

# Rekombinant Cryptostatin Proteininin ve Cryptopain 1 Sistein Proteazının Aktivitelerinin Belirlenmesi

## Determination of the Activities of Recombinant Cryptostatin Protein and Cryptopain 1 Cysteine Protease

Zeynep Erdem Aynur\*, Bülent Bozdoğan\*,\*\*

\* Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein Merkezi, Aydın, Türkiye

\*\* Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

**Atf/Cite as:** Erdem Aynur Z, Bozdoğan B. Rekombinant cryptostatin proteininin ve cryptopain 1 sistein proteazının aktivitelerinin belirlenmesi. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2023;53(4):227-236.

### Öz

**Amaç:** *Cryptosporidium* türlerinin neden olduğu kriptosporidiyoz, tüm dünyada oldukça yaygın olarak bulunan zoonotik bir hastalıktır. *Cryptosporidium* parazitinin önemli bir virülans faktörü olan cryptopain sistein proteaz, cryptostatin ise sistein proteaz inhibitörüdür. Sistein proteazlar birçok parazitte önemli rol üstlenen virülans faktörleridir ve bundan dolayı ilaç tasarımları için belirlenen hedefler arasında yer alırlar. Bu çalışmada *Cryptosporidium parvum*'da bulunan cryptopain-1 ve cryptostatin genlerinin klonlanması ve etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** *Cryptosporidium* spp. şüpheli hayvanlardan alınan dışkılarından modifiye Kinyoun asit-fast boyaması yapılmış, etken pozitif olarak değerlendirilen örneklerden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Örneklerden cryptopain ve cryptostatin genleri klonlanmıştır. Klonlamanın ardından, total protein ekstraktı hazırlanmış ve purifiye edilmiştir. Saflaştırılan proteinler SDS-Page görüntüleme yöntemiyle değerlendirilmiştir. Saf olarak elde edilen cryptopain ve cryptostatinin, jelatinaz aktivitesi, %3 jelatin içeren besiyerinde test edilmiştir. Aynı zamanda değişik pH ve sıcaklıkta cryptopain ve cryptostatinin aktivitesi test edilmiştir.

**Bulgular:** Sistein proteaz olan cryptopain'de jelatinaz aktivitesi saptanırken, inhibitörü olan cryptostatin'de ve kontrol grubunda jelatinaz aktivitesi saptanmamıştır. Saflaştırılan proteinlerin IgG ve BSA degradasyonu değerlendirmelerinde ise cryptopain-1'in her iki proteini de farklı sıcaklık ve pH değerlerinde degrade ettiği tespit edilmiştir. Cryptostatinin ise değişik ısı ve pH değerlerinde cryptopain aktivitesini engellemiştir.

**Sonuç:** Rekombinant cryptostatinin *Cryptosporidium parvum* proteazlarının inhibisyonunda ve enfeksiyonlarında önleyici olarak kullanıma potansiyeli vardır.

**Anahtar kelimeler:** *Cryptosporidium parvum*, sistein proteaz, proteaz inhibitörü

### ABSTRACT

**Objective:** Cryptosporidiosis, caused by *Cryptosporidium* species, is a common zoonotic disease all over the world. Cryptopain, an important virulence factor of *Cryptosporidium* spp., is a cysteine protease inhibitor, and cryptostatin is a cysteine protease inhibitor. Cysteine proteases are virulence factors that play an important role in many parasites and are therefore among the targets for drug designs.

**Methods:** Modified Kinyoun acid-fast staining was performed using the feces of animals that may harbor *Cryptosporidium* spp., and DNA isolation was performed from the positive samples. Cryptopain-1 and cryptostatin genes were cloned. After cloning, total protein extract was prepared and purified. Purified proteins were evaluated by SDS-Page imaging. Gelatinase activity of purely obtained cryptopain and cryptostatin were tested on medium containing three percent gelatin. Moreover, the activities of cryptopain and cryptostatin at different pH and temperature were tested.

**Results:** Our results showed that recombinant cryptopain, a cysteine protease, had gelatinase activity, however in presence of recombinant cryptostatin and control group, no gelatinase activity was observed. In the IgG and BSA degradation evaluations of the purified proteins, it was determined that cryptopain-1 degraded both proteins at different temperatures and pH values. Cryptostatin inhibited cryptopain activity at different temperatures and pH values.

**Conclusion:** Recombinant cryptostatin has potential for the inhibition of *Cryptosporidium parvum* proteases and prevention of infections.

**Keywords:** *Cryptosporidium parvum*, cysteine proteases, protease inhibitors

### Alındığı tarih / Received:

20.02.2023 / 20.February.2023

### Kabul tarihi / Accepted:

04.07.2023 / 04.July.2023

### Yayın tarihi / Publication date:

08.12.2023 / 08.December.2023

### ORCID Kayıtları

Z. Erdem Aynur 0000-0003-2736-0316

B. Bozdoğan 0000-0003-2469-9728

✉ z.erdem.06@gmail.com

## GİRİŞ

Clarke tarafından “fare mide epiteli üzerinde yer alan spor kümeleri” olarak 1895 yılında ilk kez tanımlanan parazitler, 1907 yılında Amerikalı parazitolog Ernest Edwart Tyzzer, parazite Yunanca’da gizli spor anlamına gelen *Cryptosporidium* adını vermiştir<sup>(1)</sup>.

*Cryptosporidium* ökaryotik bir protozoondur. Protozoa âleminin *Apicomplexa* şubesinde yer almaktadır. *Cryptosporidium* cinsinde bulunan tüm türlerin genetik materyalleri bir çift zarla çevrili olan nükleus içerisinde bulunmaktadır. Bu cins mensup olan tüm türler hücre içi parazitlerdir<sup>(2,3)</sup>.

*Cryptosporidium* spp. hücre içi sitoplazma dışı yerleşimli gösteren protozoondur. Gastrointestinal sistemin mikrovilluslarında hasara neden olan *Cryptosporidium* insanları da kapsayan çok sayıda omurgalı türünde bulunmaktadır. Oluşturdukları tablo, konağın immun sistemine ve yaşına göre değişiklik göstermektedir. İmmunsistemi baskılanmış hastalarda ve beş yaşın altındaki çocuklarda, kolera benzeri diyareye neden olabildiği için, hayatı tehdit edici bir tablo oluşturabilmektedir. Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (CDC) tarafından biyoterörizm ajanı olarak tanımlanan tek parazitik tür olan *Cryptosporidium* kategori B’de yer almaktadır<sup>(4)</sup>.

Proteazlar, peptit sindirimi, bağışıklık düzenlemesi, hücre sinyali, otofaji, farklılaşma ve hücre döngüsünün modülasyonu dahil olmak üzere çeşitli biyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde kritik rol oynarlar<sup>(5)</sup>. *Cryptosporidium* ookistlerinin, kist duvarının parçalanmasında; proteazların (aminopeptidaz, sistein proteaz ve serin proteaz) belirgin aktiviteleri tanımlanmıştır<sup>(6)</sup>. Kist duvarının parçalanmasında, sistein proteazların belirgin rol oynaması ve sistein proteaz inhibitörleriyle enfeksiyonun oluşmaması, proteazların *Cryptosporidium*’un yaşam döngüsünde önemli olduklarını göstermektedir<sup>(7)</sup>. *Cryptosporidium* cinsine ait sistein proteazlar olan cryptopainler, parazitik organizmalarda yalnızca ekskistasyonda değil hücre invazyonunda ve parazit ve konak proteinlerinin modifikasyonunda ve degradasyonunda görev alırlar<sup>(8)</sup>.

Toplam 401 amino asitten oluşan bir sistein proteaz olan cryptopain-1, parazitin ekskistasyon dışındaki sporozoid ve meront evrelerinde bulunması, konak hücre istilasında fonksiyonunun olduğu göstermektedir<sup>(9,10)</sup>. Cryptopain-1’in, konak hücrenin hücre dışı matris unsurları olan fibronektin ve kollajeni hidrolize edebildiği de kanıtlanmıştır<sup>(11)</sup>.

*Cryptosporidium*’da bulunan sistein proteaz inhibitörü cryptostatin olarak adlandırılmaktadır ve parazitin sistein proteazı Cryptopain-1’i inhibe eder. Cryptostatin 173 amino asitten oluşan 19.7 kDa büyüklüğünde küçük bir proteindir. Cryptostatin, cryptopain-1 dışında papain, insan katepsin-B ve katepsin L proteazlarını da inhibe edici aktivite göstermektedir<sup>(12)</sup>.

Çalışmamızda *Cryptosporidium*’a ait olan ve cryptopain ve cryptostatin genlerinin ekspresyon vektörlerinde klonlanması, saflaştırılması ve cryptostatinin parazitin proteaz aktivitesini önleyici potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma, Adnan Menderes Üniversitesi, Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu tarafından (22.08.2017 tarih ve 082 sayı) onaylanmıştır.

*Cryptosporidium* prevalansının Kinyoun asit fast boyaması ve moleküler olarak değerlendirilmesi: Kinyoun asit fast boyaması sonucunda *Cryptosporidium* spp. yönünden pozitif olarak kabul edilen dışkı örneğinden DNA izolasyonu, Qiagen Stool Kit® kullanılarak üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir<sup>(13)</sup>. DNA izolasyonunun ardından *Cryptosporidium*’un moleküler tespiti için nested PCR yapılmıştır. Bunun için daha önce tasarlanan primerler kullanılmıştır (Tablo 1)<sup>(14)</sup>.

*Cryptopain* ve *cryptostatin* genlerinin çoğaltılması ve klonlanması: Çalışmamızda, National Center for Biotechnology Information Gen-Bank (NCBI-Gen Bankası) veri tabanı kullanılarak, araştırılacak ve

**Tablo 1. Cryptopain ve Cryptostatin genlerinin amplifikasyonunda kullanılan primerler**

Primer	Primer sekansı (5'.....3')	Erişim Kodu	Referans
SSUF2	TTCTAGAGCTAATACATGCG		(14)
SSUR2	CCCATTTCCTCGAAACAGGA		(14)
SSUF3	GGAAGGGTTGTATTATTAGAT		(14)
SSUR4	AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA		(14)
Cryptopain F	CGTGAATT <u>C</u> ATGGACATAGAAACAACG	AF091366.1	Çalışmamız
Cryptopain R	CTGCTCGAGGAAATGCTTATATTGATTG		
Cryptostatin-F	CGTGAATT <u>C</u> ATGAATAAGACAATTTTAGA	GU433606.1	Çalışmamız
Cryptostatin-R	CTGCTCGAGCTATTCTTTATTATTCTTC		

çoğaltılacak olan genlere ait diziler bulunmuştur (Cryptostatin, için GenBank erişim kodu GU433606.1 ve cryptopain-1 için erişim kodu AF091366). Klonlama işlemi sağlamak amacıyla bu çalışma bünyesinde tasarlanan primerlere restriksiyon kesim bölgeleri eklenmiştir (Tablo 1). Sekans doğrulamasının ardından pET28a plazmid ve amplikonlar EcoRI ve XhoI restriksiyon enzimleriyle kesilmiştir. Kesim reaksiyonları 37°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra agaroz jelde incelenmiş ve fenol kloroform yöntemi ile saflaştırıldıktan sonra, kesilmiş amplikon ve plazmid eşit miktarlarda alınarak ligasyon için kullanılmıştır<sup>(15)</sup>. Ligasyon reaksiyon karışımı, bir saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra gece boyunca +8°C'de inkübe edilmiştir. Kimyasal kompetan hücre hazırlama yöntemi ile *Escherichia coli* BL21 hücreleri hazırlanmış ve 10 mikrolitre ligasyon reaksiyonu eklendikten sonra buz içerisinde bekletilmiş ve ısı şoku uygulanarak transformasyon sağlanmıştır. Transformasyonun ardından hücrelerin üzerine 900 µL Tryptic soy broth eklenerek 37°C'de bir saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından içinde 50 µg/mL kanamisin içeren seçici besi yerlerine 50 ve 200 µL olacak şekilde ekimler gerçekleştirilmiş ve 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır<sup>(15)</sup>.

İnsert alan kolonilerin seçimi ve doğrulanması: Seçici besiyerinde üreyen kolonilerden onar adet seçilip spesifik primer ile koloni PCR yapılmıştır. Cryptopain-1 ve cryptostatin genleri için istenilen insert büyüklüğüne sahip kolonilerden birer tane koloni, plazmid izolasyonu için seçici besiyerine ekilmiş ve bunlardan plazmid izolasyonu yapılmıştır. İnsert restriksiyon enzimleri yardımıyla çıkarılıp

klonlama doğrulanmıştır. Plazmidlerdeki insertler sekans analizi ile de doğrulanmıştır.

Hücre lizatlarının hazırlanması: Toplam 1000 ml Luria-Bertani (LB) besiyerine *cryptopain-1* ve *cryptostatin* genlerini içeren klonların gecelik kültürden 1/20 oranında inoküle edilmiş ve 37°C'de OD<sub>600</sub>'deki absorbans değeri OD 0.6-0.8 oluncaya kadar inkübe edilmiştir. İndüksiyon için 1 mM izopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit (IPTG) eklenmiş ve bir gece boyunca 37°C'de çalkalanarak kültüre bırakılmıştır. Ertesi gün santrifüjle pelletler toplanmış, lizis solüsyonu [500 mM NaCl, %1 Triton X, %6 Glikoz, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=8.0)] ile homojenize edilmiş ve sonikatör yardımıyla parçalanmıştır. Parçalama işleminden sonra lizat 5000 rpm'de 60 dakika +4°C'de santrifüj edilmiştir. Tüplerdeki süpernatant 0.45 µm'lik steril şırınga uçlu filtrelerden geçirilerek total protein kaynağı olarak kullanılmıştır<sup>(15)</sup>.

Proteinlerin Purifikasyonu: Rekombinant proteinlerin purifikasyonu immobilize metal affinite kromatografi (IMAC) yöntemi ile yapılmıştır. HisPur Ni-NTA Resin (Thermo Scientific) solüsyonu prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için yıkama solüsyonu [500 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=8.0)] ve elution [500 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 250 mM imidazol (pH=8.0)] solüsyonları hazırlanmıştır. Kolona Histaq uçlu proteinlerin bağlanabilmesi için, 0.1 M NiSO<sub>4</sub> yüklenmiş, yıkama solüsyonu ile dengeleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Dengeleme işleminin ardından lizis solüsyonu içerisinde bulunan total protein kaynağı kolona yüklenmiştir. Yıkama solüsyonu

ile kolona tutunmayan proteinlerin giderilmesi sağlanmıştır. Kolona bağlanan proteinler elüsyon solüsyonu ile toplanmıştır<sup>(16)</sup>.

SDS Page işlemi: Rekombinant olarak üretimi gerçekleştirilmiş ve saflaştırılmış olan cryptopain; 45.47 kDa ve cryptostatin; 19.79 kDa ağırlığa sahip olduğu için %15'lik separasyon jeli hazırlanmıştır. Jel hazırlandıktan sonra, saflaştırılmış olan enzimler iki ayrı 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne, 15'er µl eklenmiş ve üzerlerine 15'er µl sample buffer konulmuştur. Hazırlanan karışım, 100°C'deki ısı bloğunda 5-10 dakika denatüre edilip spin yapılarak buharı toplanmıştır. Hazırlanan jel dikey elektroforez cihazına yerleştirildikten sonra camların üst çizgisine gelecek ve tanktaki elektroforez tellerini geçecek şekilde 250 mL yürütme tamponu ilave edilmiştir. Tampon ilave edildikten sonra, hazırlanan yaklaşık 30 µl karışım ve marker'lar pipet yardımıyla kuyucuklara yüklenmiştir. Enerji kaynağıyla bağlantısı yapılan tankın elektrik düzeyleri 110 V'da boya en alt çizgiye gelene kadar elektroforez işlemi (iki saat) gerçekleştirilmiştir. Jelde yürüyen proteinleri görüntülemek için, jel dikkatlice boyama yapılacak küvete alınmış sonra su ile jel yıkanmıştır. Jeli boyamak için, commasie blue boyası kullanılmıştır. Commasie blue boyası jeli kapatacak şekilde kap içerisindeki jel üzerine dökülmüş, kabın kapağı yarım kapatılarak bir dakika mikrodalga fırında yüksek derecede ısıya tabi tutulmuştur. Daha sonra 15-20 dakika çalkalayıcı üzerinde yavaşça inkübe edilmiştir. Boya geri toplanıp ve destain solüsyonu jelin üstüne dökülmüştür ve mikrodalgada bir dakika ısıtılıp sonra 20-30 dakika karıştırıcıda yavaşça inkübe edilmiştir. Bu son işlem bantlar net görünene kadar tekrar edilmiştir.

Jelatinaz aktivitesinin test edilmesi: Sistein proteaz enzimlerinin substratları arasında jelatin, kollajen, fibronektin gibi hücre dışı matriks elemanları bulunmaktadır. Çalışmamızda rekombinant olarak ürettiğimiz sistein proteaz cryptopain ve sistein proteaz inhibitörü cryptostatinin işlevsel olup olmadığının belirlenmesi için jelatinaz aktivitesi değerlendirilmiştir. Jelatinaz deneyi, jelatin (30 g/L) içeren LB içerisinde gerçekleştirilmiştir. Seçici besiyerinde ayrı ayrı üretilen cryptopain, cryptostatin ve kontrol amaçlı olarak kullanılacak olan pET28a plazmidini içeren BL21 suşu gecelik kültüre bırakılmıştır.

Gecelik kültürler, jelatin içeren besi yerine inoküle edilmiş, 37°C'de gecelik inkübasyona bırakılmış, ardından 4°C'de beş saat boyunca tutulmuştur. Yarı katı halde görülen kültürler jelatinaz aktivitesi açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir<sup>(17)</sup>.

Proteaz aktivitesinin ve enzim stabilitesinin test edilmesi: Farklı pH ve sıcaklıklardaki enzim stabilitesinin değerlendirilmesi için, cryptopain ve cryptostatin enzimlerinin aktivitesi, farklı pH (5.0-6.5 ve 8.0) ve sıcaklık değerlerinde (37°C, 56°C ve 95°C) ölçülmüştür.

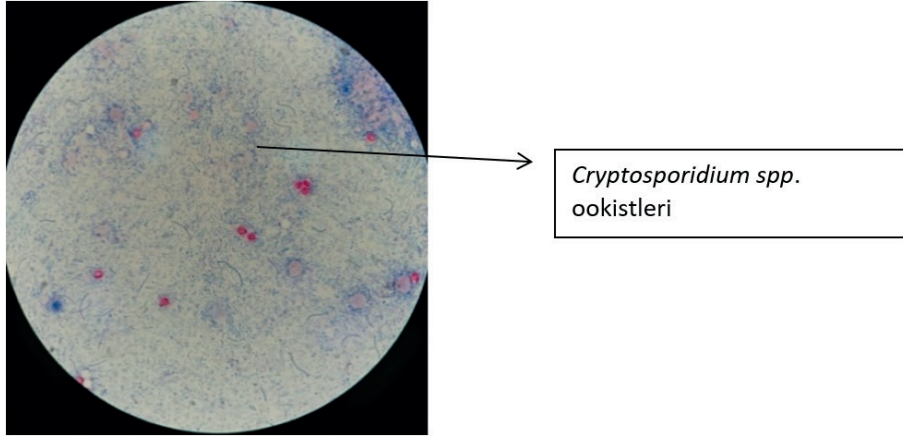
Bu amaç için pH değerleri 5.0 (sodyum asetat), 6.5 (sodyum fosfat) ve 8.0 (Tris-HCl) olan tampon çözeltileri hazırlanmıştır. Saflaştırılan ürünler, bu tampon solüsyonları içerisinde 37°C sıcaklıkta üç saat inkübe edilmiştir. Sıcaklığa bağlı enzim stabilitesinin ölçümü için, saflaştırılan ürünler 37°C, 56°C ve 95°C'lik termal bloklarda 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Sıcaklık ve pH muamelesinin ardından, saflaştırılan cryptopain proteininin proteaz aktivitesinin ölçülmesi için, cryptopain ve BSA, cryptopain ve IgG ayrı ayrı eşit miktarlarda (200 µg/ml) karıştırılarak, 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Sonuçlar %12.5'lük SDS-Page jeli ile değerlendirilmiştir. Cryptostatinin enzim aktivitesinin test edilmesi için, cryptopain ve cryptostatin eşit oranlarda karıştırılarak 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Enzim/inhibitör karışımı, BSA (200 µg/ml) üzerine eklenerek, 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiş ve sonuçlar SDS-Page ile değerlendirilmiştir.

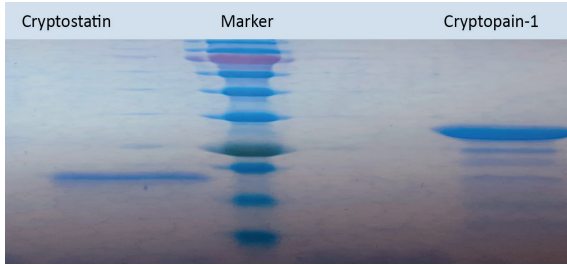
## BULGULAR

Kinyoun Asit Fast Boyaması ile Ookist Varlığının Gösterilmesi: Kinyoun asit fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium*'a ait olduğu düşünülen mikroskop görüntüleri elde edilmiştir (Resim 1).

Cryptopain ve Cryptostatin geninin klonlanması ve üretimi: Koloni PCR ve restriksiyon analizleri ile konfirmasyonu sağlanmış olan genlere ait birer adet ampikon doğrulama amacıyla ticari bir firmaya sekans



Resim 1. Kinyoun Asit Fast boyaması sonucu pozitif olarak değerlendirilen örneğe ait mikroskop görüntüsü. Kinyoun Asit Fast boyaması sonucunda mavi zemin üzerinde pembe oocistlerin görülmesi dışkıda *Cryptosporidium* olduğunun göstergesi olarak kabul edilmiştir.



Resim 2. Cryptostatin ve cryptopain genlerinin SDS-PAGE görüntüsü. Ticari olarak satın alınan GenColor Prestained Protein Marker'da yeşil ile boyanan bant 25 kDa, kırmızı ile boyanan bant 75 kDa boyutunu vermektedir. 19.7 kDa boyutundaki Cryptostatin 25 kDa'luk bantın altında, 45 kDa boyutundaki Cryptopain ise kırmızı ile yeşil bantın arasında yer almaktadır.

analizi için gönderilmiştir. Sekans değerlendirmesi sonucunda *cryptopain-1* geni %99, *cryptostatin* geni %95 benzer bulunmuştur. Saflaştırılan rekombinant proteinlerden cryptostatine ait 19 kDa ve cryptopaine ait 45 kDa boyutundaki bant SDS-Page analizi ile doğrulanmıştır (Resim 2).

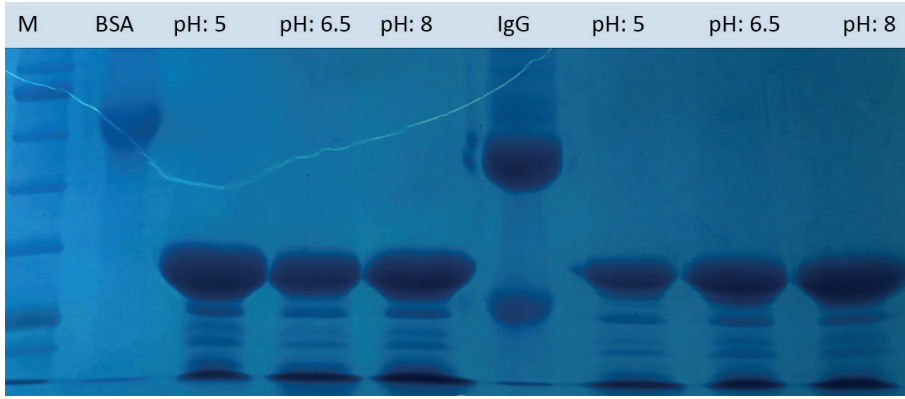
Jelatinaz aktivitesi: Jelatinaz aktivitesi değerlendirme sonuçlarına göre sistein proteaz olan cryptopainde jelatinaz aktivitesi saptanırken, sistein proteaz inhibitörü olan cryptostatin ve kontrol olarak kullanılan pET28a içeren BL21 örneğinde jelatinaz aktivitesi saptanmamıştır (Resim 3).

Proteaz aktivitesinin test edilmesi: Çalışmada toplam üç farklı pH değeri (5, 6.5 ve 8) denenmiş, proteaz aktivitesinin pH değişimlerinden etkilenmediği

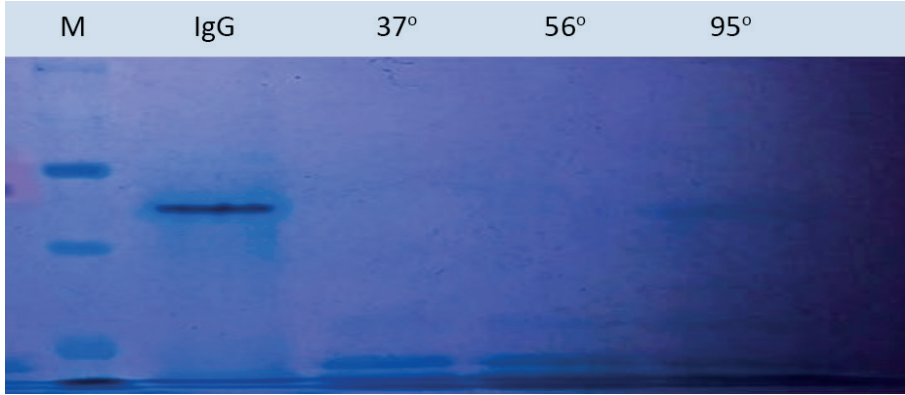


Resim 3. Üretilen rekombinant proteinlerin ve pET28a içeren BL21'in jelatinaz aktivitesi. Pet ve cryptostatin yazılı olan falkonlarda jelatinaz aktivitesi görülmemiş olup, katılaşma meydana gelmiştir. Cryptopain yazılı olan falkonda ise jelatinaz aktivitesi gerçekleşmiş olup, yüzde üç jelatin içeren besi yeri akışkan hale gelmiştir.

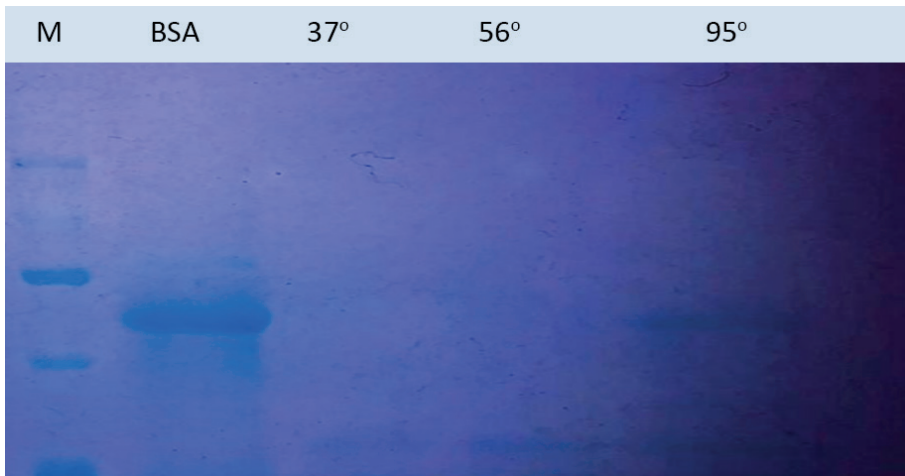
gözlenmiştir (Resim 4). Toplamda üç farklı sıcaklık değeri (37, 56 ve 95°C) denenmiş ve rekombinant cryptopain aktivitesinde 37°C ve 56°C'de herhangi bir değişiklik görülmezken, 95°C'de aktivitede bir miktar (ImageJ programı (<https://imagej.net/ij/docs/index.html>) ile absorbans ölçümleri sonucunda %20) azalma görülmüştür (Resim 5, Resim 6). Rekombinant cryptostatin aktivitesinde ise sıcaklık değişimi sonucunda bir değişiklik gözlenmemiştir (Resim 7).



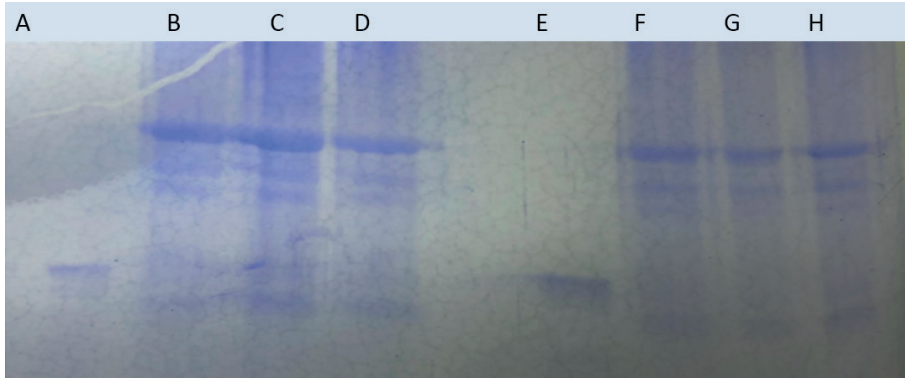
Resim 4. Rekombinant Cryptopain 1'in değişik pH bufferlarında inkübasyonu sonucunda BSA ve IgG üzerinde ki etkisi. BSA ve IgG ile belirtilen sütunlarda proteinlerin cryptopain-1 ile muamele edilmeden önceki halleri yer almaktadır. Bu sütunlarda her iki proteininde ortalama boyutu 75 kDa olarak görülürken, değişik pH bufferları (pH 5, 6.5 ve 8) ile muamele edilmiş cryptopain ile inkübasyona bırakıldıklarında proteinlerin boyutlarında azalmalar meydana gelmiştir.



Resim 5. Rekombinant Cryptopain 1'in değişik sıcaklıklarda inkübasyonu sonucunda IgG üzerinde ki etkisi. IgG ile belirtilen sütunda proteinlerin cryptopain-1 ile muamele edilmeden önceki hali yer almaktadır. 37°C'de ve 56°C'de önceden muameleye bırakılan enzimin aktivitesinde herhangi bir kayıp görülmezken, enzim kaynatma sıcaklığında inkübasyona bırakıldığında aktivitesinde azalma (%20 oranında) meydana gelmiş ancak aktivitesini sürdürmüştür.



Resim 6. Rekombinant Cryptopain 1'in değişik sıcaklıklarda inkübasyonu sonucunda BSA üzerinde ki etkisi. BSA ile belirtilen sütunda proteinlerin cryptopain-1 ile muamele edilmeden önceki hali yer almaktadır. 37°C'de ve 56°C'de önceden muameleye bırakılan enzimin aktivitesinde herhangi bir kayıp görülmezken, enzim kaynatma sıcaklığında inkübasyona bırakıldığında aktivitesinde azalma (%20 oranında) meydana gelmiş ancak aktivitesini sürdürmüştür.



Resim 7. Rekombinant Cryptostatin'in değişik sıcaklıklar ve pH değerlerinde Cryptopain aktivitesini inhibe etme özelliği. A: CP (pH=6.5)+BSA; B: CP (pH=6.5)+BSA+CS (pH=5.0); C: CP (pH=6.5)+BSA+CS (pH=6.5); D: CP (pH=6.5)+BSA+CS (pH=8.0); E: CP (37°C)+BSA; F: CP (37°C)+BSA+CS (37°C); G: CP (37°C)+BSA+CS (56°C) H: CP (37°C)+BSA+CS (95°C)

## TARTIŞMA

*Cryptosporidium* tanısının konulmasında çoklaştırma işleminin ardından yapılan modifiye boyama yöntemleri altın standart olarak kabul edilmektedir. PCR tekniği, *Cryptosporidium* türlerinin klinik olgulardan ve çevresel kaynaklardan izole edilmesi amacıyla günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır<sup>(18)</sup>. Bu teknikle, örneklerde bulunan bir ookist bile saptanabilmektedir<sup>(19)</sup>. *Cryptosporidium* tanılmasında kullanılan en duyarlı yöntemin, 18S rRNA temelli nested-PCR olduğu bildirilmiştir<sup>(20)</sup>.

*Cryptosporidium* spp'in sığırlardaki prevalansı Türkiye'de ve dünyada %3.8-96 arasında değişen oranlarda bulunmaktadır<sup>(21,22)</sup>. Dünya genelinde sığırlarda *Cryptosporidium* varlığına yönelik çalışmalar baz alındığında en yüksek prevalans Avrupa'da (%30.7) görülürken en düşük prevalans Afrika ülkelerinde (%13.2) görülmektedir. Enfeksiyonun yaygınlık oranı; Asya'da %17.0, Kuzey Amerika'da %21.7, Güney Amerika'da %25.6 ve Okyanusya'da %22.6 olarak belirlenmiştir<sup>(23)</sup>.

Proteazlar, peptit bağlarının hidrolizini katalize eden enzimlerdir. Peptitlerin sindirimi, diğer enzimlerin aktivasyonu, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, hücre farklılaşması ve otofajiyi sağlamaktadır<sup>(5)</sup>. Parazitik organizmalarda bulunan sistein proteazlar, hücre/doku penetrasyonu, konak veya parazit proteinlerinin hidrolizi, otofaji ve konak

immün sisteminden kaçma veya immün sistemin modülasyonu sağlarlar. Bu nedenle, protozoan parazitlerin patogeneğinde kilit rol oynar ve onlara karşı kemoterapötik ilaç ve aşı hedefleri haline gelirler<sup>(5)</sup>.

*Cryptosporidium parvum* genomunda cryptopaini kodlayan beş gen (cathepsin L-benzeri proteazlar, CA klanının bir temsilcisi) tanımlanmıştır. Bugüne kadar yalnızca cryptopain-1'in biyokimyasal analizi gerçekleştirilmiştir<sup>(9)</sup>. Cryptopain-1, parazitin bulaşıcı aşaması olan sporozoitlerde aktif olarak kopyalanır ve ifade edilir<sup>(9)</sup>. Cryptopain-1, 1206 bp'lik bir diziden oluşan 401 amino asit tarafından kodlanan bir proteazdır. Cryptopain-1'in biyolojik rolü tam olarak bilinmemekle beraber muhtemel rolünün tespiti için immunofloresans analizleri yapılmaktadır. Cryptopain-1, konak hücre dışı matriks unsurları olan, fibronektin ve kollajeni hidrolize ettiği western blot analizi ile saptanmıştır. Konak hücre dışı matriks unsurlarını hidrolize edebilmesi, bu enzimin; konak hücre işgali sırasında önemli bir enzim olabileceğini düşündürmektedir<sup>(12)</sup>.

Proteazlar, tüm organizmalarda, biyolojik süreçlerinin çeşitli evrelerinde önemli roller oynamaktadırlar. Proteaz aktivitesi, çeşitli seviyelerde düzenlenmektedir. Aktivite, gen ekspresyonunun düzenlenmesinden, spesifik inhibitörlerin sentezine kadar uzanan aşamalarda düzenlenebilmektedir. *Cryptosporidium*'da bulunan

sistein proteaz olan *Cryptopain-1*'in, proteaz aktivitesi spesifik inhibitörü olan *cryptostatin* tarafından düzenlenmektedir. *Cryptostatin*, 537bp uzunluğunda ve 19.7 kDa büyüklüğünde 173 amino asit tarafından kodlanan küçük bir moleküldür. *Cryptostatin* *Cryptosporidium*'un hayat döngüsünde meront ve ookist evrelerinde görülmekte, hücre içi organellerde ya da membranlarda tam bir lokalizasyon olmadan dağılmış halde bulunmaktadır<sup>(14)</sup>. *Cryptostatin*; *Cryptopain-1* inhibe ettiği gibi, *papain*, insan katepsin B'ye ve insan katepsin L'ye karşıda inhibe edici aktivite göstermektedir<sup>(14)</sup>.

*Cryptopain-1*, en iyi pH 6.5'te aktivite gösterirken, geniş bir pH aralığında da (pH 5.5-7.0) aktivitesini kaybetmemektedir. Nötr pH'larda nispeten daha kararlı olan enzim, asidik koşullarda nispeten kararsız hale gelebilmektedir<sup>(24)</sup>. Tüm chagasin ailesi sistein proteazları ve inhibitörleri gibi *cryptopain* ve *cryptostatine*, kaynatma sonrasında bile özelliklerini koruyabilmektedir<sup>(24)</sup>. Çalışmamızda, maksimum proteaz ve proteaz inhibitörünün aktivitesi pH 6.5'te olurken, diğer pH değerlerinde de önemli bir aktivite kaybı gözlenmemiştir. Yine maksimum proteaz ve proteaz inhibitörünün aktivitesi 37°C'de görülürken, elde edilen rekombinant ürün 56°C ve 95°C'de de aktivitesini sürdürmüştür. Üründe termal ve pH stabilitesinin olması enzimin saha koşullarında yaygın olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır.

Sistein proteazlar, dokunun yapısal proteinleri olan laminin, kollajen, fibronektin yapısal bütünlüğünü bozabilmektedirler. Sistein proteazların bu özelliklerinden dolayı debridman olarak kullanılma potansiyelleri de mevcuttur. Çalışmamızda rekombinant olarak üretilen, *Cryptopain-1*'in jelatin parçalaması elde edilen ürünün debridman olarak kullanılma potansiyelini göstermektedir.

Parazitlere ait olan sistein proteazların, rekombinant üretimi ve etkilerinin değerlendirilmesi çalışmaları oldukça azdır. Yapılan çalışmalar, bu enzimlerin biyokimyasal yapısı ve özellikleri üzerinedir. Bu çalışmalarda, bu enzimlerin olası kemoterapötik ajanlar olabileceği hususuna değinilmiştir.

*Cryptosporidium parvum*'un spesifik bir tedavisi ve onaylanmış ticari bir aşısı bulunmamaktadır. Hastalığın tedavisinde kullanılabilecek tam etkin bir ilaç yoktur<sup>(25)</sup>. Sistein proteazlar parazitik organizmalar için aşı olabileme potansiyeline sahiptir. Sistein proteaz inhibitörleri de söz konusu bu organizmalar için etkili kemoterapik ajanlar olarak ön plana çıkmaktadır. Branquinho ve ark.'nın<sup>(26)</sup> 2013 yılında ve Chavez-Fumagalli ve ark.'nın<sup>(27)</sup> 2017 yılında yaptıkları çalışmalarda *Leishmania* türlerinde bulunan kalsiyum bağımlı sistein proteaz türevi calpainin insanda *Leishmania* türlerine karşı potansiyel ilaç ve aşı hedefi olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Ndao ve ark.<sup>(28)</sup> 2013 yılında yaptıkları çalışmada; sentetik *cryptopain* inhibitörü olan N-methyl piperazine-Phe-homoPhe-vinylsulfone phenyl (K11777) fare modellerinde kullanmış ve kriptosporidioze karşı potansiyel ilaç olma potansiyelini araştırmışlardır. K11777 in vivo ve in vitro ortamlarda herhangi bir toksik etki göstermemiş, buna ek olarak ookist sayısında belirgin bir azalma sağlanmıştır. Rekombinant olarak üretimini gerçekleştirdiğimiz *Cryptopain-1*'in aşı, *Cryptostatin*'in ise enfeksiyonun tedavisinde kullanılma potansiyellerinin olduğu düşünülmektedir.

**Etik Kurul Onayı:** Bu araştırma, Adnan Menderes Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından (22.08.2017 tarih ve 082 sayı) onaylanmıştır.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

**Finansman:** Yoktur/bildirilmemiştir.

**Ethics Committee Approval:** This research was conducted with the approval of Adnan Menderes University, Animal Research Local Ethics Committee (08.21.2017; 082).

**Conflict of Interest:** No conflict of interest was declared by the authors.

**Funding:** None/not declared.



## KAYNAKLAR

1. Tyzzer EE. *Cryptosporidium parvum* (Sp. Nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Arch Protist. 1912;26:394-412.
2. Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. Clin Microb Rev. 2004;17(1):72-97. <https://doi.org/10.1128/cmr.17.1.72-97.2004>
3. Fayer R. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis: General Biology. Fayer R, Xiao L, Boca Raton, editors. CRC Press; 2008:1-41.
4. Center for Disease Control and Prevention (CDC). Emergency Preparedness and Response. Atlanta, 1946. [<https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp#b>] (Erişim Tarihi: Ocak.2023).
5. Siqueira-Neto L, Debnath A, McCall LI, et al. Cysteine proteases in protozoan parasites. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12(8):e0006512. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006512>
6. Forney JR, Yang S, Healey MC. Protease activity associated with excystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. J Parasitol. 1996;82:889-92. <https://doi.org/10.2307/3284194>
7. Okhuysen PC, Chappell CL. *Cryptosporidium* virulence determinants - are we there yet? Int J Parasitol. 2002;32(5):517-25. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00356-3](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00356-3)
8. McKerrow JH, Rosenthal PJ, Swenerton R, Doyle P. Development of protease inhibitors for protozoan infections. Curr Opin Infect Dis. 2008;21(6):668-72. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328315cca9>
9. Na BK, Kang JM, Cheun HI, et al. Cryptopain-1, a cysteine protease of *Cryptosporidium parvum*, does not require the pro-domain for folding. Parasitology. 2009;136(2):149-57. <https://doi.org/10.1017/S0031182008005350>
10. Nesterenko MV, Tilley M, Upton SJ. A metallo-dependent cysteine proteinase of *Cryptosporidium parvum* associated with the surface of sporozoites. Microbios. 1995;83(335):77-88.
11. Na BK, Kang JM and Sohn WM. CsCF-6, a novel cathepsin F-like cysteine protease for nutrient uptake of *Clonorchis sinensis*. Int J Parasitol. 2008;38(5):493-502. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.001>
12. Kang JM, Ju HL, Yu JR, Sohn WM, Na BK. Cryptostatin, a chagasin-family cysteine protease inhibitor of *Cryptosporidium parvum*. Parasitology. 2012;139(8):1029-37. <https://doi.org/10.1017/S0031182012000297>
13. Ash LR, Orihel TC. Parasites: a guide to laboratory procedures and identification. Chicago (IL): American Society of Clinical Pathologists Press, USA; 1987.
14. Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. Appl Environ Microbiol. 1999;65(4):1578-83. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.4.1578-1583.1999>
15. Sambrook J, Fritsch ER, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4th ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA; 2012.
16. Bio-Rad Laboratories, Inc. California, 1952. [<https://www.bio-rad.com/en-tr/applications-technologies/affinity-purification-tagged-recombinant-proteins?ID=LUSMKU2B7>] (Erişim Tarihi: Ocak.2023).
17. Kanemitsu K, Nishino T, Kunishima H, Okamura N, Takemura H, Yamamoto H. Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci. J Microbiol Methods. 2001;47(1):11-6. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(01\)00283-4](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(01)00283-4)
18. Morgan U, Weber R, Xiao L, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. J Clin Microbiol. 2000;38(3):1180-3. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.3.1180-1183.2000>
19. Clark DP. New insights into human cryptosporidiosis. Clin Microbiol Rev. 1999;12(4):554-63. <https://doi.org/10.1128/cmr.12.4.554>
20. Pedraza Díaz S, Amar C, Nichols GL, McLauchlin J. Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst Wall protein gene. Emerg Inf Dis. 2001;7(1):49-56. <https://doi.org/10.3201/eid0701.700049>
21. Maddox-Hyttel C, Langkjaer RB, Enemark HL, Vigre H. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs-occurrence and management associated risk factors. Vet Parasitol. 2006;141(1-2):48-59. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.032>
22. Gündüz N, Arslan MÖ. Kars yöresinde buzağılarda *Cryptosporidium* enfeksiyonları prevalansinin asit fast boyama (mAF) ve ELISA yöntemleriyle belirlenmesi. Türkiye Parazit Derg. 2017;41(1):5-8. <https://doi.org/10.5152/tpd.2017.4833>
23. Chen Y, Huang J, Qin H, Wang L, Li J, Zhang L. *Cryptosporidium parvum* and gp60 genotype prevalence in dairy calves worldwide: a systematic review and meta-analysis. Acta Trop. 2023;240:106843. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106843>

24. Rigden DJ, Mosolov VV, Galperin MY. Sequence conservation in the chagasin family suggests a common trend in cysteine proteinase binding by unrelated protein inhibitors. *Protein Sci.* 2002;11(8):1971-7. <https://doi.org/10.1110/ps.0207202>
25. Zhu G, Fritzler JM. Novel anti-*Cryptosporidium* activity of known drugs identified by high-throughput screening against parasite fatty acyl-CoA binding protein (ACBP). *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(3):609-17. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr516>
26. Branquinha MH, Marinho FA, Sengenito LS, et al. Calpains: Potential targets for alternative chemotherapeutic intervention against human pathogenic trypanosomatids. *Curr Med Chem.* 2013;20(25):3174-85. <https://doi.org/10.2174/0929867311320250010>
27. Chavez-Fumagalli MA, Schneider MS, Lage DP, Machado-de- Avila RA, Coelho EAF. An in silico functional annotation and screening of potential drug targets derived from *Leishmania spp.* hypothetical proteins identified by immunoproteomics. *Exp Parasitol.* 2017;176:66-74. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.03.005>
28. Ndao M, Nath-Chowdhury M, Sajid M, et al. A cysteine protease inhibitor rescues mice from a lethal *Cryptosporidium parvum* infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(12):6063-73. <https://doi.org/10.1128/AAC.00734-13>