

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**MisL OTOTRANSPORTER PROTEİNİNİN *Salmonella enterica* Serovar
Typhimurium'a KARŞI GELİŞTİRİLEN İMMÜN YANITTA Kİ ROLÜNÜN
BELİRLENMESİ**

Neslihan TAŞKALE KARATUĞ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2016**

Her hakkı saklıdır

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

05.09.2016

Neslihan TAŞKALE KARATUĞ

ÖZET

Doktora Tezi

MisL OTOTRANSPORTER PROTEİNİNİN *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium'a KARŞI GELİŞTİRİLEN İMMÜN YANITTAKİ ROLÜNÜN BELİRLENMESİ

Neslihan TAŞKALE KARATUĞ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Bu araştırmada *S. Typhimurium*'da tanımlanan bir ototransporter olan MisL proteininin, yolcu domaini klonlanarak *E. coli* BL21 suşuna aktarıldı. Klonlanan gen bölgesinin ifadesi Western Blot yöntemi ile tanımlandı. Heterolog konakçıda üretilerek saflaştırılan MisL peptidine karşı geliştirilen antikorlar ile yürütülen hücre kültürü denemelerinde, MisL'in immün yanıtları (IL-6 ve TNF- α) istatistiki açıdan anlamlı bir şekilde teşvik ettiği belirlendi. Nötralizasyon denemelerinde ise; anti-misL antikorunun TNF- α için kısmi nötralizan etki göstermesine rağmen aynı durumun IL-6 için söz konusu olmadığı belirlendi. Biotin ile işaretli antikorun streptavidin muamele edilmiş hücrelerle ilişkisi ve enzim uygulaması denemeleri, MisL proteininin salgı sürecinde hücreden kesilerek ortama salındığını kanıtlamıştır. Bu durum yeterli nötralizan etkisinin görülememesini açıklamaktadır.

Eylül 2016, 108 sayfa

Anahtar Kelimeler: MisL ototransporter protein, *Salmonella* Typhimurium, poliklonal antikor, makrofaj, sitokin

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

IDENTIFICATION OF THE ROLE OF MisL OTOTRANSPORTER PROTEİN ON THE INNATE IMMUNE RESPONSE TO *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium

Neslihan TAŞKALE KARATUĞ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

In this study, the passenger domain of the protein MisL which is described as auto-transporter on *S. Typhimurium* has been cloned and transferred into *E. coli* BL21 strain. Expression of the cloned gene region was characterized by Western Blot method. Cell culture experiments were carried out with antibodies were developed against the purified MisL peptide produced in a heterologous host and statistically, it was determined that MisL promoted immune responses (IL-6 and TNF- α) as meaningful. Neutralization assays showed that although the anti-misL illustrated a partial neutral effect for TNF- α , the same situation was not valid for IL-6. The relationship between antibodies marked with biotin and cells treated with streptavidin besides enzyme application trials proved that MisL released into the environment by cutting from the cell in the secretory process of proteins. This situation explains the failure to observe the impact of adequate neutralizing.

September 2016, 108 pages

Key Words: MisL autotransporter protein, *Salmonella* Typhimurium, polyclonal antibody, macrophage, cytokine

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Uzmanlık ve doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, her daim yanımda hissettiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı), beni destekleyen Tez İzleme Komitemde yer alan hocalarım Prof. Dr. Emine Sümer ARAS'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı) ve Prof. Dr. Belma ASLIM'a (Gazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı), her an koşulsuzca yardımını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Nefise AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü), Prokaryot Genetiği Laboratuvarı çalışma arkadaşlarımdan, sadece laboratuvar hayatımı değil tüm sosyal hayatımı paylaştığım hayatım boyunca da görüşeceğim canım dostum Uzman Fatma Neslihan YÜKSEL'e ve güzel başlayan dostluğumuzun daim olacağını düşündüğüm Uzman Caner ÖZDEMİR'e, deneylerimin bir kısmında benden yardımını esirgemeyen Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Erkan YILMAZ'a ve Yrd. Doç. Dr. Doruk ENGİN'e, immünizasyon enjeksiyonları için bana yardımcı olan Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Yılmaz laboratuvarı ekibinden Uzman Avşar ABBASİ'ye ve Uzman Ahmed Alperen TUNCER'e, deneylerim sırasında sadece bir gün yanımda bulunduğum, bana yaşattığı o bilgi dolu, verimli, güzel günden dolayı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi eski Aşı-Serum Üretim ve Araştırma Merkezi Müdürü Mustafa HACİÖMEROĞLU'na, bana koşulsuz laboratuvarını açan, yardımını, sevgisini ve hoşgörüsünü benden hiç esirgemeyen, akademik bilgisini paylaşan Prof. Dr. İhsan GÜRSEL'e (Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı) ve Bilkent Üniversitesi Thor laboratuvarı ekibinden immünolojik deneylerimin her aşamasında yardımlarını esirgmeden katkıda bulunan Tamer KAHRAMAN'a ve Gözde GÜÇLÜLER'e, zor anlarımda manevi desteklerini tereddütsüz sunan amcam Tash TAŞKALE'ye ve abim Nihat Mustafa TAŞKALE'ye, beni umutlandıran, moral, huzur, mutluluk veren özetle, yaşama kaynaklarım eşim Osman KARATUĞ'a ve oğlum Oğuzhan KARATUĞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bana hayata dair zor şartlara rağmen emekle ayakta durmayı öğreten, doktora tez deney çalışmalarım sırasında kaybettiğim, içimde yaşattığım ve her zaman yaşatacağım canım babaannem Müyesser LAKUŞLAR'a emeğimle gerçekleştirdiğim tezi itafen.

Bu tez çalışması, "MisL Ototransporter Proteininin *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium'a Karşı Geliştirilen İmmün Yanıttaki Rolünün Belirlenmesi (BAP, 13B4143002)" adlı proje tarafından desteklenmiştir. Tez çalışmamı destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkürü bir borç bilirim.

Neslihan TAŞKALE KARATUĞ
Ankara, Eylül 2016

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1 <i>Salmonella</i> Cinsinin Genel Özellikleri	3
2.2 <i>Salmonella</i> Enfeksiyonu	4
2.3 <i>Salmonella</i> Patojenite Adaları	5
2.4 Gram Negatif Bakterilerde Sekresyon Sistemleri	8
2.4.1 Ototransporter proteinlerin sekresyon mekanizması	12
2.4.2 AIDA ototransporter ailesi	16
2.4.2.1 MisL ototransporter proteini	17
2.5 <i>Salmonella</i> Enfeksiyonuna Karşı Oluşturulan Konak İmmün Yanıtı	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1 Materyal.....	22
3.1.1 Bakteriler ve plazmid.....	22
3.2 Yöntem.....	24
3.2.1 Bakteri genomik DNA izolasyonu	24
3.2.2 <i>Salmonella</i> Typhimurium LT2 suşunda <i>MisL</i> geninin ifadesi	25
3.2.2.1 <i>MisL</i> geninin PZR ile çoğaltılması	25
3.2.2.2 <i>MisL</i> geninin tanımlanması	27
3.2.2.3 <i>MisL</i> geninin doğrulanması	27
3.2.3 Restriksiyon endonükleaz enzim kesimleri ve agaroz jel elektroforezi ...	27
3.2.4 DNA bağlama reaksiyonu (Ligasyon)	29

3.2.5 <i>Escherichia coli</i> hücrelerinin elektroporasyona hazırlanması	30
3.2.6 Rekombinant plazmidlerin <i>E. coli</i> Dh5a hücrelerine elektroporasyonu	31
3.2.7 Dh5a suşunda rekombinant plazmid izolasyonu ve insert genin doğrulanması	32
3.2.8 Rekombinant plazmidlerin <i>E. coli</i> BL21 hücrelerine elektroporasyonu	33
3.2.9 Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)	34
3.2.10 Rekombinant MisL proteininin saflaştırılması	38
3.2.11 Western blot yöntemi	39
3.2.12 Protein konsantrasyonunun belirlenmesi	41
3.2.13 Poliklonal antikor eldesi ve kontrolü	42
3.2.13.1 Balb/c farelerde poliklonal antikor üretimi	42
3.2.13.2 Farelerin antikor yanıtının kontrol edilmesi	44
3.2.14 Poliklonal antikor saflaştırılması	44
3.2.15 Hücre kültürü	45
3.2.16 Makrofaj hücrelerinin simülasyonu	45
3.2.17 Sitokin düzeylerinin belirlenmesi	46
3.2.18 İstatistiksel analiz	48
3.2.19 Floresans mikroskop denemeleri	49
3.2.19.1 Antikorum biotinle işaretlenmesi	49
3.2.19.2 Kültürlerin streptavidinle işaretlenmesi	50
3.2.20 MisL proteininin ekstrasellüler ortamda incelenmesi	51
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	52
4.1 <i>Salmonella</i> Typhimurium LT2 Suşunda <i>MisL</i> Geninin Yolcu Domaininin Çoğaltılması	52
4.2 Restriksiyon Endonükleaz Enzim Kesimi	55
4.3 DNA Bağlama Reaksiyonu (Ligasyon)	56
4.4 Rekombinant Plazmidlerin <i>E. coli</i> Dh5a Hücrelerine Elektroporasyonu	57
4.5 <i>E. coli</i> Dh5a Suşundan Rekombinant Plazmid İzolasyonu Ve İntert Genin Doğrulanması	58
4.6 Rekombinant Plazmidlerin <i>E. coli</i> BL21 Hücrelerine Elektroporasyonu..	60
4.7 <i>E. coli</i> BL21 Suşundan Rekombinant Plazmid İzolasyonu Ve İntert Genin Doğrulanması	61
4.8 <i>E. coli</i> BL21 Suşunda Klonlanan <i>MisL</i> Gen Bölgesinin İfadesi.....	63

4.9 Rekombinant MisL Proteininin Saflaştırılması	66
4.10 Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	68
4.11 Poliklonal Antikor Eldesi, Kontrolü Ve Saflaştırılması	69
4.12 Makrofaj Hücrelerinin Simülasyonu Ve Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi.....	70
4.13 Floresans Mikroskop Denemeleri	77
4.14 MisL Proteininin Ekstrasellüler Ortamda İncelenmesi	83
5. SONUÇ.....	85
KAYNAKLAR.....	87
EKLER.....	103
EK 1 Etik Kurul Kararı	104
EK 2 Deney Havanları Kullanımı Eğitimi Sertifikası	105
ÖZGEÇMİŞ	106

SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
Bç	Baz Çifti
Kb	Kilobaz
kDa	KiloDalton
M	Molar
mL	Mililitre
V	Volt

Kısaltmalar

Ag	Antijen
AH-BNHS	Aminoheksanoil-Biotin-N- Hidroksisüksinimid Ester
AT	Ototransporter
BCA	Bisinkoninik Asit
BSA	Bovin Serum Albumin
CTAB	Setil Trimetil Amonyum Bromit
DMSO	Dimetil Sulfoksit
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
ELISA	Enzim Bağlantılı İmmüno-Sorbent Teknik
FBS	Fetal Bovin Serum
GzmB	Granzim B
IgG	İmmünoglobulin
IL-6	İnterlökin-6
IP	İntraperitoneal

IPTG	İzopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolisakkarit
NTA	Nitrilotriasetik Asit
OD	Optik Yoğunluk
PAb	Poliklonal Antikor
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PAMP	Patojen İlişkili Moleküler Eleman
PBS	Fosfatlanmış Tuz Tamponu
pNPP	para-Nitrofenol Fosfat
PVDF	Poliviniliden difluorid
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R.E	Restriksiyon Endonükleaz
SCV	<i>Salmonella</i> içeren vakuol
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SPI	<i>Salmonella</i> Patojenite Adası
T3SS	Tip 3 Salgı Sistemi
TAE	Tris Asetat Edta
TCA	Trikloroasetikasit
TE	Tris Edta
TLR	Toll Benzeri Reseptör
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör-alfa
UV	Ultra Viyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	<i>Salmonella</i> patojenite adası-3'ün genetik organizasyonu	8
Şekil 2.2	Tip V sekresyon sistemi.....	10
Şekil 2.3	Ototransporter proteinin alt birimleri	13
Şekil 2.4	Translokasyon birimi	14
Şekil 2.5	Yolcu domainin dış membranda translokasyon mekanizmaları	15
Şekil 2.6	I-TASSER programı ile elde edilen MisL proteinin tahmini üç boyutlu yapısı	18
Şekil 3.1	pET28a vektörünün genetik haritası	23
Şekil 3.2	Takip edilen immünizasyon basamakları	43
Şekil 4.1	<i>MisL</i> geninin polimeraz zincir reaksiyonu agaroz jel görüntüsü	52
Şekil 4.2	<i>MisL</i> bölgesine ait örneklerin FinchTV kullanılarak elde edilen sekans dizi analizi	53
Şekil 4.3	BLAST analizi sonucu	54
Şekil 4.4	pet28a plazmid vektörü ve <i>MisL</i> geninin ikili restriksiyon endonükleaz enzim kesimi	56
Şekil 4.5	Rekombinant plazmid eldesi için ligasyon denemesi agaroz jel görüntüsü.....	57
Şekil 4.6	<i>Escherichia coli</i> Dh5a suşuna pNT01 plazmidinin transformasyonu sonucu oluşan transformantların antibiyotik içeren LB agar ortamlarında gelişimi	58
Şekil 4.7	Seçilen Dh5a kolonilerinin plazmid içeriği	59
Şekil 4.8	Seçilen Dh5a kolonilerinin plazmid DNA'sından PZR ile çoğaltılan <i>MisL</i> geni.....	60

Şekil 4.9	<i>Escherichia coli</i> BL21 suşuna pNT01 plazmidinin transformasyonu sonucu oluşan transformantların antibiyotik içeren LB agar ortamlarında gelişimi	61
Şekil 4.10	Seçilen BL21 kolonilerinin plazmid içeriği	62
Şekil 4.11	Seçilen BL21 kolonilerinin plazmid DNA'sından PZR ile çoğaltılan <i>MisL</i> geni	63
Şekil 4.12	Kullanılan protein standardının % 10-20'lik SDS-PAGE jel göç planı	64
Şekil 4.13	İndüklenen ve indüklenmeyen suşların protein profillerinin SDS-PAGE jel görüntüsü	64
Şekil 4.14	Purifikasyon esnasında aşamalı olarak elde edilen örneklerin SDS-PAGE görüntüsü	66
Şekil 4.15	Saf protein eldesinin western blot görüntüsü	68
Şekil 4.16	Balb/c'den elde edilen poliklonal antikor kontrolünün ve ticari antikorla (anti-his) karşılaştırılmasının western blot görüntüleri.....	70
Şekil 4.17	Blokajsız ve blokajlı olarak LT2 suşu ile teşvik edilen IL-6 ve TNF- α sitokin miktarı	72
Şekil 4.18	Blokajsız ve blokajlı olarak BL21 suşu ile teşvik edilen IL-6 ve TNF- α sitokin miktarı	72
Şekil 4.19	Blokajsız ve blokajlı olarak D suşu ile teşvik edilen IL-6 ve TNF- α sitokin miktarı	73
Şekil 4.20	Blokajsız ve blokajlı olarak D(İ) suşu ile teşvik edilen IL-6 ve TNF- α sitokin miktarı	73
Şekil 4.21	Blokajsız ve blokajlı olarak 14028 suşu ile teşvik edilen IL-6 ve TNF- α sitokin miktarı.....	74
Şekil 4.22	Blokajsız ve blokajlı olarak 1627 suşu ile teşvik edilen IL-6 ve TNF- α sitokin miktarı	74
Şekil 4.23	Blokajsız ve blokajlı olarak 1627(İ) suşu ile teşvik edilen IL-6 ve TNF- α sitokin miktarı	75
Şekil 4.24	Blokajsız ve blokajlı olarak 1629 suşu ile teşvik edilen IL-6 ve TNF- α sitokin miktarı	75

Şekil 4.25	Değişik ajanlarla teşvik edilen IL-6 ve TNF- α sitokin üretim miktarları	76
Şekil 4.26	Akım sitometrisinde işaretli antikorun LT2 suşuna bağlanma sonucu	79
Şekil 4.27	Akım sitometrisinde işaretli antikorun 14028 suşuna bağlanma sonucu	80
Şekil 4.28	Akım sitometrisinde işaretli antikorun D suşuna bağlanma sonucu ...	81
Şekil 4.29	Akım sitometrisinde işaretli antikorun D(i) suşuna bağlanma sonucu	82
Şekil 4.30	Kültürlerden TCA kullanılarak elde edilen MisL proteininin western blot görüntüsü	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan primerler	25
Çizelge 4.1 Saflaştırma sonrası elde edilen örneklerin protein konsantrasyonları	69

1. GİRİŞ

Salmonella cinsinin sebep olduğu hastalığın primatlarda ve insanlarda genel seyri, 10^5 ya da daha fazla mikroorganizmanın alımı ile başlamaktadır. Bu mikroorganizma grubu ilk olarak ince barsağın bir bölümünü teşkil eden ve ileokokal valfe yakın bölgede yer alan ileumda tutunmakta ve vücuda mukozal hücreler aracılığı ile dahil olmaktadır. Daha sonra M hücrelerine girerek enfeksiyonu başlatmaktadırlar (Whitt 2002). Bakterinin konakçı hücreler ile temasını sağlayan tutunma faktörlerinden bir tanesi de MisL ototransporter proteinidir. MisL ototransporter proteininin *Salmonella enterica* serovar Typhimurium'a (*S. Typhimurium*) fibronektine (FN) bağlanma aktivitesini kazandırarak, kolonik karsinoma kökenli insan epitel hücrelerinde invaziviteyi artırmada rol aldığı tanımlanmıştır (Dorsey vd. 2005, Raffatellu vd. 2008, Akçelik ve Akçelik 2011).

MisL ototransporter proteininin regülasyonu üzerinde yürütülen bir diğer çalışmada ise, bu proteinin in vitro koşullarda üretilmediği, ancak patojenin konakçı sisteme dahil olması koşulunda pozitif bir regülatör protein olan MarT proteini tarafından üretiminin teşvik edildiği saptanmıştır (Dorsey vd. 2005, Tükel vd. 2007, Akçelik ve Akçelik 2011). *S. Typhimurium* tarafından üretilen MisL ototransporter proteininin, söz konusu patojenin konakçı hücrelere tutunmada ve translokasyonda rol aldığı sınırlı sayıda çalışma ile gösterilmiştir. Bu sınırlı literatür verileri MisL ototransporter proteininin *S. Typhimurium*'un patojenitesinde kritik bir işleve sahip olduğuna ve *S. Typhimurium*'a karşı konakçı sistemlerin oluşturduğu immün yanıtta oynadığı role işaret etmektedir. Bu tez çalışması ile söz konusu rolün biyolojik esası makrofaj model sistemlerinde örneklenecektir. Böylece sınırlı literatür verilerinin işaret ettiği bu durumun gerçekte var olup olmadığının tespit edilmesi amaçlanmaktadır. Bu sayede bu yüzey proteininin *S. Typhimurium*'un patojenitesinde oynadığı rolün kesin bir şekilde tanımlanması mümkün olacaktır.

Çalışmadan elde edilecek veriler, halen tüm dünyada en yaygın gıda kökenli enfeksiyon kaynağı olma özelliğini koruyan *Salmonella*'nın patojenitesinin detaylı bir şekilde

anlaşılmasına katkıda bulunacak ve söz konusu enfeksiyonların engellenmesi için etkin yöntemlerin geliştirilmesine ışık tutacaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 *Salmonella* Cinsinin Genel Özellikleri

Salmonella cinsi insan ve hayvan gastrointestinal bölgesinde lokalize olan, *Enterobacteriaceae* familyası üyelerinden biridir. Amerikan veteriner Dr. Daniel Elmer Salmon'un koleralı domuz bağırsağından elde ettiği izolata, kendi ismini vererek *Salmonella* cinsini tanımlamıştır (Salmon ve Smith 1885). *Salmonella* cinsinin adlandırılması; lipopolisakkarit (O), flagella (H) ve kapsüler polisakkarit (Vi antijeni) gibi belirli yüzey antijenlerine göre gruplandırılan Kauffmann-White şeması ile yapılmıştır. Bu şema ilk olarak 1929 yılında White tarafından yayınlandığında 20 serovar içermekteydi (Humphrey 2000). Şemanın Kaufmann ve Le Minor tarafından geliştirilmesiyle birlikte, 1985 yılından günümüze kadar *Salmonella* serovar sayısı 2610'a yükselmiştir (Guibourdenche vd. 2010).

Salmonella cinsinin taksonomisinin ve adlandırılmasının karmaşıklığı, yıllar boyunca bu sınıflandırmanın değişmesine yol açmıştır. Günümüzde *Salmonella* cinsine ait; *S. enterica*, *S. bongori* (V) ve *S. subterranea* (Shelobolina vd. 2004) olmak üzere 3 tür ve *Salmonella enterica* türüne ait *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) ve *indica* (VI) olmak üzere 6 alt tür tanımlanmaktadır (Le Minor vd. 1987, Reeves vd. 1989). Serovaryetelerin sadece % 1'i soğuk kanlı hayvanları enfekte edebilen *S. bongori* türüne aittir. Bazı serovaryeteler konak seçicilik özelliği gösterirken, bazıları göstermemektedir (Langridge vd. 2015).

Salmonella Gram negatif, fakültatif anaerob, spor ve kapsül oluşturmeyen, basil morfolojiye sahip, *S. Gallinarum* ve *S. Pullorum* dışında hareketli türleri içeren bir cinsdir (Shahane vd. 2007). Bütün enterobakterler gibi, *Salmonella* spp. glikozu fermente edebilen, nitratı nitrite dönüştürebilen, katalaz pozitif ve oksidaz negatif olan bakteri grubudur (Farmer III vd. 2007). Bu bakteri grubunun çoğu, karbon kaynağı olarak sitratı kullanabilmektedir ve inorganik sülfür, dekarboksilat ornitin ve lizinden hidrojen sülfid üretmektedir (Grimont vd. 2000).

Çoğu *Salmonella* serovaryetesi 5-47 °C arasında üreyebilirken, optimum üreme sıcaklıkları 35-37 °C'dir. Fakat bazıları en düşük olarak 2-4 °C'de, en yüksek olarak ise 54 °C'de üreme gösterebilmektedir (Stabel vd. 2002). *Salmonella* sıcaklığa karşı duyarlıdır ve 70 °C'nin üzerinde ölmektedir. Üreme pH aralığı 4-9 arasında olup, optimum pH aralığı ise 6.5-7.5 arasındadır. Yüksek su aktivitesi (0.94-0.99) gereksinimleri olmasına rağmen kuru gıdalarda da yaşamlarını sürdürebilmektedirler (Pui vd. 2011).

Dünyada en sık görülen gıda kaynaklı enfeksiyonlarından biri, bu patojen grubun sebep olduğu salmonellozistir. *Salmonella* serovaryetelerinin temel bulaşı kaynakları arasında; kümes hayvanları eti, kıyma, sosis, yumurta ürünleri, dondurma, süt tozu ve krema yer almaktadır (Kim ve Surette 2003, Voetsch vd. 2004, Suar vd. 2006). Epidemik veya endemik olarak seyreden enfeksiyon özellikle çocuklarda, yaşlılarda ve immünsupresif bireylerde ölümlere kadar varabilen ciddi sorunlara yol açabilmektedir (Graham 2002). *S. Typhi* ve *S. Typhimurium* dünya çapında insanlarda çok geniş morbidite ve mortalite oranından sorumlu iki patojendir (Crump vd. 2004, Majowicz vd. 2010). *Typhi* ve *Paratyphi* serovaryetelerinin sebep olduğu tifoid ve paratifoid ateş vakalarının sayısı yılda 21 milyon civarında olup, ölüm oranı ise % 1 ile % 4 arasındadır (www.who.int, 2008, Jaglic vd. 2014). Tifoidal olmayan serovaryetelerin sebep olduğu gastroenterit vaka sayısı her yıl 90 milyonun üzerinde olup, bu vakalardan 150 binden fazlası ölümle sonuçlanmaktadır (Majowicz vd. 2010, Jaglic vd. 2014).

2.2 *Salmonella* Enfeksiyonu

Salmonella içeren kontamine su ve gıdaların tüketimi enfeksiyona neden olmaktadır. Enfeksiyon gastroenterit, tifo ateşi, septisemi, bakteremi gibi sorunlara yol açmakta ve bazen ölümle sonuçlanabilmektedir (Dougan vd. 2011).

Salmonella, ağızla alım sonrası konaktaki ilk bariyeri olan mide asiditesinde yaşamsal faaliyetlerini sürdürebildiğinden direkt olarak ince bağırsağa geçmektedir (Kaur ve Jain 2012). İnvazyonun gerçekleşebilmesi için bakterinin ilk olarak, ince bağırsak mukozal tabakasına tutunması gerekmektedir. Ardından bakteri mikrofild hücreleri (M hücreleri)

gibi Peyer plaklarının (ince bağırsağın sonunda yer alan kümelenmiş lenfoid nodülleri) üzerini örten özelleşmiş epitel hücrelerini ve enterositleri istila etmeye çalışmaktadır (Monack vd. 2004). M hücrelerinde kısmen fagosite ve nötralize edilen infektif bakteri, antijen sunan hücreler tarafından Peyer plaklarına ulaştırılmaktadır. Peyer plaklarında bulunan dendritik hücreler ise bakteriyel antijeni, T ve B lenfositlerin simülasyonunu sağlayan mezenterik lenf nodülünde bulunan immün hücrelere sunmaktadır. Bu lenfosit hücreleri, lenfotik nodüllerden retikuloendotelyal sistem ile karaciğer ve dalağa ulaşmaktadır (Kaur ve Jain 2012). Bu organlarda makrofaj sistemiyle bakteri fagosite edilmektedir. Fakat, *Salmonella* fagositik hücreler içinde yaşamını sürdürebilmekte ve çoğalabilmektedir (House vd. 2001).

Makrofaj hücre habitatının oluşturulmasında *Salmonella* patojenite adası-1 (SPI-1) ve *Salmonella* patojenite adası-2 (SPI-2) tarafından kodlanan, Tip 3 salgı sistemi 1 (T3SS-1) ve Tip 3 salgı sistemi 2 (T3SS-2) sistemleri ile birlikte, fimbria ve bakteriyel yüzeydeki diğer adezinler virülans faktör olarak rol oynamaktadır (Santos vd. 2009). Makrofaj hücre içine alım ardından *Salmonella*, SCV (*Salmonella* içeren vakuol) olarak bilinen, LAMP1 gibi lizozomal membran glikoproteinleri ihtiva eden özelleştirilmiş fagozom içinde kalmakta ve SipA, SipC, SopB/SigD, SodC-1, SopE2, SptP gibi efektör proteinleri sitoplazma içine sokmaktadır (McGhie vd. 2009). Bu efektörler, aktin sitoskelet yapısının bozulmasını sağlayarak konak hücre membran morfolojisinin deformasyonuna, sitotoksik tepkimelere ve apoptoza neden olmaktadır (Lara-Tejero ve Gallán 2009, de Jong vd. 2012). Böylelikle virülan *Salmonella*, konağın bağışıklık sistem yanıtından kaçmayı başararak kan dolaşımına geçmektedir ve sistemik olarak yayılmaya neden olmaktadır (Salcedo vd. 2001, Figueira ve Holden 2012). Gastroenterit, tifo ve sepsisemiye neden olan *Salmonella* spp. büyük ölçüde virülans faktörlere ihtiyaç duymaktadır.

2.3 *Salmonella* Patojenite Adaları

Salmonella genomunda hücre içi invazyon ve patojeniteyi sağlayan virülans faktörlerini kodlayan büyük gen kümeleri *Salmonella* Patojenite adaları (SPI) olarak tanımlanmaktadır (Mills vd. 1995). SPI gen bölgeleri, diğer mikroorganizmalardan

yatay gen transferi ile kazanılmaktadır (Groisman vd. 1999). Bugüne kadar *Salmonella*'ya özgü 21 tane patojenite adası keşfedilmiştir (Blondel vd. 2009). Patojenite adalarının bazıları korunmuşken, bazıları serovaryetelere göre değişkenlik göstermektedir. Bu adalardan Typhimurum'a özgü tek bir ada (SPI-14), Typhi'ye özgü 4 ada (SPI-7,15,17,18) bulunurken, 11 patojenite adası (SPI 1-6,9,11,12,13,16) hem *S. Typhimurium* hem de *S. Typhi* genomunda ortak olarak bulunmaktadır (Shah vd. 2005). 5 tane patojenite adası (SPI 1-5) *S. Typhimurium* virülanslığı ile ilişkili olarak tanımlanmıştır (Fàbrega ve Vila 2013).

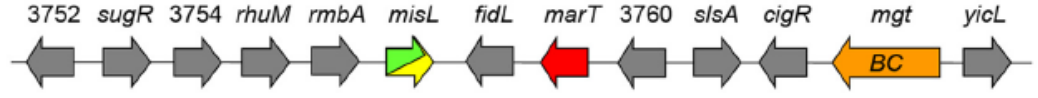
SPI-1; sentizom 63'de lokalize olan, tip 3 sekresyon sistemini (T3SS-1) (Mills vd. 1995) ve metal transport sistemini kodlayan 40 kb'lık bölgedir (Janakiraman ve Slauch 2000). T3SS, fagositik olmayan hücrelerin invazyonu ve pro-inflamatuar cevap oluşumuyla ilişkilidir (Gal'an ve Collmer 1999). Bu sekresyon sistemi, bakteri tarafından efektör adı verilen proteinleri direkt olarak konak hücre içine sokmak için kullanılmaktadır (Sabbagh vd. 2010). *S. Typhimurium* SPI-1 T3SS efektörleri, proinflamatuar sitokinlerin üretimini, polimorfonükleer lökositlerin (PMN) uyarılmasını ve akut intestinal inflamasyonunu sağlayan mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) yollarının aktivasyonunu sağlamaktadır (Bruno vd. 2009). SPI-1 bağımlı bu immün yanıt oluşumu, makrofaj hücre ölümünü gerçekleştirmektedir (van der Velden vd. 2000, Wallis ve Galyov 2000). Efektörler SPI-1'in içerisinde veya dışarısında lokalize olan genler tarafından kodlanabilmektedir (Parkhill vd. 2001). Serovaryeteler arasında görülen patojenite adası genomik lokalizasyon farkı, fonksiyonel farklılığa sebep olmaktadır (Eswarappa vd. 2008).

Sentizom 30'da lokalize olan SPI-2; *valV* tRNA geninin yanında bulunan 40 kb büyüklüğünde bir lokusdur. Konak hücre içi yaşamsal faaliyetleri sürdürmeyi sağlayan T3SS-2 sistemini kodlamaktadır (Shea vd. 1996). *S. enterica*'ya ait tüm alt türlerde SPI-2 T3SS bulunmuştur ve bu yapının sistemik yayılmaya katkıda bulunan önemli virülans faktörleri içerdiği belirlenmiştir (Ochman ve Groisman 1996). Efektör proteinlerin epitel ve makrofaj gibi konak hücrelerini enfekte eden SCV membranı içerisinde transloke olduğu bilinmektedir (Figueira ve Holden 2012). Efektörlerin konak hücre sitozolüne geçişi, bakteriyel mambranda yer alan sekresyon sisteminin translokon poru

oluşturması ile gerçekleşmektedir (Chakravorty vd. 2005). Sekresyon sistemi genlerinin aktivasyonu, OmpR–EnvZ ve SPI-2 tarafından kodlanan SsrA-B iki bileşenli regülatör sistemleri tarafından sağlanmaktadır (Feng vd. 2004). Yaklaşık olarak 30 farklı efektör protein keşfedilmesine karşın; birbirleriyle etkileşimleri ve bazılarının fonksiyonel özellikleri henüz tam olarak açıklanamamıştır (Mills vd. 2008). Fonksiyonları bilinen efektörlerden SseF proteini, mikrotübül paketlenmesini ve Sif (*Salmonella* filamentleri) oluşumunu; SifA, PipB2, SopD2, SseJ proteinleri, bakteriyel vakuol membran dinamiğini; SpvC, SseL, SspH1 proteinleri, konak hücre MAP kinazlarının defosforilasyonu ve sitokin üretiminin engellenmesini; SteC, SspH2, SrfH/SseI, SpvB proteinleri ise, konak aktin polimerizasyonunun inhibisyonunu ve makrofaj sitotoksitesini sağlamaktadır (Figueira ve Holden 2012). Bu patojenite adası için serovaryeteler arası genomikler karşılaştırıldığında; SPI-1'in aksine büyük lokalizasyon farklılıkları görülmemesine karşın, sseF, sifA gibi efektörler ve sseC, sseD gibi translokon genler bakımından belirgin moleküler farklılıklar söz konusudur (Eswarappa vd. 2008).

SPI-3; selC tRNA geninin yanında yer alan, sentizom 82'de lokalize olan 17 kb'lık, 10 geni barındıran bir lokusdur (Şekil 2.1). Hücre içinde yaşamsal faaliyetleri sürdürmeyi sağlayan bu patojenite adası, fagozom içinde besin yetersizliği adaptasyonu için gerekli olan magnezyum taşıyıcı sistemi (MgtCB) kodlamaktadır (Blanc-Potard ve Groisman 1997). *mgtC* geni, *mgtB* geni ile birlikte transkribe edilmekte (Snavely vd. 1991) ve PhoP-PhoQ regülatör sistemi tarafından kontrol edilmektedir (Garcı'a Ve'scovi vd. 1996). *mgtC*; makrofaj içinde yaşamda kalmayı, farede virülanslığı ve düşük magnezyum içeren besi ortamında gelişebilmek için gereksinim duyulan *Salmonella*'ya özgü genidir (Blanc-Potard ve Groisman 1997). MgtCB dışında virülans determinantlar olarak, MisL (AIDA-I otoransporter benzeri) ve MarT (ToxR benzeri) söz konusudur. SPI-3 genom varyasyonları serovaryeteler arası insersiyon ve delesyonlar nedeniyle büyük oranda değişkenlik göstermektedir (Blanc-Potard vd. 1999). Örneğin, *S. Typhimurium*'da bağırsak kolonizasyonunu sağlayan *MisL* geni (Dorsey vd. 2005) ve bu genin regülatörü *marT* (Tükel vd. 2007) *S. Typi*'de inaktif durumdadır (Sabbagh vd. 2010).

SPI-3



Şekil 2.1 *Salmonella* patojenite adası-3'ün genetik organizasyonu (Fàbrega ve Vila 2013)

tRNA benzeri bir genin yanında sentizom 92'de lokalize olan, 24 kb uzunluğunda SPI-4 fragmenti, epitel hücrelere adezyonunun gerçekleşmesi fonksiyonunu kodlamaktadır (Wong vd. 1998). Bu patojenite adası, tip 1 sekresyon sistemini kodlayan (T1SS) siiABCDEF gen kümesini barındırmaktadır. Bu sekresyon sistemi, 595 kDa moleküler ağırlığında olan SiiE fimbrial olmayan adezini ile karakterize edilmektedir (Morgan vd. 2007). SiiE adezini, epitel hücrelerin apikal bölgesinde bulunan mikrovillusların yapısını deforme eden SPI-1 efektörlerinin translokasyonuna yardım etmektedir (Gerlach vd. 2008).

SPI-5; *serT* tRNA'nın yanında bulunan, 8 kb'dan küçük, sentizom 25'de lokalize bir adadır ve enteropatojenite için gereklidir (Wood vd. 1998). Hem SPI-1 hem de SPI-2 efektörlerini kodlayan bu adanın, serovaryeteler arası lokalizasyon farkı bulunmamaktadır (Sabbagh vd. 2010). Diyareye yol açan *SopB* inositol fosfataz efektörü, SPI-1 kodlu T3SS ile transloke olmaktadır ve *SopB*'nin ifadesi SPI-1'in ana transkripsiyonal regülatörü *HilA*'nın kontrolü altında gerçekleşmektedir. Buna karşın, *PipB* efektörü, SPI-2 kodlu T3SS ile transloke olmaktadır (Hensel 2004).

2.4 Gram Negatif Bakterilerde Sekresyon Sistemleri

Protein sekresyonu bakteriyel hücre fizyolojisi ve bakterinin çevre ile olan ilişkisi açısından anahtar rol oynamaktadır (Chagnot vd. 2013). Bakteriyel patojenitede temel basamak olan adezyonun ve enfeksiyonun ilk basamağı olan kolonizasyonun gerçekleştirebilmesi için sekresyon sistemine ihtiyaç duyulmaktadır (Desvaux vd. 2004). Gram pozitif bakterilerde proteinler ya hücre dışı ortama salınmakta ya da hücre

duvarıyla bağlantılı olarak kalmaktadır (Cossart ve Jonquieres 2000, Mazmanian vd. 2001). Gram negatif bakterilerde, Gram pozitif bakterilerden farklı olarak sekresyon proteinleri iç ve dış membran olmak üzere iki membranı da geçmelidir. Sitoplazmadan hücre dışı ortama bir dizi proteinin taşınması zorluğunu aşabilmek için, Gram negatif bakteriler özelleşmiş salınım yolları geliştirmiştir (Dautin ve Bernstein 2007). Bugüne kadar Gram negatif bakterilerde 6 sekresyon sistemi tanımlanmıştır (Das vd. 2011).

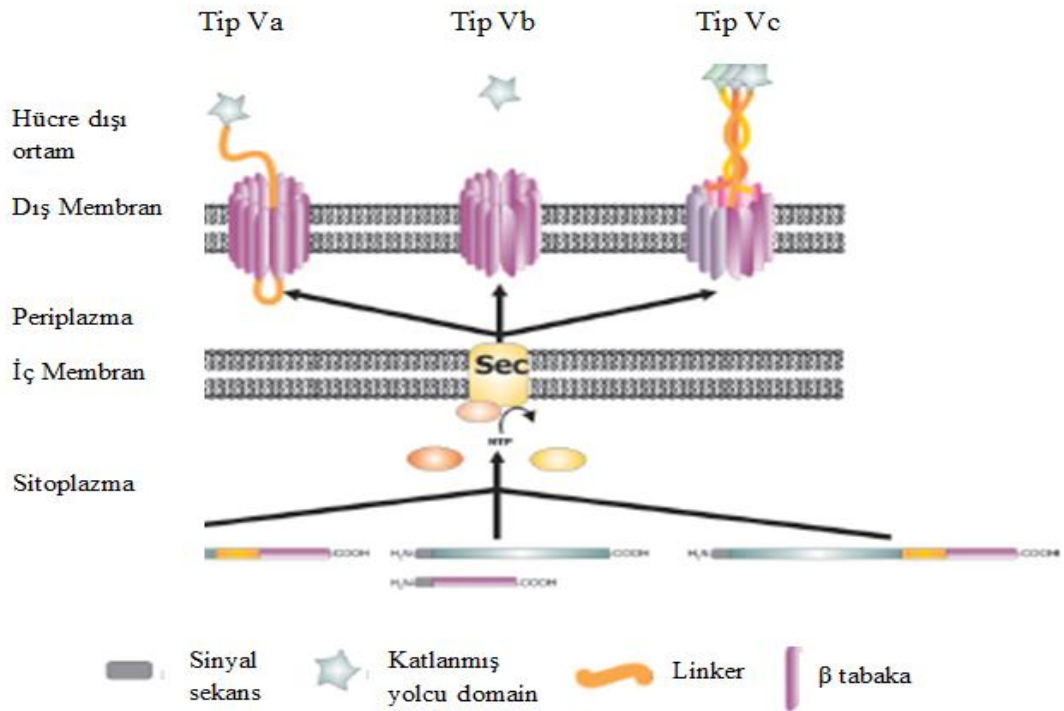
Tip I sekresyon sistemi (TOSS) ilk olarak *Esheria coli*'de alfa-hemolizin (HlyA) ile tanımlanmıştır. HlyA iç ve dış membran üzerinden bir oligomerik kompleks aracılığı ile salınmaktadır. Bu oligomerik TOSS kompleksi; iç membran ATP bağlayıcı kaset (ABC) proteini (HlyB), yardımcı faktör membran füzyon proteini (HlyD) ve dış membranda por oluşturan protein (TolC) olmak üzere üç protein içermektedir (Wandersman ve Delepelaire 1990, Fath ve Kolter 1993, Gentschev vd. 2002).

Tip II sekresyon sistemi *Klebsiella oxytoca*'da pullulanaz enziminde (PulA) örneklenmiştir. Bu sekresyon sistemi iki basamaklı süreçten oluşmaktadır. İlk olarak Tip II salınımlı proteinler secB sistemi aracılığı ile periplazmik boşluğa ve ardından sekreton olarak isimlendirilmiş 12-16 proteinden oluşan bir sekresyon sistemi ile dış membrana taşınmaktadır (d'Enfert vd. 1987, Pugsley 1993).

Tip III sekresyon sistemi (TTSS) ilk olarak patojenik *Yersinia* spp. Yop proteinleri üzerinde yürütülen çalışmalar sonucu belirlenmiştir. Daha sonra *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *E.coli* gibi patojenlerde de karakterize edilmiş bu sistem, iç ve dış membrana uzanan kompleks ile protein taşıma sistemidir (Michiels vd. 1990, Büttner ve Bonas 2002). TOSS sekresyon yoluna benzer olarak sec sistemine bağlı değildir. Bu taşıma sisteminin en önemli özelliği makrofaj ve epitel gibi hedef ökaryotik hücrenin içerisine direkt olarak proteinin injeksiyonunu sağlayabilmesidir. Moleküler şırınga benzeri rol oynayan bu protein sistemi, yaklaşık olarak 20 farklı protein içermekte ve bu yapı injektizom olarak adlandırılmaktadır. Hücre dışı ortama proteinlerin salınması, flagella oluşumu ve Hpr pilus oluşumu gibi moleküler mekanizmaların bu sistemle ilişkisi birçok bakteride tanımlanmıştır (Desvaux vd. 2004).

Tip IV sekresyon sistemi (TFSS) Gram negatif protein sekresyon yollarından en az anlaşılanıdır. Bakteriyel DNA'nın konjugatif transferi bu sistem aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bu sistem konjugatif süreçte rol oynayan nükleoproteinlerin, pertusis toksini (PT) gibi çoklu alt birim toksinlerinin ve RecA gibi monomerik proteinlerin salınmasını sağlamaktadır (Ward vd. 1988). Son zamanlarda bu yolak *Agrobacterium tumefaciens* VirB'yi içeren Tip IVa ve *Shigella flexneri* Incl Collb-P9 plazmidin Tra homolog bölgelerini içeren tip IVb olmak üzere 2 alt sınıfa ayrılmıştır (Christie ve Vogel 2000).

Tip V sekresyon sistemi, Gram negatif bakterilerin dış membran poruna taşınabilen ve en basit sekresyon donanımına sahip en büyük protein ailesini oluşturmaktadır (Yen vd. 2002). Tip V sekresyon sistemi üç alt tipten oluşmaktadır; bunlar (i) Klasik ototransporter (AT-1) tip Va, (ii) İkili sekresyon sistemi (TPS) tip Vb, (iii) Ototransporter adezin (TAA) tip Vc sistemleridir (Leyton vd. 2012), (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Tip V sekresyon sistemi (Henderson vd. 2004)

Tip Va sekresyon yolağı, ilk olarak Pohlner tarafından *Neisseria gonorrhoeae*'da IgA1 proteazlarında tanımlanmıştır (Pohlner vd. 1986). Bu yolakda kendi sekresyonunu gerçekleştirebilen proteinlere ototransporter proteinler denilmektedir (Pizarro-Cerdá ve Cossart 2006). Protein N ve C terminal uçlarını içeren tek bir polipeptit olarak sentezlenmektedir. Bu sekresyon yolunda IgA1 proteazı hem N terminal hem de C terminal ucundan modifiye edilmektedir. N terminal 27 aminoasitlik sinyal peptit dizisi, Sec sistemi aracılığıyla proteinin taşınması sırasında kesilmektedir. Olgunlaşan proteinin dış membrandan salınması için, C terminal por oluşturmaktadır. IgA1 proteazı otokatalitik aktivite ile aminoterminal domainin sinyal peptit kesimi gerçekleştirdikten sonra, protein beta tabaka üzerinden hücre dışı ortama salınmaktadır (Pohlner vd. 1986, Yen vd. 2002).

Tip Vb ya da ikili sekresyon yolağında, ilk olarak karakterize edilen protein *Serratia marcescens* *ShlA/ShlB* hemolizin sistemidir (Desvaux vd. 2005). Tek bir polipeptit olarak üretilen Tip Va sekresyon yolağına zıt olarak, bu yolakta yolcu domain (ekzoprotein-TpsA) ve por oluşturan β domain (transporter protein-TpsB) iki ayrı protein olarak translasyona uğramaktadır (Jacob-Dubuisson vd. 2001). Tip Va yolağında olduğu gibi, yolcu domain (TpsA) Sec translokonu ile katlanmamış konformasyonda periplazmik boşluğa ulaşmaktadır (Desvaux vd. 2005). Periplazma içine taşınan yolcu domain, beta tabaka ile oluşturulan dış membran poru içine yerleşmektedir. Tip Va sekresyon sistemi ile karşılaştırıldığında, beta tabaka topolojisi farklı görünmektedir. TpsB proteininde 14 yerine, 19 amfipatik β zincir bulunmaktadır (Loveless ve Saier 1997, Guedin vd. 2000, Yen vd. 2002). Yolcu domain, β domain üzerinden translokasyona uğradığı için hücre yüzeyinde katlanmaktadır (Guedin vd. 1998). Tip Va yolağında olduğu gibi, Tip Vb yolağı da 100 kDa gibi çok büyük proteinlerin salınmasını gerçekleştirebilme özelliğine sahiptir. Bakterinin yüzeyinde iken, bazı yolcu domainler fizyolojik görevini etkinleştirmek için proteolitik kesime uğrayabilmektedir (Jacob-Dubuisson vd. 2001).

Tip Vc sekresyon yolağında, *Yersinia enterocolitica* *YadA* ve *Haemophilus influenzae* *Hia* proteinleri yüzey ilişkili oligomerik ototransporterlar olarak tanımlanmış proteinlerdir (St Geme ve Cutter 2000). *YadA*; N terminal sinyal peptit, baş, boyun, sap,

bağlayıcı ve sadece 4 zincir içeren C terminal bölgesi olmak üzere 6 farklı domainden oluşmaktadır (Hoiczky vd. 2000). Tip Va sekresyon yolağında olduğu gibi, translokasyon Sec aracılığıyla iç membran üzerinden olmaktadır (Desvaux vd. 2005). C terminal bölgesi sadece 4 zincir içerdiğinden, sekresyonda dış membranda fonksiyonel beta pilili tabaka oluşturabilmek için trimerik olmak zorundadır (Leyton vd. 2012). C terminal bölgesi, trimerizasyon sonrası 12 zincir içeren β tabaka poru oluşturmakta ve proteinler C bölgesiyle bakteriyel hücre yüzeyinde bağlı olarak kalmaktadır (Hoiczky vd. 2000).

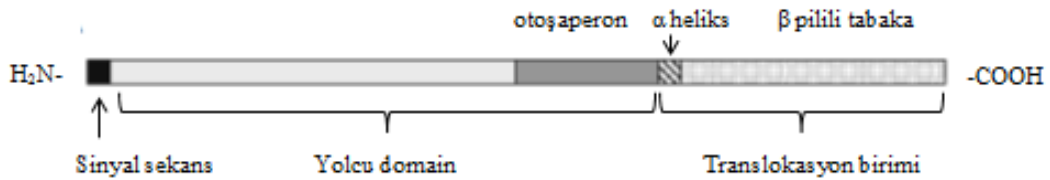
Tip VI sekresyon sistemi (T6SS) ile salınan tipik proteinler; *Vibrio cholerae* Hcp (hemolizin ko-regüle protein) ve VgrG (valin-glisin tekrarlı G) proteinleridir (Pukatzki vd. 2006). Bu kompleks moleküler sistem, çeşitli orijinlerden gelen 13 çekirdek alt ünite ve yardımcı alt ünitelerden oluşmaktadır (Shalom vd. 2007). Bu alt üniteler bakteriyofaj bileşenleri, tip IV sekresyon sistemine ait IcmF ve IcmH proteinleri, lipoprotein ve ClpV AAA⁺ Atpaz'dan oluşmaktadır (Cascales 2008). Hcp proteini bakteriyofaj kuyruğu, VgrG proteini ise bakteriyofaj kuyruk kılıfı ile önemli yapısal homoloji göstermektedir (Leiman vd. 2009, Pell vd. 2009). Bu homolojiden ötürü, sistem sekresyonu faj injeksiyon sistemi gibi gerçekleştirmektedir (Records 2011). Bu sistem Tip IV sekresyon sistemine benzer olarak, proteinleri hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelere direkt olarak salgılayabilmektedir (Alvarez-Martinez ve Christie 2009, Schwarz vd. 2010). Bu sistemin *Salmonella* (Folkesson vd. 2002), *Rhizobium* (Bladergroen vd. 2003), *Fraxisella* (Nano vd. 2004) ve *Edwardsiella* (Rao vd. 2004) türlerinde virülanslıkta rol oynadığı belirlenmiştir (Ho vd. 2014). Çoğu türde virülans faktör olmasının yanı sıra, Tip VI sekresyon sisteminin bakterilerin biyofilm yapılarında yaşamlarını sürdürebilmek gibi ekolojik uyum fonksiyonlarına da yardımcı olduğu belirlenmiştir (Miyata vd. 2013).

2.4.1 Ototransporter proteinlerin sekresyon mekanizması

Ototransporter (AT) proteinler, genellikle 100 kDa büyüklüğünde, Gram negatif bakterilerden salgılanan büyük virülans faktörlerdir (Jong vd. 2010a). Bugüne kadar 11 tane ototransporter alt kümesi tanımlanmıştır (Henderson vd. 2004). En iyi karakterize

edilen ototransporterler *Enterobacteriaceae* familyasına ait serin proteaz ototransporter (SPATEs) ailesidir (van Ulsen vd. 2014). Ototransporter ailesi proteinler; proteoliz, sitotoksisite, serum dirençliliği, invazyon, agregasyon, biyofilm oluşumu ve adezyon gibi fonksiyonlardan sorumludur (Henderson vd. 2004).

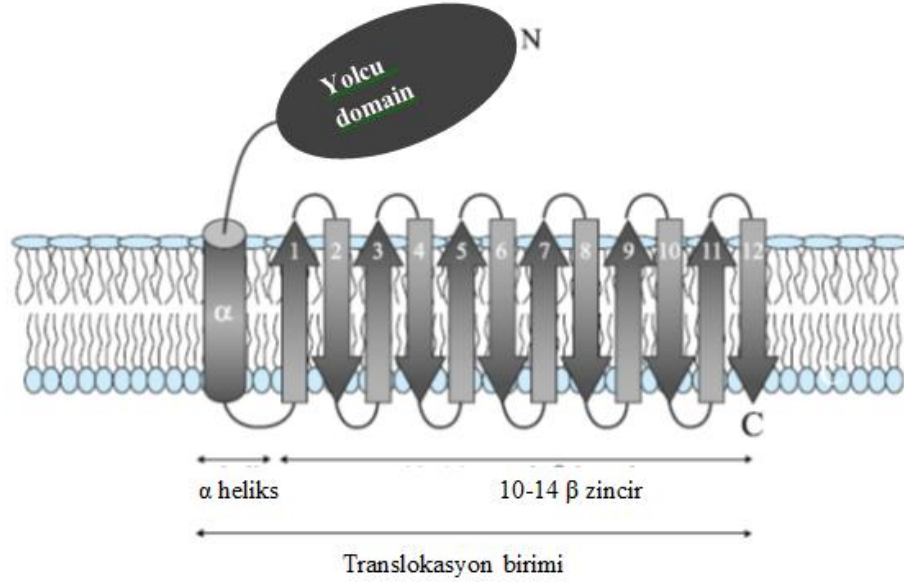
Bütün ototransporter proteinlerde; Sec translokonunu hedefleyen N terminal sinyal peptit (lider peptit), yüzey lokalize olgun protein (yolcu domain) ve dış membrana entegre olarak por oluşturan C terminal karboksi terminal uç (β -domain) olmak üzere 3 farklı domain tanımlanmıştır (Jose vd. 1995), (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Ototransporter proteininin alt birimleri (Girard ve Mourez 2006)

Sinyal sekansı genellikle 18-26 aminoasit uzunluğundadır. Pozitif yüklü aminoasit ihtiva eden N domain, hidrofobik amino asit içeren H domain ve nötr prolin-glisin aminoasitlerinden oluşan sinyal peptidaz tanıma dizisine sahip C domain olmak üzere 3 alt birimden oluşan bir organizasyona sahiptir (Leyton vd. 2012). Yolcu domainlerin büyüklüğü ve sekansı değişmektedir. Bu heterojenite ototransporterlere farklı efektör fonksiyonlar sunmasını sağlamakta ve böylece bakterilere spesifik patojenite özelliği kazandırmaktadır (Jacob-Dubuisson vd. 2004). Yolcu domain; ototransporter proteinin aktivitesine yardım eden N terminal domain ve C terminal bölgedeki otoşaperon domain olmak üzere iki alt birime sahiptir (Oliver vd. 2003b). Bu otoşaperon bölge translokasyon için zorunludur. Otoşaperonun etkinliği arttıkça beta pilili tabaka stabilize olmakta ve bu yolla yolcu domainin katlanması sağlanmaktadır (Ohnishi vd. 1994, Maurer vd. 1999, Oliver vd. 2003a, Mogensen vd. 2005). Yolcu domainin kovalent bağla bağlandığı translokasyon birimi; α-helikal konformasyonunu sağlayan 25 aminoasitlik linker bölge ve dış membrana yerleşmiş 250-300 aminoasit içeren β-pilili

bölge olmak üzere iki alt domain içermektedir (Oliver vd. 2003a). Anti-paralel β pilili tabaka, 10-14 arasında değişen β zincirlerinden oluşmaktadır (Jacob-Dubuisson vd. 2004). Bu domain proteinin sonunda bulunan C terminalde lokalize olan son ana domaindir (Oliver vd. 2003a), (Şekil 2.4).

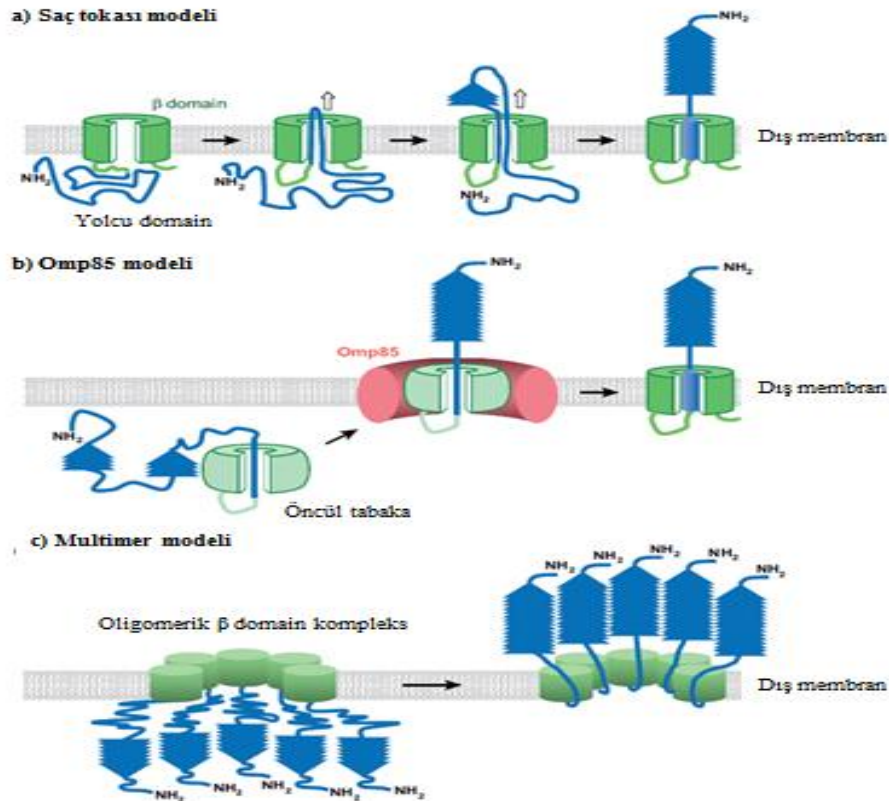


Şekil 2.4 Translokasyon birimi (Jacob-Dubuisson vd. 2004)

Ototransporter proteinlerde sekresyon sistemi, 4 adımlı bir süreçtir. Bu aşamalar; (i) proteinin iç membrana translokasyonu, (ii) periplazmaya taşınması, (iii) dış membrana translokasyon biriminin insersiyonu ve (iv) yolcu domainin işlenmesidir (Rutherford ve Mourez 2006).

Proteinler bakteriyel sitoplazmada pre-pro-protein olarak sentezlenmektedir. Proteinin sinyal peptit dizisi sinyal tanıma partikülü (SRP) ile tanınmakta ve Sec sistemi için hedef haline gelmektedir (Lee ve Bernstein 2001, Huber vd. 2005). Sec sistemi ile iç membrana taşınmanın ardından, membranda proteinin lider sekansı sinyal peptidaz tarafından kesilmekte ve pro-protein formunda olgun bir poliprotein olarak periplazmaya katlanmadan salınmaktadır (Klauser vd. 1992, Henderson vd. 1998).

Poliproteininin beta domain kısmı β pilili yapısı oluşturmak üzere, periplazmadan dış membrana yerleşmekte ve termodinamik olarak katlanma gerçekleşerek β tabaka poru oluşturmaktadır. Bu katlanma, bugüne kadar araştırılan Gram negatif bakterilerin tümünde yer alan, BamA proteinini ve BamB-E lipoproteinlerini içeren Bam kompleksi tarafından gerçekleştirilmektedir (van Ulsen vd. 2014). Bu esnada yolcu domainin geçici olarak periplazma içine uzayarak ayrıldığı öngörülmektedir. Por oluşumu sonrasında ise, yolcu domainin por üzerinden hücre yüzeyine translokasyonu gerçekleşmektedir (Henderson vd. 1998). Periplazmada ATP bulunmaması ve dış membranda elektrokimyasal gradient meydana gelmemesi nedeniyle translokasyon sürecinde enerjiye ihtiyaç duyulmadığı ön görülmektedir. Porlar küçük moleküllerin difüzyonuna izin vermektedir (Pohlner vd. 1986, Yen vd. 2002). Yolcu domainin dış membrana translokasyon mekanizmaları; saç tokası, Omp85 ve multimer olmak üzere 3 modelden oluşmaktadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Yolcu domainin dış membranda translokasyon mekanizmaları (Dautin ve Bernstein 2007).

a) Saç tokası yapısı mekanizmasında; ilk olarak yolcu domainin C terminal ucu β tabaka ile oluşan por içine uzayan bir saç tokası yapısını oluşturur. Sonrasında yolcu domain C ucundan katlanma konformasyonuna başlamaktadır. Yolcu domainin en az 20-30 aminoasiti sabit kalmakta ve saç tokası yapısı por üzerinden proteinin en uç N terminali salınana kadar sürmektedir.

b) Omp85 modelinde; yolcu domainin küçük bir segmenti öncül tabaka içine yerleşmekte ve periplazmada en azından kısmi olarak katlanmaktadır. Hem yolcu domainin dış membrana taşınması hem de dış membran içine β domainin entegrasyonu Omp85 ile katalize edilmektedir.

c) Multimer modelinde; yolcu domain periplazmada kısmi olarak katlanmakta ve ardından β domainin oligomerizasyonu ile oluşturulan büyük bir silindirik kanal olan oligomerik β domain kompleks üzerinden dış membrana taşınmaktadır (Dautin ve Bernstein 2007).

Translokasyon sonrası hücre yüzeyinde birkaç olasılığın gerçekleşmesi mümkündür;

(i) protein bir bütün büyük poliprotein olarak kalabilmektedir (St Geme ve Cutter 2000),

(ii) protein ya otoproteolitik aktivite kazanarak kendi kendine ya da bir dış membran proteazı tarafından kesilmektedir. Fakat bu durumda yolcu domain β domainle kovalent olmayan bağlar aracılığı ile hücre yüzeyiyle temas halinde kalmaktadır (Suhr vd. 1996, Charbonneau vd. 2009),

(iii) yolcu domain ya kendi otoproteolitik aktivitesi (Serruto vd. 2003) ya da bir dış membran proteazı (Shere vd. 1997) ile kesilmektedir ve hücre dışı ortama salınmaktadır.

2.4.2 AIDA ototransporter ailesi

Mikrobiyal virülans faktör olan adezin proteinleri; konak immün savunma sistemine dirençli ve konak için toksin olabilmesinin yanı sıra, uygun doku yüzeyini hedefleyerek kolonizasyonu gerçekleştirebilmektedir (Klemm ve Schembri 2000). AIDA ototransporter ailesi, en geniş ototransporter ailesi olup, iyi karakterize edilmiş *S. flexneri* IcsA, *E. coli* dış membran proteini antijen 43 ve *E. coli* adezini AIDA-I gibi

proteinlerle birlikte 55'den daha fazla protein ihtiva etmektedir (Henderson vd. 2004). AIDA-I adezin ototransporter proteini ilk kez enteropatojenik *Escherichia coli* (EPEC) 2787 suşunda virülans faktör olarak tanımlanmıştır (Benz ve Schmidt 1992, Jose vd. 1995). Tek zincir polipeptit olarak sentezlenen AIDA-I adezin pre-proteini, 1286 aminoasitten oluşan 132 kDa moleküler ağırlığında bir proteindir. 49 aminoasit içeren sinyal peptidin işlenmesinin ardından meydana gelen pro-protein (N terminal fonksiyonel α domain ve C terminal β domain), periplazmada lokalize olmaktadır (Müller vd. 2005). Bundan sonra, C terminal beta domain dış membrana entegre olmakta ve β pilili tabaka poru oluşturmaktadır (Suhr vd. 1996). Por oluşumunu takiben, beta domain ile N terminal yolcu domain dış membran üzerinde yer değiştirmektedir. Translokasyon sonrasında ya da esnasında, otokatalitik işleme gerçekleşmekte ve AIDA-I adezini bakteriyel yüzey ile non kovalent olarak ilişkide kalmaktadır (Suhr vd. 1996, Konieczny vd. 2001). AIDA adezini heptoz vasıtası ile modifiye edildiği belirlenen ilk proteindir (Henderson vd. 1998). Glikolizasyon AIDA-I adezinin moleküler ağırlığını 79.5 kDa'dan 100 kDa'a ulaştırmaktadır (Konieczny vd. 2001).

Ototransporterların yapısı korunmasına rağmen; yolcu domainin kesilmesi, lipidasyon, glikozilasyon, oligomerizasyon gibi post-translasyonel işleme süreçleri ototransporter süper ailesinin fonksiyonel olarak farklılaşmasına katkı sağlamaktadır. Spesifik modifikasyonların tümünün fonksiyonel önemi henüz açıklanamamıştır. Buna karşın O-heptoz molekülleri içeren AIDA-I'in kararlılığını glikolizasyonun artırdığı bilinmektedir (Benz ve Schmidt 2001, Lindenthal ve Elsinghorst 2001). Bu moleküller memeli hücrelere bağlanmak için gereklidir ve glikolizasyon özellikle insan hücre hattına tutunabilme yeteneğini artırmaktadır (Dautin ve Bernstein 2007).

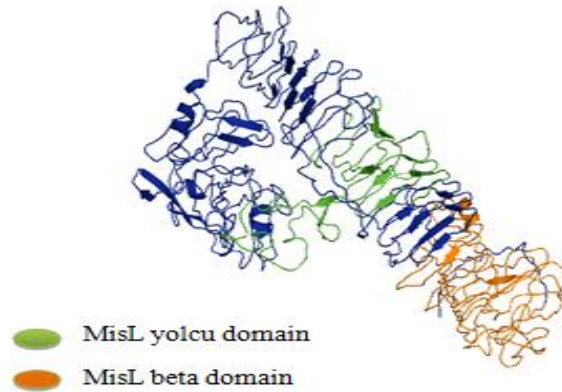
2.4.2.1 MisL ototransporter proteini

SPI-3 patojenite adasında yer alan *MisL* geni, 955 aminoasitlik bir polipeptiti kodlamaktadır. Tip V sekresyon sistemi ile salgılanan MisL proteininin C terminal domaini, HeLa (Henrietta Lacks insan servikal karsinoma) hücrelerine tutunmayı sağlayan *E. coli* AIDA-I (Benz ve Schmidt 1992) proteinin C ucu ile % 43 ve hücreler arasında yayılmayı sağlayan *S. flexneri* VirG (Goldberg vd. 1993) proteinin C ucu ile ise

% 38 gibi yüksek bir oranda homoloji gösterdiğinden ötürü, bu protein bir ototransporter protein olarak kabul edilmiştir (Blanc-Potard vd. 1999). Şekil 2.6'da MisL ototransporter proteininin I-TASSER programı kullanılarak elde edilen tahmini üç boyutlu yapısı yer almaktadır.

MarT geninin *MisL*'in pozitif regülatör elementi olduğu Tükel (2007) tarafından TPOP transpozon mutasyonu yöntemiyle saptanmıştır. SPI-3 bölgesinde yer alan 285 aminoasitlik proteini kodlayan *marT* geni, *Vibrio cholerae* ToxR proteinin N terminal bölgesi (kolera toksinin sentezinde gereksinim duyulan regülatör protein) ve *E. Coli* K-12 *CadC* transkripsiyonal aktivatörü ile % 41 oranında sekans benzerliği göstermektedir (Blanc-Potard vd. 1999, Welch vd. 2002).

MisL ototransporter proteini Dorsey (2005) tarafından bağırsak kolonizasyonu ile ilişkili hücre dışı matriks adezini olarak tanımlanmıştır. Akçelik ve Akçelik (2011) tarafından yapılan immün elektron mikroskopi çalışmaları sonuçları da bu doğrultudadır. Bu çalışma MisL proteininin, dış yüzeye salgılanarak kapsüller polisakkaritlerin üzerinde biriktiğine ve hücreye düzensiz dallanan bir dış yapı özelliği kazandırdığına işaret etmektedir (Akçelik ve Akçelik 2011). Ayrıca, hücre dışı matriksde bulunan MisL'in bitki dokusuna adezyonu Kroupitski (2013) tarafından tanımlanmıştır (Jaglic vd. 2014).



Şekil 2.6 I-TASSER programı ile elde edilen MisL proteinin tahmini üç boyutlu yapısı (Zhang 2008, Roy vd. 2010, Yang vd. 2015, Yang ve Zhang 2015)

S. Typhimurium ile enfekte olmuş tavuk ve farelerde bağırsak yüzeyinde bakteriyel kolonizasyonun gerçekleşmesi için *MisL* genin tam aktivitesini göstermesi gerektiği belirlenmiştir (Morgan vd. 2004, Dorsey vd. 2005). *S. Typhimurium* MisL protein yolcu domaini, hücre dışı matriks proteini kollajen tip IV'e ve fibronektine bağlanmakta, böylelikle insan epitel hücrelerine invazyonu artırmaktadır (Dorsey vd. 2005). Ayrıca *MisL* ekspresyonu makrofaj hücrelerinde invazyonu tetiklemektedir (Eriksson vd. 2003). Ancak *MisL* ve *MarT* genlerinin bazı *Salmonella* serovarlarının virülanslığına, nükleotit sekanslarının translasyonel stop kodonlarını kazandığından ve bu yolla yalancı gene dönüşmesinden ötürü, katkısı söz konusu değildir (Retamal vd. 2010). Parkhill (2001) tarafından *S. Typhi* CT18'in SPI-3 bölgesinde 3 tane yalancı gen tanımlanmıştır. *S. Typhi*'de bu genom sekansının inaktivasyonu ya da bozulması virülans ilişkili fonksiyonlarının ifade olmasını engellemektedir (Retamal vd. 2010).

Enfeksiyon oluşumunda *Salmonella* yüzey proteinlerinin rolü biyoteknoloji ve tıp için önemli ilgi alanıdır. Keşfedilen ototransporter proteinlerin sayısı artmasına rağmen, biyolojileri zayıf anlaşılmıştır ve hala çoğu fonksiyonları bilinmemektedir (Girard ve Mourez 2006). Fonksiyonel yolcu domainlerin iyi terapötik hedefler ve aşı adayları olduğu öngörülmektedir. *Salmonella* patojenitesinde tanımlanmış, fonksiyonu bilinen virülans efektörlerinden MisL ve SopB aşı gelişimi için iyi adaylar olabilir. Tek bir tip efektör protein aşısının konak savunmasına yeterli geleceğinin garantisi yoktur. *Salmonella* rekombinant aşı dizaynı için çoklu efektör proteinler kullanılmalıdır (Husseiny vd. 2007, Pulickal ve Pollard 2007, Cheminay ve Hensel 2008). Bu konuda detaylı çalışmalar yapılması gerekmektedir. Bu hem önemli tanı yöntemlerine yönelik pratik uygulamalarının hem de bakteriyel patojenitenin evriminin anlaşılmasını sağlayacaktır.

2.5 *Salmonella* Enfeksiyonuna Karşı Oluşturulan Konak İmmün Yanıtı

Salmonella'nın bağırsak epitelinde karşılaştığı ilk konak savunma bariyeri epitel yüzeyini kaplayan kalın bir mukus tabakasıdır. Bu tabaka, goblet hücresi olarak adlandırılan özelleşmiş epitel hücre tiplerinden salgılanan glikoprotein ailesine ait musinlerden oluşmaktadır. Musinlere ek olarak, gastrointestinal sistem hücreleri;

bakteri hücre duvarını bozan ve küçük amfipatik proteinler olan antimikrobiyal peptitleri de salgılamaktadır. Bağırsak epitel hücrelerinden antimikrobiyal peptit ve musinlerin salgılanması, mikrobiyal invazyona karşı oluşturulan doğal immün yanıtın önemli bir kısmını meydana getirmektedir (Broz vd. 2012).

Salmonella'da phoP-phoQ ikili regülatör sisteminin aktivasyonu, antimikrobiyal peptitlere karşı dirençliliği sağlamaktadır. Epitel bariyerden kaçmayı başaran *Salmonella*, M hücrelerine ya da enterositlere geçmektedir. Bağırsak lenfoid dokusunda yer alan (GALT) makrofaj ve dendritik gibi monosit kökenli fagositik hücreler, ikincil konak immün savunmasını oluşturmaktadır. Bu hücrelerin ana görevi, ya direkt olarak ya da pro-inflamatuar sitokinlerin salınmasıyla diğer immün hücreleri uyarmak ve istilacı mikroorganizmaları fagozitozla yok etmektir. Fagozitozu takiben, *Salmonella* SCV olarak adlandırılan hücre içi vakuolü oluşturmak için SPI-2 T3SS'ni aktive etmektedir (Haraga vd. 2008). İnvazyon ve hücre içi replikasyon için SPI-2 T3SS ve SPI-1 T3SS koordinasyonuna gerek vardır. *Salmonella* bu vakuol içinde, yeni konak hücreleri enfekte etmeden önce yüksek oranda replike olmaktadır. *Salmonella* kısmen hücre içi nişde saklı kalmasına rağmen, tamamen konak hücre sinyalinden kaçamamaktadır.

Bütün monosit hücreler, patojen ilişkili moleküler elemanları (PAMP) tanıyabilen, kalıp tanıma reseptörlerine (PRR) sahiptir. Toll benzeri reseptörler (TLR), hücre dışı membranında (TLR 1,2,4,5,6,10) ya da hücre içi vesiküllerde (TLR 3,7,8,9,11,13) lokalize olan *Salmonella*'nın varlığını ortaya çıkaran ilk PRR molekülleridir (Medzhitov 2001). TLR molekülleri; LPS (TLR 4), bakteriyel lipoprotein (TLR 1,2,6), flagellin (TLR5) gibi çeşitli hücre dışı PAMP moleküllerini tanımaktadır. Makrofaj ve lenfositler TLR molekülleri dışında PAMP moleküllerini sitozolde tanıyabilen NOD benzeri reseptörlere (NLR) sahiptir (Broz ve Monack 2011). TLR ve NLR moleküllerinin aktivasyonu ile konak doğal bağışıklık sisteminde önemli role sahip sitokin, kemokin gibi immün regülatörlerinin makrofajlardan üretimi ve salgılanması gerçekleşmektedir (Akira ve Takeda 2004, Franchi vd. 2009). *Salmonella*'ya karşı İnterferon (IFN)- γ , Tümör nekrozis faktör (TNF)- α , İnterlökin (IL)-1, IL-6, IL-12, IL-18

gibi sitokinlerin üretimi ile karakterize edilen güçlü bir inflamatuvar cevabı oluşturmaktadır (Khan vd. 2001, Young vd. 2002).

IFN- γ ya da TNF- α sitokinleri makrofajlarda bakterisidal mekanizmaların indüklenmesini gerçekleştirdiğinden *Salmonella* enfeksiyonunun ilk basamakları sırasında gereklidir (Gulig vd. 1997). Bu mekanizmalar reaktif oksijen ve azot ara bileşiklerinin üretimi ile birlikte lizozomlarda bulunan litik efektör moleküllere bakteriyi sunan fagozomların oluşumunu indüklemektedir (Richter-Dahlfors ve Finlay 1997). Bu doğal direnç, kromozom 1'de *Ity* lokusunda yer alan *Nramp1* geninin genetik kontrolü altındadır (Skamene vd. 1998). *Salmonella* özelleşmiş sekresyon sistemi sayesinde (tip III sekresyon sistemi) makrofajlar içinde yaşamını sürdürebilmekte ve makrofajlarda apoptoza neden olabilmektedir (Monack vd. 1996, Richter-Dahlfors ve Finlay 1997).

Doğal immün sistem, *S. Typhimurium* replikasyonunu sınırlamaktadır, fakat yine de dokulara yayılan *Salmonella* eradikasyonu ve etkili kontrol için kazanılmış direnç zorunludur (Mittrücker ve Kaufmann 2000). İlk enfeksiyon sürecinde gelişen kazanılmış direnç; antikor üreterek humoral bağışıklığı sağlayan B lenfosit hücrelerine ve sitokinlerle aktif hale gelerek hücresel bağışıklığı sağlayan T lenfosit hücrelerine gereksinim duymaktadır (Mastroeni vd. 2001). *Salmonella* enfeksiyonu spesifik sitokin üretimini sağlayan CD₄⁺ yardımcı T hücrelerinin ve CD₈⁺ sitotoksik T hücrelerinin oluşumunu indüklemektedir (Mastroeni vd. 1993). CD₄⁺ T hücreleri özellikle lenfoid dokularda inflamatuvar cevap oluşumunu tetiklemektedir (Broz vd. 2012) ve CD₈⁺ T hücreleri ile sinerjistik olarak virülan *Salmonella* türlerinin oluşturduğu enfeksiyonu kontrol etmektedir (Lo vd. 1999).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteriler ve plazmid

Tez çalışmasında kullanılan *Salmonella* Typhimurium ile *Escherichia coli* suşları ve vektör plazmid (Şekil 3.1) Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı ve Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı kültür koleksiyonundan sağlandı. Bakteriler % 40 gliserol içeren Luria-Bertani (LB) sıvı besi ortamında, plazmid ise uygun tampon (Tris-EDTA) içerisinde -80 °C’de saklandı.

LB (Luria-Bertani) Broth ve Agar

Tripton	10 g
Maya Özü	5 g
NaCl	10 g
Distile su	1000 mL

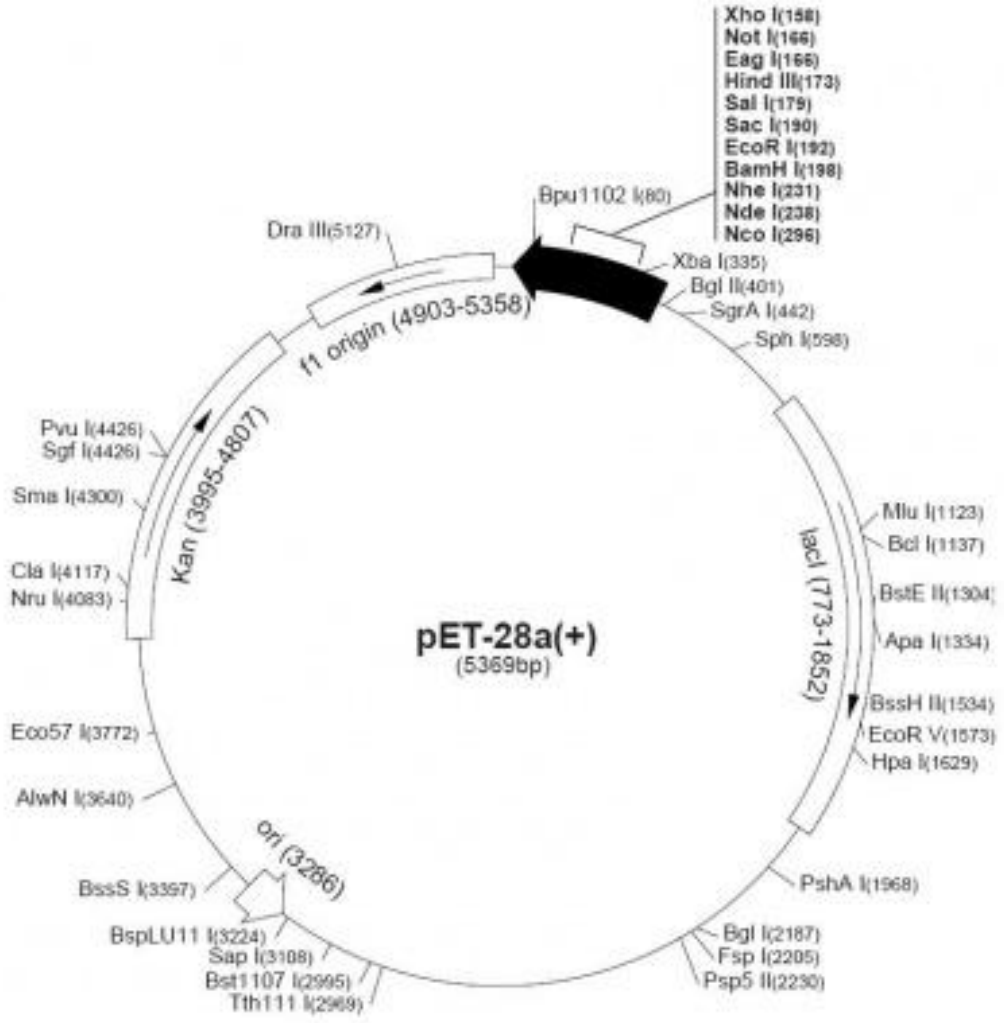
pH 7.0 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)

121 °C’de 15 dakika sıcaklık uygulaması ile sterilize edildi. Katı ortam için bu karışıma 15 g/L olacak şekilde agar ilave edildi.

Tris (Tris Hidroksimetil Amino Metan)/ EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) Çözeltisi

Tris	1,21 g
EDTA	0,37 g
Distile Su	1000 mL

2 N HCl kullanılarak pH 7.4’e ayarlandı ve 121 °C’de 15 dakika süre sıcaklık uygulaması ile sterilizasyon işlemi yapıldı.



Çoklu klon bölgesi: 158-203. bazlar arası

Kanamisin dirençlilik: 3995-4807. bazlar arası

LacI bölgesi: 773-1852. bazlar arası

Şekil 3.1 pET28a vektörünün genetik haritası

Bu vektör polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ürünlerinin doğrudan *E. coli*'ye klonlanmasında kullanıldı (Novagen, Madison, WI).

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakteri genomik DNA izolasyonu

LB broth ortamına aktif kültürlerden % 1 oranında inokülasyon yapılarak, 37 °C’de 200 rpm çalkalama hızında 18 saat geliştirildi. Bu süre bitiminde 1.5 mL kültür mikrosantrifüj tüpüne alındı ve 12000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilerek bakteri hücreleri çöktürüldü. Üst sıvı ortamdan alındıktan sonra, bakteri çökeltisi 567 µL Tris-EDTA (TE) tampon içerisinde çözüldü. Üzerine 30 µL % 10 sodyum dodesil sülfat (SDS) ve 20 mg/mL proteinaz K (Sigma Chem Co., USA) aktarılıp karıştırıldı. 37 °C’de 1 saat tutulan ortama, 100 µL 5 M NaCl ve 80 µL CTAB (Setil Trimetil Amonyum Bromit)/NaCl çözeltisi ilave edilip, kesik mikropipet uçları kullanılarak beyaz partikül yapısı oluşuncaya kadar iyice karıştırıldı ve tüpler 65 °C’de 10 dakika tutuldu. Bu ortam üzerine 750 µL kloroform/izoamil alkol (24/1 hacim/hacim) aktarıldı ve karıştırıldı. 12000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilen ortamdan, üst faz yeni mikrosantrifüj tüplerine alındı. Alınan sıvı faz üzerine 750 µL fenol/kloroform/izoamil alkol (25/24/1 hacim/hacim) ilave edildi ve 12000 rpm’de 5 dakika santrifüj işlemine tabi tutuldu. Santrifüj işlemi sonunda tüplerdeki üst sıvı yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve bu sıvının üzerine, hacminin 0.6’sı (~350 µL) oranında izopropanol ilave edildi. Ortam, beyaz çökelti oluşuncaya dek, öne arkaya hareket ettirilerek elle karıştırıldı. Çökelti oluştuğunda tüpler mikrosantrifüje yerleştirildi ve 12000 rpm’de 5 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Üst sıvı döküldükten sonra çökelti % 70’lik etanol ile yıkandı (350 µL) ve tekrar 12000 rpm’de 5 dakika santrifüj işlemine tabi tutuldu. Üst sıvı uzaklaştırılıp oda sıcaklığında kurutulan kromozomal DNA örneği, 100 µL TE tampon içerisinde çözüldü (Ausubel vd. 1994, Sambrook ve Russell 2001).

CTAB (Hekzadezil Trimetil Amonyum Bromit)/NaCl Çözeltisi

Önce 4,1 g NaCl 80 mL distile su içerisinde çözüldü ve üzerine 10 g CTAB yavaş yavaş eklenerek karıştırıldı. CTAB’in çözülmesi için çözelti aralıklarla 65 °C’ye kadar ısıtıldı. Son aşamada toplam çözelti hacmi distile su ile 100 mL’ye tamamlandı.

3.2.2 *Salmonella Typhimurium* LT2 suşunda *MisL* geninin ifadesi

3.2.2.1 *MisL* geninin PZR ile çoğaltılması

Çalışma *MisL* geninin yolcu domaininin fonksiyonunun araştırılmasına yönelik olduğundan, *MisL* geninde sadece N-terminal sinyal peptit ile Beta-barrel transmembran domainleri arasında kalan bu bölgeyi kapsayacak şekilde polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gerçekleştirildi. PZR’da kullanılacak primerlerin tasarımı için NCBI, Sinyal Peptide 4.1-prediction ve Ugene hizmetlerinden yararlanıldı.

MisL geninde bu spesifik bölgenin çoğaltılmasında kullanılacak primerlere eklenen restriksiyon endonükleaz tanıma serilerinin hangi enzime ait olacağını belirlenmesinde, enzimin çoğaltılacak gen içerisinde kesim bölgesi içermemesine ve aynı enzimlerin, kullanılacak olan pet-28a vektörünün klonlama bölgesinde kesim yapmasına dikkat edildi. Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin hedef gen içerisinde kesim bölgesinin olup olmadığının araştırılmasında CLC Sequence Viewer programından yararlanıldı ve *EcoRI* ile *NheI* restriksiyon endonükleaz enzimlerinin bu çalışma için uygun olduğu sonucuna varıldı.

Kullanılan primer çiftleri (Metabion) çizelge 1.1’de verildi. Bu çalışmada optimize edilen yöntemde Fermentas Taq DNA polimeraz kullanıldı. Polimeraz Zincir Reaksiyonları GeneAmp9700 Thermocycler (Applied BioSystems, USA) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

Çizelge 3.1 Polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan primerler

Primer	Dizilim 5'→3'	T _m (°C)
<i>MisL</i> -N-ter-clon-F	GAT <u>GCT AGC</u> GCC TGG GTT GAC GTT GAT AGT C	75
<i>MisL</i> -N-ter-clon-R	GAT <u>GAA TTC</u> TTA GAC CTT CTT CTC ACC CGT C	71

T_m: Primer erime sıcaklığı

Altı çizili diziler restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerini göstermektedir.

Amplifikasyon için kullanılan reaksiyon karışımı (Fermentas, EU) ve amplifikasyon koşulları aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı ve uygulandı.

PZR içeriği (Tek reaksiyon için):

Nükleaz içermeyen su	30 µL
Tampon (10X)	5 µL
dNTP (2mM)	5 µL
İleri Primer (20mM)	1 µL
Geri Primer (20mM)	1 µL
MgCl ₂ (25mM)	3 µL
Taq DNA polimeraz (1u/µL)	1 µL
DNA (40 ng/µL)	4 µL

PZR koşulu

<u>Basamak</u>	<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>	<u>Döngü Sayısı</u>
Ön Denatürasyon	94 °C	10 Dakika	1
Denatürasyon	94 °C	1 Dakika	} 30
Bağlanma	69 °C	45 Saniye	
Uzama	72 °C	2 Dakika	
Son Uzama	72 °C	10 Dakika	1

3.2.2.2 *MisL* geninin tanımlanması

PZR uygulaması sonrasında, DNA örnekleri Tris-Asetat EDTA tampon içeren tankta % 1'lik agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromit içeren tamponda bekletildi. Boyanan Jel, Kodak Gel Logic 200 Imaging System (Kodak, USA) kullanılarak incelendi ve fotoğraflandı.

Tris-Asetat-EDTA (TAE) Tamponu (50X)

Tris.HCl	242 g
Glasiyel Asetik Asit	57,1 mL
EDTA (0,5 M)	100 mL

Distile su ile son hacim1 litreye tamamlandı.

3.2.2.3 *MisL* geninin doğrulanması

High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Chem. Co., USA) ile saflaştırılan DNA örneğinin dizi analizi REFGEN (ODTÜ Teknokent, Ankara) firması tarafından yapıldı. Dizi analizi sonucu elde edilen dijital dosyalar FinchTV programı kullanılarak değerlendirildi.

3.2.3 Restriksiyon endonükleaz enzim kesimleri ve agaroz jel elektroforezi

Araştırmada kullanılan restriksiyon endonükleaz (R.E) enzimleri ve bu enzimlere ait tampon çözeltiler (Fermentas, EU) firmasından sağlandı. Tüm kesim reaksiyonları için, bu firma tarafından önerilen ve aşağıda belirtilen reaksiyon karışımları kullanıldı:

PCR ürünü için restriksiyon endonükleaz kesim reaksiyon karışımı (Hacim 30 µL)

Distile su	21 µL
R.E Tamponu- Tango Tampon (10X)	3 µL
Purifiye <i>MisL</i> ürünü (111.8 ng/µL)	5 µL
NheI R.E. Enzimi (10u)	1 µL

Vektör DNA için restriksiyon endonükleaz kesim reaksiyon karışımı (Hacim 20 µL)

Distile su	7 µL
R.E Tamponu-Tango Tampon (10X)	2 µL
PET28a (64.1 ng/µL)	10 µL
NheI R.E. Enzimi (10u)	1 µL

İlk enzim kesim reaksiyonları için 37 °C'de 2 saat inkübasyon uygulandı ve su banyosunda 65 °C'de 20 dakika tutularak R.E enzim inaktivasyonu sağlandı. İlk kesim reaksiyonunun devamında ikinci enzim kesim reaksiyonu gerçekleştirildi.

İkinci restriksiyon endonükleaz kesim reaksiyon karışımı

	<u>PZR ürünü için</u>	<u>Vektör DNA için</u>
R.E Tamponu-Tango (10X)	3,75 µL	2,5 µL
EcoRI R.E (10u)	1 µL	1 µL

Bu ortam ilave edilip, 37 °C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı ve bu süre sonunda 65 °C'de 20 dakika tutularak R.E enziminin inaktivasyonu sağlandı.

Enzimatik reaksiyonlarla modifiye edilmiş DNA'lar, bu enzimlere ait tamponlardan, High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Chem. Co., USA) aracılığı ile uzaklaştırıldı. Kesim sonuçları 1 Kb marker (Fermentas, EU) ve supercoiled marker (Sigma, USA) kullanılmak suretiyle % 0.7 konsantrasyonunda agaroz içeren jelde kontrol edildi. Agaroz jel elektroforezi 100 V sabit elektrik akımında ve TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponda, 1 saat süreyle yapıldı. Elektroforez işlemi sonrasında DNA bantları TAE tampon içerisine 2 µg/mL olacak şekilde etidyum bromit (Sigma Chem. Co., USA) ilave edilerek 30 dakika boyandı ve UV ışık altında görüntülenerek fotoğrafları alındı (Kodak Gel Logic 200 Imaging System, USA). Ayrıca DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflık oranları nanodrop 2000 spektrofotometre cihazı (Thermo) kullanılarak tespit edildi.

3.2.4 DNA bağlama reaksiyonu (Ligasyon)

Kesim yapılan PZR ürününün lineer hale getirilen vektöre aktarım rekombinant plazmid elde edebilmek için ligasyon reaksiyonları yapıldı. DNA parçalarının bağlanma reaksiyonlarında, T4 DNA ligaz enzimi ve bu enzime ait tampon çözeltileri (Fermentas, EU) kullanılarak 20 µL toplam hacimde gerçekleştirildi. Üretici firmanın uygulama önerisi dikkate alınarak, vektör (pet28a) ve klonlanacak DNA örneklerinin molar konsantrasyonlarına göre 1:1, 3:1 oranlarını içeren ligasyon karışımları hazırlandı ve bu karışımlar 22 °C'de 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda su banyosunda 65 °C'de 10 dakika tutularak T4 DNA ligaz enziminin inaktivasyonu sağlandı. Oluşturulan rekombinant plazmidler kullanımlarına kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

DNA-Vektör molar oranlarının hesaplanmasında aşağıda verilen denklemden faydalanıldı.

DNA Konsantrasyonu (ng)=

DNA boyutu (bç) x Vektör Konsantrasyonu (ng) x Ligasyon oranı

Vektör boyutu (bç)

DNA Bağlanma Reaksiyonu Karışımı (Hacim 20 µL)

	<u>1 :1</u>	<u>3 :1</u>	<u>*Kontrol Grubu</u>
Distile su	11,5 µL	9,5 µL	34 µL
T4 DNA ligaz tamponu (10X)	2 µL	2 µL	5 µL
<i>MisL</i> (64ng/µL)	1 µL	3 µL	—
Pet28a (32ng/µL)	5 µL	5 µL	10 µL
T4 DNA ligaz	0,5 µL	0,5 µL	1 µL

*Kontrol grubu olarak yalnızca vektörü içeren bir ligasyon karışımı uygulandı (Hacim 50 µL).

Ligasyon sonuçları 1 Kb marker (Fermentas, EU) ve supercoiled marker (Sigma, USA) kullanılmak suretiyle % 0.7 konsantrasyonunda agaroz içeren jelde kontrol edildi.

3.2.5 *Escherichia coli* hücrelerinin elektroporasyona hazırlanması

Elektrokompotent *E. coli* hücrelerin hazırlanmasında Sambrook vd. (1989) tarafından tanımlanan yöntem kullanıldı. -80 °C’de muhafaza edilen *E. coli* Dh5α ve BL21 suşu, 5 mL LB sıvı besiyeri içeren tüplerde 37 °C ve 200 rpm karıştırma hızında 1 gece üretildi. Bu kültür, LB Agar içeren petri plaklarına tek koloni düşürülecek şekilde öze ile ekildi ve 37 °C’de 1 gece inkübe edildi. Agar yüzeyinde gelişen tipik koloniler öze ile 5 mL LB sıvı besiyeri içeren tüplere alındı. Hücreler 37 °C ve 200 rpm karıştırma hızında 1 gece inkübe edildi. Gelişen kültür, inkübatörde tutularak sıcaklığı 37 °C’ye getirilmiş LB besiyerine 1/100 oranında aktarıldı ve 37 °C 200 rpm karıştırma hızında iki saatlik inkübasyon sonrasında, her 15 dakikada bir ortamın optik yoğunluk (OD₆₀₀) değerleri ölçüldü. Kültürün optik yoğunluğu 0.4-0.6 değerleri arasına ulaştıktan sonra inkübasyon sonlandırıldı ve kültür ortamı buz üzerine alınarak sıcaklığı 4 °C’nin altına düşürüldü. Hücre süspansiyonları, önceden buz içerisine yerleştirilerek soğutulan santrifüj tüplerine dağıtıldı ve 4 °C’de 10000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi. Üst sıvının dökülerek uzaklaştırılmasından sonra, hücre çöktelleri önceden 4 °C’ye soğutulmuş % 10 gliserol

içeren steril deiyonize su içerisinde çözüldü. Elde edilen süspansiyon, 4 °C'de 10000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek tekrar hücre çökeltileri elde edildi. % 10 gliserol içeren steril deiyonize su ile yapılan bu yıkama işlemi 2 kez daha tekrar edildi. Son aşamada, hücre çökeltisi % 10 gliserol içeren deiyonize su ile çözüldü ve önceden buz üzerinde soğutulmuş mikrosantrifüj tüplerine 50 µL'lik süspansiyonlar halinde dağıtıldı. Hazırlanan kompetent hücreler, kullanılıncaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi (Sambrook vd. 1989)

3.2.6 Rekombinant plazmidlerin *E. coli* Dh5α hücrelerine elektroporasyonu

Oluşturulan rekombinant plazmidler, CelljecT Uno elektroporatör cihazında (Thermo, USA), 2 mm genişliğinde örnek haznesine sahip elektroporasyon küvetleri (Thermo, USA) kullanılarak, öncelikle transformasyon etkinliği yüksek olan alıcı kompetent hücre *E. coli* Dh5α'ya aktarıldı. Bu işlem öncesinde, -80 °C'de muhafaza edilen kompetent hücreler, -20 °C'de muhafaza edilen plazmid solüsyonları ve elektroporasyon küvetleri buz üzerinde bekletildi. Buz üzerinde çözündürülen plazmid solüsyonundan 2 µL alınarak çözünmüş kompetent hücreler (50 µL) üzerine aktarıldı. Buz üzerinde inkübe edilen bu karışım, pipetle elektroporasyon küveti içerisine hava kabarcığı kalmayacak şekilde aktarıldı. Elektroporatör cihazında 1800 V değeri ayarlanarak elektrik akım uygulaması yapıldı. Elektroporasyon uygulanmış hücrelerin bulunduğu küvete 1 mL rejenerasyon ortamı (SOC+glukoz) ve LB besiyeri ilave edildi. Tüm içerik steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 2 saat 37 °C'de çalkamalı olarak inkübe edilen ortamdan, 50 µg/mL kanamisin (kan) içeren LB agar plaklarına yayma ekim yapıldı. 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı (Sambrook vd. 1989).

SOC Ortamı

Trypton	2 g
NaCl	0,5 g
1 M KCl	0,25 mL
1 M MgSO ₄	2 mL
dH ₂ O	97 mL

pH, 4 N NaOH kullanılarak 7.0 olarak ayarlandı ve ortam 121 °C’de 15 dakika sterilize edildi. Ortam kullanılmadan hemen önce 18 µL (1 mL için) 1 M glukoz ilave edildi.

1M Glukoz

Glukoz	18 gr
dH ₂ O	100 mL

Sterilizasyon filtrasyonla yapıldı.

3.2.7 Dh5α suşundan rekombinant plazmid izolasyonu ve insert genin doğrulanması

Kanamisin içermeyen LB broth besi ortamında geliştirilen *E. coli* Dh5α ve kanamisin içeren LB agar besi ortamında seçilen Dh5α^{Rc} suşlarından high pure plazmid DNA kiti (Roche Chem. Co., USA) kullanılarak, üretici firmanın önerdiği protokole göre plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

Roche High Pure Plazmid DNA Kiti İzolasyon Protokolü:

Çalışmaya OD₆₀₀=1.5-5.0 aralığında olan 4 mL’lik kültürlerle başlandı. Oda sıcaklığında 8000 rpm’de 30 saniye santirifüj edilen kültürlerin üst sıvısı döküldükten

sonra, bakteriyel çökelti 250 µL RNaz'lı tamponda çözüldü. Çözülen çökelti üzerine 250 µL lizis tampon eklendikten sonra, tüp 3-6 kez çevrildi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda buzda bekletilen bağlanma tamponundan 350 µL eklendi ve tüp tekrar 3-6 kez çevrildi. Bu aşama sonunda tüpler buzda 5 dakika inkübasyona bırakıldı ve oda sıcaklığında 12000 rpm'de 10 dakika santirifüj edildi. Santirifüj sonrası elde edilen üst sıvı filtreli tüpe aktarıldı ve oda sıcaklığında 12000 rpm'de 1 dakika daha santirifüj edildi. Santirifüj sonrası üst faza 700 µL yıkama tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 12000 rpm'de 1 dakika santirifüj edildi. Santirifüj sonrası alt faz alınarak, 1 kez daha santirifüj yapıldı ve filtreli tüp yeni steril bir mikrosantirifüj tüpüne aktarılarak, 100 µL elüsyon tamponu eklendi ve 1 kez daha santirifüj yapıldı. Sonraki analizlerde kullanılmak üzere elde edilen plazmidler -20 °C'de saklandı.

Plazmid izolasyon sonuçları % 0.7 konsantrasyonunda agaroz içeren jellerde kontrol edildi. Elde edilen rekombinant plazmidler, insert genin varlığının doğrulanması amacı ile PZR analizinde kullanıldı. *MisL* geninin amplifikasyonu için reaksiyon karışımı ve koşulları 3.2.2.1'de belirtildiği şekilde uygulandı

3.2.8 Rekombinant plazmidlerin *E. coli* BL21 hücrelerine elektroporasyonu

E. coli Dh5α hücrelerinden elde edilen rekombinant plazmidler, CelljecT Uno elektroporator cihazında (Thermo, USA), 2 mm genişliğinde örnek haznesine sahip elektroporasyon kuvvetleri (Thermo, USA) kullanılarak ifade etkinliği yüksek alıcı kompetent hücre *E. coli* BL21'e aktarıldı. Bu işlem bölüm 3.2.6'da belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

Kanamisin içeren LB agar besi ortamında seçilen BL21^{Rc} suşlarından ve kanamisin içermeyen LB broth besi ortamında geliştirilen *E. coli* BL21 suşundan high pure plazmid DNA kiti (Roche Chem. Co., USA) kullanılarak, üretici firmanın önerdiği protokole göre plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon sonucu % 0.7 konsantrasyonunda agaroz içeren jelde kontrol edildi ve UV ışık altında görüntülenerek fotoğrafı alındı (Kodak Gel Logic 200 Imaging System, USA). -20 °C'de muhafaza

edilen rekombinant plazmidlerin insert geni içerip içermediğini kontrol etmek amacıyla PZR analizi yapıldı. *MisL* insert geninin amplifikasyonu için reaksiyon karışımı ve koşulları 3.2.2.1’de belirtildiği şekilde uygulandı. *MisL* geninin varlığı % 1 konsantrasyonunda agaroz içeren jelde kontrol edildi.

3.2.9 Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Elde edilen rekombinant BL21 hücrelerinde *MisL* protein ifadesinin olup olmadığının anlaşılabilmesi için sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi yapıldı. Kanamisin içeren 5 mL LB broth üzerine 1/100 oranında BL21^{Rc} kültürü inoküle edilerek 37 °C’de OD₆₀₀=0.3-0.4 oluncaya dek üretildi (yaklaşık 2 saat). Bu kültürlerle 5 mL induksiyon çözeltisi (% 2’lik Pepton, 1 mM IPTG (izopropil β-D-1 tiogalaktopiranozid), 50mg/mL Kanamisin ve LB) ilave edilerek 1 gece boyunca aynı koşullarda inkübasyona devam edildi. Paralel olarak aynı bakteriler indüklenme gerçekleştirilmeden üretildi. Kontrol olarak BL21 suşu kullanıldı. Kültürler oda sıcaklığında 14000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü.

SDS-PAGE denemelerinde, Laemmli (1970) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. 10x8 cm ve 10x7.5 cm ebatlarında iki adet cam plaka kullanılarak dikey jel sistemi kuruldu. Elektroforez plakaları % 70’lik etanol çözeltisi ile yıkanıp kurutulduktan sonra, Bio-Rad jel elektroforez tankına yerleştirildi. Bu aşamadan sonra jel tarağının 1 cm altına kadar gelecek şekilde % 10’luk ayırıcı jel döküldü. Üzerine 100 µL isopropanol ilave edilen ayırıcı jelin polimerizasyonu için 45 dakika beklendi. Plakanın kalan kısmı, yığma jel dökülerek tamamlandı ve tarak yerleştirildi. Yığma jelin polimerizasyonu için 20 dakika kadar beklendikten sonra plakalar elektroforez tankına yerleştirildi, elektrot tamponu ilave edildi ve tarak çıkarıldı. Örnekler yüklenmeden önce 2X protein örnek tamponu (Sigma) ile iyice karıştırıldıktan sonra 5 dakika 100 °C’de bekletildi. Hazırlanan örnekler jel kuyucuklarına hamilton iğne uçlu pipet aracılığıyla 10 µL, prestain protein marker ise 5 µL olacak şekilde aktarıldı. Jel sistemine göç için 100 V akım uygulandı. Yaklaşık 2 saat ayırıcı jelde yürütülen örnekler jelin son kısmına ulaştığında, akım durduruldu. Sistemden çıkarılan jel, 45 dakika fiksasyon çözeltisinde bekletildikten sonra 1 gece Commasie Brilliant Blue Çözeltisinde tutuldu.

Boyanan jel boya giderme çözeltilisinde en az 2 saat bekletildikten sonra, beyaz ışık kaynağı üzerine yerleştirilerek jel fotoğrafları alındı. Proteinlerin moleküler büyüklükleri, marker proteinlerin bağıl hareketlilik (Rf) değerleri ve moleküler büyüklüklerinin logaritmalarından yararlanılarak çizilen standart eğri kullanılmak suretiyle belirlendi.

Ayırıcı Jel (% 10)

Steril distile su	3,93 mL
% 30 Akrilamit/bisakrilamit (Applichem)	3,33 mL
1,5 M Tris, pH 8.8	2,53 mL
% 10 Sodyum dodesil sülfat	100 µL
% 10 Amonyum persülfat	100 µL
TEMED (N’N’N’N’-Tetra-Metilendiamin)	10 µL

Dökmeden hemen önce, % 10 amonyum persülfat ve TEMED ilave edildi.

Yığma Jel (% 5)

Steril distile su	2,80 mL
% 30 Akrilamit/bisakrilamit (Applichem)	0,70 mL
0,5 M Tris, pH 6.8	1,25 mL
% 10 Sodyum dodesil sülfat	50 µL
% 10 Amonyum persülfat	50 µL
TEMED (Sigma)	5 µL

Dökmeden hemen önce, % 10 amonyum persülfat ve TEMED ilave edildi.

% 30 Akrilamit/bisakrilamit

Akrilamit	29,2 g
Bisakrilamit	0,8 g
Steril distile su	100 mL

Çözelti 0.45 µm por çapındaki membran filtreden (Millipore Co. Billerica, MA, USA) geçirilerek sterilize edildi. Kullanılana kadar 4 °C’de karanlıkta saklandı.

1,5 M Tris, pH 8.8

Tris-base	54,5 g
Steril distile su	300 mL

Tris 200 mL distile suda çözüldükten sonra, HCl kullanılarak pH 8.8’e ayarlandı. Toplam hacim 300 mL’ye tamamlandı.

0,5 M Tris, pH 6.8

Tris-base	12,1 g
Steril distile su	200 mL

Tris, 150 mL distile suda çözüldükten sonra, HCl kullanılarak pH 6.8’e ayarlandı. Toplam hacim 200 mL’ye tamamlandı.

% 10 Sodyum dodesil sülfat

Sodyum dodesil sülfat	5 g
Steril distile su	50 mL

% 10 Amonyum Persülfat

Amonyum Persülfat	0,1 g
Distile su	1 mL

Fiksasyon Cözeltisi

İsoproponol	200 mL
Glasiyel Asetikasit	100 mL
Steril distile su	700 mL

Commasie Brilliant Blue Boya Cözeltisi

Commasie Brilliant Blue R250	0,3 g
Metanol	45 mL
Glasiyel Asetikasit	10 mL
Distile su	45 mL

Commasie Brilliant Blue, methanolde ve suda çözüldükten sonra glasiyel asetikaasit eklendi.

Boya Giderme Cözeltisi

Metanol	100 mL
Glasiyel Asetikasit	50 mL
Distile su	350 mL

Elektroforez Tampon (5X)

Tris-Base	15 g
Glisin	72 g
SDS	5 g

HCl kullanılarak pH 8.3'e ayarlandı ve distile su ile hacim 1 lt'ye tamamlandı.

3.2.10 Rekombinant MisL proteininin saflaştırılması

MisL proteininin saflaştırılması çalışmalarının ilk aşamasında, hücreler IPTG ile indüklendikten sonra lize edilmiştir. IPTG ile indüklendikten sonra lize, lize tamponu içerisinde 5 dakika boyunca sonike edildi (SONICS Vibra-Cell, Newtown, USA). Sonikasyon sonrası rotatörde 30 dakika inkübasyona bırakıldı ve 13.300 rpm hızda 4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi (Thermo IEC MICROCL 17R). Elde edilen üst sıvı kısmıyla kolon aşamasına geçildi. Protein solüsyonundaki polihistidin-tag proteinlerinin saflaştırılması için nikel yüklü nitrilotriasetik asit (NTA) şelatı içeren HisPur Ni-NTA (Thermo, Rockford, USA) spin kolonundan yararlanıldı. Firmanın önerdiği protokol takip edildi. Denge (10mM imidazol içeren PBS; pH 7.4), yıkama (25mM imidazol içeren PBS; pH 7.4) ve elüsyon (250mM imidazol içeren PBS; pH 7.4) tamponları hazırlandı. Kolon çalışmaya başlamadan önce oda sıcaklığında bir süre bekletildi ve altındaki tıkaç kaldırıldıktan sonra, 50 mL'lik falkona yerleştirildi. İçindeki stok tamponu uzaklaştırmak için, 700 g hızda 2 dakika santrifüj edildi. Kolonun 2 katı hacminde denge tampon eklendi ve bu tamponu uzaklaştırmak için 700 g'de 2 dakika santrifüj edildi (Hettich Rotina 35 R). Protein ekstraktı eşit hacimde denge tamponu ile karıştırıldı ve kolonun tıkaçı alta takıldıktan sonra hazırlanan protein ekstraktı eklendi. 30 dakika oda sıcaklığında rotatörde karıştırılması sağlandı. Kolon tıkaçı tekrar çıkartılıp, 700 g'de 2 dakika santrifüj edildi ve alt kısım toplandı. Kolonun iki katı hacminde yıkama tamponu ilave edildikten sonra 700 g'de 2 dakika santrifüj edildi ve fraksiyonlar santrifüj tüpüne toplandı. Bu basamak iki kez daha tekrarlandı ve her basamağın fraksiyonları ayrı steril tüplere alındı. His-tag proteinleri ayırmak için

kolonun 1 katı hacminde elüsyon tampon eklendi ve 700 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Bu basamak iki kez daha tekrarlandı ve her basamağın fraksiyonları ayrı steril tüplere alındı. Protein saflaştırılmasının son aşamasında örnekler imidazolden arındırıldı. Bu işlem için 0.2 M amonyum bikarbonat (pH:8.0) tamponu ile dengelenen D-Salt Poliakrilamid Plastik Desalting Kolonundan (Pierce, Rockford, IL, USA) yararlanıldı. 100 g'de santrifüj edilen bu kolondan 3 kez elüsyon örneği toplandı. En son olarak da kolondan 1X PBS geçirilmesi sonrası örnek toplandı. Protein örnekleri Western Blot tekniği ile analiz edildi ve fraksiyonların protein miktar tayinleri yapıldı. Elüsyon örnekleri analiz süresince -20 °C'de % 50'lik gliserol (1:1 oranında) içerisinde saklandı.

Lizis Tamponu (25 mL)

Tris-HCl pH: 8.0	10 mM
KCl	50 mM
EDTA	1 mM
Triton X-100	% 1
IGEPAL CA-630	% 0,5
Lizozim	1/1000

3.2.11 Western blot yöntemi

Saflaştırılan rekombinant MisL proteininin purifikasyonun gerçekleştiğinin SDS-PAGE tekniğiyle kanıtlanmasının ardından Western Blotlama tekniği uygulandı (Renart vd. 1979, Towbin vd. 1979, Burnette vd. 1981). Aktarım için öncelikle jel boyutunda kesilen Immun-Blot PVDF (Poliviniliden difluorid) membran (BIO-RAD Lab, Hercules, CA, USA) % 100'lük metanol içerisinde konularak 5 dakika oda sıcaklığında çalkalandı. Bu aşamadan sonra membran soğuk transfer tampon çözeltisinde bekletilirken, aynı tampon içerisinde Whatman kâğıtları ve süngerleri de ıslatıldı. Transfer kasedinin (BIO-RAD Lab, Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell)

beyaz kısmına sırasıyla sünger, whatman kağıdı ve membran yerleştirilirken, siyah kısmına protein örneklerinin yürütüldüğü jel, whatman kağıdı ve sünger yerleştirildi. Kaset kapatılmadan önce, oluşturulan bu transfer sistemi üzerindeki hava kabarcıkları cam bir pipetin hafif bir şekilde yuvarlanması suretiyle giderildi. Transfer kasediyle birlikte buz kalıbı tanka (BIO-RAD Lab, Mini-PROTEAN) yerleştirildikten sonra, 90 dakika süresince 100 Volt akım uygulandı. Transfer işlemi gerçekleştirildikten sonra membran, 50 mL bloklama tampon çözeltisinde soğuk odada 1 gece çalkalandı. Bloklanan membrana primer antikor çözeltisi (Anti-His (C-term)-HRP (Horseradish peroksidaz antikor (invitrogen, Carlsbad, CA, USA) kullanılarak 1:2000 oranında PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) içerisinde seyreltilerek hazırlandı) ile muamele edildi ve oda sıcaklığında 1.5 saat boyunca yavaş bir şekilde karıştırılarak inkübasyona tabi tutuldu. Primer antikor uygulaması bitiminde membran, % 0.1'lik PBS-Tween 20 (PBS-T) içerisinde 10 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak 3 kez yıkandı. Buradan alınan membran, sekonder antikor çözeltisi (Anti-mouse IgG, HRP linked antikor çözeltisi (Cell Signaling Technology, Inc.) 1:5000 oranında PBS içerisinde seyreltilerek hazırlandı) içeren ortamda, oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Sekonder antikor uygulamasından sonra membran PBS-T içerisinde 10 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak 3 kez yıkandı. Kemiluminesans tanımlama görüntüleme için, 20X LumiGLO reaktif ve 20X Peroksit (Cell Signaling Technology, Inc) solüsyonlarından 1:1 oranında karıştırılarak substrat hazırlandı. Substrat solüsyonunun membrana uygulanmasından sonra görüntü alındı (Kodak Image Station 4000 mm, Rochester, USA). Görüntüleme çalışmaları karanlık ortamda gerçekleşti.

1X Transfer Tampon Çözeltisi

Tris	6,04 g
Glisin	14,4 g
Methanol	100 mL

700 mL saf su içerisinde çözüldükten sonra toplam hacim 1 litreye tamamlandı ve soğuması için 4 °C'de bekletildi.

10X PBS Çözeltisi

NaCL	80 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	8 g
KCL	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g

800 mL saf su içerisinde çözüldükten sonra pH 7.4'e ayarlanıp, toplam hacim 1 litreye tamamlandı. 121 °C'de 15 dakika steril edildikten sonra, oda sıcaklığında saklandı.

Bloklama Tampon Çözeltisi

Yağsız süt tozu	2,5 gr
PBS-T	50 mL

Hazırlanan çözelti 4 °C'de saklandı.

3.2.12 Protein konsantrasyonunun belirlenmesi

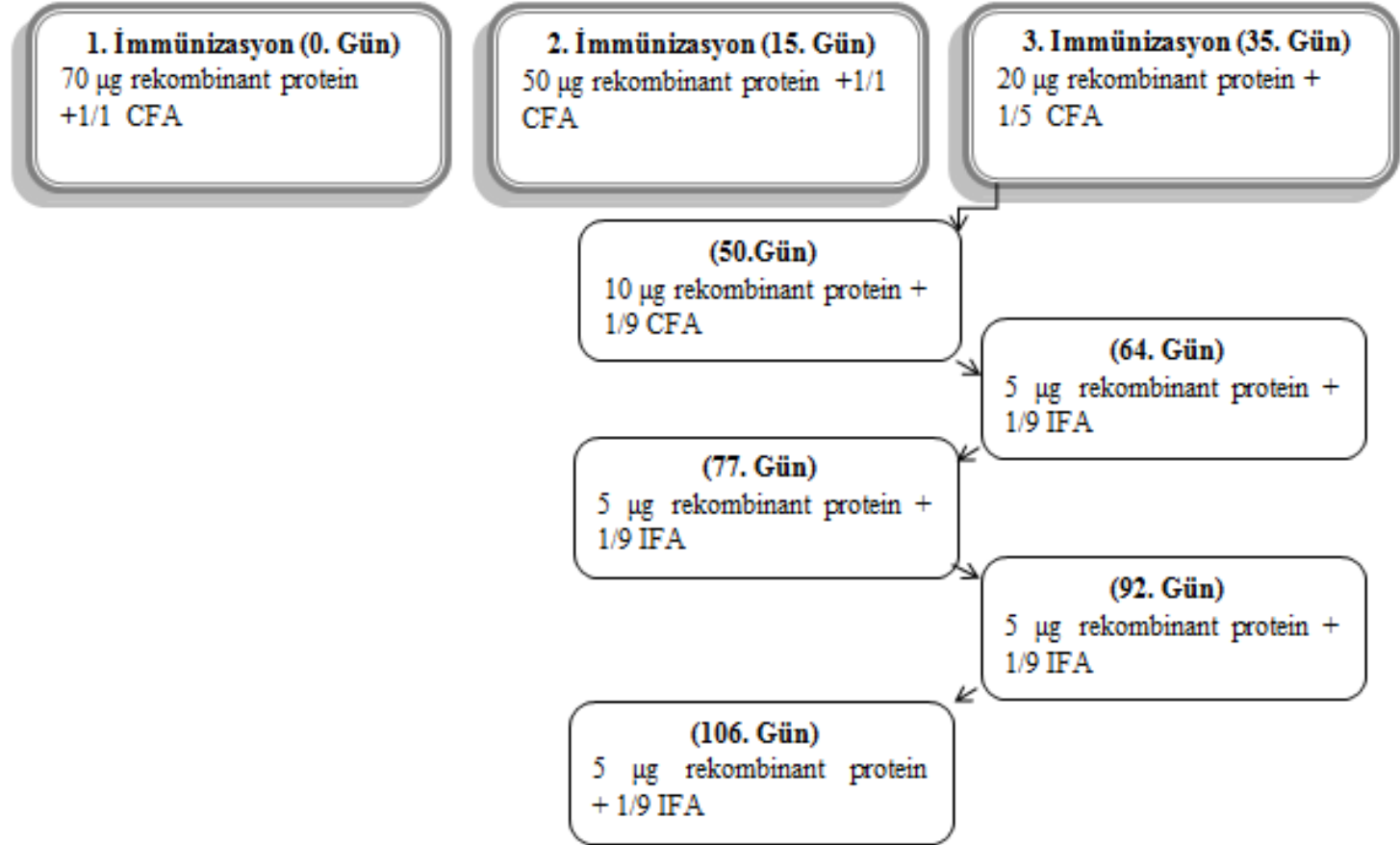
İmmünizasyon çalışmalarında farelere inoküle edilecek antijen miktarını belirleyebilmek için protein konsantrasyonunun tespitinde BCA Protein Assay kitinden (Novagen, Madison, WI, USA) yararlanıldı. Reaktif maddesi bisinkoninik asit (BCA) olan bu yöntemde, standart olarak sığır serum albümini (BSA) kullanıldı. Firmanın direktiflerine göre 0 µg/mL-1000 µg/mL aralığında BSA konsantrasyonları ve standart BCA çalışma reaktifi (BCA solüsyonu: % 4'lük kuprik sülfat, 50:1) hazırlandı. 96 kuyulu plağa her bir standarttan ve ölçülmesi istenen protein örneklerinden 25 µL konulduktan sonra, üzerlerine 200 µL BCA çalışma reaktifi eklendi. 30 saniye süre ile iyice karıştırılan plağın üzeri örtülüp, 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Plak oda sıcaklığında bir süre bekletildikten sonra, ikili reaksiyon sonucu oluşan renk

komplekslerinin absorbands değerleri 560 nm dalga boyunda ölçüldü (Perkin Elmer Victor3 V 1420 Multilabel Plate Counter). Konsantrasyonları bilinen BSA standartların absorbands verilerinden elde edilen standart eğriye göre oluşturulan formül ile örneklerin protein konsantrasyonları belirlendi (Smith vd. 1985, Kessler ve Fanestil 1986, Wiechelman vd. 1988, Brown vd. 1989).

3.2.13 Poliklonal antikor eldesi ve kontrolü

3.2.13.1 Balb/c farelerde poliklonal antikor üretimi

Poliklonal antikor (PAb) üretimi, saf antijenin eldesinden sonra hayvan türünün seçilmesi, adjuvan tercihi, enjeksiyon protokolü, enjeksiyon sonrası gözlemlene ve serum toplama süreçlerinden oluşmaktadır. PAb üretimi amacıyla gerçekleştirilen immünizasyon uygulamalarında sağlıklı, 8 haftalık, 3 adet dişi BALB/c fare kullanıldı. Saflaştırdığımız rekombinant MisL proteini antijen olarak kullanıldı ve fareye immün cevabı artırmak amacıyla Freund'un adjuvanı ile iyice emülsiyon haline getirilerek verildi (Cox ve Coulter 1997). İmmünojen-adjuvan emülsiyonu antijeni değredasyona karşı etkili bir şekilde korumakta böylece, antijen emülsiyon içinden yavaşça salınmakta ve bu sayede uzun zamanlı immünojen olma etkisini sürdürmektedir (Lindblad 2000). Bu amaçla intraperitoneal enjeksiyon (IP) uygulamasında öldürülmüş mikobakterileri içeren yağ-su emülsiyonu olan Freund'un komplet adjuvanı (CFA) ve sadece yağ-su emülsiyonu olan Freund'un inkomplet adjuvanı (IFA) kullanıldı (Sigma-Aldrich Co. LLC). İmmünizasyon protokolünün uygulanmasında bazı modifikasyonlar gerçekleştirildi (Harlow ve Lane 1999, Leenaars ve Hendriksen 2005, Hau ve Hendriksen 2005). Hayvan başına kullanılan antijen konsantrasyonu ve Freund'un adjuvan oranları şekil 3.2'de gösterildi. 2-3 hafta aralıklarla gerçekleştirilen IP enjeksiyonda 0.4 mm (26 G) çaplı steril enjektörler (Beybi A.Ş, İstanbul, Türkiye) kullanıldı.



Şekil 3.2 Takip edilen immünizasyon basamakları

3.2.13.2 Farelerin antikor yanıtının kontrol edilmesi

Çalışmaya başladığımız üç fareden ikisi 1 ay içinde eks olduğundan ötürü sadece bir farenin peritoneal boşluğunda biriken sıvı (asit) toplanabildi. Farelerin immünize olup olmadıklarının kontrolü, Western blotlama tekniği ile yapıldı. İmmünize olduğu kanıtlandıktan sonra, Balb/c'lerde IP enjeksiyon uygulamalarına devam edildi. 3.5 aylık bir süre sonunda yaklaşık 5 mL serum elde edildi. Farelerden toplanan serum 4 °C'de 13.300 rpm hızda 15 dakika santrifüjlendi. PAb içeren üst faz yağ içermeyecek şekilde alındıktan sonra, western blot analizinde kullanılmak üzere 1:1 oranında % 100'lük gliserol içerisinde -20 °C'de saklandı.

3.2.14 Poliklonal antikor saflaştırılması

Serumdan immünoglobulin (IgG) proteinleri saflaştırmak için kaprilik asit (oktanoik asit) kullanıldı (Rojas vd. 1994). Serumun üzerine hacminin % 5'i kadar kaprilik asit (Merck, Hohenbrunn, Germany) yavaşça ilave edildi. Solüsyonun pH değerinin 6 civarında olması sağlandı (Consort C3010). İki saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda rengi beyazlaşmaya kadar çalkalandı (ATE Magnetic Stirrer VELP SCIENTIFICA). Bu işlemin ardından 4 °C'de 20000 rpm hızda 10 dakika santrifüj edildi (Sigma 3K30 Laboratory Centrifuges). Santrifüj sonrası elde edilen üst sıvı 100 kDa filtre içeren Sortorius VIVASPIN 20 biotech (Goettingen, Germany) kolon içerisine aktarıldı ve 4 °C'de 7000 rpm hızda 30 dakika santrifüj edildi. Ultrafiltrasyon sonrası filtrenin üzerinde kalan sıvının hacmince distile su ilave edildi ve 4 °C'de 7000 rpm hızda 10 dakika santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi 2 defa tekrarlandıktan sonra filtrenin üzerindeki sıvı temiz bir tüpe aktarıldı. Spektrofotometrede protein konsantrasyonu hesaplamak için ölçüm yapıldı ve antikor etkinliği Western Blot tekniği ile teyit edildi. Örnek makrofaj simülasyon denemelerinde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

$$\text{Protein miktarı} = (280 \text{ nm absorbans} * 1,55) - (260 \text{ nm absorbans} * 0,76)$$

3.2.15 Hücre kültürü

Hücre kültürü deneylerinde Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarları hücre kültürü koleksiyonundan elde edilen insan makrofaj hücre hattı U937 ve fare makrofaj hücre hattı J774 hücreleri ile Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Thor Laboratuvarı hücre kültürü koleksiyonundan elde edilen fare makrofaj hücre hattı RAW hücreleri kullanıldı. Hücreler % 10 inaktive edilmiş Fetal Bovin Serum (FBS; Biowest, Nuaille, France), 2 mM L-glutamin (Lonza, Basel, Switzerland), 100u/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin (HyClone Laboratories, Logan, UT) ilave edilmiş RPMI 1640 (Lonza, Basel, Switzerland) ortamında 37 °C'de % 5 CO₂ içeren inkübatörde (Nuair Inc., Plymouth, MN) geliştirildi. Besiortamları 2-3 günde bir değiştirilerek, 2 haftalık inkübasyon sonrasında hücre kültürleri ile çalışılmaya başlandı.

3.2.16 Makrofaj hücrelerinin simülasyonu

Simülasyon denemeleri Maragkoudakis vd. (2006)'nin önerdiği yöntemin modifiye edilmesi ile gerçekleştirildi. İvert mikroskop (Olympus CKX 41, Melville, NY, USA) altında thoma lamı (Neubauer) üzerinde sayılan U937, J774 ve RAW makrofaj hücrelerinin konsantrasyonu 10⁶ hücre/mL olarak ayarlandı ve hücreler 96 kuyulu hücre kültürü plakalarına (Costar, Cambridge, MA) 10⁵ hücre/kuyu olacak şekilde inoküle edildikten sonra 1 gece inkübe edildi. LB sıvı ortamında bir gece geliştirilen *S. Typhimurium* LT2 ve 14028, *E. coli* BL21, indüklenmemiş D (BL21+pNT01) ve IPTG ile indüklenmiş D(İ), indüklenmemiş 1627 (14028 ΔmarT+pBAD24-marT) ve arabinozla indüklenmiş 1627(İ) ile 1629 (14028 ΔmarT) bakteri kültürleri 14000 rpm hızda oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj (Eppendorf 5415 R, Brinkman) edildi, kültür üst sıvısı uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile iki kere yıkandı. Yıkama işleminin ardından bakteriyel çökeltiler RPMI besiyerinde çözüldükten sonra konsantrasyonu 2x10⁷ cfu/mL olacak şekilde ayarlandı. Bu süspansiyonlardan makrofaj hücrelerinin bulunduğu kuyulara 10⁶ hücre/kuyu olacak şekilde dağıtıldı. Blokajlı ve blokajsız olarak simülasyon farkını görebilmek adına, blokaj olarak Balb/c'lerden elde ettiğimiz ve saflaştırdığımız antikor kullanıldı. Blokajın yapıldığı kuyular için saf antikordan

kültürlerin üzerine kuyu başına 0.4, 2 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarında olacak şekilde ilave edildi. Negatif kontrol olarak PBS ve RPMI besiyeri kullanıldı. Pozitif kontrol olarak 1 µg/mL konsantrasyonunda Lipopolisakkarit (LPS) (Sigma, St. Louis, MO) ve saf recombinant MisL proteini kullanıldı. Plaklar 24 saat 37 °C'de % 5 CO₂ varlığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası plaklar 300g hızda oda sıcaklığında 10 dakika santifüj edildi (Nüve NF 1200R, Ankara, Turkey). Santrifüj sonrası toplanan üst sıvılar -20 °C'de sitokin miktarlarının belirlenmesi için saklandı.

3.2.17 Sitokin düzeylerinin belirlenmesi

Simülasyon sonrası elde edilen hücre kalıntıları uzaklaştırılmış üst sıvılardaki IL-6 (İnterlökin-6) ve TNF-α (Tümör nekroz faktör-alfa) sitokin seviyelerinin ölçümü için ticari Enzim-Bağlantılı İmmüno-Sorbent teknik (ELISA) kiti (Millipore, Bedford, MA, USA; Matriks Biotek Laboratories, Ankara, Turkey) kullanıldı. ELISA reaksiyonu firmanın direktiflerine göre hazırlandı.

- Standart stok solüsyonu kullanılarak seri dilüsyonlar yapıldı ve 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8 pg/mL konsantrasyonlarında standartlar hazırlandı.
- Plağın kullanıma hazır hale gelmesi için, öncelikle 4 kere 1X konsantrasyonlu yıkama tamponu ile yıkandı.
- Kullanılacak her kuyuya 50 µL A tamponu dağıtıldı.
- Standart dilüsyonlardan ve örneklerden kuyulara 50'şer µL ilave edildi.
- Plağın üzeri kapatılıp, 200 rpm hızda çalkalanmak suretiyle 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası plak içeriği uzaklaştırılıp, 4 kere 1X konsantrasyonlu yıkama tamponu ile yıkandı.
- Kuyulara 100'er µL Avidin-HRP A solüsyonundan dağıtıldı ve üzeri kapatıldı, ardından çalkalanarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Plak içeriği yeniden uzaklaştırıldıktan sonra, plak 1X yıkama tamponu ile 5 kere yıkandı.

- Her kuyuya 100'er µL substrat solüsyonu ilave edildikten sonra karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası her kuyuya 100'er µL durdurma solüsyonu ilave edilerek reaksiyon durduruldu ve 450 nm dalga boyunda 30 dakika içinde örneklerin absorbansları okundu.

IL-6 ve TNF- α sitokin seviyelerinin araştırılması amacıyla ayrıca iki adet 96 kuyuluk plak (Nunc, Roskilde, Denmark) hazırlandı. Kuyu başına 50'şer µL anti-mouse IL-6 ve TNF- α (BioLegend, San Diego, CA, USA) monoklonal antikorları ilave edilip, 1 gece boyunca +4 °C'de inkübe edilerek, plakların kaplanması sağlandı. Takiben bloklama işlemi yapıldı ve kuyu başına 200'er µL bloklama tamponu dağıtılıp, 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Ardından içerik uzaklaştırıldıktan sonra, plaklar 5 kere 5 dakika boyunca yıkama tamponuyla, 3 kere de distile su ile yıkandı. Plaklar iyice kurutulduktan sonra, kuyu başına 50'şer µL standartlardan ve hücre kültüründen elde edilen üst sıvılardan eklenip, 1 gece boyunca +4 °C'de inkübe edildi. Plakların içeriği uzaklaştırılıp, tekrar yıkama işlemi gerçekleştirildi. Kuyu başına 50'şer µL biotinle işaretlenmiş anti-antikorlar (BioLegend, San Diego, CA, USA) (T-cell tamponu kullanılarak 1:1000 oranında dilüsyonu hazırlandı) ilave edilip, plaklar 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından plaklar 5 kere 5 dakika boyunca yıkama tamponuyla, 3 kere de distile su ile yıkandı. Kuyu başına 50'şer µL streptavidin-alkalin fosfataz (Mabtech, Stockholm, Sweden) (T-cell tamponu kullanılarak 1:3000 oranında dilüsyonu hazırlandı) eklendikten sonra, 1 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Takiben aynı şekilde yıkama işlemi gerçekleştirildi. Kuyu başına 50'şer µL pNPP (para-nitrofenol fosfat) substratı (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) dağıtılıp, reaksiyonun durdurulması sağlandı ve renk oluşumu için beklendi. Renk değişimine göre, 3 saat ve 1 gece sonrasında 405 nm dalga boyunda örneklerin absorbans değerleri ölçüldü (Engvall ve Perlmann 1971).

Bloklama Tampon Cözeltisi

BSA	25 gr
1XPBS	500 mL
Tween 20	250 µL

İyice karıştırıldıktan sonra, filtreden geçirildi ve – 20 °C’de saklandı.

Yıkama Tampon Cözeltisi

Distile su	4500 mL
10XPBS	500 mL
Tween 20	2,5 mL

T-hücre Tampon Cözeltisi

FBS	25 mL
1XPBS	500 mL
Tween 20	250 µL

İyice karıştırıldıktan sonra, filtreden geçirildi ve –20 °C’de saklandı.

3.2.18 İstatistiksel analiz

Elde edilen sitokin düzey verilerinin istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS 15.0 istatistik programından yararlanıldı. Gruplar arası anlamlılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile değerlendirildi. Testlerde anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

3.2.19 Floresans mikroskop denemeleri

3.2.19.1 Antikorum biotinle işaretlenmesi

Elde edilen poliklonal antikorum immüno Floresans mikroskopta kullanılması için biotinle işaretlenmesi gerekmektedir. Guesdon ve arkadaşları (1979) tarafından kullanılan yöntem modifiye edilerek bu basamak gerçekleştirildi. İlk aşama olarak antikordan tuzun uzaklaştırılması amacıyla Mikrodiyaliz sistemi 100 (Pierce, Rockford, USA 66315) kullanıldı. Bunun için sistem, firmanın direktiflerine göre kurulduktan sonra, hazırlanan 0.1 M Sodyum bikarbonat (NaHCO_3) çözeltisi ile dolduruldu. Sonrasında diyaliz membran (Pierce, Rockford, USA 66310) distile su ile yıkanarak sistem üzerine yerleştirildi. Oluşan hava kabarcıkların giderilmesi sağlandı. Kuyuya 2.2 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan antikordan 100 μL ilave edildi ve üzeri parafilmle örtüldükten sonra, kapağı kapatıldı. Karıştırıcı sistem üzerine diyalizer konuldu ve sistem yavaşça çalkalanmaya bırakıldı. En az 2 saat boyunca diyaliz edildi. Karışmaya başladıktan 1 saat sonra sodyum bikarbonat tamponu yenilendi ve diyalize devam edildi. İkinci aşama olarak antikorum biotinle konjuge olması için 2 mg Aminoheksanoil-Biotin-N-Hidroksisüksinimid Ester (AH-BNHS) (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, California, USA 00-4302) 200 μL Dimetil sulfoksid (DMSO) (Applichem, Darmstadt, Germany) içerisinde çözülerek hazırlandı. Diyaliz kuyucuğundan alınan örnek mikrosantrifüj tüpüne konuldu ve ardından 2 μL biotin ilave edildi. Karışım vortekslelendikten sonra 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Mikrodiyaliz sistemi distile su ile yıkandıktan sonra, fazla biotin uzaklaştırılması amacıyla tekrar kuruldu ve biotinle konjuge edilmiş örneğimiz 2.5 saat boyunca diyalize oldu. Bu sefer tampon olarak PBS kullanıldı. 2.5 saat boyunca en az 2-3 kez PBS tamponu değiştirildi. Diyalize edilen örneğimiz filtreli mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi ve 1-2 dakika boyunca spin edildi. Bir sonraki aşamada kullanılıncaya kadar elde edilen steril örnek +4 °C'de saklandı.

0,1 M Sodyum bikarbonat Cözeltisi

Distile su	500 mL
NaHCO ₃	4,2 gr
NaCl	2,92 gr

pH 8.4'e ayarlandı.

3.2.19.2 Kültürlerin streptavidinle işaretlenmesi

Biotinlenmiş antikorların kültürlerle bağlanıp bağlanmadığını kontrol edebilmek için, kültürlerin streptavidinle işaretlenmesi gerekmektedir (Chaiet ve Wolf 1964). Kültürlerin 1/10 oranında dilüe edilmesinin (100 µL hücre, 900 µL PBS) ardından, Accuri C6 Akım sitometri (BD, USA) cihazında sayımı yapıldı. Hücreler 10⁶ cfu/mL olacak şekilde ayarlandıktan sonra, 13300 rpm hızda +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra çökeltinin üzerine 100 µL antikor (1/20 oranında Faks tampon ile dilüe edilerek hazırlandı) ilave edildi. +4 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Üzerleri faks tampon ile 1 mL'ye tamamlandı ve 13300 rpm hızda +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı çekilip çökelti üzerine, 100'er µL streptavidin (1/100 oranında Faks tampon ile dilüe edilerek hazırlandı) (BioLegends) eklendi ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. Üzerleri PBS ile 1 mL'ye tamamlanıp, aynı koşullarda santrifüj yapıldı ve çökelti PBS ile çözüldü. Ardından örnekler Faks tüplerine alınıp, akım sitometri cihazında biotinlenmiş antikorun, streptavidinle işaretlenmiş bakteri hücrelerine bağlanıp bağlanmadığı kontrol edildi.

Faks Tamponu

BSA	5 g
Sodyum-Azid	250 mg
PBS	500 mL

BSA çözülünceye kadar karıştırıldı ve +4 °C’de saklandı.

3.2.20 MisL proteininin ekstrasellüler ortamda incelenmesi

Çalışmada kullanılan kültürlerde MisL proteininin varlığının tespiti için, kültürler çöktürüldü ve üst sıvılar ayrıldı. Çökelti üzerine serin proteaz olan Granzim B (GzmB) (Sigma) 6 mg/mL konsantrasyonunda ilave edildi. Santrifüj sonrası, Granzim B içeren çökeltilerin üzerine Lizozim (Sigma) 1 mg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde ilave edildi. Protein konsantrasyonunu artırmak ve yabancı etken maddelerin uzaklaştırılmasını sağlamak amacıyla Link ve LaBaer (2011) tarafından önerilen TCA (Trikloroasetikasit)/Aseton protein çöktürme yöntemi üst sıvı, Gzm B ve Gzm B+Lizozimle muamele edilmiş örneklerle kullanıldı. Protein örneğine % 100’lük soğutulmuş TCA (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) solüsyonundan 110 µL ilave edildi. 10 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakıldı. Örnek üzerine 500 µL % 10’luk soğutulmuş TCA solüsyonundan ilave edildi. 20 dakika buz üzerinde inkübasyonun ardından, 30 dakika 14000 rpm hızda santrifüj edildi. Üst sıvı dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra, 500 µL soğuk aseton ilave edildi. Çökelti iki defa asetonla yıkandı. 14000 rpm hızda 10 dakika santrifüj ardından asetonun uzaklaşması için, ısı bloğunda 95 °C’de 5-10 dakika çökeltinin kuruması beklendi. Örnek tamponu eklenmesinin ardından SDS-PAGE jelinde yürütülen örneklerin, anti-MisL antikoru (primer antikor) kullanılarak elde edilen western blotlama görüntüsü alındı.

% 100’lük TCA Solüsyonu

TCA 2,2 g

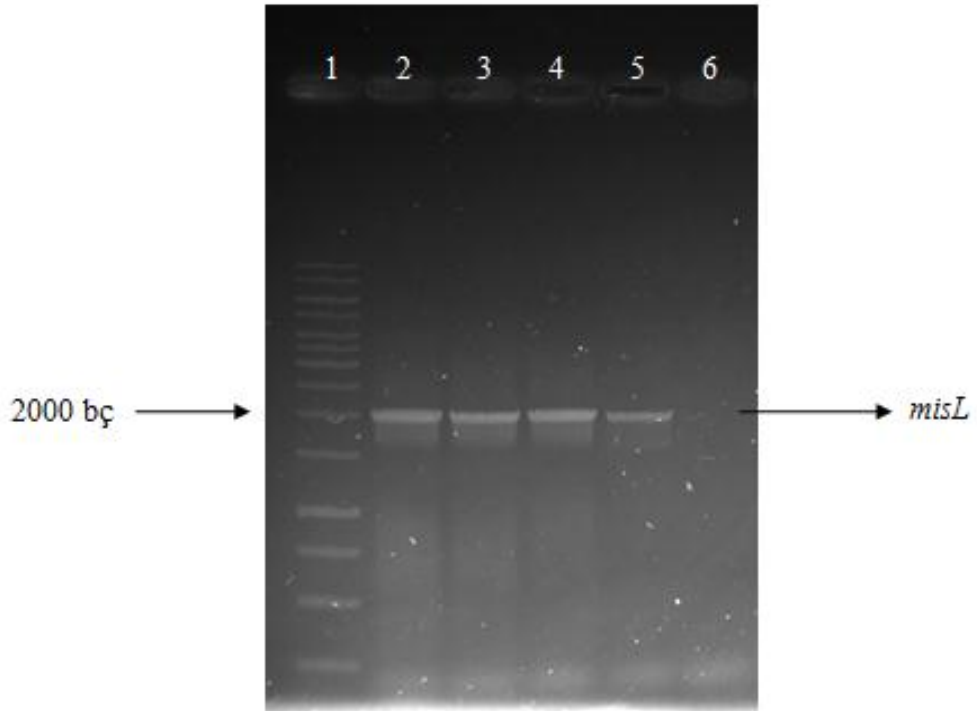
Distile su 1 mL

Bu solüsyon kullanılarak % 10’luk TCA solüsyonu hazırlandı ve TCA solüsyonları +4 °C’de saklandı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 *Salmonella* Typhimurium LT2 Suşunda *MisL* Geninin Yolcu Domaininin Çoğaltılması

2,8 kb'lık büyüklüğe sahip, 955 amino asitten oluşan ve *MisL* proteinini kodlayan *MisL* geni; çalışma kapsamında istediğimiz bölge olan yolcu domaine özgü dizayn edilen ileri primer 5'-GATGCTAGCGCCTGGGTTGACGTTGATAGTC-3' ve geri primer 5'-GATGAA TTCTTAGACCTTCTTCTCACCCGTC-3' kullanılarak *Salmonella* Typhimurium LT2 suşundan izole edilen genomik DNA'da çoğaltıldı. Gerçekleştirilen PZR sonrasında, 1968 baz çifti (bç) büyüklüğünde ürün elde edildi (Şekil 4.1).

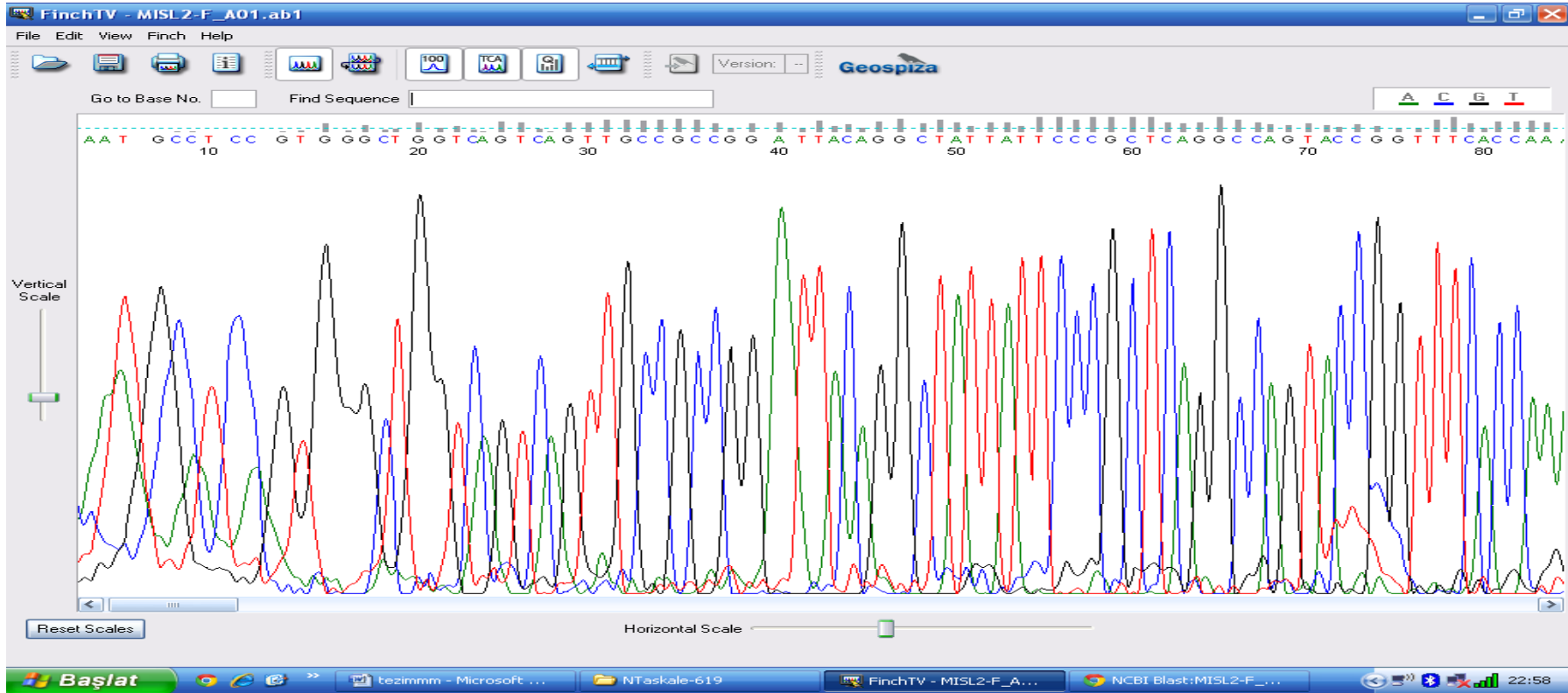


Şekil 4.1 *MisL* geninin polimeraz zincir reaksiyonu agaroz jel görüntüsü

Kuyu 1	1 kb DNA marker (10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bç, Fermentas)
Kuyu 2-5	<i>MisL</i> geni PZR ürünleri
Kuyu 6	PZR negatif kontrol (su)

Elde edilen PZR ürünleri purifikasyon sonrası, REFGEN firmasına sekans dizi analizi için gönderildi. Firma tarafından gönderilen sonuç FinchTV programında değerlendirildi (Şekil 4.2).

53



Şekil 4.2 *MisL* bölgesine ait örneklerin FinchTV kullanılarak elde edilen sekans dizi analizi

Elde edilen sonuçların BLAST analizine tabi tutulması sonucunda, söz konusu dizinin *Salmonella* Typhimurium LT2 genomunda yer alan, ototransporter protein üretiminden sorumlu *MisL* geni ile % 99 oranında homoloji gösterdiği saptandı (Şekil 4.3). Bu bulgu PZR ürününün *MisL* geni yolcu domaini olduğunu kanıtladı.

54

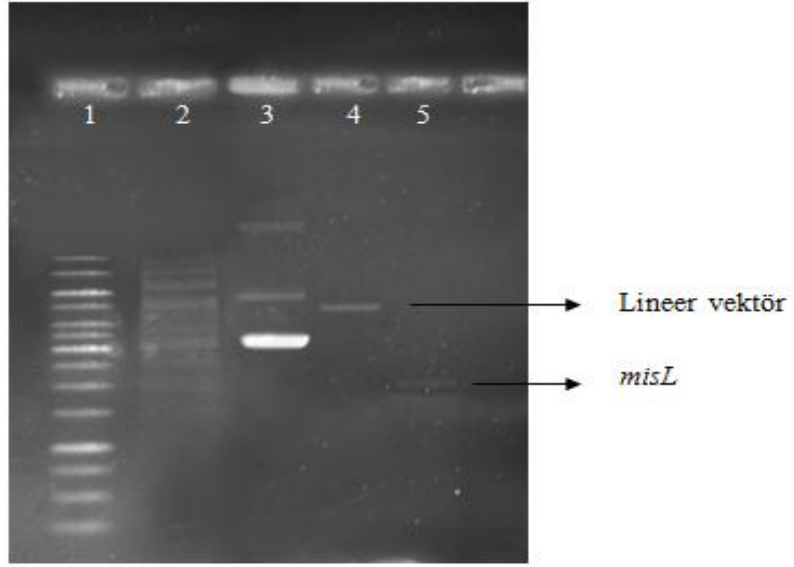
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/> Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. U288, complete genome	1577	1577	98%	0.0	99%	CP003836.1
<input type="checkbox"/> Salmonella enterica subsp. enterica serovar Heidelberg str. B182, complete genome	1577	1577	98%	0.0	99%	CP003416.1
<input type="checkbox"/> Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. 798, complete genome	1577	1577	98%	0.0	99%	CP003386.1
<input type="checkbox"/> Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. UK-1, complete genome	1577	1577	98%	0.0	99%	CP002614.1
<input type="checkbox"/> Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. ST4/74, complete genome	1577	1577	98%	0.0	99%	CP002487.1
<input type="checkbox"/> Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. T000240 DNA, complete genome	1577	1577	98%	0.0	99%	AP011957.1
<input type="checkbox"/> Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium SI.1344 complete genome	1577	1577	98%	0.0	99%	FQ312003.1
<input type="checkbox"/> Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. 14028S, complete genome	1577	1577	98%	0.0	99%	CP001363.1
<input type="checkbox"/> Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. D23580 complete genome	1577	1577	98%	0.0	99%	FN424405.1
<input checked="" type="checkbox"/> Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2, complete genome	1577	1577	98%	0.0	99%	AE006468.1
<input type="checkbox"/> Salmonella enterica subsp. enterica serovar Heidelberg str. SI476, complete genome	1577	1577	98%	0.0	99%	CP001120.1
<input type="checkbox"/> Salmonella typhimurium pathogenicity island SPI-3, complete sequence	1577	1577	98%	0.0	99%	AF106566.1
<input type="checkbox"/> Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gallinarum/bullorum str. RKS5078, complete genome	1532	1532	98%	0.0	99%	CP003047.1
<input type="checkbox"/> Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. P125109 complete genome	1532	1532	98%	0.0	99%	AM933172.1

Şekil 4.3 BLAST analizi sonucu

Bu çalışma MisL ototransporter proteininin belirli bir domaininin klonlanması açısından bir ilktir. Araştırmada temel amaç MisL ototransporter proteininin *Salmonella* patojenitesinde oynadığı rolün tanımlanması olduğu için; fonksiyonel domainin (yolcu) klonlanması, heterolog konakta ifadesi model sistemin oluşturulması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle bu çalışmada elde edilen vektörler sadece araştırmamız açısından değil, bu konuda çalışma yapacak diğer araştırmacılara hizmet sunması açısından da kritik değere sahiptir.

4.2 Restriksiyon Endonükleaz Enzim Kesimi

Sirküler halde bulunan saf pET28a vektörü ve saflaştırılan *MisL* gen ürünü yapışkan uç oluşturmaları için NheI ve EcoRI enzimleri ile kesime tabi tutuldu. pET28a vektörü çoklu kesim bölgesinde yer alan EcoRI ve NheI enzim kesim bölgeleri arasındaki uzaklık sadece 39 baz çifti olduğundan ötürü, kesim sonrası agoroz jelde vektör yaklaşık 5400 bp büyüklüğünde tek bir bant olarak lineer halde görüntülendi. İkili kesim sonrası *MisL* gen ürünü ise, sadece uç bölgelerinde Restriksiyon endonükleaz kesim dizisini içerdiğinden dolayı kendi boyutunu korumaktadır. Bundan ötürü, agoroz jelde yaklaşık olarak 2000 bp büyüklükte bir bant olarak görüntülendi (Şekil 4.4).

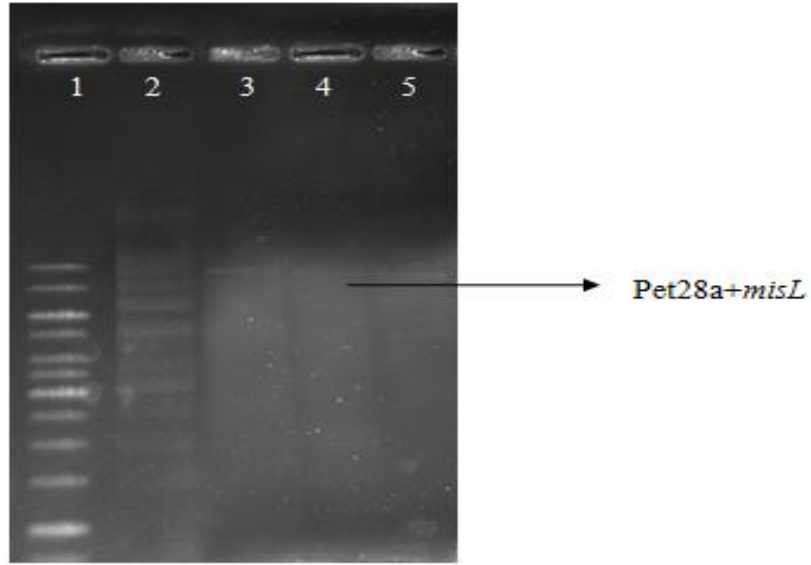


Şekil 4.4 pET28a plazmid vektörü ve *MisL* geninin ikili restriksiyon endonükleaz enzim kesimi

Kuyu 1	1 kb DNA marker (10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bç, Fermentas)
Kuyu 2	Supercoiled marker (16210, 14174, 12138, 10102, 8066, 7045, 6030, 5012, 3990, 2972, 2067 bç, Sigma)
Kuyu 3	pET28a plazmid vektörü
Kuyu 4	pET28a plazmid vektörünün NheI ve EcoRI enzimleri ile kesimi
Kuyu 5	<i>MisL</i> geninin NheI ve EcoRI enzimleri ile kesimi

4.3 DNA Bağlama Reaksiyonu (Ligasyon)

Restriksiyon enzim kesim sonrası elde edilen pET28a vektörü ve *MisL* gen ürünlerinin saflaştırılmasının ardından, ligaz enzimi kullanımıyla yapışkan uçlar arasında fosfodiester bağlarının oluşumu sağlandı. Ligasyon denemesi, insert gen molar konsantrasyonu 1 (1 insert/1 vektör) ve 3 (3 insert/1 vektör) olarak gerçekleştirildi. 1i/1v ligasyon denemesi sonucunda rekombinant plazmid eldesi görülmezken, 3i/1v olan ligasyon denemesi sonucunda 5400 bç büyüklükte vektörün (pET28a) ve 2000 bç büyüklükte inserte (*MisL*) bağlanarak, yaklaşık 7400 bç büyüklükte yeni bir rekombinant plazmid (pNT01) oluşturduğu belirlendi. Kontrol amaçlı ligasyon denemesinde ise, sadece vektör tanımlandı (Şekil 4.5). Bu sonuçlar pET28a vektörüne *MisL* geni yolcu domaininin ilave edildiğini kanıtlamaktadır.

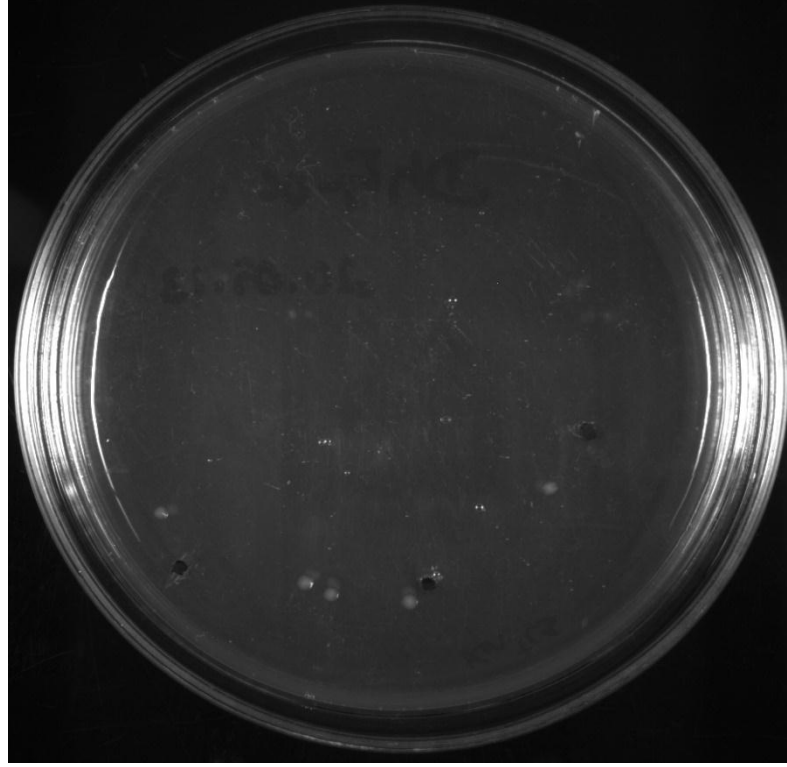


Şekil 4.5 Rekombinant plazmid eldesi için ligasyon denemesi agaroz jel görüntüsü

Kuyu 1	1 kb DNA marker (10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bç, Fermentas)
Kuyu 2	Supercoiled marker (16210, 14174, 12138, 10102, 8066, 7045, 6030, 5012, 3990, 2972, 2067 bç, Sigma)
Kuyu 3	Molar konsantrasyonu 1 olan ligasyon denemesi
Kuyu 4	Molar konsantrasyonu 3 olan ligasyon denemesi
Kuyu 5	Kontrol ligasyon denemesi

4.4 Rekombinant Plazmidlerin *E. coli* Dh5 α Hücrelerine Elektroporasyonu

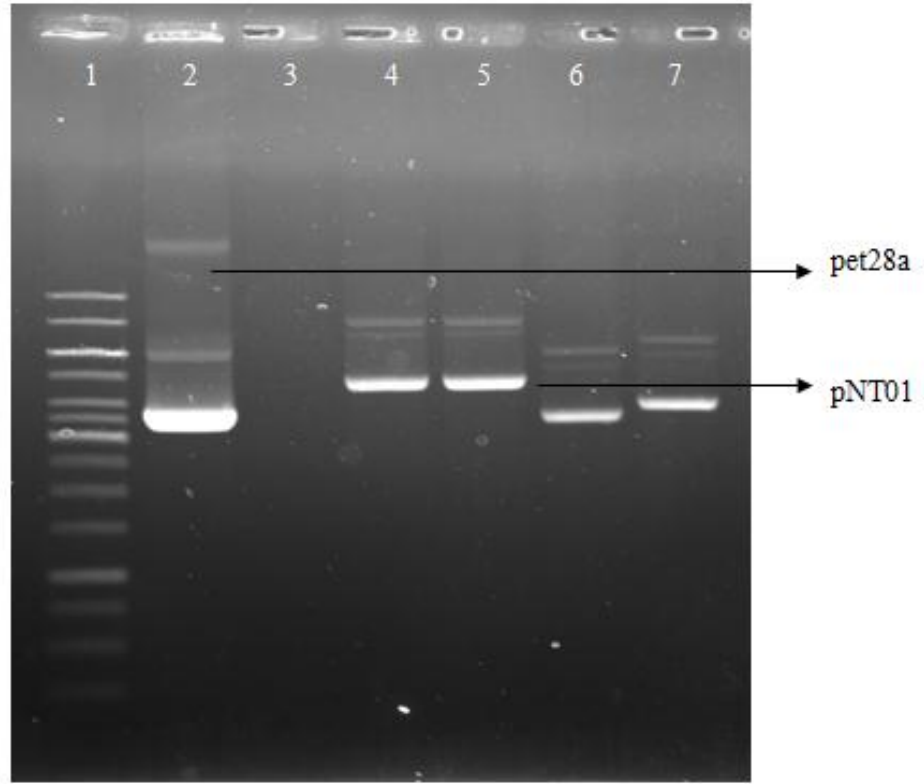
Elde edilen rekombinant plazmid (pNT01) kompetent hale getirilen *E. coli* Dh5 α hücrelerine elektropratör cihazı yardımıyla transforme edildi. Çalışmada kullanılan pET28a vektörü kanamisin (50 μ g/mL) dirençliliği taşıdığından ötürü, seçici besiyeri olarak kanamisin (50 μ g/mL) içeren LB agar kullanıldı. Plazmidi olmayan Dh5 α suşunun kan (50 μ g/mL) ortamda geliştiğinin belirlenmesi, elektroformasyon sonrası kanamisin direnç genini ihtiva eden vektör aktarımının gerçekleştiğini ve sonraki analizler için bu transformantlardan seçim yapılabileceğini kanıtlamıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 *Escherichia coli* Dh5 α suşuna pNT01 (*MisL* geninin aktarıldığı pET28a vektörü) plazmidinin transformasyonu sonucu oluşan transformantların antibiyotik içeren LB agar ortamlarında gelişimi

4.5 *E. coli* Dh5 α Suşundan Rekombinant Plazmid İzolasyonu Ve İnsert Genin Doğrulanması

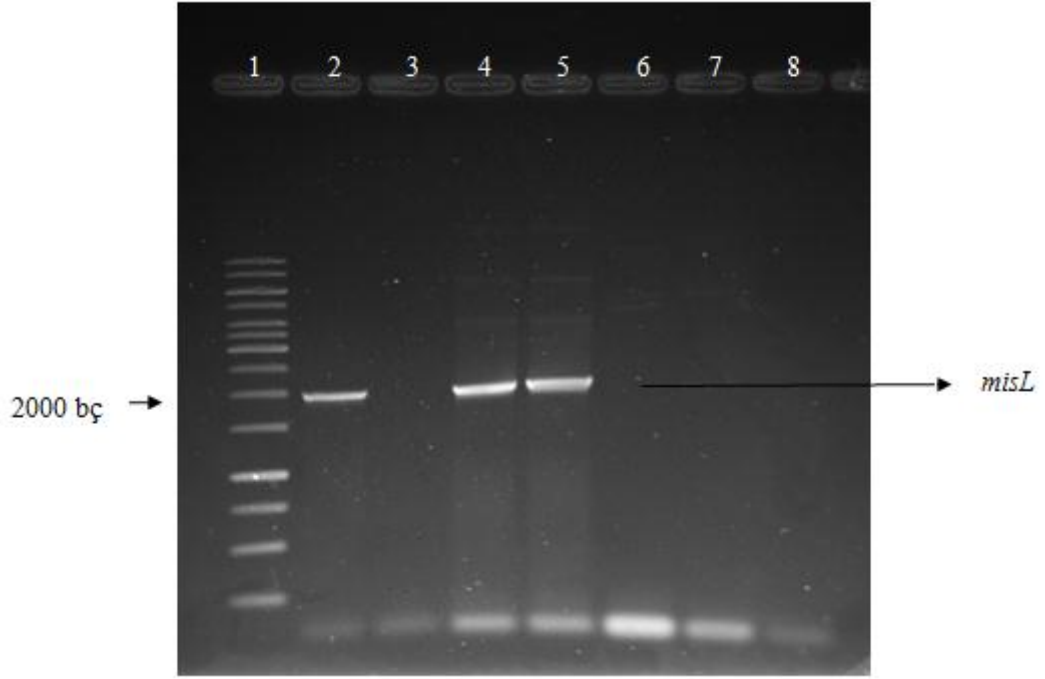
Hedef *MisL* genini taşıyan plazmidlerin varlığı, moleküler büyüklükleri esas alınarak doğrulandı. Elde edilen transformantlar arasından rastgele seçilen kolonilerden yapılan plazmid izolasyonu sonucunda; rekombinant plazmid (pNT01, 7400 bç) içeren suşlar yanında, insert geni (*MisL*) içermeyen plazmid ihtiva eden (pET28a, 5400 bç) suşların varlığı da belirlendi. Ayrıca, ara konak olarak kullanılan *E. coli* Dh5 α suşunun da plazmid izolasyonu yapılarak, plazmide sahip olmadığı doğrulandı (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Seçilen Dh5α kolonilerinin plazmid içeriği

Kuyu 1	1 kb DNA marker (10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bç, Fermentas)
Kuyu 2	pET28a plazmid vektörü
Kuyu 3	Dh5α suşunun plazmid DNA'sı
Kuyu 4-5	Dh5α ^{Rc} suşlarının pNT01 plazmid DNA'sı
Kuyu 6-7	Dh5α ^{Rc-} suşlarının pET28a plazmid DNA'sı

İzolasyon sonucu elde edilen pNT01 plazmidleri kullanılarak, insert genin varlığının kanıtlanması amacıyla PZR gerçekleştirildi ve *MisL* (2000 bç) gen bölgesinin varlığı agoroz jelde doğrulandı. İncert geni içermeyen plazmidlerle gerçekleştirilen PZR sonucunda ise, 2000 bç büyüklükte herhangi bir bant gözlemlenmedi. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun çalışabilirliğini kontrol edebilmek amacıyla LT2 genomik DNA'sı, negatif kontrol olarak ise su kullanıldı (Şekil 4.8).



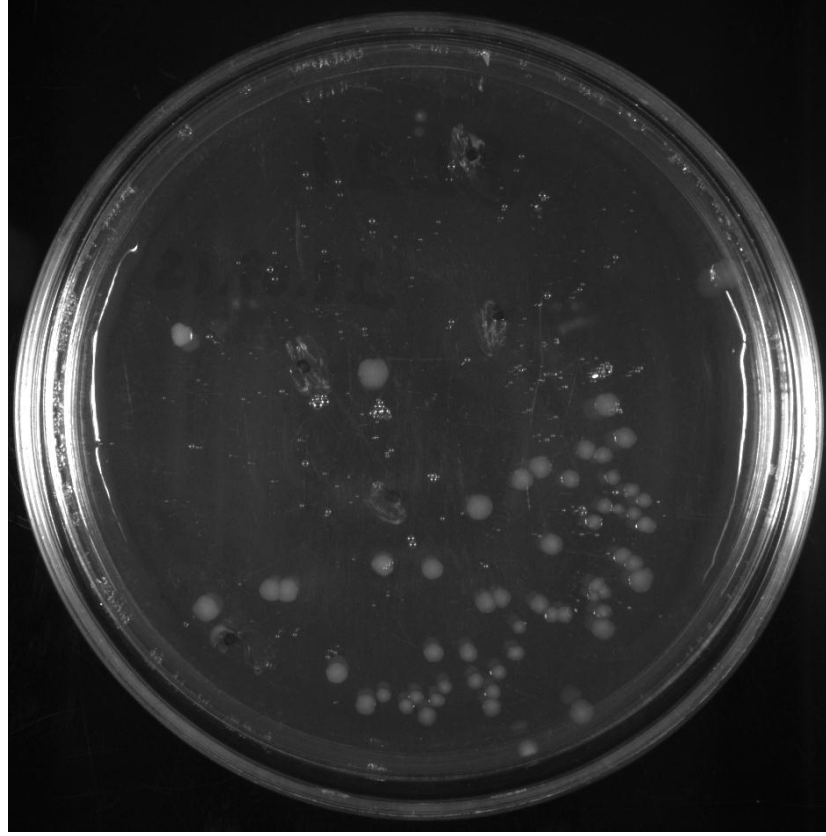
Şekil 4.8 Seçilen Dh5 α kolonilerinin plazmid DNA'sından PZR ile çoğaltılan *MisL* geni

Kuyu 1	1 kb DNA marker (10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bç, Fermentas)
Kuyu 2	LT2 suşunun genomik DNA'sından PZR ile çoğaltılan <i>MisL</i> geni (pozitif kontrol)
Kuyu 3	Dh5 α suşunun plazmid DNA'sından PZR ile çoğaltılan <i>MisL</i> geni (negatif kontrol)
Kuyu 4-5	Dh5 α^{Rc} suşlarının pNT01 plazmid DNA'sından PZR ile çoğaltılan <i>MisL</i> geni
Kuyu 6-7	Dh5 α^{Rc-} suşlarının pET28a plazmid DNA'sından PZR ile çoğaltılan <i>MisL</i> geni
Kuyu 8	PZR negatif kontrol (su)

MisL geni yolcu domainine sahip rekombinant plazmidi içeren transformantlar seçilerek çalışma ve stok kültürleri oluşturuldu.

4.6 Rekombinant Plazmidlerin *E. coli* BL21 Hücrelerine Elektroporasyonu

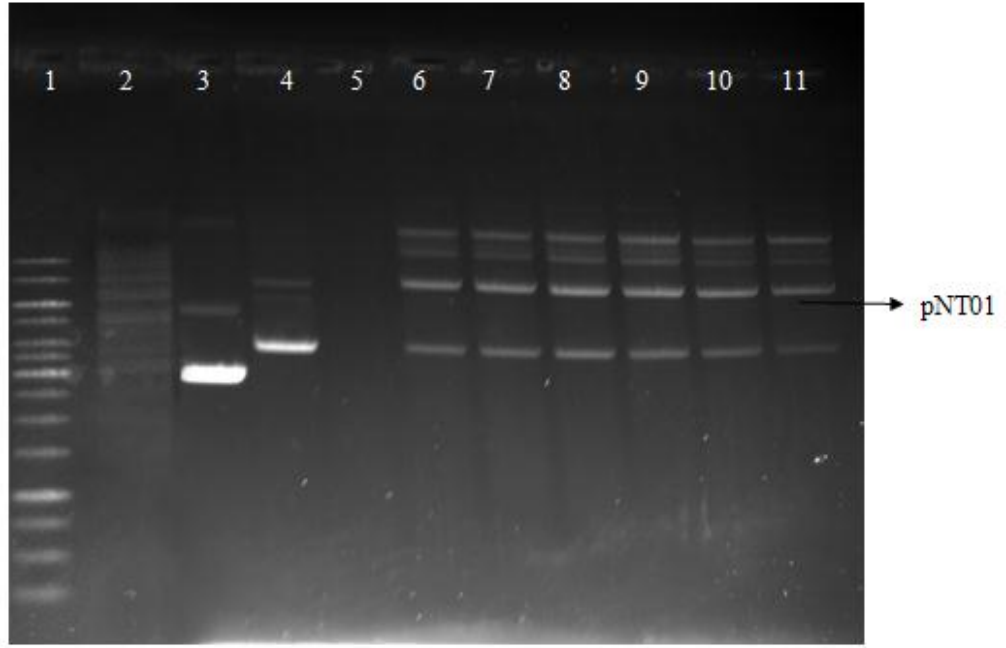
E. coli Dh5 α hücrelerinden elde edilen rekombinant plazmid (pNT01), ifade etkinliği yüksek alıcı olan *E. coli* BL21 kompetent hücrelerine aktarıldı. Plazmidi olmayan BL21 suşunun kan (50 μ g/mL) ortamda geliştiğinin belirlenmesi, elektroporasyon sonrası kanamisin direnç genini ihtiva eden vektör (pET28a) aktarımının gerçekleştiğini ve sonraki analizler için bu transformantlardan seçim yapılabileceğini kanıtlamıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 *Escherichia coli* BL21 suşuna pNT01 (*MisL* geninin aktarıldığı pET28a vektörü) plazmidinin transformasyonu sonucu oluşan transformantların antibiyotik içeren LB agar ortamlarında gelişimi

4.7 *E. coli* BL21 Suşundan Rekombinant Plazmid İzolasyonu Ve İnsert Genin Doğrulanması

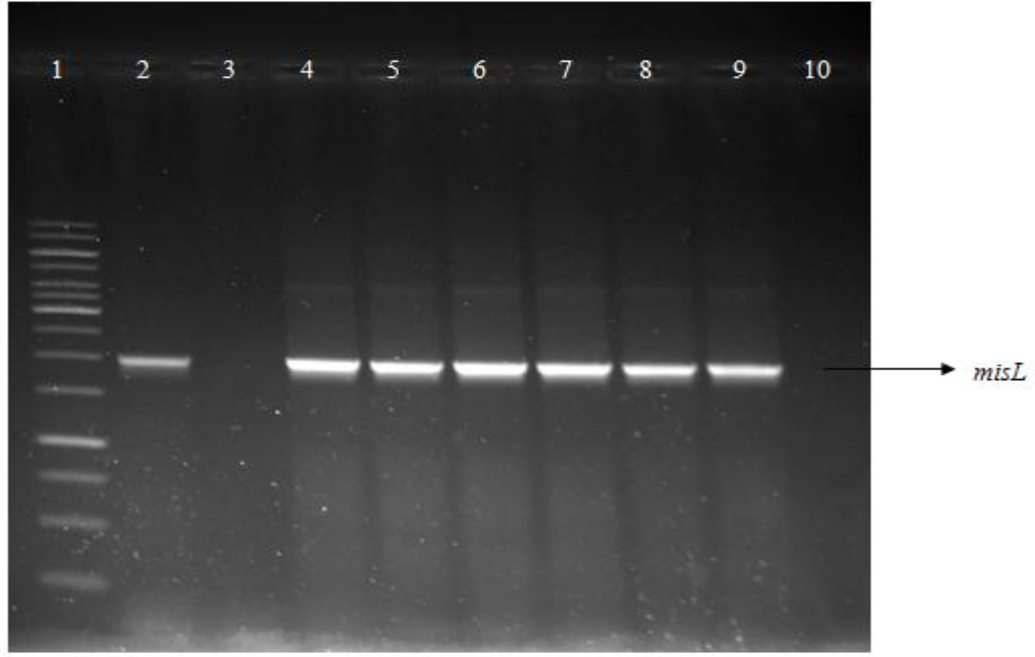
Hedef *MisL* genini taşıyan plazmidlerin varlığı, moleküler büyüklükleri esas alınarak tespit edildi. Elde edilen transformantlar arasından rastgele seçilen kolonilerden yapılan plazmid izolasyonu sonucunda, rekombinant plazmid (pNT01, 7400 bç) tanımlanırken, insert geni (*MisL*) içermeyen plazmid varlığı (pET28a, 5400 bç) tespit edilmedi. Kıyaslamanın kolay yapılması amacıyla Dh5 α kültürlerinden izole edilen pNT01 plazmidi de jele yüklendi. Ayrıca, *E. coli* BL21 suşundan da plazmid izolasyonu yapılarak, plazmid içermediği doğrulandı (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Seçilen BL21 kolonilerinin plazmid içeriği

Kuyu	1	1 kb DNA marker (10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bç, Fermentas)
Kuyu	2	Supercoiled marker (16210, 14174, 12138, 10102, 8066, 7045, 6030, 5012, 3990, 2972, 2067 bç, Sigma)
Kuyu	3	pET28a plazmid vektörü
Kuyu	4	pNT01 plazmid DNA'sı
Kuyu	5	BL21 suşunun plazmid DNA'sı
Kuyu	6-11	BL21 ^{Rc} suşlarının pNT01 plazmid DNA'sı

İzolasyon sonucu elde edilen pNT01 plazmidleri kullanılarak, insert genin varlığının kanıtlanması amacıyla PZR gerçekleştirildi ve *MisL* (2000 bç) gen bölgesinin varlığı agaroz jelde doğrulandı. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun çalıştığı pozitif kontrolü olarak LT2 genomik DNA'sı, negatif kontrol olarak ise su kullanıldı (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 Seçilen BL21 kolonilerinin plazmid DNA'sından PZR ile çoğaltılan *MisL* geni

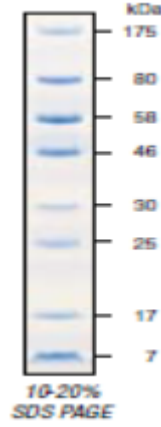
Kuyu	1	1 kb DNA marker (10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bp, Fermentas)
Kuyu	2	LT2 suşunun genomik DNA'sından PZR ile çoğaltılan <i>MisL</i> geni (pozitif kontrol)
Kuyu	3	BL21 suşunun plazmid DNA'sından PZR ile çoğaltılan <i>MisL</i> geni (negatif kontrol)
Kuyu	4-9	BL21 ^{Rc} suşlarının pNT01 plazmid DNA'sından PZR ile çoğaltılan <i>MisL</i> geni
Kuyu	10	PZR negatif kontrol (su)

Bu bulgular *E. coli* BL21 suşunda tanımlanan rekombinant plazmidin *MisL* yolcu domaini gen bölgesini içerdiğini kesin bir şekilde doğrulamıştır.

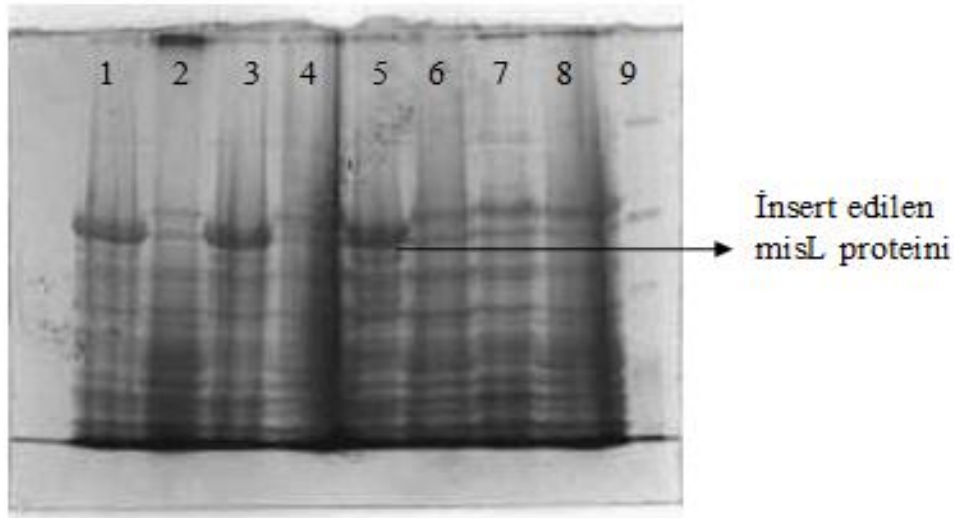
4.8 *E. coli* BL21 Suşunda Klonlanan *MisL* Gen Bölgesinin İfadesi

Elde edilen rekombinant BL21 hücrelerinde *MisL* proteini yolcu domaininin ifadesini gösterebilmek amacı ile SDS-PAGE analizi gerçekleştirildi. *MisL* ifade düzeyini artırmak için, indükleyici ajan olarak IPTG kullanıldı. IPTG ile indüklenen ve indüklenmeyen transformantlar arasındaki protein profilleri kıyaslandığında, 68 kDa büyüklüğünde tek bir bant pattern farklılığının söz konusu olduğu SDS-PAGE jelinde görüntüledi (Şekil 4.13). Bu bant büyüklüğü, vektör içine aktarılan *MisL* geninin yolcu domaini peptit büyüklüğüne eşittir. Kontrol olarak kullanılan BL21 suşunun

indüklenmiş ve indüklenmemiş halindeki protein profillerinde ise, herhangi bir farklılığın bulunmadığı saptanmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.12 Kullanılan protein standardının % 10-20'lik SDS-PAGE jel göç planı (New England BioLabs)



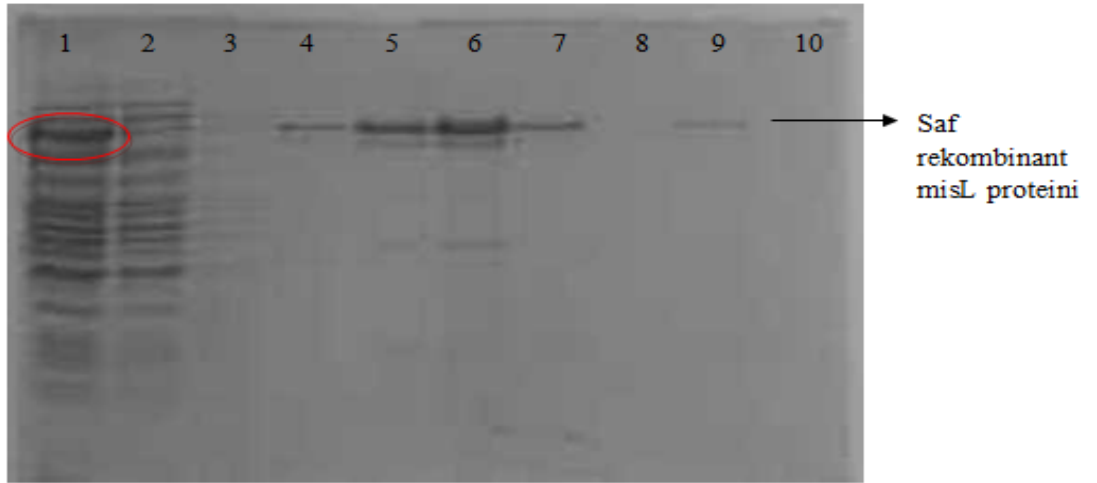
Şekil 4.13 İndüklenen ve indüklenmeyen suşların protein profillerinin SDS-PAGE jel görüntüsü

Kuyu 1-3-5	IPTG'li ortamda gelişen BL21 ^{Rc} suşlarının protein profili
Kuyu 2-4-6	IPTG'siz ortamda gelişen BL21 ^{Rc} suşlarının protein profili
Kuyu 7	IPTG'li ortamda gelişen BL21 suşunun protein profili
Kuyu 8	IPTG'siz ortamda gelişen BL21 suşunun protein profili
Kuyu 9	Prestained protein marker, 7-175 kDa (175, 80, 58, 46, 30, 25, 17, 7 kDa)

Bu veriler klonlanan *MisL* geni yolcu domaininin heterolog konakçıda (*E. coli* BL21 suşu) ifade edildiğinin kesin kanıtıdır. Çalışmamız bu açıdan bir ilk olma özelliği taşımaktadır. Yaptığımız literatür taraması çalışmalarında *MisL* geninin belirli bir domaininin homolog ya da heterolog konakçılara klonlandığı ve ifade edildiğine dair bir veriye rastlanmamıştır. Monomerik ototransporter proteinlerin üyesi olan *MisL* proteini *Bordetella pertusis*'den izole edilen pertaktin ve *E. coli*'den izole edilen IgA proteaz ile birlikte AIDA-I ailesi üyesi olarak tanımlanmaktadır (Provence ve Curtiss 1994). Bu ototransporter ailesi üyeleri Tip Va klasik ototransport sistemi ile salgılanmaktadır. Monomerik ototransporterlar bir N-terminal sinyal peptit içeren tek bir protein olarak üretilmekte ve periplazmaya Sec makinesi aracılığı ile salgılanmaktadır. Tüm ototransporter proteinler hücre yüzeyine ulaşmaya gereksinim duyarlar. Söz konusu proteinlerin translokasyonu ve salgılanması henüz tam anlamı ile açıklanamamıştır. Bu anlamda ilk sorun bu proteinlerin ototransportu esnasında pordan öncelikle N domainin mi (yolcu domaini) yoksa C domaininin mi (translokator domain) geçtiğidir. Her iki öngörüye destekler nitelikte araştırma bulguları bulunmasına rağmen, bu konuda günümüze kadar kesin kanıtlar elde edilememiştir (Sijbrandi vd. 2003, Szabady vd. 2005, Kostakioti ve Stathopoulos 2006, Yen vd. 2008, Ieva ve Bernstein 2009, Jong vd. 2010b). Ototransporterların salgılanması ile ilgili henüz açıklığa kavuşmamış bir diğer konu ise; periplazmadan katlanarak dış membrana ulaşan ototransporterların hücre dışına salgılanmasında bir proteolitik kesimin olup olmadığıdır. Zira bazı çalışmalarda bu görevi üstlenen proteazların varlığı belirlenmiş iken, bazılarında ise söz konusu proteinlerin hücreye bağlı olarak hücre dışında görev yaptıkları ileri sürülmektedir (Junker vd. 2006, Grosskinsky vd. 2007, Ruiz-Perez vd. 2009, Sauri vd. 2009, Ruiz-Perez vd. 2010). Diğer yandan konak hücrelerde immün yanıtın oluşturulmasında etkin *MisL* domaininin tanımlanması için, yolcu domaini içeren klonların hazırlanması zorunludur. Tüm bu temel sorunların açıklanması söz konusu ototransporter proteinlerin, buldukları bakterilerdeki fonksiyonlarının detaylı bir şekilde tanımlanmasını beraberinde getirecektir. Çalışmamızda elde edilen *MisL* geni yolcu domaini klonlanmış mutantlar bu anlamda bir ilktir ve ileri araştırmaların temel biyolojik materyalini teşkil etme özelliği taşımaktadır.

4.9 Rekombinant MisL Proteininin Saflaştırılması

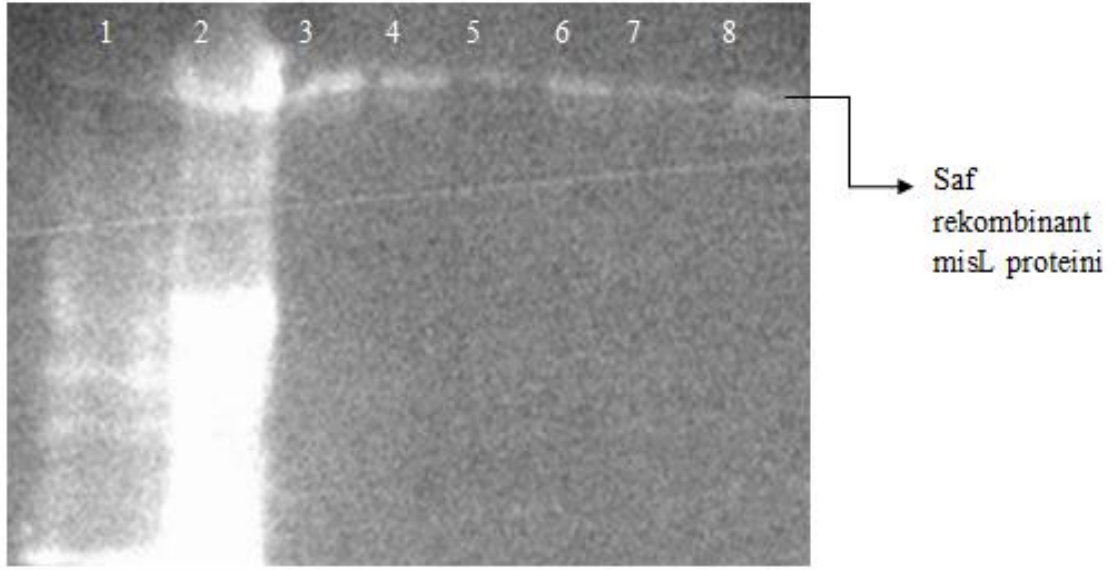
Doğruluğu kanıtlanan MisL proteininin yolcu domaininin rekombinant suşlardan saflaştırılma aşaması; His Pur Ni-NTA spin kolonu yardımıyla yapılmasının ardından, SDS-PAGE jelinde kontrol edildi. İndüklenmiş lizatın içerdiği, saflaştırma işlemine tabi tutulacak 68 kDa büyüklüğündeki MisL proteini (1. kuyu), 2. kuyunun içerdiği alt-sıvı örneğinde görülmedi. Bu durum çalışmaya devam edilen üst sıvı kısımda istediğimiz protein varlığını kanıtladı. Yıkama solüsyonunun kolondan geçirilmesi ile elde edilen örnekte (3. kuyu) protein varlığı saptanmadı. Bu bulgu söz konusu proteinin kolonda var olduğunu kanıtladı. 4., 5. ve 6. kuyulardaki elüsyon tamponu sonrası elde edilen örneklerde protein saf bir şekilde elde edilememiştir. Buna karşın D-salt kolon kullanımı sonrası elde edilen elüsyon örneklerinde saf MisL protein varlığı saptandı (7. ve 9. kuyu). Kolondan PBS'in geçirilmesi sonrası elde edilen örnekte (10. kuyu) ise, hiçbir protein varlığı belirlenmedi. Bu veri kolondaki proteinin tümünü elde ettiğimizi göstermektedir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 Purifikasyon esnasında aşamalı olarak elde edilen örneklerin SDS-PAGE görüntüsü

Kuyu	1	İndüklenmiş lizat
Kuyu	2	Santrifüj sonrası elde edilen alt kısım
Kuyu	3	Yıkama solüsyonu ile muamele edilmiş örnek
Kuyu	4	1. elüsyon örneği
Kuyu	5	2. elüsyon örneği
Kuyu	6	3. elüsyon örneği
Kuyu	7	D-salt kolon kullanımı sonrası elde edilen 1. elüsyon
Kuyu	8	D-salt kolon kullanımı sonrası elde edilen 2. elüsyon
Kuyu	9	D-salt kolon kullanımı sonrası elde edilen 3. elüsyon
Kuyu	10	PBS'de kalan örnek

Rekombinant MisL proteini saflaştırılmasının gerçekleştiğinin SDS-PAGE ile kanıtlanmasının ardından, Western Blotlama tekniği uygulandı. İndüklenmiş lizatın içerdiği protein profilindeki MisL protein ifadesinin (2. kuyu), indüklenmemiş lizatın içerdiği MisL proteinin ifadesine (1. kuyu) göre güçlü olduğu saptandı. İndüklenmiş lizattan aşamalı olarak saflaştırılan rekombinant MisL protein örneklerinin (3-8. kuyu) ise, anti-his primer antikoru ile reaksiyon verdiği tespit edildi (şekil 4.15). Bu durum, MisL yolcu domaininin heterolog konakçıda ifade edildiğinin bir diğer kanıtıdır. Tüm bu doğrulama testleri MisL proteininin yolcu domaininin heterolog bir konakçıda ifade edildiğini kesin bir şekilde ortaya koymaktadır. Daha öncede ifade edildiği gibi; hem *MisL* geninin yolcu domaininin klonlanması ve hem de klonlanan bu bölgenin heterolog bir konakçıda ifadesi bu çalışma ile ilk kez gerçekleştirilmiştir. Bu sayede ototransporter proteinlerin salgılama sistemlerinin, fonksiyonlarının ve fonksiyonel birimlerinin tanımlanması çalışmaları önemli bir ivme kazanacaktır. Zira bu sistemler sayesinde ototransporterların ana domainlerinin ayrı ayrı klonlanması, homolog ve heterolog konakçılarda ifadesi ve ayrı ayrı fonksiyonlarının incelenmesi mümkün olabilecektir. Çalışmamızda elde edilen bu biyomateryaller, özetle protein salgı sistemleri ve sekretomların çözümüne yönelik çalışmaların hareket noktasını teşkil edecek öneme haizdir.



Şekil 4.15 Saf protein eldesinin western blot görüntüsü

Kuyu	1	İndüklenmemiş lizat
Kuyu	2	İndüklenmiş lizat
Kuyu	3	1. elüsyon örneği
Kuyu	4	2. elüsyon örneği
Kuyu	5	3. elüsyon örneği
Kuyu	6	D-salt kolon kullanımı sonrası elde edilen 1. elüsyon
Kuyu	7	D-salt kolon kullanımı sonrası elde edilen 2. elüsyon
Kuyu	8	D-salt kolon kullanımı sonrası elde edilen 3. elüsyon

4.10 Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

MisL proteininin bakteriyel patojenitedeki rolünün belirlenebilmesi amacıyla; immünizasyon çalışmalarında farelere inoküle edilecek antijen miktarını belirleyebilmek için, BCA Protein Assay kitinden yararlanıldı. İki paralelli yürütülen çalışmada R^2 değeri 0.98 olarak belirlenmiştir. Elde edilen grafik kullanılarak 1. elüsyon örneğinin konsantrasyonu 345 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak tespit edilmiştir. Bu oran immünizasyon basamağı için yeterli bir orandır. Bu çalışmalar ayrıca; gerektiği takdirde poliantikor üretim çalışmaları için, 2. (275 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ve 3. (153 $\mu\text{g}/\text{mL}$) elüsyon örneklerinin de kullanılabilceğini kanıtlamıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Saflaştırma sonrası elde edilen örneklerin protein konsantrasyonları

<u>Örnekler</u>	<u>Konsantrasyon</u>
İndüklenmiş lizat	2050 µg/mL
Santrifüj sonrası elde edilen alt kısım	2048 µg/mL
Yıkama solüsyonu ile muamele edilmiş örnek	856 µg/mL
1. elüsyon örneği	439 µg/mL
2. elüsyon örneği	206 µg/mL
3. elüsyon örneği	133 µg/mL
D-salt kolon kullanımı sonrası elde edilen 1. elüsyon	345 µg/mL
D-salt kolon kullanımı sonrası elde edilen 2. elüsyon	275 µg/mL
D-salt kolon kullanımı sonrası elde edilen 3. elüsyon	153 µg/mL

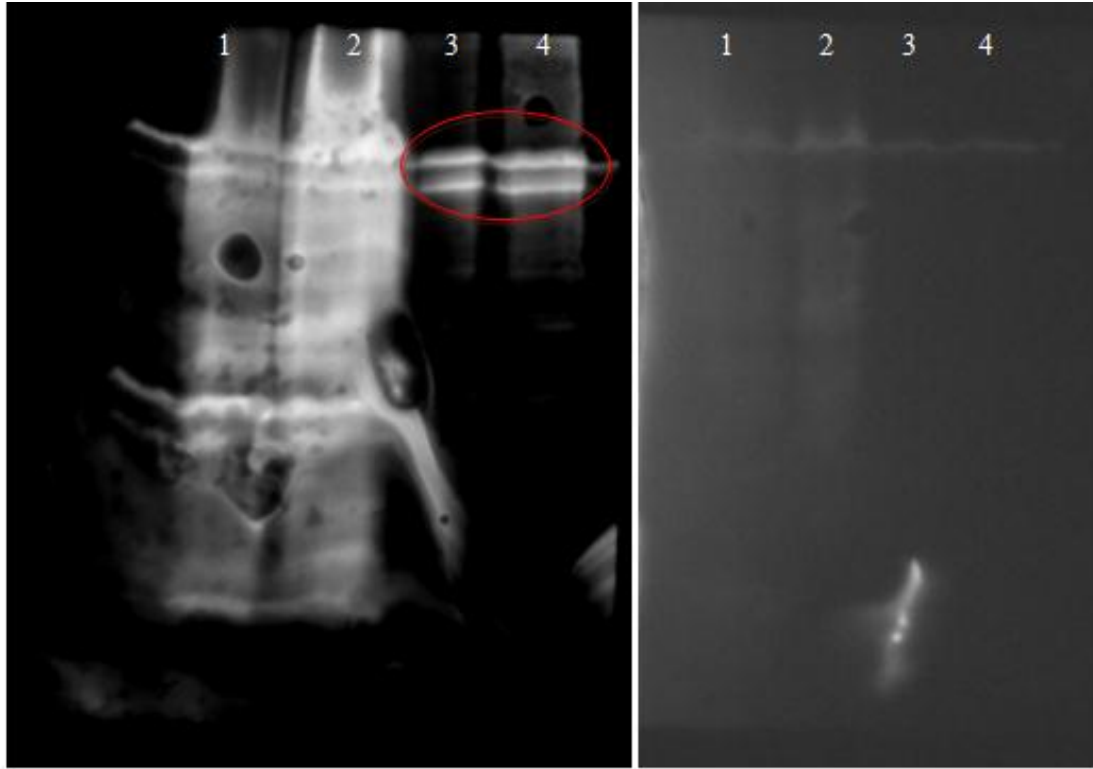
4.11 Poliklonal Antikor Eldesi, Kontrolü Ve Saflaştırılması

Yaklaşık 110 günlük immünizasyon protokolünü takiben intraperitoneal enjeksiyon çalışmaları sonrası, Balb/c farelerde poliklonal antikor üretimi sağlandı. Farelerin antikor yanıtının Western Blotlama tekniği ile kontrol edilmesinin ardından, poliklonal antikor saflaştırma basamağı kaprilik asit kullanılarak gerçekleştirildi. Saflaştırma sonrası, antikor etkinliği Western Blot tekniği ile tekrar teyit edildi.

İki paralel olarak yüklenen örnekler, SDS-PAGE sonrası membrana aktarıldıktan sonra membran ikiye kesildi. Bir membran için primer antikor olarak fareden elde edilen serum (1:2000) kullanılırken, diğer membran için anti-his primer antikor (1:2000) kullanıldı. Sekonder antikorlama (anti-mouse IgG, 1:5000) sürecinden sonra, iki membranın görüntüleri alındı (Şekil 4.16).

Western blot görüntüsü, saf rekombinant MisL protein immünojeni ile Balb/c'de üretilen poliklonal antikorun reaksiyonel bir ilişkisinin bulunduğu kanıtıdır. Ticari

olarak kullanılan antikor göz önünde bulundurulduğunda, fareden elde edilen antikorun daha güçlü bir reaksiyon verdiği aşıkardır. Fareden toplanan serumda antijen-spesifik antikorların varlığı bu bulgularla kesinlik kazanmıştır. Elde edilen kesin sonuçlar, bu aşamadan sonra, MisL antijeninin immün sistemdeki rolünün anlaşılmasına yönelik tekrarlanabilir bulgular sunacak çalışmalara geçilebileceğini göstermiştir.



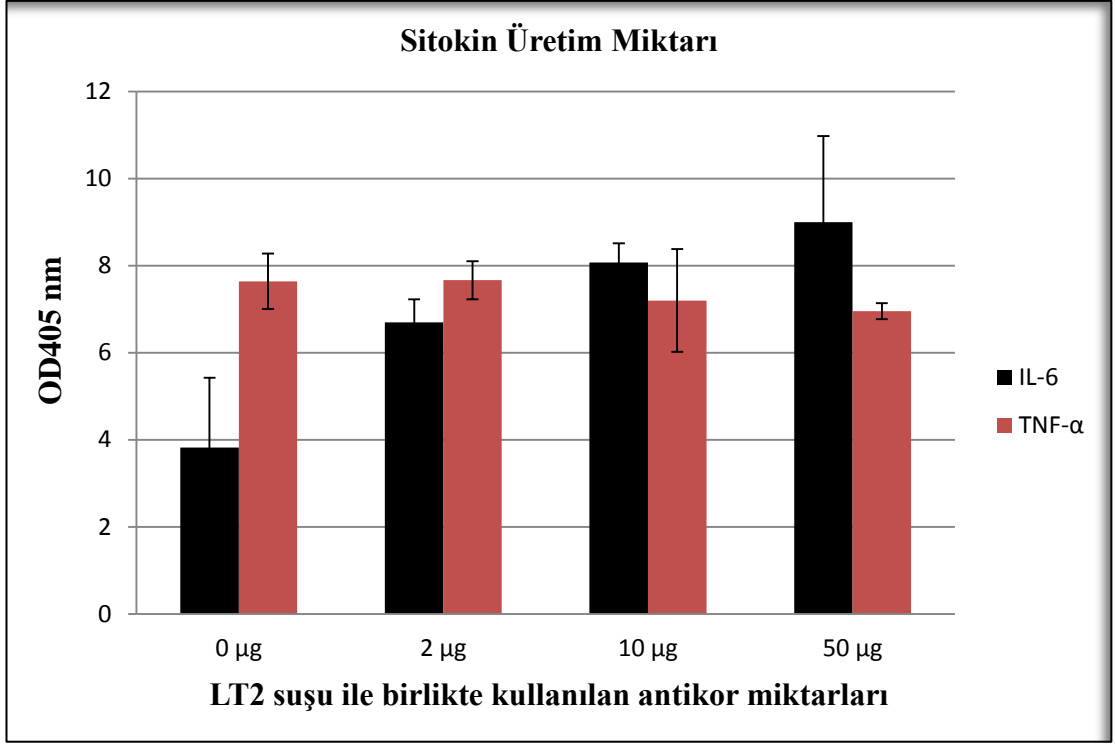
Şekil 4.16 Balb/c'den elde edilen poliklonal antikor kontrolünün ve ticari antikorla (anti-his) karşılaştırılmasının western blot görüntüleri

Kuyu	1	İndüklenmemiş lizat
Kuyu	2	IPTG ile İndüklenmiş lizat
Kuyu	3	Saf rekombinant MisL proteini
Kuyu	4	Saf rekombinant MisL proteini

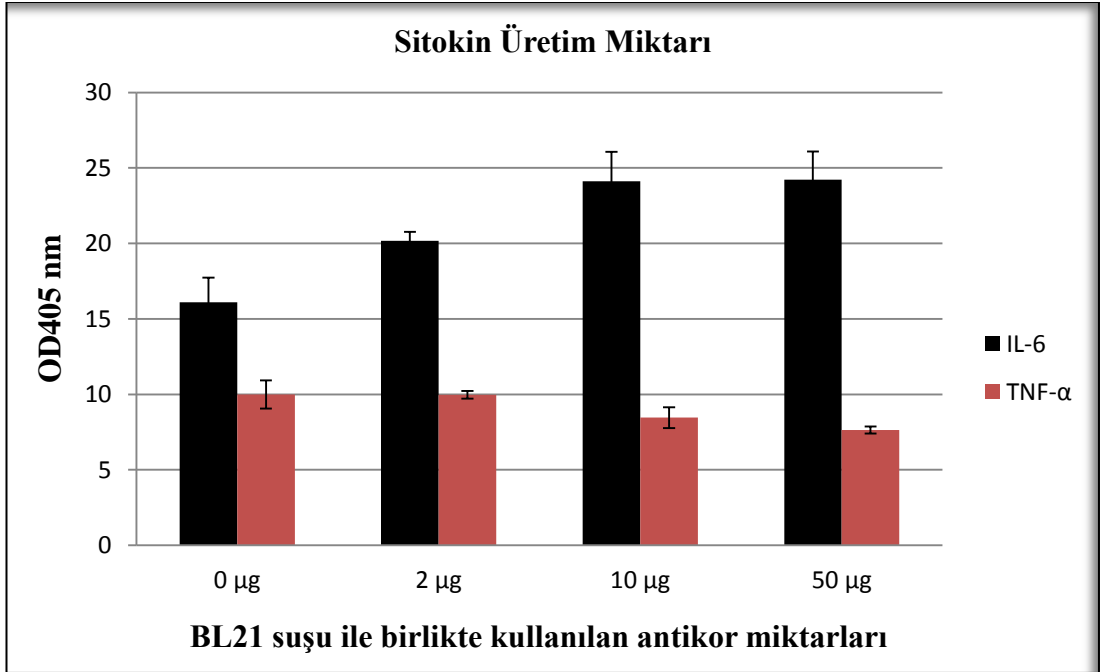
4.12 Makrofaj Hücrelerinin Simülasyonu Ve Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi

Elde ettiğimiz rekombinant MisL antijeni; makrofaj hücre hattı simülasyon denemelerinde kullanıldı. Antijeni blokajlama işleminde Balb/c farelerden üretilen ve saflaştırılan poliantikordan yararlanıldı. Blokajlı ve blokajsız olarak simülasyon farkını görebilmek için, IL-6 ve TNF- α sitokin ELISA yapıldı.

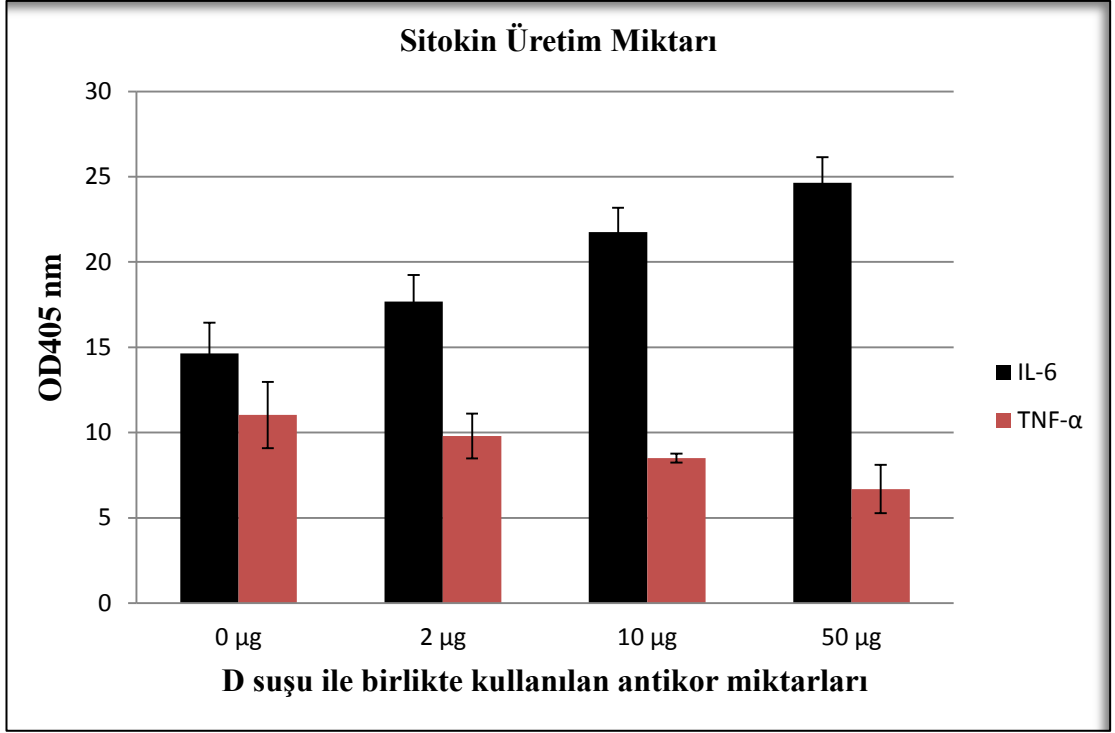
Sitokin ELISA deneyinde negatif kontrol olarak kullanılan besiyeri ve PBS'den elde edilen immün yanıt ile poliklonal antikorun (pAb) oluşturduğu immün yanıt aynı seviyede, sıfıra yakın durumdadır. Pozitif kontrol olarak kullanılan Lipopolisakkaritin (LPS) oluşturduğu immün yanıtındaki sitokin seviyesi, negatif kontrollerin ve pAb'ın oluşturduğu yanıtla kıyasla yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). MisL antijeninin hem TNF- α ve hem de IL-6 üretimini LPS'den daha yüksek düzeyde teşvik ettiği saptanmıştır. PAb, MisL antijeni ile birlikte kullanıldığında, antijenin etkinliğini azalttığı görülmektedir. Söz konusu antikorun blokajlama yapabildiği bu durum istatistiksel olarak da anlamlılık ifade etmektedir ($p<0.05$). Ayrıca, antikorun konsantrasyonu arttığında, doğru orantılı olarak antijenle birlikte verdiği sitokin yanıtı da giderek artmakta, dolayısıyla sinerjik bir etki göstermektedir. Diğer yandan özellikle TNF- α sitokin sonuçları göz önünde bulundurulduğunda, az miktarda da olsa suşların çoğunda antikorun blokaj etkinliğinin olduğu, yani sitokin yanıtını beklendiği gibi azalttığı görülmektedir (Şekil 4.17-4.25). Buna karşın, tüm suşlarda bu etkinlik görülemediğinden ve IL-6 için, bu doğrultuda sonuçlar elde edilemediğinden antikorun tam olarak nötralizan etkisinin olduğunu söyleyebilmek zordur. Öncelikle bu çalışmada elde ettiğimiz antikor poliklonal bir antikordur ve bu nedenle antijenik spesifitesi bilinmemektedir. Diğer yandan MisL yolcu domaini klonlanan *E. coli* BL21 ve doğal MisL üreticisi *S. Typhimurium* LT2 suşlarında blokajlı ve blokajsız deneme sonuçlarının suşlar arasında benzerlik göstermesi MisL ototransporter proteininin bugüne kadar öngörüldüğü gibi üretildikten sonra hücre yüzeyine bağlı olarak değil (Dorsey vd. 2005, Tükel vd. 2007, Akçelik ve Akçelik 2011), yüzeyden kesildikten sonra tutunma ve konakçı hücrelere patojeni yönlendirdiğinin kanıtıdır. Zira doğal MisL üretici suşta bile nötralizan etki ancak kısmi olarak görülebilmektedir. Bu durum büyük olasılıkla yüzeyden henüz salgılanmamış olan bir miktar MisL'in varlığından kaynaklanmaktadır.



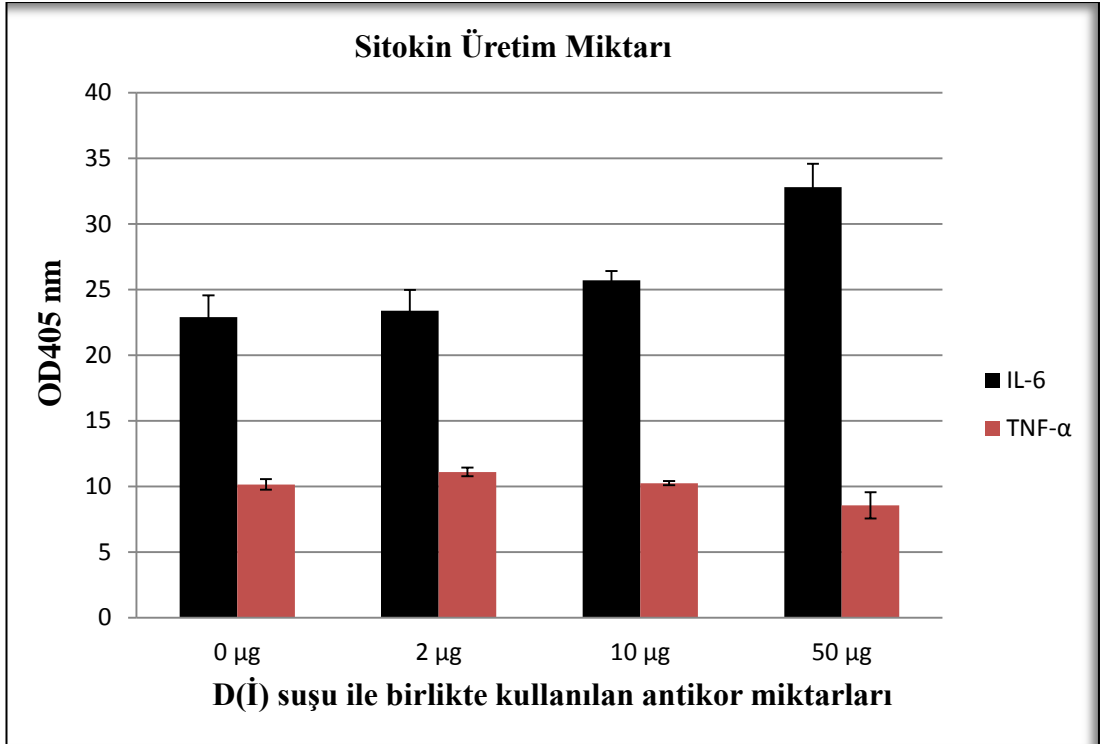
Şekil 4.17 Blokajsız ve blokajlı olarak LT2 suşu ile teşvik edilen IL-6 ve TNF-α sitokin miktarı



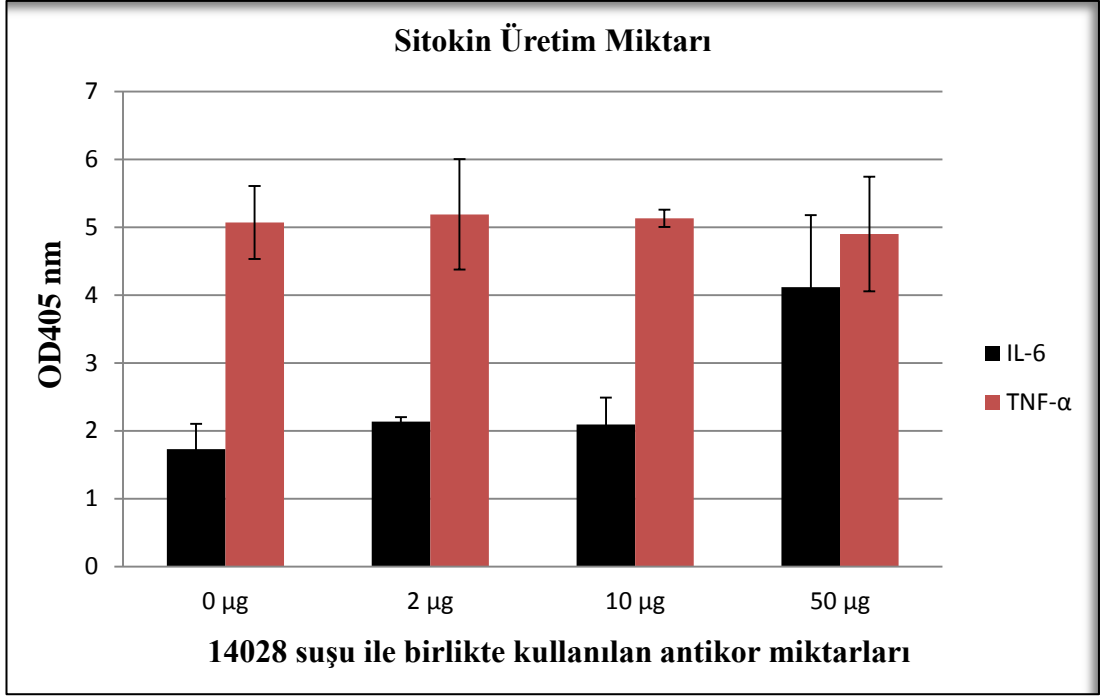
Şekil 4.18 Blokajsız ve blokajlı olarak BL21 suşu ile teşvik edilen IL-6 ve TNF-α sitokin miktarı



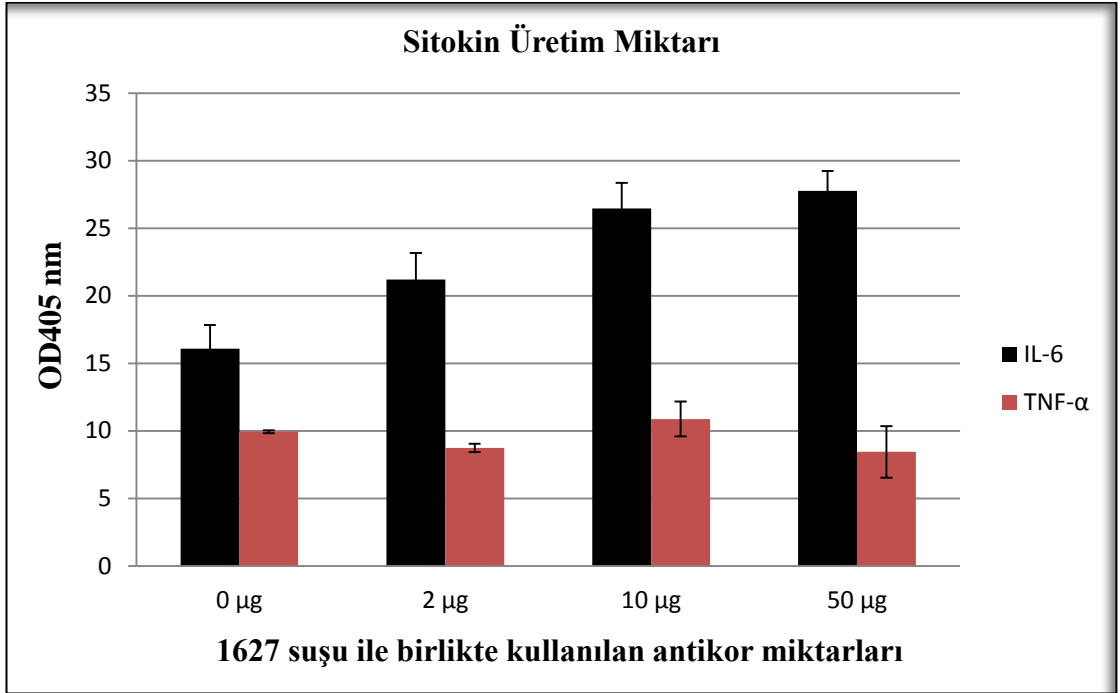
Şekil 4.19 Blokajsız ve blokajlı olarak D suşu ile teşvik edilen IL-6 ve TNF-α sitokin miktarı



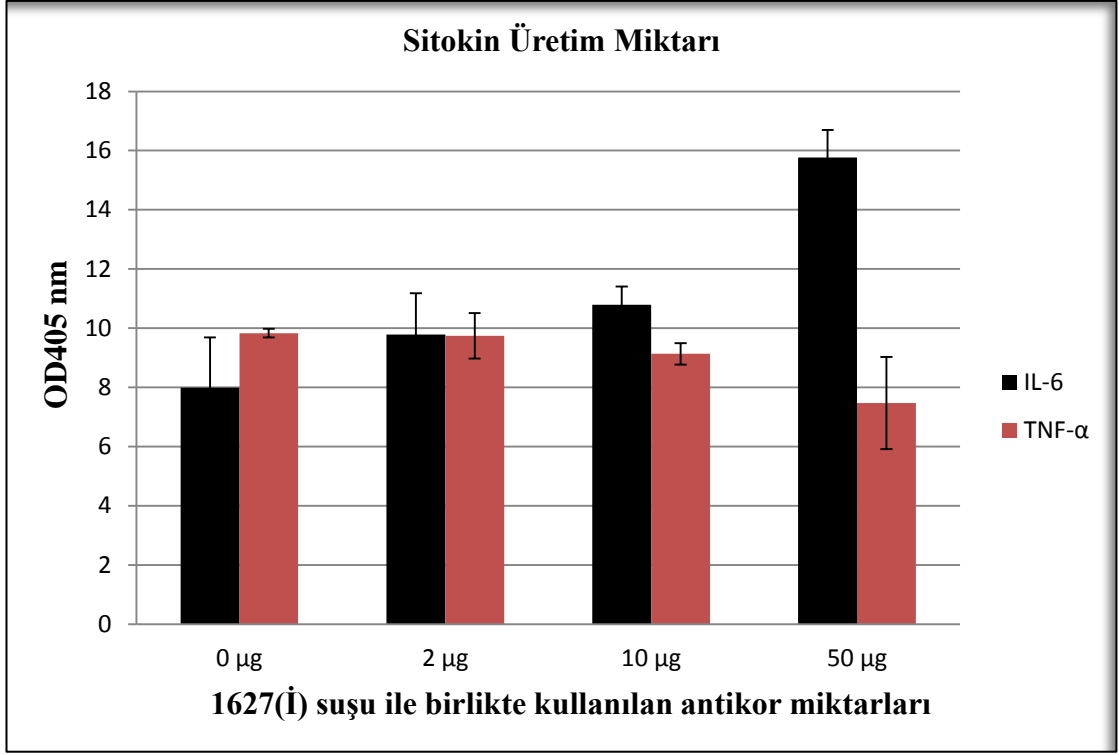
Şekil 4.20 Blokajsız ve blokajlı olarak D(I) suşu ile teşvik edilen IL-6 ve TNF-α sitokin miktarı



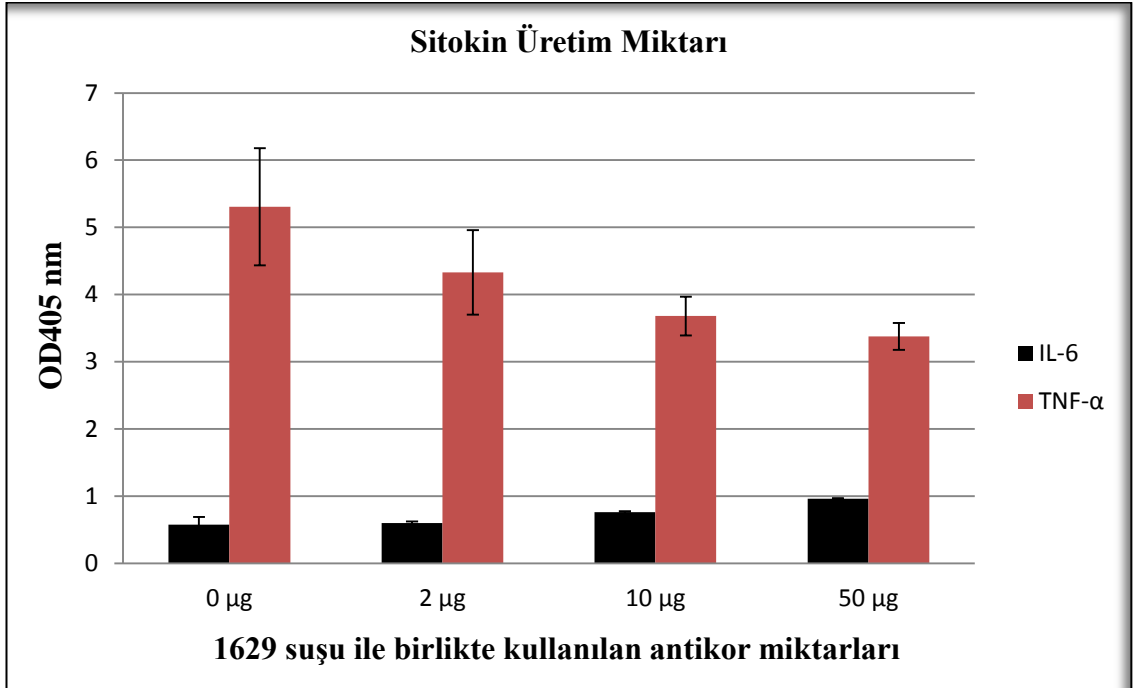
Şekil 4.21 Blokajsız ve blokajlı olarak 14028 suşu ile teşvik edilen IL-6 ve TNF-α sitokin miktarı



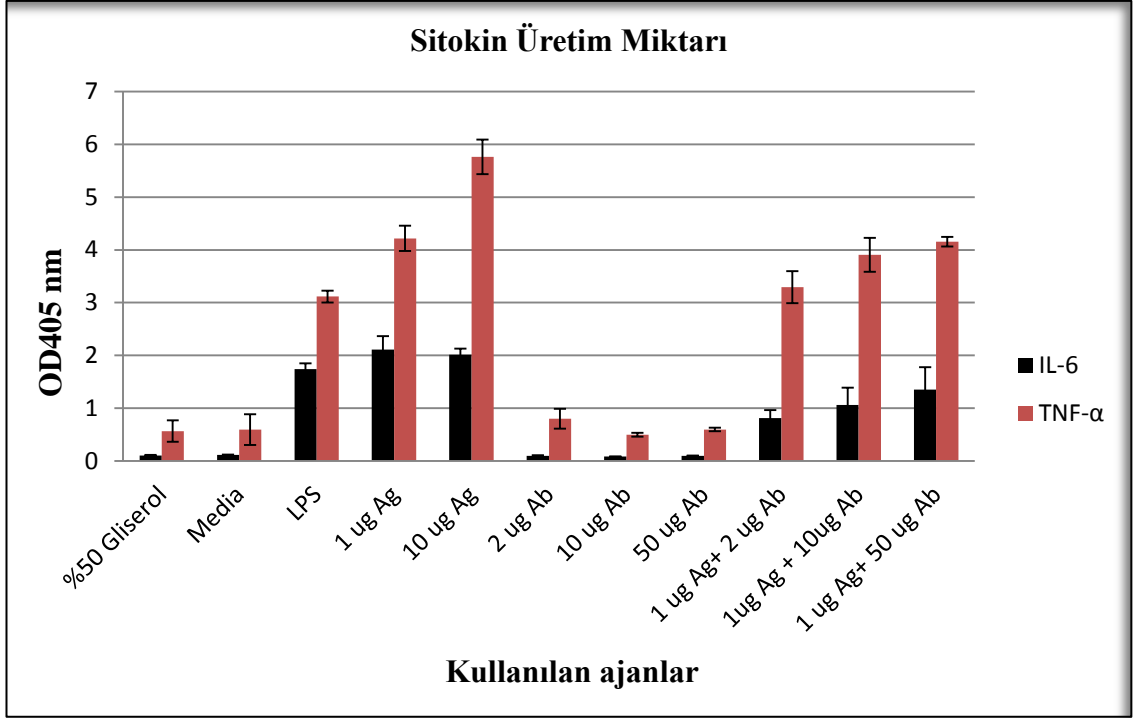
Şekil 4.22 Blokajsız ve blokajlı olarak 1627 suşu ile teşvik edilen IL-6 ve TNF-α sitokin miktarı



Şekil 4.23 Blokajsız ve blokajlı olarak 1627(İ) suşu ile teşvik edilen IL-6 ve TNF-α sitokin miktarı



Şekil 4.24 Blokajsız ve blokajlı olarak 1629 suşu ile teşvik edilen IL-6 ve TNF-α sitokin miktarı



Şekil 4.25 Değişik ajanlarla teşvik edilen IL-6 ve TNF- α sitokin üretim miktarları

Bu sonuçlar öncelikle MisL proteini yolcu domaininin konakçı hücrelerde immün yanıtları oluşturmada ana rolü üstlendiğinin kesin kanıtlarıdır. Bu bulgular ayrıca MisL proteininin patojen ilişkili bir moleküler eleman (PAMP) olduğunun ilk moleküler kanıtlarını teşkil etmektedir. TNF- α özellikle Gram negatif bakterilerde yer alan ve patojenitede önemli bir role sahip olduğu bilinen lipopolisakkarit yapılarına (LPS) karşı yanıt geliştirilmesi esnasında makrofajlar tarafından üretilmektedir. TNF- α 'nın akut inflamasyonda önemli bir araç olduğu değişik araştırmacılar tarafından yürütülen çalışmalarda belirlenmiştir. Bu faktör etkinliğini; endotel hücrelerini uyarmak suretiyle adezyon moleküllerinin üretimini sağlayarak ve ayrıca kemokinlerin üretimini uyararak enfeksiyon bölgelerinde makrofaj ve nötrofillerin tutunmasına yardımcı olarak göstermektedir. Diğer yandan TNF- α 'nın akut faz proteinlerinin üretimini stimüle ettiği de bilinmektedir (Benz ve Schmidt 2011, van Ulsen vd. 2014, Hunter ve Jones 2015). Öte yandan interlökin 6 (IL-6) da konak hücrelerde erken immün yanıtın önemli bir elemanıdır. IL-6 ve TNF- α , patojen ilişkili moleküler elemanlar tarafından uyarılmakta ve makrofajlar tarafından salgılanmaktadır. IL-6 ayrıca homeostatik süreçlerde, hormon-benzeri karakteristikler göstermektedir (Zhang ve An 2007, Hunter ve Jones 2015). IL-6 yalnız enflamasyon ve enfeksiyon süreçlerine değil, aynı zamanda

metabolik, rejeneratif ve nötral süreçlere de regülatör olarak katılan bir sitokindir (Scheller vd. 2011). Erken immün yanıtta önemli rol alan bu iki moleküler elemanın üretiminin MisL proteini yolcu domaini tarafından stimüle edildiğinin heterolog bir konakçıda tanımlanmış olması, MisL proteininin konakçı reseptörleri tarafından tanınan ve immün yanıtları uyaran patojen ilişkili bir moleküler eleman olduğunun kesin delilleridir. Özetle bu bulgu ile sadece MisL proteininin bir PAMP olduğu kanıtlanmamış, ayrıca söz konusu fonksiyonu üstlenen domainin, yolcu domaini olduğu da saptanmıştır.

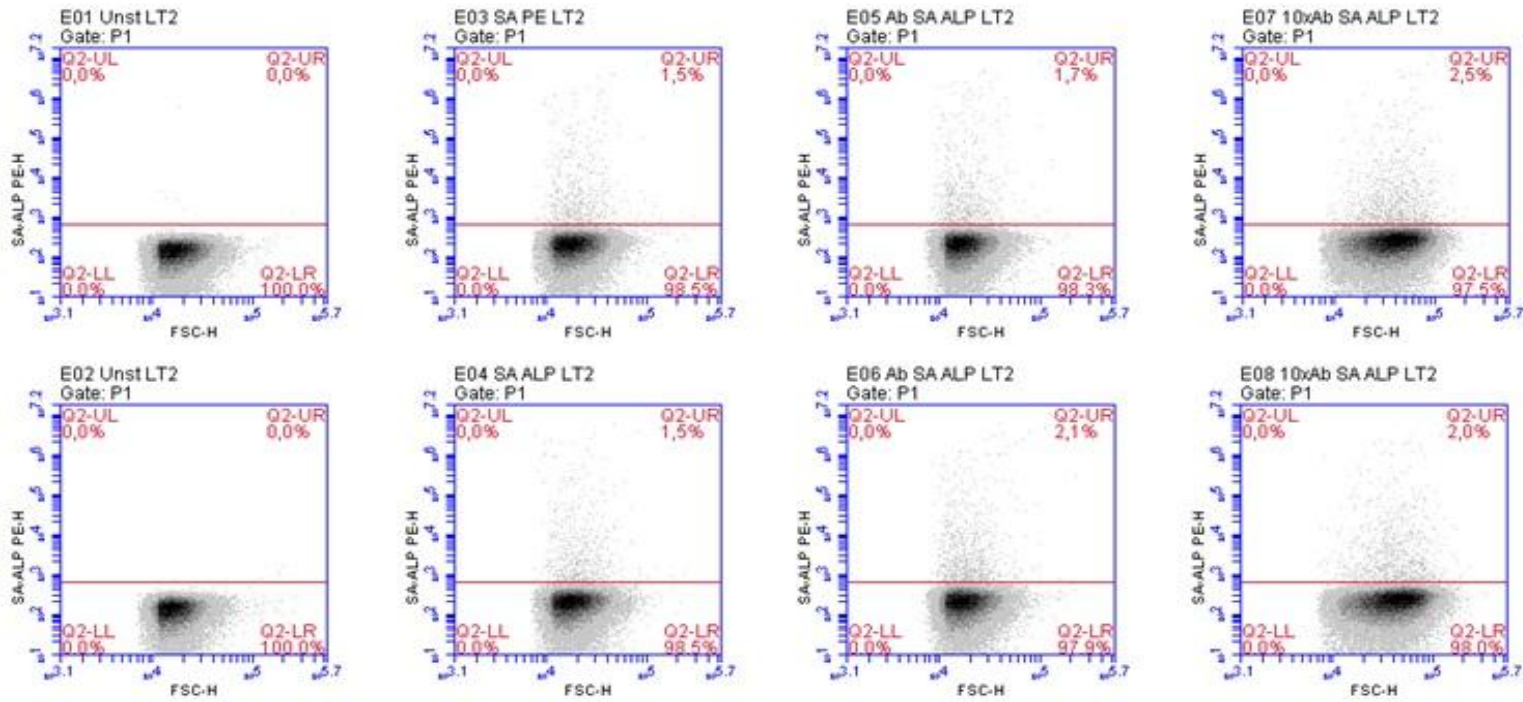
Bu çalışmada TNF- α için elde edilen ve yukarıda yorumlanan nötralizasyon sonuçlarının, IL-6 için elde edilememiş olmasının bir diğer nedeni ise TNF- α 'nın konsantrasyonuna bağlı olarak IL-6 üretiminin indüklenmesi olabilir. TNF- α 'nın IL-6 üretimi için bu denemelerde kritik konsantrasyona ulaşmamasının bu sonucu doğurması olasıdır.

4.13 Floresans Mikroskop Denemeleri

Floresans mikroskop aşaması için, biyotinlenmiş antikorun streptavidinle işaretlenmiş bakteri hücresine bağlanıp bağlanmadığının akım sitometri analizi ile kontrol edilmesi gerekmektedir. Faks tüplerinde streptavidin ile muamele edilmeyen, sadece streptavidinle muamele edilen, biyotinlenmiş antikorla muamele edilen streptavidinli hücreler ve biyotinlenmiş antikorla muamele edilen streptavidinli 10X hücreler kullanılarak ölçüm yapıldı. Biyotinle işaretli antikorun streptavidinli LT2, 14028, D ve D(İ) hücrelerine bağlanıp, reaksiyon vermediği (Şekil 4.26-4.29) belirlendiğinden ayrıca floresans mikroskop denemeleri gerçekleştirilmemiştir. Biyotinlenmiş antikorun streptavidinle işaretlenmiş bakteri hücrelerine (doğal MisL üreticisi ve *MisL* geni yolcu domaini klonlanmış rekombinant suş) bağlanmaması, makrofaj denemelerinden aldığımız sonuçları kanıtlar niteliktedir. Zira bu suşlarda üretilen tam ve kısmi MisL proteinleri yüzey salgı proteini niteliği taşıyorsa idi; antikor-antijen ilişkisinin kullanılan hassas belirleme yöntemi ile tanımlanmış olması gerekirdi. Böyle bir durumun gerçekleşmemesi MisL'in olgunlaştırıldıktan sonra hücre ile ilişkisinin kesildiğinin ve ortama salgılandığının kanıtıdır. Muhtemelen salgılanan MisL konakçı

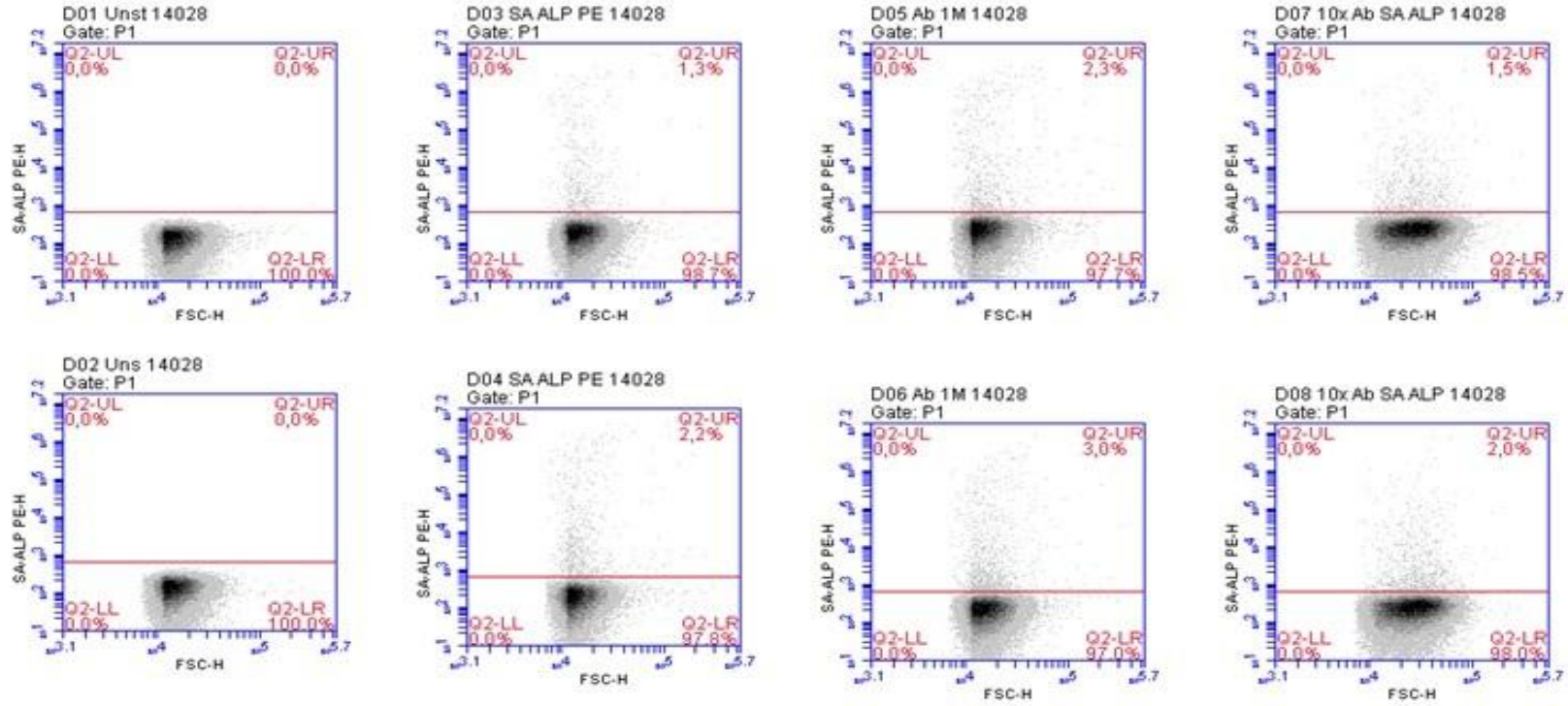
hücreler ile ilişkilenmekte ve patojenin bu hücrelere tutunma hedeflerini oluşturmaktadır.

LT2



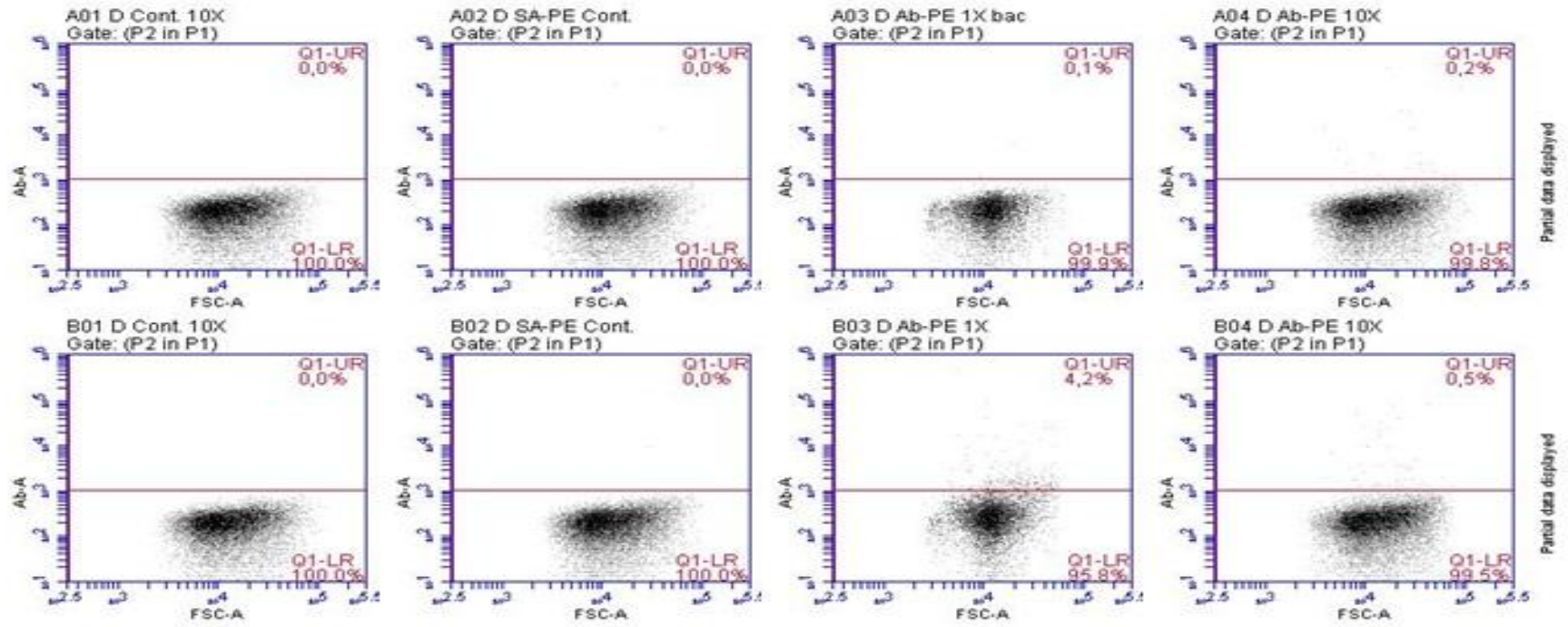
Şekil 4.26 Akım sitometrisinde işaretli antikorun LT2 süşuna bağlanma sonucu

14028



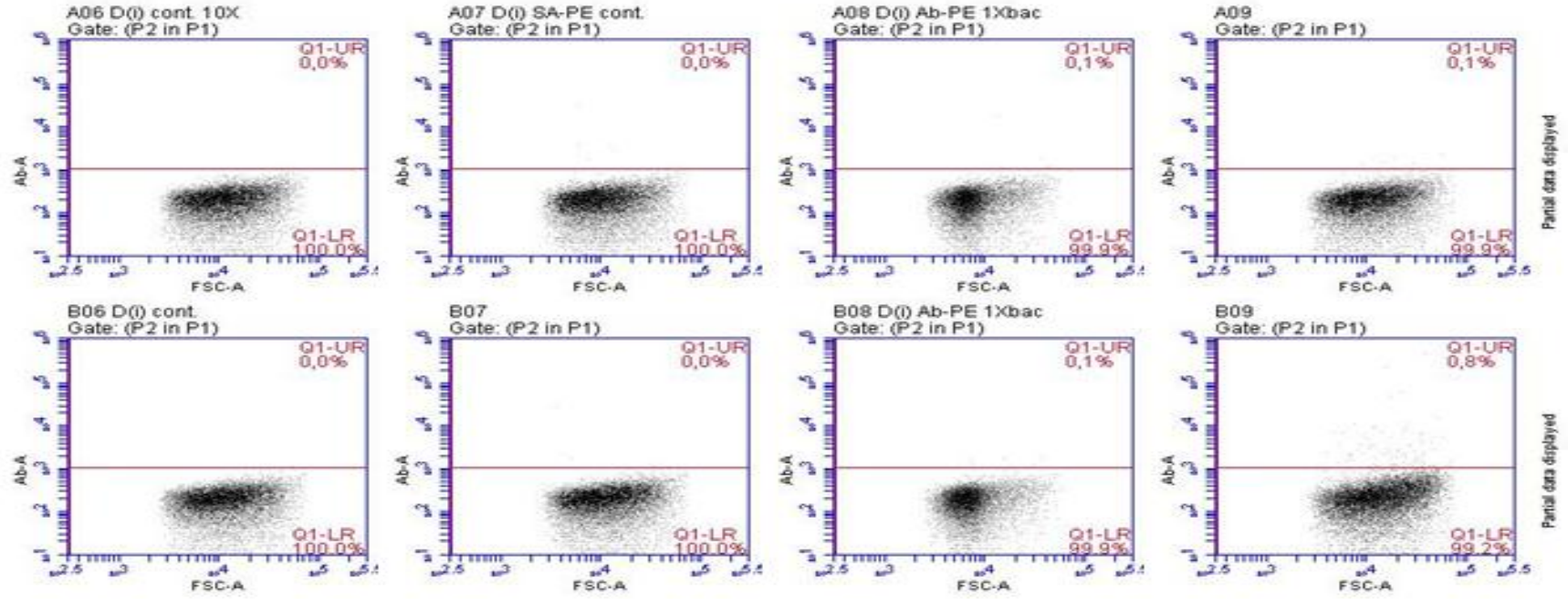
Şekil 4.27 Akım sitometrisinde işaretli antikorun 14028 suşuna bağlanma sonucu

D



Şekil 4.28 Akım sitometrisinde işaretli antikorun D suşuna bağlanma sonucu

D (i)

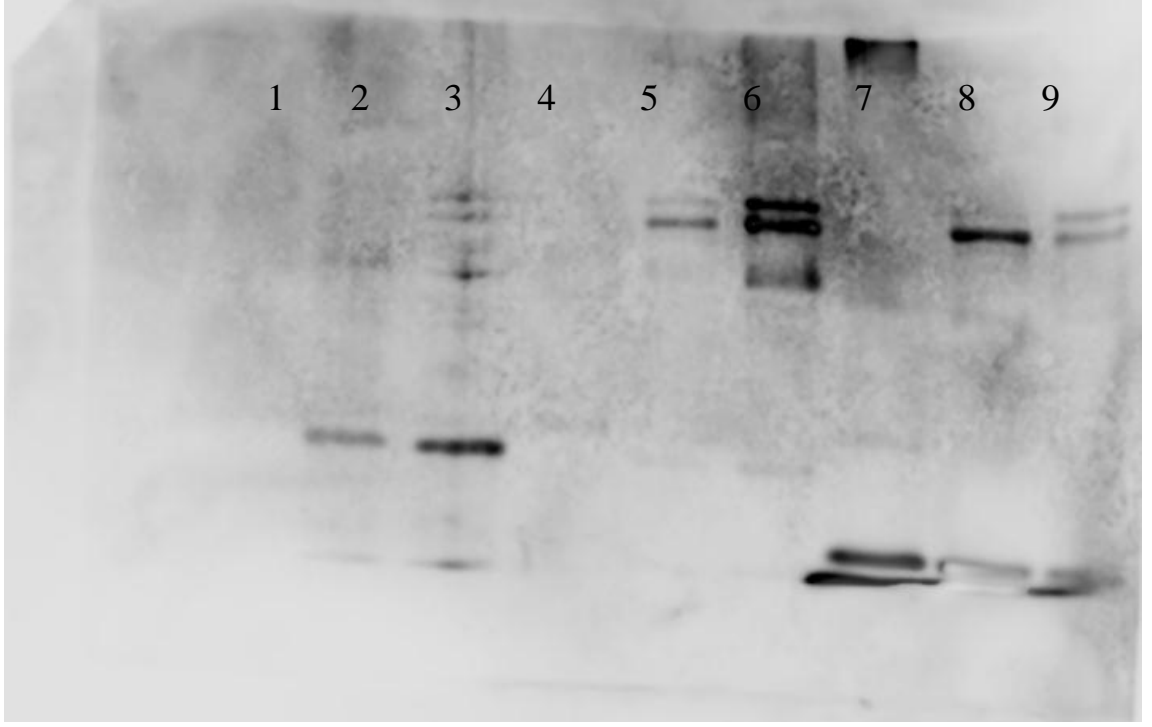


Şekil 4.29 Akım sitometrisinde işaretli antikorun D(i) süşuna bağlanma sonucu

4.14 MisL Proteininin Ekstrasellüler Ortamda İncelenmesi

MisL proteininin salgı fonksiyonlarının incelenmesi ve buna paralel olarak bakteriyel patojenite üzerindeki etkinliğinin tanımlanması amacıyla planlanan deney düzeneğinde öncelikle MisL'in tamamen hücre dışına salgılanan bir protein olup olmadığı araştırılmıştır. Bunun için *MarT* geni (*MisL* geninin regülatörü) silinmiş örneğe ilave olarak, IPTG ile indüklenmiş ve indüklenmemiş suşlar kullanılmıştır. Bu doğrultuda ilk aşamada MisL peptidi üzerinde kesim yapabilen GranzimB ile muamele edilmiştir. Bu sayede bakteri lizise uğratılmayarak hücre dışı (ekstrasellüler) MisL'in kesilmesi planlanmıştır. Diğer yandan lizozim muamele edilerek hücreler parçalanmış ve sadece membrandaki değil, hücre içindeki MisL peptidinin de elde edilmesi amaçlanmıştır. Lizozim muamelesinden sonra tekrar GranzimB uygulaması gerçekleştirilmiştir. Kültür süpernatantları ve bakteri lizatları, daha önce elde ettiğimiz anti-MisL antikorları ile Western blotlamaya tabi tutulmuştur. Bu denemeler sonucunda *MisL* geni silinmiş (knock out) suşda MisL sentezinin gerçekleştirilmediği kesinleştirilmiştir. IPTG ile indüklenmiş suşda özellikle membrana çıkan MisL sentezinde artış görülmüştür. Daha ilginç olanı, bu denemeler, MisL proteininin sadece membrana çıkmadığını, hücre ile ilişkisiz bir şekilde ortama salındığını da kanıtlamıştır (Şekil 4.30).

Bu bulgular gerek sitokin denemeleri ve gerekse biyotinlenmiş antikorun streptavidin ile işaretlenmiş bakteri hücrelerine tutunma denemelerinin işaret ettiği gibi; MisL ototransporter proteininin yolcu domaininin salgı sürecini hücreden kesilerek ortama salınması suretiyle tamamladığının çok güçlü kanıtlarıdır. Bu durum MisL'in patojenitede oynadığı rolün esasının hedef konakçı epitel hücreleri ve makrofajlara tutunduktan sonra, patojenleri bu hücrelere yönlendirdiği teorisini güçlendirmektedir.



Şekil 4.30 Kültürlerden TCA kullanılarak elde edilen MisL proteininin western blot görüntüsü

- Kuyu 1 : 1629 hücre üst sıvı TCA çöktürmesi
- Kuyu 2 : D hücre üst sıvı TCA çöktürmesi
- Kuyu 3 : D(İ) hücre üst sıvı TCA çöktürmesi
- Kuyu 4 : 1629 hücre çökelti + granzim B TCA çöktürmesi
- Kuyu 5 : D hücre çökelti + granzim B TCA çöktürmesi
- Kuyu 6 : D(İ) hücre çökelti + granzim B TCA çöktürmesi
- Kuyu 7 : 1629 hücre çökelti granzim B + lizozim TCA çöktürmesi
- Kuyu 8 : D hücre çökelti granzim B + lizozim TCA çöktürmesi
- Kuyu 9 : D(İ) hücre çökelti granzim B + lizozim TCA çöktürmesi

5. SONUÇ

Bu çalışmada temel amaç MisL ototransporter proteininin immün yanıtta ve dolayısı ile *Salmonella* patojenitesindeki rolünün belirlenmesidir. Bu amaç doğrultusunda tüm MisL proteininin değil, daha spesifik sonuçlar almak için MisL peptidinin etkin domaininin (yolcu domaini) klonlanarak heterolog konakçıda (*E. coli*) ifadesi planlanmıştır. *S. Typhimurium* MisL proteini bir N terminal lider peptit N terminalde yer alan (Lider peptit varken iç bölgede, lider peptit kesildiğinde N terminalde) yolcu domaini ve C terminalde yer alan translokator domaininden oluşmaktadır. Diğer ototransporter proteinlerle elde edilen bilgiler ışığında lider peptit salgı proteininin hücrel hedeflenmesinde, translokator C bölgesi periplazmada katlanan MisL proteininin dış membrana translokasyonunda ve yolcu domaini ise bir adezin olarak konakçı hücrelere tutunmada rol oynadığı öngörülmektedir. Ancak özellikle yolcu domaininin bu öngörülen fonksiyonuna dair literatürde herhangi bir bulgu bulunmamaktadır. Diğer yandan MisL'in bu tutunma etkinliğini patojen hücrelerine bağlı bir protein olarak mı yoksa tamamen patojen yüzeyinden kesilip atıldıktan sonra mı gerçekleştirdiği de bilinmemektedir. Özetle *Salmonella*'da MisL proteininin salgılanması ve patojenitedeki rolünün detayları üzerinde deneysel çalışmalar bulunmamaktadır.

Bu çalışmada MisL proteininin yolcu domaininin heterolog konakçıda (*E. coli*) klonlanması ve ifadesi başarı ile gerçekleştirilerek, araştırmamızda öngörülen model oluşturulmuştur. Bu model ototransporter proteinlerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin incelenmesinde diğer araştırmacılara da kaynak oluşturacak bir özellik taşımaktadır. Heterolog konakçıda üretilen MisL ototransporter proteininin yolcu domainine karşı üretilen antikorlar ile yürütülen sitokin deneylerinde; MisL üreticisi doğal suş ve heterolog konakçının sitokin üretimini (IL-6 ve TNF- α) tetiklediği belirlenmiştir. Ancak nötralizasyon denemelerinde TNF- α için kısmi bir nötralizasyon gözlemlenirken, IL-6 için aynı durumun belirlenememesi, tam bir nötralizan etkisinin olmadığı şeklinde değerlendirilmiştir. Bununla beraber, anti-misL antikorunun bu etkisi ile iyi bir aşı adjuvan adayı olduğunu söylemek olasıdır. Zira bu sonuçlar birlikte

değerlendirildiğinde, MisL'in antikorlar tarafından tutulduğu ve anti-MisL antikorunun varlığında MisL'in makrofajları daha az uyarabildiği ortaya çıkmaktadır.

MisL proteininin yolcu domaininin immün sistem uyarımındaki bu rolünün belirlenmesinden sonra, nötralizan etkisinin hangi gerekçe ile yüksek düzeyde gerçekleşmediğinin detaylı bir şekilde araştırılması sonucunda; MisL proteininin tamamen hücre dışına salgılandığı, yani bazı araştırmacılar tarafından öngörüldüğü gibi (Jong vd. 2010a, Benz ve Schmidt 2011, Chagnot vd. 2013, Jaglic vd. 2014) hücreye bağlı olarak ekstrasellüler işlev göstermediği kanıtlanmıştır. Bu bulgular da MisL proteininin bakteriyel patojenitedeki (tutunma) etkin domaininin N terminal yolcu domaini olduğunu kanıtlayan ilk bulgulardır. MisL'in hücre dışına salgılanması; anti-MisL antikorunun iyi bir adjuvan ajanı olması yanında, aynı zamanda iyi bir aşı adayı olma potansiyeli taşıdığı da göstergesidir. Bu nedenle monoklonal antikorlarla ve konakçı sistemlerde bu çalışmada yapılan deneylerin tekrar edilmesi gerekmektedir.

Bu araştırmada özetle;

1-MisL proteininin yolcu domaininin klonlanması ve heterolog konakçıda ifadesi,

2-MisL proteini yolcu domaininin bir PAMP olduğu,

3-MisL proteininin PAMP özellikteki yolcu domaininin, daha önceki literatür verilerinin aksine, yüzeye bağlı olarak değil, yüzeyden kesilerek salındıktan sonra ana aktivitesini gösterdiği,

kanıtları ile birlikte ispat edilmiştir. Tüm bu veriler tamamen orjinaldir ve *Salmonella* patojenitesinde MisL ototransporter proteininin rolünü açıklamaktadır. Bu yönü ile bulgularımız; hem ototransporter proteinlerin biyolojik fonksiyonlarına ve hem de *Salmonella* patojenitesinin moleküler esasına ve salmonellozun kontrolüne yönelik çalışmalara önemli katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Akcelik, N. and Akçelik, M. 2011. In vitro production of MisL autotransporter protein in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 17(Supplement A), S159-S166.
- Akira, S. and Takeda, K. 2004. Toll-like receptor signalling. Nature Reviews Immunology, 4(7); 499–511.
- Alvarez-Martinez, C.E. and Christie, P.J. 2009. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 73, 775–808.
- Anonymous. 2008. Weekly Epidemiological Record, 8 February 2008, vol. 83, 6 (pp. 49–60), <http://www.who.int/wer/2008/wer8306/en/>
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. 1994. Current Protocols in Molecular Biology, Volume 1. John Wiley & Sons Inc. USA. Unit 2.
- Benz, I. and Schmidt, A. 1992. AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (0126:H27). Molecular Microbiology, 6, 1539-1546.
- Benz, I. and Schmidt, M.A. 2001. Glycosylation with heptose residues mediated by the aah gene product is essential for adherence of the AIDA-I adhesin. Molecular Microbiology, 40, 1403–13.
- Benz, I. and Schmidt, M.A. 2011. Structures and functions of autotransporter proteins in microbial pathogens. International Journal of Medical Microbiology, 301(6); 461-468.
- Bladergroen, M.R., Badelt, K. and Spaink, H.P. 2003. Infection-blocking genes of a symbiotic *Rhizobium leguminosarum* strain that are involved in temperature-dependent protein secretion. Molecular Plant Microbe Interactions, 16, 53–64.
- Blanc-Potard, A. and Groisman, E. 1997. The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. EMBO Journal, 16, 5376–5385.
- Blanc-Potard, A.B., Solomon, F., Kayser, J. and Groisman, E.A. 1999. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. Journal of Bacteriology, 81, 998–1004.
- Blondel, C., Jimenez, J., Contreras, I. and Santiviago, C. 2009. Comparative genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in *Salmonella* serotypes. BMC Genomics, 10, 354.

- Brown, R.E., Jarvis, K.L. and Hyland, K.J. 1989. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Analytical biochemistry*, 180(1); 136-139.
- Broz, P. and Monack, D.M. 2011. Molecular mechanisms of inflammasome activation during microbial infections. *Immunology Reviews*, 243, 174-90.
- Broz, P., Ohlson, M.B. and Monack, D.M. 2012. Innate immune response to *Salmonella* Typhimurium, a model enteric pathogen. *Gut microbes*, 3(2); 62-70.
- Bruno, V.M., Hannemann, S., Lara-Tejero, M., Flavell, R.A., Kleinstein, S.H. and Galan, J.E. 2009. *Salmonella* Typhimurium type III secretion effectors stimulate innate immune responses in cultured epithelial cells. *PLoS Pathogens*, 5, e1000538.
- Burnette, W.N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112(2); 195-203.
- Büttner, D. and Bonas, U. 2002. Port of entry--the type III secretion translocon. *Trends in microbiology*, 10(4); 186- 192.
- Cascales, E. 2008. The type VI secretion toolkit. *EMBO reports*, 9(8); 735-741.
- Chagnot, C., Zorgani, M.A., Astruc, T. and Desvaux, M. 2013. Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. *Frontiers in microbiology*, 4, 303.
- Chalet, L. and Wolf, F.J. 1964. The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by *Streptomyces*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 106, 1-5.
- Chakravorty, D., Rohde, M., Jäger, L., Deiwick, J. and Hensel, M. 2005. Formation of a novel surface structure encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *EMBO Journal*, 24, 2043–2052.
- Charbonneau, M.E., Janvore, J. and Mourez, M. 2009. Autoprocessing of the *Escherichia coli* AIDA-I autotransporter: a new mechanism involving acidic residues in the junction region. *Journal of Biological Chemistry*, 284; 17340–17351.
- Cheminay, C. and Hensel, M. 2008. Rational design of *Salmonella* recombinant vaccines. *International Journal of Medical Microbiology*, 298(1–2); 87–98.
- Christie, P.J. and Vogel, J.P. 2000. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends in microbiology*, 8(8); 354-360.
- Cossart, P. and Jonquieres, R. 2000. Sortase, a universal target for therapeutic agents against Gram-positive bacteria? *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 97, 5013–5015.

- Cox, J.C. and Coulter, A.R. 1997. Adjuvants—A classification and review of the modes of action. *Vaccine*, 15, 248-256.
- Crump, J.A., Luby, S.P. and Mintz, E.D. 2004. The global burden of typhoid fever. *Bulletin of the World Health Organization*, 82(5); 346-353.
- Das, C., Ghosh, T.S. and Mande, S.S. 2011. Computational analysis of the ESX-1 region of *Mycobacterium tuberculosis*: insights into the mechanism of type VII secretion system. *PLoS One*, 6(11); e27980.
- Dautin, N. and Bernstein, H.D. 2007. Protein secretion in Gram-negative bacteria via the autotransporter pathway*. *Annual Review of Microbiology*, 61, 89-112.
- de Jong, H.K., Parry, C.M., van der Poll, T. and Wiersinga, W.J. 2012. Host-pathogen interaction in invasive salmonellosis. *PLOS pathogen*, 8(10); e1002933.
- d'Enfert, C., Chapon, C. and Pugsley, A.P. 1987. Export and secretion of the lipoprotein pullulanase by *Klebsiella pneumoniae*. *Molecular microbiology*, 1(3); 107-116.
- Desvaux, M., Parham, N.J. and Henderson, I.R. 2004. The autotransporter secretion system. *Research in microbiology*, 155(2); 53-60.
- Desvaux, M., Khan, A., Beatson, S.A., Scott-Tucker, A. and Henderson, I.R. 2005. Protein secretion systems in *Fusobacterium nucleatum*: genomic identification of Type 4 piliation and complete Type V pathways brings new insight into mechanisms of pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1713(2); 92-112.
- Dorsey, C.W., Laarakker, M.C., Humphries, A.D., Weening, E.H. and Baumler, A.J. 2005. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an Intestinal Colonization Factor that Binds Fibronectin. *Molecular Microbiology*, 57, 196-211.
- Dougan, G., John, V., Palmer, S. and Mastroeni, P. 2011. Immunity to salmonellosis. *Immunological reviews*, 240(1); 196-210.
- Engvall, E. and Perlmann, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9); 871-874.
- Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M. and Hinton, J.C. 2003. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology*, 47, 103-118.
- Eswarappa, S., Janice, J., Nagarajan, A., Balasundaram, S., Karnam, G., Dixit, N. and Chakravorty, D. 2008. Differentially evolved genes of *Salmonella* pathogenicity islands: insights into the mechanism of host specificity in *Salmonella*. *PLoS ONE*, 3, e3829.
- Fàbrega, A. and Vila, J. 2013. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical microbiology reviews*, 26(2); 308-341.

- Farmer III, J.J., Boatwright, K.D. and Janda, J.M. 2007. *Enterobacteriaceae*: Introduction and Identification. In *Manual of Clinical Microbiology* (Volume I), 9th edn., pp. 661. Edited by P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry and M.A. Pfaller. Washington DC: ASM Press.
- Fath, M.J. and Kolter, R. 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiological reviews*, 57(4); 995-1017.
- Feng, X., Walthers, D., Oropeza, R. and Kenney, L.J. 2004. The response regulator SsrB activates transcription and binds to a region overlapping OmpR binding sites at *Salmonella* pathogenicity island 2. *Molecular Microbiology*, 54, 823–835.
- Figueira, R. and Holden, D.W. 2012. Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. *Microbiology*, 158(5); 1147-1161.
- Folkesson, A., Lofdahl, S. and Normark, S. 2002. The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. *Research in Microbiology*, 153, 537–545.
- Franchi, L., Warner, N., Viani, K. and Nunez, G. 2009. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunology Reviews*, 227(1); 106–128.
- Gal'an, J. and Collmer, A. 1999. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, 284, 1322–1328.
- García Ve'scovi, E., Soncini, F.C. and Groisman, E.A. 1996. Mg⁺² as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell*, 84, 165–174.
- Gentschev, I., Dietrich, G. and Goebel, W. 2002. The *E. coli* alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiology*, 10, 39–45.
- Gerlach, R., Claudio, N., Rohde, M., Jackel, D., Wagner, C. and Hensel, M. 2008. Cooperation of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 4 is required to breach epithelial barriers. *Cell Microbiology*, 10, 2364–2376.
- Girard, V. and Mourez, M. 2006. Adhesion mediated by autotransporters of Gram-negative bacteria: structural and functional features. *Research in microbiology*, 157(5); 407-416.
- Goldberg, M.B., Barzu, O., Parsot, C. and Sansonetti, P.J. 1993. Unipolar localization and ATPase activity of IcsA, a *Shigella flexneri* protein involved in intracellular movement. *Journal of Bacteriology*, 175(8); 2189-2196.
- Graham, S.M. 2002. Salmonellosis in children in developing and developed countries and populations. *Current Opinion Infection Diseases*, 15, 507-512.
- Grimont, P.A.D., Grimont, F. and Bouvet, P. 2000. Taxonomy of the Genus *Salmonella*. In *Salmonella in Domestic Animals*, pp. 1-17. Edited by C. Wray and A. Wray. Florida: CABI Publishing.

- Groisman, E.A., Blanc-Potard, A.B. and Uchiya, K. 1999. Pathogenicity islands and the evolution of *Salmonella* virulence. Pathogenicity Islands and other mobile virulence elements. First ed. Washington D.C: American Society for Microbiology, 2744.
- Grosskinsky, U., Schütz, M., Fritz, M., Schmid, Y., Lamparter, M.C., Szczesny, P. and Linke, D. 2007. A conserved glycine residue of trimeric autotransporter domains plays a key role in *Yersinia* adhesin A autotransport. Journal of bacteriology, 189(24); 9011-9019.
- Guedin, S., Willery, E., Loch, C. and Jacob-Dubuisson, F. 1998. Evidence that a globular conformation is not compatible with FhaC-mediated secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. Molecular Microbiology, 29, 763–774.
- Guedin, S., Willery, E., Tommassen, J., Fort, E., Drobecq, H., Loch, C. and Jacob-Dubuisson, F. 2000. Novel topological features of FhaC, the outer membrane transporter involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. Journal of Biological Chemistry, 275, 30202–30210.
- Guesdon, J.L., Ternynck, T. and Avrameas, S. 1979. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 27(8); 1131-1139.
- Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P.I., Bockemühl, J., Grimont, P.A. and Weill, F.X. 2010. Supplement 2003–2007 (No. 47) to the white-Kauffmann-Le minor scheme. Research in microbiology, 161(1); 26-29.
- Gulig, P.A., Doyle, T.J., Clare-Salzer, M.J., Maiese, R.L. and Matsui, H. 1997. Systemic infection of mice by wild-type but not Spv- *Salmonella* Typhimurium is enhanced by neutralization of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. Infection and Immunity, 65, 5191–5191.
- Haraga, A., Ohlson, M.B. and Miller, S.I. 2008. *Salmonella* interplay with host cells. Nature Reviews Microbiology, 6, 53-66.
- Harlow, E. and Lane, D. 1999. Using Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hau, J. and Hendriksen, C.F.M. 2005. Production of polyclonal antibodies: New technologies. ILAR Journal, 46, 294-299.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F. and Nataro, J.P. 1998. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. Trends Microbiology, 6, 370–378.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C. and Ala'Aldeen, D. 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. Microbiology and molecular biology reviews, 68(4); 692-744.
- Hensel, M. 2004. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. International Journal of Medical Microbiology, 294(2); 95-102.

- Ho, B.T., Dong, T.G. and Mekalanos, J.J. 2014. A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell host & microbe*, 15(1); 9-21.
- Hoiczky, E., Roggenkamp, A., Reichenbecher, M., Lupas, A. and Heesemann, J. 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO Journal*, 19, 5989–5999.
- House, D., Bishop, A., Parry, C., Dougan, G. and Wain, J. 2001. Typhoid fever: pathogenesis and disease. *Current opinion in infectious diseases*, 14(5); 573-578.
- Huber, D., Boyd, D., Xia, Y., Olma, M.H., Gerstein, M. and Beckwith, J. 2005. Use of thioredoxin as a reporter to identify a subset of *Escherichia coli* signal sequences that promote signal recognition particle-dependent translocation. *Journal of Bacteriology*, 187, 2983–91.
- Humphrey, T. Public-health aspects of *Salmonella* infection. 2000. *Salmonella* in Domestic Animals. New York NY: CAB International Publishers, 1, 245-63.
- Hunter, C.A. and Jones, S.A. 2015. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature immunology*, 16(5); 448-457.
- Husseiny, M.I., Wartha, F. and Hensel, M. 2007. Recombinant vaccines based on translocated effector proteins of *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *Vaccine*, 25(1);185–193.
- Ieva, R. and Bernstein, H.D. 2009. Interaction of an autotransporter passenger domain with BamA during its translocation across the bacterial outer membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(45); 19120-19125.
- Jacob-Dubuisson, F., Locht, C. and Antoine, R. 2001. Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Molecular Microbiology*, 40, 306–313.
- Jacob-Dubuisson, F., Fernandez, R. and Coutte, L. 2004. Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1694(1); 235-257.
- Jaglic, Z., Desvaux, M., Weiss, A., Nesse, L.L., Meyer, R.L., Demnerova, K. and Kačaniová, M. 2014. Surface adhesins and exopolymers of selected foodborne pathogens. *Microbiology*, 160(12); 2561-2582.
- Janakiraman, A. and Slauch, J.M. 2000. The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella* Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 35, 1146–1155.
- Jong, W.S., Saurí, A. and Luirink, J. 2010a. Extracellular production of recombinant proteins using bacterial autotransporters. *Current opinion in biotechnology*, 21(5); 646-652.

- Jong, W.S., Corinne, M., Ruijter, E., Orru, R.V., Genevaux, P. and Luirink, J. 2010b. YidC is involved in the biogenesis of the secreted autotransporter hemoglobin protease. *Journal of Biological Chemistry*, 285(51); 39682-39690.
- Jose, J., Jahnig, F. and Meyer, T.F. 1995. Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Molecular Microbiology*, 18, 378–380.
- Junker, M., Schuster, C.C., McDonnell, A.V., Sorg, K.A., Finn, M.C., Berger, B. and Clark, P.L. 2006. Pertactin β -helix folding mechanism suggests common themes for the secretion and folding of autotransporter proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(13); 4918-4923.
- Kaur, J. and Jain, S.K. 2012. Role of antigens and virulence factors of *Salmonella enterica* serovar Typhi in its pathogenesis. *Microbiological research*, 167(4); 199-210.
- Kessler, R.J. and Fanestil, D.D. 1986. Interference by lipids in the determination of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 159(1); 138-142.
- Khan, S.A., Strijbos, P.J., Everest, P., Moss, D., Stratford, R., Mastroeni, P. and Maskell, D.J. 2001. Early responses to *Salmonella* Typhimurium infection in mice occur at focal lesions in infected organs. *Microbial Pathogenesis*, 30, 29–38.
- Kim, W. and Surette, M.G. 2003. Swarming populations of *Salmonella* represent a unique physiological state coupled to multiple mechanisms of antibiotic resistance. *Biological Procedures Online*, 5(1); 189-196.
- Klauser, T., Pohlner, J. and Meyer, T.F. 1992. Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: dissection of *Neisseria* Iga beta-mediated outer membrane transport. *The EMBO journal*, 11(6); 2327-2335.
- Klemm, P. and Schembri, M.A. 2000. Bacterial adhesins: function and structure. *International Journal of Medical Microbiology*, 290(1); 27-35.
- Konieczny, M.P.J., Benz, I., Hollinderbaum, B., Beinke, C., Niederweis, M. and Schmidt, M.A. 2001. Modular organization of the AIDA autotransporter translocator: the N-terminal β 1-domain is surface-exposed and stabilizes the transmembrane β 2-domain. *Antonie Leeuwenhoek*, 80, 19–34.
- Kostakioti, M. and Stathopoulos, C. 2006. Role of the α -helical linker of the C-terminal translocator in the biogenesis of the serine protease subfamily of autotransporters. *Infection and immunity*, 74(9); 4961-4969.
- Kroupitski, Y., Brandl, M.T., Pinto, R., Belausov, E., Tamir-Ariel, D., Burdman, S. and Sela (Saldinger), S. 2013. Identification of *Salmonella enterica* genes with a role in persistence on lettuce leaves during cold storage by recombinase-based in vivo expression technology. *Phytopathology*, 103, 362–372.

- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227, 680-685.
- Langridge, G.C., Fookes, M., Connor, T.R., Feltwell, T., Feasey, N., Parsons, B.N., Seth-Smith, H.M., Barquist, L., Stedman, A., Humphrey, T., Wigley, P., Peters, S.E., Maskell, D.J., Corander, J., Chabalgoity, J.A., Barrow, P., Parkhill, J., Dougan, G. and Thomson, N.R. 2015. Patterns of genome evolution that have accompanied host adaptation in *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 112(3); 863-8.
- Lara-Tejero, M. and Galán, J.E. 2009. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 1-encoded type III secretion system translocases mediate intimate attachment to nonphagocytic cells. *Infection and immunity*, 77(7); 2635-2642.
- Le Minor, L., Popoff, M., Laurent, B. and Hermant, D. 1987. Characterization of a 7th subspecies of *Salmonella*: *S.choleraesuis* subsp. *indica* subsp. nov. *Annual Institute Pasteur Microbiology*, 137B, 211–217.
- Lee, H.C. and Bernstein, H.D. 2001. The targeting pathway of *Escherichia coli* presecretory and integral membrane proteins is specified by the hydrophobicity of the targeting signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 98, 3471–76.
- Leenaars, M. and Hendriksen, C.F.M. 2005. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: Evaluation and recommendations, *ILAR Journal*, 46, 269-279.
- Leiman, P.G., Basler, M., Ramagopal, U.A., Bonanno, J.B. and Sauder, J.M. 2009. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 106, 4154–59.
- Leyton, D.L., Rossiter, A.E. and Henderson, I.R. 2012. From self sufficiency to dependence: mechanisms and factors important for autotransporter biogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 10(3); 213-225.
- Lindblad, E.B. 2000. Freund's adjuvants. In: O'Hagen DT, ed. *Methods in Molecular Medicine: Vaccine Adjuvants—Preparation Methods and Research Protocols*. Totowa NJ: Humana Press. p 79-102.
- Lindenthal, C. and Elsinghorst, E.A. 2001. Enterotoxigenic *Escherichia coli* TibA glycoprotein adheres to human intestine epithelial cells. *Infection and Immunity*, 69, 52–57.
- Link, A.J. and LaBaer, J. 2011. Trichloroacetic acid (TCA) precipitation of proteins. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011(8); pdb-prot5651.

- Lo, W.F., Ong, H., Metcalf, E.S. and Soloski, M.J. 1999. T cell responses to Gram-negative intracellular bacterial pathogens: a role for CD8+ T cells in immunity to *Salmonella* infection and the involvement of MHC class Ib molecules. *The Journal of Immunology*, 162(9); 5398-5406.
- Loveless, B.J. and Saier, M.H. 1997. A novel family of channelforming, autotransporting, bacterial virulence factors. *Molecular Membrane Biology*, 14, 113-123.
- Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien S. and Hoekstra, R.M. 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, 50(6); 882-889.
- Maragkoudakis, A.P., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulou, G., Pot, B. and Tsakalidou, E. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16, 189-199.
- Mastroeni, P., Villarreal-Ramos, B. and Hormaeche, C.E. 1993. Adoptive transfer of immunity to oral challenge with virulent salmonellae in innately susceptible BALB/c mice requires both immune serum and T cells. *Infection and Immunity*, 61, 3981-3984.
- Mastroeni, P., Chabalgoity, J.A., Dunstan, S.J., Maskell, D.J. and Dougan, G. 2001. *Salmonella*: immune responses and vaccines. *The Veterinary Journal*, 161(2); 132-164.
- Maurer, J., Jose, J. and Meyer, T.F. 1999. Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. *Journal of bacteriology*, 181(22); 7014-7020.
- Mazmanian, S.K., Ton-That, H. and Schneewind, O. 2001. Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 40, 1049-1057.
- McGhie, E.J., Brawn, L.C., Hume, P.J., Humphreys, D. and Koronakis, V. 2009. *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Current opinion in microbiology*, 12(1); 117-124.
- Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 1, 135-45.
- Michiels, T., Wattiau, P., Brasseur, R., Ruysschaert, J.M. and Cornelis, G. 1990. Secretion of Yop proteins by *Yersinia*. *Infection and immunity*, 58(9); 2840-2849.
- Mills, D., Bajaj, V. and Lee, C. 1995. A 40kb chromosomal fragment encoding *Salmonella* Typhimurium invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Molecular Microbiology*, 15, 749-759.

- Mills, E., Baruch, K., Charpentier, X., Kobi, S. and Rosenshine, I. 2008. Real-time analysis of effector translocation by the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Host Microbe*, 3, 104–113.
- Mittrücker, H.W. and Kaufmann, S.H. 2000. Immune response to infection with *Salmonella* Typhimurium in mice. *Journal of leukocyte biology*, 67(4); 457-463.
- Miyata, S.T., Bachmann, V. and Pukatzki, S. 2013. Type VI secretion system regulation as a consequence of evolutionary pressure. *Journal of Medical Microbiology*, 79, 2941–2949.
- Mogensen, J.E., Tapadar, D., Schmidt, M.A. and Otzen, D.E. 2005. Barriers to folding of the transmembrane domain of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence. *Biochemistry*, 44(11); 4533-4545.
- Monack, D.M., Raupach, B., Hromockyj, A.E. and Falkow, S. 1996. *Salmonella* Typhimurium invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 93, 9833–9838.
- Monack, D. M., Mueller, A. and Falkow, S. 2004. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nature Reviews Microbiology*, 2(9); 747-765.
- Morgan, E., Campbell, J.D., Rowe, S.C, Bispham, J., Stevens, M.P., Bowen, A.J., Barrow, P. A.D., Maskell, J. and Wallis, T.S. 2004. Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 54, 994–1010.
- Morgan, E., Bowen, A., Carnell, S., Wallis, T. and Stevens, M. 2007. SiiE is secreted by the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 4-encoded secretion system and contributes to intestinal colonization in cattle. *Infection and Immunity*, 75, 1524–1533.
- Müller, D., Benz, I., Tapadar, D., Buddenborg, C., Greune, L. and Schmidt, M.A. 2005. Arrangement of the translocator of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence on the bacterial surface. *Infection and immunity*, 73(7); 3851-3859.
- Nano, F.E., Zhang, N., Cowley, S.C., Klose, K.E., Cheung, K.K., Roberts, M.J., Ludu, J.S., Letendre, G.W., Meierovics, A.I. and Stephens, G. 2004. A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth. *Journal of Bacteriology*, 186, 6430–6436.
- Ochman, H. and Groisman, E.A. 1996. Distribution of pathogenicity islands in *Salmonella* spp. *Infection and Immunity*, 64, 5410–5412.
- Ohnishi, Y., Nishiyama, M., Horinouchi, S. and Beppu, T. 1994. Involvement of the COOH-terminal pro-sequence of *Serratia marcescens* serine protease in the folding of the mature enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 269(52); 32800-32806.

- Oliver, D.C., Huang, G. and Fernandez, R.C. 2003a. Identification of secretion determinants of the *Bordetella pertussis* BrkA autotransporter. *Journal of bacteriology*, 185(2); 489-495.
- Oliver, D.C., Huang, G., Nodel, E., Pleasance, S. and Fernandez, R.C. 2003b. A conserved region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain. *Molecular microbiology*, 47(5); 1367-1383.
- Parkhill, J., Dougan, G., James, K. D., Thomson, N. R., Pickard, D., Wain, J. and Sebahia, M. 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature*, 413(6858); 848-852.
- Pell, L.G., Kanelis, V., Donaldson, L.W., Howell, P.L. and Davidson, A.R. 2009. The phage lambda major tail protein structure reveals a common evolution for long-tailed phages and the type VI bacterial secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 106, 4160–65.
- Pizarro-Cerdá, J. and Cossart, P. 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*, 124(4); 715-727.
- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K. and Meyer, T.F. 1986. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature*, 325(6103); 458-462.
- Provence, D.L. and Curtiss, III, R. 1994. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infection and Immunity*, 62, 1369–1380.
- Pugsley, A.P. 1993. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiological reviews*, 57(1); 50-108.
- Pui, C.F., Wong, W.C., Chai, L.C., Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Noor Hidayah, M.S., Ubong, A., Farinazleen, M.G., Cheah, Y.K. and Son, R. 2011. Review Article *Salmonella*: A foodborne pathogen. *International Food Research Journal*, 18, 465-473.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., Heidelberg, J.F. and Mekalanos, J.J. 2006. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the Dictyostelium host model system. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 103, 1528-1533.
- Pulickal, A.S. and Pollard, A.J. 2007. Vi polysaccharide–protein conjugate vaccine for the prevention of typhoid fever in children: Hope or hype? *Expert Review of Vaccines*, 6(3); 293–295.
- Raffatellu, M., Santos, R.L., Verhoeven, D.E., George, M.D., Wilson, R.P., Winter, S.E., Godinez, I., Sankaran, S., Paixaro, T.A., Gordon, M.A., Kolls, J.K., Dandekar, S. and Baumler, A.J. 2008. Simian Immunodeficiency Virus-Induced Mucosal Interleukin-17 Deficiency Promotes *Salmonella* Dissemination from the Gut. *Nature Medicine*, 14, 421-428.

- Rao, P.S., Yamada, Y., Tan, Y.P. and Leung, K.Y. 2004. Use of proteomics to identify novel virulence determinants that are required for *Edwardsiella tarda* pathogenesis. *Molecular Microbiology*, 53, 573–586.
- Records, A.R. 2011. The type VI secretion system: a multipurpose delivery system with a phage-like machinery. *Molecular plant-microbe interactions*, 24(7); 751-757.
- Reeves, M., Evins, G., Heiba, A., Plikaytis, B. and Farmer, J. 1989. Clonal nature of *Salmonella* Typhi and its genetic relatedness to other *Salmonella* as shown by multilocus enzyme electrophoresis and proposal of *Salmonella bongori* comb. *Journal of Clinical Microbiology*, 27, 313–320.
- Renart, J., Reiser, J. and Stark, G.R. 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 76, 3116–3120.
- Retamal, P., Castillo-Ruiz, M., Villagra, N.A., Morgado, J. and Mora, G.C. 2010. Modified intracellular-associated phenotypes in a recombinant *Salmonella* Typhi expressing *S. Typhimurium* SPI-3 sequences. *PLoS One*, 5(2); e9394.
- Richter-Dahlfors, A.A. and Finlay, B.B. 1997. *Salmonella* interaction with host cells. In *Host Response to Intracellular Pathogens* (S. H. E. Kaufmann, ed.), Austin, TX: R. G. Landes, 251–270.
- Rojas, G., Jiméñez, J.M. and Gutiérrez, J.M. 1994. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon*, 32, 351-363.
- Roy, A., Kucukural, A. and Zhang, Y. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5, 725-738.
- Ruiz-Perez, F., Henderson, I.R., Leyton, D.L., Rossiter, A.E., Zhang, Y. and Nataro, J.P. 2009. Roles of periplasmic chaperone proteins in the biogenesis of serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*. *Journal of bacteriology*, 191(21); 6571-6583.
- Ruiz-Perez, F., Henderson, I.R. and Nataro, J.P. 2010. Interaction of FkpA, a peptidyl-prolyl cis/trans isomerase with EspP autotransporter protein. *Gut microbes*, 1(5); 339-344.
- Rutherford, N. and Mourez, M. 2006. Surface display of proteins by Gram-negative bacterial autotransporters. *Microbial cell factories*, 5(1); 1-15.
- Sabbagh, S.C., Forest, C.G., Lepage, C., Leclerc, J.M. and Daigle, F. 2010. So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS microbiology letters*, 305(1); 1-13.

- Salcedo, S.P., Noursadeghi, M., Cohen, J. and Holden, D.W. 2001. Intracellular replication of *Salmonella* Typhimurium strains in specific subsets of splenic macrophages in vivo. *Cell Microbiology*, 3, 587–597.
- Salmon, D.E and Smith, T. 1885. Report on swine plague. U.S. Bureau of Animal Industries, 2nd Ann. Rep. U.S. Gov't. Printing Office, Washington, p 184.
- Sambrook, J., Fritschi, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Santos, R.L., Raffatellu, M., Bevins, C.L., Adams, L.G., Tükel, Ç., Tsolis, R.M. and Bäumlér, A.J. 2009. Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. *Trends in microbiology*, 17(11); 498-506.
- Sauri, A., Soprova, Z., Wickström, D., de Gier, J.W., Van der Schors, R.C., Smit, A.B. and Luirink, J. 2009. The Bam (Omp85) complex is involved in secretion of the autotransporter haemoglobin protease. *Microbiology*, 155(12); 3982-3991.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. and Rose-John, S. 2011. The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(5); 878-888.
- Schwarz, S., Hood, R.D. and Mougous, J.D. 2010. What is type VI secretion doing in all those bugs? *Trends Microbiology*, 18,531–37.
- Serruto, D., Adu-Bobie, J., Scarselli, M., Veggi, D., Pizza, M., Rappuoli, R. and Aricò, B. 2003. *Neisseria meningitidis* App, a new adhesin with autocatalytic serine protease activity. *Molecular microbiology*, 48(2); 323-334.
- Shah, D., Lee, M., Park, J., Lee, J., Eo, S., Kwon, J. and Chae, J. 2005. Identification of *Salmonella* gallinarum virulence genes in a chicken infection model using PCR-based signature-tagged mutagenesis. *Microbiology*, 151, 3957–3968.
- Shahane, V., Muley, V., Kagal, A. and Bharadwaj, R. 2007. Non-typhoid Salmonellosis: emerging infection in Pune. *Indian Journal Medicine Microbiology*, 25, 173–4.
- Shalom, G., Shaw, J.G. and Thomas, M.S. 2007. In vivo expression technology identifies a type VI secretion system locus in *Burkholderia pseudomallei* that is induced upon invasion of macrophages. *Microbiology*, 153, 2689–2699.
- Shea, J., Hensel, M., Gleeson, C. and Holden, D. 1996. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella* Typhimurium. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 93, 2593–2597.

- Shelobolina, E.S., Sullivan, S.A., O'Neill, K.R., Nevin, K.P. and Lovley, D.R. 2004. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. Applied Environmental Microbiology, 70, 2959-2965.
- Shere, K.D., Sallustio, S., Manassis, A., D'Aversa, T.G. and Goldberg, M.B. 1997. Disruption of IcsP, the major *Shigella* protease that cleaves IcsA, accelerates actin based motility. Molecular microbiology, 25(3); 451-462.
- Sijbrandi, R., Urbanus, M.L., Corinne, M., Bernstein, H.D., Oudega, B., Otto, B.R. and Luirink, J. 2003. Signal recognition particle (SRP)-mediated targeting and Sec-dependent translocation of an extracellular *Escherichia coli* protein. Journal of Biological Chemistry, 278(7); 4654-4659.
- Skamene, E., Schurr, E. and Gros, P. 1998. Infection genomics: Nramp1 as a major determinant of natural resistance to intracellular infections. Annual Reviews Medicine, 49, 275-287.
- Smith, P., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M. and Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical biochemistry, 150(1); 76-85.
- Snavely, M.D., Miller, C.G. and Maguire, M.E. 1991. The mgtB Mg⁺² transport locus of *Salmonella* Typhimurium encodes a P-type ATPase. Journal of Biological Chemistry, 266, 815-823.
- St Geme, J.W.R and Cutter, D. 2000. The *Haemophilus influenzae* Hia adhesin is an autotransporter protein that remains uncleaved at the C terminus and fully cell associated. Journal of Bacteriology, 182, 6005-6013.
- Stabel, T.J., Fedorka-Cray, P.J. and Gray, J.T. 2002. Neutrophil phagocytosis following inoculation of *Salmonella choleraesuis* into swine. Veterinary research communications, 26(2); 103-109.
- Suar, M., Jantsch, J., Hapfelmeier, S., Kremer, M., Stallmach, T., Barrow, P.A. and Hardt, W.D. 2006. Virulence of broad- and narrow-host-range *Salmonella enterica* serovars in the streptomycin-pretreated mouse model. Infection and immunity, 74(1); 632-644.
- Suhr, M., Benz, I. and Schmidt, M.A. 1996. Processing of the AIDA-I precursor: removal of AIDA_c and evidence for the outer membrane anchoring as a β-barrel structure. Molecular Microbiology, 22, 31-42.
- Szabady, R.L., Peterson, J.H., Skillman, K.M. and Bernstein, H.D. 2005. An unusual signal peptide facilitates late steps in the biogenesis of a bacterial autotransporter. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(1); 221-226.

- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 76, 4350–4354.
- Tükel, Ç., Akçelik, M., de Jong, M.F., Şimşek, Ö., Tsolis, R.M. and Baumler, A.J. 2007. MarT Activates Expression of the MisL Autotransporter Protein of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 189, 3922-3926.
- van der Velden, A.W.M., Lindgren, S.W., Worley, M.J. and Heffron, F. 2000. *Salmonella* pathogenicity island 1-independent induction of apoptosis in infected macrophages by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Infection and Immunity*, 68, 5702–5709.
- van Ulsen, P., ur Rahman, S., Jong, W.S., Daleke-Schermerhorn, M.H. and Luirink, J. 2014. Type V secretion: from biogenesis to biotechnology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(8); 1592-1611.
- Voetsch, A.C., Van Gilder, T.J., Angulo, F.J., Farley, M.M., Shallow, S., Marcus, R., and Emerging Infections Program FoodNet Working Group. 2004. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 38(Supplement 3); S127-S134.
- Wallis, T.S. and Galyov, E.E. 2000. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Molecular Microbiology*, 36, 997–1005.
- Wandersman, C. and Delepelaire, P. 1990. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12); 4776-4780.
- Ward, J.E., Akiyoshi, D.E., Regier, D., Datta, A.S.I.S., Gordon, M.P. and Nester, E.W. 1988. Characterization of the virB operon from an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Journal of Biological Chemistry*, 263(12); 5804-5814.
- Welch, R.A., Burland, V., Plunkett III, G., Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E.L., Liou, S.R., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G.F., Rose, D.J., Zhou, S., Schwartz, D.C., Perna, N.T., Mobley, H.L., Sonnenberg, M.S. and Blattner, F.R. 2002. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 17020–17024.
- Whitt, A. A. S. 2002. *Bacterial Pathogenesis*, Second Edition ed. ASM Press.
- Wiechelmann, K.J., Braun, R.D. and Fitzpatrick, J.D. 1988. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Analytical biochemistry*, 175(1); 231-237.

- Wong, K., McClelland, M., Stillwell, L., Sisk, E., Thurston, S. and Saffer, J. 1998. Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a *Salmonella* pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Infection and Immunity*, 66, 3365–3371.
- Wood, M.W., Jones, M.A., Watson, P.R., Hedges, S., Wallis, T.S. and Galyov, E.E. 1998. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Molecular microbiology*, 29(3); 883-891.
- Yang, J. and Zhang, Y. 2015. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions, *Nucleic Acids Research*, 43, W174-W181.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. and Zhang, Y. 2015. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12, 7-8.
- Yen, M.R., Peabody, C.R., Partovi, S. M., Zhai, Y., Tseng, Y. H. and Saier, M.H. 2002. Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria. *Biochimica Biophysica Acta*, 1562, 6–31.
- Yen, Y.T., Kostakioti, M., Henderson, I.R. and Stathopoulos, C. 2008. Common themes and variations in serine protease autotransporters. *Trends in microbiology*, 16(8); 370-379.
- Young, D., Hussell, T. and Dougan, G. 2002. Chronic bacterial infections: living with unwanted guests. *Nature Immunology*, 3, 1026–1032.
- Zhang, J.M. and An, J. 2007. Cytokines, inflammation and pain. *International anesthesiology clinics*, 45(2); 27.
- Zhang, Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9, 40.

EKLER

EK 1 Etik Kurul Kararı

EK 2 Deney Havanları Kullanımı Eğitimi Sertifikası



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ :29/ 03/ 2012
TOPLANTI NO :2012-7
DOSYA NO :2012-36
KARAR NO :2012-7-51

Üniversitemiz Biyoteknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Mustafa Akçelik'in araştırma yürütücüsü olduğu, Prof.Dr.Mustafa Akçelik, Doç.Dr.Erkan Yılmaz, Yrd.Doç.Dr.Nefise Akçelik, Araş.Gör.Neslihan Taşkale Karatug, Araş.Gör.Gülizar Aydoğdu, Uzm.Bio.Şafak Mert ve Bio.Ahmed Alperen Tuncer'in ortak çalışmaları olan "MisL Ototransporter Proteininin Salmonella enterica Serovar Typhimurium'a Karşı geliştirilen İmmün Yanıttaki Rolünün Belirlenmesi." başlıklı çalışmaları Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışmanın Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre;

- Uygun bulunarak onaylanmasına,
 Düzeltilmesine,
oy birliği ile karar verilmiştir.

EK 2 Deney Havanları Kullanımı Eğitimi Sertifikası

104



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ

DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI

NESLİHAN TAŞKALE KARATUĞ

Ankara Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi (ANKÜSEM) ve Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu işbirliği çerçevesinde 17 - 26 Haziran 2013 tarihleri arasında düzenlenen "*Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası*" eğitimini başarı ile tamamlayarak sertifika almaya hak kazanmıştır.


Prof. Dr. Erkan İBİŞ
Rektör


Prof. Dr. Oğuz SARİMEHMETOĞLU
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı


Prof. Dr. Mualla SELÇUK
ANKÜSEM Müdürü

Eğitim Programının Kategorisi ve Süresi : B Kategorisi - 80 saat

Belge No: 5778

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Neslihan TAŞKALE KARATUĞ
Doğum Yeri : ANKARA
Doğum Tarihi : 29/11/1985
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : İnönü Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi (1999-2003)
Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü
(2003-2007)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim
Dalı (2007- 2010)
Doktora : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim
Dalı (2010- 2016)

SCI Yayınlar

Taşkale, N. and AKÇELİK, M. 2012. Use of RAPD-PCR, Plasmid Profiling, Class 1 Integron Analysis, And Antimicrobial Resistance For Molecular Characterization of *Salmonella* Strains Isolated From TURKEY, Acta Alimentaria, 41(1): 56-66. DOI: 10.1556/AAlim.2011.0008.

Uymaz Tezel, B., Akçelik, N., Yüksel, F.N, **Taşkale Karatuğ, N.**, Şanlıbaba, P., Akçelik, M. Effects Of Sub-MIC Antibiotic Concentrations on Biofilm Production Of Food Originated *Salmonella Infantis*, Biotechnology & Biotechnological Equipment. DOI: 10.1080/13102818.2016.1224981.

Uluslararası Kongre Sunum

Karaca, B., Akçelik, M., **Taşkale Karatuğ, N.**, Yüksel, F.N. The efficacy of P22 bacteriophage as a method of *Salmonella* Typhimurium biofilm eradication, 27-30 Nisan 2013, 23rd ECCMID, Berlin (Poster)

Badalı, N., Dıanı, M., **Taşkale Karatuğ, N.**, Akçelik, N., Akçelik, M. Biofilm-producing abilities of *Salmonella enterica* Virchow serotypes, isolated from Turkey, 27-30 Nisan 2013, 23rd ECCMID, Berlin (ePoster)

Taşkale Karatuğ, N., Yüksel, F.N, Karaca, B., Akçelik, N., Akçelik, M. Comparison of PCR-RFLP and PFGE for determining the genetic diversity of *Salmonella* isolates, 2-6 Haziran 2014, 3rd International Molecular Biology and Biotechnology Congress, Saraybosna (Sözlü sunum)

Yüksel, F.N, **Taşkale Karatuğ, N.**, Buyer, B., Akçelik, N., Akçelik, M. Genetic Nature of Plasmids Derived from Multiple Drug Resistant *Salmonella* Strains, 2-6 Haziran 2014, 3rd International Molecular Biology and Biotechnology Congress, Saraybosna (Poster)

Taşkale Karatuğ, N. and Akçelik, M. Production and Purification of *Salmonella* Typhimurium MİSL Ototransporter Protein in *Escherichia Coli*, 27-28 Nisan 2015, ICCMB 2015 : International Conference on Cellular and Molecular Biology, Paris (Sözlü sunum)

Yüksel, F.N, **Taşkale Karatuğ, N.**, Akçelik, N., AKÇELİK, M. Determination the efficiency of Nisin against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium S11344, 9-12 Nisan 2016, 26th ECCMID, Amsterdam (ePoster)

Uymaz Tezel, B., Akçelik, N., Yüksel, F.N, **Taşkale Karatuğ, N.**, Şanlıbaba, P., AKÇELİK, M. Effects Of Sub-MIC Antibiotic Concentrations on Biofilm Production Of Food Originated *Salmonella Infantis* Strains, 19-22 Temmuz 2016, 25th International ICFMH Food Micro Conference, Dublin, Poster

Ulusal Kongre Sunum

Abbasoğlu, D., **Taşkale N.**, Akkoç, N., Yüksel, D., Akçelik, M. *Salmonella enterica* Subspecies *enterica* Serovar *Infantis* Suşlarında Çoklu İlaç Dirençliliğinin Genetik Doğası, 13-16 Aralık 2009, XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Antalya (Sözlü sunum)

Taşkale Karatuğ, N., Akkoç, N., Şanlıbaba, P., Akçelik, M. Çoklu İlaç Dirençli *Salmonella* Suşlarının Tanısı, 24-26 Kasım 2011, 7. Gıda Mühendisliği Kongresi, Ankara (Poster)

Altuntaş Güneş, E., **Taşkale Karatuğ, N.**, Akçelik, M., Akçelik, N. Anne Sütünden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi, 7-9 Kasım 2013, Gıda Mühendisliği 8. Kongresi, Ankara (Poster)

PROJE LİSTESİ

Salmonella enterica serotip Typhimurim'un Patojenitesinde stj Fimbriyal Operonunun Rolünün ve Bu Operonun Genetik Regülasyonunun Tanımlanması, 1001, Bursiyer

MisL Ototransporter Proteininin *Salmonella Enterica* serovar Typhimurium'a Karşı Geliştirilen İmmün Yanıttaki Rolünün Belirlenmesi, BAP, Yardımcı Araştırmacı

SERTİFİKALI EĞİTİM

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası- Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, 17-26 Haziran 2013

Biyogüvenlik Eğitim Sertifikası- Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, 28 Mart 2014

Mikrobiyal Gen Teknolojisi üzerine 1 haftalık eğitim programı-Norveç Yaşam Bilimleri Üniversitesi Kimya Bölümü Biyoteknoloji ve Gıda Bilimi Laboratuvarı, 04-12 Eylül 2014

ERASMUS+ EĞİTİM

'*Staphylococcus aureus* biyofilmlerinin sürdürülebilirliğindeki gerekli genlerin tanımlanması' konulu araştırma projesi-Leeds Üniversitesi Biyoloji Bilimleri Fakültesi Moleküler ve Hücrel Biyoloji Bölümü, 4 Ocak-1 Nisan 2016