

# 12. Hafta

# **DNA İMMUNİZASYONU**

**Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**

# AŞILAR

## KONVANSİYONEL

1. İnaktif aşılar
2. Canlı aşılar

### attenue aşilar

kültür attenue  
konak attenue  
doğal attenue  
(mutant)

heterolog aşilar  
tam virulent aşilar

3. Toksoid aşilar
4. Subunit aşilar

## BİYOTEKNOLOJİK

1. Sentetik peptidler
2. Anti-idiotip aşilar
3. Genetik mühendisliđi teknikleri

rekombinant antijenler  
(kategori I)

genetik-attenue organizmalar  
(kategori II)

canlı rekombinant organizmalar  
(kategori III)

4. DNA aşiları

# DNA İmmunizasyonu

Vücuda etkeni, etkene ait bir antijeni vermek yerine, *antijeni kodlayan DNA sekansını (geni) içeren plasmid*'in kontrollü koşullar, uygun yol, metodlar kullanılarak verilmesi ve plasmidi alan veya plasmidle transfekte olan hücrelerde hedef (koruyucu) antijenin üretilmesi ve immun sisteme sunulmasıyla sağlanan immunizasyona **DNA İMMUNİZASYONU** denir.

# DNA İmmunizasyonunun Tarihi

- 1960 Ito Shope rabbit papilloma virusu' ndan fenol ile ekstrakte NA' in tavşan derisinde papilloma
- 1962 Farelere saf olarak injekte edilen DNA' nın eksprese edilebileceği
- 1987 Sanford ve ark. 'gen silahı'
- 1990 Wolff ve ark. saf plasmid DNA' sının i.m. injeksiyonunu takiben uzun süreli protein ekspresyonu
- 1990 William ve ark. gen silahını kullanarak DNA ile kaplı mikropartikülleri rodent deri ve karaciğerine bombarde (inokule) etmiş ve 14 güne kadar kodlanmış gen ekspresyonu gözlemlemiş

- 1992 Tang ve ark. insan büyüme hormonu sentezleyen geni taşıyan plasmidleri gen silahı yoluyla farelere inokule etmiş ve tekrarlayan immunizasyonla artırılabilen spesifik antikor yanıtları
- 1993 Başka bir grup gen silahıyla influenza virusu ve HIV 120 glikoproteinini uygun plasmidler ile uyguladığında spesifik antikorlar oluşmuş
- 1993 Liu ve ark. influenza virusu A/PR/8/34 suşu NP genini taşıyan plasmidler aynı virusun genetik olarak farklı olan ve 34 yıl sonra görülen suşuna (A/HK/68) karşı güçlü CTL yanıtları oluşturmuş

# Gen klonlaması

- Bir genin identik kopyalarının elde edilmesi
- Önemli bir ürünün (veya proteinin) sentezini kodlayan genin ait olduğu hücre (prokaryotik veya ökaryotik) genomundan (veya kromozomundan) özel yöntemlerle kesilerek çıkarılması, bunun bir taşıyıcı vektör DNA' sı ile birleştirilerek alıcı bir hücreye (prokaryotik veya ökaryotik) transfer edilmesi, bu alıcı hücrede genin ekspresyonunun sağlanmasıdır.

# Gen klonlamasında önemli olan aşamalar

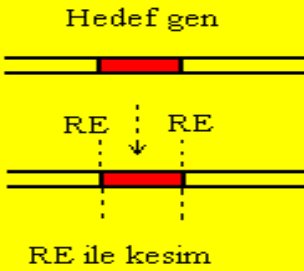
- Gen taşıyan DNA'nın (veya RNA) saf olarak elde edilmesi,
- Genin yerinin belirlenmesi,
- Genin çıkarılması,
- Taşıyıcı (vektör) DNA'nın elde edilmesi,
- Gen DNA'sının vektör DNA'sı ile birleştirilmesi,
- Oluşan rekombinant vektör DNA'nın alıcı hücreye aktarılması ,
- Seleksiyon,
- Gen ürününün kontrol edilmesi



## DNA Aşılarının Üretimi

### Gen Verici (donör) Hücreler

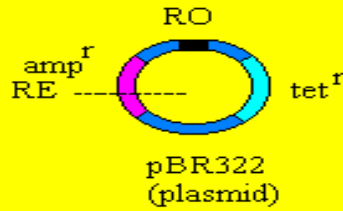
Prokaryotik genler  
Ökaryotik genler  
vs



spesifik RE ile kesilerek çıkarılan gen

### Vektörler

Plasmid, faj,  
virus, bakteri  
vs



Rekombinant plasmid

spesifik gen sekansı

E. coli'ye transfer

Okaryotik hücreye transfer

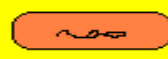
mekik vektör

Genin ekspresyonu  
ve  
gen ürününün sentezi

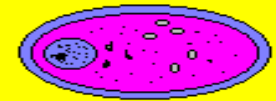
### Alıcı Hücreler

Prokaryotik hücreler  
Ökaryotik hücreler

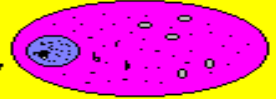
E. coli  
(bakteri)



S. cerevisiae



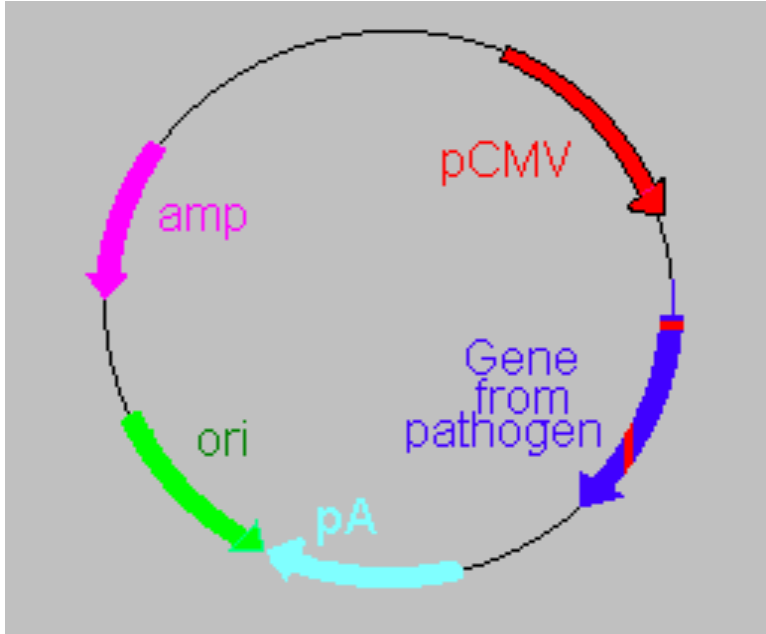
S. cerevisiae protoplastı



plasmidlerin farelere  
injeksiyonu



# İdeal Bir Plasmidin Komponentleri

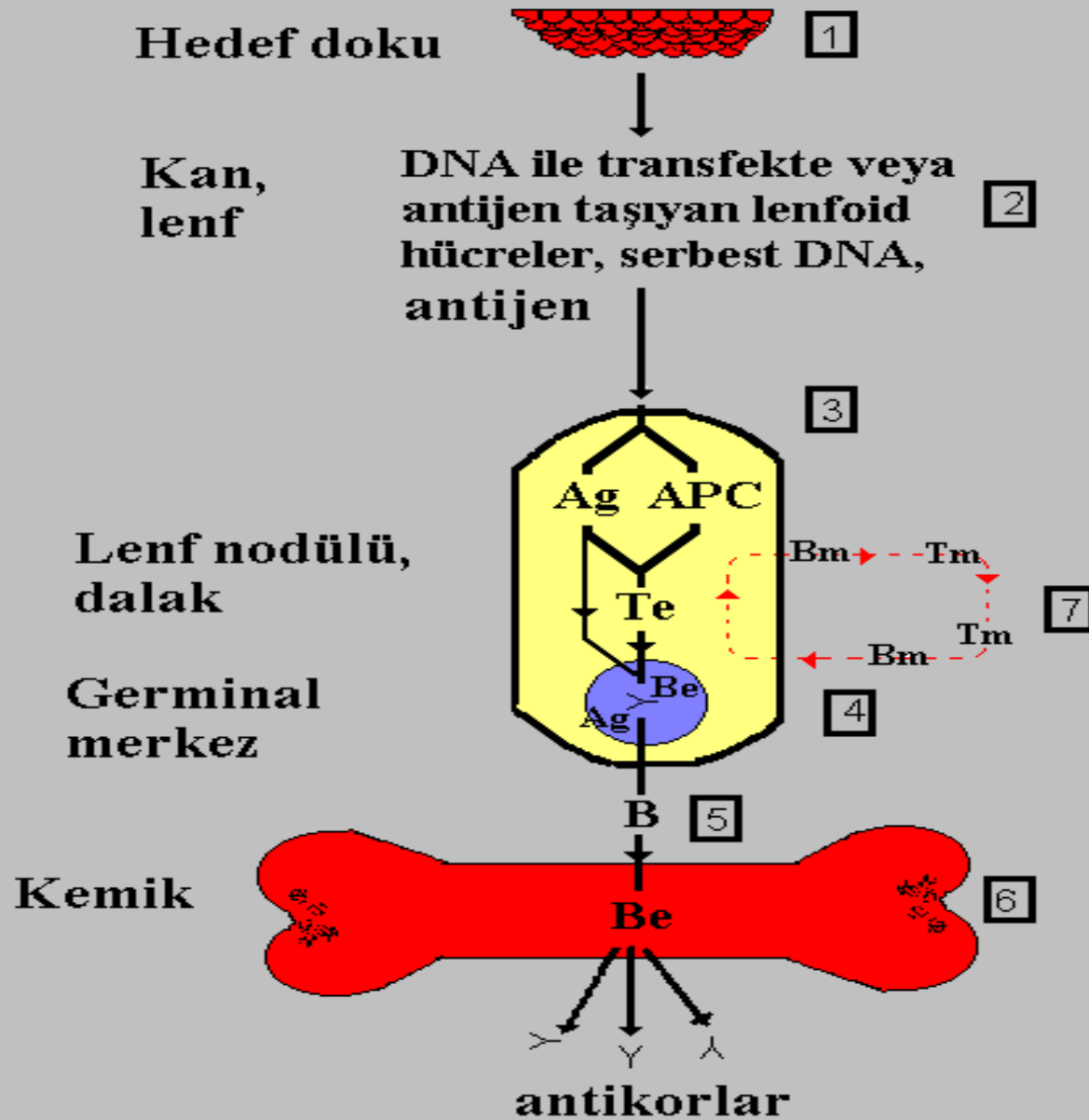


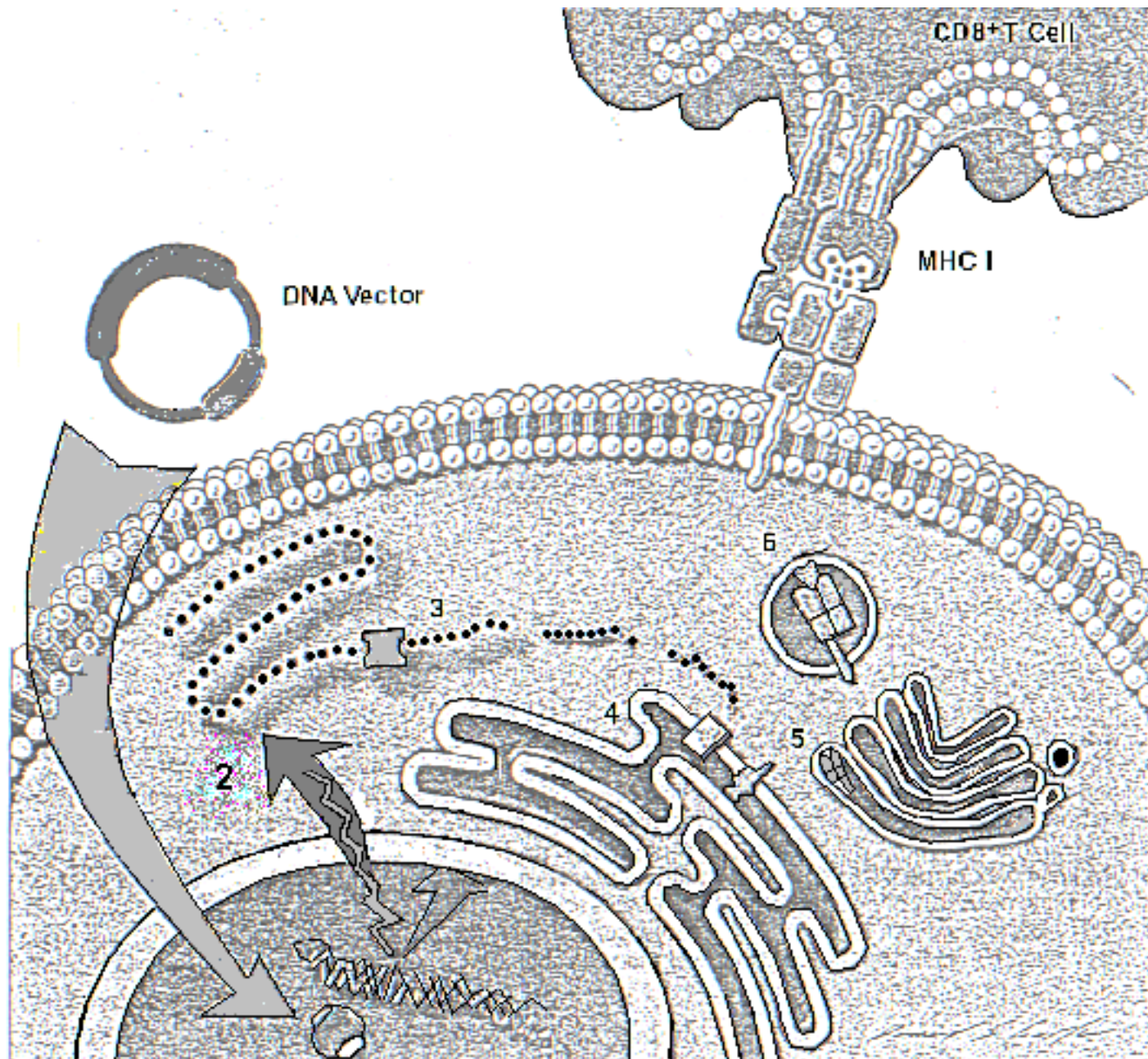
- Güçlü bir ökaryotik promotor,
- Patojene ait genin insersiyonu için bir klonlama bölgesi,
- Bir poliadenilasyon- terminasyon sekansı,
- Bir prokaryotik replikasyon orjini,
- Ampisilin-dirençlilik geni (*amp*) gibi seleksiyonu sağlayan bir marker

<b>Model</b>	<b>Antijenler</b>	<b>Hayvanlar</b>	<b>Şekillenen hücreler</b>
<b>HSV-1 zosteriform</b>	gB	Fare/BALB/c	T hücreleri
<b>HSV-1 zosteriform</b>	ICP27	Fare/BALB/c	T hücreleri
<b>HSV-1-CTL in vitro</b>	gB and ICP27	Fare/BALB/c/ C57.B46	T hücreleri
<b>HSV-2 vaginitis</b>	gD	Fare/BALB/c	B hücreleri
<b>HSV-2 vaginitis</b>	gD	Guinea pig	B hücreleri
<b>Bovine herpes virus</b>	gIV	Fare/BALB/c	B hücreleri
<b>Influenza lung</b>	NP	Fare/BALB/c	T ve B hücreleri
<b>Influenza lung</b>	HA	Tavuklar	B hücreleri
<b>Influenza lung</b>	NP	Fare/BALB/c	T ve B hücreleri
<b>Influenza lung</b>	HA	Tavuklar	B hücreleri
<b>Influenza</b>	NP	Ferretler ve Afrika yeşil maymunları	B hücreleri
<b>Influenza lung</b>	HA	Fare/BALB/c	B hücreleri
<b>Rabies-I/M</b>	G-protein	Fare/BALB/C3 H/ HEN	T ve B hücreleri
<b>Rabies-I/M</b>	G-protein	Fare/C3H/HEN	T ve B hücreleri
<b>LCMV I/C</b>	NP	Fare/BALB/c	T ve B hücreleri
<b>LCMV I/C</b>	NP	Fare/C57BL/6	T ve B

Model	Antijenler	Hayvanlar	Şekillenen hücreler
<b>Hepatitis C virus</b>	Core protein	Fare/BALB/c	T ve B hücreleri
<b>Hepatitis B virus</b>	HBs Ag	Fare/BALB/c	T ve B hücreleri
<b>Hepatitis B virus</b>	HBs Ag	Fare/BALB/c C57BL/6	T ve B hücreleri
<b>Hepatitis B virus</b>	HBc Ag	C57BL/6J	T ve B hücreleri
<b>HIV</b>	gp 160	Fare/BALB/c	T ve B hücreleri
<b>HIV</b>	gp 120	Fare/BALB/c	T hücreleri
<b>SIV</b>	env ve gag	Rhesus maymunları	T hücreleri
<b>SV-40</b>	Tümör antijeni	Fare/BALB/c	T ve B hücreleri
<b>Plasmodium yoelii</b>	Circumsporozoit protein	Fare/BALB/c	T ve B hücreleri
<b>Plasmodium yoelii</b>	CSP, PyHep17	Fare/BALB/c	T ve B hücreleri
<b>Leishmania major</b>	gp 63	Fare/BALB/c	T hücreleri
<b>Mycoplasma pulmonis</b>	Bütün antijenler ELI	Fare	T ve B hücreleri
<b>Mycobacterium tuberculosis</b>	M. leprae HSP 65	Fare/BALB/c	T hücreleri

**TABLO1 DNA Aşılarında Kullanılan Deney Hayvanı Modelleri**





# DNA Aşılarının Diğer Aşılarla Karşılaştırılması

- Plasmid DNA' sının saflığı, üretim kolaylığı, fiziko-kimyasal stabilitesi,
- Tek bir doz içinde çeşitli immunojen kombinasyonları
- subunit aşılar ve rekombinant proteinlere göre aşı üretimi ve dağıtımı açısından daha ucuz,
- DNA ile sağlanan aktarımda aşı antijenlerinin doğal formda ekspresyonu,
- Hem CD4<sup>+</sup> yardımcı T hücre hem de CD8<sup>+</sup> CTL yanıtı
- Plasmidlerin var olan vektör spesifik immuniteden etkilenmeden tekrarlanabilmesi,
- Çok genç hayvanlarda maternal antikörlerin varlığında dahi immunité oluşumu,
- Aşıyla kodlanan proteinlerin in vivo, sürekli ve düşük seviyelerde üretimi, yüksek affiniteli T ve B hücreleri

# DNA Aşılarının Avantajları

- Herhangi bir DNA sekansı uzun ekler içerenler dahi plasmid içine yerleştirilebilir,
- Fazla miktarda üretilip purifiye edildiklerinde, oda sıcaklığında uzun süreler saklanabilmek için plasmidler liyofilize edilebilir, aşıların transportu kolay ve ucuz,
- Ebola virusu gibi zararlı ajanlara karşı immunojen hazırlanmasında en güvenilir yol ,
- Uzun süreli antijen ekspresyonu uzun süreli T hücre yanıtı ve immunolojik hafıza oluşumunu sağlar,
- İmmun yanıtın doğasını etkileyebilecek molekülleri de içeren çok sayıda antijeni kodlama potansiyeli,
- Çok sayıda epitopu kodlayan DNA aşıları, doku hasarı yerine korumayla ilgisi olan T hücre yanıtı oluşumu



# DNA Aşılarının Dezavantajları

- Antijenlerin protein karakterde olma zorunluluğu ve glukozilasyonlarının sağlanmasındaki zorluklar

DNA aşılarıyla ilgili önem arzeden olasılıklar

- plasmid DNA' sının konakçı genomuna integre olarak insersiyonel mutasyonlara ve tümör formasyonlarına yol açması
- anti-DNA antikörlerini de içeren otoimmün yanıtlar
- Tolerans oluşumu veya yoğun antijen ekspresyonuna bağlı olarak self proteinlere karşı var olan toleransın kesilmesi

# DNA Aşılarının Geliştirilmesinde Göz Önünde Tutulması Gereken Noktalar

- Aşı yokluğu veya var olan aşıların yetersizliği (örn. HIV, hepatitis C, influenza, tüberküloz, leishmaniosis, schistosomiosis, sıtma)
- Günümüzde aşılama stratejilerinin maliyetlerinin aşılama engelleyici boyutlara ulaşması
- Yeni doğanlarda immunité oluşumu ihtiyacı

# Son Zamanlarda DNA Aşılamalarıyla Elde Edilen Umut Verici Sonuçlar

- Malarya (sıtma)'ya karşı multigen aşılama yapılan farelerde MHC haplotipinde CTL'ne dayalı koruma oluşumu
- İnfluenza virusu gibi antijenik değişkenliğe sahip etkenlere karşı oluşan yüksek koruma raporları
- Şempanzelerde HIV'nun heterolog suşuyla şekillenen enfeksiyona karşı koruyucu immünite oluşumu
- Etkene maruz bırakılma sonrası yapılan aşılamayla farelerde süregelen mikoplazmal pnemoninin ortadan kalkması

# DNA Aşılarının Kullanım Alanları

- Bakteriyel İnfeksiyonlar
- Viral infeksiyonlar
- Paraziter İnfeksiyonlar
- Tümörler

# Bakteriyel İnfeksiyonlar

- Brucellosis
- Lyme Hastalığı
- Mycoplasmosis
- Salmonellosis
- Tetanoz
- Tuberculosis

# Diğer DNA Aşıları

## Viral İnfeksiyonlar

- influenza virusu
- bovine herpes virus
- insan herpes simplex virusu
- kuduz virusu
- lymphocytic choriomeningitis virus
- cottontail rabbit papilloma virusu
- hepatitis B virusu
- HIV virusu

## Paraziter İnfeksiyonlar

- Schistosoma japonicum
- Leishmania major
- Plasmodium yoelii

## Tümörler

