



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



AĞIZDAN AŞI ADAYI *Clostridium difficile*
YÜZEY PROTEİNİ GENİ *slpA*'nın
Agrobacterium tumefaciens'e AKTARILMASI

NEŞE ÇAĞLAYAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı

DANIŞMAN

Prof. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT

EŞ-DANIŞMAN

Prof. Dr. Zühtü Tanıl KOCAGÖZ

İSTANBUL, 2019

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Neşe Çağlayan'ın
"AĞIZDAN AŞI ADAYI *Clostridium difficile* YÜZEY PROTEİNİ GENİ
slpA'NIN *Agrobacterium tumefaciens*'E AKTARILMASI" başlıklı tez çalışması,
14.01.2019 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. İbrahim İlker Ozyigit (Danışman)

Marmara Üniversitesi

Prof. Dr. Zühtü Tanıl Kocagöz (Üye)

Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi

Prof. Dr. Bahattin Yalçın (Üye)

Marmara Üniversitesi.....

Prof. Dr. Nermin Gözükırmızı (Üye)

İstinye Üniversitesi

Doç. Dr. Filiz Vardar (Üye)

Marmara Üniversitesi.....

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 16.01.2019 tarih
ve 2019/02-02 sayılı kararı ile Neşe Çağlayan'ın Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek
Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Adı SOYADI

ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR

Tez danışmanlığımı üstlenerek bana gösterdiği destekten dolayı değerli danışmanım Sayın **Prof. Dr. İbrahim İlker Özyiğit**'e; tez çalışmalarım boyunca Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi'nin ve Araştırma Laboratuvarı'nın her türlü imkanlarından istifade etmemi sağlayan, bilgileri, tecrübeleri ve sabrıyla bütün çalışma sürecimde desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocam Sayın **Prof. Dr. Zühtü Tanıl Kocagöz**'e; bütün yüksek lisans serüvenim boyunca yanımda olan **Dr. Elif Sever, Hale Muşlu, Esmâ Aybakan** ve ofis arkadaşlarıma, beni benden çok düşünen çok sevdiğim **Kamuran Balyen**'e; bütün eğitim hayatım boyunca, her koşulda en büyük destekçim olan sevgili annem **Sıdıka Çağlayan**'a sonsuz sevgilerimle teşekkür ederim.

Ocak, 2019

Neşe ÇAĞLAYAN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ABSTRACT	v
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER.....	ix
TABLO LİSTESİ.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2. 1. Psödomembranoz Enterokolit Etmeni Olarak <i>Clostridium difficile</i>	3
2. 1. 1. Bakteriyel özellikleri ve taksonomisi	3
2. 1. 2. <i>C. difficile</i> patogenezi ve klinik özellikleri.....	5
2. 1. 3. <i>C. difficile</i> yüzey proteini (Surface- Layer Protein – slpA) ve intestinal kolonizasyondaki rolü	7
2. 1. 4 Dünya’da ve Türkiye’de <i>C. difficile</i> epidemiyolojisi	10
2. 2. Bitkilerde Gen Aktarım Yöntemleri	11
2. 3. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Aracılığıyla Gen Aktarımı.....	14
2. 3. 1. <i>A. tumefaciens</i> bakteriyel özellikleri ve taksonomisi.....	14
2. 3. 2. <i>A. tumefaciens</i> indirekt (dolaylı) gen aktarım mekanizması	18
3. MATERYAL VE METOD	21
3.1. Sterilizasyon Yöntemleri	21
3. 2. Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması	21
3.2.1. Bakteriyel besiyerlerinin hazırlanması	21
3.2.2. Bakteri kültürü ve stoklanması.....	22
3. 3. Bakteriyel DNA Materyalinin Elde Edilmesi	23

3. 4. Primerlerin Dizayn Edilmesi	23
3. 5. <i>LMW_slpA</i> Geninin PZT ile oğaltılması	24
3. 5. 1. Agaroz jel elektroforezi	25
3. 6. Klonlama Vektörünün Modifikasyonu	26
3. 6. 1. Klonlama vektörü.....	26
3. 6. 2. <i>XhoI</i> enzimi ile restriksiyon kesimi	27
3. 6. 3. <i>LMW_slpA</i> geninin pEarleyGate 103 plasmide ligasyonu	27
3. 7. Klonlama Vektörünün Transformasyonu	30
3. 7. 1. <i>E.coli</i> TOP10 kompetent hücrelerin hazırlanması.....	30
3. 7. 2. Rekombinant plazmidin <i>E. coli</i> TOP10 kompetent hücrelerine transformasyonu.....	30
3. 7. 3. Rekombinant plazmidlerin izole edilmesi	31
3. 8. Rekombinant Plazmidlerde Doğrulama İşlemleri	32
3. 8. 1. Restriksiyon haritalama	32
3. 8. 2. Koloni PZT	32
3. 9. <i>LMW_slpA</i> Geninin Dizi Analizi.....	33
3. 10. Rekombinant Plazmidlerin <i>A. tumefaciens</i> 'e Aktarılması.....	33
3. 10. 1. <i>A. tumefaciens</i> bakteri kültürlerinin ve elektrokompotent hücrelerinin hazırlanması	33
3. 10. 2. Elektroporasyon	34
3. 10. 3. PZT ile doğrulama	35
4. BULGULAR	36
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	44
KAYNAKÇA.....	47
ÖZGEÇMİŞ	60

ÖZET

AĞIZDAN AŞI ADAYI *Clostridium difficile* YÜZEY PROTEİNİ GENİ *slpA*'nın *Agrobacterium tumefaciens*'e AKTARILMASI

Clostridium difficile insanlarda antibiyotiğe bağlı ishal ve psödomembranöz enterokolit etmeni olan anaerob bir patojendir. Dünya genelinde antibiyotiğe bağlı ishal vakalarının %15-30'u *C. difficile* kaynaklıdır. *C. difficile* enfeksiyonundan korunmak için hâlihazırda herhangi bir aşı ya da tedavi bulunmamaktadır. Bağırsak epitel hücreleri, *slpA* proteinleri ile uyarıldığında buna karşı anti-*slpA* antikorlarını üretmektedir. Böylece konakçı hücrelere *C. difficile*'nin yapışmasının engellediği son yıllardaki çalışmalarda gösterilmiştir.

Çalışmamız, bitkinin üreteceği Yüzey-Katman Proteinleri (Surface-Layer Proteins- *slpA*) ile *C. difficile*'nin insan bağırsağında kolonizasyonunu engelleyip bu etkene bağlı enfeksiyonların önlenmesini sağlamak üzerine oluşturulmuştur. Aynı zamanda yenilebilir aşı olarak kullanılacak transgenik bitkilerin üretilmesinde, indirekt gen aktarım etmeni olarak rekombinant *A. tumefaciens* bakterisi elde edilmiştir.

Bu amaçla çalışmanın birinci aşamasında, vektör olarak kullanılan *A. tumefaciens*'e öncül proteini sentezleyen *LMW_slpA* geni klonlanmıştır. Transgenik başarı, *LMW_slpA* geninin PZT ve sonrasında yapılan elektroforez sonucu agaroz jelde 947 baz çifti bölgede bantlar görülmüştür.

ABSTRACT

TRANSFERRING ORAL VACCINE CANDIDATE *Clostridium difficile* SURFACE PROTEIN GENE *slpA* TO *Agrobacterium tumefaciens*

Clostridium difficile is an anaerobic bacteria that causes antibiotic-induced diarrhea and pseudomembranous enterocolitis in humans. It is responsible for 15-30 % of antibiotic-related diarrhea cases worldwide. There is currently no vaccine or treatment to prevent *C. difficile* infection. Recent studies have shown that anti-slpA antibodies are produced against the human intestinal epithelial cells when stimulated with slpA proteins and inhibits the adhesion of *C. difficile* to host cells.

With the present study we aim to generate the plants that expressing slpA which prevents binding of *C. difficile* to intestinal epithelial cells of human. Therefore, *C. difficile* causing infection is obscured. Recombinant *A. tumefaciens* bacteria were obtained as indirect gene transfer agent that generate transgenic plants which can be used as edible vaccines.

For this purpose, in the beginning on this study, the *LMW_slpA* gene that synthesized the precursor protein was cloned to the cloning vector of *A. tumefaciens*. Transgenic success was achieved by electrophoresis of the *LMW_slpA* gene.

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
~	Yaklaşık olarak
μ F	Mikrofarad
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
μ M	Mikromolar
BBD	Bitki büyüme düzenleyici
bç	Baz çifti
$^{\circ}$ C	Santigrad derece
CaCl₂	Kalsiyum klorür
CDE	<i>Clostridium difficile</i> enfeksiyonu
chv	Kromozomal virülens gen
cm	Santimetre
CO₂	Karbondioksit
cwp	Hücre duvarı proteini
dH₂O	Distile saf su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonüldeozid trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasedikasit
FliC	Flagellar yapısal filament protein
FliD	Flagellar kapak proteini
g	Gram

GFP	Yeşil floresan protein
GroEL	Isı-şok proteini
HMW	Yüksek moleküler ağırlık
IAA	İndolasetik asit
IgA	İmmüoglobülin A
IgG	İmmüoglobülin G
IPTG	İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit
kb	Kilobaz
KCl	Potasyum klorür
kDa	Kilodalton
kPa	Kilopaskal
kV	Kilovolt
L	Litre
LB	Luria Bertani besiyeri
LBA	Luria Bertani agar
LMW	Düşük moleküler ağırlık
M	Molar
mg	Miligram
MgSO₄	Magnezyum sülfat
MHA	Müller Hinton besiyeri
MHFA	Müller Hinton Fastidious agar
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MS	Murashige-Skoog besiyeri
NA	Nutrient agar

NaCl	Sodyum klorür
ng	Nanogram
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
PEG	Polietilen glikol
pmol	Pikomol
PZT	Polimeraz zincirleme tepkimesi
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikada devir
SLP	Yüzey katman proteini
sn	Saniye
TAE	Tris-asetat EDTA
T-DNA	Transfer deoksirübonükleik asit
Ti	Tümör indükleyici
U	Ünite
V	Volt
v/v	Hacimce
Vir	Virülens gen
xg	3000 rpm'e denk gelen kuvvet
B-NAD	β -Nikotinamid adenin dinükleotid
Ω	Ohm

ŞEKİLLER

- Şekil 2.1.** A. Gram boyama yapılmış *C. difficile* mikroskop görüntüsü. B. Endospore (kırmızı) oluşturan *C. difficile* renklendirilmiş transmisyon elektron mikrografi4
- Şekil 2.2.** Psödomembranöz kolit. İnsan kolonundan psödomembranların kolonoskopi görüntüsü.....6
- Şekil 2.3.** *C. difficile* 630 için *slpA* aminoasit dizisi ve ORF organizasyonu.....9
- Şekil 2.4.** Elektroporasyon uygulamasında akım öncesi, akım verilirken ve akım sonrası hücre membranının elektron mikrografi görüntüsü13
- Şekil 2.5.** Peritrik flagella ile çevrili *A. tumefaciens* elektron mikrografi görüntüsü15
- Şekil 2.6.** A. Kore ginsengi fidelerinin köklerinde tümör oluşumu, B. Domates bitkisi taç bölgesinde *A. tumefaciens* etmeniyle oluşmuş taç tümörü.....17
- Şekil 2.7.** *A. tumefaciens* ile inoküle edilmiş hastalıklı ve sağlıklı havuç dilimleri. Siyah oklar, havuç dokusu üzerinde *A. tumefaciens* kolonilerini göstermektedir.....17
- Şekil 2.8.** Ti Plazmid Genetik Haritası19
- Şekil 3.1** pEarleyGate 103 (c-GFP-His) vektör sistemi. Görüntü SnapGene sürüm 4.2.6 (demo versiyonu) programı kullanılarak oluşturulmuştur.....26
- Şekil 3.2.** İlgilenilen genin pEarleyGate 103 vektöre eklenme adımlarını gösteren şekil. Görüntü SnapGene sürüm 4.2.6 (demo versiyonu) programı kullanılarak oluşturulmuştur.....28
- Şekil 3.3.** *LMW_slpA* geninin pEarleyGate 103 vektör üzerindeki konumunun dairesel gösterimi. Görüntü SnapGene sürüm 4.2.6 (demo versiyonu) programı kullanılarak oluşturulmuştur.....29

Şekil 3.4. <i>LMW_slpA</i> geninin pEarleyGate 103 vektör üzerindeki konumunun lineer gösterimi. Görüntü SnapGene sürüm 4.2.6 (demo versiyonu) programı kullanılarak oluşturulmuştur.....	29
Şekil 4.1. PZT ile sentezlenmiş <i>C. difficile</i> <i>LMW_slpA</i> geninin %1'lik agaroz elektroforezi jel görüntüsü. P: PZT. Ladder: GeneMark Gen100 DNA.....	36
Şekil 4.2. XhoI restriksiyon enzimi ile <i>LMW_slpA</i> geninin ve pEarleyGate 103 klonlama vektörünün kesiminin %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	37
Şekil 4.3. pEarleyGate 103 plazmidde <i>LMW_slpA</i> geninin ligasyon ürününe ait %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. L1: Boş pEarleyGate 103 plazmid, L2 ve L3: <i>LMW_slpA</i> geni içeren rekombinant pEarleyGate 103 plazmid. L: Ligasyon. Ladder: GeneMark 1 kb DNA Ladder.....	38
Şekil 4.4. Kanamisinli LB Agar plakta <i>LMW_slpA</i> geni klonladığımız pEarleyGate 103 plazmidi içeren transformant <i>E. coli</i> TOP10 kolonileri.....	39
Şekil 4.5. Rastgele seçilen 10 koloniden izole edilen plazmidlerin %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Ladder: GeneMark 1 kb DNA Ladder.....	40
Şekil 4.6. Seçilen 10 koloniye ait plasmidin koloni PCR'ına ait %1'lik agaroz jel elektroforezi. K: Koloni. Ladder: GeneMark 100 bp DNA Ladder.....	40
Şekil 4. 7. PZT ile belirlenen koloni plazmid DNA'larının PstI endonukleaz enzimi ile kesimi %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. P: PstI endonukleaz enzimi. Ladder: GeneMark 100 bp DNA Ladder.....	41
Şekil 4.8. Kanamisinli LB Agar plakta <i>LMW_slpA</i> geni klonladığımız pEarleyGate 103 plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> kolonileri.....	42
Şekil 4.9. <i>A. tumefaciens</i> 'ten izole edilen plazmidlerle <i>LMW_slpA</i> için özel hazırlanan ileri ve geri primer çiftiyle yapılan PZT sonucunu gösteren %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	42

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. <i>C. difficile</i> 'in sistematığı.....	3
Tablo 2.2. <i>A. tumefaciens</i> 'in sistematığı.....	14
Tablo 3.1. <i>C. difficile</i> Yüzey-Katman Proteini (<i>LMW_slpA</i>) genlerine ve pEarleyGate 103 plazmide ait 5' yukarı ve 3' aşağı bölgelerini içeren primer dizileri.....	24
Tablo 3.2. PZT protokolünde kullanılan bileşenler, miktarları ve uygulama koşulları.....	25
Tablo 3.3. XhoI restriksiyon kesim işlemi için bileşenler ve miktarları.....	27
Tablo 3.4. Ligasyon işlemi için bileşenler ve miktarları.....	28

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Clostridium difficile, gram-pozitif, çubuk şeklinde, spor oluşturan, zorunlu anaerob ve hareketli bir bakteridir. *C. difficile* insanlar ve hayvanlarda pseudomembranöz enterokolit adı verilen antibiyotik ile ilişkili ishal etmenidir (Borriello ve ark., 1990; Kuipers ve ark., 1998; Cerquetti ve ark., 2000). Kendisi için ortam koşulları kötüleştiğinde spor üretir (Ryan ve ark., 2004). Antibiyotik alımı ile bağırsak normal florasının baskılanması sonucunda, antibiyotiğe dirençli *C. difficile* vejetatif forma geçerek çoğalır ve konak-kolonizasyon faktörleri etkileşimi ile hastalığa neden olur (Voth ve ark., 2005).

TcdA ve *TcdB* genleri ile kodlanan Toksin A (enterotoksin) ve Toksin B (sitotoksin), klinik belirtilerin ortaya çıkmasından sorumlu iki önemli toksindir (Voth ve ark., 2005). Bu toksinlerin etki mekanizmaları aydınlatılmış olmasına karşın, kolonizasyon süreci henüz netleştirilememiştir. Buna karşın *C. difficile* kolonizasyonunda adezinlerin de kilit rol oynadığı birçok duvar proteini olduğu gösterilmiştir (Waligora, 2001; Hennequin ve ark., 2001; Tasteyre ve ark., 2001; Hennequin ve ark., 2003). Bu hücre duvarı yapılarından en çok bulunan ve bağlanmada önemli rolü olduğu düşünülen yüzey katman (“Surface-Layer Protein –SLP-”) proteinleridir (Calabi ve ark., 2002). Yüzey katman proteininin yüksek ve düşük moleküler ağırlıklı (HMW ve LMW) iki altbirimi, 2160 baz çifti büyüklüğündeki *slpA* geni tarafından kodlanır ve öncül protein yüzeyde sistein proteaz enzimi ile iki parçaya ayrılır (Kirby ve ark., 2009). Yüksek moleküler ağırlıklı SLP (HMW- *slp* (42-48 kDa), öncül proteinin C –terminalidir ve gastrointestinal dokuya tutunmada rol alır (Calabi ve ark., 2002). Düşük moleküler ağırlıklı SLP (LMW-*slp*) (32-38 kDa), öncül proteinin N-terminalidir, en dış katmanı kaplar, dış çevreyle ilk teması sağlar ve kolonizasyon sürecinin başlamasında rol aldığı düşünülür (Cerquetti ve ark., 2000; Calabi ve ark., 2002; Eidhin ve ark., 2006).

C. difficile'ye ait *slpA* proteini ile ilgili fareler ve hamsterlar üzerinde yapılan in vivo deneylerde, intra-rektal yoldan lokal immünizasyon yöntemi kullanılmıştır (Pechine ve ark., 2007). Moleküler yöntemlerle elde edilen *slpA* proteini ile aşılaman farelerden alınan dışkı örneklerinde, *slpA*'ya özgül IgA, aşılamanmayan farelere oranla

daha yüksek miktarda saptanmıştır. *slpA*, intra-rektal aşılardan hamsterlerde ise önemli ölçüde özgül IgG üretimine neden olduğu saptanmıştır (Bruxelle ve ark., 2015).

İlaçlar ve aşılar genellikle yüksek maliyetli olup özel saklama koşulları gerektirir. Transgenik bitkilerle yapılan araştırmalar emniyetli, saf ve yüksek etkili terapötik proteinlerin büyük ölçekte üretim fırsatını sunmaktadır. Araştırmacılar taşıma, saklama ve uygulama koşulları açısından geleneksel enjekte edilen aşılarından daha kolay olan yenilebilir aşılar geliştirmek üzere çalışmalar yapmaktadır (Barak ve ark., 2010). Bu bitkilerde üretilen aşılar sadece gereksinim duyulan antijenleri üretir bu nedenle genetik modifikasyonla üretilen aşılar, etken maddeleri sıklıkla zararlı yan etkilere neden olan geleneksel aşılarından daha güvenli olabilir (Conway, 1998).

Son yıllarda *Clostridium difficile* enfeksiyonu (CDE), Amerika, Kanada ve çoğu Avrupa ülkelerinde ülkemizde olduğu gibi çok önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Türkiye’de izole edilmiş sekiz izolat, ribotip 001 olarak bildirilmiştir (Barbut ve ark., 2007). Hastane kaynaklı oluşan enfeksiyonlarla birlikte toplum kaynaklı enfeksiyonlar tüm dünyada ciddi bir yayılım göstermektedir.

Yenilebilir aşı teknolojisiyle, ağız yoluyla alınacak rekombinant bitki organları ile sindirim kanalında IgG üretiminin uyarılması ve immün bağışıklık sağlanması amaçlanmaktadır. Soğuk zincir gereksinimi olmaması, kitlelerce tüketilebilir olması ve uygulamasının zahmetsiz olması üstünlük sağlamaktadır.

Çalışmamızda, gram (-) bir toprak bakterisi olan *A. tumefaciens* ‘in indirekt gen aktarım vektörü olarak kullanılarak, *C. difficile* kolonizasyonunda rolü olduğu çalışmalarla gösterilmiş yüzey katman proteini genini (*slpA*) ihtiva eden plazmidlerin düzenlenmesi ve bitki doku kültürü sistemlerine uygun olarak hazır hale getirilmesi hedeflenmiştir. Bu başarıldığı takdirde ileride yapılacak çalışmalar ile bitkilerde üretilen bu proteinin ağızdan aşılamada etkinliği araştırılabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Psödomembranoz Enterokolit Etmeni Olarak *Clostridium difficile*

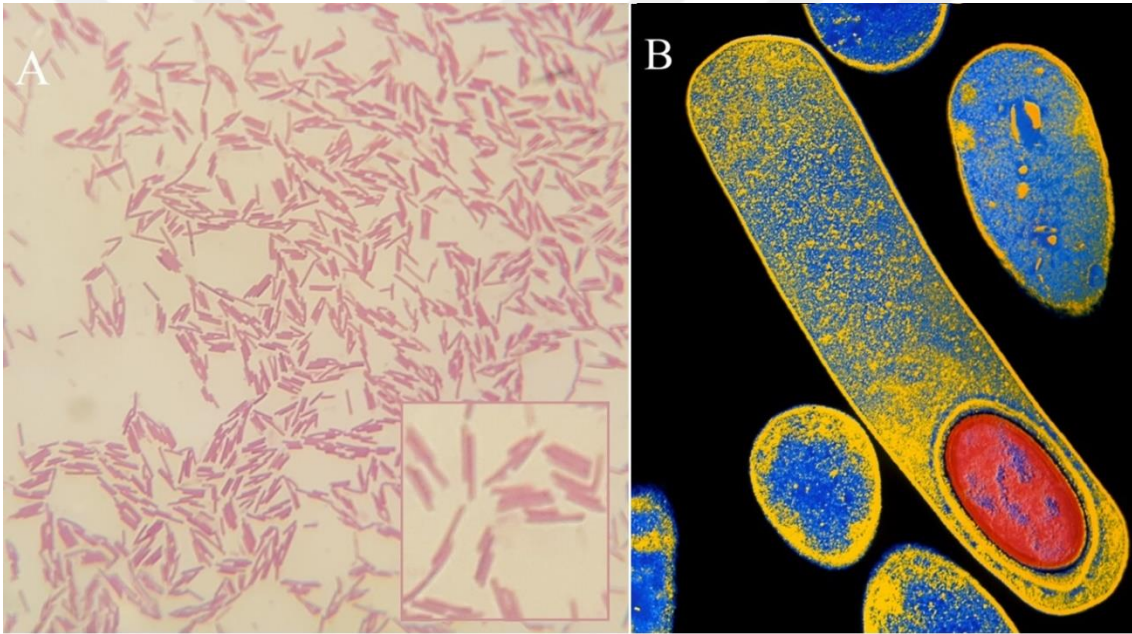
2. 1. 1. Bakteriyel özellikleri ve taksonomisi

Üst Alem	Bacteria
Alem	Eubacteria
Şube	Firmicutes
Sınıf	Clostridia
Takım	Clostridiales
Aile	Clostridiaceae
Cins	<i>Clostridium</i>
Tür	<i>Clostridium difficile</i>

Tablo 2.1. *C. difficile* 'nin sistematığı

Clostridiaceae familyasının bir üyesi olan *C. difficile*, gram-pozitif, çubuk şeklinde, spor oluşturan, zorunlu anaerob ve hareketli bir bakteridir. Peritrik flagella yapısına sahiptir. Flagella hücre yüzeyini tamamen çevreler ve bu sayede yüksek düzeyde hareket yeteneği kazanır (Poxton ve ark., 2005). *C. difficile* Enfeksiyonu (CDE)'nden sorumlu patojendir. İnsanlarda ve hayvanlarda antibiyotiğe bağlı ishal ve psödomembranoz kolit (yalancı zarla örtülü kalın bağırsak iltihabı) etmenidir. Çoğunlukla antibiyotik tedavisini takiben hastaların kolonunu enfekte eden fırsatçı bir patojendir. *C. difficile* bağırsak hücrelerine zarar veren ve bağırsakta iltihaba neden olan iki toksin olan TcdA ve TcdB üretir (Borriello ve ark., 1990; Kuipers ve ark., 1998; Cerquetti ve ark., 2000; Hurley ve ark., 2002; Bartlett, 2006).

C. difficile ismi, iğ anlamına gelen Yunanca “*Kloster*” kelimesinden türemiştir. 1935 yılında ilk defa sağlıklı yenidoğanların dışkılarından elde edilmiş ve izolasyonunun zorluğundan, anaerobic ortama ihtiyaç duyduğundan ve kültürde çok yavaş büyüme gösterdiğinden dolayı *Bacillus difficilis* olarak isimlendirilmiştir (Hall ve O’toole 1935). Bartlett ve arkadaşlarının 1978’de yaptığı çalışmada, *C. difficile*’nin psödomembranöz kolit ve antibiyotik ilişkili ishal hastalarının dışkılarındaki sitotoksin kaynağı olduğu belirlenene kadar nonpatogenik görülmekteydi. (Tedesco, 1974; Barlett, 1978; Elliott ve ark., 2007; McCollum ve ark., 2012).



Şekil 2.1. A. Gram boyama yapılmış *C. difficile* mikroskop görüntüsü. B. Endospore (kırmızı) oluşturan *C. difficile* renklendirilmiş transmisyon elektron mikrografi (Aslam ve ark., 2005)

C. difficile dışkı- ağız yoluyla ya da sporlarla kontamine yüzeylerden temasla bulaşır. Optimal üreme ısısı 37°C (98.6 °F)’dir, bu da insan vücudunu *C. difficile* için ideal bir konak haline getirir (Vonberg ve ark., 2008). Sporların asidine gösterdiği direnç ile mideden zarar görmeden geçebilirler. Bağırsakta vejetatif forma geçerek çoğalırlar. Bağırsak mikroflorasına yerleşen *C. difficile*, antibiyotik etkisiyle

mikroflorayı baskılar ve bunun sonucunda kolonize olur. Antibiyotiğe dirençli *C. difficile* vejetatif formda konak-kolonizasyon faktörleri etkileşimi ile hastalığa neden olur (Voth ve ark., 2005). Vejetatif formdaki anaerobik *C. difficile* cansız yüzeyde 24 saate kadar canlılığını sürdürebilmesine karşın sporlar oksijenli ortam ve cansız yüzeyde 2 seneye kadar canlı kalabilir (McCollum ve ark., 2012).

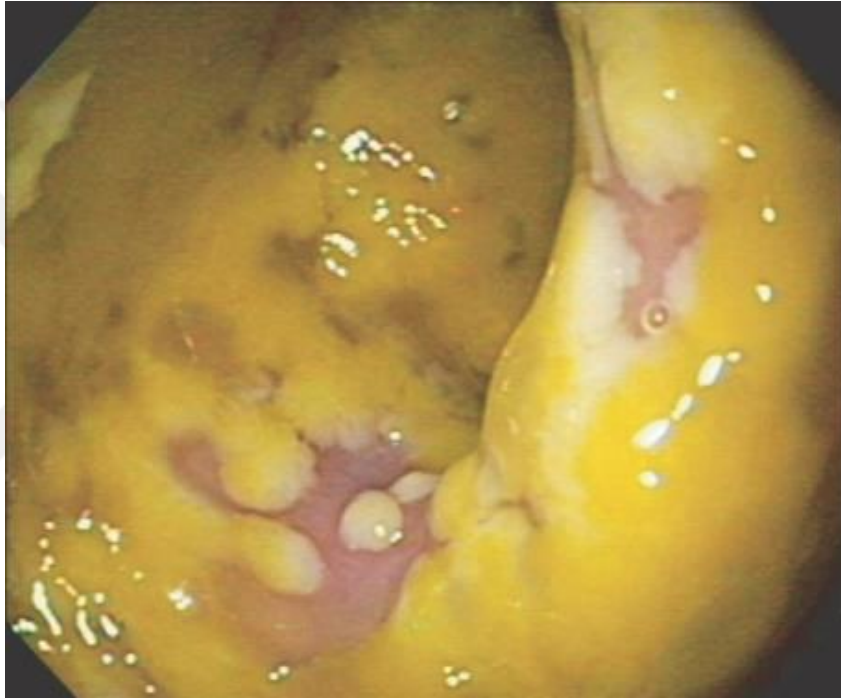
Hastanelerde ve diğer sağlık kuruluşlarında bakterileri taşıyan insanların yüzdesi çok daha fazladır ve bu iletimin kesilmesi oldukça zordur (Mayo Clinic, 2013). Sıklıkla hastane ve diğer sağlık kuruluşlarından yayılım gösterse de toprak, kanalizasyon ve diğer memelilerin dışkılarında da kolaylıkla bulunabilir (al Saif ve Brazier, 1996).

2. 1. 2. *C. difficile* patogenezi ve klinik özellikleri

C. difficile'nin sebep olduğu ishal vakalarında en önemli faktör uzun süreli ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımınıdır. Öncül hastalığın şiddeti, ilerlemiş yaş, bağışıklık durumu, gastrointestinal sisteme dışarıdan yapılan müdahaleler ve hastaneden yatma süresi diğer risk faktörleridir (Bignardi, 1998; Cohen ve ark., 2010). Antibiyotik kullanımına bağlı ishal semptomları, kullanım esnasında ve antibiyotik tedavisinin bitmesini takip eden 8 hafta içinde görülebilir (Simor, 2010). Antibiyotikle ilişkili *C. difficile* enfeksiyonu (CDE) tablolarının ortaya çıkışında beta-laktam antibiyotik grubunun ön planda olduğu gözlenmiş, ikincil olarak kinolon kullanımını, aminoglikozidlerin takip ettiği görülmüştür (Urban ve ark., 2002; Deniz ve ark., 2011). Antibiyotik kullanımına bağlı olarak mikroorganizmaların birbirleriyle rekabet halinde bulunduğu bağırsak florasının dengesi bozulur ve baskılanan *C. difficile* sporları aktif halde vejetatif forma geçerek toksin salgılar (Leclair ve ark., 2010). Hastalık, belirti göstermeyen kolonizasyondan, orta şiddetli ishal, kolit ve ileri aşamalarda ölüme varan klinik tablolarda seyredebilir. Bazı hastalarda, cerrahi müdahaleyle kalın bağırsağın alınması *C. difficile* tedavisi için en acil yoldur. Hastalık ortadan kalktıktan sonra bile çoğu hastada ishal sıkıntısı devam etmekte, hastaların 1/5'inde hastalığın nüksetmesi sıklıkla görülen bir klinik tablo oluşturmaktadır (Barnett, 2012).

C. difficile enfeksiyonu sebepli ishal, hafif-orta şiddetli karın ağrısı, iştahsızlık, bulantı, kusma, sekretuar ishal ve dışkıda bol lökosit varlığıyla seyreder. Ateş ve halsizlik nadiren de olsa görülebilir. Kolit vakalarında ise bu belirtilere ek olarak,

yüksek ateş (>38°C) ve dışkıda eritrosit de görülür (Johnson, 2009). Kolit en sık görülen CDE tablosudur. Psödomembranöz olup olmamasından bağımsız olarak klinik seyri ciddi etkiler göstermektedir. Psödomembranöz kolit ise *C. difficile* için tipiktir. Semptomları kolitten daha ağırdır ve hasta endoskopik muayenelerinde kalın bağırsakta sarı renkli lezyon artışı ve kolorektal mukozada psödomembran oluşumu görülür. Psödomembranların kolonoskopi ile görülmesi, tanı için gerekli olmasa da, *C. difficile* tanısını doğrular (Şekil 2.2.). (Vaishnavi, 2010; Burke ve Lamont, 2014).



Şekil 2.2. Psödomembranöz kolit. İnsan kolonundan psödomembranların kolonoskopi görüntüsü.

C. difficile türleri, Toksin A (enterotoksin) ve Toksin B (sitotoksin) olarak adlandırılan iki toksin üretmektedir (Voth ve ark., 2005). Bu toksinler birbirine benzer etki mekanizmalarına sahiptir ve patojenik lokus olarak adlandırılan genom bölgesi genleri tarafından kodlanır. ToksinA ve toksinB'nin sentezi ve düzenlenmesinden sorumlu *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdR* ve *tcdE* genleri bu patojenik lokusta bulunmaktadır. Hastalık yapmayan *C. difficile* suşlarında ise bu patojenik lokus bölgesi yoktur (Johnson, 2009).

Asemptomatik *C. difficile* taşıyıcılarında Toksin A için yüksek IgG üretimi saptanmıştır. Bu antikoların CDE'nin klinik semptomlarının ortaya çıkmasını önlediği gösterilmiştir (Kyne ve ark., 2000). Klinik semptomların ortaya çıkmasından büyük çoğunlukla Toksin A ve Toksin B sorumludur ve her ikisi de sitotoksik aktiviteye sahiptir (Voth ve ark., 2005). Endositozla bağırsak epitel hücrelerine giren toksinler, hücre iskeletinin önemli proteinlerinden Ras ve Rho proteinlerinin aktivasyonunu glikolizasyon ile durdurarak hücre iskelet yapısını bozarlar. İskelet yapısı bozulan hücre içinde bağlar kopar ve permeabilite artışı sekretuar ishal görülmesine neden olur (Poxton ve ark., 2001; Johnson, 2009). Aynı zamanda toksinlerin, bazı sitokinlerin salgılanmasıyla inflamatuvar yanıtın ve psödomembran yapısının oluşmasına sebep oldukları anlaşılmıştır (Poxton ve ark., 2001).

Kolon mukozasında reseptör gelişimi yeterli olmadığından yenidoğanlarda %50'yi aşan oranda asemptomatik taşıyıcılık görülmektedir. Bebeklerdeki bu yüksek taşıyıcılık yüzdeleri 2 yaşından itibaren azalarak erişkinlerdeki seviyelere iner (Yassin ve ark., 2001). Sağlık çalışanlarında ise taşıyıcılık oranı %20'dir (Riggs, 2007). Sağlıklı yetişkinlerde yaş ilerledikçe taşıyıcılık oranları (%15-25) yüksek görülmektedir. Bunun sebebi tam olarak netleştirilemese de immün yanıtın ilerleyen yaşlarda azalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Spencer, 1998; Yassin ve ark., 2001).

2. 1. 3. *C. difficile* yüzey proteini (Surface- Layer Protein – slpA) ve intestinal kolonizasyondaki rolü

C. difficile bağırsak yüzeyinde çoğalmak ve toksin salgılayabilmek için sağlıklı bağırsak florasının dengesinin bozulmasına ihtiyaç duymaktadır. *C. difficile* enfeksiyonunda bağırsak mikroflorası oldukça önemli koruyucu bir faktördür. Mikrofloranın bu koruyucu etkisine **kolonizasyon direnci** denilmektedir. Bu sebeple antibiyotik kullanımı enfeksiyon oluşması ile doğrudan ilişkilidir (Boriello, 1998; Spencer, 1998; Yılmaz ve ark., 2000; Yassin ve ark., 2001).

Diğer birçok enterik patojende olduğu gibi, *C. difficile* de konak kolonizasyonunu başlatabilmek için bağırsak mukozasına bağlanmalıdır (Kyne ve ark., 2001; Vedantam ve ark., 2012). *C. difficile*'nin salgıladığı toksin A ve B, klinik belirtilerin görülmesindeki etki mekanizmaları ortaya konulmuş olmasına rağmen

kolonize olma süreci net olarak belirlenememiştir. Fakat *C. difficile* kolonizasyonunda adezinlerin kilit rol oynadığı çok sayıda duvar proteini olduğu gösterilmiştir (Waligora, 2001; Hennequin ve ark., 2001; Tasteyre ve ark., 2001; Hennequin ve ark., 2003). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, *C. difficile* bağırsak yüzeyinde kolonizasyon sürecinde hücre duvarı yüzey proteinlerinin etkin olduğu gösterilmektedir (Calabi ve ark., 2002).

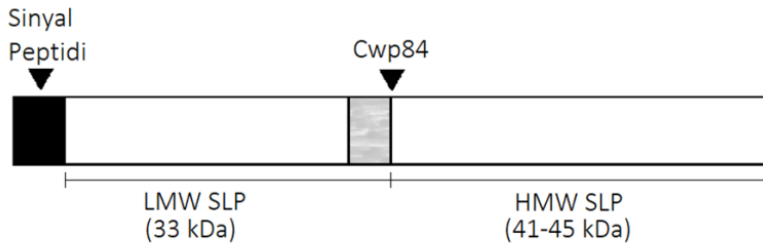
Çoklu *C. difficile* adezinleri, flagellar yapısal filament proteini FliC, flagellar kapak proteini FliD (Tasteyre ve ark., 2001), fibronektin bağlayan proteinler (Hennequin ve ark., 2003; Barketi-Klai ve ark., 2011), bir ısı-şok proteini, GroEL (Ternan ve ark., 2012), yüzey ilişkili, ısı-şok-uyarılmış adezin, Cwp66 (Waligora ve ark., 2001) ve yüzey proteini, SlpA (Calabi ve ark., 2001; Calabi ve ark., 2002; Calabi ve Fairweather, 2002) olarak tanımlanmıştır. SlpA, biyolojik olarak farklı iki birim, yüksek moleküler ağırlıklı (HMW) ve düşük moleküler ağırlıklı (LMW) alt üniteleri içerir, bunlar tek bir prekürsör proteinin hücre duvarı proteini (Cell Wall Protein) Cwp84 aracılığıyla bölünmesiyle elde edilir ve bakteriyel yüzey üzerinde bir parakristalin kafes içine monte edilir. *C. difficile* hücre duvarı yapılarından en çok bulunan ve bağlanmada önemli rolü olduğu düşünülen adezin, yüzey-katman (“Surface-Layer Protein –SLP-”) proteinleridir (Calabi ve ark., 2002).

SlpA geni, diğer birçok yüzey ilişkili proteini kodlayan 17 gen dizisindeki iki gen tarafından kodlanır (Cerquetti ve ark., 2000; Karjalainen ve ark., 2001). *slpA* geni düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı (LMW ve HMW) iki altbirimi, yaklaşık 2160 baz çifti büyüklüğündeki *slpA* geni tarafından kodlanır ve öncül protein yüzeyde sistein proteaz enzimi ile iki parçaya ayrılır (Kirby ve ark., 2009). Yüksek moleküler ağırlıklı yüzey katman proteini (HMW_*slpA* - 42-48 kDa), öncül proteinin C-terminalidir ve gastrointestinal dokuya tutunmayı sağlar (Calabi ve ark., 2002). Düşük moleküler ağırlıklı yüzey katman proteini (LMW_*slpA* - 32-38 kDa), öncül proteinin N-terminalidir ve bakterinin en dış katmanını kaplar (**Şekil. 2.3. B.**) (Cerquetti ve ark., 2000; Calabi ve ark., 2002; Eidhin ve ark., 2006).

A

1 MNKKNIAIAM SGLTVLASAA PVFAATTGTQ GYTVVKNDWK KAVKQLQDGL KDNSIGKITV
61 SFNDGVVGEV APKSANKKAD RDAAAELYN LVNTQLDKLG DGDYVDFSVD YNLENKIITN
121 QADAEAIIVTK LNSLNEKTLI DIATKDTFGM VSKTQDSEK NVAATKALKV KDVATFGLKS
181 GSEDGTGYVV EMKAGAVEDK YGKVG DSTAG IAINLPSTGL EYAGKGTID FNKTLKVDVT
241 GGSTPSAVAV SGFVTKDDTD LAKSGTINVR VINAKEESID IDASSYTSAE NLAKRYVDFP
301 DEISEAYKAI VALQNDGIES NLVQLVNGKY QVIFYPEGKR LETKSANDTI ASQDTPAKVV
361 IKANKLKDLK DYVDDLKTYN NTYSNVVTV GEDRIETAIE LSSKYNSDD KNAITDKAVN
421 DIVLVGSTSI VDGLVASPLA SEKTAPLLLT SKDKLDSSVK SEIKRVMNLK SDTGINTSKK
481 VYLAGGVNSI SKDVENELKN MGLKVTRLG EDRYETSLAI ADEIGLDNDK AFVVGGTGLA
541 DAMSIAPVAS QLKGDATPI VVVDGKAKEI SDDAKSFLGT SDVDIIGGKN SVSKEIEESI
601 DSATGKTPDR ISGDDRQATN AEVLKEDDYF TDGEVVNYFV AKDGSTKEDQ LVDALAAAPI
661 AGRFKESPAP IILATDTLSS QONVAVSKAV PKDGGTNLVQ VGKGIASSVI NKMKDLDM

B



Şekil. 2.3. *C. difficile* 630 için slpA aminoasit dizisi ve ORF organizasyonu. **A.** *C. difficile* 630 suşuna ait slpA öncü proteininin aminoasit dizilimi (GenBank: YP_001089306). Siyahla işaretlenen aminoasitler sinyal peptidini, ve gri renkle işaretlenen aminoasitler HMW_slpA ile etkileşime katılan kalıntıları gösterir. LMW_slpA'yı sentezleyen aminoasitler altı çizili olarak gösterilmiştir. Siyah üçgen, iki olgun slp'nin üretilmesiyle sonuçlanan bölünme bölgesini gösterir. **B.** slpA öncü proteininin şematik gösterimi. Siyah kısım, sinyal peptidini gösterir, açık gri kısım, LMW_slpA içindeki korunmuş bölgeyi gösterir ve siyah üçgen, olgun LMW_slpA ve HMW_slpA üreten, sistein proteazı Cwp84'ün kesim bölgesini gösterir. Kısaltmalar: slp'ler, yüzey-katman proteinleri; HMW, yüksek moleküler ağırlık; LMW, düşük moleküler ağırlık; Cwp84, hücre duvarı proteini 84.

2. 1. 4 Dünya’da ve Türkiye’de *C. difficile* epidemiyolojisi

C. difficile, ortaya yeni çıkan bir patojen olmamasına rağmen yayılma hızı edişe vericidir. Günümüzde *C. difficile*, Amerika, Kanada ile birlikte çoğu Avrupa ülkesinde önemli bir klinik sorun haline almıştır (Kuijper ve Surawiz, 2008). CDE epidemiyolojisi 2000’li yılların başlangıcında belirgin olarak değişmiştir. Hastalığın insidansı ile beraber şiddetinde de artış görülmüştür. Örneğin Kanada’da CDE insidansı 1991-2003 yılları arasında 100.000 kişide 35.6 vakadan 156.3 vakaya artış olmuştur. Kasım 2004-Nisan 2005 tarihleri arasındaki 5 aylık süreçte de vaka görülme sıklığı 1000 hastada 4.6 olduğu bildirilmiştir (Gravel ve ark., 2009). Amerika’da ise hastalık insidansı ve şiddeti 1996- 2003 yıllarında iki katına kadar ulaşmıştır. 1999-2004 aralığında CDE sebepli ölüm oranı 4 katına ulaşmıştır (McDonald, 2006; Redelings ve ark., 2007). Dünya genelinde *C. difficile* vakalarındaki bu artış, antibiyotiklerin, özellikle 2001 yılından bu yana fluorokinolonların kullanımındaki artışla ilişkilendirilmektedir. 2005 yılında Hollanda ve İngiltere ile birlikte bir çok ülkede şiddeti ve ölümcül özelliği yüksek, çok miktarda toksin salgılayan ve florokinonlara dirençli suşların (ribotip 027/NAP1/BI) sebep olduğu çok sayıda salgın bildirilmiştir (Kuijper ve ark., 2006; Pépin ve ark., 2004). Hem Amerika hem de Kanada’da sıklıkla izole edilen suş; epidemik olarak bilinen ribotip 027 olmuştur. Bu ribotip diğerlerine oranla 1623 kat daha fazla toksin salgılamaktadır (Freeman ve ark., 2010). Son yıllarda ribotip 027, Kore, Hong Kong, Singapur, Japonya, Kosta Rika ve Avustralya’da da bildirilmiştir (Tschudin-Sutter ve ark.,2012). 2005 yılında Avrupa *C. difficile* Çalışma Grubu’nun yapmış olduğu çalışmada, 14 ülke 38 hastaneden, ishal ve toksijenik kültür pozitif çıkan hastalardan örnekler alınmış, 345 farklı toksijenik *C. difficile* izolatu tanımlanmış, 66 farklı ribotip belirlenmiştir. Çalışmada aynı zamanda ribotiplerin ülkeler arasında farklılık gösterdiği de gözlenmiştir. Türkiye’de sekiz izolat elde edilmiştir ve tümü ribotip 001 olarak belirlenmiştir (Barbut, 2007). 2007 yılında 14 Avrupa Birliği ülkesi ve İsviçre’de yapılmış başka bir çalışmada ise, 65 farklı ribotip belirlenmiş ve ribotip 017/020 (%16), ribotip 001 (%9), 078 (%8) ve 027 (%5) izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Bauer ve ark.,2011).

Ülkemizde bu konuda henüz iyi planlanmış geniş ölçekli bir çalışma yapılmamıştır (Karadağ ve ark., 2013). Ergen ve arkadaşlarının yapmış olduğu

çalışmada hastanelerden kökenlenen ishallerin %43'ünde *C. difficile* etken olarak saptanırken, insidansı 1000 hastada 0.6 olarak bildirilmiştir (Ergen ve ark., 2009). Cerrahpaşa Üniversitesi'nde Aygun ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise, 16 aylık süreçte ishal görülen 226 hastada toksin A veya B oranı %5,5 saptanmıştır (Aygun ve ark., 2005).

Ülkemizde ve dünyada geniş etki alanına sahip ve sıkça görülen CDE'ye karşı alternatif tedaviler geliştirmek zorunlu hale gelmektedir. Bu gereklilikle çalışmamızdaki amacımız, CDE'ye karşı uygulaması kolay koruyucu bir tedavi geliştirebilmek ve yenilebilir aşı üretmektir. Bu doğrultuda dolaylı gen aktarım vektörü olan *A. tumefaciens* bakterisini moleküler olarak düzenlemektir.

2. 2. Bitkilerde Gen Aktarım Yöntemleri

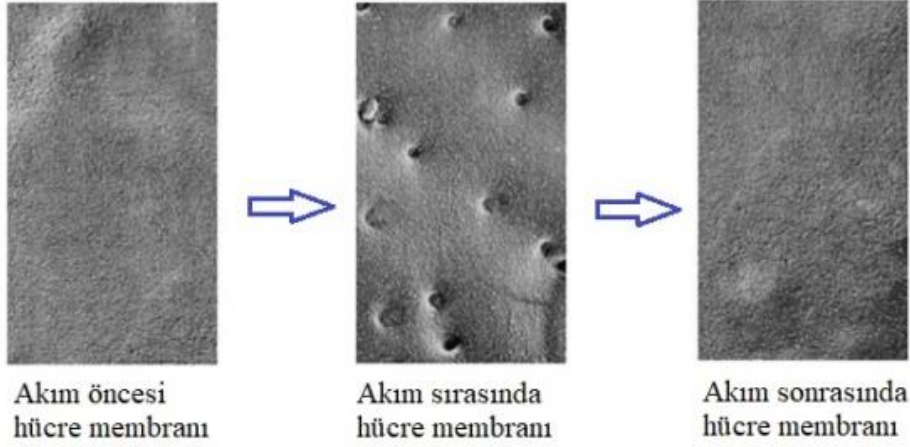
İlk olarak 1980'li yıllarda gen aktarılmış bitkiler başarılı bir şekilde üretilmiştir. Öncesinde yapılan çalışmalar, ihtiyaç duyulan özellikler için direnç/toleransa sahip bitkiler elde etmek veya bir özelliği geliştirmek üzere genellikle eşeyli çaprazlama (melezleme) gibi yöntemlerle yapılan klasik bitki ıslahı metodlarıydı (Clark ve ark., 2013). Klasik usulle yapılan bitki ıslahı ile tipik bir eşeyli çaprazlamada binlerce genin karışması sonuçları görülür ve beklenen karakterdeki bireyin bulunması bütün yavruların sınıflandırılmasına bağlıdır. Tüm bu sebeplerle beklenen karakterdeki bireyin üretilmesi zor ve zaman alıcı olmaktadır (Cobb ve ark., 2013). Transgenik bitki üretim yöntemlerinin geliştirilmesi ile ilgilenilen gen veya genler bitkiye aktararak istenen özellikteki bitkiler elde edilmiş ve ıslah çalışmaları hız kazanmıştır (Pérez-Massot ve ark., 2012). Genin bitkiye başarılı şekilde aktarılması sonucunda elde edilen bitki ana bitkiyle mutlaka aynı olmalı ve bununla beraber aktarılan gen bitkide bir özelliğin geliştirilmesini sağlamalıdır (Potrykus ve ark., 2013).

DNA'nın Aktarılması: DNA'nın bitki hücresine aktarımı aşamasında, sitoplazma zarından geçisi hücre duvarında bulunan porlar aracılığıyla olur (Pauly ve Keegstra, 2016). Çoğunlukla bitki hücresinin ozmotik basıncı hipertondiktir. Bitkinin ozmotik basıncı dokunun kurutulması ya da şeker içeren besiy ortamına konularak geçici olarak azaltılabilir ve hücre duvarındaki porlardan sitoplazma akışı yavaşlatılarak DNA aktarımı gerçekleştirilebilir (Vain ve ark., 1993; de Dios Barajas-López ve ark., 2013).

DNA kaplandığı koruyucu proteinlerle çekirdeğe kadar parçalanmadan ulaşır. Çekirdeğe ulaşan yabancı DNA, hedef hücreye ait doğal mekanizma tarafından kendi genomik yapısına katılır (Potrykus ve ark., 2013). Fonksiyonel olabilmesi için aktarılan yabancı DNA'nın kromozomal DNA'ya ulaşması gerekir. Ayrıca yok olmamak için, gen ifadesini sağlayan gerekli fonksiyonlara sahip olması ve doğal bitki DNA'sı gibi davranması gereklidir (Chandra, 2012).

Direkt (Doğrudan) Yöntemlerle DNA'nın Aktarılması: Kültürü yapılması çeşitli sebeplerle zor olan bitkiler için direkt gen aktarım metodları uygulanmaktadır. Bitki hücre duvarı enzimlerle parçalanarak sitoplazmik membranla çevrili protoplastlar ortaya çıkar (Ochatt, 2013). Protoplastların serbest DNA solüsyonu içerisinde inoküle edilmesi, CaCl_2 gibi kimyasal maddeler ile plazmid DNA'sının aktarımı, mikroenjeksiyon, elektroporasyon, partikül tabancası kullanılarak hızlandırılmış partiküller aracılığıyla DNA aktarımı direkt gen aktarım metodlarındandır. Elektroporasyon ve partikül bombardımanı (biyolistik) en yaygın kullanılan yöntemlerdir (Ueki ve ark., 2013).

Elektroporasyon yönteminde, protoplastlar DNA fragmentleri bulunan solüsyon içinde inoküle edilir ve kısa süreli yüksek voltaja (550V/cm) tabi tutulur. Şekil 2.4.'de gösterildiği gibi, elektrik akımı verilen hücrelerin hücre zarında küçük porlar açılır, hücre zarı geçirgen hale getirilir. Kısa süre açık kalabilen bu porlar, DNA fragmentlerinin içeri girmesinin ardından kapanır (Gelvin, 2012; Ochatt, 2013). Aktarımdan sonra protoplastlar elektroporasyon kuvvetlerinden çıkarılır, rejenerasyon besiyeri içinde transgenik bitki oluşumu sağlanır. Elektroporasyon yöntemi ile gen aktarımı özellikle polenler üzerinde sıklıkla kullanılır (Lynch ve Davey, 2012; Jordan ve ark., 2013).



Şekil 2.4. Elektroporasyon uygulamasında akım öncesi, akım verilirken ve akım sonrası hücre membranının elektron mikrografi görüntüsü

Partikül bombardımanı (biyolistik) yöntemi ile gen aktarımında, altın ve tungsten gibi yüksek yoğunluklu metal partikülleri kullanılır. Bu partiküllere polietilen glikol (PEG) ile bağlanmış DNA fragmentleri bitki hücrelerine yüksek hızla (500m/s) aktarılır (Jackson ve ark., 2013). Aktarılan metal-DNA kompleksi hücre çekirdeğine ulaşır, çekirdekte hedef gen bağlandığı metal partikülden ayrılarak genom içindeki yerini alır. Parçacıkların hızlandırılması için önceleri yüksek voltaj elektrik akımı kullanılırken son zamanlarda kontrol edilmesi kolay olduğundan sıkıştırılmış Helyum ya da CO₂ gazı kullanılmaya başlanmıştır (Finer ve ark., 2016). Bu yöntem kullanılarak özellikle gen aktarımı çok zor olan monokotil bitkiler ile birlikte tüm bitki hücrelerine gen aktarımı yapılabilmektedir (Bhattacharyya ve ark., 2015).

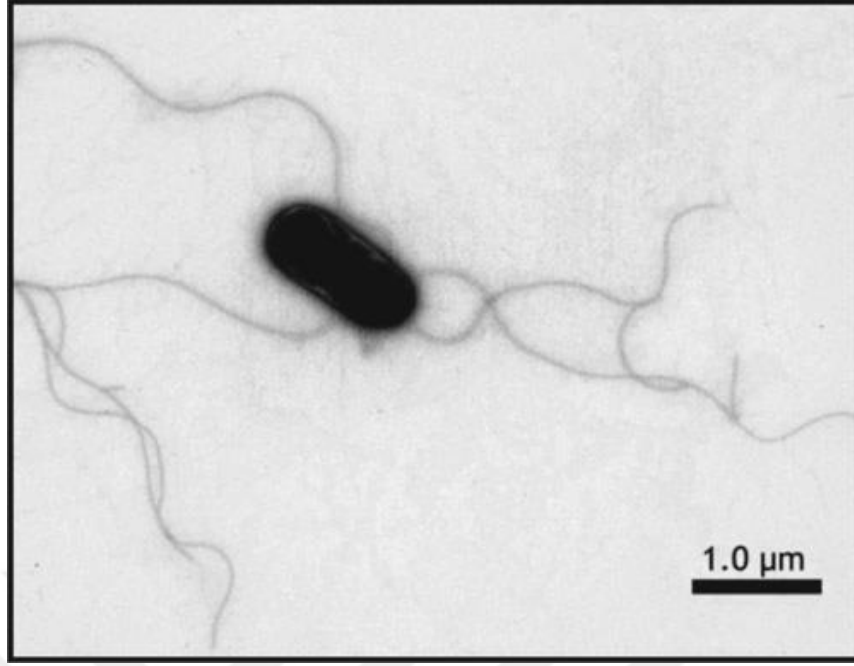
2. 3. *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Gen Aktarımı

2. 3. 1. *A. tumefaciens* bakteriyel özellikleri ve taksonomisi

Üst Âlem	Bacteria
Âlem	Eubacteria
Şube	Proteobacteria
Sınıf	Alphaproteobacteria
Takım	Rhizobiales
Aile	Rhizobiaceae
Cins	<i>Agrobacterium</i>
Tür	<i>A. tumefaciens</i>

Tablo 2.2. *A. tumefaciens*'in sistematığı

Rhizobiaceae familyası üyesi olan *A. tumefaciens*, spor oluşturmayan, gram negatif, hareketli, çubuk şeklinde bir toprak bakterisidir. Aynı zamanda baklagillerde kök yumruları oluşturan azot bağlayan rhizobium bakterileriyle yakından ilişkilidir (Ream, 2002). Bakteri az sayıdaki peritrik flagella ile çevrilidir (**Şekil 2.5.**) (Garrity, 2005). Çeşitli bitkilerde, taç tümör ve ya kök uru denilen, kanser şeklinde kontrolsüz çoğalan hücrelerin oluşturduğu bozukluklara sebep olan parazit bir bakteridir (**Şekil 2.6.**) (Platt ve ark., 2014). Taç, bitkinin toprak ile yüzeyde havanın kesiştiği yerde uzanan bölümdür (Kahl ve Schell, 2014).



Şekil 2.5. Peritrik flagella ile çevrili *A. tumefaciens* elektron mikrografi görüntüsü (Jeon ve ark., 2008)

Taç tümör hastalığına dair ilk yazılı bildirim 1853 yılında Fabre ve Dunal tarafından yapılmıştır (Fabre ve Dunal, 1853). *Agrobacterium* türleri ile ilgili ilk araştırmalar yaklaşık bir asır önce bitkilerdeki taç gali ya da diğer adıyla taç tümörü hastalığı etmeni üzerine yoğunlaştığı sırada başlamıştır. İlk defa 1897 yılında *A. tumefaciens*, Cavara (Cavara., 1897) tarafından *Vitis vinifera* (asma) bitkisinde bulunan tümörlerden izole edilmiştir (Hwang ve ark., 2015).

Agrobacterium cinsi çoğunlukla hastalık semptomolojisi ve konak aralığı baz alınarak birçok türe ayrılır (Gelvin, 2003). *A. radiobacter* avirülant bir türdür. Buna karşılık *A. tumefaciens* bitkilerde taç tümör veya kök uru (crown gall) olarak adlandırılan hastalığına sebep olmaktadır. *A. rhizogenes*, saçaklı kök (hairy root) hastalığına ve *A. rubi* gövde uru hastalığına neden olmaktadır. Son zamanlarda ilan edilen yeni bir tür olan *A. vitis*, üzüm köklerinde ve taçlarında neoplastik tümörlerin büyümesine neden olmakta ve üzüm kökleri ve diğer birkaç bitki türünde nekrotik lezyonlara neden olmaktadır (Otten ve ark. 1984; Burr ve ark. 1998; Ozyigit, 2012).

A. tumefaciens'in sebep olduğu ta tümörü hastalığı, tarımsal olarak ciddi hasarlar oluşturup genellikle çift çenekli (dikotil) bitkiler, seyrek olarak da bazı tek çenekli (monokotil) bitkilerde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Kerr ve Tate, 2016). Ta tümörü hastalığı, 600'den fazla bitki türünü etkilediği bilinen, yaygın görülen bir bitki hastalığıdır. Neredeyse bütün çift çenekli (dikotil) bitkiler, odunsu ve otsu bitkiler ile böğürtlen, g l, söğüt, üzüm, pirinç ve şeker gibi ticari önemi olan birçok ürünü de etkiler (Burr ve ark. 1998 ; Jeon ve ark. 2008). Bitkinin üzerinde oluşan ta tümörü kendi başına büyümeye devam ettiği için hastalık bitki patolojisi çalışan bilim insanlarınca önemli bir araştırma konusu olmuştur. Araştırmalar ışığında hastalığa neden olan bakteriler genetik mühendisliği araştırmaları için kullanılmıştır (Singh ve ark., 2015).

Ta tümörü hastalığında *A.tumefaciens*, yaralanmış bitki dokularından salınan fenolik bileşiklerce çekilir ve bitkinin dokularına girer. Bitkide ta bölgesi, toprakla gövdenin buluştuğu bölge olduğundan yaralanma sık görülür ve bakteri için en uygun bölge haline gelir (Matveeva ve ark., 2012). Bakteriler bu yaralanmış  l  hücrelerde koloni oluştururlar ya da yaralanmış canlı hücelere kendilerini entegre ederler. Bitkinin hücrelerinden bakteriye gönderilen kimyasal sinyallerle bakterinin virülans genleri aktif olur. Böylece bakteri virülans hale gelir. Son aşamada bakterinin T-DNA'sı bitki hücresine ulaştırılır ve bitki, bakterinin ihtiyaç duyduğu ürünleri sentezlemeye başlar (Chandra, 2012; Ozyigit, 2012). Enfekte olan bitki hücreleri, bitki hücresinin kendi genlerinin bazılarının yerine bakteriye ait genler içerir (Khawar ve  zcan 2002; Jeon ve ark. 2008). Bitkiler gençken tümörler beyaz veya krem renkli ve süngerimsi ve ya siğil şeklinde olabilir, yaşlandığında ise koyu renk ve odunsu bir hal almaya başlar (Burr ve ark., 1998; Ozyigit, 2012). Ta tümörler normalde bitkiyi öldürmezler ama çok fazla büyüdüklerinde öldürücü olabilirler. Kreozot bazlı kimyasal bileşikler, bakır bazlı  zeltiller ve sodyum hipoklorit gibi güçlü oksidanlar kullanılarak ortadan kaldırılabılır (Utkhede ve Smith 1993; Polcaro ve ark. 2008).



Şekil 2.6. A. Kore ginsengi fidelerinin köklerinde tümör oluşumu (Jeon ve ark., 2008), **B.** Domates bitkisi taç bölgesinde *A. tumefaciens* etmeniyle oluşmuş taç tümörü (Jamison, 2001)

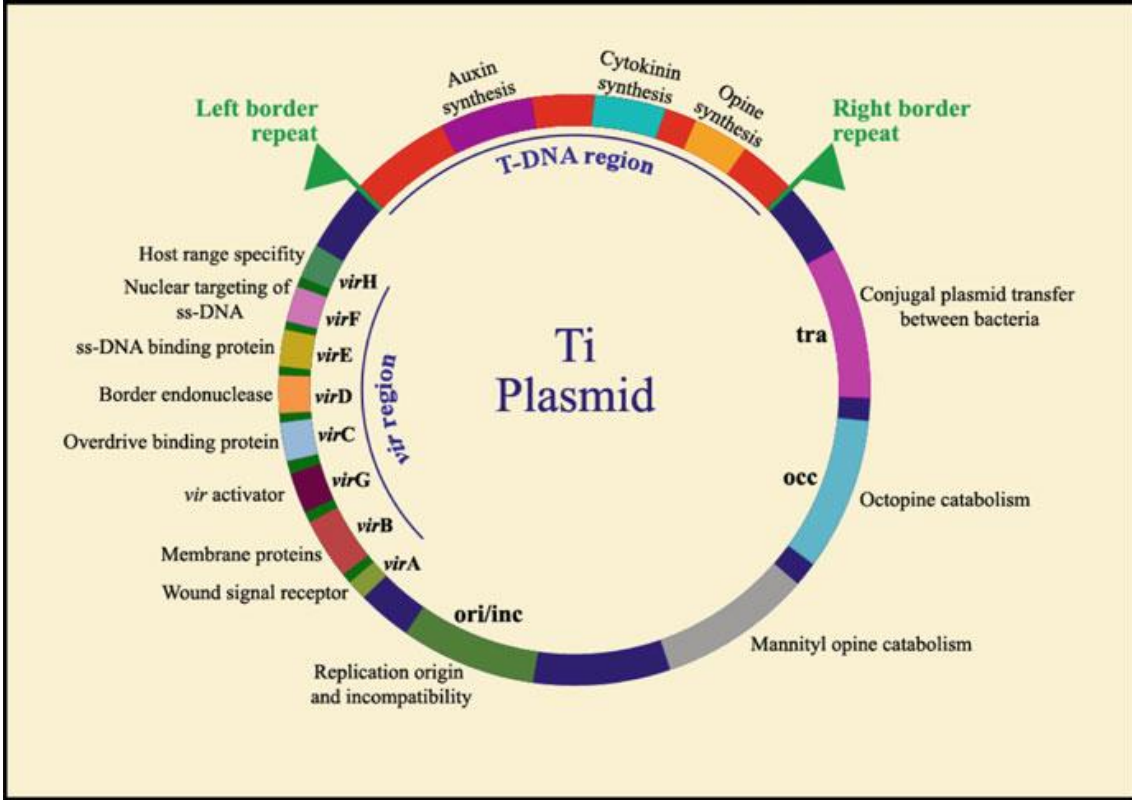


Şekil 2.7. *A. tumefaciens* ile inoküle edilmiş hastalıklı ve sağlıklı havuç dilimleri. Siyah oklar, havuç dokusu üzerinde *A. tumefaciens* kolonilerini göstermektedir. (Jeon ve ark., 2008)

2. 3. 2. *A. tumefaciens* indirekt (dolaylı) gen aktarım mekanizması

Bitkilerde genetik transformasyonda *Agrobacterium*'un patojen etkisinden faydalanılır ve bakteride bulunan plazmid, ilgilenilen genin bitki hücrelerine aktarılmasına olanak veren bir vektör görevi üstlenmektedir (Rao ve ark., 2009). Transformasyonda kullanılan vektör plazmidlere yabancı genler eklenirken; plazmidde halihazırda bulunan tümör oluşumuna sebep olan genler kaldırıldığından tümör oluşturma yeteneğini tamamen yitirmektedirler (Rivera ve ark., 2012).

A. tumefaciens, DNA'sını bitki hücrelerine aktarmaya olanak veren kendine has bir yeteneğe sahiptir. Aktarılan *A. tumefaciens*'e ait DNA, T-DNA olarak adlandırılır. Bu DNA, Ti plazmid (Tumour inducing) yani tümör oluşumunu uyaran plazmid olarak isimlendirilir ve ekstrakromozomal plazmid üzerinde taşınır. *Agrobacterium* ile gen aktarımı, direkt gen aktarım metodlarına göre daha karmaşık olmasına rağmen en çok tercih edilen yöntemlerdendir. Biyolojik vektör kullanılmadan DNA aktarımı sağlayan direkt gen aktarım metodlarında, DNA'nın hedef hücre çekirdeğine ulaştırılması gereklidir. Ancak *Agrobacterium*'da T-DNA, çekirdeğe ulaşmak için gerekli tüm sinyallere doğal olarak sahip olduğundan gen aktarımında büyük avantajlar sağlamaktadır (Murai, 2013). *A. tumefaciens*, bir bitki hücrelerine gen aktarımı için gerekli olan çift sarmallı Ti-plazmid üzerinde bulunan T-DNA (transferred DNA) ve virülans (*vir*) bölgeleri olarak iki temel bölgeye sahiptir (García-Cano ve ark., 2015). *Agrobacterium* bitki hücreleriyle ilk iletişimine, bitkinin kök-toprak yüzey bölgesi rizosfere salgıladığı sinyallerin, bakteri Ti plazmidde kodlanan kromozomal virülans gen (*chv* gen) ve virülans gen (*vir* gen) ürünlerinin etkisiyle bakteri tarafından algılanmasıyla başlar. Bunu takiben hareketli bakteriler konak bitkinin hücrelerine yönelerek hücreler ile temas ederler. Bakteri ile enfekte olan bitki hücreleri, VIP1 (Agrobacterium Vir E2 ile etkileşen protein 1)'in bitki hücrelerinin nükleusuna translokasyonu ve fosforilasyonuna neden olan MAP kinaz (Mitogen Aktive Protein Kinaz) sinyalizasyonu başlatmak yoluyla savunucu genlerin ifade edilmesini uyarır (Hwang ve ark., 2015).



Şekil 2.8. Ti Plazmid Genetik Haritası (Ozyigit, 2012)

T-DNA bölgesi, Ti plazmidten bitki hücrelerine aktarılır, bitkinin kendi genomuyla birleşir. *Agrobacterium*'un modifiye edilmemiş Ti plazmidindeki T-DNA bölgesi yaklaşık 23 kb büyüklüğünde bir DNA parçasıdır. Bitki hücrelerine T-DNA'nın aktarımı bakteriler arası konjugasyonla plazmid aktarımına oldukça benzerlik gösterir. T-DNA bölgesinde ifade edilen genler bitki hücrelerine girdiğinde fonksiyonel olmakta, ifadesi sonucu ortaya çıkan gen ürünleri bitki hücrelerinin metabolizma dengesini bozmakta ve bunun sonucunda bir tümör oluşturmaktadır (Park ve ark., 2015). Enfekte hücrelerin oluşturduğu tümör ve opinler T-DNA bölgesindeki bazı genler tarafından sentezlenmektedir. Ayrıca bitkide oksin ve sitokinin sentezini hızlandıran bazı genler de bulunmaktadır. Bu genler bitki hücrelerinde tümör oluşturduğu için onkogenler denilmektedir (Kodahl ve ark., 2016) Bu onkogenler içinde bulunan transferaz (*ipt*) geni, sitokinin; indolasetik asit (*iaa*) geni ise indolasetik asit sentezlenmesini sağlar ve bitkinin bazı bölgelerinde anormal büyümeler meydana gelir. Virulans (Vir) bölgesindeki genler tarafından kodlanan proteinler ise, yaralanmış bitki dokusundan salınan fenolik bileşikler ile aktif edilmektedir. Vir proteinleri T-DNA'nın transfer

edilmesini, *virA*, *virG* ve diğer vir genlerinin aktivasyonunu sağlar (Denkovskienė ve ark., 2015). *VirA* geni ürünü transmembran reseptör kinaz proteini, bakterinin sitoplazma membranı üzerinde bulunur ve periplazmadaki fenolik bileşikler tarafından fosforile edilmesi sonucu sitoplazmik transkripsiyon faktörü olan VirG proteinini de fosforile eder. Aktif hale geçen VirG proteini, *virB*, *virC*, *virD* ve *virE* genlerinin promoter bölgelerine bağlanarak ilgili genin transkripsiyonunu indükler (Czarnecka-Verner ve ark., 2016). *VirD* geni ürünü olan protein endonukleaz aktivitesi göstererek T-DNA'yı sağ ve sol uçlarından kesilerek plazmidten çıkarılmasını sağlar. Çift iplikli halde bulunan Ti-plazmidin T-DNA bölgesinden bir tek iplik ayrılarak bitki hücresine aktarılır. Bitki hücresine aktarılan bu tek iplik replikasyon ile çift iplik haline geçer ve bitkiye ait genoma yerleşir (Marton ve ark., 2013).

Agrobacterium'un bitki hücrelerine gen transferinde etkin olmasını sağlayan diğer bir önemli özelliği, kendi kromozomu içinde bulunan 3 lokustur. Bu lokuslarda, transfer faktörü proteinini sentezleyen *chvA* geni, beta-glukan sentezlenmesinde görevli proteini sentezleyen *chvB* geni ve hücre dışı polisakkarit sentezinde görevli proteini sentezleyen *pscA* geni bulunmaktadır. Bu genlerin *Agrobacterium*'un bitki hücreleri üzerinde tutunabilmesi için önemli olduğu saptanmıştır (Ziemienowicz, 2014). Ayrıca yaralanmış bitki dokusunda sentezlenen düşük molekül ağırlıklı fenolik bileşiklerin de virulens genlerinin aktif hale gelmesini sağladıkları bilinmektedir (Yang ve ark., 2013). Bakteri ve bitki hücresi arasındaki etkileşim süresince peroksidaz aktivitesinde artışı takiben oksidasyon oluşur ve bitki dokuları kahverengileşerek hücre ölümleri görülür (Shkryl ve ark., 2013).

A. tumefaciens' in belirtilen özellikleri ile bitki hücrelerini enfekte etme yetisi, yabancı bir genin bitki hücreleri tarafından ifade edilmesinde en önemli unsurdur. İlgili çalışmada, *A. tumefaciens*'in bu özellikleriyle, *LMW-slpA* geninin bitki hücrelerine aktarılmasını sağlamak için transgenik olarak geliştirilmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Sterilizasyon Yöntemleri

Besiyelerinin ve kullanılacak malzemelerin sterilizasyonu: Hazırlanan besiyeleri ve kullanılacak malzemeler otoklavda 105 kPa basınçta 121°C’de 20 dakika tutularak steril edildi.

Çalışma yüzeylerinin sterilizasyonu: Laminar flow içi kullanımdan 10-15 dakika önce %70’lik etanol silinerek UV lambası açıldı. Bench ve diğer yüzeyler kullanımdan önce %70’lik alkolle silinerek steril edildi.

%70’lik alkolün hazırlanışı: %96’lık etanol içinden 730 ml mezürle ölçülerek alındı ve hacmi 1000 ml’ye tamamlandı.

%20’lik sodyum hipoklorit çözeltisi hazırlanışı: 200 ml sodyum hipoklorit mezürle ölçülerek alındı ve 800 ml distile su eklenerek hacmi 1000 ml’ye tamamlandı.

3. 2. Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması

3.2.1. Bakteriyel besiyelerinin hazırlanması

Luria Bertani Sıvı Besiyeri (LB): 1000 ml’lik Schott şişe içine, 25 gr toz LB besiyeri ve 15 gr Agar tartılarak distile su ile 1000 ml’ye tamamlandı. Şişe içine manyetik balık atıldı ve manyetik karıştırıcıda çözünene kadar karıştırıldı. (1 litre LB için; 10 g Triptone, 10 g NaCl, 5 g Maya özü)

Luria Bertani Agar Besiyeri (LBA): 1000 ml’lik Schott şişe içine, 25 gr toz LB toz besiyeri ve 15 gr agar tartılarak distile su ile 500 ml’ye tamamlandı. Şişe içine manyetik balık atıldı ve manyetik karıştırıcıda çözünene kadar karıştırıldı. Otoklavla steril edildikten sonra steril petriyer içine herbirine 20 ml olacak şekilde döküldü ve katılaşmaya bırakıldı.

Müeller Hinton Agar Besiyeri (MHA): 1000 ml’lik Schott şişe içine, 25 gr toz Müeller Hinton besiyeri ve 15 gr agar tartılarak distile su ile 500 ml’ye tamamlandı. Şişe içine manyetik balık atıldı ve manyetik karıştırıcıda çözünene kadar karıştırıldı. Otoklavla steril edildikten sonra, steril petriyer içine herbirine 20 ml olacak şekilde döküldü ve katılaşmaya bırakıldı. (Et özütü 2,0 g/L; Nişasta 1,5 g/L; Kazein hidrolizat 17,5 g/L; Agar 13,0 g/L)

Nutrient Agar Besiyeri (NA): 1000 ml'lik Schott şişe içine, 25 gr toz Nutrient besiyeri ve 15 gr agar tartılarak distile su ile 500 ml'ye tamamlandı. Şişe içine manyetik balık atıldı ve manyetik karıştırıcıda çözünene kadar karıştırıldı. Otoklavla steril edildikten sonra, steril petriyerler içine herbirine 20 ml olacak şekilde döküldü ve katılaşmaya bırakıldı. (Pepton 5,0 g/L, sığır/maya özütü 3,0 g/L, agar 12,0 g/L)

3.2.2. Bakteri kültürü ve stoklanması

C. difficile 630 suşu DSMZ (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) kültür koleksiyonundan sipariş edildi (DSM No: #27543). Gelen liyofilize kültür 5 ml Thioglycollate Broth (Salubris, Cat.#MT 170) ile süspansiyon edilerek 30 dk oda sıcaklığında canlandırıldı. Müller Hinton Fastidious Agar (MHFA) β -NAD'lı %5 Horse Blood Agar plaklara ekilerek anaerob kavanozda 37°C'de 2-4 gün inkübe edildi. 2-4 günün sonunda plaklardan pasaj yapıldı, aynı koşullarda yeniden inkübe edildi. Üreyen bakterilerden %15 gliserol stok yapıldı ve - 80°C'de saklandı. DNA izolasyonu için 5 ml Thioglycollate Broth içinde plaklardan alınan koloniler süspansiyon edildi ve 37°C'de geceboyu inkübe edildi.

Klonlama vektörü olarak kullanılacak pEarleyGate 103 plazmid (Stok No: CD3-685) Ohio State University Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) kültür stoğundan satın alınmıştır. *Escherichia coli* (*E. coli*) içinde gliserol stokta gelen örnek, Kanamisin antibiyotik direnç geni içerdiğinden 50 µg/ml kanamisin içeren LB Agar (LBA) plaklara ekim yapıldı. 37°C'de geceboyu inkübe edildi. Plakta üreyen kolonilerden kanamisinli LB sıvı besiyerine ekim yapıldı ve 37°C 180 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Sıvı kültürden % 25 gliserol stok alındı ve - 80°C'de saklandı.

A. tumefaciens B6 suşu DSMZ kültür koleksiyonundan sipariş edildi (DSM No: #30205). Gelen liyofilize kültür 500 µl Luria Bertani (LB) Broth ile süspansiyon edilerek 30 dk oda sıcaklığında canlandırıldı. 30 dk sonunda 250 µl süspansiyon kültür 5 ml. LB Broth içine ekilerek 26°C'de 180 rpm'de çalkalanarak geceboyu inkübe edildi. Geri kalan 250 µl süspansiyon kültür Nutrient Agar (Salubris, Cat No# MP 235) plaklara ekilerek 26°C'de gece boyu inkübe edildi. Sıvı kültürden % 25 gliserol stok alındı ve - 80°C'de saklandı.

3. 3. Bakteriyel DNA Materyalinin Elde Edilmesi

C. difficile genomik DNA'nın izolasyonu, "Bacteria Genomic DNA Purification Kit" (GeneMark, Cat #DP025) kullanılarak yapıldı. Çalışmada kullanılan *C. difficile* bakterisi, 5 ml LB besiyerinde 37°C 180 rpm'de bir gece inkübe edilerek büyütüldü. Elde edilen sıvı kültürün 1,5 ml'si 14,000×g'de 2 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Üst sıvı atıldı, çökelti -80°C'de 5 dk tutuldu, ardında hızlıca 37°C'ye alındı ve 2 dk bekletildi. Çökelti 180 µl lizozim solüsyonu eklenerek pipetle süspanse edildi. 37°C'de 30 dk bekletildi ve 200 µl ekstraksiyon solüsyonu eklendi. Üzerine 20 µl Proteinase K solüsyonu eklendi ve karıştırıldı. Hücre zarı parçalanana kadar 56°C su banyosunda 0.5-1 saat bekletildi. Belli aralıklarda karıştırıldı. Liziz işlemi tamamlandığında hücre kalıntılarını uzaklaştırmak için 14,000×g'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı 1.5 ml'lik temiz mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. RNA kontaminasyonu için 4 µl RNase A solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. 200 µl bağlama solüsyonu eklendi, karıştırıldı ve 70°C su banyosunda 10 dk tutuldu. Bağlama solüsyonu eklendiğinde beyaz renkli hafif bir çökelti oluştu. 200 µl etanol eklendi ve karıştırıldı. Çökeltiyle beraber bütün içerik toplama kolonu içine yerleştirilmiş spin kolon içine aktarıldı. En yüksek hızda 1 dk santrifüj edildi. Süzüntü atıldı ve spin kolon içine 300 µl bağlama solüsyonu eklendi. En yüksek hızda 1 dk santrifüj edildi. Süzüntü atıldı ve 700 µl yıkama solüsyonu eklendi. En yüksek hızda 1 dk santrifüj edildi. Yıkama işlemi bir kere daha tekrarlandı. Süzüntü atıldı ve etanol kalıntılarından kurtulmak için ilave olarak 5 dk daha santrifüj edildi. Spin kolon temiz bir mikrosantrifüj tüp içine transfer edildi. Kolon içindeki silika tabakaya emdirilerek 100 µl dH₂O eklendi ve 1-2 dk bekletildi. En yüksek hızda 1 dk santrifüj edildi ve -80°C'de saklandı.

3. 4. Primerlerin Dizayn Edilmesi

Çalışmada kullandığımız *C. difficile* 630 suşu düşük moleküler ağırlıklı yüzey katman protein (Low Molecular Weight Surface Layer Protein) *LMW_slpA* geni, kendi promotorları, transkript başlangıç ve bitiş dizileri ile birlikte klonlama vektörüne yerleştirmek amacıyla primerler hazırlandı. National Center Of Biotechnology Information (NCBI) gen bankasında bulunan *C. difficile* bakterisine ait DNA sekansından *slpA* genlerine ait nükleotid dizilimi alındı (GenBank accession no:

NC_009089). Primerler NCBI Primer-BLAST Tool kullanılarak, genin yukarı bölgesinde bulunan küçük altbirimi olan LMW_slpA proteinini kodlayan baz dizisi, 946 baz çifti uzunluğunda alınarak dizayn edildi. İleri ve geri primere XhoI restriksiyon kesim bölgeleri eklendi. Klonlama vektörünün 6x His Taq bölgesinin yukarı konumunda yer alan restriksiyon kesim bölgesi klonlama için tercih edildi.

Primerlerin çoğaltacağı genlerin doğru aminoasit dizilimine karşılık gelip gelmediği çevrimiçi biyoinformatik sitesi EXPASY Tool kullanılarak kontrol edildi. LMW_slpA geni klonlama sonrasında doğrulama işlemlerinde kullanılmak üzere ek olarak plazmid DNA'sı üzerinde, klonlanan bölgeyi içine alacak şekilde universal primerler tasarlandı.

Gen	Primer Adı	Baz Dizilimi (5'-3')
LMW_slpA	LMW_slpAFw	5'- CTCGAGGGATGAATAAGAAAAATATAGCAA-3'
LMW_slpA	LMW_slpARv	5'- CTCGAGGGTGCTACTATTGCCTTATAT -3'
pEG103	Unv_Fw	5'- AGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAG -3'
pEG103	Unv_Rv	5'- AGTTCTTCTCCTTTACTAGTCAGAT -3'

Tablo 3.1. *C. difficile* Yüzey-Katman Proteini (LMW_slpA) genlerine ve pEarleyGate 103 plazmide ait 5' yukarı ve 3' aşağı bölgelerini içeren primer dizileri.

3. 5. LMW_slpA Geninin PZT ile Çoğaltılması

LMW_slpA geni için tasarladığımız primerler kullanılarak PZT (Polimeraz Zincirleme Tepkimesi) gerçekleştirildi. Tepkimeler, her tüpte 50 µl son hacim olacak şekilde toplam 200 µl yapıldı. Her bir PZT tüpüne 50- 100 ng *C. difficile*'den izole edilen genomik DNA, 1'er µl 20 pmol/µl ileri ve geri primerler, 2 mM 5 µl dNTP, 10x 5 µl DreamTaq Buffer ve 1.25 U (0.25 µl) DreamTaq Hot Start DNA Polimeraz enzimi (ThermoScientific, Cat# EP1703) eklendi. Steril dH₂O ile son hacim 50 µl'ye tamamlandı.

PZT koşulları, 95°C’de 3 dakikalık denatürasyondan sonra 95°C’de 30 saniye, 58°C’de 30 saniye annealing, 72°C’de 1 dakika uzama ve 36 döngü sonunda 72°C’de 10 dakika son uzama olarak ayarlandı.

PZT Bileşenleri		PZT Koşulları
İleri primer	0.5 µl (20pmol)	95°C → 3 dk
Geri primer	0.5 µl (20pmol)	
dNTP	2.5 µl (2 mM)	95°C → 30 sn -----
10X DreamTaq HS buffer	2.5 µl	
DreamTaq HS DNA Polimeraz	0.125 µl	58°C → 30 sn 36 döngü
DNA	50 -100 ng	
dH ₂ O	50 µl ‘ye tamamlanır	72°C → 1 dk -----
		72°C → 10 dk
		4 °C → ∞

Tablo 3.2. PZT Protokolünde kullanılan bileşenler, miktarları ve uygulama koşulları

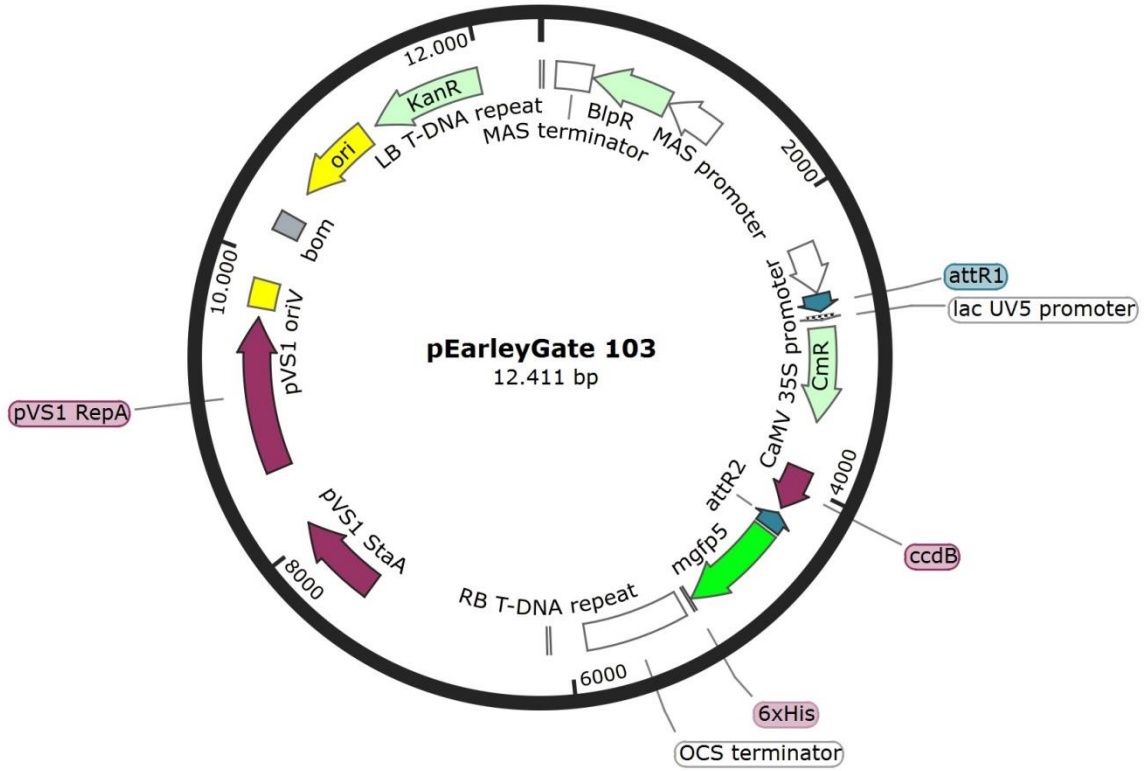
3. 5. 1. Agaroz jel elektroforezi

%1’lik agaroz jeli hazırlamak için, 0,5 gram agaroz tartılarak 50 ml 1x TAE buffer içinde mikrodalgada agaroz tamamen eritildi. 1x TAE (Tris- Acetate EDTA) buffer 50x stok TAE (50 ml pH=8 0,5 M EDTA, 121 gram Tris, 25 ml glaci el asetik asit karıştırılarak dH₂O ile 500 ml’ye tamamlanır.) çözeltilisinden 1/20 oranında sulandırılarak hazırlandı. Mikrodalgada eritilen jel yaklaşık 60°C’ye soğuduğunda uygun boyutlardaki yatay elektroforez tepsisine, uygun dişli tarak yerleştirilerek döküldü ve polimerleşmesi için 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. PZT ile sentezlenen DNA fragmentleri, 1/1 oranında TİBO® Gold floresan boya ve 5x Orange G yükleme tamponu ile karıştırılarak %1’lik agaroz jelde, 1x TAE bufferda yürütülerek eş zamanlı olarak ORTE (İzlenebilir Jel Elektroforezi, Salubris) jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi. GeneMark 100 baz çiftlik ladder ile bilinen baz ölçülerine uyan DNA fragmentleri jelden kesildi ve temizlendi (Gel Elution Kit, GeneMark, Cat#DP03P).

3. 6. Klonlama Vektörünün Modifikasyonu

3. 6. 1. Klonlama vektörü

Çalışmamızda indirekt gen aktarımını yönteminde kullanılan *A. tumefaciens* bakterisine özel tasarlanan pEarleyGate 103 plazmidi tercih edildi. pEarleyGate 103 plazmidi, seçici marker olarak bir kanamisin direnç geni (*kanr*) içermesi, ilgili genin ifadesini geliştirmek için Karnabahar Mozaik Virüsü'nden üretilen bir 35S promoteri; genin organizma üzerindeki ifadesini görselleştirmek için *GFP* geninin (Yeşil Floresan Protein) varlığı ve çoklu klonlama bölgesinin aşağı akış konumunda yerleşen kodlama sekansı ile çalışmamız için uygun görülmüştür.



Şekil 3.1 pEarleyGate 103 (c-GFP-His) vektör sistemi. *mgfp5*; yeşil floresan protein geni, *KanR*; kanamisin direnç geni. Görüntü SnapGene sürüm 4.2.6 (demo versiyonu) programı kullanılarak oluşturulmuştur.

3. 6. 2. XhoI enzimi ile restriksiyon kesimi

PZT ile sentezlenen ve elektroforezle jelde ayrıştırıldıktan sonra jelden aldıktan sonra hem *LMW_slpA* geni (946 baz çifti) hem de klonlama vektörü pEarleyGate103 (12.411 kb) XhoI endonükleaz enzimi (Thermo Scientific, Cat# ER0691) ile kesildi. İki XhoI kesim bölgesi içeren plazmid, 2654. baz çifti ve 4369. baz çifti bölgeden kesilerek 1715 baz çiftlik DNA parçası çıkarılarak uzaklaştırıldı. Kesim, PZT ürünü ve plazmid için ayrı ayrı tüplerde gerçekleştirildi.

Restriksiyon Bileşeni (PZT ürünü için)		Restriksiyon Bileşeni (Plazmid için)	
10X Tango buffer	2 µl	10X Tango buffer	2 µl
XhoI Restriksiyon Enzimi	1 µl	XhoI Restriksiyon Enzimi	1 µl
LMW_slpA DNA	6 µl	pEarleyGate103 plazmid	3 µl
dH ₂ O	20 µl'ye tamamlanır	dH ₂ O	20 µl'ye tamamlanır

Tablo 3.3. XhoI restriksiyon kesim işlemi için bileşenler ve miktarları

37°C 'de 16 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda enzim inhibisyonu için 80°C 'de 20 dk bekletildi. Kesilen PZT ürünü ve plazmid DNA 'ları %1'lik agaroz jelde, daha önce belirtildiği şekilde floresan boya ve yükleme tamponu ile karıştırılarak ORTE (İzlenebilir Jel Elektroforezi, Salubris) jel görüntüleme sisteminde yürütüldü ve eş zamanlı olarak görüntüledi. 1715 baz çiftlik parçanın kesilip çıkarıldığı jelde gözlemlendi. Kesilen DNA materyalleri jelden saflaştırıldı.

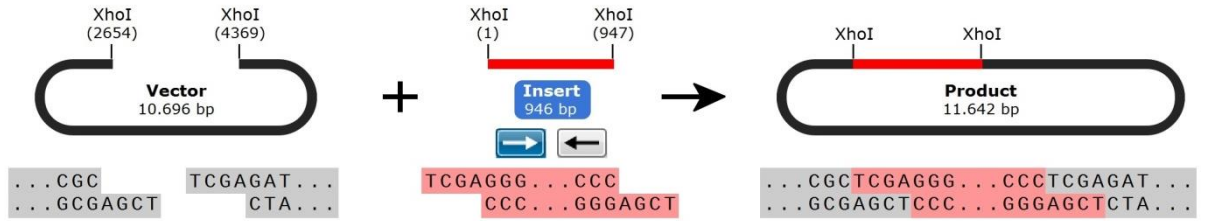
3. 6. 3. *LMW_slpA* geninin pEarleyGate 103 plasmide ligasyonu

PZT ile çoğalttığımız ve jelden saflaştırdığımız *LMW_slpA* geninin pEarleyGate 103 klonlama vektörüne 1:1 ve 1:3 insert/vektör oranlarında ligasyon yapıldı. Ligasyon için, 2 µl 5x T4 DNA Ligaz Buffer, 5 µl (25 ng/ µl) pEarleyGate 103 vektör, 5 µl *LMW_slpA* geni, 1 µl T4 DNA Ligaz enzimi karışımı steril dH₂O ile son hacim 20 µl'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında 3 saat bekletildi. 60°C 'de 10 dk bekletilerek enzim inhibisyonu sağlandı.

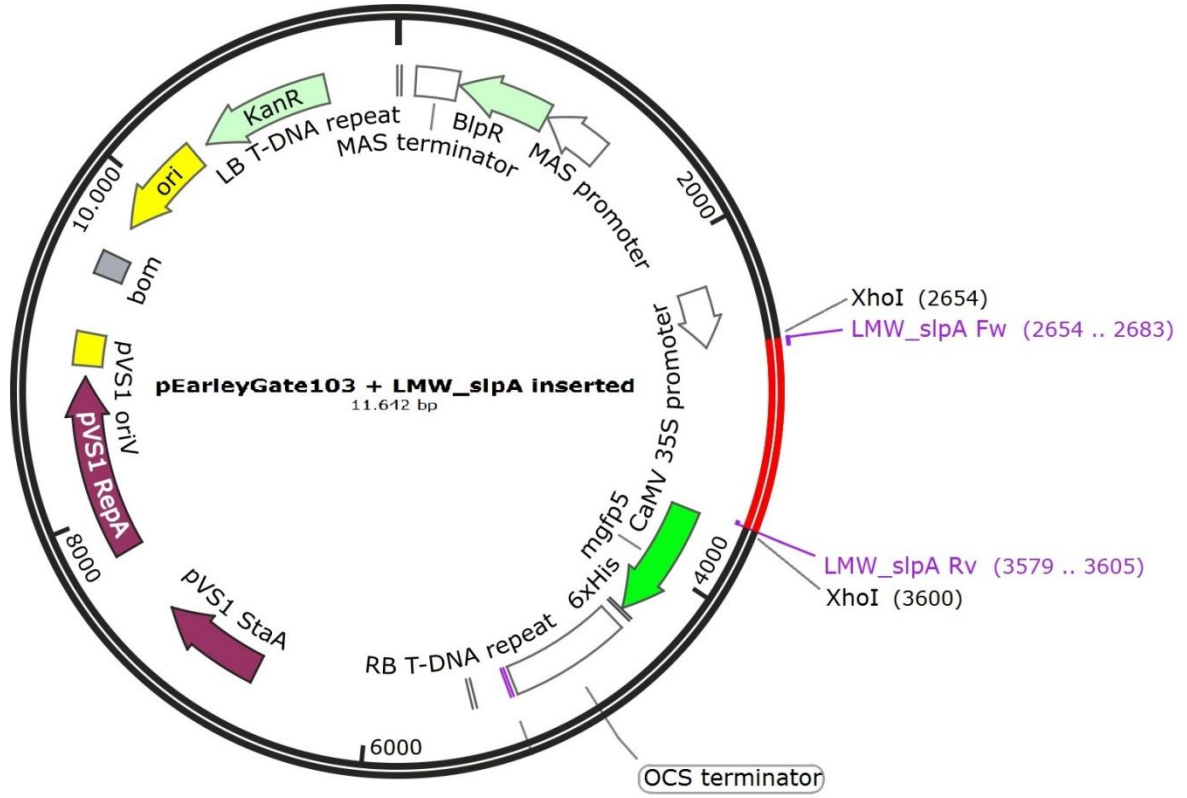
Ligasyon Bileşeni (1:1)		Ligasyon Bileşeni (1:3)	
10X T4 Ligase buffer	2 µl	10X T4 Ligase buffer	2 µl
T4 DNA Ligase Enzimi	1 µl	T4 DNA Ligase Enzimi	1 µl
LMW_slpA DNA	5 µl	LMW_slpA DNA	3 µl
pEarleyGate103 plazmid	5 µl	pEarleyGate103 plazmid	9 µl
dH ₂ O	20 µl'ye tamamlanır	dH ₂ O	20 µl'ye tamamlanır

Tablo 3.4. Ligasyon işlemi için bileşenler ve miktarları

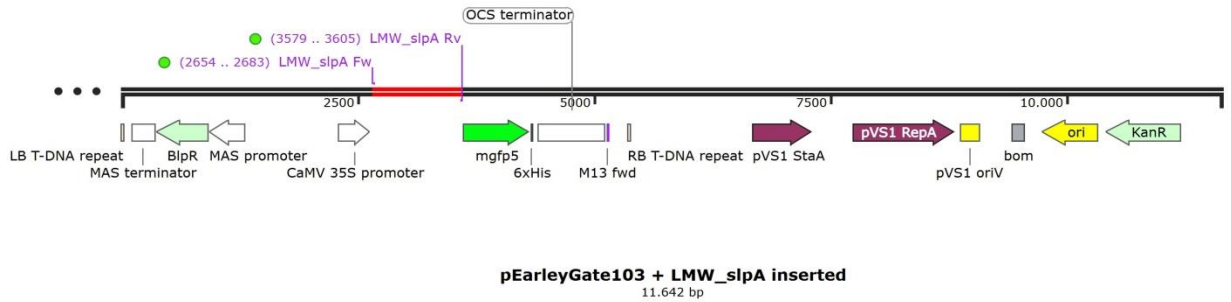
Ligasyon ürünleri, 1:1 oranında hazırlanmış 1x Orange G yükleme boyası ve 1x Syber Gold florasan boya ile boyanarak %0,8'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı.



Şekil 3.2. İlgilenilen genin pEarleyGate103 vektöre eklenme adımlarını gösteren şekil. Görüntü SnapGene sürüm 4.2.6 (demo versiyonu) programı kullanılarak oluşturulmuştur.



Şekil 3.3. *LMW_slpA* geninin pEarleyGate103 vektör üzerindeki konumunun dairesel gösterimi. Görüntü SnapGene sürüm 4.2.6 (demo versiyonu) programı kullanılarak oluşturulmuştur.



Şekil 3.4. *LMW_slpA* geninin pEarleyGate103 vektör üzerindeki konumunun doğrusal gösterimi. Görüntü SnapGene sürüm 4.2.6 (demo versiyonu) programı kullanılarak oluşturulmuştur.

3. 7. Klonlama Vektörünün Transformasyonu

3. 7. 1. *E.coli* TOP10 kompetent hücrelerin hazırlanması

Kompetent hücreleri hazırlamak için petriye ekilerek canlandırılmış *E.coli* TOP10 (Invitrogen) bakterilerinden alınan tek koloni 5 ml LB sıvı besiyerine ekildi. 37°C'de 180 rpm'de gece boyu üremeye bırakıldı. Üreyen sıvı kültürden LB besiyerine 1:100 oranında inoküle edildi. 37°C'de 180 rpm'de, 600 nm dalga boyunda OD₆₀₀=max. 0,5 olacak şekilde birkaç saat inkübe edildi. Yeterli yoğunluğa ulaşan bakteri kültürü 50 ml falkon tüpe transfer edildi ve 10 dakika 10000xg'de 4°C'de santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı ve içinde kalan LB kalıntısı kurutuldu. Çökelti 10 ml Improved Buffer (75 mM CaCl₂ , %15 v/v gliserol) ile iki kere yıkandı. Örnek her yıkamada 15 dakika buzda bekletildi. Yıkama sonunda çökelti 2 ml Improved Buffer ile çözüldü ve her bir mikrosantrifüj tüpüne 50 µl olacak şekilde dağıtıldı. Transformasyon için kullanılacak miktarda kompetent hücre buza alındı, diğerleri sıvı nitrojenle aniden dondurularak -80°C'de saklandı.

Improved Buffer Hazırlanışı: 2M CaCl₂ ve %100 (v/v) gliserol. Son hacim: 50 ml.

2M CaCl₂ stoktan 75mM 50 ml için 1.875 ml alındı, %100 gliserol stoktan 7.5 ml eklendi, distile su ile 50 ml.'ye tamamlandı. 0.22 µM filtre ile filtrelendi.

3. 7. 2. Rekombinant plazmidin *E. coli* TOP10 kompetent hücrelerine transformasyonu

Kanamisin içeren LBA besiyerleri 37°C'de 30 dakika bekletildi. Transformasyon için hücreleri indüklemesi için 40 µl (100 mM) IPTG (İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit) sürülüp 37°C inkübatörde kurutuldu. Ligasyon ürününü içeren mikrosantrifüj tüpleri ve 50 µl *E.coli* TOP10 kompetent hücreler buzda çözüldü. 2 µl ligasyon ürünü kompetent hücre içeren mikrosantrifüj tüpüne bırakıldı ve pipet ucuyla nazikçe karıştırıldı. Kompetent hücreler ve ligasyon ürününü içeren tüp 30 dakika buzda bekletildi ve sonra 42°C'de 90 saniye su banyosunda tutuldu. Su banyosundan alınıp hızlıca buza tekrar kondu ve 5 dk daha bekletildi. Üzerine 250 µl SOC besiyeri (Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC) 0.5% Maya Extratı, 2% Tripton, 10 mM NaCl, 10 mM

MgSO₄, 10 mM MgCl₂, 2.5 mM KCl, 20 mM Glukoz) eklenerek 37°C'de 225 rpm'de 1 saat çalkalandı. 1 saat sonunda IPTG sürülüp kurutulmuş kanamisinli LBA plaklara yayma ekim yapıldı. 37°C'de gece boyu inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda koloni seçiminde, IPTG indüklemesiyle rekombinant plazmidi içine alan kolonilerin opak beyaz olmasından yararlanıldı. Petriler 4°C'de saklandı.

3. 7. 3. Rekombinant plazmidlerin izole edilmesi

Transformasyon sonucunda üreyen kolonilerden plazmid içeren beyaz koloniler seçildi. Plazmid izolasyonu Plazmid MiniPrep Purification Kit (GeneMark, Cat# DP01-300) ile yapıldı. Rastgele seçilen 10 koloni plazmid izolasyonu için 5 ml 50 µg/ml kanamisin içeren sıvı LB besiyerlerine ekildi. 37°C'de 180 rpm'de gece boyu inkübe edildi. Üreyen 5 ml sıvı kültür üst üste 14000xg'de 1 dakika santrifüjlenerek mikrosantrifüj tüpünde çöktürüldü. Üst sıvı atıldı, çökelti üzerine 200 µl süspansiyon solüsyonu eklendi ve pipetle süspanse edildi. Üzerine 200 µl lizis solüsyonu eklendi ve tüp içindeki sıvı rengi berraklaşana kadar 5 kere dikkatlice alt üst edildi. 200 µl nötralizasyon solüsyonu eklendi ve 5 kere alt üst edildi. En yüksek hızda (16000xg) 5 dakika santrifüj edildi. Mikrosantrifüj tüpünün yan duvarında beyaz çökelti birikti. İçinde plazmid bulunan berrak, sıvı lizat beyaz çökeltiden ayrıldı. Spin kolon toplama kolonunun içine yerleştirildi ve üzerine sıvı lizat eklendi. En yüksek hızda 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpündeki filtrelenmiş sıvı boşaltıldı, spin kolona 700 µl yıkama solüsyonu eklendi ve en yüksek hızda 1 dakika santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi bir kere daha tekrarlandı. Spin kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak silika filtrenin tam üzerine 50 µl dH₂O eklendi, 1-2 dk bekletildi ve en yüksek hızda 2 dakika santrifüjlendi. İzole edilen plazmid DNA'ları %0.8'lik agaroz jelde elektroforez yapılarak kontrol edildi ve -20°C'de saklandı.

3. 8. Rekombinant Plazmidlerde Doğrulama İşlemleri

3. 8. 1. Restriksiyon haritalama

İzole edilen plazmidlerin *LMW_slpA* DNA fragmentlerini içerip içermediğini kontrol etmek için **restriksiyon haritalama** işlemi yapıldı. Restriksiyon haritalama, DNA içinde restriksiyon bölgelerinde bulunan yerleşimi bilinen, belirli restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim yapıp beklenen baz uzunluğuna sahip DNA fragmentlerinin görülmesi temeline dayanan işlemdir. DNA dokusu (görülmesi beklenen bant sayısı, baz uzunluğu) bilinen, klonlanan DNA içinden de kesen endonükleaz enzimi PstI tercih edildi. Kesim tepkimesi için 50- 70 ng plazmid DNA'sı, 2 µl 10x Green buffer, 1 µl Fastdigest PstI (ThermoFisher), restriksiyon enzimi karışımı dH₂O ile 20 µl son hacme tamamlandı. 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Kesilen DNA fragmentleri %1'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı. Beklediğimiz DNA dokusunu gösteren klonlar belirlendi.

3. 8. 2. Koloni PZT

Belirlenen klonlardan izole edilen plazmidlerle **koloni PZT** yapıldı. Koloni PZT için, her bir PZT tüpüne 50-100 ng plazmid DNA'sı, 1'er µl 20 pmol/µl klonlanan *LMW_slpA* genini sentezlediğimiz ileri ve geri primerler, 5 µl 10x DreamTaq Buffer, 5 µl 2 mM dNTP ve 1.25 U (0.25 µl) DreamTaq Hot Start DNA Polimeraz enzimi (ThermoScientific, Cat# EP1703) eklendi. Steril dH₂O ile son hacim 50 µl'ye tamamlandı. 3 dakika 95°C'de denatürasyon, döngü başlarında 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 30 saniye 58°C'de annealing, 1 dakika 72°C'de uzama ve 10 dakika 72°C'de son uzama olarak 36 döngülük PZT koşulları ayarlandı. %1'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı. Klonlanan *LMW_slpA* geni içini beklediğimiz 946 baz çifti büyüklüğündeki bant jelde görüldü.

3. 9. *LMW_slpA* Geninin Dizi Analizi

İlgilendiğimiz DNA fragmentlerini içeren klonlardan izole edilen plazmid DNA'sı ile klonlama vektörüne klonladığımız geni içine alacak şekilde birkaç baz daha 5' yukarı ve 3' aşağı bölgelerine özel hazırlanmış üniversal primerlerle PZT gerçekleştirildi.

Tepkime için her bir PZT tüpüne; 1 µl (~ 150 ng) Plazmid DNA'sı, 1'er µl 20 pmol/µl ileri ve geri üniversal primerler, 5 µl 2 mM dNTP, 5 µl 10x DreamTaq Buffer ve 1.25 U (0.25 µl) DreamTaq Hot Start DNA Polimeraz enzimi eklendi. Steril dH₂O ile son hacim 50 µl'ye tamamlandı. PZT koşulları, 95°C'de 3 dakikalık denatürasyondan sonra 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 55°C'de 30 saniyelik annealing, 72°C'de 1 dakika uzama ve 36 döngü sonunda da 10 dakika 72°C'de son uzama olarak gerçekleştirildi. PZT ürünlerinin elektroforezi %1'lik hazırlanan agaroz jelde yapıldı. İsteddiğimiz DNA fragmenti baz uzunluğuna göre Gel Elution Kit (GeneMark, Cat# DP03P) ile jelden saflaştırıldı.

20 µl saflaştırılan DNA fragmenti, 10 µl (10 pmol/ µl) ileri ve geri primerler 1,5 ml mikrosantrifüj tüp içinde hazırlandı. Örnekler DNA dizi analizi için üzerleri etiketlenerek GATC BioTech AG, Almanya firmasına gönderildi. Dizi analizleri ABI 3730XL (GATC BioTech AG, Almanya) cihazında yapıldı.

Analiz sonucunda elde edilen verilerle, klonlama vektörüne klonlanan gen bölgesinin ilgilendiğimiz *LMW_slpA* genine karşılık geldiği görüldü.

3. 10. Rekombinant Plazmidlerin *A. tumefaciens*'e Aktarılması

3. 10. 1. *A. tumefaciens* bakteri kültürlerinin ve elektrokompetent hücrelerinin hazırlanması

DSMZ kültür koleksiyonundan elde edilerek %25 gliserol stok yapılan *A. tumefaciens* B6 suşu çözülerek LBA plaklara tek koloni ekim yöntemiyle ekilerek çoğalması için 26°C'de 1-2 gün inkübe edildi. Çoğalan kolonilerden tek koloni seçilerek 5 ml LB sıvı besiyerine inoküle edildi ve 26°C'ye ayarlanmış çalkalamalı inkübatörde 1-2 gün kültüre edildi.

1-2 günlük taze üretilmiş *A. tumefaciens* bakterileri LBA plaklardan öze ile tek koloni seçildi ve yeni bir LBA'ya yayma plak yöntemiyle ekildi. Plak yüzeyini tamamen kaplayana kadar 26°C'de gece boyu (~ 16 sa.) inkübe edildi. Daha yüksek hacimde elektrokompotent hücre süspansiyonu gerekiyorsa, hücreler birden fazla plakadan toplandı.

Bakteriyel hücreler plaktan 4 ml % 10 (hacim / hacim) soğuk steril gliserol ile yıkandı. Plağın yüzeyinde büyüyen hücreler, öze ile kazındı ve gliserol solüsyonunda süspansiyon edildi. Bakteri süspansiyonu daha sonra iki steril 2 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. İki tüp içindeki süspansiyonlar, 4°C'de 1 dakika boyunca 14,000 rpm'de (18,000 xg) santrifüj edildi; üst sıvı atıldı. Bakteriyel çökelti içeren her bir tüpe 1 ml % 10 (v / v) buz gibi soğuk steril gliserol ilave edildi. Hücreleri tekrar süspansiyon haline getirmek için tüpler vorteksle iyice karıştırıldı ve santrifüj işlemi bir kez daha tekrarlandı. İki santrifüjleme aşamasından sonra, üst sıvı ayrıldı ve tekrar atıldı. İki tüp içindeki bakteri çökeltileri her biri 200 µl % 10 (v / v) soğuk steril gliserol içinde yeniden süspansiyon edildi ve bir tüpte birleştirildi. 400 µl elde edildi.

Agrobacterium hücre süspansiyonu içeren tüp elektroporasyona kadar buz üzerinde tutuldu. Kullanılmayan elektrokompotent hücreler, alikotlandı, sıvı azot içinde donduruldu ve -80 ° C'de saklandı.

3. 10. 2. Elektroporasyon

Elektroporasyon için, 70-80 µl soğuk elektrokompotent bakteriyel hücre süspansiyonu steril mikrosantrifüj tüpünde 1-3 µl (1-100 ng) plazmid DNA ile karıştırıldı. Bu karışım buzda bekletilmiş 2 mm'lik elektroporasyon küvetine dolduruldu ve küvet tutucusuna yerleştirildi. Elektroporator aşağıdaki parametrelerle kullanıldı:

2.5 kV, 25 µF kapasitans ve 400 Ω rezistans.

Plazmid DNA ve elektrokompotent bakteriyel hücre süspansiyonu içeren küvete hızlıca 1 ml SOC besiyeri eklendi ve bakteri süspansiyonu 15 ml'lik bir santrifüj tüpüne aktararak istenen yüksek sayıda transformantlara ulaşana kadar 1-3 saat boyunca 26°C'de inkübe edildi. Elektroporasyona uğramış hücrelerin her bir süspansiyonundan

100 µl, 50 µg/µl kanamisin içeren LBA plakları üzerine yayıldı. Plaklar 2 gün boyunca 26°C'de inkübe edildi.

İşlem sonunda rekombinant plazmidi içeren *A. tumefaciens* kültürü elde edildi ve sonraki aşamada bitki doku kültüründe kullanılmak üzere % 25 gliserol ile stoklanarak -80° C'de muhafaza edildi.

3. 10. 3. PZT ile doğrulama

Rekombinant plazmidi içeren *A. tumefaciens* kültüründen izole edilen plazmid ile ilgilenilen geninin *C. difficile* genomundan çoğaltılmasında kullanılan primer çifti ile PZT işlemi aynı koşullarda yapıldı. Başarılı şekilde dönüştürülmüş koloniler PZT amplifikasyonu ile doğrulandı.

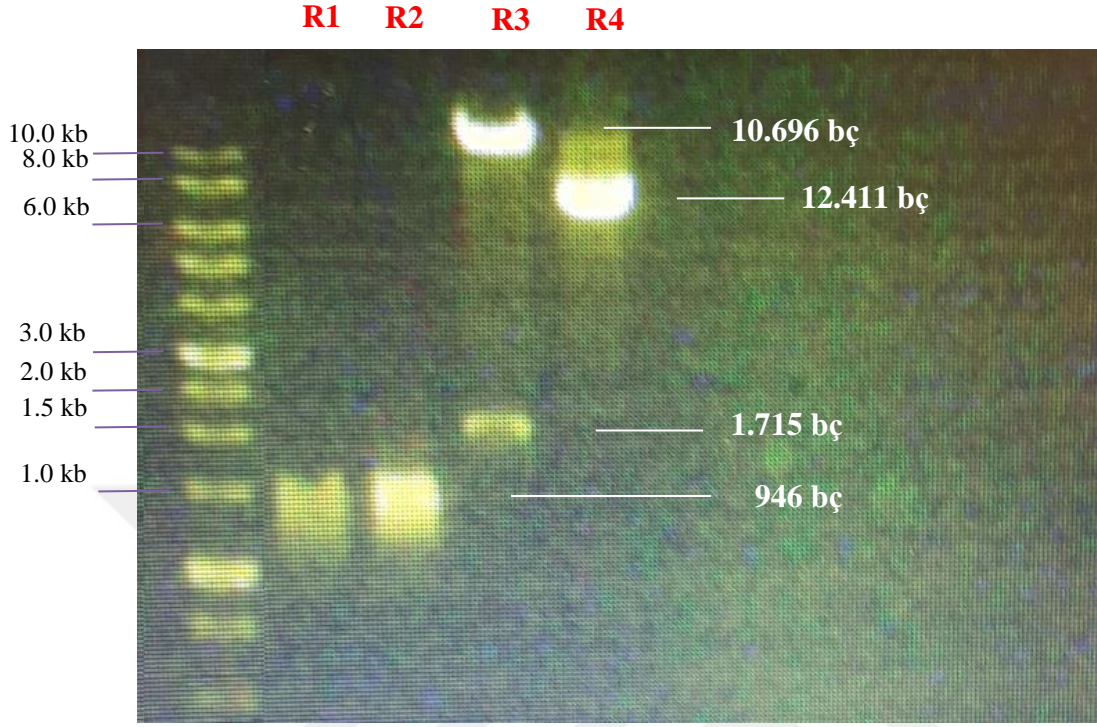
4. BULGULAR

Çalışmamızda antibiyotikle ilişkili enterokolit etmeni *C. difficile*'ye ait Düşük Moleküler Ağırlıklı Yüzey Katman Proteinleri'ne ait *LMW_slpA* geni, gen bölgesine özel hazırlanan ileri ve geri primer çiftiyle yapılan PZT sonucunda çoğaltılmıştır. *LMW_slpA* genine ait DNA fragmenti (Şekil 4. 1.) gösteren jel görüntüsü aşağıdadır.



Şekil 4.1. PZT ile sentezlenmiş *C. difficile* *LMW_slpA* geninin %1'lik agaroz elektroforezi jel görüntüsü. P: PZT. Ladder: GeneMark Gen100 DNA Ladder

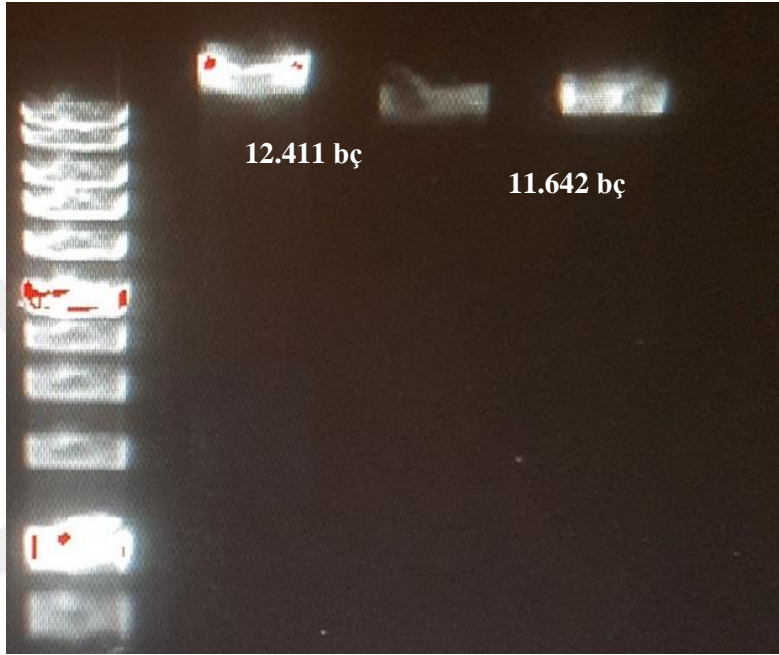
2. ve 3. kuyucukta yüksek konsantrasyonda stoklanmak üzere 50'şer µl olarak yüklenerek jelden temizlenen *LMW_slpA* genine özel primerlerle yapılan PZT ürünleri görülmektedir. Örneğe ait bantların, referans olarak kullanılan 1. kuyudaki 100 baz çifti ladderin 1 kb'a karşılık gelen yukarıdan 4. bandına yakın çıkmış olması, 946 baz çifti olması beklenen *LMW_slpA* genini doğrulamaktadır. Jelden toplanan bu DNA fragmentleri yaklaşık 80 ng/µl olarak ölçülerek sonraki işlemlerde kullanılmak üzere saklanmıştır.



Şekil 4.2. XhoI restriksiyon enzimi ile *LMW_slpA* geninin ve pEarleyGate 103 klonlama vektörünün kesiminin %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü.
R: Restriksiyon. Ladder: GeneMark 1 kb DNA Ladder

R1 olarak adlandırılan 2. kuyucukta, XhoI restriksiyon enzimi ile kesilmiş *LMW_slpA* genine ait DNA fragmenti, R2 olarak adlandırılan 3. kuyucukta ise enzim ile kesilmemiş aynı gen bulunmaktadır. 946 baz çifti beklendiği üzere ladderdaki ilgili referans değerlere karşılık geldiği görülmüş ve doğrulanmıştır. R3 kuyucuğunda XhoI restriksiyon enzimi ile kesilerek plazmidten çıkarılan 1.715 baz çiftlik parça ile kalan 10.696 baz çifti 2 ayrı fragment olarak görülmektedir ve kesimin gerçekleşmiş olduğu bu şekilde belirlenmiştir. R4 kuyucuğuna yüklenen kesilmemiş plazmide ait 12.411 baz çifti olması beklenen DNA'nın karşılık geldiği referans değerinin altında kalması plazmidin "supercoiled" formda olduğunu düşündürmüştür. Kesilmiş plazmide ait 10.696 baz çifti olduğu düşünülen bant jelden temizlenerek ligasyonda kullanılmak üzere saklanmıştır.

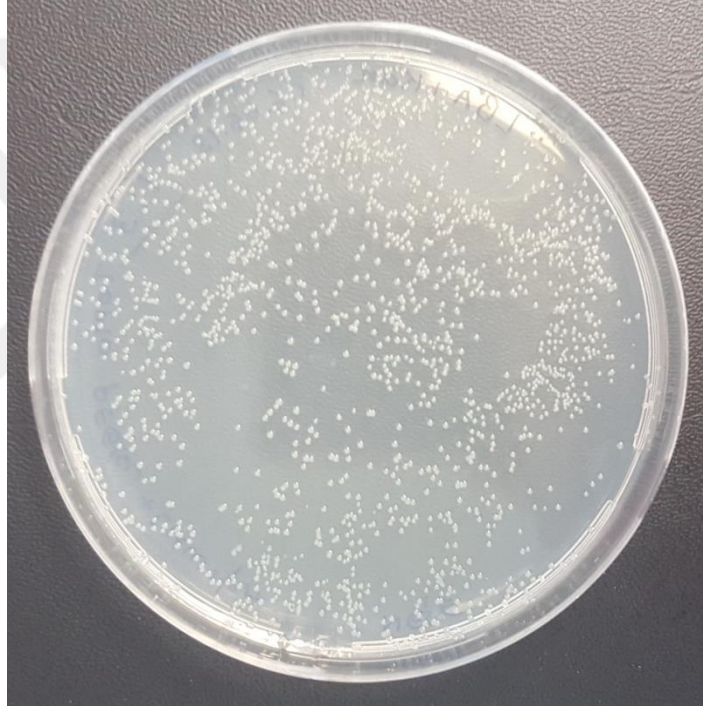
Klonlama vektörünün önceden yeri belirlenen çoklu kesim bölgesinde restriksiyon enzimi ile yapışkan uçlar oluşturulmuş, önceden PZT ile çoğaltılan ilgilenilen gen bölgesinin aynı enzimle kesilen yapışkan uçları ile uyumlu hale getirilmiştir.



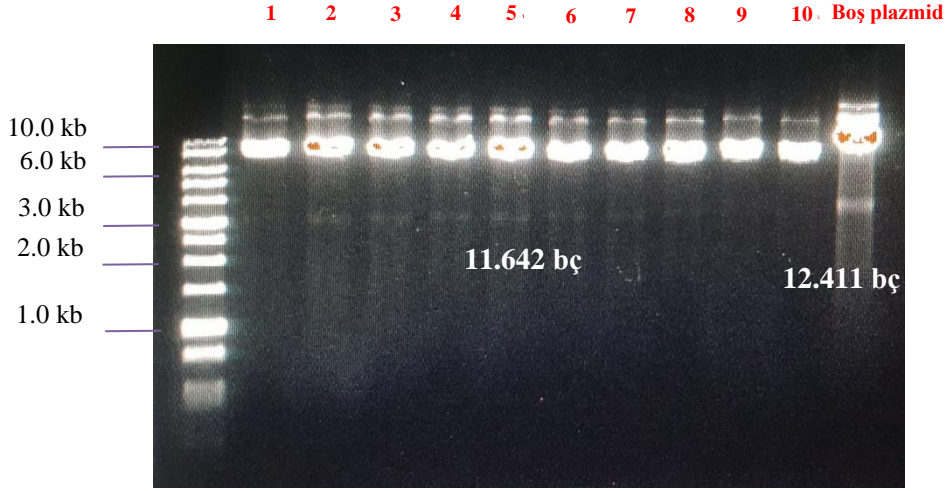
Şekil 4.3. pEarleyGate 103 plazmidde *LMW_slpA* geninin ligasyon ürününe ait %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. L1: Boş pEarleyGate 103 plazmid, L2 ve L3: *LMW_slpA* geni içeren rekombinant pEarleyGate 103 plazmid. L: Ligasyon. Ladder: GeneMark 1 kb DNA Ladder

T4 DNA Ligaz enzimi ile yapışkan uçlu lineer plazmid ve DNA fragmentinin birbirine bağlanması tepkimesi gerçekleştirilmiştir. Plazmidin çoklu klonlama bölgesinden çıkarılan DNA parçası ile sonradan bağlanan yabancı DNA parçası arasındaki fark 769 baz çiftidir.

Yukarıda Şekil 4.3.'de görülen agaroz jelde ligasyon tepkimesi sonucu gösterilmektedir. L1 olarak adlandırılan kuyucukta kesimden önceki boş plazmidlere ait 12.411 kb bant görüntüsü görülmektedir. L2 ve L3 olarak adlandırılan 3. ve 4. kuyucuklarda ise 946 baz çifti büyüklüğünde *LMW_slpA* geni eklenmiş pEarleyGate 103 plazmidine ait 11.642 baz çifti büyüklüğündeki rekombinant DNA'nın bantları görülmektedir.

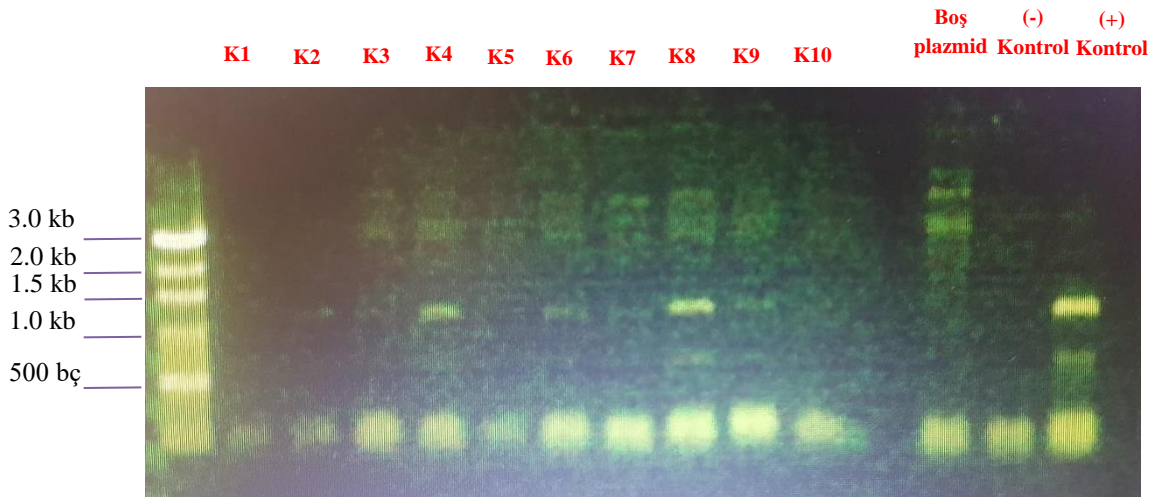


Şekil 4.4. Kanamisinli LB Agar plakta *LMW_slpA* geni klonladığımız pEarleyGate 103 plazmidi içeren transformant *E.coli* TOP10 kolonileri.



Şekil 4.5. Rastgele seçilen 10 koloniden izole edilen plazmidlerin %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Ladder: GeneMark 1 kb DNA Ladder

Şekil 4.5.'te verilen jel görüntüsündeki 1'den 10'a kadar numaralandırılan kuyucuklardaki 11.642 baz çifti büyüklükte olduğu düşünülen bantlardan ilkinin ilgili plazmide ait doğrusal, ikinci bandın ise plazmidin halkasal DNA formuna ait olduğu düşünülmektedir. 12. kuyucukta vektörün klonlama yapılmamış formuna ait 12.411 baz çifti büyüklüğündeki örneğin doğrusal ve halkasal yapıdaki bantları görünmektedir.



Şekil 4.6. Transforme bakterilerden rastgele seçilen 10 koloniye ait plazmid ile yapılan koloni PZT sonucunu gösteren %1'lik agaroz jel görüntüsü. K: Koloni. Ladder: GeneMark 100 bp DNA Ladder

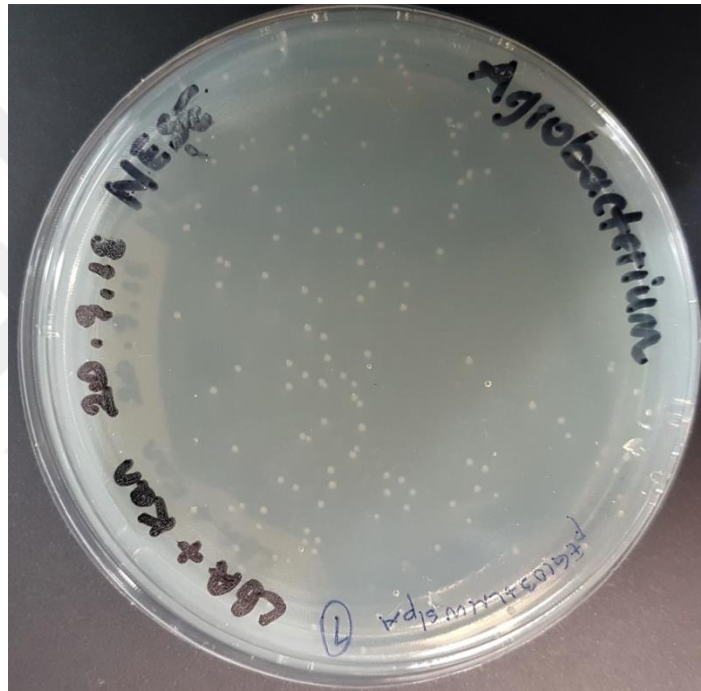
Şekil 4.6.'da verilen jel görüntüsündeki K1 ve K10 arasında sıralanan kuyucuklarda, klonlanan gene ait 946 baz çifti büyüklüğünde olması beklenen PZT ürünleri ladder üzerindeki referans değerleriyle birlikte pozitif kontroldeki banda karşılık gelmiş ve genin plazmid içerisindeki varlığı doğrulanmıştır. Beklenen değerde bant gözlenen koloniler sonraki çalışma aşaması için ayrılmıştır. Negatif kontrolde bant gözlemlenmemiş ve PZT'nin doğru çalıştığı, herhangi bir kontaminasyon olmadığı teyit edilmiştir. Sonraki aşamada PZT sonucu referans değerlere göre 946 baz çiftlik bant görünen kolonilere ait plazmidlerle PstI endonukleaz kesim enzimiyle haritalama işlemi yapılmıştır.



Şekil 4. 7. PZT ile belirlenen koloni plazmid DNA'larının PstI endonukleaz enzimi ile kesimi %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. P: PstI endonukleaz enzimi. Ladder: GeneMark 100 bp DNA Ladder

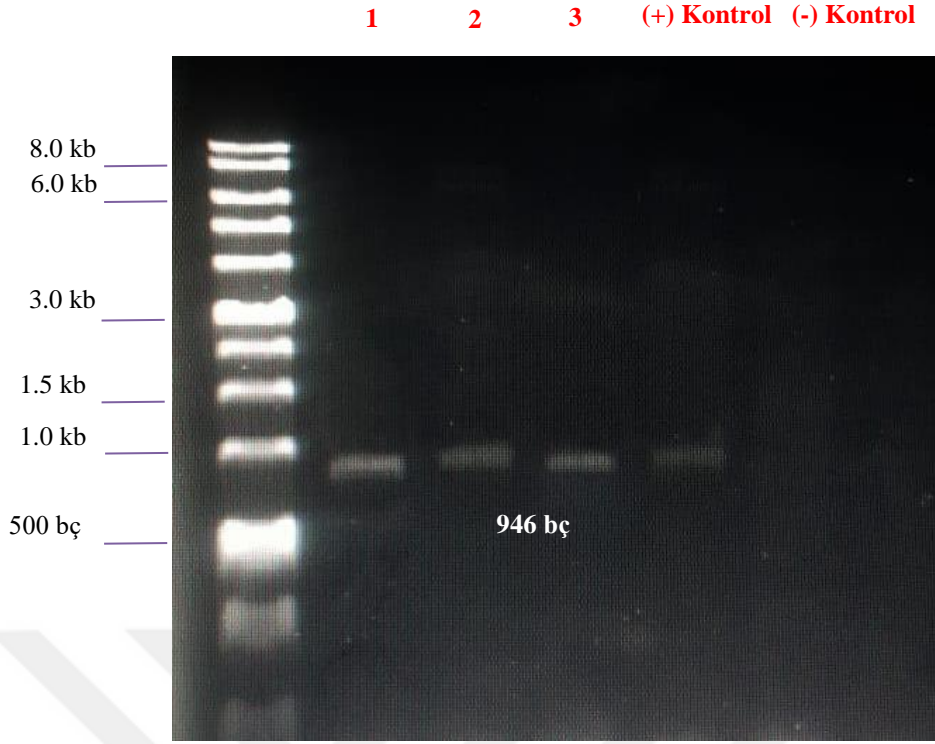
Klonlamada tercih ettiğimiz XhoI endonukleaz enzimi, analizlerde genin ters ya da düz olarak klonlanmış olduğunu belirlememiz zorunluluğu meydana getirmektedir. Restriksiyon haritalama yöntemiyle yapılan analiz sonucu rekombinant plazmidlerdeki genin yerleşme şekli belirlenmiştir. Bu işlem için, plazmid en az 3 noktadan kesen ve bu noktalardan en az biri klonladığımız genin içinde bulunan bir endonukleaz enzimi

tercih edilmiştir. PstI endonukleaz enzimi, ilgili genin *düz* olarak klonlanmış olduğu plazmidlerde 7.243 baz çifti, 2.542 baz çifti ve 2.215 baz çifti uzunluğunda 3 DNA fragmenti oluşturmaktadır. Buna karşılık *ters* olarak klonlanmış plazmidlerde ise farklı olarak 7.243 baz çifti, 2.974 baz çifti ve 1.783 baz çifti uzunluğunda bantlar oluşturmaktadır. Kontrol olarak, *boş* plazmid kesimi de jele yüklenmiş ve beklenen 5.700 baz çifti, 3.864 baz çifti ve 1.662 baz çifti uzunluğunda bantlar, klonlanmış plazmidlerle karşılaştırılarak tekrar doğrulanmıştır.



Şekil 4.8. Kanamisinli LB Agar plakta *LMW_slpA* geni klonladığımız pEarleyGate 103 plazmidi içeren *A. tumefaciens* kolonileri.

Restriksiyon haritalama işlemi sonucu *düz* olarak klonlandığı belirlenmiş ve doğrulanmış koloniye ait rekombinant plazmidler, *A. tumefaciens* bakterisine elektroporasyon yöntemi ile aktarılmıştır. Şekil 4.8.'de kanamisinli LB agar plaklarda üreyen *A. tumefaciens* kolonileri görülmektedir.



Şekil 4.9. *A. tumefaciens*'ten izole edilen plazmidlerle *LMW_slpA* için özel hazırlanan ileri ve geri primer çiftiyle yapılan PZT sonucunu gösteren %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü

Şekil 4. 9.'da 1,2 ve 3 şeklinde numaralandırılmış kuyucuklardaki bantların, ladder ve pozitif kontrol olarak kullanılan *C.difficile* DNA'sından çoğaltılan *LMW_slpA* geninin referans değerleriyle karşılaştırılması sonucu 946 baz çifti uzunluğunda olması beklenen ilgili PZT ürünlerinin doğrulanması sağlanmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hastane kaynaklı, antibiyotikle ilişkili enterokolit etmeni *C. difficile* bakterisi, dünyada ve ülkemizde klinik olarak ilgilenilmesi gereken bir sorun oluşturmaktadır. Özellikle halihazırda tedavi sürecinde olan ve bağışıklık sistemi zayıflayan hastalarda tedavisi güç ve ölüme kadar ilerleyen bir tabloda seyretmektedir. Antibiyotik kullanımına bağlı olarak mikroorganizmaların birbirleriyle rekabet halinde bulunduğu bağırsak florasının dengesi bozulur ve baskılanan *C. difficile* sporları aktif halde vejetatif forma geçerek toksin salgılamaktadır (Leclair ve ark., 2010).

CDE'nin tedavisi için vankomisin antibiyotik tedavisi ya da sağlıklı bir insanın dışkısından elde edilen mikrobiyal solüsyonun değişik yollarla hasta kişiye nakledilmesidir olarak tanımlanan fekal mikrobiyota transplantasyonu (FMT) yöntemleri dışında uygulanabilecek başka tedavi günümüz için bulunmamaktadır (Barnett, 2012; Pechine ve ark., 2007). CDE için en güncel alternatif tedavi arayışlarında *C. difficile* bakterisinin yüzey katman proteinleri (SLP'ler) üzerine yoğun ilgi dikkat çekmektedir. Özellikle Calabi ve arkadaşlarının detaylı çalışmalar yaptığı SLP'ler hakkında sundukları bilgilerden sıklıkla faydalanılmıştır. Yapılan çalışmalardan alınan sonuçlar, SLP'ler üzerine farklı bir bakış açısı geliştirip bu çalışmayı planlamamızı sağlamıştır (Cerquetti ve ark., 2000; Calabi ve ark., 2001; Calabi ve ark., 2002; Calabi ve Fairweather, 2002; Eidhin ve ark., 2006).

C. difficile'e ait SLP'lerin bağırsak yüzeyindeki kolonizasyonu sırasında özellikle düşük moleküler ağırlıklı SLP A'nın (LMW-slpA) yüksek miktarlarda uygulanması halinde bağırsak epitel hücrelerinde immün yanıt oluşturduğu Bruxelle ve arkadaşları tarafında 2015 yılında yayınlanan çalışmayla ortaya konmuştur. Bu bilgiden yola çıkarak bitki biyoteknolojisiyle geliştirilmiş LMW-slpA proteini üreten bitkiler yetiştirmek tasarlanmıştır. Bu bitkiler ağızdan alınarak sindirim kanalına geçen LMW-slpA'lar ile bağırsak epitel hücrelerinde immünooglobulin antikorlarının sentezini uyarmak ve sonradan gelişebilecek CDE için kolonizasyon öncesinde immün yanıt oluşturulmasını sağlamak çalışmamızın ana fikrini oluşturmuştur. (Bruxelle ve ark., 2015; Pechine ve ark., 2007; Calabi ve ark., 2002).

SLP'lere ait öncül protein slpA, 2160 baz çifti uzunluğundaki gen bölgesinden sentezlenmektedir ve toplamda 72-86 kDa kütleyle sahiptir (Eidhin ve ark., 2006; Calabi ve ark., 2002). Yüksek moleküler ağırlıklı alt birim (HMW-slpA), öncül proteinin C-terminalinden, sistein proteaz enzimi ile düşük moleküler ağırlıklı yüzey katman proteini (LMW-slpA)'den ayrılır. Bağırsak epitel hücresi ile ilk temas eden ve kolonizasyon sürecinin başlamasında öncül olan protein olduğu düşünülmektedir (Calabi ve ark., 2002). *slpA* geni baz çifti uzunluğu ve sentezlenen proteinin kütlesi göz önüne alınarak, bir bütün olarak kullanılmak yerine düşük moleküler ağırlıklı (LMW-slpA) alt birimi tercih edilmiştir. *LMW-slpA* geninin tercih edilmesindeki en önemli etken *C. difficile* kolonizasyonundaki etkisi ile hedeflediğimiz amacı yerine getirebileceğini düşünmemizdir. Ayrıca moleküler düzeyde *slpA* genini bir bütün olarak PZT ile çoğaltmak, *Agrobacterium*'a uygun plazmid pEarleyGate 103'ün halihazırda boyutunun büyük olması (12.411 baz çifti) sebebiyle klonlanmada karşılaşılan güçlükler de göz önüne alınarak çalışmamızda yüzey katman proteinlerinin düşük moleküler ağırlıklı (LMW-slpA) alt birimi seçilmiştir.

Moleküler klonlama ile ilgilendiğimiz genin ürünü olan proteini üretecek genetik özelliğe sahip rekombinant plazmidlerin düzenlenmesi ve bitkilere indirekt gen aktarımında kullanılacak *A. tumefaciens* bakterilerine bu plazmidlerin aktarılması çalışmaları gerçekleştirilmiştir. *A. tumefaciens* bakterilerinden izole edilen rekombinant plazmidler ile yapılan DNA seviyesinde analizler ile klonlamanın gerçekleştiği, bitkiye aktarılabilir yapıda plazmidlerin ve doğal olarak vektör olarak kullanılabilir *A. tumefaciens*'lerin elde edildiği görülmüştür. İlgilenilen rekombinant plazmidi içeren *A. tumefaciens* elde edilmesi, bitki doku kültürü ile *LMW-slpA* geninin ifadesiyle sentezlenen proteinlerle *C. difficile* enfeksiyonuna karşı anti-SlpA antikorlarının üretilmesi açısından önem teşkil etmektedir.

Rekombinant biyofarmasötiklerin tedariki için bitkilerin kullanılması, üretimini arttırma ve maliyetleri azaltma potansiyeline sahiptir (Owczarek, 2019). Bu çalışmadan elde edilen materyaller ve verilerden, sonraki aşamalarda bitki biyoteknolojisi çalışmalarında kullanılmak üzere faydalanılabilir. Çalışmanın amacına uygun olarak; yenilebilir, tarımı yaygın, kültür şartları ve çimlenme kapasitesine göre belirlenecek bitki türü ile doku kültürü yapılabilir. Tercih edilen bitkilere ait tohumlar, bitki doku

kültürüyle çimlendirilip, gerekli bitki büyüme düzenleyicileri doğru miktarlarda kullanılarak, organogenezle elde edilecek kök, gövde, yaprak gibi dokulara ait bitki hücrelerine, transgenik *A. tumefaciens* bakterileriyle gen aktarım yapılabilir.

Özellikle 2000 yılı ve sonrasında yapılan çalışmalarda doku kültürü ve bitkinin genetik olarak ıslahı konusunda çok daha sağlam adımların atıldığı bir gerçektir. Özellikle Barotti ve arkadaşlarının (2006) belirttiği üzere belirli ekolojik koşullara adaptasyonu ve ürün verimi yüksek bitkilerin geliştirilmesinde genetik değişikliklerin önemi gösterilmiştir.

Li ve Zhang 'ın (2018) yayınladığı en güncel yayınlarda memeli hücrelerinin yanısıra pamuk gibi bitki hücrelerinde CRISPR/Cas9 sistemi ile gen düzenleme çalışmalarının hız kazandığı da görülmektedir.

Oluşturulan transgenik bitkilerle soğuk zincir gerektirmeyen, bozulma riski minimum olan, kolay tüketilebilir, kolay uygulanabilir, yenilebilir aşular üretilebilmektedir. Biz bu çalışmada yenilebilir aşı üretiminin birinci aşaması olarak gerekli vektör olan transgenik plazmid taşıyan *A. tumefaciens* bakterilerini elde ettik.

KAYNAKÇA

“FAQ: *Clostridium difficile*.” 1997-2001. Department of Microbiology, Mount Siani Hospital. 01 May 1, 2014. <http://microbiology.mtsinai.on.ca/faq/CDEfffaq.shtml>

al Saif, N., Brazier, J.S. (1996). “The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales”. *J Med Microbiol.* 1996;45(2):133–7.

Aslam, S., Hamill, R.J., Musher, D.M. (2005). “Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease: old therapies and new strategies”. *Lancet Infect Dis.*2005;5:549-557

Aygun, G., Yilmaz, M., Yasar, H., Aslan, M., Polat, E., Midilli, K., Ozturk, R., Altas, K. (2005). “Parasites in nosocomial diarrhoea: are they underestimated?”. *J Hosp Infect.* 2005 ;60(3):283-5.

Barak S., Mudgil D., Khatkar B.S. (2010). “Genetically modified food: benefits, safety aspects and concerns.”. *As. J. Food Ag-Ind.*, 3(06), 548-560

Barbut, F., Mastrantonio, P., Delmée, M., Brazier, J., Kuijper, E. ve Poxton, I. (2007). “Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates”. *Clin Microbiol Infect.* 13(11): 1048-57.

Barketi-Klai, A., Hoys, S., Lambert-Bordes, S., Collignon, A., Kansau, I. (2011). “Role of fibronectin-binding protein A in *Clostridium difficile* intestinal colonization”. *J Med Microbiol* 60: 1155–1161.

Barotti, S., Fambrinii M., Pugliesi, C., Lenzi, A. (2006). “Genetic variability in plants regenerated from *in vitro* culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.)”. *Plant Breed*, 114: 275–276.

Barnett, J.S. (2012). “*Clostridium difficile*: a new look at an old but increasingly deadly infection”. *JAAPA* 2012; 25(1): 326.

Bartlett, J.G. (2006). “Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease”. *Ann Intern Med.* 2006;145:758-64.

Bartlett, J.G., Chang, T.W., Gurwith, M., Gorbach, S.L., Onderdonk, A.B. (1978). “Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxinproducing clostridia”. *N Engl J Med.*; 298:531-534

Bauer, M.P., Notermans, D.W., van Benthem, B.H., et al. (2011). ECDIS Study Group. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospitalbased survey. *Lancet* 2011; 377(9759): 6373.

Bhattacharyya, J., Chakraborty, A., Roy, S. et al. (2015). "Genetic transformation of cultivated jute (*Corchorus capsularis* L.) by particle bombardment using apical meristem tissue and development of stable transgenic plant". *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 121: 311- 324.

Bignardi, G.E. (1998). “Risk factors for *Clostridium difficile*”. *J Hosp Infect.* 1998;40:1–15.

Borriello, S. P., Davies, H. A., Kamiya, S., Reed, P. J. and S. Seddon. (1990). “Virulence factors of *Clostridium difficile*”. *Rev. Infect. Dis.* 12: S185–S191.

Borriello, S.P.B. (1998). “Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection”. *JAC* 1998;41(Suppl C):13-19.

Bruxelle, J.-F. et al. (2015). “Immunogenic properties of the surface layer precursor of *Clostridium difficile* and vaccination assays in animal models”. *Anaerobe.* Volume 37, Pages 78-84.

Burke K. E., Lamont J. T. (2014). “*Clostridium difficile* infection: a worldwide disease”. *Gut Liver* 81–6. 10.5009.

Burr, T.J., Bazzi, C., Sule, S., Otten, L. (1998). “Crown gall of grape: biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies”. *Plant Disease.* 82:1288–1297

Calabi, E. and Fairweather, N. (2002). “Patterns of sequence conservation in the S-layer proteins and related sequences in *Clostridium difficile*”. *J. Bacteriol.* 184(14): 3886-3897.

Calabi, E., Calabi, F., Phillips, A.D., Fairweather, N.F. (2002). “Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues”. *Infect Immun* 70: 5770–5778.

Calabi, E., Ward, S., Wren, B., Paxton, T., Panico, M., et al. (2001). “Molecular characterization of the surface layer proteins from *Clostridium difficile*”. *Mol Microbiol* 40: 1187–1199.

Cavara, F. (1897). ”Intorno alla eziologia de alcune malattie di piante coltivate”. *Soc. tip. Modenese*. 30: 483–487

Cerquetti, M., Molinari, A., Sebastianelli, A., Diociaiuti, M., Petruzzelli, R., Capo, C. and Mastrantonio. P. (2000). “Characterization of surface layer proteins from different *Clostridium difficile* clinical isolates”. *Microb. Pathog.*, 28: 363–372.

Chandra, S. (2012). "Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism." *Biotechnology letters*, 34.3 (2012): 407-415.

Clark, M. S., ed. (2013). “Plant molecular biology—a laboratory manual”. *Springer Science & Business Media*.

Cobb, J.N., DeClerck, G., Greenberg, A., Clark, R., McCouch, S. (2013). "Next-generation phenotyping: requirements and strategies for enhancing our understanding of genotype–phenotype relationships and its relevance to crop improvement”. *Theoretical and Applied Genetics*, 126.4 (2013): 867-887.

Cohen, S., Gerding, D., Johnson, S., Kelly, C., Loo, V., McDonald, L., . . . Wilcox, M. (2010). “Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults: 2010 Update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA)”. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 31(5), 431-455.

Conway G. (1998). “The Doubly Green Revolution: Food for All in the 21st Century”. Ithaca, N.Y.: Cornell University Press.

Czarnecka-Verner, E., Salem, T. ve Gurley, W.B. (2016). "Adaptation of the *A. tumefaciens* VirG response regulator to activate transcription in plants.". *Plant Mol Biol* (2016) 90: 217.

de Dios Barajas-López, Juan, Nicolás E. Blanco, ve Åsa Strand. (2013). "Plastid-to-nucleus communication, signals controlling the running of the plant cell." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1833.2 (2013): 425-437.

Deniz, U., Ulger, N., Aksu, B., Karavus, M., Soyletir, N. (2011). "Investigation of Toxin Genes of *Clostridium difficile* Strains Isolated from Hospitalized Patients with Diarrhoea at Marmara University Hospital". *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(1): 1-10.

Denkovskienė, E., Paškevičius, Š., Werner, S., Gleba, Y. Ve Ražanskienė, A. (2015). "Inducible Expression of Agrobacterium Virulence Gene VirE2 for Stringent Regulation of T-DNA Transfer in Plant Transient Expression Systems." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28.11 : 1247-1255.

Eidhin, D.N., Ryan, A.W., Doyle, R.M., Walsh, J.B. and Kelleher, D. (2006). "Sequence and phylogenetic analysis of the gene for surface layer protein, slpA, from 14 PCR ribotypes of *Clostridium difficile*". *J. Med. Microbiol.* 55(1): 69-83.

Elliott, B., Chang, B.J., Golledge, C.L., Riley, T.V. (2007). "*Clostridium difficile*-associated diarrhoea". *Inn Med Journal.* 2007;37:561-68.

Ergen, E.K., Akalin, H., Yilmaz, E., Sınırtaş, M., Alver, O., Heper, Y., Özakın, C., Bakker, D., Ener, B., Mıstık, R., Helvacı, S., Kuijper, E. J. (2009). "Nosocomial diarrhea and *Clostridium difficile* associated diarrhea in a Turkish University Hospital". *Med Mal Infect.* 2009;39:382-7.

Fabre, E., Dunal, F. (1853)."Observations sur les maladies regantes de la vigne". *Bull. Soc. Cent. Agric. Dep. Herault.*, 40, 46

Freeman, J., Bauer, M. P., Baines, S.D., Corver, J., Fawley, W. N., Goorhuis, B., Kuijper, E. J., Wilcox, M. H. (2010). "The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections". *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(3): 52949.

García-Cano, E., Magori, S., Sun, Q., Ding, Z., Lazarowitz, S.G., Citovsky, V. (2015). “Interaction of Arabidopsis Trihelic-Domain Transcription Factors VFP3 and VFP5 with Agrobacterium Virulence Protein VirF”. *PLoS ONE* 10(11): e0142128.

Garrity GM (ed). (2005). “Bergey’s manual of systematic bacteriology”. 2nd edn. The Proteobacteria, Originally published by Williams and Wilkins, 1984 2nd edn. Springer, New York

Gelvin, S. (2012). “Plant molecular biology manual”. *Springer Science & Business Media, 2012.*

Gelvin, S.B. (2003). “Improving plant genetic engineering by manipulating the host”. *Trends in Biotechnology.* 21(3): 95- 98

Gravel, D., Miller, M., Simor, A., Taylor, G. Gardam, M., McGeer, A., Hutchinson, J., Moore, D., Kelly, S., Boyd, D., Mulvey, M. (2009). “Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. Health care associated *Clostridium difficile* infection in adults admitted to acute care hospitals in Canada: a Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program Study”. *Clin Infect Dis* 2009; 48(5): 56876.

Grewal, H.M.S., Hemming Karlsen, T., Vetvik, H., Åhren, C., Gjessing, H.K., Sommerfelt, H. ve Haneberg, B. (2000). “Measurement of specific IgA in faecal extracts and intestinal lavage fluid for monitoring of mucosal immune responses”. *J. Immunol. Methods.* 239 (1-2): 53-62.

Gürel, E. (1997). “Callus and root development from leaf explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): Variability at variety, plant and organ level. *Turkish Journal of Botany,* 21(3): 131-136.

Hall, I.C., O’Toole, E. (1935). “Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficile*”. *Am J Dis Child* 1935; 49:390–402.

Hennequin, C., Janoir, C., Barc, M.C., Collignon, A., Karjalainen, T. (2003). “Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*”. *Microbiology* 149: 2779–2787.

Hennequin, C., Porcheray, F., Waligora-Dupriet, A., Collignon, A., Barc, M., Bourlioux, P. ve Karjalainen, T. (2001). “GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence”. *Microbiol. Read. Engl.* 147(1): 87-96.

Hurley, B.W., Nguyen, C.C. (2002). “The spectrum of pseudomembranous enterocolitis and antibiotic associated diarrhea”. *Arc Intern Med.* 2002;162:2177-84.

Hwang, H.H., Gelvin, S.B. and Lai, E.M. (2015). Editorial:“*Agrobacterium* biology and its application to transgenic plant production”. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-3

Jackson, M. A., Anderson, D.J. ve Birch, R.G. (2013). "Comparison of *Agrobacterium* and particle bombardment using whole plasmid or minimal cassette for production of high-expressing, low-copy transgenic plants". *Transgenic research*, 22.1 (2013): 143-151.

Jamison, J. (2001). “Tomatoes silence crown gall disease”. *Nat. Biotechnol.* 19, 1127

Jeon, Y.H., Park, H., Lee, B.D., Yu, Y.H., Chang, S.P., Kim, S.G., Hwang, I., Kim, Y.H. (2008). “First description of crown gall disease on ginseng”. *Plant Pathol J* 24(2):207–210

Johnson, S. (2009). “Recurrent *Clostridium difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes”. *J Infect* 2009; 58(6): 40310.

Johnson, S., Samore, M.H., Farrow, K.A., Killgore, G.E., Tenover, F.C., Lyras, D., Rood, J.I., DeGirolami, P., Balth, A.L., Rafferty, M.E., Pear, S.M., Gerding, D.N. (1999). “Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin resistant strain of *Clostridium difficile* in four hospitals”. *N Engl J Med.* 1999;341:1645-51.

Jordan, C. A., Neumann, E. ve Sowers, A.E. eds. (2013). “Electroporation and electrofusion in cell biology”. *Springer Science & Business Media*, 2013.

Kahl, G., ve Schell, J.S. eds. (2014). “Molecular biology of plant tumors”. *Academic press*, 2014.

Karadag, F.Y., Gunal, O., Barut, H. S. (2013). “Güncel Bilgiler Işığında *Clostridium difficile* Enfeksiyonu”. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2013;5 (2):68-73

- Karjalainen, T., Waligora-Dupriet, A.J., Cerquetti, M., Spigaglia, P., Maggioni, A., et al. (2001).** “Molecular and genomic analysis of genes encoding surface-anchored proteins from *Clostridium difficile*”. *Infect Immun* 69: 3442–3446.
- Kerr, Allen, ve Max, Tate. (2016).** "Further studies on crown gall of stone fruit." *Australasian Plant Pathology*, (2016): 1-3.
- Khawar, K.M., Özcan, S. (2002).** “*In vitro* induction of crown galls by *A. tumefaciens* super virulent strain A281 (pTiBo 542) in lentil (*Lens culinaris* Medik.)”. *Turk J Bot* 26:65–170
- Kirby, J.M., Ahern, H., Roberts, A.K., Kumar, V., Freeman, Z., Acharya, K.R. and Shone, C.C. (2009).** “Cwp84, a surface-associated cysteine protease, plays a role in the maturation of the surface layer of *Clostridium difficile*”. *J. Biol. Chem.* 284(50): 34666-34673.
- Kodahl, N., Müller, R. ve Lütken, H. (2016).** "The *Agrobacterium rhizogenes* oncogenes rolB and ORF13 increase formation of generative shoots and induce dwarfism in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh". *Plant Science* 252 : 22-29.
- Kuijper, E.J., Coignard, B., Tüll, P. (2006).** ESCMID Study Group for *Clostridium difficile*; EU Member States; “European Centre for Disease Prevention and Control. Emergence of *Clostridium difficile* associated disease in North America and Europe”. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(Suppl 6):2-18.
- Kuijpers, E.J., Surawiz, C.M. (2008).** “*Clostridium difficile* infection. *Lancet* 2008; 371(9623): 14868.
- Kuipers, O. P., de Ruyter, P., Kleerebezem, M. and de Vos, W. M. (1998).** “Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria”. *J. Biotechnol.* **64**: 15–21.
- Kyne, L., Farrell, R.J., Kelly, C.P. (2001).** “*Clostridium difficile*”. *Gastroenterol Clin North Am* 30: 753–777, ix–x.
- Kyne, L., Warny, M., Qamar, A., Kelly, C.P. (2000).** “Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin”. *A.N Engl J Med.* 2000;342:390-7.

Leclair, M.A., Allard, C., Lesur, O., Pépin, J. (2010). “*Clostridium difficile* infection in the intensive care unit”. *J Intensive Care Med* 2010; 25(1): 2330.

Li, C., ve Zhang, B. (2018). “Genome Editing in Cotton Using CRISPR/Cas9 System”. *Transgenic Cotton*, 95–104. doi:10.1007/978-1-4939-8952-2_8

Lynch, P., ve Davey, M.R. (2012). “Electrical manipulation of cells”. *Springer Science & Business Media*, 2012.

Marton, I., Honig A. , Omid, A. , De Costa, N., Marhevka, E., Cohen, B., Zuker, A., ve Vainstein, A. (2013). "From *Agrobacterium* to viral vectors: genome modification of plant cells by rare cutting restriction enzymes." *International Journal of Developmental Biology*, 57.6-7-8 (2013): 639-650.

McCollum, D.L., Rodriguez, J.M. (2012). “Detection, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infection”. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; 10(6): 58192.

McDonald, L.C., Owings, M., Jernigan, D.B. (2006). “*Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996- 2003”. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:409-15.

Murai, Norimoto. (2013). "Review: plant binary vectors of Ti plasmid in *A. tumefaciens* with a broad host-range replicon of pRK2, pRi, pSa or pVS1". *American Journal of Plant Sciences*, 2013, 4, 932-939

Ochatt, S. (2013). “Plant cell electrophysiology: Applications in growth enhancement, somatic hybridisation and gene transfer”. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1237-1246.

Otten L, deGreve H, Leemans J, Hain R, Hooykaas P, Schell J. (1984). “Restoration of virulence of *vir* region mutants of *A. tumefaciens* strain B6S3 by coinfection with normal and mutant *Agrobacterium* strains”. *Mol Gen Genet.* 195:159–163

Owczarek, B., Gerszberg, A., ve Hnatuszko-Konka, K. (2019). “A Brief Reminder of Systems of Production and Chromatography-Based Recovery of Recombinant Protein Biopharmaceuticals”. *BioMed Research International*, 1–13. Article ID 4216060.

Ozyigit, I. I., Bajrovic, K., Gozukirmizi, N., Semiz, B.D. (2002). “Direct plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of five different sunflower genotypes (*Helianthus annuus* L.) from Turkey”. *Biotechnol Biotec Eq.*, 16(1), 8-11.

Ozyigit, I. I. (2012). “*A. tumefaciens* and Its Use in Plant Biotechnology”. *Crop Production for Agricultural Improvement*. Ashraf, M. et.al (eds.). *Springer*. 317-361

Park, S. , Vaghchhipawala, Z. , Vasudevan, B. , Lee, L. , Shen, Y. , Singer, K. , Waterworth, W. M., Zhang, Z. J., West, C. E., Mysore, K. S. ve Gelvin, S. B. (2015). “*Agrobacterium* T-DNA integration into the plant genome can occur without the activity of key non-homologous end-joining proteins”. *Plant J.* 81: 934-946.

Pauly, M., ve Keegstra, K. (2016). "Biosynthesis of the Plant Cell Wall Matrix Polysaccharide Xyloglucan." *Annual review of plant biology* 67 (2016): 235-259.

Pechine, S., Janoir, C., Boureau, H., Gleizes, A., Tsapis, N., Hoys, S., Fattal, E. and Collignon, A. (2007). “Diminished intestinal colonization by *Clostridium difficile* and immune response in mice after mucosal immunization with surface proteins of *Clostridium difficile*”. *Vaccine*, 25(20): 3946-3954.

Pépin, J., Valiquette, L., Alary, M.E., Villemure, P., Pelletier, A., Forget, K., Pépin, K., Chouinard, D. (2004). “*Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity”. *CMAJ*. 2004;171:466-72.

Pérez-Massot, E., Banakar, R., ve ark. (2012). "The contribution of transgenic plants to better health through improved nutrition: opportunities and constraints." *Genes & nutrition*, 8.1 (2012): 29-41.

Perez-Molphe, E. (2006). “Methods in Plant Tissue Culture. In: Shetty K., Paliyath G., Pometto A. and Levin R.E. (eds)”. *Food Biotechnology*, pp. 553-603. CRC Press, New York.

Platt, T. G., Morton, E.R., Barton, I. S., Bever, J.D., ve Fuqua, C. (2014). "Ecological dynamics and complex interactions of *Agrobacterium* megaplasmids." *Frontiers In Plant Science*, 5 (2014): 635.

Polcaro, C.M., Brancaleoni, E., Donati, E., Frattoni, M., Galli, E., Migliore, L., Rapana, P. (2008). “Fungal bioremediation of creosote-treated wood: a laboratory scale study on creosote components degradation by *Pleurotus ostreatus* mycelium”. *B Environ Contam Toxicol* . 81(2):180–184

Potrykus, Ingo, ve German Spangenberg, eds. (2013). “*Gene transfer to plants*”. Springer Science & Business Media.

Poxton, I. R. 2005. “*Clostridium difficile*”. *Journal of Medical Microbiology*, 54: 97-100.

Poxton, I.R., McCoubrey, J., Blair, G. (2001). “The pathogenicity of *Clostridium difficile*”. *Clin Microbiol Infect*, 2001; 7(8):421-7.

Presottoa A., Uretaa M. S., Cantamutto M., Poverenea M. (2012). “Effects of gene flow from IMI resistant sunflower crop to wild *Helianthus annuus* populations”. *Agriculture, Ecosystems & Environment Volume*, 146. Issue 1. 1 January 2012. Pages 153–161.

Rao, A. Q., Bakhsh, A., Kiani, S., Shahzad, K., Shahid, A. A., Husnain, T. ve Riazuddin, S. (2009). “The myth of plant transformation”. *Biotechnology Advances*, 27(6), 753-763.

Ream, W. (2002). “*Agrobacterium* genetics”. In: Streips UN, Yasbin RE (eds) *Modern microbial genetics*, 2nd edn. Wille-Liss Inc., New York, pp 323–348

Redelings, M.D., Sorvillo, F., Mascola, L. (2007). “Increase in *Clostridium difficile*-related Mortality Rates, United States, 1999–2004”. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:1417–19.

Riggs, M.M., Sethi, A.K., Zabarsky, T.F., Eckstein, E.C., Jump, R.L., Donskey, C.J. (2007). “Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic *Clostridium difficile* strains among long-term care facility residents”. *Clin Infect Dis*. 2007;45:992-8.

Rivera, A.L., Gómez-Lim, M., Fernández, F. ve Loske, A.M. (2012).”Physical methods for genetic plant transformation”. *Physics of Life Reviews*, 9(3), 308-345.

Ryan, K. J., Ray C. G., eds. (2004). “*Sherris Medical Microbiology* (4th ed.)”. *McGraw Hill*, pp. 322-4. ISBN 0-8385-8529-9.

Shkryl, Y. N., Veremeichika, G.N., Bulgakov, V.P., Avramenko, T.V., Günter, E.A., Ovodov, Y.S., Muzarok, T.I., Zhuravlev, Y.N. (2013). "The production of class III plant peroxidases in transgenic callus cultures transformed with the rolB gene of *Agrobacterium rhizogenes*." *Journal of biotechnology*, 168.1: 64-70.

Simor, A.E. (2010). “Diagnosis, management, and prevention of *Clostridium difficile* infection in longterm care facilities: a review”. *J Am Geriatr Soc*, 2010; 58(8): 155664.

Singh, N. V., Singh, S. K., Singh, A. K. (2015). “Standardization of embryo rescue technique and bio-hardening of grape hybrids (*Vitis vinifera* L.) using Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) under sub-tropical conditions”. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, 50(3): 115.

Spencer, R.C. (1998). “The role of antimicrobial agents in the aetiology of *Clostridium difficile*-associated disease”. *JAC*, 1998;41(Suppl C):21-7.

Tam Dang, T.H., Fagan, R.P., Fairweather, N.F. and Tate, E.W. (2012). “Novel inhibitors of surface layer processing in *Clostridium difficile*”. *Bioorg. Med. Chem*, 20 (2): 614-621.

Tasteyre, A., Barc, M.C., Collignon, A., Boureau, H. and Karjalainen, T. (2001). “Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization”. *Infect. Immun*, 69(12): 7937-7940.

Tedesco, F.J., Barton, R.W., Alpers, D.H. (1974). “Clindamycin-associated colitis. A prospective study”. *Ann Intern Med*, 1974; 81:429–33.

Ternan, N.G., Jain, S., Srivastava, M., McMullan, G. (2012). “Comparative transcriptional analysis of clinically relevant heat stress response in *Clostridium difficile* strain 630”. *PLoS ONE*, 7: e42410.

Tschudin-Sutter, S., Widmer, A.F., Perl, T.M. (2012). “*Clostridium difficile*: novel insights on an incessantly challenging disease”. *Curr Opin Infect Dis.*, 2012; 25(4): 40511.

Ueki, S., Magori, S., Lacroix, B. ve Citovsky, V. (2013). "Transient gene expression in epidermal cells of plant leaves by biolistic DNA delivery". *Methods Mol Biol.*, 2013; 940: 17–26.

Urban, E., Tusnadi, A., Terhes, G., Nagy, E. (2002). "Prevalence of gastrointestinal disease caused by *Clostridium difficile* in a university hospital in Hungary". *J Hosp Infect*, 2002; 51(3): 175-8.

Utkhede, R.S., Smith, E.M. (1993). "Evaluation of biological and chemical treatments for control of crown gall on young apple-trees in the Kootenay Valley of British-Columbia". *J Phytopathol*, 137(4):265–271

Vain, P., McMullen, M.D. ve Finer, J.J. (1993). "Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize". *Plant Cell Reports*, (1993) 12: 84.

Vaishnavi, C. (2010). "Clinical spectrum and pathogenesis of *Clostridium difficile* associated diseases". *Indian J Med Res*, 2010;131: 48799.

Vedantam, G., Clark, A., Chu, M., McQuade, R., Mallozzi, M., et al. (2012). "Clostridium difficile infection: toxins and non-toxin virulence factors, and their contributions to disease establishment and host response". *Gut Microbes*, 3: 121–134.

Vonberg, R. , Kuijper, E. J., Wilcox, M. H., Barbut, F. , Tüll, P. , Gastmeier, P. , , , Van Den Broek, P. J., Colville, A. , Coignard, B. , Daha, T. , Debast, S. , Duerden, B. I., Van Den Hof, S. , Van Der Kooi, T. , Maarleveld, H. J., Nagy, E. , Notermans, D. W., O’Driscoll, J. , Patel, B. , Stone, S. and Wiuff, C. (2008). "Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*". *Clinical Microbiology and Infection*, 14: 2-20.

Voth, D.E. and Ballard, J.D. (2005). "Clostridium difficile toxins: mechanism of action and role in disease." *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 247-263.

Waligora, A.J. (2001). "Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties". *Infect. Immun.* 69: 2144-2153.

Waligora, A.J., Hennequin, C., Mullany, P., Bourlioux, P., Collignon, A., et al. (2001). “Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties”. *Infect Immun* 69: 2144–2153.

Yang, J., Yi, J., Yang, C., Li, C. (2013). “*A. tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Salix matsudana* Koidz. using mature seeds”. *Tree Physiology*, Volume 33, Issue 6, 1 June 2013, Pages 628–639,

Yassin, S.F., Young-Fadok, T.M., Zein, N.N., Pardi, D.S. (2001). “*Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis”. *Mayo Clinic Proceedings*; 2011; 76(7): 725-730

Yilmaz, G.R., Çevik, M.A., Ünal, S. (2000). “*Saccharomyces boulardii*”. *Flora*, 2000;5:3-28.

Ziemienowicz, A.. (2014). "*Agrobacterium*-mediated plant transformation: factors, applications and recent advances." *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3.4: 95-102.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Neşe ÇAĞLAYAN
Doğum Yeri ve Tarihi : Üsküdar 09.10.1988
E-posta Adresi : nscglyn@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce, Almanca

EĞİTİM BİLGİLERİ

2011 - 2015 **Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi**
Lisans, Biyoloji (Mezun)
Mezuniyet Ortalaması (3.49/4.00)

2006 - 2010 **Anadolu Üniversitesi, İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi**
Lisans, İşletme Bölümü (Mezun)
Mezuniyet Ortalaması (3.16/4.00)

2002 - 2006 **Sultanbeyli Meslek Lisesi**
Lise, Bilgisayar Programlama Bölümü (Mezun)
Mezuniyet Ortalaması (4.69/5.00)

AKADEMİK ÇALIŞMALAR

Caglayan, N., Ozyigit, I. I., Ozturk, A., Ozturk, N., Karadeniz, S., Vatansever, R., Yalcin, I. E., Cilgin, K., Demir, G. (2016). “Endemik Bir Bitki Olan *Astragalus mitchelianus* BOISS.’in Kaz Dağları Populasyonlarının Mineral Besin Dağılım Özellikleri”. *23. Ulusal Biyoloji Kongresi, Gaziantep, 5-9 Eylül 2016, (Poster)*

Caglayan, N., Kocagoz, T., Ozyigit, I. I. (2018).” *Clostridium difficile* Enfeksiyonlarına Karşı Yenilebilir Aşı Adayı Olarak *slpA* Geninin *A. tumefaciens*’e Klonlanması”. *13. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, İstanbul, 6 - 8 Nisan 2018, (Poster)*