

Human Papillomavirusun L1 Gen Bölgesinin Klonlanması ve Açıklanması

Yasemin BULUT, Zülal AŞÇI TORAMAN, Adnan SEYREK

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, human papillomavirusun (HPV) yüksek patojenik genotiplerinin (HPV 16 ve HPV 18) L1 gen bölgesinin klonlanması ve prokaryotik sistemde açıklanması rapor edilmiştir.

Gereç ve Yöntem: Öncelikle, HPV 16 ve 18 DNA pozitif doku örneklerinden HPV DNA'ları izole edildi. Daha sonra, L1 gen kısmı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı ve pH6HTC His6HaloTag® T7 plazmid vektörde klonlandı. Bu vektörler *Escherichia coli*'ye transforme edildi ve transforme bakteri hücreleri ampisillin içeren vasata selekte edildi.

Bulgular: Transforme *E. coli* hücrelerinden elde edilen rekombinant vektörlerde L1 geni varlığı restriksiyon enzim analizi ve PCR-tarama testleri ile belirlendi. Ampisillin içeren vasat ortamında üretilen his-işaretli L1 proteinleri pürifiye edildi. Pürifiye rekombinant L1 proteinleri sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ile belirlendi.

Sonuç: Bu çalışma ile elde edilen HPV L1 proteininin aşı olarak kullanımı potansiyeli bulunmaktadır. Bu nedenle bu proteinin ökaryotik sistemde açıklanması ve aşı çalışmalarını planlamaktayız.

Anahtar kelimeler: Ekspresyon, Human papillomavirus, HPV, klonlama

SUMMARY

Cloning and Expression of L1 Gene Region of Human Papillomavirus

Aim: In this study, cloning and prokaryotic expression of L1 gene region of highly pathogenic genotypes (HPV 16 and HPV 18) of human papillomavirus (HPV) were reported.

Materials and Methods: Initially, HPV DNAs were isolated from HPV 16 and 18-positive tissue samples. Later, amplification of L1 gene of HPV was carried out by polymerase chain reaction (PCR). The amplified product of L1 gene was cloned into the pH6HTC His6HaloTag® T7 plasmid vector. The recombinant plasmid was used in transforming *Escherichia coli*. The transformed bacterial cells were selected onto ampicillin containing media.

Results: The recombinant vectors obtained from the transformed *E. coli* cells were subjected to restriction endonuclease and PCR-screening analysis in order to confirm the identity of L1 gene. The his-tagged L1 proteins synthesized onto the media containing ampicillin were purified. The purified recombinant L1 proteins were detected by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Conclusion: The L1 protein obtained from this study is a potential vaccine. Therefore, we are planning for the expression of this protein in eukaryotic system and vaccine studies.

Key words: Expression, Human papillomavirus, HPV, cloning

GİRİŞ

Human papillomavirus (HPV), *Papillomaviridae* ailesinde yer alan, çift iplikli sirküler DNA'ya sahip ve 50-55 nanometre büyüklüğünde ikosa-hedral kapsid yapıda zarfsız bir virustur⁽¹⁾.

HPV epitelyotropik bir virus olup deri ve muko-

zalarda genellikle papillomatöz ile hiperplastik lezyonlara neden olur. HPV'nin yol açtığı lezyonlar genellikle lokalize olup, kendiliğinden iyileşir veya belirtisiz latent enfeksiyonlar oluşur. Ancak belli HPV tipleri kanser gelişiminde kofaktör olarak rol oynar. Günümüzde HPV özellikle serviks, anogenital bölge, deri, üst solunum ve üst sindirim yolları kanserlerinde

Alındığı tarih: 14.06.2016

Kabul tarihi: 03.08.2016

Yazışma adresi: Yasemin Bulut, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ

e-posta: ybulut@firat.edu.tr

saptanmış onkojenik bir DNA virusu olarak değerlendirilmektedir^(2,3).

HPV'ler L1 proteinindeki DNA sekans bölgeleri baz alınarak sınıflandırılmaktadır⁽⁴⁾. Bu sınıflandırmaya göre 120'den fazla HPV genotipi belirlenmiştir. En son yapılan gruplandırmada HPV genotipleri onkojenik potansiyellerine göre 3 gruba ayrılmıştır⁽⁵⁾. Bunlar düşük, orta ve yüksek riskli HPV gruplarıdır.

Yüksek riskli gruptaki viruslar, servikal invaziv karsinomda en sık belirlenen tiplerdir. HPV tip 16, 18, 45, 56 ve 58 bu grupta yer almaktadır. HPV 16 ve HPV 18 servikal skuamöz hücreli karsinom ile ilişkili iken, servikal adenokarsinomlarla HPV 18 daha çok ilişkili bulunmuştur. Serviks kanserlerinde tespit edilen HPV tiplerinin yaklaşık %80'sinde HPV 16 ve HPV 18 belirlenmiştir. Bu nedenle HPV tipleri içerisinde HPV 16 ve HPV 18 en önemli tipler olarak değerlendirilmektedirler. Günümüzde HPV enfeksiyonuna yönelik en etkin mücadele HPV'nin yüksek patojenik genotiplerinin L1 gen bölgesinde açıklanan rekombinant proteinin aşı olarak kullanılmasıdır⁽⁶⁾.

Bu çalışmanın amacı HPV'nin yüksek patojenik genotipleri olan HPV 16 ile HPV 18'in L1 gen bölgesinin rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak klonlanması ve açıklanmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

DNA Örnekleri

Çalışmanın başlangıç materyalini daha önceki çalışmalarımızda HPV enfekte olduğu tespit edilen dokularda elde edilen ve -80°C'de tutulan HPV pozitif DNA örnekleri oluşturdu⁽⁷⁾.

İnzört Geninin Çoğaltılması

HPV tip 16 ve 18 olduğu belirlenen DNA örnek-

leri ile proofreading polymerase (PromegaCo., ABD) ve EcoRI-XhoI restriksiyon enzim tanıma bölgelerini de bulunduran primerler (Tablo 1) kullanılarak yaklaşık 1500 baz çifti uzunlukta ürünler elde edildi.

Tablo 1. İnzört genin çoğaltılmasında kullanılan primerler.

HPV 16 Primerleri	HPV 18 Primerleri
<i>Sense Primer;</i> 5'GCTGAATTCAATATGC(G) AGGTGACTTTTTATTTA-3'	<i>Sense Primer;</i> 5'-GCTGAATTCAATATGGCCTGT ATACACGGGTC-3'
<i>Anti-sense Primer;</i> 5'GGTCTCGAGACATTACA GCTTACGTTT-3'	<i>Anti-sense Primer;</i> 5'GGTCTCGAGACA TTACTTC (G)CTG GCAC-3'

Polimeraz zinciri reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılan L1 geni %1'lik low-melting agaroz jelde ultra violet ışık kaynağında görüntülendi. Genleri içeren agaroz jel bölgesi steril bistüri ile kesilerek mikrosantrifüj tüpü içerisine alındı. Jeldeki DNA'lar GENE CLEAN® II (MP Biomedicals, Kaliforniya, ABD) ile yüksek miktarda ve temiz ürünler olarak elde edildi. Elde edilen DNA'ların konsantrasyonları spektrofotometrede ölçüldü ve kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı^(8,9).

Klonlama

PCR ile amplifiye edilen ve -80°C'de tutulan HPV L1 gen bölgeleri pH6HTC His6HaloTag® T7 plazmid vektöre (PromegaCo., ABD) yerleştirildi. Bu amaçla, EcoRI enzimi ile kesilen plazmid DNA ile insört genlerin ligasyonu 2X Rapid Ligation Buffer içinde T4 DNA Ligase enziminin olduğu ortamda gerçekleştirildi. Rekombinant plazmidlerin transformasyonları amacıyla soğuk CaCl₂ içeren ortamda high-efficiency competent hücreler (*E. coli* JM109 kompetent hücreler) kullanıldı. Transforme hücreler 100 µg/ml ampisilin içeren LB agar pleytlerinde üretildi. Klonlama işlemini takiben rekombinant plazmid vektörlerin belirlenmesi, ampisilin dirençli klonların seçim yöntemine ilave olarak, PCR tarama (PCR screening method)

ve EcoRI-XhoI restriksiyon enzim kesimi metotları kullanılarak gerçekleştirildi^(8,9).

Rekombinant L1 proteininin üretimi

Rekombinant plazmid transforme *E. coli* JM109 kompetent hücreleri 37°C’de, sallayıcının bulunduğu ortamda LB besiyerinde bir gece için üretime bırakıldı. Bu süre sonunda LB besiyeri 5000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı farklı bir kaptaki toplandı. Elde edilen bu üst sıvıda His6HaloTag protein pürifikasyon sistemi (PromegaCo., ABD) kullanılarak histidin işaretli L1 proteinlerin pürifikasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen ürünlerin bir kısmı, üretim ve pürifikasyonun başarısının doğrulanması amacıyla, sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ile test edildi⁽⁹⁾.

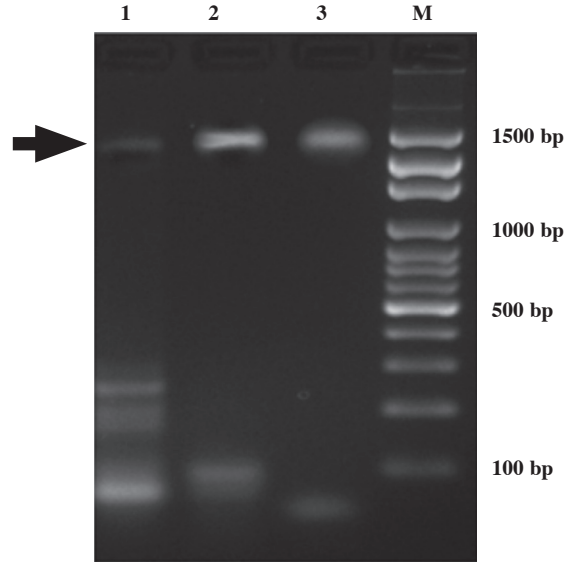
SDS-PAGE

Üretim ve pürifikasyonun başarısının doğrulanması üretilen rekombinant proteinlerin SDS-PAGE’de göçü ve görüntülenmesi ile sağlandı. Bu amaçla bir önceki adımda elde edilen pürifiye proteinler lizis solusyonu ile parçalandı. Daha sonra, proteinler Laemmli’nin aralıklı SDS-PAGE sistemi kullanılarak %5’lik yığılmalı ve %10’luk ayırıcı jelde, vertikal elektroforez cihazında molekül ağırlıklarına göre ayrıştırıldı⁽⁹⁾.

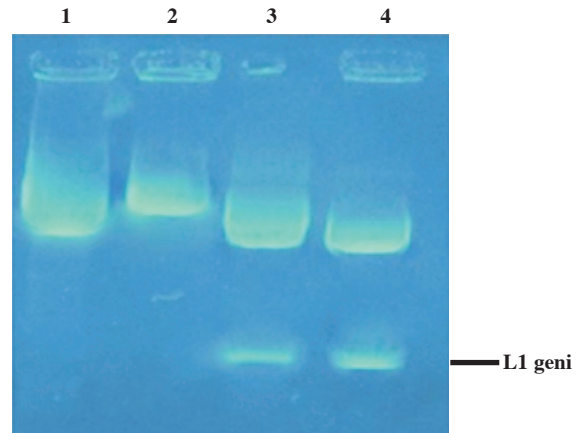
BULGULAR

HPV tip 16 ve 18 olduğu belirlenen DNA örnekleri kullanılarak insört DNA’lar PCR ile sentez edildi. PCR ile çoğaltılan insört L1 geni %1’lik agaroz jelde ultraviolet ışık kaynağında görüntü- lendi (Şekil 1).

HPV L1 gen bölgesini içeren rekombinant vektöre ile transforme *E. coli* hücrelerinden elde edilen DNA’ların doğrulanması için EcoRI-XhoI restriksiyon enzim analizi gerçekleştirildi (Şekil 2).

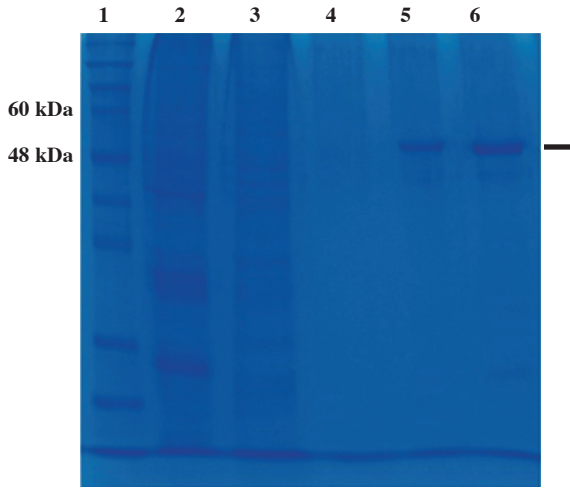


Şekil 1. HPV pozitif doku örneklerinde amplifiye edilen L1 gen bölgesinin %1’lik agaroz jelde görüntüsü. Hat 1 ve 3; HPV-16 pozitif doku örneklerinde çoğaltılan L1 gen bölgesi, Hat 2; HPV-18 pozitif doku örneklerinde çoğaltılan L1 gen bölgesi, M; DNA marker.



Şekil 2. HPV L1 gen bölgesini içeren rekombinant plazmidin restriksiyon enzim analizi ile doğrulanması. Hat 1; pH6HTC His6HaloTag® T7 plazmid, Hat 2; L1 gen bölgesini içeren rekombinant pH6HTC His6HaloTag® T7 plazmid, Hat 3; HPV-16 L1 gen bölgesini içeren rekombinant plazmid, Hat 4; HPV-18 L1 gen bölgesini içeren rekombinant plazmid.

Rekombinant vektörle transforme edilen *E. coli* hücrelerinden açıklatılan ve pürifiye edilen L1 proteini %10’luk SDS-PAGE’de incelendi. Rekombinant vektörle transforme *E. coli* üst sıvılarında pürifiye edilen proteinin “coomassie” mavisıyla boyanmasında bu proteinin yaklaşık 55 kDa büyüklüğe sahip olduğu belirlendi (Şekil 3, Hat 5 ve hat 6).



Şekil 3. SDS-PAGE görüntüsü. Hat 1; Protein marker, Hat 2; *E. coli* üst sıvı, Hat 3; Rekombinant vektörle transforme *E. coli* üst sıvısı, Hat 4; Kontrol *E. coli* pürifiye üst sıvısı, Hat 5 ve 6; Rekombinant vektörle transform ve pürifiye *E. coli* üst sıvısı.

TARTIŞMA

HPV ile serviks kanserleri arasındaki epidemiyolojik ilişkinin anlaşılmasından sonra bu virusa karşı aşılarda üretilmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. HPV in-vitro hücre kültürlerinde üretilebilen virus değildir. Bu nedenle HPV'ye karşı klasik zayıflatılmış veya inaktive aşılarda geliştirilmesi olası olmamıştır. Zhou ve ark.⁽¹⁰⁾, 1991 yılında ökaryotik hücrelerde HPV 16'nın kapsid proteinleri olan L1 ve L2 genini çoğaltarak VLP (virus-like partikül) sentezlemişler ve aşı çalışmalarının başlatılmasında önemli bir adım atmışlardır. Daha sonraki yıllarda başka araştırmacılar VLP'yi saflaştırmışlar ve VLP'lerin morfolojik olarak doğal virionlara benzerlik göstermelerini belirlemişlerdir. Ayrıca bu VLP'lerin yüksek titrasyonda nötralizan antikor ve T hücre yanıtı oluşturabildiğini ispatlamışlardır⁽¹¹⁻¹⁴⁾. Bu yapılar günümüzde birçok ülkede kullanılan koruyucu aşılarda temelini oluşturmaktadır.

Günümüzde lisans almış olan ve birçok ülkede kullanımına izin verilen HPV 16 ve 18 L1 VLP'ler ile yapılan bivalan (Cervarix®) ve HPV 6, 11, 16 ve 18 L1 VLP'ler ile yapılan quadrivalan aşılardan (Gardasil®, Merck-Sanofi-Pasteur

ümit verici sonuçlar elde edilmiştir⁽¹⁵⁾. L1 proteinlerinden elde edilen bivalan HPV aşısının 27 aylık takip süresi içinde yeni enfeksiyonlara karşı %92 ve persistan enfeksiyonlara karşı %100 koruduğu saptanmıştır. HPV tip 6, 11, 16 ve 18 L1 VLP'lerinden rekombinant maya teknolojisi ile üretilmiş quadrivalan HPV aşısının HPV 16 ve 18 bağlantılı servikal intraepitelial neoplazi ("cervical intraepithelial neoplasia"; CIN)'den ve persistan enfeksiyonlardan %100, HPV 6, 11, 16 ve 18 bağlantılı CIN'den %99 ve external genital lezyonlardan %95 koruduğu tespit edilmiştir⁽¹⁶⁾.

Gerçekleştirilen birçok çalışmada koruyucu aşılarda neticesinde oluşan HPV antikorlarının doğal enfeksiyondan sonra şekillenen antikorlara göre en az sekiz kat daha yüksek titrede oluştuğu gösterilmiştir. Ayrıca oluşan bu antikorların uzun yıllar yüksek titrede seyrettiği belirlenmiştir^(17,18).

Günümüzde HPV aşılarda, FDA onayı ile birlikte, gelişmiş birçok ülkede bayanlara 11-12 yaş grubunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, daha önce aşı olmamaları durumunda, 26 yaşına kadar kullanılması önerilmektedir. Yirmi yedi yaşın üzerindeki kadınlarda yapılması ise, olguların geç şekillenmesi ve maliyet hesaplamaları dikkate alınarak, tavsiye edilmemektedir⁽¹⁸⁾. Uygun şekilde yapılan bir aşılamadan sonra ise yaklaşık yedi yıla yakın yüksek ve koruyucu titrede antikorların oluştuğu kaydedilmiştir⁽¹⁹⁾.

Ülkemizde, başta serviks kanserleri olmak üzere, üst solunum yolları ve gastroentestinal sistem kanser olgularında HPV'nin belirlenmesi ve genotiplendirilmesine yönelik çalışmalar mevcuttur⁽²⁰⁻²⁴⁾. İlimiz ve çevresinde tarafımızdan yapılan çalışmalarda solunum, gastroentestinal ve genital sistemlerin kanser olgularında HPV virusunun bu olgularda yüksek sıklıkla varlığı gösterilmiştir^(7,23,24). Gerek ülkemizde gerekse ilimiz ve çevresinde görülen kanser olgularının konu edildiği çalışmalarda HPV prevalansının yüksek olduğu belirlenmiştir⁽²⁰⁻²⁴⁾.

Ayrıca, belirlenen HPV tiplerinin büyük kısmını HPV tip 16 ve 18 gibi yüksek patojenik tipler oluşturur⁽⁷⁾. Bu bakımdan, sunulan bu sonuçlar, mevcut projenin ülkemiz açısından gerekliliğini ve ileri taşınmasını açık olarak desteklemektedir.

Mevcut proje ile HPV'nin iki önemli genotipinin aşı olarak kullanılması potansiyeline sahip proteinini açıklatan L1 gen bölgesinin prokaryotik açıklanması başarılmıştır. Bu bir ön çalışmadır ve aynı gen bölgesinin özellikle ökaryotik sistemde açıklanması ile bu sistemde üretilecek proteinlerin aşı olarak kullanımı için gerekli olan çalışmalar devam ettirilmektedir.

Teşekkür

Bu çalışmaya finansman destek sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (FÜBAP TF.11.87 nolu proje) teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- zur Hausen H. Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288:F55-78. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-419x\(96\)00020-0](http://dx.doi.org/10.1016/0304-419x(96)00020-0)
- Lazzari CM, Krug LP, Quadros OF, Baldi CB, Bozzetti MC. Human papillomavirus frequency in oral epithelial lesions. *J Oral Pathol Med* 2004; 33:260-5. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0904-2512.2004.00177.x>
- Turazza E, Lape-a A, Sprovieri O, et al. Low-risk human papillomavirus types 6 and 11 associated with carcinomas of the genital and upper aero-digestive tract. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997; 76:271-6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0412.1997.tb07858.x>
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324:17-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>
- Wright TC, Kurman RJ, Ferenczy A. Precancerous lesions of the cervix. In: Kurman RJ, Te Linde RW. Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract, Eds. 2nd ed, Springer-Verlag, New York, USA, 2002: 102-47.
- Mu-oz N, Bosch FX, Castellsagué X, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer* 2004; 111:278-85. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.20244>
- Korkmaz E, Bulut Y, Seyrek A, Özercan IH, Toraman ZA. Üst solunum yolları malign lezyonlarında HPV Tip 16, 18, 31 ve 33 DNA prevalansının araştırılması. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2010; 30:305-8.
- Bulut Y, Doymaz MZ. Hepatit B virus core antijeni (HBcAg) geninin *Escherichia coli*'de klonlanması. *Mikrobiyol Bul* 2001; 35:127-32.
- Bulut Y, Doymaz MZ. Hepatit B virüsü HBcAg geninin klonlanması ve ökaryotik hücrelerde ekspresyonu. *Mikrobiyol Bul* 2003; 35:183-91.
- Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ, Frazer IH. Expression of vaccini a recombinant of HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly HPV virion-like particles. *Virology* 1991; 185:251-7. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90772-4](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(91)90772-4)
- Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:12180-4. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.89.24.12180>
- Brown DR, Bryan JT, Schroeder JM, et al. Neutralization of human papillomavirus type 11 (HPV-11) by serum from women vaccinated with yeast-derived HPV-11 L1 virus-like particles: correlation with competitive radioimmunoassay titer. *J Infect Dis* 2001; 184:1183-6. <http://dx.doi.org/10.1086/323645>
- Evans TG, Bonnez W, Rose RC, et al. A Phase I study of a recombinant viruslike particle vaccine against human papillomavirus type 11 in healthy adult volunteers. *J Infect Dis* 2001; 183:1485-93. <http://dx.doi.org/10.1086/320190>
- Pagliusi SR, Teresa Aguado M. Efficacy and other milestones for human papillomavirus vaccine introduction. *Vaccine* 2004; 23:569-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.07.046>
- Goldie SJ, Grima D, Kohli M, et al. A comprehensive natural history model of HPV infection and cervical cancer to estimate the clinic impact of a prophylactic HPV 16/18 vaccine. *Int J Cancer* 2003; 106:896-904. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.11334>
- Harper DM, Franco EL, Wheeler C, et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle in prevention of infection with human papillomavirus type 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 364:1757-65. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17398-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17398-4)
- Hakim AA, Dinh TA. World wide impact of the human papilloma virus vaccine. *Curr Treat Options Oncol* 2009; 10:44-53. <http://dx.doi.org/10.1007/s11864-009-0094-4>
- Pedersen C, Petaja T, Strauss G, et al. Immunization of early adolescent females with human papillomavirus type 16 and 18 virus-like particle vaccine containing AS04 adjuvant. *J Adolescent Health* 2007; 40:564-71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jadohealth.2007.02.015>
- MacKenzie D. Will cancer vaccine get to all women? *New Sci* 2005; 12:34-38.
- Tezcan S, Ozgur D, Ulger M, et al. Human papillomavirus genotype distribution and E6/E7 oncogene expression in Turkish women with cervical cytological findings. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15:3997-4003. <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.9.3997>
- Akcali S, Goker A, Ecemis T, Kandiloglu AR, Sanlidag T. Human papilloma virus frequency and genotype distribution in a Turkish population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14:503-6. <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.1.503>
- Tuncer ZS, Boyraz G, Sahin N, Alp A. Distribution of human papillomavirus types in Turkish women. *Eur J Gynaecol Oncol* 2012; 33:204-6.
- Erol D, Bulut Y, Yüce H, Özercan IH. Çeşitli gastrointestinal karsinom örneklerinde insan papillomavirus DNA varlığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43:259-68.
- Bulut Y, Önalın EE, Dilek AR, et al. Serviksin sitolojik anomalilerinde human papillomavirus pozitifliği ve IL-10 promotör-1082 gen polimorfizmi, 3. Ulusal Viroloji Kongresi, Bursa, Türkiye 2007: 273.