

AKÜ FEMÜBİD 17 (2017) 017101 (312-317)  
DOI: 10.5578/fmbd.53815

AKU J. Sci. Eng. 17 (2017) 017101 (312-317)

### Araştırma Makalesi / Research Article

## Q Humması Hastalığının Antijenik Peptidinin Sentezi ve Karakterizasyonu

**Mesut Karahan**

Üsküdar Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Biyomühendislik Bölümü, 34662, Üsküdar, İstanbul.  
e-posta:mesut.karahan@uskudar.edu.tr

Geliş Tarihi: 11.10.2016 ; Kabul Tarihi: 07.03.2017

### Özet

Q humması gram negatif *Coxiella burnetii* bakterisinin sebep olduğu tüm Türkiye ve Dünya’da yaygın olarak görülen zoonotik bir hastalıktır ve Q humması hastalığı için aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Biyoteknolojik aşılardan peptid aşıları sahip olduğu avantajlar ile ön plana çıkmakta ve son yıllarda yaygın olarak çalışılmaktadır. Bu çalışmada Q humması hastalığına ait m1E41920 peptid epitopu (NH<sub>2</sub>- Ser - Leu - Thr - Trp - His - Lys - His - Glu - Leu - His - Arg - Lys -COOH) mikrodalga destekli katı faz peptid sentezi yöntemiyle sentezlenmiştir. Bu peptidin saflaştırılması ve karakterizasyonu yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve kütle spektrometresi ile yapılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen saf peptid polimerik adjuvanlara bağlanarak Q humması hastalığı için yeni nesil sentetik peptid aşısı geliştirilmesinde kullanılacaktır.

### Anahtar kelimeler

Katı Fazda Peptid Sentezi; Q Humması; Sentetik Peptid Aşısı

## Antigenic Peptide Synthesis and Characterization of Q Fever Disease

### Abstract

Q fever is common zoonotic disease in Turkey and all over the world caused by the gram negative *Coxiella burnetii* bacterium. The studies are ongoing to develop vaccine against for Q fever disease. The biotechnological peptide vaccinations become important because of having many advantages and has been studied widely in recent years. Q fever Disease m1E41920 peptide epitope (NH<sub>2</sub>- Ser - Leu - Thr - Trp - His - Lys - His - Glu - Leu - His - Arg - Lys -COOH) of peptid synthesization integrated by using a microwave supported solid phase peptide synthesis method. The extract and characterization of this peptide were carried out by high pressure liquid chromatography and mass spectrometer. The pure peptide obtained from this study will be used in the development of a new generation synthetic peptide vaccine for Q fever disease by binding to polymeric adjuvants.

### Keywords

Solid Phase Peptide Synthesis, Q Fever, Synthetic Peptide Vaccine

### 1. Giriş

İlk defa Avusturya’da, Q hummasının etiyolojik ajanı olan *Coxiella burnetii* 1937 yılında tanımlanmıştır. *Coxiella burnetii* konağa bağlı faz varyasyonu geçiren tek mikroorganizmadır. Bu mikroorganizma ısı, kurutulma ve kimyasal ajanlara karşı yüksek oranda dirençlidir. Q humması hastalığı küçük (0.2 to 0.4 µm genişliğinde, 0.4 to 1 µm uzunluğunda), gram negatif intrasellüler *Coxiella burnetii* bakterisinin sebep olduğu Dünya’da en sık görülen riketsiyal kaynaklı zoonotik bir hastalıktır (Maurin and Raoult 1999, Gale *et al.* 2015). Oldukça bulaşıcı bir hastalık olan Q humması, tek bir bakteri ile bile insanları enfekte edebilmektedir. İnsanlarda bu enfeksiyonun en

yaygın olarak görüldüğü hastalık kaynakları sığır, keçi ve koyun gibi çiftlik hayvanlarıdır, ayrıca kedi, köpek gibi evcil hayvanların da bu hastalığa sebep olduğu vakalar görülmüştür. Çiftlik hayvanları ile temas eden kişilerde ve risk altındaki hayvanlarla çalışan laboratuvar çalışanları için enfekte olma ihtimali yüksektir. Ülkemizde tarım ve hayvancılıkla uğraşan nüfusun çok olduğu göz önüne alındığında hastalığın risk boyutları ve kapsamının oldukça fazla olduğu görülmektedir (Fournier *et al.* 1998, Özbey *et al.* 2009). Q humması genellikle birden başlayan ateş, titreme, halsizlik, baş ağrısı, iştahsızlık gibi özgül olmayan semptomlarla seyrederek. En yaygın akut formu grip benzeri bir hastalık, alışılmamış bir zatürre ile karakterize edilmiştir. İnsanlarda

© Afyon Kocatepe Üniversitesi

endokarditlerle ilişkili olabilecek kalıcı enfeksiyonlar, Q hummasının kronik formuna yol açabilir ve sonuçta, *Coxiella burnetii* indüklenmiş endokarditler sıklıkla ölümcül olabilmektedir.

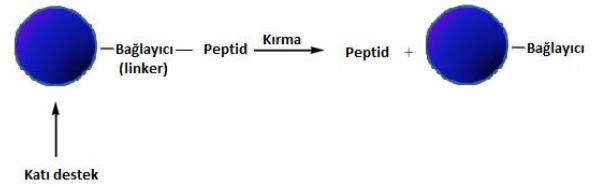
Yaygın olarak görülen Q humması hastalığının için biyoteknolojik aşı geliştirme çalışmaları ise devam etmektedir. Biyoteknolojik aşuların geliştirilmesinde yeni nesil sentetik peptid aşularının diğer aşulara göre birçok avantajı olması sebebiyle öne çıktığı bilinmektedir. Bu avantajlar (WHO, 1999, Yang *et al.* 2001, Özdemir *et al.* 2010, Eroğlu and Kılınc 2011, Moisa and Kolesanova 2012, Derman and Mustafaeva 2015):

- Biyopolimer yapılı adjuvantların hazırlanması ucuz ve basit bir teknoloji yöntemi ile oluşturulmaktadır.
- Peptid antijenleri kimyasal olarak elde edildikleri için canlı mikroorganizmaların üretilmesine ihtiyaç yoktur ve bu nedenle güvenlidir.
- Toksik değildir.
- Kimyasal sentez yoluyla elde edilen peptidlerin ve polimerlerle gerçekleştirilen konjugatlarının mekanizmalarının tam olarak anlaşılması sayesinde yapı-işlev ilişkileri çok iyi bilinmektedir.
- Taşınması sırasında soğuk zincire gereksinim duyulmamaktadır.
- Taşıyıcı polimer kullanılarak gerçekleştirilen peptid konjugasyonun optimum değeri belirlenerek, immun yanıt için gerekli antijen (konjugat) miktarının verilebilmesi sağlanmaktadır.
- Adjuvan özellik gösteren taşıyıcı polimerler, hastalığın antijenik peptid epitoplalarının immunojenliğini ve vücutta kalma süresini arttırmaktadır.

Yeni nesil sentetik peptid aşularının temelini hastalık etkeni virüs ve bakterilerin antijenik bölgelerini oluşturan peptidlerin kimyasal olarak sentezi ve bu sentezlenen peptidlerin adjuvan özellikteki taşıyıcı polimer ve/veya proteinlere farklı yöntemlerle bağlanarak güçlü bir immun yanıtın (aşı sistemi gibi) sağlanmasıdır (Mustafaev and Mustafaeva 2002, Mustafaev, 2004, Derman and Mustafaeva 2015). Bu amaçla Q humması hastalığına karşı etkin, yeni nesil peptid aşularının

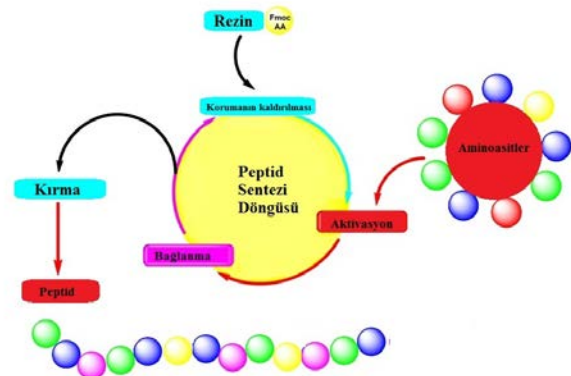
geliştirilmesi için koruma özelliği gösterdiği literatürde (Peng *et al.* 2012, Peng *et al.* 2014) belirtilmiş olan m1E41920 (NH<sub>2</sub>- Ser - Leu - Thr - Trp - His - Lys - His - Glu - Leu - His - Arg - Lys - COOH) peptid dizisi katı faz yöntemi ile sentezlenmiştir.

Katı faz peptid sentezi (SPPS) inert katı bir desteğe (rezin, katı faz, reçine) bağlayıcı (linker) aracılığı ile bağlanmış bir peptid zincirinin uzaması ve istenen diziyeye ulaşıldığında peptidin katı destekten kırma işlemi ile ayrılmasıyla oluşmaktadır (Guzman *et al.* 2007). Katı fazda peptid sentezinin şematik gösterimi Şekil 1'deki gibidir.



Şekil 1. Katı Fazda peptid sentezinin şematik gösterimi (Giraldés, 2003)

Katı fazda peptid sentezi yöntemi üç temel adımdan oluşmaktadır. Buna göre; korumanın kaldırılması (Deprotection), karboksil grubunun aktive edilmesi (Activation) ve peptid bağının oluşmasıdır (Coupling). Bu işlemleri takiben en son eklenmiş aminoasidin koruma grubu kaldırılarak (final deprotection) N- ucu serbest bırakılır. Reçine bağlı peptidin katı destekten ayrılması (cleavage, kırma) ve koruma gruplarının ayrılması (deprotection) olarak özetlenebilir (Özdemir 2008, Özdemir and Mustafaeva, 2011, Vanier 2013, Derman *et al.* 2014). Peptid sentezi döngüsü Şekil 2'de gösterilmiştir.



## Şekil 2. Peptid Sentezi Döngüsü (Int Kyn. 1)

Bu çalışmada literatürde belirtilen Q Humması Hastalığına ait m1E41920 isimli (NH<sub>2</sub>- Ser - Leu - Thr - Trp - His - Lys - His - Glu - Leu - His - Arg - Lys - COOH) peptid epitopunun mikrodalga destekli katı fazda peptid sentezi yöntemi ile sentezlenmesi, saflaştırılması yapılmış ve karakterizasyonu Yüksek Basıncılı (Performanslı) Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve Kütle spektrometresi (LC-MS) ile gerçekleştirilmiştir.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Materyal

Çalışmada kullanılan Q humması hastalığına karşı koruyucu özellik gösteren sentetik peptidinin (NH<sub>2</sub>- Ser - Leu - Thr - Trp - His - Lys - His - Glu - Leu - His - Arg - Lys -COOH) katı faz yöntemi sentezi için gerekli Serin aminoasiti yüklü Wang resin, aminoasitler ve bağlanma reaktifleri NovaBiochem'den; DMF, DCM, TFA, HOBt, HCTU, DIEA, NMP ve Fmoc korumalı aminoasitler Sigma Aldrich'den alınmıştır.

### 2.2. Peptidin Sentezi

Bu çalışmada sentezlenen antijenik peptid mikrodalga destekli katı fazda peptid sentezi cihazında [Liberty (CEM, USA)] Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarlarında sentezlenmiştir. Peptid sentezi mikrodalga destekli SPPS methodu ile DMF içerisinde, 2-(6-chloro-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate/1-hydroxybenzotriazole (HCTU/HOBt) aktivatör (activator) ve N,N-diisopropylethylamine/N-methyl-2-pyrrolidinone (DIEA/NMP) aktivatör bazı, piperidine deprotector olarak kullanılmıştır (DEP). Serin aminoasidi yüklü Wang resin sentezden önce DMF içerisinde 3 saat şişirilerek kullanılmıştır.

### 2.3. Peptidin Rezinden Ayrılması (Kırma, Cleavage)

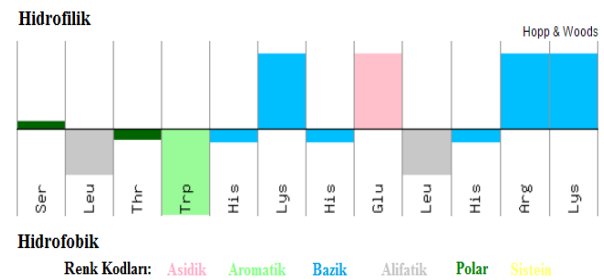
Peptid sentezinin en önemli aşamalarından biri olan kırma (cleavage) işlemi polimerik resin üzerinde büyüyen peptid zincirinin bu rezinden

ayrılması işlemidir. Cihazdan rezine bağlı olarak elde edilen peptid kırma (cleavage) kokteyli [(TFA/thioanisole/EDT/water), (87,5/5/2,5/5 mL, (v/v))] içerisinde 3 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda yavaş yavaş karıştırılmıştır. Soğuk eter (-20 °C) çöktürme ve peptidin ayrılması için kullanılmıştır. Santrifüj işlemi gerçekleştirilen peptide çöktürme prosedürü tekrarlanarak son çökelti yıkanmış ve kurutma işlemi yapılmıştır. Kurutulan peptid -18° C' de saklanır.

### 2.4. Peptidin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

Sentezlenen peptidin HPLC (Shimadzu) ile Shimadzu PRC-ODS C-18 kolon 30x2,1 kolonu kullanılarak UV detektör yardımı ile analizi yapıldı ve saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. LC-MS sistem (Shimadzu LC MS 2010 EV) Electro Spray İyonlaştırıcı (ESI) probu ve Teknokroma Tracer Exel 120 ODS-A, C-18 colon (20 cm length and 0.21 cm inlet diameter) ve HPLC (4.6x250mm,Venusil MP C18-5 kolonunda 220 nm dalga boyunda asetonitril/su gradienti) peptidin karakterizasyonu için kullanılmıştır.

Innovagen's peptide calculator kullanılarak sentezlenen peptidin izoelektrik noktası: pH 10.66; pH 7'deki net yükü 2,3 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca suda iyi çözünür olduğu belirlenmiştir ve ileride aşı prototipi geliştirme çalışmalarında peptid ve polimerle konjugasyonunda bu durumun avantaj sağlayacağı düşünülmektedir. Hidrofilik ve hidrofobik amino asit rezidülerinin şematik gösterimi Şekil 3'deki gibidir.

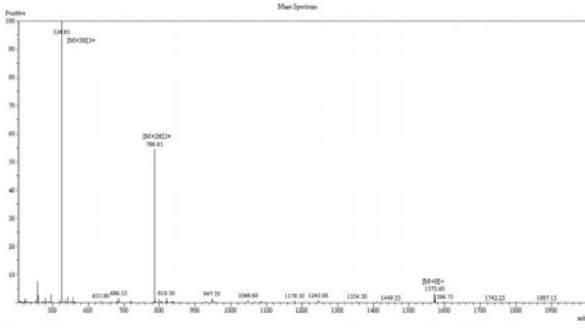


Şekil 3. Peptide ait Hidrofilik ve hidrofobik amino asit rezidülerinin şematik gösterimi (Int Kyn. 2)

## 3. Bulgular

Sentezlenen peptidin molekül ağırlığı LC-MS spektrometresinde analiz edilmiştir. Molekül

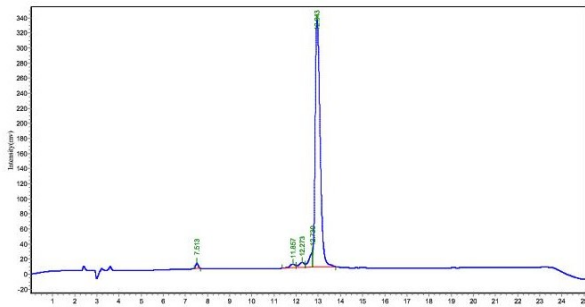
ağırlığını gösteren kütle spektrumu Şekil 4’de gösterilmektedir.



Şekil 4: Peptide ait kütle spektrumu

Kütle spektrumları kullanılarak sentezlenen peptidin molekül ağırlığı hesabı yapılmıştır.  $[M+3H]^{3+} = 524,85 \rightarrow M = 1571,55 \text{ Da}$ ;  $[M+2H]^{2+} = 786,65 \rightarrow M = 1571,30 \text{ Da}$ ;  $[M+H]^+ = 1572,60 \rightarrow M = 1571,60 \text{ Da}$ . Deneysel olarak hesaplanan molekül ağırlıklarının peptidin teorik molekül ağırlığı olan 1571,78 Da değerine oldukça yakın olduğunu gösteren bu hesaplama; peptidin başarılı bir şekilde sentezlendiğinin en büyük destekçisidir.

Şekil 5’te HPLC grafiğinden pik alanları hesaplanarak peptidin saflık yüzdesi belirlenmiştir. Pik alanları ve saflık yüzdeleri Tablo 1’de gösterilmektedir.



Şekil 5. Peptide ait HPLC Kromatogramı

**Tablo 1.** HPLC kromatogram verilerine dayanarak peptidin saflığının hesaplanması

Pik No	Alınma Zamanı	Pik Alanı	Conc.
1	7.513	53623.500	0.9631
2	11.857	81466.586	1.4631
3	12.273	108258.109	1.9443
4	12.730	205400.703	3.6890
5	12.943	5119180.000	91.9405

Tablo 1’de yer alan veriler doğrultusunda peptidin saflığının % 91,94 olduğu söylenebilmektedir.

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Son yıllarda antijenik özellik gösteren sentetik peptidlerin çeşitli adjuvanlara bağlandığı sentetik peptid aşı modelleri üzerine çalışmalara yoğunlaşıldığı ve biyolojik açıdan daha etkili olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (Moisa and Kolesanova 2010, Li *et al.* 2014, Skwarczynski and Toth 2016). Bu tip aşuların maliyet ve etki oranlarında ülke ekonomisine olan katkıları düşünüldüğünde oldukça önemli olduğu bilinmektedir.

Çalışmamızda Q Humması Hastalığı peptidi mikrodalga destekli katı faz yöntemi ile sentezlenmiş ve HPLC ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılma sonrasında karakterizasyon işlemi LC-MS ve farklı kolon kullanılarak HPLC ile gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda elde ettiğimiz LC-MS sonuçlarına göre, belirlenen molekül ağırlığı (1571,60 Da) ile teorik molekül ağırlıklarının (1571,78 Da) birbirine çok yakın olması, peptidin başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir.

Daha önce çalışma grubumuz tarafından yapılan peptid aşı prototiplerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalarda, sentetik peptidlerin farklı özellikteki çeşitli adjuvanlara bağlanması, karakterizasyonu, saflaştırılması ve sonrasında deney hayvanlarından Balb/c türü farelerde yüksek immün yanıt alındığı görülmüştür (Deliloglu *et al.* 2002, Mansuroglu *et al.* 2009, Tuğlu 2012). Yapılan literatür taramasında Q humması hastalığına karşı etkin bir aşı geliştirilmesinin gerekliliği ve m1E41920 antijenik peptid epitopunun tanımının olduğu da ayrıca belirlenmiştir.

Çalışmamızda Q Humması Hastalığına karşı yeni nesil sentetik peptid aşularının geliştirilmesinde hastalığın antijenik özellik gösteren peptidinin tarafımızca sentezlenmesi, saflaştırılması ve karakterizasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Bundan sonra ki devam edecek çalışmalarımızda ise sentezi gerçekleştirilen peptid molekülünün çeşitli polimerik taşıyıcılara çapraz

bağlayıcılar vasıtasıyla kovalent olarak bağlanmasını planlanmaktadır. Oluşturacağımız kovalent bağlı suda çözünen polimer-peptid konjugatlarının karakterizasyonlarının yapılmasından sonra deney hayvanlarına enjekte edilerek antikor yanıtlarının değerlendirilmesiyle uygun polimerik adjuvan türü ve optimum konjugat oranları belirlenmesi ve sonrasında Q hummasına karşı bir aşı prototipi çıkarılmaya çalışılacaktır. Yapılması planlanan bu aşı prototipi, ülkemizin de ihtiyacı olan aşılara karşı geliştirilebilecek yerli aşilar için bir model olacağı inancındayız.

### Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK'ın 113Z938 nolu projesinin desteğiyle gerçekleştirilmiştir. Ayrıca desteklerinden dolayı Doktora öğrencisi Pelin Pelit Arayıcı ve Yrd.Doç.Dr. Zeynep Akdeste'ye teşekkür ederim.

### Kaynaklar

Derman, S., Kızılbey, K., Mansuroğlu, B., Mustafaeva, Z., 2014. Synthesis and characterization of canine parvovirus (CPV) VP2 W-7L-20 synthetic peptide for synthetic vaccine. *Fresen Environ Bul*, **23**(2A), 558-566.

Derman, S. and Mustafaeva A. Z., 2015. Particle size and zeta potential investigation of synthetic peptide-protein conjugates. *Turkish Journal of Biochemistry*, **40**(4), 282-289.

Eroğlu, İ. B. and Kılınc, B. Y., 2011. Bioconjugation of Hepatitis B antigenic peptide with polymeric carriers through various carbodiimide chemistry. *Turkish Journal of Biochemistry*, **36**(3), 222-229.

Fournier, P. E., Thomas, J. M., Raoult, D., 1998. Diagnosis of Q Fever. *J. Clin. Microbiol.*, **36**(7), 1823-1834.

Gale, P., Kelly, L., Mearns, R., Duggan, J., Snary, L. E., 2015. Q fever through consumption of unpasteurised milk and milk products – a risk profile and exposure assessment. *Journal of Applied Microbiology*, **118**, 1083-1095.

Giraldés, J. 2003. Design And Synthesis Of Handles For Solid-Phase Peptide Synthesis And Convergent Peptide Synthesis. Doctoral Dissertation, Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, B.S., University of Puerto Rico, 96.

Guzman, F., Barberis, S., Illanes, A., 2007. Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*, **10**(2), 279-314.

Li, W., Joshi, M. D., Singhania, S., Ramsey, K. H., Murthy, K. A., 2014. Peptide Vaccine: Progress and Challenges. *Vaccines*, **2**, 515-536.

Mansuroglu, B., Derman, S. Kızılbey, K., Mustafaeva, A. Z., 2009. Investigation of Protein and Polymer as a Carrier on Immune System. *International Journal of Natural and Engineering Sciences*, **3**(2), 32-35.

Maurin, M. and Raoult, D., 1999. Q Fever. *Clin Microbiol Rev.*, **12**(4), 518-553.

Moisa, A. A. and Kolesanova, E. F., 2010. Synthetic Peptide Vaccines. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, **4**(4), 321-332.

Moisa, A. A. and Kolesanova, E. F., 2012. Synthetic Peptide Vaccines. Insight and Control of Infectious Disease in Global Scenario. P. K. Roy, 201-228.

Mustafaev, M. 2004. Functionally Biopolymer Systems. *Sigma Journal of Engineering and Natural Science*, **4**, 1-201.

Mustafaev, M. I. and Mustafaeva, Z., 2002. Novel polypeptide-comprising biopolymer systems. *Technology and Health Care*, **10**(3), 217-226.

Özbey, G., Kalender, H., Muz, A., 2009. Q Humması'nın Epidemiyolojisi Ve Teşhisi. *Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences)*, **18**(2), 100-110.

Özdemir, Ö. Z., Karahan, M., Karabulut, E., Mustafaeva, Z. 2010. Characterization of Foot-and-Mouth Disease Virus's Viral Peptides with LC-ESI-MS. *Journal of The Chemical Society of Pakistan*, **32**(4), 531-536.

Özdemir, Ö. Z. and Mustafaeva A. Z. 2011. Development Of Polyelectrolyte Based Bioconjugates Using With Synthetic Viral Peptides. *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences*, **29**, 65-89.

Özdemir, Ö. Z., 2008. Developing bioconjugates which based on polyelectrolytes, using synthetic viral peptides. PhD Thesis. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 201.

Peng, Y., Schoenlaub, L., Elliott, A., Mitchell J. W., Zhang, G., 2014. Characterization of a Lipopolysaccharide-Targeted Monoclonal Antibody and Its Variable Fragments as Candidates for Prophylaxis against the Obligate Intracellular Bacterial Pathogen *Coxiella burnetii*. *Infection and Immunity*, **82**(11), 4530-4541.

Peng, Y., Zhang, Y., Mitchell, J. W., Zhang, G., 2012. Development of a Lipopolysaccharide-Targeted Peptide Mimic Vaccine against Q Fever. *The Journal of Immunology*, **189**, 4909-4920.

Deliloglu, G. S.I., Mustafaev, M., Mustafaeva, Z., Aynagöz, G., Unver, G., Unal N., Celik, N., 2002. Preparation of synthetic peptide FMD vaccine with newly developed antigen- polymere conjugates be used as immonogen and vaccine in veterinary medicine. *FAO, UN2002*, **41**, 349-357.

Skwarczynski, M. and Toth, I., 2016. Peptide-based synthetic vaccines. *Chem. Sci.*, **7**, 842-854.

Tuğlu, S. 2012. Biomolecule-polyelectrolyte conjugates. Yüksek Lisans Tezi. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 201.

Vanier, G. S. 2013. Microwave-Assisted Solid-Phase Peptide Synthesis Based on the Fmoc Protecting Group Strategy (CEM). *Peptide Synthesis and Applications*, Springer: 235-249.

WHO, 1999. Guidelines for the production and quality control of synthetic peptide vaccines. *WHO Technical Report Series*, **No: 889**.

Yang, D., Holt, E. G., Rudolf, P. M., Velders, P. M., Brandt, P. R. M., Kwon, D. E., Kast, W. M., 2001. Peptide Vaccines. *New Vaccine Technologies*. E. W. R. Texas USA: Eureka.com.

#### İnternet kaynakları

- 1- Kitson, D. S. "Carbon-14 Labelled ADCs & Peptides." from [www.almacgroup.com](http://www.almacgroup.com). (29.09.2016).
- 2- Innovagen's peptide property calculator, <http://pepcalc.com/> (29.09.2016)