

AKÜ FEMÜBİD 20 (2020) 011001 (1-9)

AKU J. Sci. Eng. 20 (2020) 011001 (1-9)

DOI:10.35414/akufemubid.576171

Araştırma Makalesi / Research Article

## ***Bordetella pertussis*'e Ait Varsayımsal Dış Zar Proteini D (BopD), Varsayımsal Dış Zar Proteini N (BopN), Lösin/İzolösin/Valin Bağlanma Proteini (LivJ) ve Tip 2 Fimbriya (Fim2)'nin Rekombinant Olarak İfade Edilmesi**

Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK<sup>1</sup><sup>1</sup>Akdeniz Üniversitesi, Faculty of Science, Department of Biology, 07070, Antalya.e-posta: burcutefon@akdeniz.edu.tr. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1690-9879>

Geliş Tarihi: 11.06.2019 ; Kabul Tarihi: 31.01.2020

### Öz

Boğmaca, gram-negatif *Bordetella pertussis* bakterisinin etken olduğu, akut, oldukça bulaşıcı bir solunum yolu hastalığıdır. Şiddetli, kasılganlı ve uzun süreli öksürük boğmacanın en tipik belirtisidir. En çok yeni doğarlarda görülen bu hastalığın bu yaş grubunda ölümlerle sonuçlanabildiği de bilinmektedir. Bu çalışmada, ileride aşı geliştirme araştırmalarında kullanılmak üzere, daha önce immünojenik olduğu bilinen Lösin/İzolösin/Valin bağlanma proteini, Tip 2 fimbriya (Fim2) ve *B. pertussis*'in patojenitesinde önemli yer tutan Tip3 salgılama sisteminin (TTSS) elemanları olan varsayımsal dış zar proteini D (BopD) ve varsayımsal dış zar proteini N (BopN) rekombinant olarak ifade edilmiştir. Proteinlere ait olan gen bölgeleri ilk olarak bir klonlama vektörü olan pGEM®-T Easy vektörüne klonlanmış ve *E. coli* DH5α hücrelerine transforme edilmiş, ardından pET-28a(+) ekspresyon vektörüne atılarak *E. coli* BL21(DE3)'de ekspresyonları yapılmıştır. Ekspresyonları yapılan proteinler His-tag kolonları kullanılarak saflaştırılmıştır. SDS poliakrilamid jellerde BopD ve Fim2 proteinlerinin beklenenden daha yüksek molekül ağırlığında bant verdiği görülmüştür. BopN ve BopD'nin ise indüklenmemiş örneklerde de kaçak protein olarak ifade edildiği belirlenmiştir. Patojenitede önemli yer tutan bu proteinlerin rekombinant olarak ekspresyonları koruyuculuklarının belirlenebilmesi, söz konusu proteinleri içeren aşı kombinasyonlarının denenmesi ve yeni füzyon proteinlerinin oluşturulması gibi patojene karşı aşı geliştirme çalışmalarında kullanılabilirliğini sağlaması açısından oldukça önem taşımaktadır.

### Anahtar kelimeler

*Bordetella pertussis*;  
BopD; BopN; LivJ; Fim2

## **Recombinant Expression of *Bordetella pertussis* Putative Outer Protein D (BopD), Putative Outer Protein N (BopN), Leucin/Isoleucine/Valin Binding Protein (LivJ) and Type 2 Fimbria (Fim2)**

### Abstract

Whooping cough (pertussis) is a contagious upper respiratory tract infection primary causative agent of which is gram-negative coccobacillus *Bordetella pertussis*. This disease, which may be fatal especially in infants, is characterized by repeated, violent coughing spasms caused by infection and may results in death. In this study, selected immunogenic proteins, namely Leucin/Isoleucin/Valin binding protein (LivJ), Fimbria type 2 (Fim2) and members of Type 3 Secretion System (TTSS) Putative Outer Protein D (BopD) and Putative Outer Protein N (BopN) expressed recombinantly. Genes of selected proteins were first cloned into pGEM®-T Easy vector and transformed to into *E. coli* DH5α cells, then cloned into the expression vector pET-28a(+) and transformed into *E. coli* BL21(DE3) cells to express the proteins. Expressed proteins were also purified by using His-tag columns. The molecular weights of the expressed BopD and Fim2 proteins were higher than expected on SDS-PAGE. Leakage was observed during BopD and BopN protein expression. Recombinant expression of these proteins, which take place in pathogenicity, is really important because of their potential as a vaccine candidate. After detection the

### Keywords

*Bordetella pertussis*;  
BopD; BopN; LivJ; Fim2

## 1. Giriş

Boğmaca daha çok yeni doğanlarda ve küçük çocuklarda, son zamanlarda ergen ve erişkinlerde görülen ciddi seyirli, akut bir solunum yolu hastalığıdır. Etkeni gram negatif bir patojen olan *Bordetella pertussis*'tir. Kızamıktan sonra en çok bildirimi yapılan hastalık olan boğmaca herhangi bir yaşta ortaya çıksa da genelde aşılammış çocuklarda özellikle 0-12 aylık bebeklerde birinci derecede ölüm nedenidir (Cherry and Heininger 2004). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yaptığı açıklamalara göre 2000 yılında dünyada yaklaşık 39 milyon boğmaca vakası görülmüş ve bunların yaklaşık 300.000'i ölümlle sonuçlanmıştır. Yine WHO'ya göre, 2008 yılında dünyada % 95'i gelişmiş ülkelerde olmak üzere görülen 16 milyon boğmaca vakasının 195.000'i ölümlle sonuçlanmıştır (Int. Kayn 1). 1970'li yıllarda başlayan dünya çapındaki aşılama kampanyaları hastalığın görülme sıklığını azaltsa da günümüzde bu aşılama programlarına dâhil ülkelerde bile boğmacanın yeniden ortaya çıkışıyla ilgili raporları görmek mümkündür. Gelişmekte olan ülkelerde boğmaca, aşı ile önlenemez ölüm nedenleri arasında ön sıralarda yer almaktadır (Crowcroft and Britto 2002, Berbers *et al.* 2009). Teşhiste kullanılan yöntemlerin gelişmesi, hastalıklarla ilgili farkındalıkların artması, patojenlerin adaptasyonu ve azalmış aşılama kapsamı gibi faktörler boğmacanın yeniden görülmesinde oldukça etkiliyken, asıl nedenin aşı kaynaklı bağışıklığın ergenlerde ve yetişkinlerde zamanla azalması olduğu düşünülmektedir (Mooi 2009, Tefon *et al.* 2011). Görülme sıklığının daha ileri yaşlara kayması, mevcut aşuların klinik etkinliğini arttırmak için koruyuculuğu yüksek yeni proteinlerin araştırılmasını ve üretilmesini oldukça önemli kılmaktadır. Tip 2 fimbriya (Fim2), patojenin epitel hücrelerinin hücre dışı matriksine bağlanmasında rol oynayan, birçok mikroorganizmada olduğu gibi *B. pertussis*'te de iyi bilinen ve hâlihazırdaki aşının bir bileşeni olarak da kullanılan bir proteindir (de Gouw 2011). Lösin/İzolösin/Valin bağlayıcı protein

(LivJ), periplazmik bağlayıcı proteinlerden biridir ve immünojenik aktivitesi daha önce fare ve insan serumu kullanılarak yapılan çeşitli immünoproteom çalışmalarında da gösterilmiştir (Zhu *et al.* 2010; Tefon *et al.* 2011, Tefon *et al.*, 2013). Dış zar proteini D (BopD) ve dış zar proteini N (BopN), birçok Gram-negatif patojenin virülans faktörlerini salgılamak için kullandığı Tip III Salgılama Sisteminin (TTSS) üyeleridir (Yuk *et al.* 2000). BopD, *B. bronchiseptica* ile enfekte olmuş hücrelerde sitotoksitenin ortaya çıkmasında görev alır. Tefon vd. (2011), BopD'nin Türkiye'de daha önce aşı üretiminde kullanılmış olan yerel izolat *B. pertussis* Saadet'te yüksek oranda ifade edildiğini göstermiştir. Etkin bir protein olan BopN, enfekte olmuş nişlerin immün sistemden korunmasında görev alan anti-enflamatuar sitokin IL-10'un miktarının artmasına neden olur (Nagamatsu *et al.* 2009).

Bu çalışmada *B. pertussis*'e ait BopD, BopN, LivJ ve Fim2 proteinlerine ait genler, pGEM-T Easy vektörüne klonlanarak *Escherichia coli* DH5α hücrelerine atılmış, ardından genlerin pET-28a(+) vektörüne klonlanmasıyla *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinde his işaretli rekombinant proteinlerin ifadesi gerçekleştirilmiş ve elde edilen proteinleri saflaştırılmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1 Plazmidler, Bakteri Suşları

Bu çalışmada *B. pertussis* Tohama I suşu [Prof. Dr. Gülay Özcengiz (ODTÜ, Türkiye) tarafından sağlanmıştır] kullanılmıştır. *E. coli* DH5α (ATCC, Manassas, VA, ABD) ve *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen, Almanya) suşları sırasıyla klonlama ve gen ifadesi çalışmaları için kullanılmıştır. pGEM®-T Easy (Promega, WI, ABD) ve pET-28a (+) (Novagen, WI, ABD) vektörleri klonlamada ve rekombinant proteinlerin *E. coli* BL21(DE3) suşunda ifadesinde kullanılmıştır

*B. pertussis* hücrelerinin büyüme ortamı olarak katı bir besiyeri olan Cohen-Wheeler agar besiyeri

modifiye edilerek kullanılmıştır (Sato and Arai, 1972). *E. coli* DH5α hücreleri 100 µg/mL ampisilin içeren Luria-Bertani (LB) sıvı besiyerinde büyütülmüş ve ampisilinli LB agar petri kaplarında daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere tutulmuştur. *E. coli* BL21(DE3) hücreleri 50 µg/mL kanamisin içeren Luria-Bertani (LB) sıvı besiyerinde büyütülmüş ve kanamisinli LB agar petri plaklarında daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere tutulmuştur. Bakterilerden daha sonraki çalışmalarda kullanabilmek amacıyla %20 gliserol-NaCl çözeltisi stoğu hazırlanarak, -80 °C'de saklanmıştır.

## 2.2 Moleküler Klonlama Deneyleri

*B. pertussis*' Tohama'ya ait kromozomal DNA, Storm vd. (2006)'nin modifiye metodu kullanılarak elde edilmiştir. Bakteriler Cohen-Wheeler agar besiyerine (Sato and Arai 1972) 37 °C'de 3 gün boyunca büyütüldükten sonra, hücreler 200 µL TEN tampon çözeltisi içine kazınmış, 100°C'de 10 dak. inkübasyonun ardından, 13.000 rpm'de 2 dak. boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant 4°C'de saklanmış polimeraz zincir reaksiyonlarında (PCR) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primerler, NCBI'da bulunan *bopD*, *bopN*, *fim2* ve *livJ* gen dizileri baz alınarak tasarlanmıştır (Gene ID *bopD*: 2667094; *bopN*: 2665952; *fim2*: 2665370 *livJ*: 2665126) (Çizelge 1) ve Sentegen firmasından (Türkiye) temin edilmiştir.

**Çizelge 1.** PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler. Restriksiyon enzimi kesim bölgeleri koyu olarak gösterilmiştir.

Gen Adı/ID	Primer adı	Oligonükleotid Sekans	PCR Ürünü Büyüklüğü
<i>bopD</i> / 2667094	DF DR	5'- <b>ggatcc</b> atgtctgtttctccgacttcgc - 3' 5'- <b>gaattc</b> cagatattgcggccacg - 3'	941 bp
<i>bopN</i> / 2665952	NF NR	5'- <b>ggatcc</b> atgactcgtatcgatgccg - 3' 5'- <b>gaattc</b> catgcgttctccattgcta - 3'	1097 bp
<i>fim2</i> / 2665370	DF DR	5'- <b>ggatcc</b> gtgttaccatgcaaatccct - 3' 5'- <b>gaattc</b> ctagggttagaccacggaaa - 3'	632 bp
<i>livJ</i> / 2665126	JF JR	5'- <b>gaattc</b> atgaacaagcatttcgtttcac - 3' 5'- <b>aagctt</b> tactgtacgacgtcttctgctg - 3'	1127 bp

PCR için reaksiyon tüpüne 10X Taq Polimeraz Tampon solüsyonundan 5 µL, 25 mM MgCl<sub>2</sub>'den 5 µL, 10 µM primerlerden 2 µL, 10 mM dNTP'den 1 µL, DMSO'dan 1 µL, genomik DNA'dan 0.5 µg, Taq polimeraz enziminden (Thermo Scientific, ABD) 1 µL eklenerek son hacim steril dH<sub>2</sub>O ile 50 µL'ye

tamamlanmıştır. Gen bölgelerinin çoğaltılması için belirlenen PCR koşulları Çizelge 2'de verilmiştir.

**Çizelge 2.** Genler çoğaltılabilmesi için gerekli olan PCR koşulları.

	Sıcaklık			Süre	
	<i>bopD</i>	<i>bopN</i>	<i>fim2</i>		<i>livJ</i>
İlk denatürasyon	94 °C	94 °C	94 °C	94 °C	10 dak
Denatürasyon	94 °C	94 °C	94 °C	94 °C	1 dak
Primer bağlanma	60 °C	60 °C	56 °C	56 °C	1 dak
Uzama	72 °C	72 °C	72 °C	72 °C	1 dak
Son uzama	72 °C	72 °C	72 °C	72 °C	10 dak

PCR, T100 Thermal Cycler (BioRad, ABD) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve genler için her bir döngü 35 kere tekrarlanmıştır. PCR ürünleri %1'lik (w/v) agaroz jelde 100 V'da 60 dak. yürütülmüş ve UV cihazı altında görüntülenmiştir. İstenen bantları jelden elüsyonu için Zymoclean Gel DNA Elüsyon Kiti (Zymo Research, ABD) kullanılarak yapılmıştır.

PCR ürünleri pGEM®-T Easy vektörüne klonlandıktan sonra kompetan *E. coli* DH5α hücrelerine aktarılmış ve mavi-beyaz koloni seçimi için hücreler 100 µg/mL ampisilin, 20 mg/mL X-gal, 100 mg/mL IPTG içeren LB agar besiyerine ekilmiştir. *E. coli* hücrelerinden plazmid izolasyonu Zippy™ Plasmid Miniprep (Zymogen) kiti kullanılarak üreticinin talimatlarına göre yapılmıştır. Transformasyonları doğrulamak ve ekspresyon vektörüne klonlamak amacıyla pGEM®-T vektöründen *bopD* geni *BamH* I ve *EcoR* I; *bopN* geni *BamH* I ve *EcoR* I; *livJ* geni *EcoR* I ve *Hind* III ve *fim2* ise *BamH* I ve *EcoR* I restriksiyon enzimleri kullanarak kesilmiştir. Doğrulanmış genler alkalın fosfataz ile muamele edilen ve uygun restriksiyon enzimleriyle kesilmiş pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanarak kompetan *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine transforme edilmiştir. Hücreler 50 µg/mL kanamisin içeren LB agar besiyerine inoküle edilmiştir. Genlerin DNA sekans analizleri BM Labosis Inc. tarafından (Türkiye) yapılmıştır. Elde edilen nükleotid sekansları, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi'ndeki (NCBI) sekanslarla doğrulanmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

## 2.3. Protein İfadesi ve Saflaştırılması

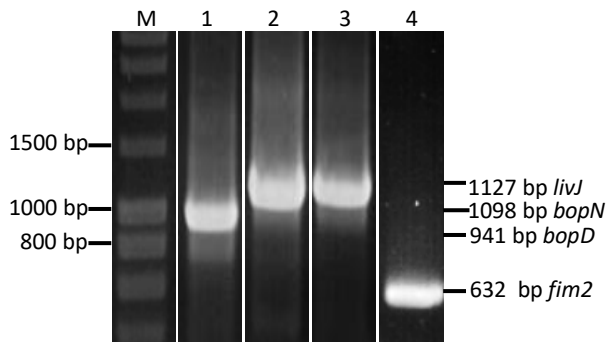
İstenilen geni taşıdığı doğrulanmış transformant BL21(DE3) hücreleri 50 µg/mL kanamisin içeren 5 mL LB sıvı besiyerinde 37 °C'de gece boyu

büyütülmüştür. Kültürden alınan 0.1 mL örnek, kanamisin içeren 2 adet 10 mL LB içeren kültür şişesine ekilmiş ve hücrel yoğunlukları OD600'de 0.6'ya gelince 1 mM IPTG (izopröril- $\beta$ -D-tiyogalaktopiranozid) ile indüklenmişlerdir. İndüksiyondan 4 saat sonra hücreler santrifüjle toplanmış, pellet 2 kere 2 mL dH<sub>2</sub>O ile yıkanmış ve üzerine 50  $\mu$ L Thorner tampon çözeltisi (8M üre, 5% SDS, 40 mM Tris- pH 6.8, 0.1 mM EDTA, 0.4 mg/mL bromofenol mavisi, %5 eklenmiş taze  $\beta$ -merkaptoetanol) eklenerek bir gece -20 °C'de saklanmıştır. Ertesi gün örnekler "1 dak. buzda bekletme" ardından "1 dak. vorteksleme" olacak şekilde 5 kere vortekslenmiş ve 5 dak. 80 °C'de bekletilmiştir. Örneklerin üstüne boya içermeyen 250  $\mu$ L Laemmli örnek tampon çözeltisinden (Laemmli 1970) eklenerek 70 °C'de 1 dak. daha bekletilmiştir. 12000 g'de 10 dak. santrifüjlenen örneklerin protein ekstraktını içeren süpernatant kısmı alınmıştır ve Bradford yöntemi ile (Ramagli and Rodrigez 1985) konsantrasyonları belirlenmiştir. Örneklerin saflaştırılması His-Spin Protein Miniprep (Zymogen) kiti kullanılarak üreticinin talimatlarına göre yapılmıştır.

### 3. Bulgular

#### 3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyon ve Genlerin pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektörüne Klonlanması

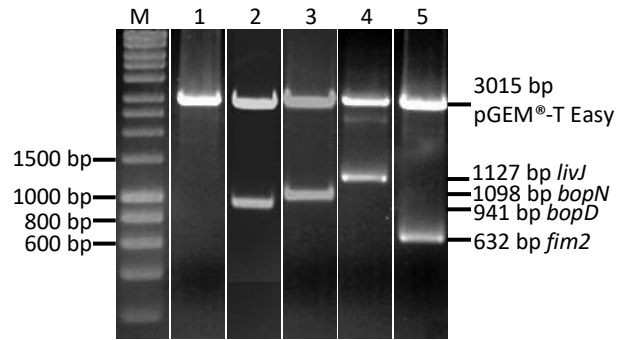
*B. pertussis*'e ait genomik DNA izole edilerek *livJ*, *fim2*, *bopD* ve *bopN* genlerinin çoğaltılmasında kullanılmıştır. Reaksiyon ürünleri agaroz jel elektroforezi yapıldıktan sonra görüntülenmiştir ve ürünler jelden ekstrakte edildikten sonra pGEM<sup>®</sup>-T Easy klonlama vektörüne klonlanmıştır (Şekil 1).



**Şekil 1.** *bopD*, *bopN*, *livJ* ve *fim2* genlerinin PCR reaksiyonu sonuçları. M: Markör (Hyper Ladder™ 1 kb, Bioline); Kolon 1: *bopD* (941 bp) PCR ürünü; Kolon 2: *bopN* (1098 bp) PCR

ürünü; Kolon 3: *livJ* (1127 bp) PCR ürünü ve Kolon 4: *fim2* (632 bp) PCR ürünü.

*livJ*, *fim2*, *bopD* ve *bopN* ligasyon ürünleri *E. coli* DH5 $\alpha$  kompetan hücrelerine aktarılmış ve hücreler, rekombinant olanları seçebilmek için X-gal, IPTG ve ampisilin içeren LB agar petri kaplarına inoküle edilmiştir. Seçilen beyaz kolonilerden plazmidler izole edilmiş ve klonlamayı doğrulamak için restriksiyon enzimleriyle kesilmiştir (Şekil 2). Restriksiyon enzimi kesimlerinde *bopD*, *bopN* ve *fim2* genleri için *BamH* I ve *EcoR* I; *livJ* geni içinse *EcoR* I ve *Hind* III enzimleri kullanılmıştır.



**Şekil 2.** *bopD*, *bopN*, *livJ* ve *fim2* pGEM<sup>®</sup>-T Easy vektörüne klonlanmasının restriksiyon enzimleri kesimi ile doğrulanması. M: Markör (Hyper Ladder™ 1 kb, Bioline); Kolon 1: *BamH* I ve *EcoR* I ile kesilmiş pGEM<sup>®</sup>-T Easy vektörü; Kolon 2: *BamH* I ve *EcoR* I ile kesilmiş *bopD* genini taşıyan pGEM<sup>®</sup>-T Easy; Kolon 3: *BamH* I ve *EcoR* I ile kesilmiş *bopN* genini taşıyan pGEM<sup>®</sup>-T Easy; Kolon 4: *EcoR* I ve *Hind* III ile kesilmiş *bopN* genini taşıyan pGEM<sup>®</sup>-T Easy ve Kolon 5: *BamH* I ve *EcoR* I ile kesilmiş *fim2* genini taşıyan pGEM<sup>®</sup>-T Easy.

#### 3.2. *livJ*, *fim2*, *bopD* ve *bopN* Genlerinin pET-28a (+) Ekspresyon Vektörüne Subklonlanması

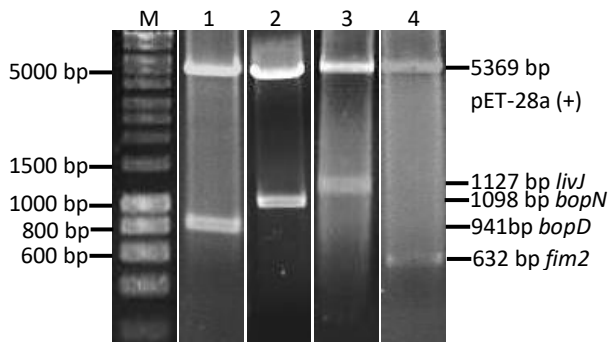
C ve N uçlarında His-Tag sekansı taşıyan pET-28a (+) ekspresyon vektöründe genlerin ekspresyonu T7 promotörünün kontrolü altındadır. Vektör *bopD*, *bopN* ve *fim2* genlerinin subklonlanması için *BamH* I ve *EcoR* I; *livJ* geninin subklonlanması içinse *EcoR* I ve *Hind* III enzimleriyle kesilmiş ve alkalın fosfataz ile muamele edilmiştir. pGEM<sup>®</sup>-T Easy vektöründen ilgili enzimlerle kesilen genler pET-28a(+) vektörüne atılmıştır. pET-28a(+)’ya atılan genler *E. coli* BL21(DE3) kompetan hücrelerine transforme edilmiştir. Hücreler kanamisin içeren LB agar petri kaplarında büyütülmüş, plazmidler rekombinant

kolonilerden izole edilmiş ve klonlama restriksiyon enzimi kesimleri ile doğrulanmıştır (Şekil 3).

### 3.3. Rekombinant *livJ*, *fim2*, *bopD* ve *bopN* Genlerinin ve *E. coli* BL21 (DE3)'te Ekspresyonu ve Proteinlerin Saflaştırılması

Hücrelerin ekspresyon deneyleri için kontrol olarak, boş pET-28a(+) ile transforme edilmiş *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinden (boş hücre) 2 adet 10 mL kanamisin içeren LB besiyeri hazırlanmış ve kültürlerden biri IPTG ile indüklenirken diğeri olduğu gibi bırakılmıştır. İlgilenilen genleri içeren pET-28a(+) ile transforme edilmiş *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin ekspresyonlarında her bir örnek için 2 adet 10 mL kanamisinli LB besiyeri hazırlanmıştır. Her bir proteinin ekspresyon deneyi için, 2 kültürden birine IPTG eklenerek His-tag ile işaretlenmiş rekombinant BopD (31.9 kDa), BopN (38.9 kDa), LivJ (39 kDa) ve Fim2 (21.9 kDa) proteinlerinin ekspresyonu indüklenmiştir. Diğer bir kültür ise kontrol olması için olduğu gibi bırakılmıştır (Şekil 4A, 4B, 4C ve 4C).

Ekspresyon ve His-tag saflaştırılması sonrasında protein miktarı tayinleri Bradford yöntemi ile yapılmış ve 0,491 mg/mL BopD proteini, 0,502 mg/mL BopN proteini, 0,301 mg/mL LivJ proteini ve 0.231 mg/mL Fim2 proteini elde edilmiştir.



**Şekil 3.** *bopD*, *bopN*, *livJ* ve *fim2* pET-28a(+) vektörüne klonlanmasının restriksiyon enzimleri kesimi ile doğrulanması. M: Markör (Hyper Ladder™ 1 kb, Bioline); Kolon 1: *Bam*H I ve *Eco*R I ile kesilmiş *bopD* genini taşıyan pET-28a(+); Kolon 2: *Bam*H I ve *Eco*R I ile kesilmiş *bopN* genini taşıyan pET-28a(+); Kolon 3: *Eco*R I ve *Hind* III ile kesilmiş *bopN* genini taşıyan pET-28a(+) ve Kolon 4: *Bam*H I ve *Eco*R I ile kesilmiş *fim2* genini taşıyan pET-28a(+).

## 4. Tartışma ve Sonuç

Aşılamayla önlenebilen bir hastalık olan boğmaca yaklaşık üç ila dört yılda bir görülen salgınlar nedeniyle halen bir sağlık problemi olarak yerini korumaktadır (Yılmaz *et al.* 2018) ve 2018 yılında dünya üzerinde 151.074 boğmaca vakasının görüldüğü bildirilmiştir (Int. Kayn 2). Patojenin anlaşılmasında rekombinant proteinlerin yaygınlıkla kullanıldığı bilinmektedir ve bu proteinlerin koruyuculuklarını gösteren birçok çalışma literatürde yer almaktadır. 2015 yılında bir yüzey proteini olan rOmpA'nın *E. coli* enfeksiyonunu önlemek için aselüller aşı geliştirilmesinde kullanılabilir umut verici bir aday protein olabileceği ileri sürülmüştür (Guan *et al.* 2015). Yine immünojeniteleri çeşitli çalışmalarla gösterilmiş olan rekombinant *Bordetella* proteinlerinin koruyuculuklarını gösteren çalışmalar mevcuttur. Monofosforil lipid A ile birlikte farelere uygulanan rekombinant demir-sülfat proteinin koruyuculuğu gösterilmiş ve bu kombinasyonun aselüler boğmaca aşısı aday bileşeni olarak kullanılabilirliği öne sürülmüştür (Yılmaz *et al.* 2016). *B. pertussis*'e ait bir demir transport proteininin rekombinant formunun (rAfuA) *B. parapertussis* enfeksiyonlarına karşı koruyuculuk gösterdiği belirlenmiştir (Alvarez Hayes *et al.* 2017). Rekombinant SphB1 ve Vag8 (SV) proteinlerinden oluşan karışımın farelerin alt solunum yolundaki patojen yükünü azaltarak boğmacaya karşı koruma sağladığı ve bu antijenlerin mevcut aselüler boğmaca aşısının iyileştirilmesi amacıyla kullanılabilir bir potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir (Suzuki *et al.* 2017). *B. pertussis*'e ait BP1253 proteini rekombinant olarak ifade edilerek bu proteinin bakterinin patogeneğinde önemli rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Moramarco *et al.* 2019).

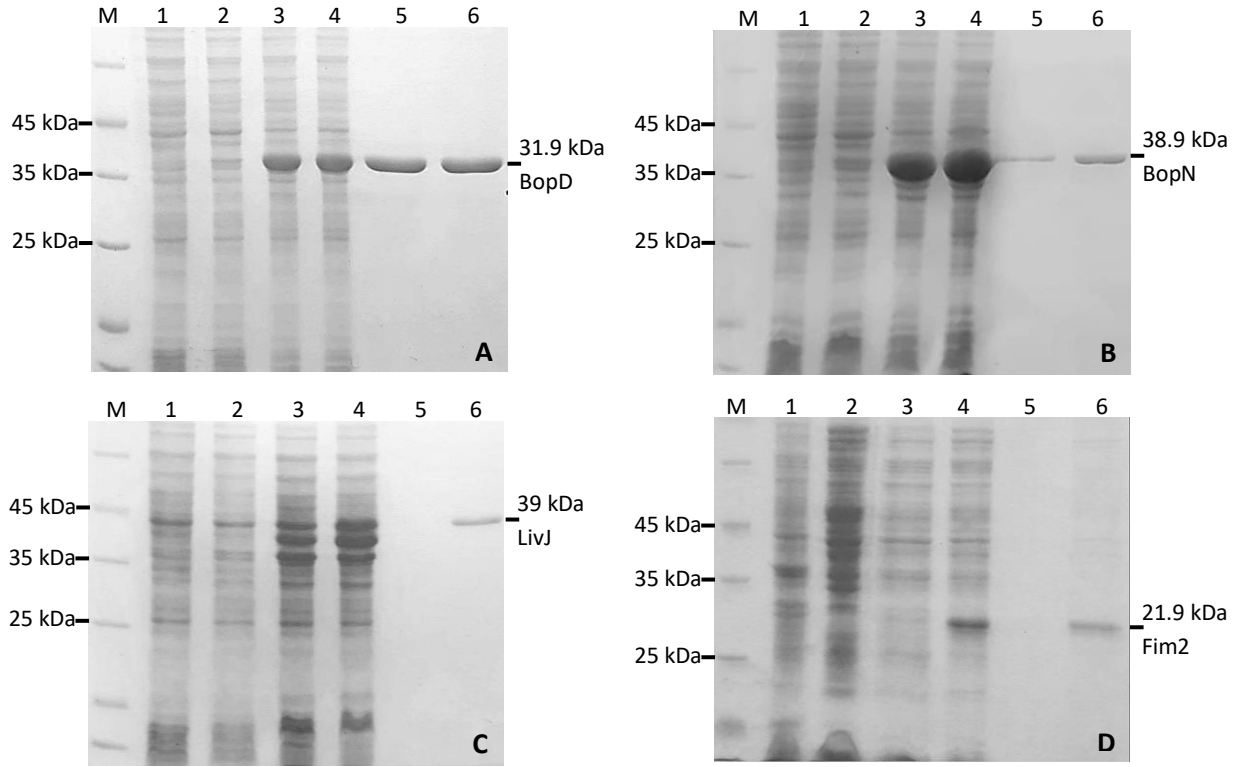
Bütün bu veriler ışığında yapılan çalışmada ileride yapılacak olan hayvan deneyleriyle birlikte koruyuculukları araştırılacak olan rekombinant BopD (31.9 kDa), BopN (38.9 kDa), LivJ (39 kDa) ve aşı komponenti Fim 2 (21.9 kDa) proteinlerinin pET-28a(+) ekspresyon vektörü kullanılarak *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinde ifadeleri ve ardından saflaştırılmaları başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada, 31.9 kDa'luk BopD proteininin ve 21.9 kDa'luk Fim2 proteininin SDS poliakrilamid jel üzerinde beklenenden daha büyük molekül ağırlığında bant verdiği gözlemlenmiştir. Literatürde proteinlerin hücre içindeki modifikasyonlar ya da tersiyer yapıları nedeniyle SDS jel üzerinde daha yavaş yürüdüğü ve bu nedenle daha büyük moleküler ağırlıkta görülebildiği (Rainbow *et al.* 1997, Yu *et al.* 1997, Benz and Schmidt 2002, Mudd *et al.* 2008, Rath *et al.* 2008) ve aynı zamanda daha önce His-tag'li proteinlerin de SDS polakrilamid jelde beklenenden daha büyük bantlar verebildiği Alger ve Williams (2002) tarafından belirtilmiştir. Yine jelde daha yüksek molekül ağırlığında bir bant görülmesi durumu, proteinlerdeki intermoleküler disülfid çapraz bağların, proteinin SDS jeldeki yürüyüşünü etkileyebilmesiyle ve proteinin post translasyonel modifikasyona uğramış halinin de jelde bulunmasıyla açıklanabilir (Kumar *et al.* 1993).

Çalışmada, BopD ve BopN proteinlerinin indüklenmemiş örneklerde de eksprese olduğu görülmüştür. Rekombinant proteinlerin ifadesinde en yüksek protein verimi elde edilen sistem en sık kullanılan T7 RNA polimeraz promotörüne bağlı *E. coli* ekspresyon sistemidir (Briand *et al.* 2016). Zaman zaman kaçak protein üretiminin bu promotörü içeren *E. coli* BL21(DE3) konak hücrelerinde görüldüğü bilinmektedir (Gopal and Kumar 2013, Briand *et al.* 2016, Li *et al.* 2017). Kaçak protein ifadesi üretilen bu proteinler ancak hücrelere toksik etki gösterdiğinde problem oluşturabilmekte ve IPTG indüklenmesinin ardından eksprese edilmek istenen protein konsantrasyonunda düşüşle kendini göstermektedir (Briand *et al.* 2016). Bu çalışmada bahsedilen örneklerde indüklemeden sonra geçen 4 saatte indüklenmiş hücre yoğunluğunda, indüklenmemiş örnek yoğunluğuna kıyasla herhangi bir azalma görülmemiştir.

Rekombinant olarak ifade edilen proteinlerin His-tag saflaştırılmaları sırasında görülen verim düşüklüğü nedeniyle verimi arttırmak için optimizasyon çalışmaları da yapılmıştır: Buna göre, protein ekstraksiyonu sırasında daha önce kullanılan Laemli solüsyonu yerine kitte önerildiği üzere 8M üre, 10 mM imidazol, 0.1 M sodyum fosfat ve 0.01 M Tris içeren bağlanma solüsyonu (pH:8) kullanılarak spesifik olmayan bağlanmalar engellenmiştir. Yine aynı şekilde yıkama solüsyonundaki imidazol konsantrasyonları 25 mM, 50mM ve 100 mM olacak şekilde değiştirilerek yıkama sırasında kaybedilen protein miktarının minimuma indirilmesi amaçlanmış ve en iyi sonucun 50 mM imidazol konsantrasyonunda alındığı görülmüştür. Aynı zamanda verimi arttırmak amacıyla proteinlerin en son olarak elde edildiği elüsyon çözeltisi miktarı 150 µL'den 50 µL'ye düşürülerek proteinlerin yoğunluğu artırılmıştır.

Tüm bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, Dorji *et al.* (2017)'nin de belirttiği gibi Bip A, Vag8, TCT ve TTSS efektör proteinleri gibi yeni proteinlerin boğmacaya karşı aşı geliştirmede potansiyel aday olarak değerlendirilmesi önemlidir. *B. pertussis*'e ait önemli virülans faktörlerinden BopD, BopN Fim2 ve LivJ proteinlerinin rekombinant olarak elde edilmesi ileride yapılacak olan aşı çalışmalarında kullanılabilmeleri açısından önem taşımaktadır. Bu çalışmanın ışığında, eksprese edilen proteinlerin koruyuculuklarının belirlenmesini takiben söz konusu proteinleri de içeren aşı kombinasyonlarının denenmesi ve yeni füzyon proteinlerinin oluşturulması bu alanda yapılabilecek olan yeni çalışmalar arasında yer almaktadır.



**Şekil 4.** Eksprese edilmiş ve His-tag saflaştırılması yapılmış BopD, BopN, LivJ ve Fim2 proteinlerini gösteren SDS poliakrilamid jel. **A)** M: Markör (Pierce™ Unstained Protein MW Marker, ThermoFischer), Kolon 1: İndüklenmemiş, boş plazmid içeren *E.coli* BL21(DE3), Kolon 2: İndüklenmiş, boş plazmid içeren *E.coli* BL21(DE3), Kolon 3: İndüklenmemiş BopD, Kolon 4: İndüklenmiş BopD, Kolon 5: His-tag saflaştırılması yapılmış, indüklenmemiş BopD, Kolon 6: His-tag saflaştırılması yapılmış, indüklenmiş BopD. **B)** M: Markör, Kolon 1: İndüklenmemiş, boş plazmid içeren *E.coli* BL21(DE3), Kolon 2: İndüklenmiş, boş plazmid içeren *E.coli* BL21(DE3), Kolon 3: İndüklenmemiş BopN, Kolon 4: İndüklenmiş BopN, Kolon 5: His-tag saflaştırılması yapılmış, indüklenmemiş BopN, Kolon 6: His-tag saflaştırılması yapılmış, indüklenmiş BopN. **C)** M: Markör, Kolon 1: İndüklenmemiş, boş plazmid içeren *E.coli* BL21(DE3), Kolon 2: İndüklenmiş, boş plazmid içeren *E.coli* BL21(DE3), Kolon 3: İndüklenmemiş LivJ, Kolon 4: İndüklenmiş LivJ, Kolon 5: His-tag saflaştırılması yapılmış, indüklenmemiş LivJ, Kolon 6: His-tag saflaştırılması yapılmış, indüklenmiş LivJ. **D)** M: Markör, Kolon 1: İndüklenmemiş, boş plazmid içeren *E.coli* BL21(DE3), Kolon 2: İndüklenmiş, boş plazmid içeren *E.coli* BL21(DE3), Kolon 3: İndüklenmemiş Fim2, Kolon 4: İndüklenmiş Fim2, Kolon 5: His-tag saflaştırılması yapılmış, indüklenmemiş Fim2, Kolon 6: His-tag saflaştırılması yapılmış, indüklenmiş Fim2.

## Teşekkür

Bu projenin bir kısmı TÜBİTAK tarafından 115Z683 proje numarasıyla, bir kısmı Akdeniz Üniversitesi tarafından FBA-2015-644 proje numarasıyla desteklenmiştir.

## 5. Kaynaklar

Alger H.M. and Williams D.L., 2002. The disulfide redox system of *Schistosoma mansoni* and the importance of a multifunctional enzyme, thioredoxin glutathione reductase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **121(1)**, 129-139.

Alvarez Hayes J., Oviedo J. M., Valdez H., Laborde J. M., et al., 2017. A recombinant iron transport protein from *Bordetella pertussis* confers protection against *Bordetella parapertussis*. *Microbiology and Immunology*, **61(10)**, 4017-415.

Benz I. and Schmidt A., 2002. Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria. *Molecular Microbiology*, **45(2)**, 267-276.

Berbers G.A., de Greeff S.C., Mooi F.R., 2009. Improving pertussis vaccination 2009. *Human Vaccines*, **5**, 497-503.

Briand L., Marcion G., Kriznik A., Heydel J.M., Artur Y., Garrido C., Seigneuric R., Neiers F., 2016. A self-

- inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, **6**, 33037.
- Cherry J.D. and Heininger U., 2004. Pertussis and other *Bordetella* infections in Textbook of Pediatric Infectious Diseases, edited by R. D. Feigin, J.D. Cherry, G.J. Demmler, and S. Kaplan, 5th ed. (The W. B. Saunders Co), 1588–1608.
- Crowcroft N.S. and Britto J., 2002. Whooping cough-a continuing problem. *British Medical Journal*, **4**, 1537–1538.
- de Gouw D., Diavatopoulos D.A., Bootsma H.J., Hermans P.W.M., Mooi F.R., 2011. Pertussis: a matter of immune modulation. *Federation of European Microbiological Society Microbiology Reviews*, **35(3)**, 441–474.
- Dorji D., Mooi F., Yantorno O., Deora R., Graham R. M., Mukkur T. K. 2018. *Bordetella pertussis* virulence factors in the continuing evolution of whooping cough vaccines for improved performance. *Medical microbiology and immunology*, **207(1)**, 3-26.
- Gopal G.J. and Kumar A., 2013. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *The Protein Journal*, **32(6)**,419-425.
- Kumar T.K.S., Gopalakrishna K., Prasad V.V.H., Pandit M.W., 1993. Multiple bands on the sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels of proteins due to intermolecular disulfide cross-linking. *Analytical Biochemistry*, **213(2)**, 226-228.
- Laemmli UK., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227(5259)**,680-685.
- Li H., Chengwei H., Daqing X., 2017. Development of a novel vector for cloning and expressing extremely toxic genes in *Escherichia coli*. *Electronic Journal of Biotechnology*, **30**, 88-94.
- Mooi F. R., 2009. *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerging Infectious Diseases*, **15(8)**, 1206–1213.
- Moramarcio F., Pezzicoli A., Salvini L. *et al.*, 2019. A LONELY GUY protein of *Bordetella pertussis* with unique features is related to oxidative stress. *Scientific Reports*, **9**, 17016.
- Mudd E.A., Sullivan S., Gisby M.F., Mironov A., Kwon C.S., Chung W.I., Day A., 2008. A 125 kDa RNase E/G-like protein is present in plastids and is essential for chloroplast development and autotrophic growth in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, **59(10)**, 2597-2610.
- Nagamatsu K., Kuwae A., Konaka T., Nagai S., Yoshida S., Eguchi M., Watanabe M., Mimuro H., Koyasu S., Abe A., 2009. *Bordetella* evades the host immune system by inducing IL-10 through a type III effector, BopN. *Journal of Experimental Medicine*, **206**, 3073–3088.
- Rainbow L., Platt G.M., Simpson G.R., Sarid R., Gao S.J., Stoiber H. *et al.*, 1997. The 222- to 234-kilodalton Latent Nuclear Protein (LNA) of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8) is encoded by orf73 and is a component of the Latency-Associated Nuclear Antigen. *Journal of Virology*, **71(8)**, 5915-5921
- Ramagli L.S. and Rodrigez L.V., 1985. Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis*, **6**, 559–563.
- Rath A., Glibowicka M., Nadeau V.G., Chen G., Deber C.M., 2008. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106(6)**, 1760-1765.
- Sato Y. and Arai H., 1972. Leucocytosis promoting factor of *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity*, **6**, 899–904.
- Storm M., Advani A., Pettersson M., Hallander H.O., Bondeson K., 2006. Comparison of real time PCR and pyrosequencing for typing *Bordetella pertussis* toxin subunit 1 variants. *Journal of Microbiological Methods*, **65**, 153-158.
- Suzuki K., Shinzawa N., Ishigaki K., Nakamura K., Abe H., Fukui-Miyazaki A., *et al.*, 2017. Protective effects of *in vivo* expressed autotransporters against *Bordetella pertussis* infection. *Microbiology and Immunology*, **61**, 371–379.
- Tefon B.E., Maass S., Ozcengiz E., Becher D., Hecker M. and Ozcengiz G., 2011. A comprehensive analysis of *Bordetella pertussis* surface proteome and identification of new immunogenic proteins. *Vaccine*, **29(19)**, 3583–3595.



Tefon B.E., Özcengiz E., Özcengiz G., 2013. Pertussis vaccines: State of the art and future trends. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **13(20)**, 2581-2596.

Yılmaz Ç., Apak A., Özcengiz E., Özcengiz G., 2016. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant iron superoxide dismutase protein from *Bordetella pertussis* in mice models. *Microbiology and Immunology*, **60(11)**, 717-724.

Yılmaz Ç., Özcengiz E., Özcengiz G., 2018. Recombinant outer membrane protein Q and putative lipoprotein from *Bordetella pertussis* inducing strong humoral response were not protective alone in the murine lung colonization model. *Turkish Journal of Biology*, **42**, 123-131.

Yu X.J., Crocquet-Valdes P., Walker D.H., 1997. Cloning and sequencing of the gene for a 120-kDa immunoproteomic protein of *Ehrlichia chaffeensis*. *Gene*, **184**, 2149-2154.

Zhu Y.Z., Cai C.S., Zhang W., Guo H.X., Zhang J.P., Ji Y.Y. *et al.*, 2010. Immunoproteomic analysis of human serological antibody responses to vaccination with whole-cell pertussis vaccine (WCV). *PLoS One*, **5(11)**, e13915.

#### **Internet Kaynakları**

1. <http://www.who.int/immunization/topics/pertussis/en/>, (16.05.2018)
2. [https://www.who.int/immunization/monitoring\\_surveillance/burden/vpd/surveillance\\_type/passive/pertussis/en/](https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/passive/pertussis/en/), (09.12.2018)