ortalamanın standart hatası), **** μ : Mean of.



Şekil 12. siRNA 1, siRNA 6, siRNA 7, siRNA 8 transfeke edilen enfekte hücrelerin anti-*T.gondii* RON1 antikor ile WB analizi.

Pozitif ve negatif kontrol gruplarında ve deney gruplarında total *T.gondii* antijenlerinin ve *T.gondii* RON1 antijenlerinin hedeflendiği WB analizleri yapılmıştır. Deney gruplarında ve negatif kontrollerde total *T.gondii* antijenlerine ait bantlar görülememiştir. Bu durum enfeksiyonu gerçekleştiremeyen takizoitlerin hücre kültürü ortamından elimine olduğunu göstermektedir. Anti-*T.gondii* RON1 antikoruna ile yapılan WB analizlerinde ise qRt-PCR sonuçlarını destekleyen veriler tespit edilmiştir. Parazit yükünün artış gösterdiği saatlerde RON1 proteininin kültür ortamında üretildiği ve negatif kontrole bakılarak yalancı bir pozitifliğin veya kontaminasyonun olmadığını görülmüştür (Şekil 12).

TARTIŞMA

Dünyada yaygın görülen toksoplazmozisin etkeni olan *T.gondii*, sıcakkanlı omurgalıları enfekte edebilen zorunlu hücre içi protozoon olarak, optimal büyüme ve devamlılığı için kendi ihtiyaçlarını sağlayacak şekilde konak hücreyi yeniden düzenleyecek gelişmiş mekanizmalar kullanmaktadır¹⁰. *T.gondii* membran proteomunun ileri sistematik analizlerinin, enfeksiyonunun fizyopatolojisinin altında yatan moleküler ve biyolojik mekanizmayı aydınlatacağı ve yeni ilaç hedeflerine imkan sunacağı ileri sürülmüştür¹¹. *T.gondii*'nin, apikompleksan protozoonlar hariç diğer protozoonlarda bulunmayan hücre membranı ile ilişkili tek veya çoklu transmembran segmentler içeren RON1, RON2, RON3 gibi integral plazma membran proteinlerine sahip olduğu gösterilmiştir¹¹. RON moleküllerinin, parazitin hücreye invazyonu sırasında oluşan MJ formasyonunda kritik bir rolü olduğu bildirilmiştir¹⁰ ve konak hücre membranında oluşturdukları MJ formasyonundan hücre içine doğru itilerek parazitoforik vakuolün oluşmasında görevlidirler^{3,4}. Henüz literatürde RON1 ve MJ potansiyeli hakkındaki bilgi bulunmaması çalışmanın özgün kısmını oluştur-

maktadır. Dolayısıyla bu çalışmanın sonuçları, *T.gondii*'nin konak hücreye invazyonunda önemi artan moleküller arasında RON1 proteininin de gösterilmesi gerektiğine işaret etmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada RON1 geni hedef alınarak siRNA transfeksiyonu ile genetik olarak susturulduğu ve bunun sonucu olarak anti-*T.gondii* antikolları ile yapılan WB analizlerinde deney grubuna ait hücre lizatlarında parazit antijeninin üretilemediği görülmektedir. Dolayısıyla, HeLa hücre kültüründe in vitro kültürasyonu yapılmış olan *T.gondii*'nin konak hücreye invazyonunun engellendiği tespit edilmiştir. siRNA8 ile yapılan deneyde ise gen ifadesindeki azalma anlamlı bulunmamıştır ($p < 0.4049$). Bu durum siRNA8 molekülünün, genin non-fonksiyonel bir bölgesine komplementasyon sağlaması ile ilgili olabilir. *T.gondii* suş tiplerinin arasında büyüme oranı ve enfeksiyon kabiliyeti gibi önemli farklar olduğu bilinmektedir. Konakta gelişen kronik veya akut enfeksiyon, suş tipleri ile ilişkili olup Tip 1 suşu, Tip 2 ve Tip 3 suşlarına göre daha virulenttir^{12,13}. Bu sebeple, çalışmamızda *T.gondii* T1 suşu arasında yer alan RH Ankara suşu takozitler enfeksiyon deneylerinde kullanılmıştır. Deney sonuçlarında yaşanan sapmaların bir sebebinin de parazitin virülans kabiliyeti yüksek suşunun kullanımına bağlı olabileceği düşünülmüştür. siRNA dubleksleri ile lipofektamin paketi bir lipozomdur; memeli hücreleri için toksik olmayan¹⁴, etkin internalizasyon sağlanabilen ve kolay uygulanabilen¹⁵ bir yöntem olan lipofektamin ile transfeksiyon uygulaması ile gen susturma çalışmasında karşılaşılabilecek zorluklar minimize edilmiştir. Ancak, mikroarray analizleri siRNA tedavisinin hedef dışı gen susturma ile sonuçlanabildiğini göstermiştir¹⁶. Hedef dışı susturma, istenmeyen hücre transformasyonuna ve gen ifadesinde tehlikeli mutasyonlara neden olması nedeniyle istenilmez. Kullanılan siRNA'ların hedef dışı gen susturma yapıp yapmadığının mikroarray analizi ile değerlendirilmesi önerilmektedir.

Parazit miRNA'ları ilk olarak parasitik nematodlarda tanımlanmış daha sonra birçok miRNA dizisi protozoonlarda, diğer helmintlerde ve arthropod parazitlerde karakterize edilmiştir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda *Trypanosoma brucei*, *Leishmania braziliensis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* ve *T.gondii* gibi bazı protozoon parazitlerde endojen siRNA'ların eksojen kaynaklılarda olduğu gibi gen ekspresyonlarının down regülasyondan sorumlu olduğu belirtilmiştir¹⁷. Literatürde az sayıda yayımlanmış bazı protozoonlarla yapılan RNA interferans deneyleri bulunmaktadır. Parazitoforik vakuolün non-füzojenik doğasını sürdürebilmesi için gerekli olan EGFR sinyalizasyonunun bloklanmasının strateji olarak kullanıldığı bir çalışmada, siRNA'lar ile *T.gondii* MIC1-3 genleri susturulmuş ve parazitlerin CD154 aracılığıyla öldürüldüğü gözlemlenmiştir. Böylece EGF-MIC1-3-6'nın parazit yaşamını düzenlemek için konak hücrelerde sinyalizasyonda görev aldığı gösterilmiştir¹⁸. Spesifik parazit fenotipleri ile konak gen ekspresyonunu ilişkilendirmek ve tanımlamak için çok değişkenli mikroarray analizleri yapılarak insan hücre bölünme otoantijen-1'in (CDA-1) tanımlandığı bir diğer çalışmada, bu genin siRNA ile susturulmasının parazit replikasyonunun inhibisyonuna sebep olduğu ve ardışık olarak bradizoit farklılaşmasının indüklenmesine öncülük ettiği gösterilmiştir¹⁹. Hücre içi zorunlu bir parazit olan *T.gondii*'nin gelişmesi için gerekli olan O₂ metabolizmasını nasıl sağladığını anlamaya yönelik yapılan çalışmada, *T.gondii* ile enfekte HeLa hücrelerinde hipoksi ile indüklenen transkripsiyon faktör 1 (HIF-1) geni tarafından regüle edilen Hexokinase2

(HK2) geni siRNA transfeksiyonu ile susturulmuştur. HK2'nin fonksiyonun anlaşılması ve HK2'nin HIF-1 bağımlı ekspresyonu, fizyolojik O₂ seviyesinin sağlanmadığı hücre içi parazitlikte yeni bir mekanizma ile açıklanmıştır²⁰. Bir çalışmada, *T.gondii* pürin salvaj yolunun en önemli enzimlerden biri olan Adenozin kinaza (AK) spesifik 3 farklı siRNA dizayn edilmiştir. Elektroporasyonu takip eden 24 saatte siRNA'lardan iki tanesi anlamlı oranda ($p < 0.05$) hedef mRNA seviyesini azaltmıştır. Kırk sekiz saat sonra dahi enzim seviyesi anlamlı oranda düşük kalmaya devam etmiştir. Veriler göstermiştir ki siRNA transfeke edilen hücreler, *T.gondii*'de gen ekspresyonunu regüle etmek için etkin bir şekilde çalışmışlardır. *T.gondii*'de gen ekspresyonunu baskılamak için siRNA uygulaması anti-toksoplazmozis aşarlarının ve terapötik ajanların gelişimine doğru atılan ümit verici bir adım olarak değerlendirilmiştir²¹.

Sonuç olarak, bu çalışma ile in vitro kültürasyonu yapılmış olan *T.gondii*'nin RON1 spesifik siRNA transfeksiyonu ile genetik olarak susturulmasıyla konak hücreye invazyonunun engellendiği, RON1 geninin gen susturmada iyi bir hedef olduğu belirlenmiştir. *T.gondii* için RON1 genine spesifik tasarlanan 10 adet farklı siRNA dubleks, siRNA8 hariç hedef mRNA ile komplementasyon yaparak mRNA'nın degrade olmasını sağladığı, her çalışma grubunda, enfeksiyondan sonraki 30. saniye, 1. dakika, 5. dakika, 15. dakika, 30. dakika, 1. saat, 6. saat, 12. saat, 24. saat, 36. saat ve 48. saat sürelerinde gen susturmanın stabil kaldığı gösterilmiştir. Bu durum, transmembran proteinini olan RON1 molekülünün tamamının veya ekstraselüler bir domaininin hücre invazyonu aşamasında parazit için önemli fizyopatolojik mekanizmalarda görevli olabileceğini ve önemli bir terapötik hedef olduğunu göstermektedir. Ayrıca, siRNA stratejisinin toksoplazmozis in tedavisinde alternatif bir yöntem olarak geliştirilebileceği fikrini doğurmuştur. Elde edilen sonuçlar kapsamında, ileri çalışmalarda ayrı ayrı deneyi yapılan bu siRNA'ların bir kokteyli ile gen susturma deneyinin tekrar yapılarak sinerjik etkisi bakımından incelenebilir. siRNA partiküllerinin preparat haline getirilmesi, farklı suşların ve yabancı tiplerin bu deneyin enfeksiyon aşamasında kullanılması, *T.gondii*'nin konak hücreye invazyonunun engellemesi için in vivo deneyler ve saha çalışması yapılması bu çalışmanın ileri basamakları olarak tasarlanabilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmaya yaptığı katkılardan dolayı Prof. Dr. İzzet Şahin'e teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Kaye A. Toksoplazmozis: diagnosis, treatment, and prevention in congenitally exposed infants. J Ped Health Care 2011;25:355-64.
2. Bargieri D, Lagal V, Andenmatten N, Tardieux I, Meissner M, Menard R, et al. Host cell invasion by apicomplexan parasites: the junction conundrum. PLoS Pathog 2014;10:1004273.
3. Beck JR, Chen AL, Kim EW, Bradley PJ. RON5 is critical for organization and function of the Toxoplasma moving junction complex. PLoS Pathog 2014;10:1004025.

4. Poukchanski A, Fritz HM, Tonkin ML, Treeck M, Boulanger MJ, Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii* sporozoites invade host cells using two novel paralogues of RON2 and AMA1. *PLoS One* 2013;8:70637.
5. Zamboni DS, Lima-Junior DS. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. *Immunol Rev* 2015;265:156-71.
6. Rivera Fernandez N, Mondragon Castelan M, Gonzalez Pozos S, Ramirez Flores CJ, Mondragon Gonzalez R, Gómez de Leon CT, et al. A new type of quinoxalinone derivatives affects viability, invasion, and intracellular growth of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro. *Parasitol Res* 2016;115:2081-96.
7. Zheng Y. Phylogenetic analysis of the Argonaute protein family in platyhelminths. *Mol Phylogenet Evol* 2013;66:1050-4.
8. Manzano-Roman R, Siles-Lucas M. MicroRNAs in parasitic diseases: potential for diagnosis and targeting. *Mol Biochem Parasitol* 2012;186:81-6.
9. Costa JM, Cabaret O, Moukoury S, Bretagne S. Genotyping of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* using high-resolution melting analysis of the repeated B1 gene. *J Microbiol Methods* 2011;86:357-63.
10. Hakimi MA, Cannella D. Apicomplexan parasites and subversion of the host cell microRNA pathway. *Trends Parasitol* 2011;27:481-6.
11. Che FY, Madrid-Aliste C, Burd B, Zhang H, Nieves E, Kim K, et al. Comprehensive proteomic analysis of membrane proteins in *Toxoplasma gondii*. *Mol Cell Proteomics* 2011;10:M110.000745.
12. Moser LA, Pollard AM, Knoll LJ. A genome-wide siRNA screen to identify host factors necessary for growth of the parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS One* 2013;8:68129.
13. Saeij JP, Boyle JP, Boothroyd JC. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol* 2005;21:476-81.
14. Gavrillov K, Saltzman WM. Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. *Yale J Biol Med* 2012;85:187-200.
15. Gao Y, Liu XL, Li XR. Research progress on siRNA delivery with nonviral carriers. *Int J Nanomedicine* 2011;6:1017-25.
16. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 2003;21:635-7.
17. Kolev NG, Tschudi C, Ullu E. RNA interference in protozoan parasites: achievements and challenges. *Eukaryot Cell* 2011;10:1156-63.
18. Muniz-Feliciano L, Van Grol J, Portillo JA, Liew L, Liu B, Carlin CR, et al. *Toxoplasma gondii*-induced activation of EGFR prevents autophagy protein-mediated killing of the parasite. *PLoS Pathog* 2013;9:1003809.
19. Radke JR, Donald RG, Eibs A, Jerome ME, Behnke MS, Liberator P, et al. Changes in the expression of human cell division autoantigen-1 influence *Toxoplasma gondii* growth and development. *PLoS Pathog* 2006;2:105.
20. Menendez MT, Teygong C, Wade K, Florimond C, Blader IJ. siRNA screening identifies the host hexokinase 2 (hk2) gene as an important hypoxia-inducible transcription factor 1 (hif-1) target gene in *Toxoplasma gondii*-infected cells. *MBio* 2015;6:00462.
21. Yu L, Gao YF, Qiao ZP, Li CL, Li X, Shen JL. *Toxoplasma gondii*: siRNA can mediate the suppression of adenosine kinase expression. *Exp Parasitol* 2008;118:96-102.