

# HBeAg gen bölgesinin *Saccharomyces cerevisiae*'da ekspresyonu

Mehmet Yapar (\*), Kenan Şener (\*), Orhan Bedir (\*\*), Ertan Altaylı (\*\*\*), Ayhan Kubar (\*)

## ÖZET

HBeAg/anti-HBe serokonversiyonu hepatit B enfeksiyonlarının tanısında sık kullanılan göstergelerden birisidir. Bu çalışmada serolojik testlerde kullanılan HBeAg proteinini elde etmek amacıyla hepatit B virüsü (HBV) "e" antijen gen bölgesi *Saccharomyces cerevisiae*'ya aktarıldı ve eksprese ettirildi. Bunun için öncelikle HBeAg gen bölgesi PCR yöntemiyle çoğaltıldı. Daha sonra amplikonlar TOPO® TA ekspresyon kiti ile pYES2.1 plazmidine klonlandı ve kompetan bakteriyeye (TOPO 10F' *Escherichia coli*) transforme edildi. Ampisilinli LB agarda çoğaltılan kompetan bakteriden pYES2.1+HBeAg plazmidini izole edildi ve S.c. EasyComp transformasyon kitiyle *Saccharomyces cerevisiae*'ya transforme edildi. Son olarak, HBeAg'nin maya tarafından eksprese edilip edilmediği iki farklı otomatize sistem aracılığıyla kontrol edildi. Elde edilen HBeAg üreten maya hücreleri sonraki çalışmalarda üretilen proteinlerin pür olarak elde edilmesine imkan sağlayabilir.

Anahtar kelimeler: *Gen ekspresyonu, HBeAg, klonlama*

## SUMMARY

**Expression of HBeAg gene region in *Saccharomyces cerevisiae***  
HBeAg/anti-HBe seroconversion is one of the markers frequently used in the diagnosis of hepatitis B infection. In this study, the "e" antigen gene region of the hepatitis B virus (HBV) was transformed to *Saccharomyces cerevisiae* and expressed by the yeast in order to obtain HBeAg protein used in serologic tests. Firstly, HBeAg gene region was amplified by PCR method. Later, the amplicons were cloned into the plasmid pYES2.1 via the TOPO® TA expression kit and transformed into the competent bacteria (TOPO10F' *Escherichia coli*). The plasmid pYES2.1+HBeAg was isolated from the competent bacteria, which was cultivated on LB media supplemented with ampicillin, and transformed to *Saccharomyces cerevisiae* via the S.c. Easy-Comp Transformation Kit. Finally, whether HBeAg was expressed by the yeast was checked through two different automatized systems. HBeAg producing yeast cells obtained may render it possible to purely isolate proteins in future studies.

Key words: *Gene expression, HBeAg, cloning*

## Giriş

Hepatit B virüsü (HBV) üzerinde, tanımlandığı günden bu yana çok yoğun çalışmalar yapılmıştır ve geliştirilen serolojik yöntemler ile bu virüsün neden olduğu enfeksiyonların tüm dünyada ne denli yaygın olduğu ortaya konmuştur. Günümüzde çoğunluğu gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere 350 milyondan fazla insanın HBV taşıyıcısı olduğu tahmin edilmektedir (1,2). Taşıyıcılığın belirlenmesinde kullanılan serolojik göstergeler hepatit B virüsünün yüzey antijeni (HBsAg) iken, buna eşlik eden hepatit B virüs "e" antijen (HBeAg) varlığı genellikle virüsün aktif replikasyonu olarak kabul edilmektedir (1). HBeAg varlığı genç taşıyıcılarda yetişkin taşıyıcılara göre daha yüksek iken, anti-HBe prevalansı ise yaşla birlikte artış göstermektedir (2).

HBV genomunun kor bölgesine ait iki açık okuma bölgesi ("Open Reading Frame"; ORF) bulunmaktadır ve eğer sentez Pre-C kısmında yer alan Adenin Urasil Guanin (AUG) başlangıç kodonundan başlarsa 212 amino asidlik bir translayon ürünü ortaya çıkmaktadır ve bu ürün HBeAg'nin öncülü (p25) olan bir moleküldür (1,2). Akut olgularda serumda HBeAg, HBsAg ile hemen hemen aynı dönemde belirir ve HBsAg'den önce kaybolur. HBeAg'nin kaybolması ve özellikle spesifik antikoru olan anti-HBe'nin ortaya çıkması (HBeAg/Anti-HBe serokonversiyonu) hastalığın iyileşmeye doğru gittiğinin kanıtı olarak kabul edilmektedir (1). Hem HBeAg, hem de anti-HBe serolojik yöntemlerle saptanabilmektedir. Hepatit B virüsünün üretilmesi pratikte mümkün olmadığından, antijenik yapıların elde edilmesinde daha çok rekombinant DNA teknolojisi kullanılmaktadır. Bu teknoloji sayesinde HBV'nin antijenik proteinleri değişik sistemlerde ekspresyon yoluyla bol miktarda üretilebilmektedir (3).

Bu çalışmada HBV DNA'sı pozitif hasta serumlarından PCR yöntemiyle çoğaltılan HBeAg gen bölgesinin pYES2.1 TOPO TA ökaryotik ekspresyon vektörüne yerleştirilerek bu antijeni eksprese edecek maya hücrelerine transformasyonu amaçlandı.

\* GATF Viroloji Bilim Dalı

\*\* GATF Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

\*\*\*TSK Sağlık Komutanlığı

Aynı basım isteği: Dr. Kenan Şener, GATF Viroloji Bilim Dalı,

Etilik-06018, Ankara

E-mail: tabipks@yahoo.com

## Gereç ve Yöntem

*HBeAg gen bölgesinin elde edilmesi:* Klonlanacak PCR ürünlerinin elde edilebilmesi amacıyla HBeAg'ye özgü primerlerin dizaynı, GenBank'ta bulunan HBV komple genom dizilerinden 97 tanesi referans alınarak kendi yazılımımız olan OligoYap 4.0 isimli bilgisayar programı aracılığıyla hazırlandı (4). HBeAg için "sense" primer (1812. baz) olarak 5' CCATGCAACTTTTTTCACCTCTGCC 3' ve "antisense" primer (2457. baz) olarak 5' AGTTTCCCACCTTATGA GTCCAAGG 3' dizileri tespit edilerek sentezlettiler (MWG, Almanya). Rutin tanı laboratuvarımızda HBV yönünden pozitif bulunan hasta serumlarından elde edilen DNA'lar kullanılarak PCR işlemi daha önce tanımlandığı şekilde yapıldı (5). PCR sonrası yapılan agaroz jel elektroforezinde elde edilen ampliconlara ait bantlar jelden kesilerek "Invisorb Spin Rapid PCR Kit" (Invitrogen-Almanya) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda pürifiye edildi.

*Ekspresyon vektörünün hazırlanması ve kompetan bakteriye aktarılması:* HBeAg gen bölgesine ait PCR ürünlerinin plazmid vektörüne klonlanması için pYES2.1 TOPO TA ekspresyon kiti (Invitrogen, ABD) kullanıldı. Üretici firma önerileri doğrultusunda PCR ampliconundan 4 µl, tuz solüsyonundan 1 µl, TOPO vektöründen 1 µl karıştırılıp oda ısısında 5 dakika bekletildi. Elde edilen rekombinant vektör CaCl<sub>2</sub> metodu ile hazırlanan kompetan bakteriye (TOPO 10F' *Escherichia coli*) transforme edildi (6). Transformasyon sonrası bakteriler 100 µg/ml ampisilin içeren LB (Luria Bertni) agar [%1 tryptone (Merck/Almanya), %0.5 yeast extract (Difco/ABD), %1 NaCl (Merck/Almanya), 15 gr/lit agar (Difco/ABD)-steril distile su içinde] plaklara yayılarak ekildi. İnkübasyon sonrası üreyen kolonilerden Plasmid Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak, üretici firma önerileri doğrultusunda yoğun plazmid (120 µg/ml) izolasyonu yapıldı. Bu plazmidlere pYES 2.1+HBeAg adı verildi. HBeAg gen bölgesine ait PCR ürünlerinin klonlama bölgelerine girip girmediğini kontrol etmek için, "sense" primer vektör üzerindeki "GAL1 forward priming site" alanından, "antisense" ise amplicon üzerinden seçilerek, kit kullanma kılavuzunda belirtilen reaksiyon koşullarında PCR işlemi yapıldı.

*Ekspresyon vektörünün kompetan mayaya transformasyonu:* Bu işlem için S.c. EasyComp Transformation Kit (Invitrogen, ABD) kullanıldı. Önce *Saccharomyces cerevisiae*'ya ait tek koloni YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) [%1 yeast extract (Difco/ABD), %2 pepton (Merck/Almanya), %1 glukoz (Sigma/Almanya)-steril distile su içinde] sıvı besiyerine ekildi ve spektrofotometrik olarak ölçülen 600 nm dalga boyundaki optik dansite (OD<sub>600</sub>) değeri 1 olana kadar 30 °C'de inkübe edildi (7). Daha sonra kitin kullanma kılavuzunda belirtildiği şekilde, hazırlanan kompetan maya hücrelerine transformasyon işlemi yapıldı ve maya hücre-

leri urasil içermeyen SC-U besiyeri (Urasil içermeyen SC besiyeri) [%0.67 yeast nitrojen base (Invitrogen/ABD), %2 glukoz (Sigma/Almanya), %0.01 adenin-arjinin-sistein-lösin-lizin-treonin-triptofan (Sigma/Almanya), %0.005 aspartat-histidin-izolösin-metionin-fenilalanin-prolin-serin-tirozin-valin (Sigma/Almanya), %2 agar (Difco/ABD)-steril distile su içinde] plaklarına ekilerek 30 °C'de inkübe edildi. Normalde urasil geni olmayan mayalar bu ortamda üreyemezken, vektörü alan mayalar vektör üzerindeki urasil geni sayesinde bu ortamda üreyebildi. Bu nedenle üreyen koloniler transformant olarak değerlendirildi (7). Transformantlar %20 galaktoz (Sigma/Almanya) içeren sıvı indüksiyon besiyerine ekildi. Vektör üzerinde bulunan GAL1 promoteri sayesinde besiyerindeki galaktoz transkripsiyonu indükledi ve üreyen mayalar, klonlanmış geni eksprese edebildi (8).

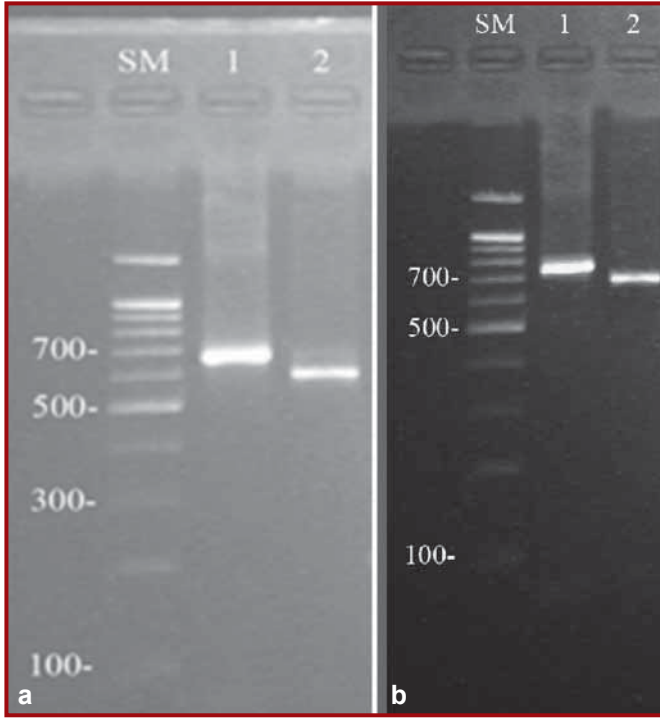
*HBeAg ekspresyonunun kontrolü:* Sıvı indüksiyon besiyerinde üreyen mayaların parçalanması daha önce tanımlanan şekilde yapıldı (9). HBeAg antijeninin maya tarafından eksprese edilip edilmediğini araştırmak için parçalanmış maya ekstresi 3000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı başka bir tüpe alınarak 1000 kat sulandırıldı ve rutin hepatit tanı laboratuvarımızda bulunan mikropartikül enzim immünassay prensibiyle çalışan Abbott AxSYM System (Abbott/Almanya) ve kemiluminesen mikropartikül immünassay prensibiyle çalışan Architect i2000 SR (Abbott/Almanya) isimli iki farklı otomatize cihazda HBeAg varlığı yönünden test edildi.

## Bulgular

HBeAg primerleriyle yapılan PCR işlemi sonrasında agaroz jelde 670 bp ile uyumlu bölgede ampliconlara ait bant görüntüsü elde edildi (Şekil 1a). Bu ampliconların ekspresyon vektörüne yerleştirilmesiyle elde edilen pYES2.1+HBeAg plazmidinin kontrolü için yapılan PCR işlemi sonrasında agaroz jel elektroforezinde beklendiği gibi 774 bp ile uyumlu bölgede ampliconlara ait bant görüntüsü elde edildi (Şekil 1b). Rutin hepatit seroloji laboratuvarımızda kullanılan Abbott AxSYM System (Abbott/Almanya) ve Architect i2000 SR (Abbott/Almanya) cihazları ile parçalanmış mayaların bulunduğu solüsyonda HBeAg varlığı araştırıldı ve her iki cihazda da reaktif (>1000 mIU/ml), yani pozitif sonuçlar elde edildi.

## Tartışma

Hepatit B virüsüyle ilgili çalışmalar daha çok rekombinant DNA teknolojisi üzerinde yoğunlaşmıştır. Hepatit B virüsünün kodladığı antijenlerin hem klonlama hem de ekspresyon vektörleri kullanılarak çoğaltılması mümkündür. Klonlanan gen bölgelerine ait transkripsiyon ürünlerinin ekspresyonu için prokaryotik



**Şekil 1. a.** HBeAg gene bölgesi primerleri ile yapılan PCR sonrası jel görüntüsü (SM: Size marker, Yol 1: 670 bp ile uyumlu ampikon) **b.** pYes2.1+HBeAg plazmid kontrolü için yapılan PCR jel görüntüsü (SM: Size marker, Yol 1: 774 bp ile uyumlu ampikon)

veya ökaryotik sistemler kullanılmaktadır. Ancak prokaryotik sistemlerde ekspresyon sonrası posttranslasyonel modifikasyonlar kısıtlıdır. Bu nedenle daha çok ökaryotlar tercih edilmektedir (10-12). Bu çalışmada da hepatit B virus "e" antijen gen bölgesinin pYES2.1 TOPO® TA ekspresyon vektörüne klonlanması ve maya hücrelerine (*S.cerevisiae*) transforme edilerek ekspres edilmesi sağlandı.

Rekombinant DNA teknolojisi son 30 yıldır yoğun olarak kullanılan bir teknoloji olup, ülkemizde de yapılmış pek çok çalışma mevcuttur. Özellikle HBV ile ilgili yapılmış benzer çalışmalar vardır ve bunlar konu ile ilgili bilgi birikiminin artması yönüyle önemli çalışmalardır (5,11,12). Kaynakların kısıtlı olması ve farklı merkezlerdeki deneyimlerin bir araya getirilmesindeki zorluklar nedeniyle mevcut bilgi birikimlerinin tanı kitleri, aşı ve tedavi amaçlı ürünler gibi ülke ekonomisine hissedilir seviyede katkı sağlayacak ürünlere dönüşmesi kısıtlı olmuştur.

Hepatit B enfeksiyonu ile ilgili serolojik testler hem tanı, hem de tarama amaçlı olarak birinci basamak sağlık hizmeti veren kuruluşlar da dahil olmak üzere pek çok sağlık merkezinde ve kan bankacılığında oldukça sık kullanılmaktadır. Kullanılan serolojik ve moleküler testlerin büyük çoğunluğu ithal ürünlerdir ve ülke ekonomisine hatırı sayılır bir yük getirmektedir. Bu nedenle sahip olunan bilgi birikiminin literatüre katkı sağlama çabası yanında, kendi öz kaynaklarımızla elde edilecek ürünlere dönüşmesi için kullanılması ülkemiz

bilim insanları üzerine düşen bir görevdir. Bu çalışmanın, hepatit B enfeksiyonlarının tanısında kullanılacak serolojik ve moleküler tanı kitlerinin geliştirilmesi amacıyla planlanmış çok merkezli bir projenin parçası olması ve yukarıda sözü edilen nedenlerden dolayı önemli olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmanın klonlama ve ekspresyon ile ilgili pratik deneyimlerimizi artırdığı düşünülmektedir. Kullandığımız pYES2.1 TOPO® TA ekspresyon vektörü HBeAg gibi proteinlerin ekspresyonu için kullanımı kolay ve verimli bir vektör olarak değerlendirildi. Ekspresyonun bir ökaryot olan mayada yapılmış olması, elde edilecek proteinin tanısal amaçlı hazırlanacak kitlerde kullanılabilmesine imkan tanımaktadır. Sonuçta HBeAg üreten maya hücreleri elde edildi ve sonraki çalışmalarda üretilen proteinlerin pür olarak elde edilmesi planlanmaktadır.

### Kaynaklar

1. Badur S. Hepatit A, B ve D virusları. In: Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S (eds). Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 2004: 175-202.
2. Harrison TJ, Dusheiko GM, Zuckerman AJ. Hepatitis viruses. In: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Schoub BD, Griffiths PD, Mortimer P (eds). Principles and Practice of Clinical Virology. 6th ed. London: John Wiley & Sons Ltd, 2009: 273-319.
3. Seeger C, Zoulim F, Mason WS. Hepadnaviruses. In: Knipe DM, Howley PM (eds). Fields Virology. 5th ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 1253-1304.
4. Yapar M, Aydoğan H, Pahsa A, et al. Rapid and quantitative detection of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus by one step real-time reverse transcriptase PCR. Jpn J Infect Dis 2005; 58: 358-362.
5. Yapar M, Guney C, Basustaoglu AC, Kubar A. Expression of hepatitis B "e" antigen gene in Escherichia coli. Mikrobiyol Bul 2001; 35: 273-278.
6. <http://structure.biochem.queensu.ca/protocols/compcells.htm> (Son erişim tarihi: 17.03.2008)
7. 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. User manual.
8. Guthrie CC, Fink GR. Guide to yeast genetics and molecular biology. In: Abelson JN, Simon MI (eds). Methods in Enzymology. Vol. 194. San Diego: Academic Press, 1991.
9. Saracli MA, Sener K, Gonlum A, Yildiran ST, Wickes BL. Genotyping of clinical Rhodotorula mucilaginosa isolates by pulsed field gel electrophoresis. Mycoses 2003; 46: 487-491.
10. 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: 135-141.
11. Kubar A, Yapar M, Ozyurt M, Haznedaroglu T, Gun H. Cloning of hepatitis B virus surface gene region to Escherichia coli. Flora 1988; 3: 183-186.
12. Yapar M, Guney C, Saracli MA, Kilic A, Kubar A. Expression of HBsAg gene in insect (Trichoplusia ni) cell culture. Flora 2001; 6: 108-113.