

# DNA aşıları

Dr. Mayda GÜRSEL

Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyolojik Bilimler Bölümü, Biyoteknik Araştırma Ünitesi, Ankara

**B**ağışıklık sistemi, hücre içi ve hücre dışı büyüyen patojenlere karşı farklı mekanizmalar kullanacak şekilde evrimleşmiştir. Hücre dışı patojenler, bakteriyel toksin ve virusleri nötralize eden, bakterileri opsonize ederek fagositik hücrelerce yutulmalarını sağlayan anti-korlarca (sivisal bağışıklık) kontrol edilir (Şekil 1). Hücre içi büyüyen kimi patojenler de özel antikor izotipleri (örneğin farede IgG<sub>2a</sub>) tarafından antikor-bağımlı hücresel sitotoksitte reaksiyonuyla yok edilebilmektedir. Bunun yanı sıra hücresel bağışıklık hücre içi patojenlere karşı korunmayı sağlayan ana mekanizmayı oluşturur. Burada, yüzeylerinde CD4 reseptörü taşıyan T-hücreleri, salgıladıkları bazı sitokinler aracılığıyla (Interferon-γ gibi) makrofajları uyararak bu hücrelerde konaklayan patojenlerin (mycobacteria veya leishmania gibi) öldürülmesine yol açarlar. Yine hücresel bağışıklığın ana elemanları olarak yüzeylerinde CD8 reseptörü taşıyan sitotoksik T hücreleri de enfekte olan hücreyi direkt olarak yok ederler (Şekil 2).

Günümüzde kullanılmakta olan pek çok aşının koruyucu etkisini büyük oranda spesifik antikor oluşturarak göstermektedir. Oysa viral ve parazitik hastalıklardan korunmada özellikle hücresel bağışıklığın indüklenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu yazında, hücre içi patojenlere karşı etkili koruma sağladığı düşünülen DNA bazlı aşının potansiyel uygunlamaları, etki mekanizmaları ve insana uygunlanabilirlikleri, son yıllarda bu konuda yapılan çalışmalar derlenerek gözden geçirilecektir.

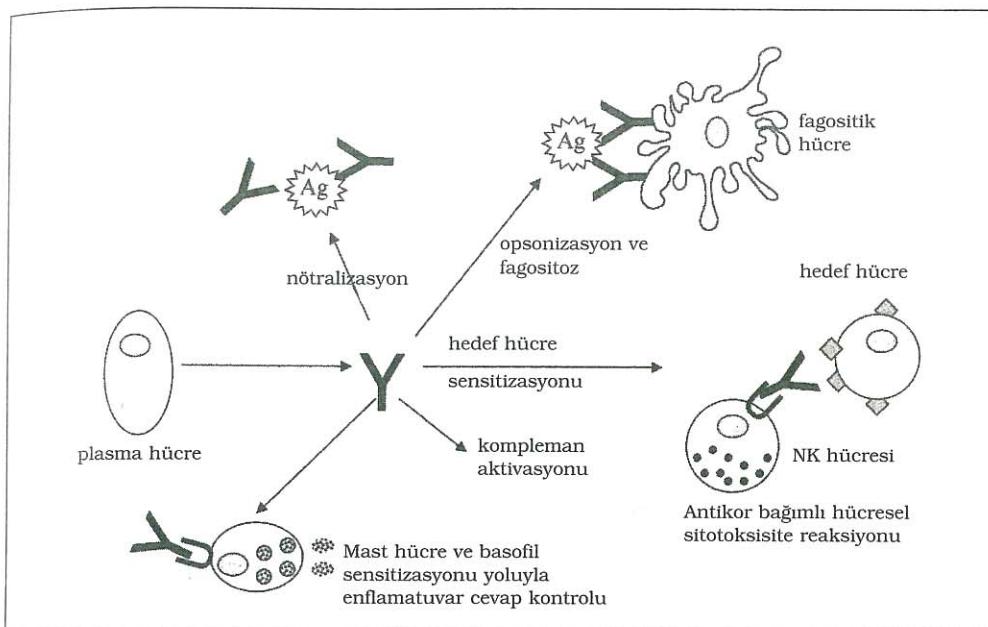
## 1. KLASİK ANTİJEN SUNUM SİSTEMLERİ VE YETERSİZLİKLERİ

Klasik aşılama stratejileri pek çok enfeksiyöz hastalıktan korunmada oldukça başarılı sonuçlar vermekle birlikte, istenmeyen yan etkilere yol açabilmekte ve bazı hastalıklar için ise yeterli koruyuculuk sağlayabilen aşilar bulunmamaktadır. Antijen bazlı aşilar 3 ana başlık altında incelenebilir (1):

### a. Canlı-atenüye edilmiş viral, bakteriyel veya viral-vektör aşılar

Atenüasyonun amacı, orijinal mikroorganizmanın doğal davranışını belirgin bir hastalığa yol açmadan mimik edebilecek, modifiye bir organizma üretmektir. Atenüasyon, organizmanın üretildiği ortam koşullarının değiştirilmesiyle sağlanabilmektedir. Örneğin, *Mycobacterium tuberculosis*'in virulant suyu 1908'de Calmette ve Guerin tarafından tespiti bir çalışma sonucu atenüye edilmiştir. Bu araştırmacılar Hücre agregasyonunu engellemek amacıyla kültür ortamına safra eklemişler ve bu ortamda üretilen organizmanın 13 yıl sonra atenüye olduğunu gözlemişlerdir.

Atenüye viral veya bakteriyel aşılar hem sivil hem de hücresel imüniteyi indüklemekle birlikte canlıda virulant hale dönüşme (örneğin Sabin Polio virusu) veya imün yetmezlik durumunda patolojiye yol açabilme (örneğin BCG) riskini de taşırlar. Bunun yanı sıra her patojenin in vitro'da üretememesi veya yeterli düzeyde atenüye edilememesi de bu tür aşın kullanımını sınırlı kılmaktadır. Büy-



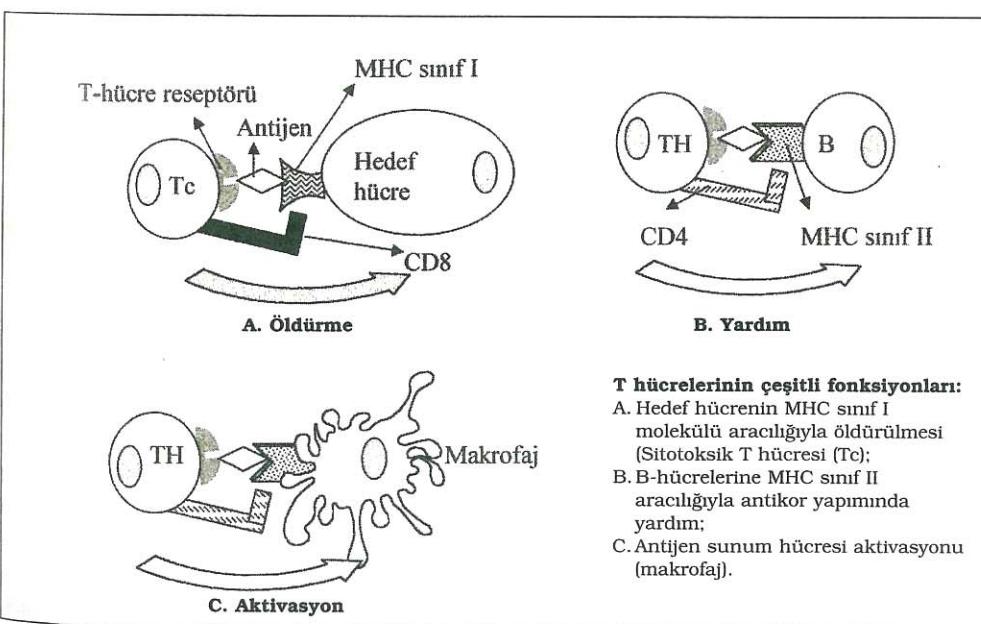
Şekil 1. Antikorun görevleri

le patojenler için antijenik protein kodlayan geni *Vaccinia* veya *Herpes* gibi atenüye bir viral vektöre (taşıyıcı) klonlamak yoluna gidilebilmekte ancak yine viral vektörün virulant forma dönebilme riski bulunmaktadır.

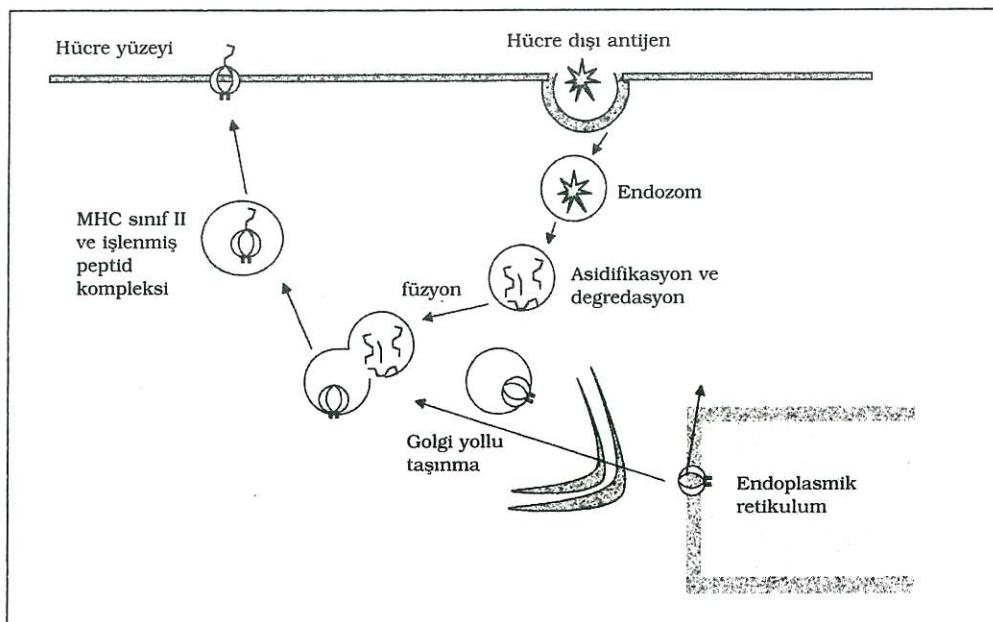
#### b. Subunit aşılar

Saflaştırılmış veya rekombinant protein ya da sentetik peptid'den oluşan bir aşılar, en-

feksiyöz olmadıkları için güvenle kullanılmaktadırlar. Böyle bir aşının yapımında patojenin hangi protein komponentinin korumayı sağladığını bilmek gereklidir. Subunit antijenler makrofaj gibi özel antijen sunum hücreleri tarafından endositik kesecikler halinde hücre içerişine alınıp işlenirler ve sınıf II MHC moleküllerile komplekslenip hücre yüzeyinde yardımcı T-lenfositlere sunulurlar



Şekil 2. T hücrelerinin rolü

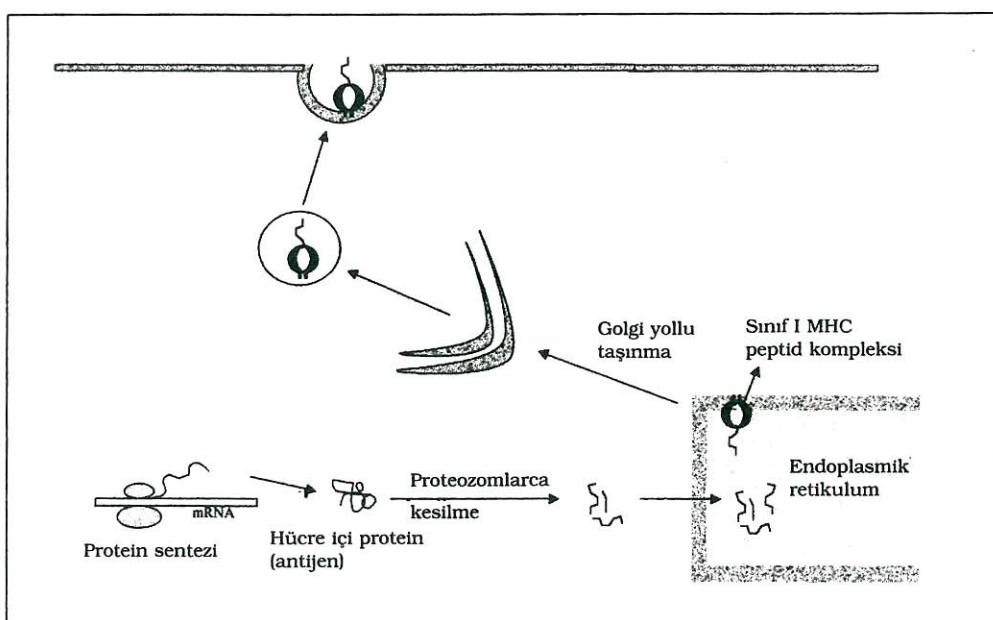


**Şekil 3.** Hücre dışı antijenin işlenmesi ve MHC sınıf II molekülleriyle sunuluşu

(Şekil 3). Sadece bu yolla işlenen antijenler sitotoksik T hücrelerini indükleyemezler çünkü bu hücrelerin uyarılabilmeleri için antijenin endositik kesecik yerine sitoplazmada işlenmesi ve sınıf I MHC molekülleriyle komplekslenerek yüzeye sunulması gerekmektedir (Şekil 4). Yani özetleyecek olursak subunit aşilar güvenli olmalarına karşı sitotoksik T hücrelerin uyarılmasını sağlayamadıkları için hücre içi patojenlere karşı yeterli korumayı gerçekleştirememektedirler.

### c. Ölü aşilar

İsi veya formaldehit gibi kimyasallara tabi tutularak öldürülün patojenler imünizasyonda kullanılabilmektedir. Bunlar da subunit aşilar gibi hücre dışı antjen gibi davranışları ve dolayısıyla sitotoksik T hücrelerin aktivasyonunda etkisizdirler. Ayrıca patojenin inaktivasyon işlemi protein konformasyonunu değiştirebileceği için imünogenezde azalma olabilir.



**Şekil 4.** Hücre içi antijenin işlenmesi ve MHC sınıf I molekülleriyle sunuluşu

Tablo 1. DNA aşılarda kullanılan bazı hayvan modelleri

Patojen	Antijen	Hayvan türü	Referanslar
Borelia burgdorferi	OspA	Fare	(5)
Hepatit B virüsü	Kapsid (core antijen)	Fare	(6)
Hepatit B virüsü	Yüzey antijeni	Fare, Tavşan, Siçan, Şempanze	(7-10)
Herpes simplex virüsü	Glikoprotein B ve D	Fare	(11-13)
HIV-1	gp160	Fare ve Primatlar	(14-15)
İnfluenza virüsü	Hemaglutinin Matriks proteini Nükleoprotein	Tavuk, Fare ve Primatlar	(16-19)
Leishmania major	Ana yüzey glikoproteini	Fare	(20)
Mycobacterium tuberculosis	M. leprae hsp 65	Fare	(21-22)
Mycoplasma pulmonis	M. pulmonis DNAsı	Fare	(23)
Kuduz virüsü	Glikoprotein	Fare	(24-25)
Papilloma virüsü	Ana kapsid proteini L1	Tavşan	(26)
Plasmodium yoelii	Sirkumsporozoit proteini	Fare	(27-28)
Lenfositik koriomenenjit virüsü	Glikoprotein Nükleoprotein	Fare	(29-30)

## 2. KONVANSİYONEL AŞILARA KARŞI DNA BAZLI AŞILAR

1990 yılında Wolf ve arkadaşları (2)  $\beta$ -galaktosidaz geni taşıyan plasmid DNA'yi farede kas içi enjekte etmiş ve bu genin kas hücrelerinde ekspresyonunu B-galaktosidaz enzym aktivitesini ölçerek göstermiştir. Bu çalışmadan sonra Tang ve arkadaşları (3) hücrelerde ekspres olan markör proteine karşı spesifik imün yanıt olduğunu bulmuşlardır. Tüm bu sonuçlar, nükleik asit bazlı imünizasyon çalışmalarını başlatmıştır.

### a. DNA bazlı aşilar nedir ve nasıl üretilir

Bu yeni imünizasyon yöntemi hepatit B yüzey antijeni gibi bir proteini kodlayan plasmid DNA'nın organizmaya enjeksiyonunu takiben hücreler içerisinde ekspresyonunu içerir. Hücre içerisinde giren plasmidin genellikle çekirdekteki ana kromozoma entegre olmadan kaldığı ve burada yapısında bulunan

viral promoter altındaki genin ekspres olduğu ve kodlanan proteinin sitoplazmada işlenerek en sonunda MHC sınıf I molekülleriyle komplekslenerek yüzeyde sunulduğu düşünülmektedir.

Tipik bir DNA bazlı aşı yapımının aşamaları Mycoplasma pulmonis örnek alınarak aşağıda gösterilmektedir (4):

- M. pulmonis uygun bir besi yerinde üretilir
- Organizmanın DNA'sı ekstre edilir
- Elde edilen DNA EcoRI gibi uygun bir restriksiyon enzimi ile kesilir ve değişik boyda fragmanlar oluşturulur.
- Elde edilen fragmanlar  $\lambda$ -gt 11 bakteriofajı gibi bir universal ekspresyon vektörüne klonlanır.
- E. coli bu vektörle transforme edilir ve klonlar üretilir.

Hangi klonların M. pulmonis antijenini eksp-

res etikleri anti-mikoplazma monoklonal antikoru kullanılarak taranır.

- Positif klonlar polimeraz zincir reaksiyonuyla amplifiye edilir.
- Elde edilen DNA PBKCMV gibi memelilerde ekspresyona elverişli bir plasmid vektöre klonlanır.
- HeLa hücrelerinde plasmidle transformasyonu takiben antijen ekspresyonu yine anti-mikoplazma monoklonal antikoru kullanılarak taranır.
- Pozitif sonuç alınmışsa imünizasyon çalışmalarına geçilir.

### b. DNA bazlı aşı modelleri

DNA bazlı aşılarla ilgili farklı antijen ve hayvan modelleri kullanılmaktadır (Tablo 1). Bu modellerin çoğunda viral proteinler kullanılmıştır ancak diğer mikroorganizma genleriyle yapılan çalışmalar da başarılı sonuçlar vermiştir. Bu aşıların sadece sitotoksik T-hücreleri aktive etmeye kalmayıp IgG ağırlıklı antikor oluşumuna da yol açıkları gözlenmiştir. Yine pek çok hayvan modelinde İnterlökin-2 ve İnterferon- $\gamma$  salgılamalarıyla karakterize olan TH1 tipi yardımcı T-hücre ağırlıklı imün yanıtının oluştuğu gösterilmiştir.

### c. DNA aşılarının geleceği

Plasmid DNA aşıların organizmanın ana kromozomuna entegre olma olasılığı preklinik çalışmalar açısından gözönünde bulundurulması gereken önemli bir teorik risk faktörüdür. Entegrasyon, onkogenlerin aktivasyonuna ya da tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna yol açabileceği için bu aşıların güvenilirliği henüz tam olarak kanıtlanamamıştır. Ayrıca bu aşıların yüksek imün yanıtla sonuçlanması tatmin edici düzeyde açıklayacak bir model oluşturulamamıştır. Her ne kadar hücre içi antijen üretiminin sitotoksik T-hücreleri aktive ettiği düşünülse

de Sato ve arkadaşlarının 1996 yılında yayınladıkları (31) çalışma, DNA kökenli imünizasyon konusunun sanıldığından çok daha komplike olduğuna işaret etmektedir. Bu araştırmacılar, aynı markör protein genini ( $\beta$ -galaktosidaz) birinde ampisilin direnç geni (AmpR) diğerinde ise kanamisin direnç geni (KanR) bulunan iki farklı plasmid'e klonlamışlar ve fareleri bu plasmidlerle aşılamışlardır. Bunun sonucunda AmpR geni taşıyan plasmidle aşılanan farelerde başarılı sıvısal ve hücresel imün yanıt sağladıkları halde diğer plasmid'in aşı sonrası çok daha yüksek düzeyde protein ekspresyonuna yol açtığı halde etkisiz olduğunu saptamışlardır. Yani sadece antijenin hücre içi ekspresyonu sağlamak bağışıklık sistemini aktive etmek için yetersiz kalmaktadır. Bu çalışmada bir başka bulgu, kısa imünstimülör DNA dizinlerinin imünizasyonun başarısı için gerekliliğidir. Örneğin AmpR geni içerisinde iki adet böyle dizin (5'-AACGTT-3') olduğu ancak KanR geninde hiçbir imünstimülör sekans bulunmadığı bilinmektedir. Bu da bakteri kökenli plasmid DNA'nın kendisinin adjuvant olarak görev yaptığı düşündürmektedir. Klinman ve arkadaşlarının yayınladıkları son çalışmada DNA'nın adjuvant etkisini destekleyecek bulgular sunulmaktadır (32). Prokaryotik DNA'nın bazı dizinleri bağışıklık sistemini aktive etmekteyse, o zaman bu dizinlerin proteinyapısındaki antijenlerle karıştırılıp enjekte edilmesi, başarılı imün aktivasyonun sağlanması için yeterli olabilir. Böyle bir bulgunun doğrulanması DNA aşılarının sonunu getirebilecektir ancak yeni bir imünolojik adjuvant olarak imünstimülör dizinler içeren prokaryotik DNA'nın kullanımı mümkün olabilecektir.

Sonuç olarak nükleik asit kökenli aşıların insanda kullanılıp kullanılamayacağı etki mekanizmasının kesinleşmesinden ve bu aşıların güvenilirliklerinin tespit edilmesinden sonra belli olacaktır.

### KAYNAKLAR

1. Ertl HCJ and Xiang Z, Novel vaccine approaches. *J. Immunol.* 1996; 156:3579-3582.
2. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Ascadi G, Jani A et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990; 247: 1465-1468.
3. Tang DC, De Vit M and Johnston SA, Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992; 356: 152-154.
4. Kai WC, Pakes SP, Ren K, Lu Y-S and Bennett M, The-

- raapeutic effect of DNA immunization of genetically susceptible mice infected with virulent *Mycoplasma pulmonis*. *J Immunol*. 1997; 158: 2513-2516.
5. Luke CJ, Carner K, Liang X and Barbour AG, An Osp-A based DNA vaccine protects mice against infection with *Borelia burgdorferi*. *J. Infect. Dis.* 1997; 175: 91-97.
  6. Kuhober A, Pudollek HP, Reifenberg K, Chisari FV, Schlicht H-J, Reimann J et al. DNA immunization induces antibody and cytotoxic T cell responses to Hepatitis B core antigen in H-2b mice. *J. Immunol.* 1996; 156: 3687-3695.
  7. Whalen RG and Davis HL, DNA-mediated immunization and the energetic immune response to hepatitis B surface antigen. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1995; 75: 1-12.
  8. Davis HL, Michel M-L, Whalen RG, DNA-based immunization for hepatitis B induces continuous secretion of antigen and high levels of circulating antibody. *Human Molecular Genetics* 1993; 2: 1847-1851.
  9. Davis HL, Michel M-L, Mancini M, Schleef M and Whalen RG, Direct gene transfer in skeletal muscle: plasmid DNA-based immunization against the hepatitis B virus surface antigen. *Vaccine* 1994; 12: 1503-1509.
  10. Davis HL, MJ McCluskie, JL Gerin and RH Purcell, DNA vaccine for Hepatitis B: Evidence for immunogenicity in chimpanzees and comparison with other vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996, 93: 7213-7218.
  11. Rouse RJ, Nair SK, Lydy SL, Bowen JC; Rouse BT, Induction in vitro of primary cytotoxic T-lymphocyte responses with DNA encoding herpes simplex virus proteins. *J. Virol.* 1994, 68: 5685-5659.
  12. Ghiasi H, Cai S, Slanina S, Nesburn AB and Wechsler SL, Vaccination of mice with herpes simplex virus type 1 glycoprotein D DNA produces low levels of protection against lethal HSV-1 challenge. *Antiviral Res.* 1995, 28: 147-157.
  13. Manickan E, Rouse RJ, Yu Z, Wire WS and Rouse BT, Genetic immunization against herpes simplex virus. Protection is mediated by CD4+ T lymphocytes. *J. Immunol.* 1995, 155: 259-265.
  14. Wang B; Boyer J, Srikantan V, Coney L, Carrano R, Phan C et al. DNA inoculation induces neutralizing immune responses against HIV-1 in mice and nonhuman primates. *DNA Cell Biol.* 1993; 12: 799-805
  15. Lu S, Santoro JC, Fuller DH, Haynes JR and Robinson HL, Use of DNAs expressing HIV-1 Env and noninfectious HIV-1 particles to raise antibody responses in mice. *Virology* 1995; 209: 147-154.
  16. Fynan EF, Robinson HL and Webster RG. Use of DNA encoding influenza hemagglutinin as an avian influenza vaccine. *DNA Cell Biol.* 1993; 12:785-789
  17. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993; 259: 1745-1749.
  18. Yankuakas MA, Morrow JE, Parker SE, Abai A, Rhodes GH, Dwarki VJ et al. Long-term anti-nucleoprotein cellular and humoral immunity is induced by intramuscular injection of plasmid DNA containing NP gene. *DNA Cell Biol.* 1993; 12: 771-776.
  19. Donnelly JJ, Friedman A, Martinez D, Montgomery DL, Shiver JW, Motzel SL et al. Preclinical efficacy of a prototype DNA vaccine: enhanced protection against antigenic drift in influenza virus. *Nature Medicine* 1995; 1: 583-587.
  20. Xu D and Liew FY, Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein of *L. major*. *Immunology* 1995; 84: 173-176.
  21. Silva CL, New vaccines against tuberculosis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1995; 28: 843-851.
  22. Lowrie DB, Tascon RE, Colston MJ and Silva CL. Towards a DNA vaccine against tuberculosis. *Vaccine* 1994; 12: 1537-1540.
  23. Lai WC, Pakes SP, Ren K, Lu Y-S and Bennett M, Therapeutic effect of DNA immunization of genetically susceptible mice infected with virulent *Mycoplasma pulmonis*. *J. Immunol.* 1997; 158: 2513-2516.
  24. Xiang ZQ, Spitalnik S, Tran M, Wunner WH, Cheng J and Ertl HC, Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology* 1994; 199: 132-140.
  25. Xiang ZQ, Spitalnik S, Cheng J, Erikson J, Wojczyk B and Ertl HC, Immune responses to nucleic acid vaccines to rabies virus. *Virology* 1995; 209: 569-579.
  26. Donnelly JJ, Martinez D, Jansen KU, Ellis RW, Montgomery DL and Liu MA, Protection against papilloma virus with a polynucleotide vaccine. *J. Infect. Dis.* 1996; 173: 314-320.
  27. Hoffman SL, Sedegah M and Hedstrom RC, Protection against malaria by immunization with a *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein nucleic acid vaccine. *Vaccine* 1994; 12: 1529-1533.
  28. Mor G, Klinman DM, Shapiro S, Hagiwara E, Sedegah M, Norman JA et al. Complexity of the cytokine and antibody response elicited by immunizing mice with *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein plasmid DNA. *J. Immunol.* 1995; 155: 2039-2046.
  29. Yokoyama M, Zhang J and Whitton JL, DNA immunization confers protection against lethal lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J. Virol.* 1995; 6964: 2684-2688.
  30. Zarosinski CC, Fynan EF, Selin LK, Robinson HL and Welsh RM, Protective CTL-dependent immunity and enhanced immunopathology in mice immunized by particle bombardment withDNA encoding an internal virion protein. *J. Immunol.* 1995; 154: 4010-4017.
  31. Sato Y, Roman M, Tighe H, Lee D, Corr M, Nguyen M-D et al. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* 1996; 273: 352-355.
  32. Klinman DM, Yamschikov G and Ishigatubo Y, Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J Immunol* 1997; 158:3635-3639.