



ARAŞTIRMA MAKALESİ
RESEARCH ARTICLE
CBU-SBED, 2020, 7(3): 389 -394

Boğmaca Hastalığına Karşı Yeni Aşı Tasarımı ve Analizi

Design and Analysis of New Vaccine Against Whooping Cough

Mostafa Norizadehtazekand^{1*}

Farmasötik Biyoteknoloji AD- Eczacılık Fakültesi- Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi- Zonguldak- Türkiye.

mostafa_noorizadeh@yahoo.com

ORCID: 0000-0002-7688-7467

*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Sorumlu Yazar: Mostafa Norizadehtazekand¹

Gönderim Tarihi / Received: 26.04.2020

Kabul Tarihi / Accepted: 17.09.2020

DOI: 10.34087/cbusbed.727094

Öz

Giriş ve Amaç: Boğmaca hastalığına neden olan Bordetella pertussis aerob, gram negatif ve patojenik bir bakteridir. Boğmacayı önlemek için en iyi yol aşı uygulanmasıdır. Öldürülmüş B. pertussis bakterileri kullanılan etkili aşılardır, ancak bu aşılarda birçok yan etkisi vardır.

Gereç ve Yöntemler: Rekombinant DNA teknolojisi yeni aşılarda geliştirmek için farklı yazılımlar sunmuştur. In silico çalışmaları aşı keşfinin önemli bir parçası haline geldiğinden dolayı bu çalışmada B. pertussis'e karşı yeni epitop bazlı aşı tasarlanması ve analizi amaçlanmıştır.

Bulgular: Tasarlanan aşının fizikokimyasal analizi sonucu aşının 53.718 kDa'lık bir molekül ağırlığına sahip olduğunu ve memeli hücrelerinde 20 saatten fazla, mayada 20 saatten fazla ve E. Coli' de ise 10 saatten fazla tahmini yarılanma ömrüne sahip olduğunu göstermiştir. Kararsızlık indeksi (37.64) ve alifatik indeksi (64.31) sonuçlarından aşının stabil yapıya sahip olduğu saptanmıştır. Hidropatisitenin değerinin -0.765 olmasıyla aşının hidrofilik bir protein olduğunu ve suda çözünür olduğunu söyleyebiliriz. AllerTOP ve ToxinPred'den elde edilen sonuçlar aşının insanlar üzerinde toksik ve alerjenik etkileri olmadığını ortaya koymuştur. ProtParam ve pepCalc'in sonuçlarına göre aday aşı suda çözünür ve transmembran helix'e sahip değildir, bu nedenle bu proteinin rekombinant DNA teknolojisi yollarıyla geliştirilmesi ve E. Coli' de ekspresyonu zor olmayacaktır. Docking analizinden elde edilen sonuçlar aşının-607.64 skoru ile HLA-DRB10101'e maksimum afinité'ye sahip olduğunu ve bağışıklık sistemini uyarabildiğini göstermiştir.

Sonuç: Aday aşı laboratuvarda klonlanıp ve üretilebilir ve ayrıca aşının B. pertussis' e karşı etkinliği model hayvanlarında araştırılabilir.

Anahtar kelimeler: Aşı, B hücre, Bordetella pertussis, epitop, HLA-DRB10101, T hücre.

Abstract

Objective: Bordetella pertussis is an aerobe, Gram negative, and pathogenic bacteria causes pertussis or whooping cough. Vaccination is the best way for preventing of pertussis. Killed bacterial cells are effective vaccines against *B. pertussis*, but these vaccines have many side effects.

Materials and Methods: Recombinant DNA technology provides different software's to develop new vaccines. Because silico studies have become a crucial part of the vaccines discovery, this study was aimed to design and analysis of new multi epitope based vaccine against B. pertussis.

Results: Physicochemical analysis of new vaccine showed that our designed vaccine has a molecular weight of 53.718 kDa with the estimated half-life of more than 20 hours in mammalian cells, greater than 20 hours in yeast, and greater than 10 hours in E. Coli. The result of instability index (37.64) and aliphatic index (64.31) showed that the vaccine is considered stable. Because the grand average of hydropathicity is -0.765 we can say the vaccine is a hydrophilic protein and it is soluble in water. The results obtained from AllerTOP and ToxinPred revealed that the vaccine does not have toxic and allergenic effects on humans. The result of ProtParam and PepCalc showed that candidate vaccine is soluble in water and does not have transmembrane helix, so the expression of this protein in E. Coli won't be difficult in the development of the vaccine with recombinant DNA technology methods. The results obtained from docking revealed that the vaccine has maximum affinity to HLA-DRB10101 with the score of-607.64 and it can be stimulate immune response.

Conclusion: The candidate vaccine could be cloned and expressed at the laboratory and the vaccine experiments using model animals should be performed to confirm the suitability of vaccine against *B. pertussis*.

Keywords: Bordetella pertussis, B cell, epitope, HLA-DRB10101, T cell, vaccine,

1. Giriş

Boğmaca hastalığı bulaşıcı ve akut bir solunum yolu enfeksiyonudur. En önemli semptomu ise uzun süren şiddetli öksürüklerdir.[1] *B. pertussis*'in neden olduğu boğmaca hastalığı solunum yolu enfeksiyonlarına neden olur. Boğmaca hastalığı üç farklı klinik evreden oluşur: Kataral, paroksizmal ve konvalasent faz. İlk devre olan kataral devre toplam 7-14 gün sürer. Bu devredeki semptomlar soğuk algınlığına benzer ve bu sebepten dolayı soğuk algınlığından ayırt edilemez. Bu dönemde giderek hastalığın etkisi artar ve şiddetli öksürükler gözükür. Kataral devrede genelde ateş 38.5 °C'a kadar ulaşır ama bu değerden fazla olmaz. Daha sonra paroksizmal faz başlar. Bu fazda öksürükle daha şiddetli olur ve mukusun nefes borusuna tıkanılmasıyla çıkarılması zor olur. Paroksizmal fazda nefes borusundan mukusun temizlenmesiyle hava akciğerlere hızlıca ulaşır ve böylece enfeksiyon geçiren hastanın sesi ötme şeklinde olur. Bu sese ise boğmaca öksürüğü adı verilir. Öksürüklerin devamı kusmaya yol açar. Bu fazdaki semptomlar öksürükle birlikte lenfositozis, dehidratasyon, pneumothorax vb. Giderek öksürük ve kusmalar azalır ve üçüncü devre başlar. Bu evre ise konvalasent evresidir. Bu fazda bazen paroksizmal faza ait semptomlar tekrar ortaya çıkabilir ama genelde hastalık giderek geçer ve hastanın iyileşmesi için birkaç hafta geçmesi gerekir.[2]

B. pertussis'in neden olduğu Boğmaca hastalığı 6 aydan küçük bebeklerde daha çok etkilidir ve ölüme yol açabilir ama hastalık herhangi bir yaş gurubunda gözükabilir. Hastalıkta kullanılan antibiyotikler paroksizmal fazda etkili olabilir. Tedavi sürecinin uzun olması ve çocuklarda risk oluşturulmasından dolayı hastalığın kontrolü için aşı uygulanması en mantıklı yoldur.[3] Boğmaca vakaları daha çok Temmuz ile Ekim ayları arasında görülmektedir. Birçok ülkede aşı yapılmasına rağmen hala hastalık birçok ülkede görülmekle birlikte hatta can kaybına da sebep olmaktadır. Ölümlerin bebeklerde %4'lerde olduğu saptanmıştır. [4-6] Aşıların yapılmasına rağmen enfeksiyonlar ve ölümlerin ortaya çıkmasından dolayı her zaman yeni nesil aşıların üretimi ve uygulanması düşünülmüştür. Aşılama, boğmacayı önlemek için en iyi yöntemdir. Öldürülen bakteri hücreleri *B. pertussis*'e karşı etkili aşılardır, ancak bu aşıların birçok yan etkisi vardır.[7] Rekombinant aşıların üretime geçmesinden önce *in silico* ortamda aşının tasarlanması ve farklı programlarla analiz edilmesi gerekir.[8] Yeni nesil aşılar Rekombinant DNA Teknolojisi ile elde edilerek daha güvenilir olmaları ve uzun süre insanları koruyabilmeleriyle ilgili araştırmalar vardır.[9-12] *In silico* (Bilgisayar Ortamı) çalışmaları aşı keşfinin önemli bir parçası haline gelmiştir.[13] Bu çalışmanın amacı boğmaca hastalığına karşı rekombinant aşı tasarımı ve dizayn edilen aşının farklı özelliklerini araştırmaktır.

2. Materyal ve Metot

B. pertussis bakterisine karşı aşı tasarımı için pertussis toxin subunit 1 (NCBI accession no: VO_0011034), pertussis toxin subunit 2, (NCBI accession no:

VO_0011037), pertussis toxin subunit 3 (NCBI accession no: VO_0011038), pertussis toxin subunit 4 (NCBI accession no: VO_0011032) chaperonin GroEL (NCBI accession no: VO_0011035) ve filamentous hemagglutinin (NCBI accession no: VO_0011030) proteinleri kullanarak kimerik bir aşı tasarlanmıştır. Pertussis Toksini beş alt birimden oluşur. Toksinin moleküler ağırlığı 105 kDa'dır. Pertussis Toksini enfeksiyonun kolonizasyon aşamasında önemli bir virulans faktörüdür.[14] *B. pertussis* bakterisine ait Chaperonin GroEL proteini bakteride sentezlenen proteinlerin katlanmayan polipeptit zincirlerine bağlanarak veya yanlış katlanmış bölgelerin uygun katlanmasına sebep olur.[15] Filamentous hemagglutinin (FHA), *B. pertussis* 'in hücre yüzeyi proteinidir ve bakterinin yapışmasında görev alır. Bu protein boğmaca hastalığın oluşmasında önemli rol alır.[16] B lenfositlere ait epitoplara IEDB (2020) ve ABCpred (2020) veri tabanı kullanarak tasarlanmıştır. Bu çalışmada 0.35 eşliğinden daha yüksek epitoplara B-hücresi epitop olarak seçilmiştir. Ayrıca MHC sınıf II'ye ait epitoplara ise Vaxign 2 Beta, PropredI ve IEDB veri tabanlarını kullanarak tasarlanmıştır. Çalışmada MHCII epitoplara için hem dominant HLA'lar ve hem de resesif HLA'lar göz önünde bulundurulmuştur. Bu çalışmada HLA alelleri ile yüksek afinite ($p < 0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi) gösteren epitoplara seçilmiştir ve antijenik puanı 0,6 üzerinde olan epitoplara seçilmiştir. [17,18] Daha sonra seçilen epitoplara bir araya getirilmiştir ve böylece bir protein yapısı oluşturulmuştur. Oluşan protein 'in 2. ve 3. Yapısı dikkate alınmıştır ve antijenitesi VaxiJen programı kullanarak analiz edilmiştir.[19] Tasarlanan aşının sitotoksik ve alerjik riski Allertop ve Toksinpred programları ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda alerji riski taşıyan bölgeler aşının yapısından çıkarılmıştır ve tekrar antijenitesi, toksisite ve alerjenik özelliği test edilmiştir. Bu üç test de başarılı olan epitoplara daha sonraki aşamalara tabi tutulmuştur. Tasarlanan proteinin yapısındaki aşı insan vücuduna girdikten sonra çözünür olması gerekir ve ayrıca çözünürlüğünün düşük olması bu aşıya ait genin *E. Coli*'ye aktarılmasıyla bakteri tarafından ekspresyonunda ve saflaştırılmasında sıkıntıya sebep olabilir. İşte bu sebepten dolayı tasarlanan aşının su da çözünürlüğü hesaplanmıştır. [20,21] Aşı insan veya hayvan vücuduna enjekte edildikten bir süre stabil olması ve yapısının hemen bozulmamasına dikkat ederek aşının bu özellikleri ve moleküler ağırlığı ProtParam programını kullanarak değerlendirilmiştir. Bu aşı Biyoteknolojik yöntemlerle bir konakçı tarafından üretilmek istenirse proteinin saflaştırılması aşamasında aşının izoelektrik noktası göz önünde bulundurulmalıdır. Bu sebepten dolayı aşıya ait izoelektrik noktası, alifatik indeksi ve aday aşının stabilitesi ParatParam ve Papcol yazılımlarıyla analiz edilmiştir.[22] Aday aşının 2. Protein yapısı ve 3. Protein yapısı ProtParam ve SWIIS MODEL programlarıyla çizilmiştir. Daha sonra çizilen yapı farklı programlar kullanarak rafine edilmiştir. Rafine sonucunda elde edilen modellerin 3D inceltme (refine) puanı, GDT-HA puanı, GTD-TS, RMSD skoru

ve MolProbite puanına göre en iyi model seçilmiştir. Seçilen modelin yapısında anormal aminoasitlerin olup olmadığını incelemek için Ramachandran analizi Procheck yazılımı ile yapılmıştır.[23]

Tasarlanan aşının insan vücudunda etkili olup olmadığını incelemek için HEX protein protein docking (Hex 8.0.0) programı uygulanmıştır. Bu amaçla aşının MHCII'ye bağlanma afinitesi incelenmiştir. Bu çalışmada dominant MHC olarak bilinen HLA-DRB1 0101 seçilmiştir ve aşının HLA-DRB10101'e afinitesi incelenmiştir.[24] Bunun için PDB veri tabanından HLA-DRB10101'in moleküler yapısı alınmıştır ve MHCII'ye ait anormal atomlar NOTPAD⁺⁺ programıyla MHC'nin yapısından çıkarılmıştır. Docking çalışmanın doğruluğunu ortaya koymak için bir defa da HEX programında kontrol olarak Bovin Serum Albumin (reseptör olarak) ile HLA-DRB10101(ligand olarak) 'in docking'i yapılmıştır.[25]

3. Bulgular

Bu çalışmada pertussis toxin subunit 1 (NCBI accession no: VO_0011034), pertussis toxin subunit 2, (NCBI accession no: VO_0011037), pertussis toxin subunit 3 (NCBI accession no: VO_0011038), pertussis toxin subunit 4 (NCBI accession no: VO_0011032) chaperonin GroEL (NCBI accession no: VO_0011035) ve filamentous hemagglutinin (NCBI accession no: VO_0011030) proteinleri kullanarak bu proteinlere ait epitoplara seçilmiştir. Bu çalışmada B hücreleri epitoplara için 0.35 eşik ve T hücreleri epitoplara için p < 0.05 değeri

PVTSPAWADDPPATVYRYSRPPEDVFQ	TAWGNNDN
VQVQSAPPKPAVAKQAPAPKPKPKPKAERPKGKTTPLS	AVEAERAGRG
VAGEDYQAEQRATIDVGQTKDAPARLVQGGVKGTLNQDAAQA	NFYG
SKEEQYDYEDATF	GIKDAPPGAGF
FGAPTVTKDGVS	KTGQPAADHYV
ASKTSDNAGDGTITA	PYEVT
CQVGSNSAFVSTSSRR	GAAASSPDAH
KHWAGGGSEFSV	LKRPSSP
LFTQQGGAYGRCPNGTR	TTLGPKGR
KPVTTSKEIA	VITVEDGKSL
SISANSAS	INSPEKQVAAL

Şekil 1. Tasarlanan aşya ait B hücreleri epitoplara

baz alınmıştır ve bu değerlerin üzerindeki epitoplara seçilmiştir. Daha sonra bu epitoplara tek tek antijenitesi, alerjene sitesi ve toksisitesi analiz edilmiştir alerjik veya toksik etkisi olan epitoplara yapıdan çıkarılmıştır. Kimerik yapıda olan peptid aşısına ait antijenite değeri 0.6707 idi (0.4 eşikinin üstünde). Antijenite değerinin 0.4'ün üstünde olması bu proteinin immünojen özelliğinin olmasını ortaya koymuştur. Oluşturulan peptid yapıdaki aşıda tekrar aynı analizler yapılmıştır ve böylece aşının alerjik ve toksik olmadığı tespit edilmiştir. Aşı tasarımında kullanılan B epitoplara Şekil 1'de ve T epitoplara ise Şekil 2'de gösterilmiştir. Aşının toksisite analizi Şekil 3'de gösterilmiştir

Figure 2 displays multiple tables of T cell epitopes for various MHC classes and alleles. Each table lists the MHC Class, MHC Allele, and the corresponding p-value for the epitope. The tables are arranged in a grid format, showing results for different MHC classes and alleles.

MHC Class	MHC Allele	p-value
H	HLA-B*1301	0.00103
H	HLA-B*1	0.00127
H	HLA-B*31:01	0.00173
H	HLA-B*34:01	0.00345
H	HLA-B*37:02	0.00501
H	HLA-B*33:01	0.0051
H	HLA-B*35:01	0.00682
H	HLA-DRB1*04:02	0.00746
H	HLA-DRB1*01:01	0.011
H	HLA-DRB1*03:01	0.0191
H	H-2-KB	0.0209
H	H-2-KI	0.03
H	H-2-CE	0.0337
H	HLA-DRB1*08:01	0.0404

MHC Class	MHC Allele	p-value
H	HLA-DRB1*04:02	0.000164
H	HLA-DRB1*04:01	0.000983
H	HLA-DRB5	0.00126
H	HLA-DR7	0.00142
H	HLA-DR13	0.00368
H	HLA-DRA1*02:01:DRB1*05:01	0.00565
H	HLA-DRA1*02:01:DRB1*01:01	0.00578
H	HLA-DRA	0.013
H	H-2-KB	0.0135
H	H-2-CE	0.018
H	Mamu-B*17	0.023
H	HLA-DR11	0.0305
H	HLA-A*23:01	0.0339
H	HLA-DR13	0.038
H	HLA-DRB1*08:02	0.038

MHC Class	MHC Allele	p-value
H	HLA-B*18:01	0.000677
H	HLA-DRB3*01:01	0.000883
H	HLA-DRA1*02:01:DRB1*05:01	0.000922
H	HLA-B*40:01	0.0063
H	HLA-B*40:02	0.00694
H	HLA-B*33:01	0.0103
H	HLA-B*15:01	0.0113
H	Mamu-A*11	0.0136
H	HLA-DQA1*01:01:DQB1*05:01	0.0175
H	HLA-DRA1*03:01:DRB1*04:02	0.0189
H	HLA-B*39:01	0.0206
H	H-2-KA	0.0209
H	Mamu-B*17	0.0256
H	HLA-DRB1*03:01	0.0281
H	HLA-DRA1*02:01:DRB1*01:01	0.0349

MHC Class	MHC Allele	p-value
H	HLA-DRA	0.00315
H	HLA-DR7	0.00368
H	HLA-DRB1*07:01	0.00629
H	HLA-DRB1*12:01	0.0136
H	HLA-DRB1*04:02	0.0214
H	HLA-DRB1*04:03	0.0219
H	HLA-DRB1*05:01	0.0281
H	HLA-DRB1*06:02	0.0314
H	HLA-DRB1*04:05	0.0328
H	HLA-DQA1*03:01:DQB1*03:01	0.034
H	HLA-DRB1*01:01	0.0349

MHC Class	MHC Allele	p-value
H	HLA-DRB1*04:04	0.000178
H	HLA-DRB5*01:01	0.00054
H	HLA-DRB1*07:01	0.00101
H	HLA-DRB1*01:01	0.00148
H	HLA-DRB1*04:05	0.00312
H	HLA-DRB4*01:01	0.00389
H	HLA-DRB1*11:01	0.00884
H	HLA-DRA	0.0337

MHC Class	MHC Allele	p-value
H	HLA-DRB1*04:04	0.000178
H	HLA-DRB5*01:01	0.00054
H	HLA-DRB1*07:01	0.00101
H	HLA-DRB1*01:01	0.00145
H	HLA-DRB1*04:05	0.00312
H	HLA-DRB4*01:01	0.00389
H	HLA-DRB1*11:01	0.00884
H	HLA-DRA	0.0337

MHC Class	MHC Allele	p-value
H	HLA-A*55:01	0.00991
H	HLA-A*58:02	0.01
H	HLA-DRA1*03:01:DRB1*04:02	0.0102
H	HLA-DRA	0.0136
H	HLA-A*7	0.0154
H	HLA-DRB1*04:05	0.0238
H	HLA-DR2	0.0264
H	HLA-B*58:01	0.0307
H	HLA-DRB1*01:01	0.0471

MHC Class	MHC Allele	p-value
H	HLA-DRB1*04:05	0.00788
H	HLA-DRB5*01:01	0.0133
H	HLA-B*15:02	0.016
H	HLA-DRB4*01:01	0.0161
H	HLA-DRB1*01:01	0.0218
H	HLA-DRB1*02:02	0.0219
H	HLA-DRB1*07:01	0.0313
H	HLA-DRB1*13:02	0.0383
H	HLA-DRB1*09:01	0.0404

MHC Class	MHC Allele	p-value
H	HLA-DQA1*08:01:DQB1*03:01	0.00131
H	HLA-B*34:01	0.0103
H	HLA-DQA1*01:02:DQB1*06:02	0.0127
H	HLA-DRB3*02:02	0.0136
H	HLA-DRB1*04:03	0.0206
H	HLA-DRB1*01:01	0.0265

MHC Class	MHC Allele	p-value
H	HLA-DRB1*13:02	0.0217
H	HLA-DRA	0.0286
H	HLA-DRB1*04:03	0.0298
H	HLA-DQA1*05:01:DQB1*03:01	0.0355
H	HLA-DRB1*01:01	0.0471
H	HLA-DRB1*11:01	0.0474

MHC Class	MHC Allele	p-value
H	HLA-DRB1*12:01	0.0117
H	HLA-DRB1*11:01	0.0188
H	HLA-B*58:01	0.0198
H	HLA-DRB1*01:01	0.0291
H	HLA-A*02:03	0.0455

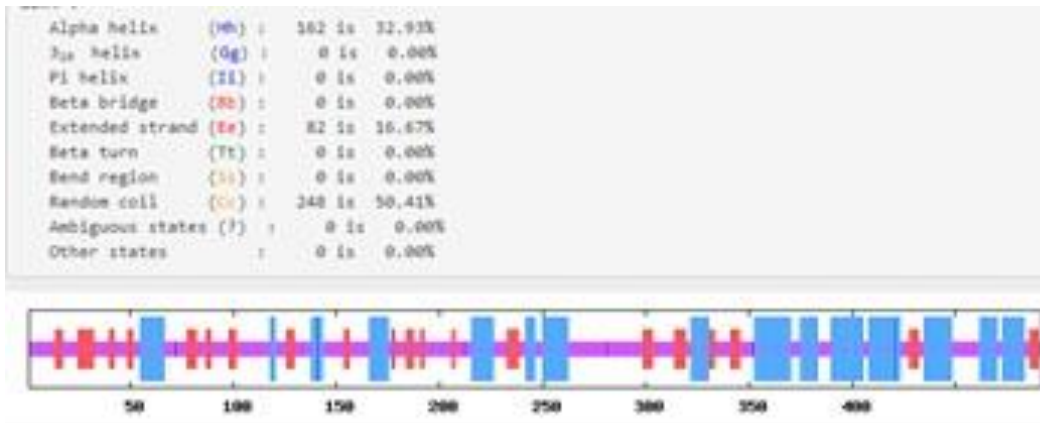
Şekil 2. Tasarlanan aşya ait T hücreleri epitoplara

Peptides Scanned from Original Protein							
Peptide Sequence	SVM score	Prediction	Hydrophobicity	Hydrophobicity	Hydrophobicity	Change	Mol wt
PVTSFVWADO	-1.04	Non-Toxin	-0.06	-0.48	0.00	-2.00	1058.23
VTSFVWADDP	-0.95	Non-Toxin	-0.06	-0.48	0.00	-2.00	1058.23
TSPVWADDPF	-0.55	Non-Toxin	-0.12	-1.06	0.15	-2.00	1056.21
SFVWADDPFA	-0.74	Non-Toxin	-0.08	-0.81	0.14	-2.00	1026.18
FVWADDPFAT	-0.82	Non-Toxin	-0.07	-0.80	0.07	-2.00	1040.21
AVWADDPFATV	-0.70	Non-Toxin	-0.01	-0.22	-0.08	-2.00	1042.23
WADDPFATVY	-1.04	Non-Toxin	-0.03	-0.53	-0.26	-2.00	1134.33
ADDPFATVYR	-0.95	Non-Toxin	-0.25	-0.89	0.38	-1.00	1104.30
DDPFATVYRY	-0.73	Non-Toxin	-0.27	-1.20	0.20	-1.00	1196.40
DFPATVYRYD	-0.62	Non-Toxin	-0.27	-1.20	0.20	-1.00	1196.40
FPATVYRYDS	-0.77	Non-Toxin	-0.22	-0.93	-0.07	0.00	1168.39
PATVYRYDSH	-0.74	Non-Toxin	-0.39	-1.22	0.23	1.00	1227.46
ATVYRYDSRP	-0.63	Non-Toxin	-0.39	-1.22	0.23	1.00	1227.46
TVYRYDSRPF	-0.43	Non-Toxin	-0.42	-1.56	0.28	1.00	1253.50
VYRYDSRPPE	-0.45	Non-Toxin	-0.47	-1.84	0.62	0.00	1281.51
YRYDSRPPED	-0.22	Non-Toxin	-0.59	-2.61	1.07	-1.00	1297.46
RYDSRPPEDV	-0.01	Non-Toxin	-0.54	-2.06	1.15	-1.00	1233.42
YDSRPPEDVF	-0.27	Non-Toxin	-0.30	-1.33	0.60	-2.00	1224.41
DSRPPEDVFG	-0.57	Non-Toxin	-0.38	-1.55	0.65	-2.00	1189.37
SRPPEDVFOK	-0.53	Non-Toxin	-0.41	-1.59	0.85	0.00	1202.46
RPPEDVFOOK	-0.66	Non-Toxin	-0.50	-1.90	1.12	1.00	1243.56

Şekil 3. Tasarlanan aşının toksisite analizi

Aday aşının fizikokimyasal özelliği protparam programında analiz edilmiştir. Boğmaca hastalığa karşı tasarlanan aşının molekül ağırlığı 53.718 kDa olmuştur. Aday aşının yarılanma ömrü memeli hücrelerinde 20 saatten (>20 saat) fazla, mayada 20 saat ve *E. coli*'de ise 10 saatten fazla (>10 saat) olmuştur. Tasarlanan aşının Kararsızlık endeksi 37,64 olarak ortaya çıkmıştır bu rakam aşının stabil olduğunu göstermektedir. Ayrıca alifatik endeksi sonucunda aşının alifatik endeksi 64.31 olarak ortaya çıkmıştır. Bu değer aday aşının sıcaklığa dayanıklılığı özelliği ispatlanmıştır. Bu çalışmada tasarlanan aşına ait hidropatisite (GRAVY) değeri -0.765 olmuştur, dolayısıyla peptid aşı hidrofilik

bir proteindir ve su molekülleri ile etkileşime girebilir ve kolaylıkla çözünür. Bu çalışmada tasarlanan aday aşına ait alpha helix değeri değeri 32.93% olmuştur (Şekil 4). SWISS-MODEL programı kullanarak aşının 3D yapısı çizilmiştir (Şekil 5) ve bu programdan elde edilen sonuçlara göre protein yapısındaki amino asitler normal bölgelerde yer almıştır. 3D rafine yazılımı vasıtasıyla proteinin 3d yapısı rafine edilmiştir (Şekil 6) ve bu analiz sonucunda aşının 3D rafine skoru 8276, GDT-HA skoru 0.980 ve GTD-TS skoru 1.000 olarak ortaya çıkmıştır. Bu değerler aday aşının yapısal stabilitesini açıklamaktadır.



Şekil 4. Tasarlanan aşının alfa helix değerinin belirlenmesi

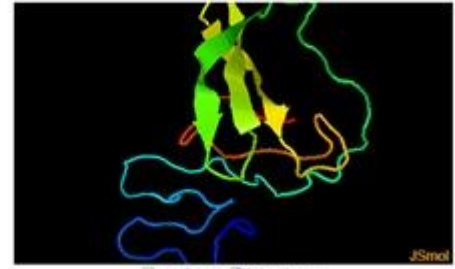


Şekil 5. Tasarlanan proteinin 3D yapısı

Çalışmanın devamında peptid yapısında yer alan aminoasitlerin anormal bölgelerde yer alıp almadıklarını analiz etmek için Ramachandran analizi uygulanmıştır (Şekil 7). Bu analiz sonucu amino asitlerden sadece 1.2%'si anormal bölgelerde yer almıştır. Bu değer ise aday aşının stabil olduğunu kanıtlamıştır. Bu araştırmada tasarladığımız boğmaca aşısının sınıf II MHC (HLA-DRB10101)'ye bağlanma afinitesi HEX protein protein docking programıyla (Hex 8.0.0) değerlendirilmiştir. Bu amaçla HLA-DRB1 * 0101'in 3D yapısı PDB veri tabanından elde edilmiştir ve ligand olarak programa yüklenmiştir. Daha sonra tasarladığımız aşı reseptör olarak programa tanıtılmıştır ve gerekli ayarlar yapıldıktan sonra docking işlemi gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın doğruluğunu göstermek için aynı işlem bir kerede Bovin Serum Albumin proteini ile yapılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre tasarladığımız aşının HLA-DRB10101'ye afinitesi -607.64 ve Bovin Serum Albumin'in affinitesi ise -65,30 olarak program tarafından belirlenmiştir (Şekil 8). Docking analizi sonuçlarına göre tasarlanan aşı kolaylıkla MHC-II'ye bağlanabilir ve bu bağlanma immün yanıtı sebep olabilir.

4. Sonuç

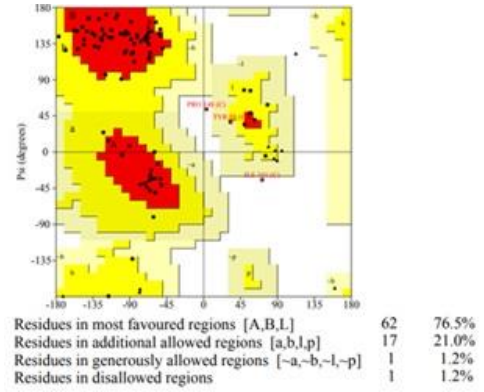
Yapılan bu araştırmada boğmaca hastalığına karşı aşı tasarlanmıştır ve bu aşıya ait farklı analizler yapılmıştır. Bu çalışmada B. pertussis' e ait antijenik özelliği olan farklı proteinler seçilmiştir ve B hücreleri epitoplari ve T hücreleri epitoplari birleştirerek kimerik bir aşı tasarlanmıştır. Aşının tasarımı ve analizinde farklı immünoinformatik programlar kullanılmıştır. En son olarak da tasarlanan aşının MHCII (HLA-DRB10101)'ye afinitesi HEX protein docking programıyla analiz edilmiştir. Bu araştırmada tasarlanan aşıya ait antijenik skorun 0.6707 olması bu aşının immünojenik özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca aşı hem B hücreleri ve hem Sitotoksik T hücreleri tarafından kolaylıkla tanımlanabilir.



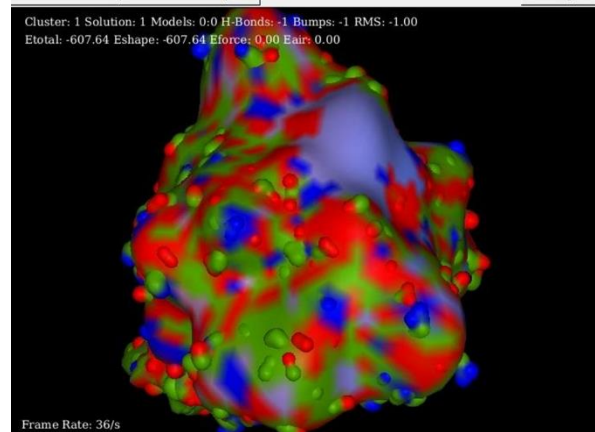
Visualization of refined models are displayed in rainbow colors and initial models in white. Drag the image to rotate model. Scroll the image to zoom in and out. Right-click to access JSmol functions. Visit the tutorial for more information.

Model #	Score	GDT-TS	GDT-HA	RMSD (Å)	MolProbity	RWPI	Refined Model
5	8276.21	1.0000	0.9800	0.316	2.558	-11248.943173	Refined_Model_5

Şekil 6. Tasarlanan aşının rafine analizi



Şekil 7. Tasarlanan aşıya ait Ramachandran analizi sonucu



Şekil 8. Aşı adayın MHCII ile docking sonucu

MHCII'ler ve B lenfositleri hücre dışı antijenleri tanımlayabilirler, bu sebepten dolayı bu çalışmada tasarlanan aşı MHCII ve B lenfosit'lere göre tasarlanmıştır.

Aday aşının kararsızlık endeksi 37.64 olarak ortaya çıkmıştır bu rakam 40'dan küçük olduğundan dolayı bu aşının stabil bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Aşının moleküler ağırlığının 53.718 kDa olması bu aşının biyoteknolojik yollardan elde edilmesinin kolay olabileceğini kanıtlamıştır.[26] Ayrıca alifatik endeks'in 64.31 olması aşının termostabil olduğunu açığa çıkarmıştır. Bu özellik ise aşının saflaştırılmasını kolaylaştırır. GRAVY analizinden elde edilen -0.580 değeri aşının hidrofilik bir protein olduğunu ve su da kolaylıkla çözülebilirliğini göstermişti. Protparam ve PepCalc programlardan elde edilen verilere göre tasarladığımız aşı su da çözünür ve transmembrane helix'i yoktur, dolayısıyla klonlandığında ekspresyonu zorluğu olmayacaktır. Aşının su da çözünebilmesi immünojenik özelliğini artırır.[27] Yapılan analizler sonucunda aşı insan vücudunda 20 saat den fazla stabil olduğu görülmektedir. Aşının uzun süre yapısını koruyabilmesi aşya karşı fazla miktarda antibadi'nin salgılanmasına neden olur. Docking analizinden elde edilen sonuç aday aşının MHC-II'ye yüksek afinitesinin olması bu aşya karşı immün sistemin yanıt oluşturabileceğini göstermektedir.

Bu araştırmada farklı imünoinformatik programlar kullanarak peptid yapısında bir aşı tasarlanmıştır ve analizler sonucu aşının etkili olabileceğine karar verilmiştir. Tüm rekombinant aşuların üretilmesinden önce bilgisayar ortamında farklı testlerle incelenmesi gerekir. Docking analizinden elde edilen sonuçlar aday aşının MHC-II'ye karşı yüksek afiniteye sahip olduğu ve böylece immün yanıt oluşturabileceğini göstermektedir. Tasarlanan aşı E. Coli veya başka konakçı hücrelere aktarıldıktan sonra üretilip ve test edilebilir.

Referanslar

1. Işık, Y, Salman, N, Somer, A, Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları, 1. Baskı, İstanbul, 2007, 259- 63.
2. Özengiz, E, Boğmaca: Her zaman gündemde, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 2005, 35, 215-231.
3. Willems, R.J.L, Mooi, FR, From whole cell to acellular pertussis vaccines, *Reviews in Medical Microbiology*, 1996, 7, 13-21.
4. Kurugöl, Z, Türkiye'de boğmaca epidemiyolojisi: Pekiştirme aşı dozları gerekli mi? *Çocuk Enfeksiyon Dergisi*, 2009, 3, 14-18.
5. World Health Organization, Recommended Surveillance Standards of vaccine preventable diseases: Pertussis, 2003, WHO/V&B/03.01.
6. Neyzi, O, Ertuğrul, T, Somer, A, Somer A, Boğmaca, Pediatri, 4. Baskı, *Nobel Tıp Kitabevi*, İstanbul, 2010, 599-601.
7. Rappuoli, R, Pizza, M, Covacci, A, Bartoloni, A, Nencioni, L, Podda, A, Magistris, MTD, Recombinant Acellular Pertussis Vaccine--From the Laboratory to the Clinic: Improving the Quality of the Immune Response, *FEMS Microbiology Immunology*, 1992, 5, 161-170.
8. Saxena, A, Tamuly, S, Saxena, MK, Cloning, sequencing, and in silico characterization of Omp 28 of Salmonella Typhi (strain MTCC 733) to develop r-DNA vaccine for typhoid fever, *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 2012, 3,133-138.
9. Nascimento., IP, Leite LCC, Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2012, 45, 1102-1111.
10. Arnon, R, Yedidia, TB, Old and new vaccine approaches, *International Immunopharmacol*, 2003, 3,1195 - 1204.
11. <https://www.proteogenix.science/scientific-corner/peptide-synthesis/conventional-vs-peptide-vaccines/>.
12. Bull, JJ, Nuismer, SL, Antia, R, Recombinant vector vaccine evolution, *PLOS Computational Biology*, 2019, 15, 1-20.
13. Dash, R, Das, R, Junaid, MD, Akash, MDFH, Islam, A, Hosen, SMZ, In silico-based vaccine design against Ebola virus glycoprotein,

Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry, 2017, 10, 11-28.

14. Turan, M, Say, A, Boğmaca benzeri öksürüğü olan süt Çocuklarında bordetella pertussis ve Mycoplasma pneumoniae enfeksiyonlarının Araştırılması, Sağlık Bakanlığı Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, İstanbul, 2004.
15. Burns, DL, Gould-Kostka, JL, Kessel, M, Arciniega, JL, Purification and Immunological Characterization of a GroEL-Like Protein from Bordetella pertussis, *Infection and Immunity*, 1991, 59, 1417-1422.
16. Kimura, A, Mountzouros, KT, Relman, DA, Falkow, S, Cowell, JL, Bordetella Pertussis Filamentous Hemagglutinin: Evaluation as a Protective Antigen and Colonization Factor in a Mouse Respiratory Infection Model, *Infection and Immunity*, 1990, 58, 7-16.
17. Dikhit, MR, Kumar, A, Das, S, Dehury, B, Rout, AK, Identification of Potential MHC Class-II-Restricted Epitopes Derived from Leishmania donovani Antigens by Reverse Vaccinology and Evaluation of Their CD4+ T-Cell Responsiveness against Visceral Leishmaniasis, *Frontiers in Immunology*, 2017, 8, 1-17.
18. Norizadehtazehkand, M, Hajipour, O, In silico Design a vaccine Candidate against Corynebacterium diphtheriae, *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology*, 2019, 9, 1082-1089.
19. Doytchinova, IA, Flower, DR, VaxiJen, a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines, *BMC Bioinformatics*, 2007, 8, 1-4.
20. Shey, RA, Ghogomu, SM, Esoh, KK, Nebangwa, ND, Shintouo, CM, In-silico design of a multiepitope vaccine candidate against onchocerciasis and related filarial diseases, *Scientific Reports*, 2019, 9, 4409.
21. Norizadehtazehkand, M, Hajipour, O, Multi Epitope Vaccine Candidate against Mycobacterium Tuberculosis, *Drug Designing & Intellectual Properties International Journal*, 2019, 3, 351-358.
22. Khan, A, Junaid, M, Kaushik, AC, Ali, A, Ali, SS, Mehmood, A, Wei DQ, Computational identification, characterization and validation of potential antigenic peptide vaccines from hrHPVs E6 proteins using immunoinformatics and computational systems biology approaches, *PLoS One*, 2018, 5, 1-9.
23. Shahsavani, N, Sheikhha, MH, Yousefi, H, Sefid, F, In silico Homology Modeling and Epitope Prediction of NadA as a Potential Vaccine Candidate in Neisseria meningitidis, *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 2018, 1, 53-68.
24. <http://www.rcsb.org/structure/5V4N>.
25. Jain, A, Tripathi, P, Shrotriya, A, Chaudhary, R, Singhcorresponding A, In silico analysis and modeling of putative T cell epitopes for vaccine design of Toscana virus, *3 Biotech*, 2015, 4, 497-503.
26. Zaheer, HA, Shehroz, M, Ullah, N, Naz, K, Muhammad, SA, Zhang, T, Amjad, AA, Immunoinformatics Aided Design and Evaluation of a Potential Multi-Epitope Vaccine against Klebsiella Pneumoniae, *Vaccines (Basel)*, 2019, 3, 1-17.
27. Li, WW, Joshi, MD, Singhania, S, Kyle, H, Ramsey, S, Murthy, AK, Peptide Vaccine: Progress and Challenges, *Vaccines (Basel)*, 2014, 3, 515-536.

<http://edergi.cbu.edu.tr/ojs/index.php/cbusbed> isimli yazarın CBU-SBED başlıklı eseri bu Creative Commons Alıntı-Gayriticari4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

