

HEPATİT B VİRUSU KOR ANTİJENİ GEN BÖLGESİNİN MAYADA EKSPRESYONU*

EXPRESSION OF HEPATITIS B VIRUS CORE ANTIGEN GENE REGION IN YEAST CELL

Mehmet YAPAR¹, Kenan ŞENER¹, Orhan BEDİR², Ertan ALTAYLI³, Ayhan KUBAR¹

¹ Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji Bilim Dalı, Ankara. (tabipks@yahoo.com)

² Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

³ Türk Silahlı Kuvvetleri Sağlık Komutanlığı, Ankara.

ÖZET

Bu çalışmada, hepatit B virusu (HBV) enfeksiyonlarının tanı ve izleminde önemli bir serolojik belirleyici olan anti-HBc testinde kullanılan gerekli proteini elde etmek amacıyla, HBV kor antijeni gen bölgesinin rekombinant DNA teknolojisi ile ökaryotik ekspresyon vektörüne yerleştirilmesi planlanmıştır. Çalışmada HBV DNA'sı pozitif hasta serumları kullanılmış ve HBc antijenini kodlayan genin primerleri dizayn edilerek, HBcAg gen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır. Daha sonra "Invisorb Spin Rapid PCR Kit" (Invitex, Almanya) ile saflaştırılan ampikonlar, TOPO® TA ekspresyon kiti (Invitrogen, ABD) ile pYES2.1 plazmidine klonlanmış ve bu plazmid CaCl₂ yöntemiyle kompetan bakteriye (TOPO 10F' *Escherichia coli*) transforme edilmiştir. Kompetan bakteri, ampisilinli LB (Lysogeny Broth) agarda çoğaltıldıktan sonra "pYES2.1 + HBcAg" plazmidini izole edilmiş ve "S.c. EasyComp transformasyon kiti" (Invitrogen, ABD) ile *Saccharomyces cerevisiae*'ya transforme edilmiştir. Son aşamada, HBcAg'nin maya tarafından eksprese edildiği "in house" ELISA yöntemiyle doğrulanmıştır. Ülkemizde hepatit B'nin serolojik tanısında kullanılan kitlerin büyük çoğunluğunun ithal ürünler olduğu ve bu durumun ülke ekonomisine getirdiği yük dikkate alındığında, bu ve benzeri çalışmalarla elde edilen deneyim ve bilgi birikiminin, kendi öz kaynaklarımızla elde edilecek ürünlere dönüşmesinde önemli katkısı olacağı düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Hepatit B virusu, kor antijeni, klonlama, gen ekspresyonu.

ABSTRACT

In this study, the core antigen (HBcAg) gene region of hepatitis B virus (HBV) was transformed and expressed into an eukaryotic expression vector by recombinant DNA technology in order to obtain the protein used in anti-HBc tests which is being one of the most important marker for the serodiagnosis of HBV infections. For this purpose, HBV-DNA positive patient sera were used as the source of viral nucleic acids, and the primers coding HBcAg gene region have been designed. After the amplification of HBcAg gene region by polymerase chain reaction (PCR), the amplicons purified by Invisorb Spin Rapid PCR Kit"

* Bu çalışma TÜBİTAK 1007 Programındaki 105G056 (KP-GR-01) projesi kapsamında yer alan bir çalışma olarak desteklenmiştir.

(Invitex, Germany), were cloned to pYES2.1 plasmid via the TOPO® TA expression kit (Invitrogen, USA) and this plasmid was transformed to competent bacteria (TOPO 10F' *Escherichia coli*) by CaCl_2 method. After competent bacteria were grown on LB (Lysogeny Broth) agar media supplemented with ampicillin, the plasmid "pYES2.1 + HBcAg" were isolated and transformed to *Saccharomyces cerevisiae* via the "S.c. EasyComp Transformation Kit" (Invitrogen, USA). Finally, the expression of HBcAg by the yeast was confirmed with the use of in house ELISA method. Since the diagnostic kits used in our country for hepatitis B serology are usually imported products, this creates a great economical burden. Thus, the experience and knowledge that builds up following such studies will help to produce our own diagnostic products using our equity.

Key words: Hepatitis B virus, core antigen, cloning, gene expression.

GİRİŞ

Tedavisi problemlili olan hepatit B enfeksiyonunun tanımlanmasında, tedavinin takibinde ve immünizasyon ile ilgili konularda, öncelikle bu virusa ait antijenler ve enfekte kişide bunlara karşı oluşan antikorlar belirleyici olarak kullanılmaktadır. Bu belirteçlerin en önemlilerinden birisi, hepatit B virusu (HBV) genomunun C gen bölgesinden kodlanan HBcAg (hepatitis B core antigen)'dir. Eğer sentez kor bölgesindeki başlangıç kodonundan başlarsa yaklaşık 183 aminoasitlik bir polipeptid (HBcAg) ortaya çıkmaktadır¹. HBV'nin pratikte üretilmesi mümkün olmadığından, bu antijenik yapıların elde edilmesinde daha ziyade rekombinant DNA teknolojisi kullanılmaktadır. Bu teknoloji sayesinde HBV'nin antijenik proteinleri değişik sistemlerde ekspresyon yoluyla bol miktarda üretilmektedir².

Bu çalışmada, HBcAg gen bölgesinin rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak pYES2.1 TOPO TA ökaryotik ekspresyon vektörüne yerleştirilmesi ve kor proteinin elde edilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada, HBcAg amplikonlarının elde edilmesi amacıyla HBV DNA'sı pozitif hasta serumları kullanıldı. HBcAg gen bölgesi, daha önce tanımlandığı şekilde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile çoğaltıldı³. "Sense" primer (1899. baz) olarak 5' gcattg-gacattgacccttataaagaatttg 3' dizisi ve "antisense" primer (2457. baz) olarak 5' agtttcc-caccttatgagtccaagg 3' dizisi kullanıldı. PCR sonrası elde edilen amplikonlar "Invisorb Spin Rapid PCR Kit" (Invitex, Almanya) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda saflaştırıldı.

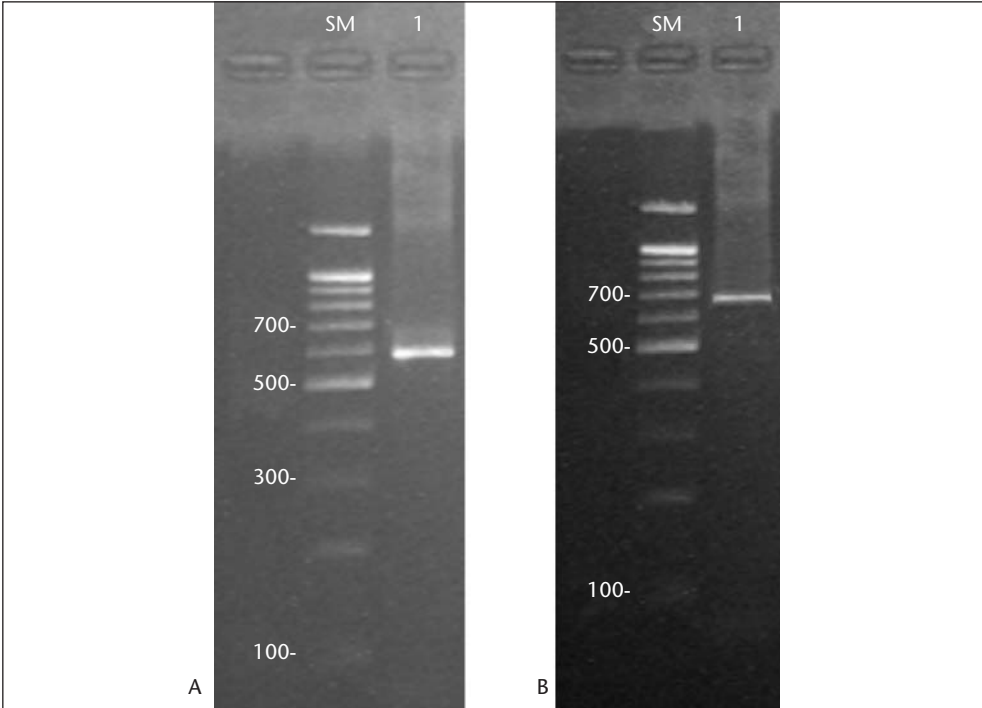
HBcAg gen bölgesine ait amplikonları, plazmid vektörüne klonlamak için "pYES2.1 TOPO TA" ekspresyon kiti (Invitrogen, ABD) kullanıldı⁴. Elde edilen rekombinant vektör CaCl_2 metodu ile hazırlanan kompetan bakteriye (TOPO 10F' *Escherichia coli*) transforme edildi ve bu bakteriler 100 µg/ml ampicilin içeren LB (Lysogeny Broth; Difco) agar plaklarına ekildi. İnkübasyon sonrası üreyen kolonilerden "Plasmid Mini Kit" (Qiagen, Almanya) kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda yoğun plazmid izolasyonu yapıldı. Bu plazmidlere pYES 2.1 + HBcAg adı verildi ve HBcAg gen bölgesine ait amplikonların klonlama bölgelerine girip girmediği üretici firma önerilerine göre kontrol edildi.

Ekspresyon vektörü olarak kompetan *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri kullanıldı. YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) sıvı besiyerine ekilen mayalar, OD₆₀₀ değeri 1 olana kadar 30°C’de inkübe edildi. Daha sonra “S.c. EasyComp Transformation” (Invitrogen, ABD) kitinin kullanma kılavuzuna göre hazırlanan kompetan maya hücrelerine transformasyon yapıldı ve urasil içermeyen besiyeri plaklarında (SC-U besiyeri) üreyen koloniler transformant olarak değerlendirildi⁵.

Sıvı indüksiyon besiyerinde üreyen mayaların parçalanması daha önce tanımlanan şekilde yapıldı⁶. HBcAg ekspresyonunun kontrolü amacıyla, HBcAg antijeni ile kaplı 96 çukurlu mikropaklar hazırlanarak “in house” ELISA yöntemi uygulandı⁷. Hazırlanan plaklar, antijen tespiti için kullanılan herhangi bir ticari ELISA kitindeki solüsyonlar kullanılarak anti-HBc pozitif olduğunu bilinen hasta serumuyla işleme alındı. Negatif kontrol olarak anti-HBc negatif hasta serumu kullanıldı.

BULGULAR

HBV DNA’sı pozitif hasta serumlarından HBcAg gen bölgesini hedefleyen primerlerle yapılan PCR işlemi sonrasında, agaroz jelde 583 baz çifti (bç) ile uyumlu bölgede ampliconlara ait bant görüntüsü elde edilmiştir (Resim 1A). Bu ampliconların ekspresyon vektörüne yerleştirilmesiyle elde edilen pYES2.1 + HBcAg plazmidlerinin kontrolü için yapı-



Resim 1. A. HBcAg gen bölgesi primerleri ile yapılan PCR sonrası jel görüntüsü (SM: Büyüklük belirteci; Hat 1: 583 bç ile uyumlu amplicon), **B.** pYES2.1 + HBcAg plazmid kontrolü için yapılan PCR jel görüntüsü (SM: Büyüklük belirteci; Hat 1: 687 bç ile uyumlu amplicon).

lan PCR işlemi sonrasında, agaroz jel elektroforezinde beklendiği gibi 687 bp ile uyumlu bölgede ampliconlara ait bant görüntüsü saptanmıştır (Resim 1B).

Mayalarda HBcAg ekspresyonunun kontrolü için yapılan ELISA testinde, negatif kontrollere göre yaklaşık 50 katı değerinde pozitif sonuçlar elde edilmiştir.

TARTIŞMA

HBV'nin kültürde üretilmemesi ve deneysel hayvan modellerinin kısıtlı olması nedeniyle bu virusa ait çalışmalar sıklıkla rekombinant DNA teknolojisi ile yapılmaktadır. HBV'nin kodladığı pek çok gen ürünü gerek klonlama gerekse ekspresyon vektörleri kullanılarak çoğaltılabilmekte ve uygun sistemlerde bu gen ürünlerinin ekspresyonu mümkün olabilmektedir. Ekspresyon için prokaryotik veya ökaryotik sistemler kullanılmaktadır. Ancak prokaryotlarda ekspresyon sonrası posttranslasyonel modifikasyonların kısıtlı olması nedeniyle daha çok ökaryotlar tercih edilmektedir⁸⁻¹⁰. Bu çalışmada da HBV kor antijen gen bölgesinin pYES2.1 TOPO® TA ekspresyon vektörüne klonlanması ve maya hücrelerine (*S.cerevisiae*) transforme edilerek eksprese edilmesi sağlanmıştır.

Bu konuda ülkemizde de yapılmış çeşitli çalışmalar mevcuttur ve bunlar konu ile ilgili bilgi birikiminin artması yönüyle önemli çalışmalardır^{3,11-13}. Gerek kısıtlı kaynaklarla çalışılması, gerekse çok merkezin ve farklı deneyimlerin bir araya getirilmesindeki zorluklar nedeniyle bu çalışmaların ülke ekonomisine katkı sağlayacak ürünlere dönüşmesi kısıtlı olmuştur.

Hepatit B enfeksiyonu ile ilgili testler, gerek tanı gerekse tarama amaçlı olarak hem tedavi merkezlerinde hem de kan bankacılığında olmak üzere pek çok sağlık ünitesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu konuda kullanılan serolojik ve moleküler testlerin büyük çoğunluğunu ithal ürünler oluşturmaktadır. Bu durumun ülke ekonomisine getirdiği yük göz önüne alındığında, sahip olunan bilgi birikiminin, literatüre katkıda bulunma çabası yanında kendi öz kaynaklarımızla elde edilecek ürünlere dönüşmesinde de kullanılması gerekliliği ortadadır. HBV'ye yönelik tanı kitlerinin geliştirilmesi amacıyla planlanmış çok merkezli bir projenin parçası olan bu çalışmanın, yukarıda sözü edilen nedenlerden dolayı önemli olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Badur S. Hepatit A, B ve D virusları, s: 175-202. Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S (ed), Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. 2004, Güneş Kitabevi, Ankara.
2. Seeger C, Zoulim F, Mason WS. Hepadnaviruses, pp: 1253-304. In: Knipe DM, Howley PM (eds), Fields Virology. 2007, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, New York.
3. Yapar M, Guney C, Basustaoglu AC, Kubar A. Expression of hepatitis B "e" antigen gene in *Escherichia coli*. Mikrobiyol Bul 2001; 35: 273-8.
4. pYES2.1 TOPO® TA Expression Kit. Five-minute cloning of *Taq* polymerase-amplified PCR products for regulated expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Catalog no. K4150-01. Invitrogen, USA.
5. Guthrie C, Fink GR. Guide to yeast genetics and molecular biology. In: Abelson JN, Simon MI (eds), Methods in Enzymology. 1991, Vol. 194. Academic Press, San Diego, CA.
6. Saracli MA, Sener K, Gonlum A, Yildiran ST, Wickes BL. Genotyping of clinical *Rhodotorula mucilaginosa* isolates by pulsed field gel electrophoresis. Mycoses 2003; 46: 487-91.

7. McCubbin V, Frank MB. Detection of recombinant proteins by ELISA. In: Frank MB (ed), Molecular Biology Protocols. 1997. Oklahoma City. <http://omrf.ouhsc.edu/~frank/elisa.html> Erişim tarihi: 16.06.2008 (Revision Date: October 2, 1997).
8. Imamura T, Araki M, Miyanohara A, et al. Expression of hepatitis B virus middle and large surface antigen genes in *Saccharomyces cerevisiae*. J Virol 1987; 61: 3543-9.
9. Kniskern PJ, Hagopian A, Montgomery DL, et al. Unusually high level expression of foreign gene (hepatitis B virus core antigen) in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 1986; 46: 135-41.
10. MacLachlan A, Milich DR, Raney AK, et al. Expression of hepatitis B virus surface and core antigens: influences of pre-S and precore sequences. J Virol 1987; 61: 683-92.
11. Kubar A, Yapar M, Ozyurt M, Haznedaroglu, Gun H. Cloning of hepatitis B virus surface gene region to *Escherichia coli*. FLORA 1988; 3: 183-6.
12. Yapar M, Guney C, Saracli MA, Kilic A, Kubar A. Expression of HBsAg gene in insect (*Trichoplusia ni*) cell culture. FLORA 2001; 6: 108-13.
13. Bulut Y, Ozdarendeli A, Doymaz MZ, Asci TZ. Cloning of the core antigen (HBcAg) gene of hepatitis B virus into an eukaryotic expression vector. FLORA 2003; 8: 144-7.