

37 NANP ve 4 NVDP Epitoplu *Plasmodium falciparum* Rekombinant Circumsporozoite Proteinin Ekspresyonu ve Moleküler Karakterizasyonu*

Production and Molecular Characterization of *Plasmodium falciparum* Recombinant Circumsporozoite Protein with 37 NANP and 4 NVDP Epitopes

Yunus UYAR¹, Abdüssamed AKŞİT², Serkan KARACA², Şirin Sahra CEYLAN², Merve YÜRÜK²

¹ Türk Kızılayı Kan Bağış Merkezi, Kayseri.

¹ Turkish Red Crescent Blood Donation Center, Kayseri, Turkey.

² Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

² Erciyes University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Kayseri, Turkey.

* Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2014-5370 nolu proje ile desteklenmiş ve çalışmanın bir bölümü 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi (29 Eylül-5 Ekim 2013, Denizli)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 13.07.2016 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 11.01.2017

ÖZ

Plasmodium cinsine ait protozoan parazitlerin sebep olduğu sıtma, parazitler hastalıklar arasında en fazla ölüme neden olanıdır. Hastalık dişi Anofel sivrisineğin insanlardan kan emmesiyle bulaşmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre 2015 yılı içerisinde 214 milyon yeni sıtma olgusu görülmüş ve buna bağlı olarak 438 bin ölüm olgusu gerçekleşmiştir. Sıtmaya bağlı ölümlerin %90'ı Afrika kıtasında görülmektedir. Bu ölümlerin %78'i beş yaş altı popülasyonu etkilemektedir. Sıtmaya karşı yürütülen yoğun mücadele sonucunda 2000 ila 2015 yılları arasında hastalığın insidansı %37 azalmıştır. Hızlı ve etkin bir biçimde tanı ve tedavisi gerçekleştirildiğinde, sıtma iyileştirilebilir bir hastalıktır. Halihazırda sıtmaya karşı kullanılan ilaçların hemen hepsine karşı direnç gelişmiş durumdadır ve günümüzde sıtmaya karşı tam etkili bir aşı ise henüz geliştirilememiştir. 40 yıl önce, radyasyon uygulanmış 1000 sivrisineğe maruz bırakılan kişilerde falciparum sıtmasına karşı steril immunité oluşturulmasıyla birlikte çalışmalar başlamıştır. *Plasmodium*'ların kompleks yapıları ve karmaşık hayat döngüleri ve çok fazla antijenik yapılarının olması aşı çalışmalarını zorlaştırmaktadır. Üzerinde en fazla çalışılan Circumsporozoite protein (CSP), günümüzde lisans almaya en yakın aday olan RTS,S'in de yapısında bulunmaktadır. CSP, enfeksiyonun başlangıcı esnasında

İletişim (Correspondence): Dr. Yunus Uyar, Türk Kızılayı Kan Bağış Merkezi, Kayseri, Türkiye.
Tel (Phone): +90 505 681 5740, E-posta (E-mail): dryunusuyar@yahoo.com

oynadığı önemli rolden dolayı parazitin antijenik yapıları içerisinde ilk tanımlananıdır. *Plasmodium*'ların major yüzey proteini'dir. CSP çözünebilir bir proteindir ve *Escherichiacoli* hücreleri içerisinde bu proteinin rekombinant formu üretilebilmektedir. NANP tekrar bölgesi konak antikorları için hedef özelliğindedir. Günümüzde sıtmaya karşı birçok protein ve DNA aşısı geliştirilmeye çalışılmaktadır. DSÖ'ye göre önümüzdeki 20 yıllık dönemde sıtma aşısının yapılabilmesi mümkündür. Bu çalışmada, *P.falciparum* CSP'nin rekombinant (rCSP) olarak üretilmesi amaçlanmıştır. Öncelikle CSP geni PCR ile çoğaltılmıştır. CSP geni pJET vektörüne klonlanmış; daha sonra pET100 protein ekspresyon vektörüne subklonlama yapılmıştır. Protein ekspresyonu için *E.coli* hücreleri kullanılmıştır. Bu işlemten sonra saflaştırma ve endotoksinlerden arındırma protokolleri uygulanmıştır. Sonuç olarak; *P.falciparum* genomik DNA'sından 1.182 bp'lik CSP geni elde edilmiştir. DNA dizi analizi ile gen klonlamasının doğruluğu ve CSP geninin DNA dizisi tespit edilmiştir. Elde edilen gen dizisi GenBank'a KT315396 kayıt no ile kaydedilmiştir. Plazmit içerisine yerleştirilen CSP geni ile *E.coli* hücrelerinde rCSP eksprese edilmiştir. Western blot ile varlığı gösterilen rCSP, saflaştırıldıktan sonra endotoksinlerinden arındırılmıştır. rCSP'nin aminoasit dizilimi ve 3 boyutlu şekli elde edilmiştir. CSP'nin rekombinant olarak üretilmesinin laboratuvarımızda ve ülkemizde yapılacak sıtma aşısı çalışmalarına katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

Anahtar sözcükler: Sıtma; sıtma aşısı; *Plasmodium falciparum*; Circumsporoite protein; bağışıklık.

ABSTRACT

Malaria is caused by the protozoan parasite *Plasmodium*, the leading cause of death amongst the parasitic diseases. The disease is transmitted to human by the bites of female *Anopheles* mosquitoes. According to the World Health Organization (WHO) data, there were an estimated 214 million malaria cases and estimated 438.000 deaths occurred worldwide, in 2015. It is observed that 90% of all the deaths due to malaria occur in Africa. 78% of these cases were children who are under five years old. Intensive malaria interventions helped to reduce malaria incidence by 37% between 2000 and 2015. Malaria is a curable disease if diagnosed and treated promptly and correctly. Drug resistance has developed against almost all anti-malarial drugs and an effective vaccine against malaria has not been developed yet. Vaccine studies initiated 40 years ago by sterile immunity against falciparum malaria through immunization by exposure to 1000 irradiated mosquitoes. Complex structures, complicated life cycles and various antigenic structures of *Plasmodium* species make vaccination studies difficult. Circumsporoite protein (CSP), the most extensively studied protein is also present in the content of the vaccine candidate RTS,S which is currently closest to get license. CSP was the first described *Plasmodium* antigen because of its important role during initiation of the parasitic infection. CSP is the major surface coat protein of *Plasmodium* parasite. CSP is a soluble protein and recombinant form of the CSP can be produced in *Escherichia coli*. NANP repeat region is a target site for host antibodies. Recently many DNA, RNA and protein vaccine candidates are being developed against malaria. According to WHO, in the next 20 years period, malaria vaccine can be developed. In this study we aimed to produce recombinant CSP (rCSP). Initially, *P.falciparum* CSP gene was amplified by PCR. CSP gene was cloned in the pJET cloning vector. The gene subcloned to the pET100 protein expression vector. *E.coli* cells were used for protein expression. After this process, purification and endotoxin removal protocols were performed. As a result, 1182 bp CSP gene was obtained from *P.falciparum* genomic DNA. Accuracy of cloning and DNA sequence of the CSP gene was determined with DNA sequence analysis. The gene sequence was recorded to the GenBank with a registration no KT315396. rCSP was expressed in *E.coli* cells. The existence of rCSP was verified with Western Blot method and was purified and removed from endotoxins. rCSP aminoacid sequence and 3D shape was obtained. We believe that the production of recombinant CSP will enable us to contribute to the further malaria vaccine studies in our laboratory and country.

Keywords: Malaria; malaria vaccine; *Plasmodium falciparum*; Circumsporoite protein; immunity.

GİRİŞ

Sıtma, halen dünyada en fazla morbidite ve mortaliteye neden olan paraziter enfeksiyondur. Sıtmaya karşı etkin tedaviler günümüzde kullanılmakta olup, henüz hastalıktan tam olarak koruma sağlayan bir aşı mevcut değildir¹⁻³.

Plasmodium türlerinin insanda enfeksiyona neden olan dört ana türü mevcuttur. Bunlar *P.falciparum*, *P.ovale*, *P.malariae* ve *P.vivax*'tır. İnsanlarda enfeksiyona neden olan beşinci bir tür olan *P.knowlesi* aslında primatların sıtma etkeni olup insanlarda da zoonoz şeklinde sıtmaya neden olmaktadır. İki veya daha fazla *Plasmodium* türüyle kombine enfeksiyonlar da görülebilmektedir. Sıtma etkenleri arasında en ağır klinik tabloyu oluşturan ve en fazla ölüme neden olan tür *P.falciparum*'dur¹⁻⁴.

Dünyada *P.falciparum* sıtması daha fazla görülmekteyken, Türkiye'de yerli olgularda *P.vivax* etkindir. Ülkemizde cumhuriyetin kuruluşundan itibaren yoğun bir şekilde yürütülen mücadele neticesinde yerli sıtma olgusu son yıllarda seyrek^{1,2} fakat uluslararası seyahatin kolaylaşması sonucu son yıllarda ülkemizde ve bölgemizde etkenin *P.falciparum* olduğu importe sıtma olguları daha sık görülebilmektedir⁵⁻¹³.

Hastalığa karşı mevcut ilaç alternatifinin sınırlı olmasının yanı sıra, var olan ilaçlara da direnç gelişimi ve ilaç yan etkileri nedeniyle kullanımının kısıtlanması; böyle önemli bir hastalık için neden halen etkili bir aşı olmadığı sorusunu akla getirmektedir. 1970'lerde attenüesporozoitlerin aşı olarak denenmesiyle başlayan çalışmalar, günümüzde DNA ve protein aşı çalışmalarıyla devam etmektedir¹⁴.Günümüzde parazitin pre-eritrositer, eritrositer ve seksüel hayat evrelerine karşı etkili ve/veya bunların kombinasyonlarından oluşan aşılar geliştirilmeye çalışılmaktadır¹⁵.

Plasmodium'ların farklı hayat evrelerinde sentezlenen birçok antijen tek başına veya birbirleriyle kombine edilerek birçok aşı çalışmasında kullanılmıştır. İlk çalışmalarda attenüesporozoitlerle yapılan deneylerde bağışıklık elde edilmesi üzerine ilgi pre-eritrositer dönem antijenleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Pre-eritrositer dönemin en önemli antijenik yapısı da gerek sporozoitin gelişiminde, gerekse de invazyondan karaciğer evresine kadar olan dönemde aktif rol oynayan Circumsporozoite proteindir (CSP)².

Plasmodium'ların antijenik yapıları içerisinde ilk tanımlanan CSP tek başına ve diğer antijenlerle beraber birçok aşı çalışmasında kullanılmıştır. Bu protein ilk olarak sivrisineklerin vücudundaki ookistler içerisindeki sporozoitlerde tespit edilmiştir. Dişi anofelin yumurta gelişimi için insandan kan emmesi esnasında dermis üzerine enjekte edilen sporozoit yapısında bu protein bulunmakta ve sporozoitin gelişiminde de önemli rol oynamaktadır. CSP'nin yapısında bulunan N ve C terminali yapılarının parazitin enfekte edebildiği insan dışındaki türlerde de büyük oranda benzer olduğu bilinmektedir^{16,17}.

Bu çalışmada *P.falciparum* CSP geninin klonlanıp, ekspresyon vektörüne yerleştirilmesi ve sonrasında rCSP proteininin ekspresyonu, optimizasyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

CSP Geninin Elde Edilmesi

P.falciparum tüm genomik DNA'sından *P.falciparum* CSP geni için, spesifik primerler PfCSP F1 (5'-CACC ATG ATG AGA AAA TTA GCT AT-3') ve PfCSP R2 (5'-TTA ATT AAA GAA TAC TAA TAC-3') kullanılarak PCR reaksiyonu hazırlandı. PCR döngüsü şartları; 94°C'de 5 dk denatürasyonun ardından, 25 döngü 94°C'de 1 dk, 58°C'de 1.15 dk ve 72°C'de 1 dk ile bağlanma ve 72°C'de 30 dk uzama basamakları şeklinde düzenlenmiştir.

Elde edilen PCR ürünü %0.8 etidyum bromür içeren %1.5 agaroz içeren jelde marker eşliğinde yürütülmüş ve jel üzerindeki PCR ürünü, Gel Logic 212 Pro Jel görüntüleme cihazıyla görüntülenmiştir (Carestream, ABD).

CSP Geninin Klonlanması

Klonlama reaksiyonu, CloneJET PCR Cloning Kit (ThermoScientific, ABD)inde önerilen yöntemle uygun olarak gerçekleştirildi. Yapışkan uçlu klonlama protokolü uygulandıktan sonra elde edilen ürün ligation reaksiyonu sayesinde CSP geni pJET vektörüne klonlandı. Bu karışımdan 5µl alınarak buz üzerinde bekletilen mikrosantrifüj tüpündeki 100 µl kompetan OneShot® TOP10 *Escherichia coli* (Invitrogen, ABD) hücrelerine eklendi. Sonrasında mikrosantrifüj tüpü, 42°C'de 1 dk bekletilerek buz üzerine alındı ve üzerine 250 µl SOC medium eklendi. Daha sonra ampisilinli katı LB agar üzerine bu karışım ekildi ve 37°C'de bir gece inkübe edildi.

Transformasyon sonrası oluşan kolonilerin, rekombinant plazmit içerip içermediğini tespit için PCR taraması yapıldı. Bunun için katı besiyerinden steril pipet ucuyla alınan her bir koloni, 25 µl'lik PCR tarama reaksiyon karışımına eklendi. PCR ürünü agaroz jelde yürütüldü ve görüntüledi.

Pozitif kolonilerden miniprep yapılarak CSP genini içeren rekombinant plazmitler saflaştırıldı. Rekombinant plazmitler template olarak kullanılarak PCR yapıldı ve agaroz jelde görüntülenen *P.falciparum* CSP geninin varlığı doğrulandı. Ayrıca DNA dizi analizi yapılarak klonlamanın doğruluğu kesinleştirildi. DNA dizi analizi sonuçları, Chromas v.1.45 programı ile <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> adresindeki BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programıyla veri tabanında mevcut olan *P.falciparum* dizileri ile karşılaştırılarak incelendi.

Elde edilen genin Champion™ pET100 Directional TOPO® Expression Kit (ThermoScientific, ABD)vektörüne yerleştirilebilmesi için Pfu DNA Polimeraz enzimi kullanılarak PCR reaksiyonu hazırlandı. Elde edilen PCR ürünü agaroz jelde yürütüldü ve görüntüledi. Protein ekspresyon ve purifikasyonu için Champion™ pETDirectional TOPO® Expression Kit kullanıldı. *P.falciparum* CSP geninin pET100 vektörüne subklonlanması üretici firma protokolüne göre yapıldı.

pET100 vektörüne ligation ve transformasyon sonrasında oluşan kolonilerin, rekombinant plazmit içerip içermediğini anlamak için PCR taraması yapıldı ve CSP geninin pET100 vektörüne transformasyonu sonrası PCR taraması ile pozitifliği belirlenen koloni LB sıvı besiyerine ekilerek miniprep prosedürü uygulandı. PCR yöntemi ile rekombinant plazmit varlığı doğrulandı. DNA dizi analizi ile varlığı kesinleştirilen rekombinant plazmit, rCSP üretimi için BL21 Star *E.coli* hücrelerine transforme edildi.

rCSP Ekspresyonu

Transformasyon ürününün 500'er µl'si 50 ml'lik 10 ml sıvı LB içeren 2 adet tüpe aktarılacak ikiye bölündü. Sıvı besiyerleri 37°C'de OD₆₀₀ 0.5-0.8 olana kadar yaklaşık 3 saat inkübe edildi. Protokol sonunda negatif örnekle birlikte, alınan diğer örnekler -20°C'de saklandı. Bu örnekler rCSP analizi aşamasında kullanıldı.

Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems (Bio-Rad, ABD) SDS-PAGE'de yürütülen proteinler Trans-Blot® Turbo™ Transfer System Western Blot (Bio-Rad, ABD) sistemle nitroselüloz membrana transfer edildi. Bloklama ve Anti-HisG-HRP antikor (Invitrogen, ABD) inkübasyonu sonrası rekombinant proteine ait bantlar DAB tablet yöntemi ile tespit edildi.

rCSP'nin Saflaştırılması ve Endotoksinlerinden Arındırılması

Rekombinant protein ekspresyonu 3.5 saat 0.1 mM IPTG ile indüklenerek optimize edildi. rCSP'nin saflaştırılması, Protein Purification System Kit (ProBond, ABD) prosedürüne uygun olarak yapıldı. Saflaştırılmış rCSP'nin doğruluğu SDS-PAGE sonrası Western blotta Anti-HisG-HRP antikor ve DAB ile gösterildi.

Saflaştırılan rCSP'den dotoksinlerin ayrıştırılması "ToxinEraser™ Endotoxin Removal Kit (Genscript, ABD)" kullanılarak üretici firma önerisine göre yapıldı. Saflaştırılan ve endotoksinleri uzaklaştırılan rCSP'nin endotoksin seviyesi Pierce LAL Chromogenic Endotoxin-QuantitationKit (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak ölçüldü.

rCSP'nin Aminoasit Dizilimi ve 3 Boyutlu Yapısının Elde Edilmesi

DNA dizi analizi yapılarak elde edilen *P.falciparum* CSP gen dizisi kullanılarak http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/adresindeki program ile rCSP'nin aminoasit dizilimi elde edildi. <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index> adresindeki Jmol 14.2.15_2015.07.09 programı kullanılarak rCSP'nin 3 boyutlu şekli elde edildi.

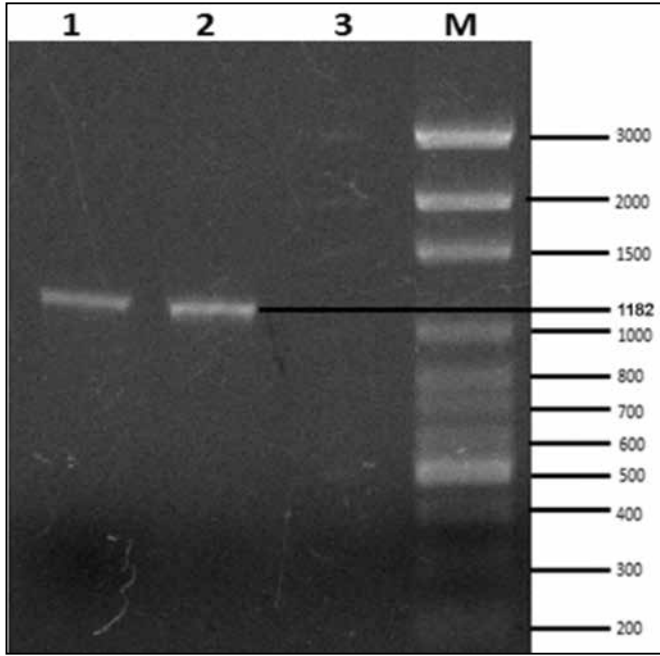
BULGULAR

P.falciparum genomik DNA'sından CSP spesifik primerler kullanılarak PCR kurularak 1.182 bp büyüklüğünde PCR ürünü elde edilmiştir (Resim 1).

PCR ile elde edilen *P.falciparum* CSP geni pJET vektörüne klonlandı. Klonlamanın doğruluğunu göstermek amacıyla rekombinant plazmitin DNA dizi analizi yapıldı. DNA dizi analizi ile gen klonlamasının doğruluğu ve CSP geninin DNA dizisi tespit edildi (Resim 2). Çalışmada elde edilen 1.182 bp büyüklüğündeki *P.falciparum* CSP geni GenBank'a KT315396 numarası ile kaydedilmiştir.

pET100 ekspresyon vektörüne plazmitin yerleştirilebilmesi için Pfu DNA polimeraz enzimi ile çoğaltılan 1.182 bp büyüklüğündeki CSP geni pJET vektöründen subklonlama ile pET100 plazmitine yerleştirilmiştir (Resim 3).

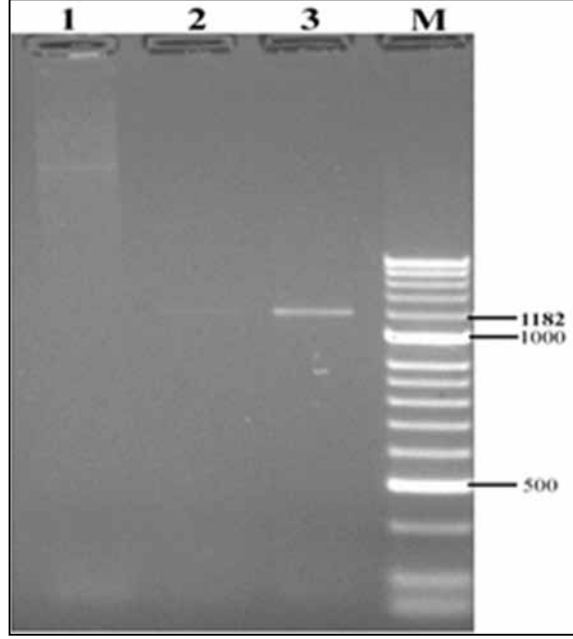
pET100 vektörüne *P.falciparum* CSP geninin yerleştirilmesi ile oluşturulan rekombinant plazmite pET100PfCSP adı verildi. Rekombinant pET100PfCSP plazmiti, BL21 star *E.coli* hücrelerine transformasyonu sonrasında IPTG ile indüklenerek rekombinant protein ekspresyonu uyarıldı. Elde edilen rCSP, SDS-PAGE ve Western Blot yöntemiyle Anti-HisG-HRP antikor ve DAB ile gösterilmiştir (Resim 4).



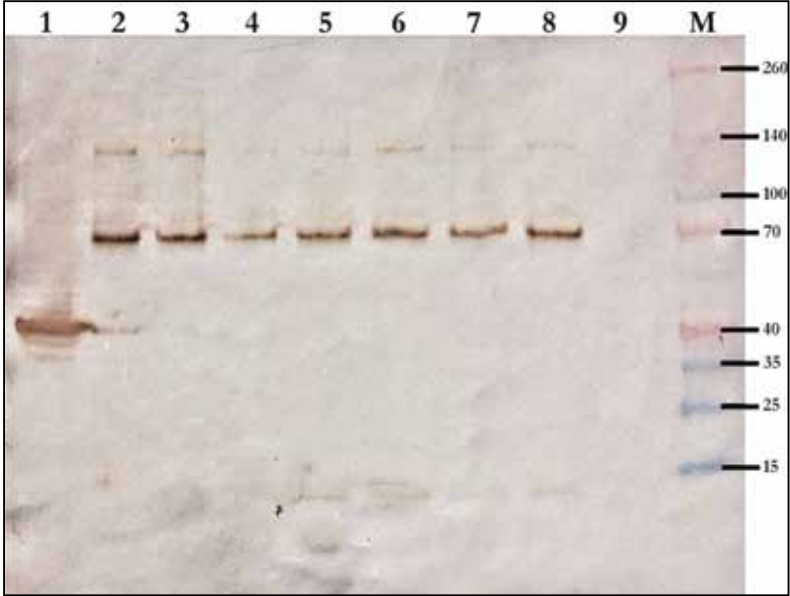
Resim 1. *Plasmodium falciparum* CSP geninin PCR ürünü. 1: Pozitif kontrol (1182 bp), 2: Pozitif örnek, 3: Negatif kontrol, M: Marker.

1	atgatgagaa	aattagctat	tttatctgtt	tcttcctttt	tatttggtga	ggccttattc
61	caggaatacc	agtgtctatg	aagttcgtca	aacacaaagg	ttctaaatga	attaaattat
121	gataatgcag	gcactaatat	atataatgaa	ttagaaatga	attattatgg	gaacacaggaa
181	aattggtata	gtcttaaaaa	aaatagtaga	tcacttgag	aaaatgatga	tggaaataac
241	gaagacaacg	agaaattaag	gaaaccaaaa	cataaaaaat	taaagcaacc	agcggatggt
301	aatcctgatc	caaatgcaaa	cccaaagtga	gatcccaatg	ccaacccaaa	tgtagatcca
361	aatgcaaacc	caaatgtaga	tccaaagtga	aacccaaatg	caaacccaaa	tgcaaaccga
421	aatgcaaacc	caaatgcaaa	cccaaagtga	aacccaaatg	caaacccaaa	tgcaaaccga
481	aatgcaaacc	caaatgcaaa	cccaaagtga	aacccaaatg	caaacccaaa	tgcaaaccga
541	aatgcaaacc	caaatgcaaa	cccaaagtga	gatcccaatg	caaacccaaa	tgcaaaccga
601	aatgcaaacc	caaacgcaaa	cccaaagtga	aatcccaatg	caaacccaaa	tgcaaaccga
661	aatgcaaacc	ctaagtccaa	tccaaagtga	aatcccaatg	caaacccaaa	cgcaaaccga
721	aatgcaaacc	ctaagtccaa	tccaaagtga	aatcccaatg	caaacccaaa	tgcaaaccga
781	aatgcaaacc	ccaatgcaaa	tcctaataaa	aacaatcaag	qtaatggaca	aggtcacaa
841	atgccaaatg	acccaaccg	aaatgtagat	gaaaatgcta	atgccaaaca	tgctgtaaaa
901	aataataata	acgaagaacc	aagtgtatga	cacatagaaa	aatattttaa	gataatacaa
961	aattctcttt	caactgaatg	gtcccatgtg	agtgtaaact	gtggaatgg	tattcaagtt
1021	agaataaagc	ctggctctgc	taataaacct	aaagaccaat	tagattatgc	aaatgatatt
1081	gaaaaaaaaa	tttgtaaaat	ggaaaaatgt	tccagtgtgt	ttaatgtcgt	aaatagttca
1141	ataggattaa	taatgggtatt	atccttcttg	tcccttaatt	ag	

Resim 2. *Plasmodium falciparum* CSP geninin DNA dizi analiz sonucu.



Resim 3. Pfu DNA polimeraz ile elde edilen PCR ürünü. M: Marker
1: Negatif kontrol, 2: Pozitif kontrol (1182 bp), 3: Pozitif örnek.



Resim 4. Safaştırma sonrası rCSP Western blot sonucu. 1: Pozitif kontrol, 2-8: Örnekler
(2: 0.1 mM 4.5 saat, 3: 0.1 mM 3.5 saat, 4: 0.1 mM 2.5 saat, 5: 0.01 mM 5.5 saat, 6: 0.01 mM 4.5 saat, 7: 0.01 mM 3.5 saat, 8: 0.01 mM 2.5 saat), 9: Negatif kontrol
(0. saat), M: Marker.

1	MMRKLAILSV	SSFLFVEALF	QEYQCYGSSS	NTRVLNELNY	DNAGTNLYNE	LEMNYYGKQE
61	NWYSLKKNSR	SLGENDDGNN	EDNEKLRKPK	HKKLKQPADG	NPDPNANPNV	DPNANPNVDP
121	NANPNVDPNA	NPANPNANP	NANPNANPNA	NPANPNANP	NANPNANPNA	NPANPNANP
181	NANPNANPNV	DPNANPNANP	NANPNANPNA	NPANPNANP	NANPNANPNA	NPANPNANP
241	NANPNANPNA	NPANPNANP	NANPNANPNK	NNQNGQGHN	MPNDPNRNVD	ENANANNAVK
301	NNNNEEPSDQ	HIEKYLKIIQ	NSLSTEWSPC	SVTCGNGIQV	RIKPGSANKP	KDQLDYANDI
361	EKKICKMEKC	SSVFNVNNS	IGLIMVLSFL	FLN		

Resim 5. rCSP aminoasit dizisi.

P.falciparum CSP gen dizisi kullanılarak 393 aminoasitten oluşan rCSP yapısı elde edildi (Resim 5). Bu çalışmada elde edilen rCSP içyapısında merkezi bölgede toplam 37 NANP epitopu (Asn-Ala-Asn-Pro) bulunmaktadır. Merkezi bölgede tek başına 3 NANP-NVDP epitop tekrarından sonra 15 NANP tekrarı ve arada bulunan bir NVDP epitopunun ardından tekrar 19 NANP epitop tekrarı olduğu tespit edilmiştir. rCSP yapısında toplam 4 adet birbirinden bağımsız NVDP epitopu bulunduğu görülmüştür.

P.falciparum CSP gen dizisi kullanılarak rCSP'nin 3 boyutlu yapısı elde edilmiştir (Resim 6).

TARTIŞMA

P.falciparum, sıtmaya neden olan parazitler içerisinde en sık karşılaşılan tür olmanın yanında en ağır klinik tabloyu oluşturan ve en fazla ölüme neden olan etkindir. Ülkemizde sıtma etkeni olarak *P.vivax* görülmekteyken, son yıllarda uluslararası seyahatin kolaylaşması, göçler, savaşlar ve öğrenci değişim programları gibi etkenlere bağlı olarak



Resim 6. rCSP proteininin üç boyutlu yapısı.

P.falciparum ile ortaya çıkan sıtma olgularının sayısı da giderek artmaktadır⁵⁻¹³. Aşı çalışmalarına en fazla konu olan sıtma etkeni *P.falciparum*'dur¹⁶.

Sıtmaya karşı aşı geliştirme çalışmaları 1970'li yıllarda başlamıştır. İlk olarak kullanılan radyasyonla attenüe edilmiş sporozoitleri taşıyan sivrisineklere maruz bırakılan kişilerde kısmi bağışıklık elde edilmiştir¹⁴. Gamma ışınlarıyla zayıflatılmış sporozoitler aşı olarak kısıtlı bir bağışıklık oluşturmuştur. Busporozoitlerin bağışıklık oluşturabilmesi için binden fazla sivrisinek ısırığı gereklidir ve seri üretiminde güçlükler yaşanmaktadır. Önceki çalışmalarda elde edilen başarılı sonuçlar sayesinde günümüzde bu yöndeki çalışmalar tekrar ilgi odağı olmuştur¹⁸⁻²⁰.

RTS,S aşısı DSÖ gökkuşağı tablosuna göre Faz III çalışmalarına ulaşabilmiş tek sıtma aşısıdır. Bu aşıda 19 NANP epitop tekrarı bulunmaktadır. Aynı zamanda Hepatit B yüzey antijenine bağlanmış olan CSP'nin C terminalini de içermektedir. RTS,S'de adjuvan olarak ise AS01E kullanılmıştır². RTS,S'in Faz III çalışmaları sonucu elde edilen verilere göre, 5-17 aylık süt çocuklarında yapılan ilk doz aşılamaı takiben 18 ay sonra ikinci bir doz uygulanmasıyla, sıtma olgu sayısını %36 oranında azalttığı bulunmuştur. İlk doz aşılamaı da 6-12 haftalık olan infantlarda ise %26 oranında koruma sağlandığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra aşının etkinliğinin her iki grupta da zamanla azaldığı gözlenmiştir. Aşının etkinliğinin değerlendirilmesinde %80 civarında insektisit ve cibinlik gibi diğer koruma faktörlerinin de mevcut olduğu göz önünde bulundurulmuştur. RTS,S saha çalışmaları, sıtmanın en fazla ölüme neden olduğu Afrika'da ve yine en fazla ölüme neden olduğu grup olan 5 yaş altı çocuklar üzerinde yapılmıştır. 2013 yılında yapılan bir araştırmanın sonuçlarına bakıldığında RTS,S'in 4 yıl sonunda koruma oranı %16.8 olarak bulunmuştur. Afrika'da geniş katımlı bir çalışmada 6 ila 12 haftalık 6537 infantın dahil edilmesiyle yapılan Faz III çalışmasında RTS,S sıtmaya karşı yaklaşık %30 oranında bir koruma sağlamıştır. Afrika'nın 11 farklı bölgesinde yürütülen ve 4453 çocuk üzerinde yapılan bir diğer araştırmada sıtmanın düşük transmisyonunun görüldüğü bölgelerde %60 koruma, orta derecede transmisyonun olduğu bölgelerde %41 koruma ve yüksek transmisyonun olduğu bölgelerde ise %4 koruma gözlenmiştir²¹⁻²³.

Aşının üreticisi olan Glaxo Smith Kline (GSK, İngiltere) firması Haziran 2014'de Avrupa İlaç Ajansı (AİA)'na ruhsat almak üzere resmen başvurmuştur. GSK, AİA'nın değerlendirme sonucuna göre, RTS,S'in Temmuz 2015 itibariyle onaylandığını; 2017 yılında ise son olarak DSÖ tarafından kullanıma sunulup sunulmayacağına karar verileceğini duyurmuştur. Elimizdeki bu veriler ışığında bir değerlendirme yapıldığında, CSP bazlı RTS,S'in, sıtmaya karşı ılımlı bir koruma sağladığı; bu koruyuculuğun %100 olmadığı ve bu konuda önümüzdeki yıllarda daha detaylı çalışmalar yapılarak, daha etkili aşı formülasyonlarının geliştirilmesi gerektiği sonucuna ulaşabiliriz. Ayrıca aşı adayı olabilecek hedef antijenler içinde birçok molekül olmasına karşın en önemli molekül de CSP olarak görülmektedir.

Çalışmamızda kullanılan *P.falciparum* CSP geninin büyüklüğü 1.182 bp'dir. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore> adresinde mevcut bulunan CSP gen dizilerinin büyüklüğü 1.032-2.337 bp arasındadır. GenBank'ta AB502850.1 (Tanzanya izolatu) kayıt numaralı gen ile çalışmamızda izole edilen ve KT315396 numara ile kayıt edilen gen %100 aynı baz dizilimine sahiptir.

Pre-eritrositer dönem aşılarında, CSP'nin merkezinde bulunan ve proteinin ana karakterini belirleyen NANP tekrarlarının önemi dikkate alınarak aşı çalışmalarında kullanılmıştır^{2,24}. NANP epitoplarının; CSP'nin yapısında doğal olarak bulunduğu şekilde ve/veya sentetik şekilde 3 ila 19 tekrar halinde aşı çalışmalarında etkinliği araştırılmıştır. Bu epitopun aşı çalışmalarında stratejik bir hedef olarak seçilmesi oldukça gerçekçi ve akılcı bir yaklaşım olarak günümüze kadar kabul görmüştür^{25,26}.

CSP'ye karşı oluşan humoral bağışıklıkta NANP epitop tekrarı önemli bir rol oynamaktadır. Malawi'de NANP epitop tekrarının polimorfizmi üzerine yapılan bir çalışmada 98 farklı izolat kullanılmış ve sonuçta 20 farklı epitop tespit edilmiştir. RTS,S yapısında 19 NANP tekrarı bulunduğu bilinmesine rağmen farklı izolatlarda oldukça değişken sayılarda NANP tekrarı bulunduğu bildirilmiştir²⁷⁻²⁹. Bizim çalışmamızda kullanılan izolattan elde edilen CSP'deki NANP epitopu tekrar sayısı 37 olarak tespit edilmiştir. Literatürdeki bilgiler ışığında, kullanmış olduğumuz rCSP'deki NANP tekrarının konak immünesinde B ve T lenfosit yanıtını uyarak yapılacak çalışmalarda aşı etkinliğine olumlu katkılarının olabileceğini düşünmekteyiz.

P.falciparum'un pre-eritrositer döneme ait en önemli antijenik yapılarından olan CSP'in rekombinant olarak üretilip, aşı adayı olarak tasarlandığı bu çalışmada; *P.falciparum* genomik DNA'sı kullanılarak; spesifik primerlerle CSP gen bölgesi PCR ile çoğaltılıp daha sonra plazmite klonlanmıştır. Rekombinant plazmit BL21 hücrelerinde eksprese edilmiştir. Eksprese edilen rekombinant protein saflaştırılarak, endotoksinlerinden arındırılmıştır. rCSP'nin etkinliğinin farklı deney hayvanlarında araştırılabilmesi için; rekombinant protein ekspresyon optimizasyonu çalışmalarının yanı sıra, daha yüksek miktarlarda elde edilebilmesi gerekmektedir³⁰.

Günümüzde halen milyonlarca ifade edilen olgu sayısı ve yüzbinlerle ifade edilen can kayıplarına rağmen, sıtmaya karşı etkili bir aşı olmaması ve mevcut ilaçların hepsine karşı bildirilen direnç, bu alanda yapılan ve yapılması planlanan çalışmaları daha da önemli hale getirmektedir.

Bu çalışma sonrasında, farklı modifikasyonlarla elde edilecek verilerin geliştirilmesi ve diğer yüksek organizmalı deney hayvanlarında enfeksiyona karşı etkinliğinin araştırılması ile sıtmaya karşı aşı çalışmalarına önemli bir katkı sağlanmış olunacaktır.

KAYNAKLAR

1. Yazar S, Kuk S, Miman Ö, Saygı G. Saygı'nın Temel Tıbbi Parazitoloji'si. 2016, Erciyes Üniversitesi Yayını, Kayseri.
2. Özcel MA, Özcel Y, Ak M (ed). Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. 2007, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No: 22. Meta Basım Bornova, İzmir.
3. Altıntaş K, Tıbbi Parazitoloji. 2002, Mn Medikal & Nobel Yayını, Ankara.
4. Cox-Singh J. Zoonotic malaria: Plasmodium knowlesi, an emerging pathogen. Curr Opin Infect Dis 2012; 25(5): 530-6.
5. Uyar Y, İnanç T, Sahin S, Kuk S, Yazar S. 2001-2013 Yılları Arasında Kayseri'de Sıtma Epidemiyolojisi. Türkiye Parazit Derg 2015;39:86-9.
6. Bayındır Y, Aycan ÖM, Atambay M, Karaman Ü, Aydoğdu İ. Malatya'da Uganda Kökenli İlk Falciparum Sıtması: İki Olgu. Türkiye Parazit Derg 2005; 29: 157-9.

7. Alver O, Yılmaz E, Akçağlar S, Töre O. Bursa'da Sıtma. Türkiye Parazitoloj Derg 2007; 31: 249-55.
8. Karaman Ü, Atambay M, Yaşar S ve ark. Malatya'da son yedi yıl içindeki sıtma olguları. Türkiye Parazitoloj Derg 2007; 31: 245-8.
9. Parlak E, Ertürk A, Çayır Y, Parlak M. Sporadik bir bölgede: Dört import sıtma olgusu. Türkiye Parazitoloj Derg 2013; 37: 161-4.
10. Çelik T, Kölgeliler S. Adıyaman'da 2000-2011 yılları arasında aktif ve pasif sürveyans ile saptanan sıtma olguları. Türkiye Parazitoloj Derg 2012; 36: 204-7.
11. Altun HU, Gül YK, Vudalı E ve ark. Uganda kaynaklı *Plasmodium falciparum* sıtması. Türkiye Parazitoloj Derg 2013; 37: 229-32.
12. Cetinkol Y, Yıldırım AA. Ordu ilinde 2002-2011 yılları arasında sıtma epidemiyolojisi. Türkiye Parazitoloj Derg 2013; 37: 69-72.
13. Güven T, Eser FC, Yılmaz GR, Güner R, Taşyaran MA. Seyahat ilişkili *P.falciparum* sıtması: Dört olgu. Türkiye Parazitoloj Derg 2013; 37: 225-8.
14. Clyde DF. Immunization of man against falciparum and vivax malaria by use of attenuated sporozoites. Am J Trop Med Hyg 1975; 24(3): 397-401.
15. Richie TL, Saul A. Progress and challenges for malaria vaccines. Nature 2002; 415: 694-701.
16. Doud MB, Koksai AC, Mi LZ, et al. Unexpected fold in the circumsporozoite protein target of malaria vaccines. Proc Natl Acad Sci 2012; 109(20): 7817-22.
17. Chakravarty S, Cockburn IA, Kuk S, et al. CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. Nature Medicine 2007; 13: 1035-41.
18. Rénia L, Grüner AC, Mauduit M, Snounou G. Vaccination using normal live sporozoites under drug treatment. Methods Mol Biol 2013; 923: 567-76.
19. Roestenberg M, McCall M, Hopman J, et al. Protection against a malaria challenge by sporozoite inoculation. N Engl J Med 2009; 361(5): 468-77.
20. Luke TC, Hoffman SL. Rationale and plans for developing a non-replicating, metabolically active, radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. J Exp Biol 2003; 206(Pt 21): 3803-8.
21. Agnandji ST, Lell B, Fernandes JF, et al. A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. N Engl J Med 2012; 367(24): 2284-95.
22. Bejon P, White MT, Olotu A, et al. Efficacy of RTS,S malaria vaccines: individual-participant pooled analysis of phase 2 data. Lancet Infect Dis 2013; 13(4): 319-27.
23. Olotu A, Fegan G, Wambua J, et al. Four-year efficacy of RTS,S/AS01E and its interaction with malaria exposure. N Engl J Med 2013; 368(12): 1111-20.
24. Graves PM, Gelband H. Vaccines for preventing malaria (pre-erythrocytic). The Cochrane Database of Systematic Reviews. 2009; Issue 1.
25. Zavala F, Tam JP, Hollingdale MR, et al. Rationale for development of a synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. Science 1985; 228(4706): 1436-40.
26. Espinosa DA, Gutierrez GM, Rojas-López M, et al. Proteolytic Cleavage of the *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite protein is a target of protective antibodies. J Infect Dis 2015; 212(7): 1111-9.
27. Bowman NM, Congdon S, Mvalo T, et al. Comparative population structure of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein NANP repeat lengths in Lilongwe, Malawi. Sci Rep 2013; 3: 1990.
28. Zeeshan M, Alam MT, Vinayak S, et al. Genetic variation in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in India and its relevance to RTS,S malaria vaccine. PLoS One 2012; 7(8): e43430.
29. Rich SM, Ferreira MU, Ayala FJ. The origin of antigenic diversity in *Plasmodium falciparum*. Parasitol Today 2000; 16(9): 390-6.
30. Recombinant protein production optimization. Available from: URL: http://www.genscript.com/gfiles/techfiles/Optimizing_conditions_for_recombinant_soluble_protein_production_in_E_coli.pdf.