ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MYCOBACTERİUM TUBERCULOSİS MMAA4 PROTEİNİNİN TÜTÜN BİTKİSİNDE ÜRETİLMESİ

YAHYA MOUMİNE ALİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2020

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

YAHYA Moumine Ali tarafından hazırlanan **"*Mycobacterium tuberculosis* MmaA4 Proteininin Tütün Bitkisinde Üretilmesi"** adlı tez çalışması 20.08.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman **:** Doç. Dr. Sezer OKAY

Jüri Üyeleri

Başkan **:** Doç. Dr. Şinasi AŞKAR

(Çankırı Karatekin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi)

Üye **:** Doç. Dr. Sezer OKAY

(Hacettepe Üniversitesi, Aşı Enstitüsü)

Üye **:** Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SEZGİN

(Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Fakültesi)

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MYCOBACTERİUM TUBERCULOSİS MMAA4 PROTEİNİNİN TÜTÜN BİTKİSİNDE ÜRETİLMESİ

YAHYA MOUMİNE ALİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Sezer OKAY

Mycobacterium tuberculosis'in neden olduğu tüberküloz (TB), günümüzde de çok sayıda insanın ölümüne yol açan aşı ile önlenebilir bir hastalıktır. BCG, TB'a karşı kullanılan tek onaylı aşıdır, ancak bu aşının yetişkinlerde ve yaşlılarda korunması yetersizdir. Yeni etkili anti-TB aşıları geliştirmek için çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmanın amacı, *M. tuberculosis*'in virülans faktörlerden biri olan ve immün yanıtı tetikleme kapasitesi gösterilen MmaA4 proteinini kodlayan geni tütün bitkilerine aktarmak ve rekombinant TB aşısının geliştirilmesi için MmaA4 antijenik proteininin tütün bitkisinde potansiyel üretimini sağlamaktır. Bu amaçla, *M. tuberculosis mmaA4* geni pGFPGUS+ vektörüne klonlandı. Daha sonra pGFPGUS+*mmaA4* ve kontrol grubu olarak sadece pGFPGUS+ plazmitleri *Agrobacterium tumefaciens*'e aktarıldı. Rekombinant *A. tumefaciens* hücreleri aracılığıyla tütün bitkileri transforme edildi. pGFPGUS+*mmaA4* ile oluşturulan transgenik tütün bitkilerinde *mmaA4* geninin varlığı PZR yöntemiyle doğrulandı. Rekombinant MmaA4 proteininin transgenik tütünlerde üretimini göstermek için SDS-PAGE ve Western blot analizleri gerçekleştirildi ancak *mmaA4* genini taşıyan ve taşımayan transgenik bitkiler arasında bir fark gözlenmedi. Transgenik tütünlerde MmaA4 proteininin üretiminin görülmemesi, bakteri geninin bitkide ifade edilmesi için kodon optimizasyonu yapılmamasına bağlanmıştır.

2020, 57 sayfa

Anahtar Kelimeler: MmaA4, *Mycobacterium tuberculosis*, tütün, transgenik bitki

ABSTRACT

MSc. Thesis

PRODUCTION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* MMAA4 PROTEIN IN TOBACCO PLANT

YAHYA MOUMİNE ALİ

Çankırı Karatekin University
Institute of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sezer OKAY

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis*, is a vaccine-preventable disease still causing deaths of numerous humans. BCG, is the only licenced vaccine against TB. However, protection of this vaccine is insufficient among adults and elderlies. The studies on new and efficient anti-TB vaccines are ongoing. The aim of this study is to transfer the gene encoding MmaA4, a virulence factor of *M. tuberculosis* of which capacity for immune response stimulation was shown, and to provide the potential production of antigenic MmaA4 protein in tobacco plants for development of a recombinant TB vaccine. Fort his purpose, *M. tuberculosis mmaA4* gene was cloned into pGFPGUS+ vector. Next, pGFPGUS+*mmaA4* and pGFPGUS+ only as a control group were transferred into *Agrobacterium tumefaciens*. Tobacco plants were transformed via recombinant *A. tumefaciens* cells. The presence of *mmaA4* gene was verified via PCR in transgenic tobacco plants transformed with GFPGUS+*mmaA4*. To show the production of recombinant MmaA4 protein in transgenic tobaccos, SDS-PAGE and Western blot analyses were performed. However, there was no difference between the transgenic plants carrying *mmaA4* gene or not. Inability to observe the production of MmaA4 protein in transgenic tobaccos was attributed not to perform a codon optimization to express the bacterial gene in plant.

2020, 57 pages

Keywords: MmaA4, *Mycobacterium tuberculosis*, tobacco, transgenic plant

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

"*Mycobacterium tuberculosis* MmaA4 proteininin tütün bitkisinde üretilmesi" başlıklı bu çalışma 2019-2020 yılında hazırlanmış ve Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans tezi olarak sunulmuştur. Bu çalışmanın amacı, *Mycobacterium tuberculosis*'in virülans faktörlerinden biri olan MmaA4 proteinini kodlayan geni tütün bitkisine aktarmak ve rekombinant antitüberküloz aşının geliştirilmesinde MmaA4 antijeninin tütün bitkisinde potansiyel üretimini incelemektir.

Öncelikle annem Hibo, babam Moumine, kardeşim Adnan, kız kardeşim Neima ve her zaman arkamda olan, bana destek olan ve bana yardımcı olan küçük kardeşlerime ve aile üyelerime teşekkürlerimi sunarım. Onlar her zaman bana güvendi. Buraya başka bir ülkeye geldiğimden beri onların sevgi dolu sözleri ve tavsiyeleri asla pes etmeme ve her zaman başımı dik tutmamı sağladı, onlara kalbimle teşekkürlerimi sunuyorum.

Bana yardım etmeyi kabul eden danışmanım, hayat öğretmenim bana bu deneyimi yaşatan ve bana öğrenme ve akademik hayatımda daha ileri gitme fırsatı veren, her türlü desteği gösteren ve bana her zaman rehberlik eden, dünyadaki tüm mutlulukları dilediğim Doç. Dr Sezer OKAY'a sonsuza kadar çok teşekkür ederim. Üniversite hayatımın yönetiminde bana yol gösteren, zamanının kısıtlı olmasına rağmen işimde bana yardımcı olan hocam Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SEZGİN'e çok teşekkür ediyorum. Ayrıca, deneylerde yardımcı olan Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Araştırma Görevlisi Özgün Fırat DÜZENLİ'ye de teşekkür ederim.

YAHYA Moumine Ali
Çankırı, Ağustos 2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **ii**
ABSTRACT ..... **iii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. KURAMSAL TEMELLER **2**
2.1 Tüberküloz **2**
2.1.1 Etiyoloji **3**
2.1.2 Tanı **6**
2.1.3 Kontrol **8**
2.2 *Mycobacterium tuberculosis* **9**
2.3 Virülans Faktörleri **16**
2.4 MmaA4 (Mikolik asit metiltransferaz) **18**
2.5 Aşı Geliştirme ve Aşı Tipleri **20**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **27**
3.1 Bakteri ve Plazmitler **27**
3.2 Bakterileri Büyütme ve Saklama Koşulları **28**
3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) **28**
3.5 Jel Ekstraksiyon **29**
3.6 pGFPGUS(+) ile *mmaA4* Ligasyon Reaksiyonu **30**
3.7 *E. coli* DH5α Hücrelerine Transformasyon **30**
3.8 Plazmit İzolasyonu **31**
3.9 *Agrobacterium tumefaciens* Transformasyonu **31**

3.10 Tütün (*Nicotiana tabacum* L.) Bitkisi Doku Kültürü ile Çoğaltılması.....32

3.11 Gen transferi protokolü 33

3.12 Transgenik Tütün Bitkilerinin Doğrulanması 34

3.12.1 Bitkilerden DNA İzolasyonu 34

3.12.2 PZR.....35

3.12.3 Bitkilerden Protein İzolasyonu 35

3.12.4 Western Blot 36

4. BULGULAR.....37

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 42

KAYNAKLAR 44

EKLER

EK 1 Boyut Belirteçleri.....49

EK 2 Bakteri Kültür Ortamlarının Hazırlanması 50

EK 3 Solüsyon ve Tamponlar.....51

EK 4 Kullanılan Kimyasal ve Enzimler 55

ÖZGEÇMİŞ.....57

SİMGELER DİZİNİ

°C	Celcius
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mM	Milimolar
mg	Miligram
mL	Mililitre

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AG	Arabinogalaktan
AIDS	Edinilmiş Bağışıklık Yetmezliği Sendromu
Ala	Alanin
AMP	Adenozin Mono Fosfat
Arg	Arjinin
BCG	Bacille Calmette Guerin
Bç	Baz çifti
cAMP	Siklik Adenozin Mono Fosfat
CM	Sitoplazmik Membran
CMAS	Mikolik Siklopropanant Asit Sentaz
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
dNTP	Nükleosit trifosfat
Gly	Glisin
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
IFN	İnterferon
IgG	İmmunoglobulinG
IL	İnterlökin
kb	Kilo baz
kDa	Kilo dalton
MTB	*Mycobacterium tuberculosis*
MTBK	*M. tuberculosis* kompleksi
OD	Optik Yoğunluk
PE	Prolin-Glutamik Asit
PG	Peptidoglikan
PPE	Prolin-Prolin-Glutamik Asit
Pro	Prolin
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TB	Tüberküloz
TAC	Tiyasetazon
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 *M. tuberculosis* kompleksinde yer alan türlerin filogenetik ilişkisi.. 4
Şekil 2.2 *M. tuberculosis*'in elektron mikroskobu görüntüsü 10
Şekil 2.3 *M. tuberculosis*'in koloni yapısı. 10
Şekil 2.4 *M. tuberculosis* H37Rv genom yapısı 12
Şekil 2.5 Gram (+), gram (-) ve mikobakteri hücre duvar yapıları şematik gösterimi. ..15
Şekil 2.6 *M. tuberculosis* hücre duvarı yapısı. 15
Şekil 2.7 *M. tuberculosis* hücre duvarı yapısında bulunan hücre yüzey proteinlerinin şematik gösterimi 18
Şekil 2.8 *M. tuberculosis*'in mikolik asitlerinin kimyasal yapıları. 19
Şekil 2.9 *M. tuberculosis* H37Rv *mmaA4* geninin nükleotit dizisi. 19
Şekil 2.10 *M. tuberculosis* H37Rv MmaA4 proteininin aminoasit dizisi. 20
Şekil 3.1 pGFPGUSPlus vektörünün haritası. 27
Şekil 3.2 pGFPGUS+*mmaA4* taşıyan *A. tumefaciens* ile tütün bitkilerinin transformasyonu. 34
Şekil 4.1 *E. coli*'den izole edilen pGFPGUS+*mmaA4* vektörünün doğrulanması.. 37
Şekil 4.2 *A. tumefaciens* bakterilerinden izole edilen pGFPGUS+*mmaA4* plazmidinin PZR ile doğrulanması. 38
Şekil 4.3 pGFPGUS+*mmaA4* taşıyan *A. tumefaciens* ile tütün bitkilerinin transformasyonu (4. gün). 38
Şekil 4.4 Tranformasyondan 3 hafta sonra pGFPGUS+*mmaA4* taşıyan *A. tumefaciens* ile transformasyonu sağlanan tütün bitkilerinde kök ve gövde oluşumu. 39
Şekil 4.5 Tranformasyondan 6 hafta sonra pGFPGUS+ ve pGFPGUS+*mmaA4* taşıyan *A. tumefaciens* ile transformasyonu sağlanan tütün bitkilerinin gelişimi. 39
Şekil 4.6 Transgenik tütün bitkilerinde *mmaA4* geninin varlığının PZR ile doğrulaması 40
Şekil 4.7 Transgenik bitkilerin SDS-PAGE ve Western Blot sonucu.. 41

EK1:
Şekil 1 Precision Plus Protein Dual Xtra prestained marker. 49
Şekil 2 GeneRuler 1 kb DNA marker. 49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 TB tanı araçlarının hassasiyeti ve özgünlüğü 7
Çizelge 2.2 *M. tuberculosis* genlerinin işlevlerine göre dağılımı 14
Çizelge 3.1 PZR'de kullanılan ileri ve geri primer özellikleri..... 28
Çizelge 3.2 Kullanılan primerler ve PZR programı..... 29

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü raporuna göre, 2018 yılında tüberküloz (TB) görülme sıklığı yaklaşık 10 milyon ve ölüm oranı 1,2 milyondur. Kronik TB hastalığına *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) neden olur. MTB bakterileri, Robert Koch tarafından 1882'de keşfedilmiştir (Koch 1982). HIV pozitif hastalarda immün baskılama nedeniyle TB ölümü sık görülür. Her ne kadar TB ölümcül olabilse de önlenebilir. Yüksek ölüm oranları son derece endişe vericidir. Şu anda, TB'un önlenmesi için sadece bir ticari aşı kullanılmaktadır. Bu, *M. bovis*'in zayıflatılmış bir suşu olan Bacille Calmette Guérin (BCG) aşısıdır. BCG aşısı çocukluk hastalıklarının önlenmesinde etkilidir, ancak önleme daha sonraki yaşlarda yeterli değildir (Agger and Andersen 2001). Bu nedenle, yetişkinleri de koruyan yeni aşılar geliştirmek gerekir. Son derece etkili rekombinant anti-TB aşılar geliştirmek için yeni, yüksek immünojenik aday antijenlere ihtiyaç duyulmaktadır (Junqueira-Kipnis *et al*. 2014). MTB'nin virülans faktörlerinden biri olan MmaA4, tiasetazonun (TAC) aktivasyonu yoluyla bir immün yanıt tetikleme kabiliyetine sahiptir.

Transgenik bitkiler, insan terapötik proteinlerinin üretimi için ilginç sistemlerdir ve insan proteinlerine eşdeğer terapötik proteinler (biyoaktif proteinler) üretebilir (Maheshwari 1995; Staub *et al*. 2000). Ek olarak, tütün, ağır ve hafif zincir immünoglobülinlerin üretimi için uygun bir ekspresyon sistemi olarak kullanılabilir. Aynı zamanda, bu tür sistemler, hayvan hücre kültürlerinden daha az riskli, daha düşük maliyet ve düşük bakım gerektiren viral protein üretme avantajına sahiptir. Böylece bakteriyel ve viral patojenlerin neden olduğu bazı hastalıklara karşı korunmanın alternatif bir yoludur (Okay 2011). Böylece terapötik proteinler istenilen özellikte üretilebilir ve değiştirilebilir (Ward 2000). Bu çalışmada, MmaA4 proteini kodlayan gen klonlanıp daha sonra tütün içerisine aktarılmıştır. Ardından, transgenik bitkilerin *mmaA4* genini taşıma ve MmaA4 proteinini üretme durumu kontrol edilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Tüberküloz

Mycobacterium tuberculosis, insanda tüberküloza (TB) neden olan bir bakteridir ve iki varyantı tanımlanmıştır: İnsanları enfekte edebilen, sığırlarda TB ajanı olan *M. bovis* (vakaların %0.5'i) ve Afrika'da karşılaşılan *M. tuberculosis* ve *M. bovis* arasında bir ara varyant olan *M. africanum*. *M. tuberculosis* vücuttaki tüm dokuları enfekte edebilir, ancak sadece pulmoner kontaminasyon epidemiyolojik açıdan önemlidir.

Ortalama 1 hastanın yılda 10 kişiye TB bulaştırdığı tahmin edilmektedir. TB, bir hastanın konuşma veya öksürme gibi davranışları sonucu ortaya çıkan, havada asılı kalan ve basil taşıyan ince damlacıklar aracılığıyla sağlıklı kişiye bulaşır. Bu damlacıklar teneffüs edildikten sonra, bazı basiller pulmoner alveollere ulaşır. Damlacıklar şeklinde 5 mikrondan daha az olan aerosoller, hava süspansiyonu nedeniyle alveollere kolayca ulaşabilir. Bir enfeksiyonu takiben organlarda ciddi patolojik lezyonlar görülür (Nikiforuk 2000). Bağışıklık öncesi fazda, basiller alveolar makrofajlarda çoğalır. Bu hücre içi bakteriyel mikro koloni, enfekte olmuş makrofajların lizisine ve daha sonra diğer makrofajlar ve enflamasyon hücreleri tarafından fagosite edilecek olan basillerin salınmasına neden olur.
Hücresel savunma, T-lenfositleri içeren bağışıklık savunması ile tamamlanmaktadır. Bu bağışıklık fazı iki ila üç haftalık bir süreyi gerektirir ve şu sırada gerçekleşir: bazı izole basiller ve fagosite edilmiş basiller, ilk bulaşıcı bölgeyi boşaltan lenf düğümüne ulaşır; lenf nodunda T-lenfositler, reseptörleri yoluyla *M. tuberculosis* antijenleri ile etkileşime girer. Bu hücreler, lokal olarak çoğaldıktan sonra organizmada göç ederek enflamatuar reaksiyonu tetikleyecekleri birincil bulaşıcı odağa ulaşır. Bu durum tüberküllerin oluşumuna yol açar. Birincil bulaşıcı odak gerileyebilir veya tam tersine savunma yeteneklerine bağlı olarak genişleyebilir.

Çoğu durumda, ilk odak ve uydu gangliyonunun oluşturduğu birincil kompleks birkaç ay veya yıl boyunca değişmeden kalır, azalır veya söner. Az sayıda vakada, birincil kompleksin basilleri vücutta kan dolaşımı yoluyla yayılarak herhangi bir doku ve organı enfekte edebilir. Bu hematojen yayılım, ilk enfeksiyonu takip eden haftalarda ortaya

çıkabilir, görünmez kalabilir ve bağışıklık tepkisi onu kontrol eder ya da bir veya daha fazla TB odağına ilerleyebilir ki bu aşamadaki en tehlikeli form menenjittir.
Birkaç yıl sonra bile, bir TB hastalığı ortaya çıkabilir. Organizmanın savunmasının zayıflaması nedeniyle yeni bir kontaminasyon olabilir veya birincil enfeksiyon basili yeniden virülan hale gelip enfeksiyona neden olabilir. Lezyonların oluşumu birincil enfeksiyon sırasındakiyle aynıdır, ancak geniştir. Akciğerlerdeki makroskopik ilerleme, nodül ve infiltrat oluşumuna yol açar. En ilerici formlarda, kazeum sıvılaşarak bronşlardan diğer organlara geçerek akciğer dışı tutulum gelişir. Bazı insanlarda ise enfeksiyon TB'a dönüşmeyebilir (Engleberg *et al*. 2013).

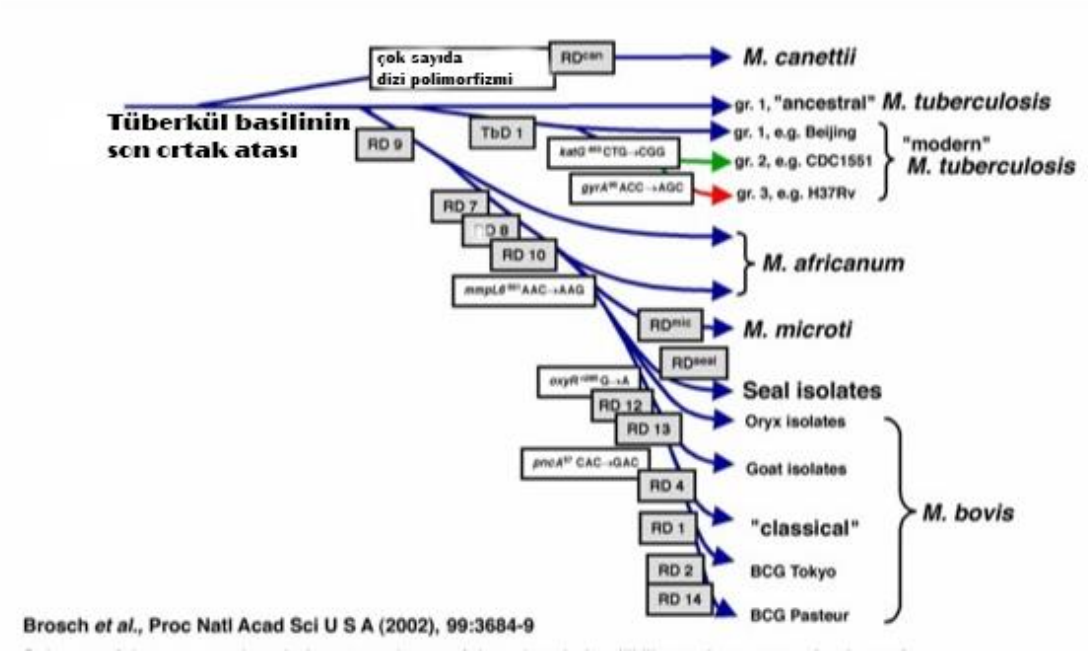
Özetle, TB enfeksiyonunda (birincil enfeksiyon) vakaların %90'ında sessizdir. Olguların geri kalanında TB semptomları görülür; %5'inde maruziyetten sonraki ilk beş yıl içinde, diğer %5'inde ise birkaç on yıl kadar bir aralık içerisinde hastalık ortaya çıkabilir.

2.1.1 Etiyoloji

TB, varlığından beri insan sağlığını tehdit eden bir hastalıktır (Rieder 1999). 1650'de önde gelen ölüm nedenlerinden biriydi. 1882'de Robert Koch yeni bir boyama tekniği kullanarak TB bakterilerini tanımladı (Engleberg *et al*. 2013). TB, bir tür mikobakteri olan *M. tuberculosis* adlı mikroorganizmanın neden olduğu farklı klinik belirtilere sahip kronik, nekrotizan bir enfeksiyöz hastalıktır (Stead *et al*. 1996).

TB'un etiyolojik ajanı olan *M. tuberculosis*, Mycobacteriaceae ailesinin dahil olduğu Actinobacteria sınıfına ait bir bakteridir. *Mycobacterium* cinsi, esas olarak saprofitik ve patojenik olmayan yaklaşık altmış aerobik, hareketsiz bakteriden oluşur. *M. leprae* ve *M. tuberculosis* dahil olmak üzere sadece birkaçı majör patojenlerdir. TB basili genomlarındaki delesyon olaylarından kaynaklanan varyasyonlar sonucunda *M. tuberculosis* kompleksi (MTBK) ortaya çıkmıştır (Şekil 2.1). TB'dan sorumlu bakteriler MTBK'de birlikte gruplandırılır (Cole *et al*. 1998). Bunlar arasında insan TB'undan sorumlu iki suş vardır: *M. tuberculosis* ve *M. africanum*. Diğer MTBK üyeleri hayvan TB'undan sorumludur, sığırlarda *M. bovis*, keçi ve koyunlarda *M. caprae*, tarla farelerinde *M. microti* ve yüzgeçayaklılarda ve denizaslanlarında *M. pinnipedii* (Smith *et*

al. 2009). MTBK üyesi türler genetik olarak %85 ile %100 arasında benzerdir, ancak epidemiyolojileri farklıdır. *M. bovis*'in neden olduğu insan TB'u vakaları pastörizasyonla oldukça azaltılmış olsa da tehlike devam etmektedir (Gagneux 2012; Grange 1983). Son zamanlarda, insan ve hayvan TB'undan sorumlu *M. orygis* suşunun MTBK'ne entegre edilmesi önerilmiştir (van Ingen *et al*. 2012). *M. canettii* suşu, MTBK'nin özel bir durumudur. Çok sayıda nükleotit dizi polimorfizmi bulunan *M. canettii* de insanlarda enfeksiyona neden olan bir mikobakteridir. Diğer MTBK



Şekil 2.1 *M. tuberculosis* kompleksinde yer alan türlerin filogenetik ilişkisi. İnsan TB'undan (*M. tuberculosis* ve *M. africanum*) veya hayvan TB'undan (*M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*) sorumlu mikobakteriyel türler MTBK içinde gruplandırılmıştır (Brosch *et al*. 2002).

MTBK üyesi tüm mikobakteriler doku veya balgamın mikroskobik incelemesi için kullanılan boyama tekniği (Ziehl-Neelsen boyama) nedeniyle "asit-fast" basiller olarak adlandırılmıştır (Brosch *et al*. 2002).

M. tuberculosis çoğu bakteriden daha yavaş çoğalır, bu nedenle TB'nin evrimi, enfeksiyondan haftalar hatta yıllar sonra ortaya çıkabilir. *M. tuberculosis* aerobik bir bakteridir, akciğer dokusunda (özellikle oksijen konsantrasyonlarının yüksek olduğu apekste) oksijenin az olduğu organlara göre daha iyi çoğalır (Frothingham *et al*. 1994).

Mycobacterium africanum

M. africanum bir MTBK üyesidir. Ekvator Afrika ve Afrika kıtasında insanlarda bulunan *M. africanum*'un neden olduğu hastalık *M. tuberculosis* ve *M. bovis*'in neden olduğu hastalığa benzer. *M. africanum*, Batı Afrika ülkelerinde en yaygın patojendir ve tüm TB vakalarının dörtte birini oluşturur (Desmond *et al*. 2004).

M. africanum sadece hava yoluyla insanlardan bulaşabilir. Enfeksiyonun ilerleme derecesi *M. tuberculosis*'e benzer, ancak bağışıklık sistemi hastalığın ilerlemesinde daha az rol oynar. Bu nedenle, *M. africanum* endemik bir patojendir ve HIV ile enfekte kişilerde görülme olasılığı daha yüksektir (Skerman *et al*. 1980).

Mycobacterium bovis

M. bovis, MTBK'nin en geniş konakçı aralığına sahip üyesi olup hayvanları ve bazen insanları enfekte eder. *M. bovis*'in kompleksin diğer üyeleri ile ilişkili olarak tanımlanması, fenotipik ve biyokimyasal özelliklere dayanmaktadır (Kubica *et al*. 2006). *M. bovis*'in insanlarda ana bulaşma kaynağı, pastörize edilmemiş kontamine süt tüketimidir, ancak enfekte hayvanlarla doğrudan temas veya enfeksiyöz aerosollerin hasta hayvanlardan solunması kontaminasyona yol açabilir. Bir kişiden diğerine geçiş çok nadir olmakla birlikte, bağışıklığı baskılanmış kişiler arasında bir geçiş olduğu doğrulanmıştır. Klinik ve patolojik özellikler *M.bovis* ve *M.tuberculosis* arasında çok yakındır ve sonuç olarak hastalarda önleme ve tedavi uygulama güçlüğüne neden olmaktadır (Aslan vd. 2009).

Mycobacterium microti

MTBK'nin diğer bir üyesi olan *M. microti*, küçük kemirgenlerde ve çayır farelerinde görülen bir patojendir. *M. microti* ilk olarak 1930'larda tarla farelerinden izole edildi ve aşı kökenli olarak kullanıldı. Kompleks içinde kromozomal DNA'da delesyona uğramış, spesifik bir bölgenin olmamasıyla tanımlanır (Smith *et al*. 2009). Bu patojen, lama ve domuz gibi bazı memelilerde bulunmuştur. Son çalışmalara göre, insanlarda da tespit edilmiştir. (Gutierrez *et al*. 2005).

Mycobacterium canettii

M.canettii, ilk kez 1969 yılında organizmaya adını veren Fransız mikrobiyolog Georges Canetti tarafından bildirilen MTBK'nin bir üyesidir. Nadir TB vakalarına neden olduğu ve genetik olarak *M. tuberculosis* atalarına yakın olduğu bilinmektedir. *M. canettii*, *M. tuberculosis*'in çok nadir ve pürüzsüz koloni oluşturan bir varyantıdır ve genellikle Afrika'daki hastalardan veya Afrika'ya seyahat edenlerden izole edilir. MTBK'nin diğer üyeleri ile özdeş 16S rRNA dizilerini paylaşmasına rağmen, *M. canettii* suşları, bazı konservatif genlerin polimorfizmleri de dahil olmak üzere birçok açıdan farklılık gösterir. Katı ortamda *M. tuberculosis* kolonileri kuru, kaba ve buruşuk, *M. canettii* kolonileri mukozal ve yapışkandır. Sıvı bir kültür ortamında, birincisi bir halat şeklinde kuvvetli bir şekilde toplanırken ikincisi tamamen ayrılır. Sonuç olarak, *M. canettii*, ayrıntılı genomik analizi ile MTBK'nin evriminin daha iyi anlaşılmasını sağlayabilecek büyüleyici bir tüberkül basilini temsil eder (Brosch *et al*. 2002).

2.1.2 Tanı

Dünya çapında TB tanısı genellikle balgam örneklerindeki bakterilerin mikroskop altında incelenmesine dayanan balgam yayma mikroskopisi yöntemi ile yapılır. Asit-fast basil (AFB) için boyama, 1882'de Koch tarafından keşfinden bu yana TB tanısının temel taşıdır (Cambau and Drancourt 2014). Yayma mikroskopisi, önemli tekniker eğitimi gerektirmesine ve zaman alıcı olmasına rağmen, düşük teknik araç-gereç ihtiyacı ve ucuz olma avantajına sahiptir. Yayma mikroskopisinin avantajı, en bulaşıcı hastaları tanımlayabilmesidir (Behr *et al*. 1999). Bununla birlikte, toplama süresi, balgamın işlenmesi ve Ziehl-Neelsen boyamanın kullanılması bulaşma zamanını etkileyebilir.

TB tanı teknolojilerinin geliştirilmesi sonucu TB için moleküler hızlı tanı testleri kullanılmaya başlandı (Çizelge 2.1). Araştırma koşullarının ve kapasitelerinin iyileştirildiği ülkelerde TB, kültür yöntemleri kullanılarak teşhis edilebilir (Anonim 2019).

Çizelge 2.1 TB tanı araçlarının hassasiyeti ve özgünlüğü (Cudahy and Shenoi 2016).

Tanı aracı	**Hassasiyet**	**Özgünlük**	**Avantaj**	**Dezavantaj**
Semptom Taraması	% 93'e kadar değişken	Değişken	Ucuz, kolay uygulama	Duyarlılık ve özgüllük arasında seçim yapmak gerekir, performans değerlendirme kriterlerine bağlıdır
Göğüs röntgeni	%73–95	%63	Birçok merkezde uygulama, ucuz	Yorumlamak için uzman gerektirir, uygulayıcılar arası yüksek değişkenlik
Balgam Mikroskobu	%60	%95	Ucuz	HIV koenfeksiyonunda zaman alıcı, düşük hassasiyet
Katı Ortam Kültürü	Referans standardı	Referans standardı	Ucuz	Önemli laboratuvar altyapısı ve uzun süre gerektirir
Interferon-gamma Salım Testi (IGRA)	%69–83	%52–61	Balgam gerektirmez	Aktif hastalık için düşük performans
Floresan mikroskobu	%70	%95	Geleneksel mikroskopiden daha yüksek hassasiyet ve hız	Özel ekipman gerektirir
Sıvı Ortam Kültürü	Katı ortamdan %10 daha fazla	Referans standardı	Katı ortamdan daha hızlı ancak yine de süre uzundur	Özel ekipman ve yüksek eğitimli teknisyenler
Polimeraz Zincir Reaksiyonu	%10–100	%5–100	Hızlı geri dönüş, çoğu oldukça spesifiktir	Pahalı, değişken performans, yüksek eğitimli personel gerektirir
Xpert MTB/RIF	%89	%99	Hızlı geri dönüş, HIV pozitiflerde iyi performans, orta fiyatlı, rifampin direnç testi dahildir	Ölüm oranı üzerindeki net olmayan etki
Line Prob Testi (LPA)	%66–95	%99	Hasta numuneleri üzerine direkt uygulanabilir	Pahalıdır

TB’lu kişilerin kesin tanısı, TB basili tanısı ile gösterilir. Bu tanı uzun yıllardır mikroskobik inceleme ve kültüre dayanmaktadır. Kültür testi sonuçları 2 ila 6 hafta içinde alındığından ve mikroskobik incelemelerin duyarlılığı düşük olduğundan, araştırmacılar yıllarca TB’u teşhis etmek için yeni, daha hassas yöntemler geliştirmeye çalışmıştır (Lisby 1999). TB’un ilk tanısı, saflaştırılmış bir protein türevi kullanılarak tüberkülin deri testidir. Test 48 ila 72 saat içinde okunur ve tüberkülin enjeksiyon bölgesinde 10 mikrondan daha büyük bir çapa sahip yuvarlak, sert bir yumru gelişirse test pozitiftir. Ancak zayıf bağışıklık sistemi olan AIDS hastalarında sorun olabilir. Pozitif bir testten sonra daha kesin sonuçlar elde etmek için göğüs röntgenleri, daha net sonuçlar için kültür büyümesi veya serum analizleri gibi başka muayeneler de planlanmalıdır (Frothingham *et al*. 1994). Kültürün büyümesi kesin test olarak kullanılmasına rağmen, serumun incelenmesi her zaman bakteri varlığını göstermez. Kültür büyüme testi, organizmanın yavaş büyümesi probleminden muzdariptir.

2.1.3 Kontrol

Enfeksiyonun yayılmasını önlemek için hasta insanların toplumdan izole edilmesi TB’un yayılmasını kontrol etmenin tek yolu olmuştur. 1940'tan itibaren antibiyotiklerin ortaya çıkışı ve kullanımı TB’la yeterince savaşmayı mümkün kılmıştır. Halen dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir, ancak gelişmiş ülkelerde hastalık yaygın değildir (Todar 2008).

TB’u tedavi etmek için kullanılan yaygın ilaçlar arasında izoniazid, rifampisin ve streptomisin bulunur. Bakteriler ilaçlara giderek daha fazla direnç gösterir, bazen birkaç ilaç birlikte kullanılabilir (Engleberg *et al*.2013).

Yaşam standartlarındaki iyileşmeler, tıbbi önlemler ve tanı yöntemleri TB ajanının yayılmasını kontrol etmeye yardımcı olmuştur. TB'nin yayılmasını önlemede erken tedavi anahtar faktördür. Kişinin izolasyonu, hastalığın tedavi sırasında ve özellikle tedavinin erken aşamalarında yayılmasını önlemek için gereklidir.

İlk sorun, hastalığın kontrol edilmesi için ve genellikle gelişmekte olan ülkelerde bir araç kurulmasıdır (Nikiforuk 2000). Ek olarak, TB’un önlenmesi için pahalı ilaçların yoksul ülkelerde elde edilmesi konusunda sorunlar, hastalığın ortadan kaldırılmasının önündeki

engellerdir. Bacille Calmette-Guérin (BCG) aşısının kullanılması, akciğer hasarının şiddetini azaltmıştır. Aşı çoğu ülkede TB'a karşı kullanılmasına rağmen, ABD gibi bazı ülkeler kullanılmamaktadır.

18. ve 19. yüzyıllarda Avrupa ülkelerinde ciddi salgınlara ve ölümlere neden olan hastalık, 20. yüzyılın başından itibaren bağımsız olarak azalmaya başladı. Ardından, hastalığın daha önce hiç ulaşmadığı az gelişmiş ülkelerde bu hastalık yayılmaya başladı. Yoksulluk, TB kontrol programlarının uygulanamaması ve özellikle Afrika ve Güneydoğu Asya'da HIV/AIDS salgını TB kontrolünü zorlaştırmaktadır (Rieder 1999).

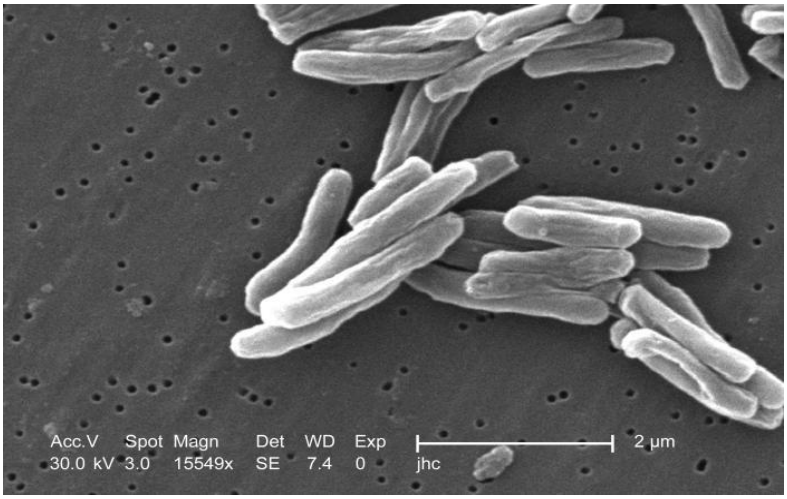
2.2 *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculsosis, Prokaryot âlemi, Firmicutes bölümü, Actinobacteria sınıfı, Actinomycetales takımı, Mycobacteriaceae ailesi ve *Mycobacterium* cinsine ait bir türdür (Zopf 1883).

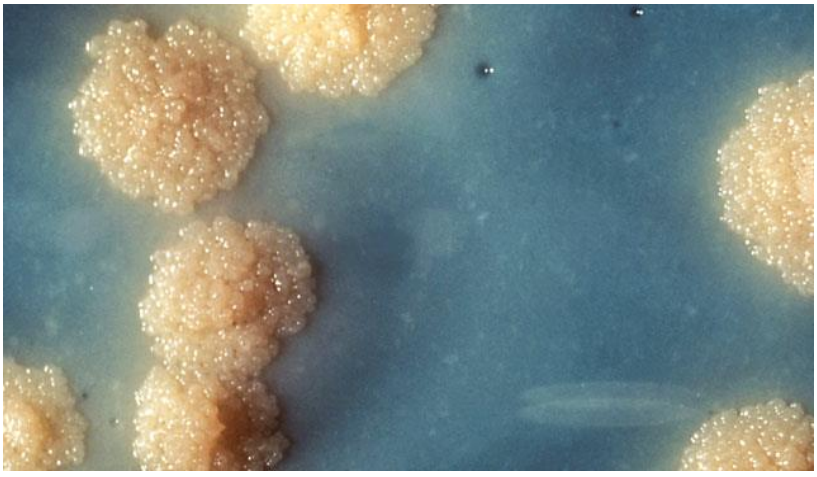
Mycobacterium cinsi, insanlarda ve hayvanlarda çok uzun süre tanımlanmış patojenlerdir. Mikobakteriler mikroorganizmalardır ve genellikle spor veya kapsül içermeyen gram pozitif bakteriler, özel hareketsizlikleri, hafif kavisli, çubuk şekilli morfolojileri ve aside karşı dirençleri olarak karakterize edilirler (Rastogi *et al*. 2001). Mikroorganizmalarda kapsül olmamasına rağmen, hücre duvarlarında çok karmaşık lipitler bulunur ve mikroorganizmanın çevre koşullarının etkilerinden korunmasına yardımcı olur, ayrıca Gram boyalarla boyanma olasılığını zorlaştırır (Griffith 1999) .

M. tuberculsosis, 1-4 µm uzunluğunda, 0,3-0,6 µm genişliğinde, ince ve bazen hafif kavisli, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, basil şeklinde bir bakteridir (Şekil 2.2). Zorunlu yavaş büyüyen aerobik, olumsuz koşullara karşı çok dirençli ve uzun süre canlılığını koruyabilen bir bakteridir. Asitlere ve bazlara karşı dayanıklıdırlar ve Gram boya ile boyanmazlar. Ayrıca uyku hali vardır ve hücre içi patojenlerdir. Patojen bölünme süresi yaklaşık 18 saattir. Bu nedenle, katı ortam kolonileri sadece 2-3 hafta içinde görünür hale gelir. Kolonilerin kenarları düzensizdir, yüzey pürüzlü ve kurudur (Şekil 2.3) (Cole *et al*. 1998). *M. tuberculosis* uzak aktinomisetler ile ilişkilidir. Birçok patojenik olmayan mikobakteri insan florasının normal bileşenleridir. *M. tuberculosis* iyi havalandırılan

akciğerlerin üst loblarında bulunur. *M. tuberculosis*'in büyümesi için yumurta agar ortamı veya Löwenstein-Jensen ortamı kullanılır. Her iki ortamda da *M. tuberculosis* yetiştirildiğinde, küçük devetüyü renginde koloniler oluşturur. Her iki ortamda da koloniler yaklaşık 4 ila 6 haftada büyür (Todar 2008).



Şekil 2.2 *M. tuberculosis*'in elektron mikroskobu görüntüsü (Todar 2008).



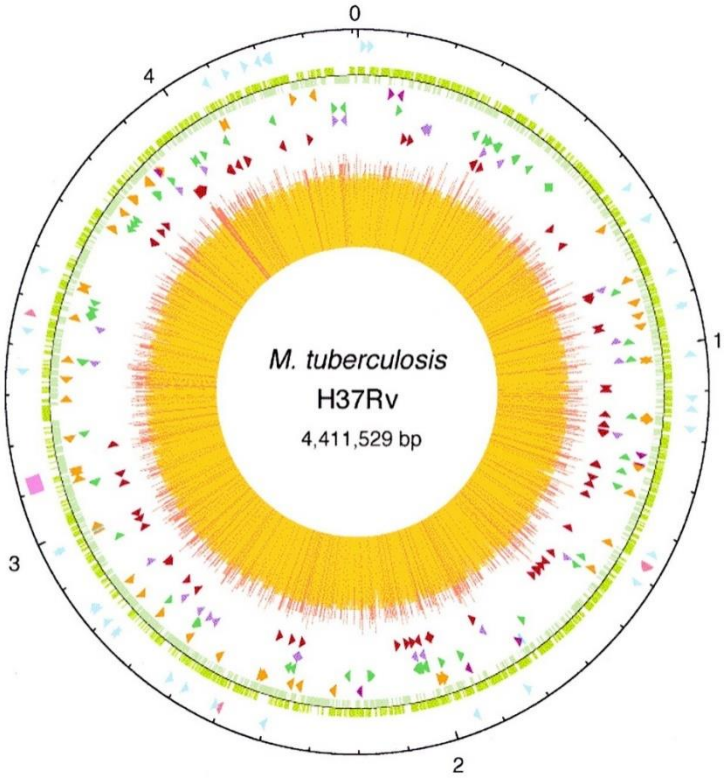
Şekil 2.3 *M. tuberculosis*'in koloni yapısı (Kubica *et al.* 2006).

M. tuberculosis, havada bulunan mikro damlacıkların solunması sonucu hava yoluyla bulaşır. Enfeksiyonun oluşması için minimum bakteri yükü yeterlidir (Russell 2007). Solunduğunda, mikobakteriler, çevreleyen hücrelerle etkileşime girecek ve konağın bağışıklık tepkisini tetikleyecekleri pulmoner bölgeye ulaşacaktır. Makrofajlar, doğuştan gelen bağışıklık tepkileri (hızlı, spesifik olmayan ve kısa ömürlü) ile adaptif bağışıklık yanıtı (geç, spesifik ve kalıcı) arasındaki kavşak noktasındadır.

M. tuberculosis, hücre içinde ve makrofajlarda çoğalabilir. Vücut patojenle savaşmada yetersiz kalırsa, *M. tuberculosis* lokal dokuyu ve hücre içi ortamı değiştirerek kas nekrozuna ve granülom oluşumuna neden olur. Çeşitli mikobakteriyel enfeksiyonlar, hücre içi sinyal iletimini etkileyen makrofajlarda siklik AMP'nin (cAMP) patlamasına neden olur. Bakteriyel patojenler, konakçı hücrede çoğalmak için enfeksiyon sırasında çok spesifik mekanizmalar geliştirmiştir. Genel bir stratejiye göre, enfeksiyöz ajanın, konakçı hücreye girişte cAMP gibi moleküllerin sinyal iletimine dahil olduğu söylenir. *M. tuberculosis*, hücredeki çeşitli sağkalım mekanizmalarını kullanarak konakçı organizmada fagosom oluşumunu inhibe eder (Agarwal *et al*. 2009).

Genom dizisi ortaya çıkarılmış ilk *M. tuberculosis* suşu H37Rv'dir. *M. tuberculosis* H37Rv'nin genomu 4.411.529 baz çifti (bp) ve yaklaşık 4000 genden oluşur (Şekil 4). *M. tuberculosis* genomu, yaklaşık 7 milyon bp kromozomu olan *M. smegmatis* gibi hızlı büyüyen mikobakteri türlerinden daha kısadır. Bunun nedeni, hücre içi ortamda genetik izolasyon ve zaman içinde gereksiz genlerin kaybolmasıdır (Brosch *et al*. 2000).

M. tuberculosis genomu, bu bakterinin benzersiz özelliklere sahip olduğunu gösterir. 200'den fazla gen, yağ asidi metabolizmasını kodlayan enzimleri kodlamaktadır. Bunlardan yaklaşık 100'ü yağ asidi p-oksidasyonunda görev alırken, *E. coli*'nin yağ asidi metabolizmasında rol oynayan sadece 50 enzimi vardır. Transkripsiyon ATG kodonu ile başlar, ancak *M. tuberculosis* (%35), *B. subtilis* (%9) ve *E. coli* (%14)'de GTG ile de başlayabilir (Cole *et al*. 1998). *M. tuberculosis*'in genomundaki yaklaşık 4000 genden 525'i hücre duvarı ve hücresel işlemlerde yer alır. 188 gen, düzenleyici proteinleri kodlar. 91 gen virülans, detoksifikasyon ve adaptasyonda rol oynar. Bu genler doğrudan veya dolaylı olarak virülansa karışabilir (Todar 2008).



Şekil 2.4 *M. tuberculosis* H37Rv genom yapısı (Cole *et al.* 1998).

M. tuberculosis genomu yüksek oranda GC (%65,6) içerir, bunun nedeni Gly, Ala, Pro ve Arg açısından zengin proteinlerin çokça varlığı, Lys ve Asn içeren proteinlerin düşük oranıdır. Glisin bakımından zengin proteinler, tekrarlayan yapıya sahip bir antijenik varyasyon kaynağını temsil edebilir. *M. tuberculosis* bakterilerinin aerobik bir yaşam tarzı vardır, ancak anaerobik ortamlara uyum sağlamada metabolik bir potansiyeli vardır (Brosch *et al*. 2000).

Çok sayıda gen lipogenez ve lipoliz enzimlerinin sentezi ve ayrıca tekrarlayan yapısı prolinden oluşan yeni tipte PE (prolin-glutamik asit) ve PPE (prolin-prolin-glutamik asit) protein aileleriyle alakalıdır. Bu yeni proteinlerin işlevi şu anda bilinmemektedir, ancak bunların bolluğu (genomun %10'unu kapsar) olası bir antijenik varyasyon kaynağı olarak sunulmaktadır. Bu, *M. tuberculosis* biyolojisinde önemli bir rol oynadıklarını göstermektedir (Cole *et al*. 1998; Delogu and Brennan 2001). Bu nedenle PE ve PPE proteinleri, yeni tedavilerin geliştirilmesi için potansiyel hedefler olarak kabul edilir.

M. tuberculosis genomunun üçte biri, füzyon ve taşıma sistemleri dahil olmak üzere hücre duvarının bileşenlerinin sentezine, ara metabolizmasına ve solunumuna ayrılmıştır. Bunlar genellikle bakteriyel virülans ile ilişkili enzimlerdir.

Farklı mikobakteri suşlarının genomik yapısı, yapay bakteriyel kromozom tekniği (BAC) kullanılarak ile belirlenir. Farklı *Mycobacterium* suşlarının karşılaştırılması, değişken alanların tam olarak tanımlanmasını mümkün kılmıştır.

M.tuberculosis ile mukayese edildiğinde, *M.bovis*'te RD1, RD2, RD3 adlı 3 delesyon gözlemlenmiştir. *M. bovis* BCG'de ise on bölge delesyona uğramış olup bunlardan üçü *M. bovis*'te açıklananlarla aynıdır, geri kalan yedisi RD4-RD10 olarak adlandırılmıştır. Diğer suşlardan *M. africanum*, bu açıdan *M. bovis*'e göre *M. tuberculosis*'e daha yakın iken, *M. microti*'nin bir ara yapısı vardır. Delesyona uğrayan bölgelerin ilgi çekici proteinleri kodladığı görülmektedir. Bunlar arasında, makrofajı istilasında görev alan bir mikobakteri proteini olan invazin Mce, birkaç fosfolipaz, PlcA, B, C ve D virülans faktörleri, PE, PPE ve ESAT-6 proteinleri sayılabilir.

Ardışık DNA kayıpları klonal genişlemelere ve yeni konakçılara adaptasyonlara izin vermektedir. İnsan suşlarına en çok benzeyen hayvan suşlarının da patojenik olması bu hipotezi desteklemektedir.

Analiz edilen diğer suşlarla filogenik bir çıkarım yapılmıştır. Bir Afrika türü olan *M. canettii*, filogenetik ağaçta çok eski bir ayrılmaya işaret eden çok sayıda polimorfizm barındırır. Genel olarak, *M. bovis*'in genomu, *M. tuberculosis* genomundan daha küçüktür. *M. africanum* ve *M. microti*'nin genomları ara pozisyonlarda bulunur. *M. bovis* ise *M. africanum* ve *M. microti*'nin birbiri ardına ayrıldığı progenitörden farklılaşan son elemandır (Şekil 2.1).

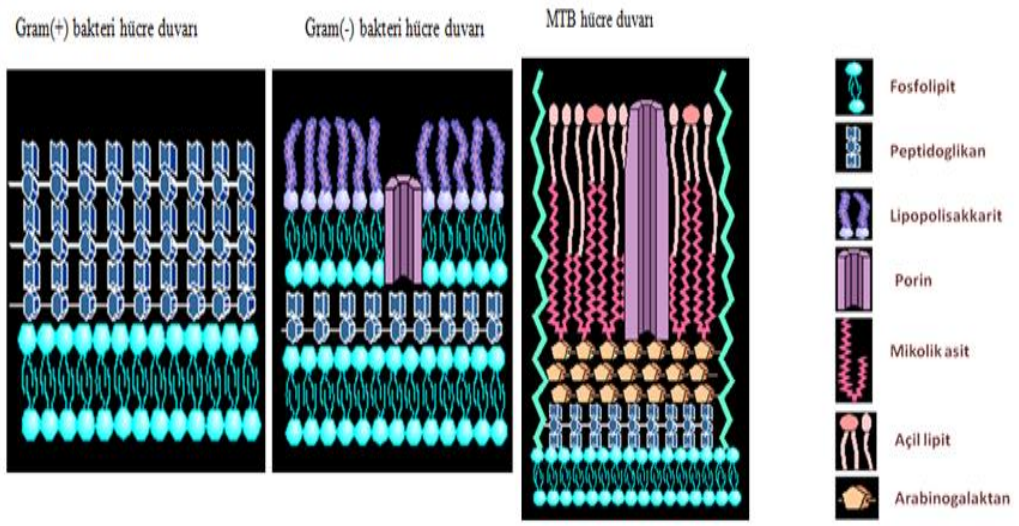
M. tuberculosis'in diğer bakterilere göre daha geniş bir protein ailesine sahip olduğu bilinmektedir. Bu protein ailelerinin en önemli biyolojik etkileri arasında lipit metabolizması, gen ekspresyonunun taşınması ve düzenlenmesi bulunmaktadır (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2 *M. tuberculosis* genlerinin işlevlerine göre dağılımı (Brosch *et al.* 2000)

İşlev	%
Ara metabolizma ve solunum	22
Hücre duvarı, hücre işlemleri	17
Lipit metabolizması	6
Düzenleyici proteinler	5
Virülans ve adaptasyon	2

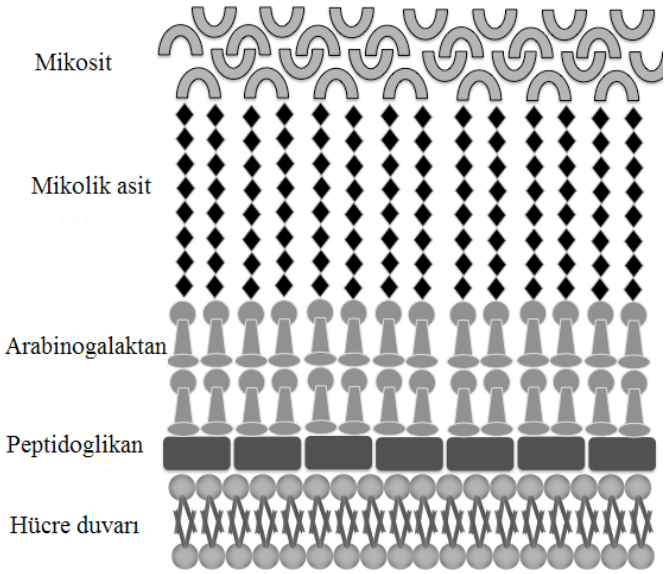
TB basili, genomik dizisi sayesinde ihtiyaç duyduğu kendi aminoasitlerini, vitaminlerini ve enzim kofaktörlerini sentezler (Brosch *et al*. 2000). *M. tuberculosis* hücre duvarında bol miktarda lipit içerir. Çok az mikroorganizmanın *M. tuberculosis* gibi farklı lipofilik moleküller üretebilen bir lipit metabolizması vardır. TB basilinde, lipit biyosentezinin potansiyel aktivitesini kodladığı bilinen ürünlerden daha fazla gen vardır (Pym and Small 2006). *M. tuberculosis*, tedaviyi zorlaştıran birçok antibiyotiğe doğal olarak dirençlidir. Bu direnç esas olarak geçirgenlik bariyeri görevi gören yüksek derecede hidrofobik hücre zarından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, birçok potansiyel direnç markörü genomda kodlanmıştır. Bu direnç mekanizmaları hakkındaki mevcut bilgiler sayesinde, ilaçların daha iyi kullanımı ve yeni tedavilerin geliştirilmesi sağlanmaktadır (Cole *et al*. 1998).

M. tuberculosis'in hücre duvarı prokaryotlar arasında benzersiz bir yapıya sahiptir ve virülansta önemli bir rol oynar (Todar 2008). TB basilinin hücre duvarı diğer bakterilerden çok daha kalındır ve mikolik asitler adı verilen yüksek oranda lipitleri içerir (Brennan 2003). Hücre duvarının %50'sini oluştururlar. Mikolik asit, hücrelerin yüzeyinde geçirgenliği kontrol eden ve hücre çevresinde bir lipit zarf oluşturan hidrofobik bir moleküldür. Bakteriyi fagositik radikaller, lizozim ve oksijen gibi saldırılardan korur (Todar 2008). Mikobakterilerin hücre duvarı yapısı karmaşık bir yapıdır ve gram (+) ve gram (-) bakteri türlerinin hücre duvarı yapısından oldukça farklıdır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Gram (+), gram (-) ve mikobakteri hücre duvar yapıları şematik gösterimi (Matee 2011).

Mikolik asitler arabinogalaktan molekülleri yoluyla en içteki peptidoglikan tabakasına bağlanır. Mikolik asit, arabinogalaktan ve peptidoglikandan oluşan bu sağlam yapı dışarıda yer alır ve mikobakteri hücresini bir kalkan gibi sarar. Bu yapının sağlamlığı lipoarabinomannan, manofosfosinositid, serbest lipit ve polipeptitlerin dahil edilmesiyle daha da geliştirilir (Şekil 2.6) (Brennan *et al*. 2003).



Şekil 2.6 *M. tuberculosis* hücre duvarı yapısı (Brennan *et al.* 2003).

Bu kalın lipit bakımından zengin hücre duvarının boyalarla renklendirilmesi zordur, hücrede mikroskobik inceleme için uygulanan birçok boyanın geçişini önler. Bu nedenle, mikobakterileri boyamak için, diğer bakteriler için kullanılan boyama yöntemlerine kıyasla farklı boyama yöntemleri kullanılır (Van-Deun *et al*. 2008). Mumsu kıvamı, birçok ilaç molekülünün hücreye girmesini önleyerek doğal direnç oluşturur. *M. tuberculosis*'e karşı etkili ilaçlar ilk önce bu tabakadan kolayca geçmelidir (Ryll *et al*. 2001).

Özellikleri nedeniyle benzersiz olan TB basilinin yavaş büyüme hızı ve bilinen birçok ilaca karşı direnci, hücre duvarının düşük geçirgenliğinden kaynaklanmaktadır. Lipitlerdeki zenginliğin yanı sıra, hücre duvarındaki geçiş kanallarının diğer bakterilerden daha az olması, düşük geçirgenlikte rol oynar (Niederweis 2003).

2.3 Virülans Faktörleri

Bilinen en önemli insan patojenlerinden biri olmasına rağmen, *M. tuberculosis*'in patojenitesi hakkında çok az şey bilinmektedir. 1890'larda Robert Koch, TB basilinin toksin üretmediğini gösterdi. Bugün, hastalığın patolojisine bakıldığında, konağın bakteriyel antijenlerin birçoğuna karşı hücre aracılı bir bağışıklık yanıtı ve enflamatuar tepki geliştirdiği bilinmektedir (Pym and Small 2006).

M. tuberculosis virülansı olağanüstü karmaşık ve çok yönlüdür. Bakteri doğal olarak toksin üretmemesine rağmen, büyük bir virülans repertuarına sahiptir. MTB'nin virülans faktörleri genellikle 2 gruba ayrılabilir: proteinler ve hücre duvarının bileşenleri.
M. tuberculosis, bakteriyel patojenler arasında benzersizdir, çünkü hücre yüzeyinde çok çeşitli kompleks lipitler ve lipoglikanlara sahiptir (Converse *et al*. 2003). Hücre duvarının bu özel lipitlerinin patogenezde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir; bu nedenle biyosentez ve taşınmadan sorumlu genler virülans faktörleridir.

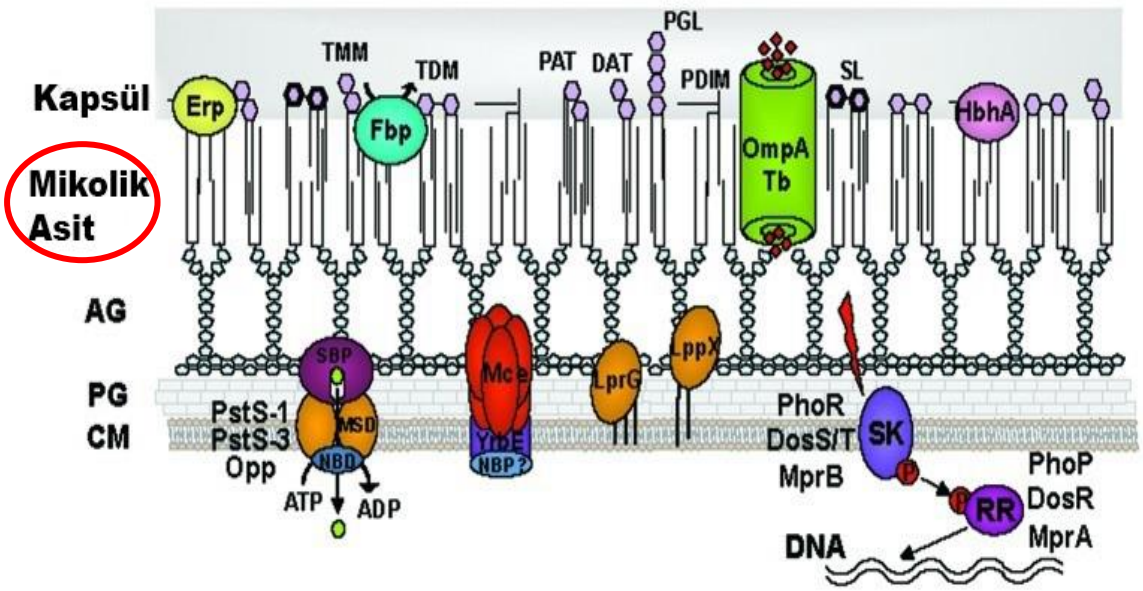
Mikolik asitler, mikobakteriyel sağkalım ve biyofilm oluşumu için gereklidir (Portevin *et al*. 2004; Ojha *et al*. 2005). Mikolik asitler tüm mikobakteriyel türler için ortak bir özellik olmasına rağmen, *M. tuberculosis* ayrıca hücre zarfında bulunan çok sayıda kompleks

lipid ve glikolipit ile karakterizedir. Bu lipitler ve glikolipitler hücre zarfı ile gevşek bir şekilde ilişkilidir ve bu nedenle konakçının bağışıklık tepkisini modüle edebilir veya patojen için enfeksiyon durumu sinyalleri olarak işlev görebilir.
Bağışıklık sistemi MTB bakterilerini kolayca tanımayabilir ve onu ortadan kaldıracak kadar reaksiyon göstermeyebilir. Hücre duvarındaki yüksek lipit konsantrasyonu, antimikrobiyal ajanlara, hücre içi ve hücre dışı ortamda asit ve alkali bileşiklerin öldürücü etkisine ve ayrıca lizozomların ozmotik lizisine direnç sağlar (Niederweis 2003).

Fenolik glikolipitlerin varlığı immünosupresyon (Reed *et al*. 2004) ve sulfolipitler sağlar, makrofajların enfektivitesini arttırır, IFN-gama tarafından primingi engelleyerek makrofajların aktivasyonunu değiştirir (Pabst *et al*. 1988). Kordon faktörü (trehaloz 6,6′ dimikolat), *M. tuberculosis*'in virülansı ile ilişkili, memeli hücrelerinde toksik bir ajan ve inhibitör olarak işlev gören bir glikolipiddir (Todar 2008).

M. tuberculosis, fagositoz sırasında üretilen oksijen radikallerinin toksik etkileriyle üç mekanizma ile savaşabilir: 1) Glikolipit içeren bileşikler oksidatif sitotoksik mekanizmayı düzenler. 2) Makrofajların tamamlayıcı reseptörler aracılığıyla emilmesi, bir nefes patlamasının aktivasyonunu atlayabilir.3) Oksidatif patlama, katalaz ve enzim süperoksit dismutaz üretimi ile inaktive edilebilir. Antijenik kompleks *M. tuberculosis* tarafından salgılanan bir protein grubudur. Bu proteinler bakterilerin hastalığa neden olan mekanizmasına katkıda bulunur (Cole *et al*. 1998).

M. tuberculosis'te, virülansa bağlı genler, genin etkisiz hale getirildiği suşların hayvan modellerinde hastalık oluşturma durumlarına göre belirlenmektedir (Pym and Small 2006). *M. tuberculosis*'in virülans faktörleri, bilinen veya beklenen fonksiyonlara göre gruplandırılır (Şekil 2.7) (Smith 2003).



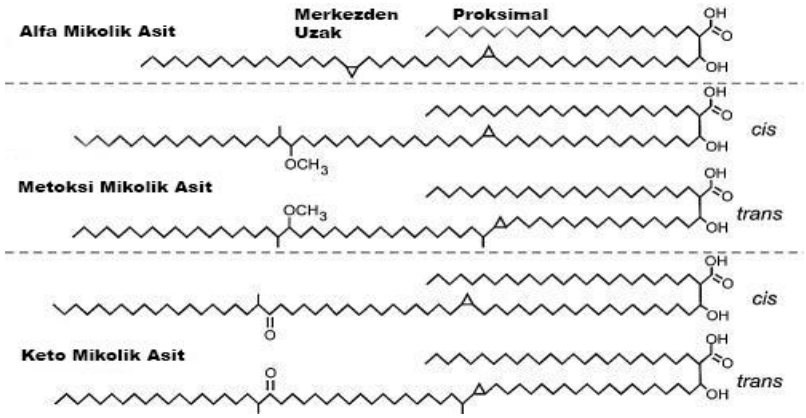
Şekil 2.7 *M. tuberculosis* hücre duvarı yapısında bulunan hücre yüzey proteinlerinin şematik gösterimi (Forrellad *et al.* 2012).

2.4 MmaA4 (Mikolik asit metiltransferaz)

M. tuberculosis uzun süreli hayatta kalma yeteneğine sahip, hücre içi insan patojeni olarak, bu başarısından büyük ölçüde sorumlu olan yüksek derecede hidrofobik bir hücre zarfının varlığı ile ayırt edilir (Brennan and Nikaido 1995; Daffe and Draper 1998). Mikobakteriyel suşların lipit hücre zarfı, hücrenin kuru ağırlığının %60'ı kadar olabilir (Brennan and Nikaido 1995). Hücre zarfı, mikolik asit olarak adlandırılan, daha düşük bir arabinogalaktan tabakasına bağlanan son derece uzun zincirli yağ asitlerini içerir (Kremer *et al*. 2000; Takayama *et al*. 2005).

M. tuberculosis'teki mikolik asitler, uzun bir alfa-alkil yan zinciri olan β-hidroksi yağ asitleridir ve üç tipi bulunur: alfa, metoksi ve keto mikolik asitler (Şekil 2.8) (Asselineau and Ledrer 1950). En bol formu alfa mikolik asitlerdir (>%70), metoksi ve keto-mikolik asitler küçük bileşenlerdir (%10 ila 15) (Qureshi *et al*. 1978). *M. bovis* BCG aşı suşu, benzer bir mikolik asit profiline sahiptir, ancak metoksi mikolatları yoktur. Hücre duvarı lipitleri, özellikle mikolik asitlerin sentezi, mikobakterilerin in vivo hayatta kalması için gereklidir.

Rv0642c olarak da bilinen MmaA4, *Mycobacterium* ailesinin hücre içi proteinlerinin bir üyesidir. 906 bç uzunluğundaki *mmaA4* geni, 301 amino asit uzunluğunda ve 34.6 kDa molekül ağırlığına sahip bir proteini kodlar (Şekil 2.9-2.10). *M. bovis*'te de bir benzeri mevcuttur ancak BCG suşları, metoksi-mikolik asitleri üretme kapasitelerinde farklılık gösterir (Minnikin *et al*. 1983). Metoksi-mikolik asitlerin varlığı, hidroksikolik asit öncülerinin O-metilasyonunu katalize eden MmaA3'e bağlıdır (Yuan *et al*. 1998)



Şekil 2.8 *M. tuberculosis*'in mikolik asitlerinin kimyasal yapıları (Takayama *et al*., 2005).

```
atgacgagaatggccgagaaaccgattagcccaaccaagacacggacacgcttcgaagacatccaagcgcactacga
cgtctccgatgatttcttcgccctgttccaggacccgacccgaacttacagctgtgcctacttcgagccaccggagc
tcacgctcgaagaagcccaatacgccaaggtcgacctcaacctggacaagctggacctcaagccgggcatgacgctg
ctggacattgggtgcggttggggcaccaccatgaggcgcgccgtcgagcggttcgacgttaacgtcatcggcctgac
gttgtccaagaaccagcacgcccgctgcgagcaagtgctggcttcgatcgacaccaaccgctcacgtcaagtgctgc
tgcaaggctgggaggatttcgccgaacccgtcgaccggattgtgtcgatcgaagccttcgagcacttcgggcacgag
aactacgacgacttcttcaagcggtgtttcaacatcatgcccgccgacggccggatgaccgtccagagcagcgtcag
ctaccacccctacgagatggcggcccgcggtaagaagctgagcttcgagacggcgcgtttcatcaagttcatcgtca
ccgagatatttcccggcggccgcctgccgtccaccgagatgatggtcgaacacggcgagaaggccggtttcaccgtc
ccggagccgctctcgttgcgcccgcattacatcaagacgctgcggatctgggggacacgctgcagtccaataagga
caaggccatcgaggtcacctccgaagaggtctacaaccgctacatgaagtatttgcgtggctgcgagcactacttca
ccgacgagatgctcgactgcagcctggtgacctacctcaagccgggtgccgcggcctaa
```

Şekil 2.9 *M. tuberculosis* H37Rv *mmaA4* geninin nükleotit dizisi (Anonim 2020a).

```
MTRMAEKPISPTKTRTRFEDIQAHYDVSDDFFALFQDPTRTYSCAYFEPPELTLEEAQYAKVDLNLDKLDLKPGMTL
LDIGCGWGTTMRRAVERFDVNVIGLTLSKNQHARCEQVLASIDTNRSRQVLLQGWEDFAEPVDRIVSIEAFEHFGHE
NYDDFFKRCFNIMPADGRMTVQSSVSYHPYEMAARGKKLSFETARFIKFIVTEIFPGGRLPSTEMMVEHGEKAGFTV
PEPLSLRPHYIKTLRIWGDTLQSNKDKAIEVTSEEVYNRYMKYLRGCEHYFTDEMLDCSLVTYLKPGAAA
```

Şekil 2.10 *M. tuberculosis* H37Rv MmaA4 proteininin aminoasit dizisi (Anonim 2020a).

mmaA4 geninin bulunmadığı hücrelerde, mikoitlerin paterninde büyük bir farklılık nedeniyle hücre zarfının geçirgenliğinde ve akışkanlığında bir azalma meydana gelir. MmaA4'ün inaktivasyonu tiasetazona güçlü direnç kazandırır.

Alfa-mikolatların proksimal siklopropan döngüsünün baskılanması, enfekte olmuş farelerde uzun süreli kalıcılığı etkiler (Glickman *et al*. 2000). Ek olarak, keto ve metoksikolatların baskılanması, fare enfeksiyonu modelinde mukabil *M. tuberculosis* mutant suşunun sınırlı büyümesiyle sonuçlanır (Dubnau *et al*. 2000). Virülans ve patojenisite üzerindeki ciddi etkilere ek olarak, mikolatların yapısal ve kantitatif varyasyonları, hücre zarfının çözünenlere geçirgenliği açısından çok önemli biyolojik öneme sahip olabilir (Liu *et al*. 1996; Jackson *et al*. 1999; Dubnau *et al*. 2000; Gao *et al*. 2003). Bu nedenle, mikolatların kimyasal modifikasyonlarında yer alan enzimlerin yapı-işlev ilişkilerinin incelenmesi özel dikkat gerektirir. Bu, çoklu ilaca dirençli suşlar dahil olmak üzere *M. tuberculosis* için yeni, daha etkili anti-TB ilaçlarının bulunmasına yardımcı olacaktır.

2.5 Aşı Geliştirme ve Aşı Tipleri

İnsanlarda ve hayvanlarda humoral ve hücresel yolların aktif bağışıklığını uyararak enfeksiyonlara karşı koruma sağlayan biyolojik maddelere aşı denir (Kocagöz 2014). Aşı birkaç yüz yıl boyunca uygulandı, ancak modern anlamda aşılama ilk defa 1796'da çiçek hastalığından muzdarip bir çocuk üzerinde Edward Jenner tarafından gerçekleştirildi. Daha sonra Louis Pasteur, kuduz veya kolera gibi çeşitli hastalıklara karşı birçok aşı üreterek aşılamanın ikinci kurucu babası oldu.

Bu uygulama şu anda bilimsel, etik, politik, tıbbi güvenlik, dini ve diğer nedenlerden dolayı kuruluşundan bu yana pek çok tartışmaya neden olmaktadır. Bu eleştirilere rağmen, Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre aşılamayla 2003 yılında 2 milyondan fazla ölümün önlendiği tahmin edilmektedir (Anonim 2020b). Vücudun bağışıklık yanıtını uyarmak aşılamanın temelidir. Aşılar, doğal bağışıklık tepkisini uyararak ve antijen sunan hücreleri aktive ederek patojene karşı koruyucu bir bağışıklık tepkisi oluşturur (Di Pasquale 2015). Aşılar etkili olmalı, uzun süre bağışıklık sağlamalı, dayanıklı olmalı, tek bir dozla yeterli bağışıklık sağlamalı, yan etkisi olmamalı ve toksik olmamalı, ucuz olmalı, bulunması kolay, güvenilir olmalıdır (Klegerman 1992).

İlk aşılamalar zayıflatılmış bir patojeni aşı olarak uygulayarak bir hastalığa karşı insanları immünize etmekten ibaretti, ancak şu anda birkaç aşı türü bulunmaktadır (Nizar 2009) (Anonim 2020c).

2.5.1 Canlı aşılar

Canlı zayıflatılmış aşılar, genellikle hastalığa neden olmayacak şekilde patojenik güçlerini kaybeden mutasyona uğramış virüs veya bakteriyel patojenlerden oluşur. Bu aşı türü hastalıklara karşı bağışıklık kazanmada çok etkilidir. Canlı bulaşıcı ajanlar içeren bu aşılar hamile kadınlarda ve zayıflatılmış virülansları nedeniyle immün sistemi baskılanmış insanlarda kontrendikedir. Canlı zayıflatılmış aşılar, imalat ve üretim koşullarından dolayı en çok kullanılanlardır. Ayrıca doğal bağışıklığa yakın bağışıklığa neden olurlar. Koruyucu hücreleri (B ve T lenfositler) aktive ederek doğal bağışıklık ile aynı semptomlara neden olurlar. Bu tip bir aşı ile tek bir doz kullanılarak kesin ve etkili bir immün yanıt elde edilebilir. Patojenin tersine çevrilmesi, tekrar patojenik hale gelebilmesi ve böylece çocuk felci virüsünde olduğu gibi kişiler için zararlı olma olasılığı vardır (Anonim 2020d). Günümüzde TB'a karşı kullanılan tek lisanslı aşı, *M. bovis*'in zayıflatılmasıyla elde edilen canlı BCG aşısıdır.

2.5.1.1 BCG Aşısı

1900'de Albert Calmette ve Camille Guérin, Lille'deki Institut Pasteur'da TB aşısı için araştırmalarına başladılar. Bir gliserin ve patates ortamı üzerinde tüberkül basilini büyüttüler, ancak basilin homojen bir süspansiyonunu üretmenin zor olduğunu buldular. Bir araya toplanma eğilimlerine karşı koymak için, ortada sığır safrası eklemenin etkisini denediler ve sürpriz bir şekilde, altkültürün virülansta bir azalmaya yol açtığını belirttiler. Bu tesadüfi gözlem, zayıflatılmış TB basilinden bir aşı üretimi için uzun vadeli bir proje yürütmelerine neden olmuştur (Calmette 1922). 1908'de, Nocard tarafından sağlanan virülan bir sığır TB suşunu (başlangıçta 1902'de bir TB ineğin memesinden izole edildi), safra, gliserin ve patates ortamlarında yetiştirdiler, sonra yaklaşık üç haftalık aralıklarla alt kültür yaptılar. 11 yıl boyunca gerçekleştirilen yaklaşık 230 alt kültürden sonra, 1919'da kobay, tavşan, sığır veya atlara enjekte edildiğinde ilerleyici TB üretmeyen bir TB basili elde edildi. Guérin'in önerisiyle, Bacille Bilie Calmette-Guérin adı önerildi; daha sonra "Bilie" yi atladılar ve BCG doğdu (Calmette 1922). 1921'de Calmette, insan aşısının uygulama zamanının geldiğine karar verdi. BCG'nin ilk insan uygulaması, Paris'teki Charité hastanesinde Raymond Turpin'in desteklediği Benjamin Weill-Halle tarafından gerçekleştirildi. Bir kadın sağlıklı bir bebek doğurduktan birkaç saat sonra TBdan öldü. 18 Temmuz 1921'de Weill-Halle ve Turpin bebeğe oral dozda BCG uyguladılar. İstenmeyen sekeller yoktu. Oral yol seçildi çünkü Calmette gastrointestinal sistemi tüberkül basili ile normal enfeksiyon yolu olarak kabul etti. Weill-Halle daha sonra diğer bebeklerde subkütan ve kutanöz yolları denedi, ancak lokal reaksiyonlar ebeveynler tarafından tartışıldı ve bu nedenle oral yöntem devam etti.

1940'ların sonlarında, TB'a karşı korunmada BCG'nin yararlı olduğuna dair kanıtlar sunan çeşitli çalışmalar ortaya çıkmıştır. TB, İkinci Dünya Savaşı sonrasında önemli bir endişe haline geldi ve BCG kullanımı teşvik edildi. Özellikle UNICEF ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından teşvik edildi. BCG, Birleşik Krallık'ta ergen TB hastaları için rutin olarak tavsiye edilirken, ABD'de rutin kullanım için önerilmedi, ancak kullanım bazı yüksek riskli popülasyonlarla sınırlıydı. Dünyanın büyük bir kısmı Avrupa ve DSÖ örneğini izledi ve çeşitli programlara göre (örneğin doğumda, okula girişte, okul çıkışında) sistematik BCG aşılaması yapıldı.

BCG aşısı, TB basilinin yaptığı gibi T lenfositleri ve buna bağlı olarak makrofajları aktive ederek TB'a karşı bir immün yanıt geliştirir. BCG aşısı olan bireylerde yine de reenfeksiyon olabilmektedir. Ancak daha önce aşının oluşturduğu immün yanıt nedeniyle bu basiller akciğerlerde sınırlanmaktadır. BCG aşısı, bebekleri %80-90 oranında korurken erişkinlerde bu oran %50'dir. Aşının erişkinlerde tam koruması yoktur fakat hastalığın vücuda yayılmasını engellemektedir (Gökçay vd. 2000). BCG aşısının sağlamış olduğu bağışıklık süresi belli değildir. İlerleyen yaşlarda korumanın azaldığı, aşılamanın ardından bağışıklığın 20 yıl gibi bir zaman zarfında kaybolduğu tespit edilmiştir (Aronson *et al*. 2004).

Aşıdan sonra görülen komplikasyonlar, aşının dozuna, aşılama yeri ve derinliğine, aşılanan kişinin yaşına, bağışıklık sistemini özelliğine bağlı olarak gelişmektedir (Kıter ve Uçan 2001). Yapılan yeni aşı çalışmalarındaki hedefler belirli başlıklar altında toplanmıştır. Bunların başında, i) BCG'den daha etkili ve uzun süreli bağışıklık sağlanması, ii) adölesan ve erişkinlerde akciğer TB gelişiminin engellemesi, iii) enfekte olmuş kişilerde hastalık gelişiminin engellemesi, iv) etkili bir immünoterapotik aşı geliştirerek tedavi uygulamalarında azalma sağlanması, v) BCG ile aşılı kişilerin de yeni aşı ile korunabilmesi, vi) HIV'le enfekte kişilerde de emniyetle kullanılması gelmektedir (Martin 2005).

Hala BCG'nin yerini alabilecek veya BCG ile birlikte kullanılabilecek aşı çalışmaları devam etmektedir. Bunlar, canlı olmayan ve canlı aşılardır. Canlı olmayan aşılar, yenilebilir ve altbirim aşılar, DNA aşıları iken canlı aşılar, attenüe *M. tuberculosis*, rekombinant BCG'dir (Lin and Ottenhoff 2008). TB hala AIDS'den sonra gelen ölümcül bir hastalık olmaya devam etmektedir. Bu nedenle, BCG aşısının yerine daha iyi bir aşı geliştirmek veya BCG aşısını geliştirmek için çalışmalar başlatılmıştır (Brennan *et al*. 2007).

1950-1975 yılları arasında TB hastalığına karşı yapılan aşı çalışmalarında, *M. tuberculosis*'in çeşitli hücre duvarı ya da inaktive edilmiş bileşenleri kullanılmış olup birçok çalışmada BCG'ye eşdeğer veya BCG'den daha iyi koruma potansiyeli olduğu belirtilmiştir. Ancak, bazı çalışmalardaki spesifik olmayan bir enflamasyon cevabından

dolayı bu aşı adaylarının uzun süreli koruma potansiyelleri sorgulanmıştır (Agger and Andersen 2001).

En umut verici stratejiler arasında yenilebilir aşılar olarak bilinen antijenleri taşıyan bitkisel aşılar bulunmaktadır. Mevcut aşılara kıyasla özgüllük, güvenlik ve kolay bulunabilirlik gibi özelliklere sahiptir.

2.5.2 İnaktif aşılar

İnaktif aşılar, kimyasallar veya ısı ile denatüre edilmiş veya öldürülmüş hastalık yapıcı etkeni içerir. Canlı aşılara göre daha güvenlidirler. İlk doz genellikle koruyucu bağışıklık sağlamaz, bağışıklık sistemini hazırlar (Ada 2003). Tüm inaktif aşılar hamile kadınlarda ve immün sistemi baskılanmış bireylerde kullanılabilir. Etkili olması için, inaktif aşıların bir adjuvan ile birleştirilmesi gerekir. Yardımcı maddeler, antijenleri enjeksiyon bölgesinde yeterince uzun süre tutmak ve bunların giderilmesini kolaylaştırmak için tasarlanmıştır. Luis Pasteur inaktive edilmiş (öldürülmüş) mikroorganizmaların aşı olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Adams *et al*. 2011). Zayıflatılmış aşılara göre bu aşılar önemli ölçüde yüksek dozlar halinde ve daha sık uygulama gerektirmektedir (Ada 2003).

2.5.3 Alt ünite aşılar

Alt birim aşılar genellikle, hepatit B veya tetanos aşısında olduğu gibi bulaşıcı ajanın bir kısmını içerir. Bu aşı tipine alt birim aşılar denmesinin nedeni viral partiküller, fraksiyonlu enfeksiyöz ajanlar, detoksifiye toksinler, hücre membranı (bakteriyel veya viral proteinler) içermesidir. Kapsüler antijenler ise (pnömokokların veya meningokokların polisakaritleri) birkaç basit şekerden oluşan karbonhidratlardır.

Bazı bakterilerin yüzeyinde bulunan polisakkaritler, bakterilerin patojenik potansiyelinde rol oynar. Genellikle menenjit aşısında olduğu gibi taşıyıcı proteinlerle konjuge edilirler. Tek bir doz aşı, belirli hastalıklar için bağışıklık sistemini aktive edemez, bu nedenle repel dozların veya konjuge aşıların kullanılması gerekmektedir.

2.5.4 Yenilebilir aşılar

Son yıllarda, yenilebilir aşılar gündemde yerini almıştır. Daha verimli olmaları, aynı zamanda daha ucuz olmaları gibi avantajları ile bir fırsat olarak kabul edilirler. Yenilebilir aşılar, bitkilere ve onların ürünlerine dayalı aşılardır. Bitkiler genetik olarak genellikle bir plazmit ve *Agrobacterium tumifaciens* yardımı ile transgenez yoluyla veya biyolojik olarak bombardıman yoluyla değiştirilir ve bağışıklık sisteminin reaksiyonunu tetikleyebilecek zararsız bakteriyel/viral proteinleri taşır (Mason and Arntzen 1995).

Yenilebilir aşılara dayalı aşılar ağız yoluyla kullanılır. Vücuda girebilmesi için yiyecekler yutulmalıdır. Aşıların vücut içerisine entegrasyonu, bu tür aşılarla ilgili temel sorunlardan biridir. Yenilebilir aşılar aşılama için etkili bir mekanizmaya sahiptir çünkü bağışıklık tepkisini uyarmak için yardımcı elemanlar gerektirmezler. Geleneksel aşıların aksine, yenilebilir aşılar, M hücrelerini daha kolay aktive ederek mukozal bağışıklık sağlayabilirler (Lal *et al*. 2007). Oral uygulama, bir bağışıklık sistemi yanıtı üreterek, mukoza zarlarının bir bağışıklık tepkisinin uyarılmasında etkilidir (Streatfield 2006).

Geliştirilen ve halen ishale karşı aşı olarak kullanılan çeşitli yenilebilir aşı türleri vardır. Bu aşılarda domates bitkileri kullanılmış ve antijenik proteinler üretilmiştir. Bu domateslerin tüketimi bağışıklık sisteminin aktivasyonuna neden olabilir. Proteinleri üretmek için çeşitli tiplerde bitkiler kullanılabilir, bu onların üretim, tüketim ve verimliliklerine bağlı olacaktır. Yenilebilir aşılar düşük maliyetlidir ve nakliye ve depolama maliyeti yoktur. Transgenik bitkilerin soğuk zincirde depolanması gerekmez, çünkü transgenik bitkilerin tohumları daha az nem içerir ve kolayca kurutulabilir. Yenilebilir aşılar ayrıca tıbbi ekipman için düşük bir maliyete sahiptir çünkü uygulama için şırıngalara gerek duyulmaz (Streatfield 2006; Xu *et al*. 2011). Daha az sağlık uzmanına ihtiyaç vardır (Streatfield 2006).

2.6. Aşıların Uygulama Yolları

Şu anda birkaç aşı çeşidi vardır ancak hepsinde aynı uygulama şekli yoktur. Uygulama yolu, aşının vücut ile temas ettiği yoldur. En uygun aşılama için uygulama başarıyla gerçekleştirilmelidir. Aşıyı vücutta uygulamak için çeşitli mekanizmalar vardır (Pierre and Fletcher 2000). Enjekte edilebilir aşılar, doku, vasküler veya nörolojik yaralanma riski olmayan bölgelerde uygulanmalıdır.

İntramüsküler enjeksiyon (IM): Aşının kas kütlesinde (kuadriseps kası ve deltoid kası) uygulanmasına izin verir.

Subkutan enjeksiyon (SC): Aşı subkutan tabakada, kasın üstünde ve cildin altında uygulanır. Deri altı yol viral aşılar için tavsiye edilir ve bazı konjuge olmayan ve pnömokok için isteğe bağlıdır.

İntradermal enjeksiyon (ID): Aşının cildin üst katmanına uygulanmasına izin verir. BCG bu uygulama yolunun kullanıldığı tek aşıdır. BCG aşısının intradermal enjeksiyonu nörovasküler yaralanma riskini azaltır. Sağlık çalışanlarına göre, BCG yenidoğan kollarının küçük boyutlarından dolayı uygulanması en zor aşıdır. BCG için küçük, ince bir iğne (15 mm, 26 ayar) gerekir. Diğer tüm aşılar, daha uzun ve daha geniş bir iğne (genellikle 25 mm, 23 ayar), SC veya IM ile verilir.

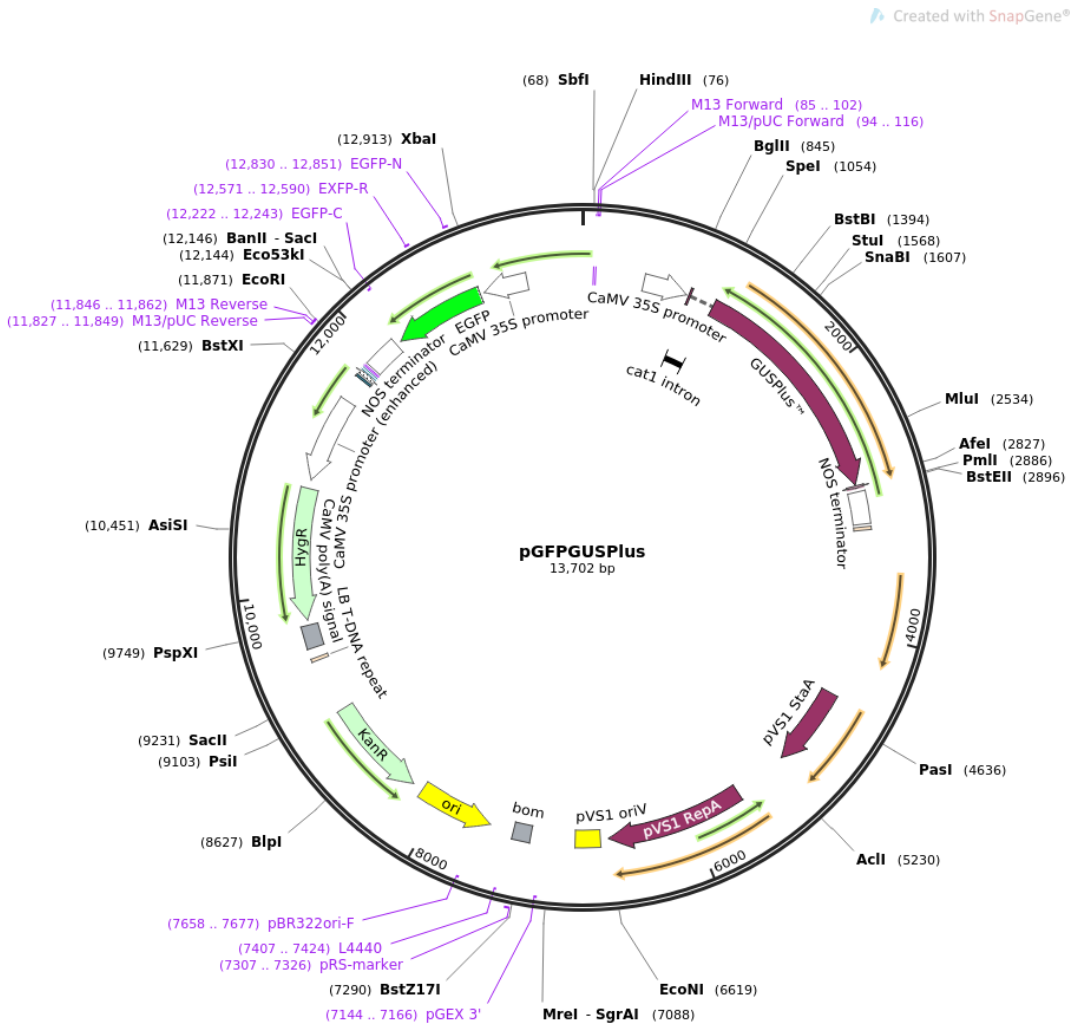
Mukozal yol (oral/intranazal): Transkütan yolun dışında, enfeksiyöz ajanlar vücuda mukoza zarından ve özellikle sindirim kanalından da girebilir. Elli yıldan fazla bir süre önce oral çocuk felci aşısı getirildi. Bir aşının burun spreyi uygulaması, aşılanmış kişinin burun mukozasına uygulanmasına izin verir. Bu aynı zamanda yenilebilir aşılar için de geçerlidir. Bu uygulamada iğne ve şırınga kullanımına gerek kalmaz.

Bağışıklık sistemimizin ilk koruyucu bariyeri olan mukoza zarlarıyla temas, onları daha da ilginç kılmaktadır. Bu aşıların tüketimi ile B ve T lenfositleri gibi immün hücrelerin aktivasyonu, immün sistemin aktivasyonunda ana adımdır. Bağışıklık sisteminin gıdalarla aktifleştirilmesi, vücudu kısa vadede ve aynı zamanda uzun vadede B hücrelerinin hafızasıyla koruyabilen bir bağışıklık hücresi oluşumuna yol açar.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Bakteri ve Plazmitler

M. tuberculosis mmaA4 geni daha önceden pGEM-T Easy plazmidine klonlanmış şekilde *Escherichia coli* DH5α bakterisinde saklandı (Okay vd. 2019). *mmaA4* genini tütün bitkilerine aktarmak için pGFPGUSPlus (Şekil 3.1) plazmidi kullanıldı. Klonlama deneylerinde *E. coli* DH5α, bitki transformasyonu için *Agrobacterium tumefaciens* bakterileri kullanıldı.



Şekil 3.1 pGFPGUSPlus vektörünün haritası (Anonim 2020e).

3.2 Bakterileri Büyütme ve Saklama Koşulları

Luria Broth (LB, Ek 2) sıvı besiyeri *E. coli* DH5α ve *A. tumefaciens* bakterilerinin büyümesi için, Luria Agar (LA, Ek 2) katı besiyeri ise bakteri örneklerinin saklanması için kullanıldı. Büyütülen bakteri kültürleri +4°C'de muhafaza edildi ve aylık alt kültürler yapılarak canlılıkları devam ettirildi. Bakteri kültürlerinin uzun süreli canlılıklarını korumak amacı ile %50 gliserol içiren LB içerisinde -80°C'de depolandı. LB ve LA besiyerlerine kanamisin 30 µg/ml konsantrasyonda eklendi.

3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

M. tuberculosis mmaA4 geninin aktarımlarının doğrulanması için PZR gerçekleştirildi. PZR karışımı, PZR 1X tamponu (Fermantas), $MgCl_2$ 5 µL (Fermentas), dNTP karışımı 1 µL (Fermentas), ileri ve geri primer 1 µL, *Taq* DNA polimeraz 1 U/µL (Fermentas) ve 2 µL DNA ile hazırlandı. Karışımın toplam hacmi, dH_2O ile 50 µl'ye tamamlandı.
PZR'de kullanılan primerler ve ürünlerin boyutu Çizelge 3.1'de, PZR koşulları ise 3.2'de gösterildi. PCR ürünleri,% 1'lik bir agaroz jeli üzerinde görüntülendi.

Çizelge 3.1 PZR'de kullanılan ileri ve geri primer özellikleri

Gen adı	Primer adı	Nükleotit sekansı	Gen uzunluğu (bç)
mmaA4	MMAF	5'-ggatccatgacgagaatggccga-3'	906
	MMAR	5'-agatctttaggccgcggcaccc-3'	906

Çizelge 3.2 Kullanılan primerler ve PZR programı

PZR ürünü	**Kullanılan primer**	**PZR koşulları (35 döngü)**
mmaA4	MMAF ve MMAR	Başlangıç denatürasyonu: 94°C'de 5 dakika Denatürasyon: 94°C'de 1 dakika Primer bağlanma: 60°C'de 30 saniye Uzama: 72°C'de 1 dakika Son uzama: 72°C'de 10 dakika

3.4 Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi için TAE tamponunda (Ek 3) %1'lik jel hazırlandı. DNA örnekleri jele 10X DNA yükleme boyası ile yüklendi. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra 60 dakika boyunca 90 volt elektrik akımında çalıştırıldı. Uygulamadan sonra agaroz jel, bir etidyum bromür çözeltisi (0,5 ug/ml, TAE tamponu) ile boyandı. DNA bantları bir UV lambası (Vilber Lourmat) ile görüntülendi. DNA bantlarının moleküler büyüklükleri, 1 kb DNA markerı (Ek 1) kullanılarak belirlendi.

3.5 Jel Ekstraksiyon

Arzu edilen DNA bantları, Thermo Scientific GeneJET jel ekstraksiyon kiti ile agaroz jelden alındı. Jel üzerine bağlama tamponu ilave edildi ve jel tamamen çözünene kadar 50-60°C'de bir su banyosunda inkübe edildi. Jel çözeltisi, GeneJET saflaştırma kolonuna ilave edildi ve 1 dakika boyunca 12.000 rpm'de santrifüjlendi. Saflaştırma kolonuna 700 µL yıkama tamponu ilave edildi ve 1 dakika boyunca 12.000 rpm'de santrifüjlendi. Kolon yeni bir steril eppendorf tüpe aktarıldı. Toplam 50 µL elüsyon tamponu, kolonun merkezine iki döngüde ilave edildi ve oda sıcaklığında 1 dakika tutuldu. 1 dakika boyunca

12.000 rpm'de santrifüjlendi. Doğrulama için, ürünler %1'lik agaroz jelde 60 dakika boyunca 90 voltta yürütüldü. Sonunda, saflaştırılmış DNA -20°C'de saklandı.

3.6 pGFPGUS(+) ile *mmaA4* Ligasyon Reaksiyonu

İzolasyonu gerçekleştirilmiş olan pGEMT-*mmaA4* *Bam*HI ve *Bgl*II, pGFPGUS+ ise sadece *Bgl*II restriksiyon enzimleri ile kesildi. Agaroz jelde yürütülüp jelden ekstrakte edilen fragmanlar ligasyonda kullanıldı. Ligasyon reaksiyonu için vektör (pGFPGUS+) ve insert (*mmaA4*) karıştırıldı ve üzerine 1X T4 ligaz tamponu (Promega), 5 ünite T4 ligazı (Promega) eklendi. Karışım 4°C'de 16 saat inkübe edildi.

3.7 *E. coli* DH5α Hücrelerine Transformasyon

Transformasyon işlemi için kompetan hale getirilen *E. coli* DH5α kullanıldı. Gece boyunca 37°C'de sıvı ortamda (LB) büyütülen kültür, daha sonra 200 ml sterilize edilmiş LB'ye aktarıldı. Bakteriler, çalkalayıcı inkübatörde 200 rpm'de 37°C'de, OD_{600}'de 0,4-0,6'ya ulaşana kadar büyütüldü. Steril falkon tüpleri kullanılarak 4500 rpm'de 4°C'de 5 dakika santrifüjlendi. Santrifüjün sonunda, 20 mL tampon 1 (Ek 3) ilave edildi ve 4500 rpm'de 4°C'de 5 dakika santrifüjlendi. Son olarak, filtre ile sterilize edilen 8 ml ikinci tampon (Ek 3) pelete ilave edildi ve pelet buz içinde çözüldü. Hücreler steril eppendorf tüplere ayrıldı ve -80°C'de saklandı.

Kompetan hücreler 15 dakika buz üzerinde tutuldu. Ligasyon ürünü veya plazmit ile kompetan hücreler karıştırıldı ve 30 dakika boyunca buz üzerinde tutuldu. Sürenin sonunda, hücreler 60-90 saniye boyunca 42°C'de bir su banyosunda termal şoka maruz bırakıldı. Termal şoktan sonra hücreler hızla buz üzerine alındı ve 5 dakika bekletildi. 5 dakika sonra antibiyotiksiz 700 µL LB ilave edildi. Karışım, bir çalkalayıcı inkübatörde 80 dakika süreyle 37°C'de 100 rpm'de inkübe edildi. Hücreler 6000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve bakteri peleti 100 µl LB içerisinde çözüldü. Hücreler, kanamisin içeren seçici bir ortam üzerine yayıldı. Bakteriler 37°C'de 16-24 saat inkübe edildi.

3.8 Plazmit İzolasyonu

pGFPGUS+ ligasyonu ile transformasyondan kaynaklanan kolonilerin taranması, plazmidin manuel izolasyonu ile gerçekleştirildi. Bir gece boyunca LA'da büyütülen bakteri kolonileri, pipet uçları ile steril bir ortamda kazınarak eppendorf tüplerine alındı. Tüplere 100 µL STE tamponu (Ek 3) ilave edildi ve çözünene kadar vortekslendi. Tüpler 20 dakika buz üzerinde tutuldu. Daha sonra 60 µL liziz tamponu (EK 3) ilave edildi ve vortekslendi. Tüpler 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve daha sonra 10 dakika boyunca bir su banyosunda 70°C'de inkübe edildi. Tüpler daha sonra 10 dakika boyunca oda sıcaklığında 12,000 rpm'de santrifüjlendi. Prosedürün sonunda, süpernatant (20 µl) ve 1X boya karışımı agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

Restriksiyon enzim kesimi yapılacak plazmit DNA örnekleri Thermo Scientific GeneJET Plazmid Miniprep kiti kullanılarak elde edildi. 100 µg/ml ampisilin içeren bir LB ortamında, bakteri kültürü gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra bir santrifüj yardımıyla, 1 dakika 12,000 rpm'de çöktürüldü. Bir pipet kullanılarak, 250 µL süspansiyon çözeltisi pelete ilave edildi ve pelet yok olana kadar pipetlendi. Daha sonra karışıma 250 µL lizis çözeltisi ilave edildi ve tüpler 4-6 kez çalkalanarak karıştırıldı. Karışıma 350 µL nötrleştirme çözeltisi ilave edildi. Tüpler, beyaz bir çökelti oluşana kadar baş aşağı karıştırıldı. Hücre lizatı, 12.000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüjlendi ve santrifüjün sonunda sıvı faz, GeneJET santrifüj kolonuna aktarıldı. 12,000 rpm'de 1 dakika santrifüjlemeden sonra iki tekrarla kolona 500 µL yıkama çözeltisi ilave edildi ve 1 dakika 12,000 rpm'de santrifüjlendi. Kolon yeni bir ependorf tüpüne yerleştirildi. Toplam 50 µL elüsyon tamponu, kolonun merkezine iki kez ilave edildi. 2 dakika boyunca 12.000 rpm'de santrifüjlendi ve plazmid DNA -20°C'de saklandı.

3.9 *Agrobacterium tumefaciens* Transformasyonu

Agrobacterium tumefaciens (AgT) hücreleri öncelikli olarak elektrokompetan hale getirildi. Bunun için hücreler 28°C'de 20 ml LB içinde 16 saat inkübe edildi, daha sonra 10 dakika boyunca 4500 rpm 4°C'de santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve hücrelere 5

ml Hepes ilave edildi. Hücreler 3 kez art arda 25 ml Hepes ile yıkandıktan sonra 10 ml Hepes içinde çözüldü ve eppendorf tüplerde -20°C'de saklandı.

A. tumefaciens elektroporasyonu için elektroporatör küvetine 200 µl elektrokompetan AgT hücreleri ve 3 µl pGFPGUS+*mmaA4* eklendi. BioRad MicroPulser cihazında AgT için önerilen program ile elektroporasyon uygulandı. Daha sonra hücrelerin üzerine 800 µl LB ilave edildi ve çok hızlı bir şekilde steril bir eppendorf tüpe aktarıldı. Hücreler 28°C'de 1 saat kültürlendi ve 6000 rpm, 20°C'de 2 dakika santrifüjlendi. Son olarak, kanamisinli LA plaklara yayılan hücreler 28°C'de 24 saat inkübe edildi.

3.10 Tütün (*Nicotiana tabacum* L.) Bitkisi Doku Kültürü ile Çoğaltılması

Bitki biyoteknolojisi bitki doku kültürü ve bitki genetik mühendisliği olmak üzere iki ana dala ayrılmıştır. Bitki doku kültürü; aseptik (steril) şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir (Babaoğlu vd. 2001). Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik çeşitlilik oluşturmak doku kültürünün temel amaçları arasında sayılabilir. Bu nedenle bitki doku kültürleri genetiksel iyileştirme çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır (Hatipoğlu 1999).

Tütün bitkisi ekonomik öneminin yanı sıra, doku kültürü ve moleküler düzeydeki çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Tütünden alınan eksplantlar, kültür koşullarında kolayca rejenere olma yeteneğindedirler. Örneğin yapraktan alınan somatik hücreler uygun doku kültürü şartlarında 1 veya 2 hafta içerisinde rejenere olabilirler (Murashige and Skoog 1962).

Çalışmada kullanılan tütünler, tohumların çimlendirilerek uygun doku kültürü şartlarında yetiştirilmesi ile elde edilmiştir. Malatya Şark Tütünü (*Nicotiana tabacum* L. cv Malatya)

tohumları, %15 klor içeren ticari sodyum hipokloritin birkaç damla Tween 20 ilave edilmiş %10'luk solüsyonunda, 10 dakika boyunca sterilize edilmiş ve ardından sodyum hipokloritin dokulardan uzaklaşması için 3 defa 5'er dakika süre ile steril saf su ile aseptik koşullarda çalkalanmıştır (Sezgin ve Dumanoğlu 2014). Steril edilen tohumlar, Murashige and Skoog (MS) besin ortamına 0.5 mg/L 6-benziladenin (BA), 0.01 mg/L Indol-3-butirik asit (IBA), 30 g/L sukroz ve8 g/L agar ilave edilerek pH'sı 5.7'ye ayarlanan ortama dikilmişlerdir. Besin ortamı dijital kontrollü otoklav ile 121°C ve 1,2 atmosfer basınç altında 20 dakika süreyle sterilize edilmiştir. Laminar hava akışlı kabin içerisinde aseptik şartlarda dikimleri yapılan tohumlar, 25±1°C sıcaklıkta ve tamamen karanlık koşullara sahip iklim kabininde 2 hafta süreyle inkübe edilmiştir. Çimlenen tohumlar yine MS besin ortamında, BA (1 mg/L) + IBA (0.1 mg/L), 30 g/L sukroz ve 8 g/L agar ilave edildikten sonra hazırlanan ortama dikilmişler ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşullarda inkübe edilmişlerdir. Yaklaşık 4 hafta sonra bu sefer bitki büyüme düzenleyici madde içermeyen ortama alınmışlardır. Bu şekilde hazırlanan tütünler gen transferi için uygun hale getirilmiştir.

3.11 Gen transferi protokolü

pGFPGUS+*mmaA4* ve kontrol grubu olarak pGFPGUS+ taşıyan AgT hücreleri, 2 gün boyunca 28°C'de kanamisin içeren YEP ortamında (EK 1) kültüre alınmıştır. Kültür yoğunluğu OD_{600}'de 0,5-0,8 olana kadar hücreler RM sıvısında (EK 3) seyreltilmiştir. In vitro şartlarda 4-8 hafta büyütülen tütün bitkisi gen transferi amacıyla kullanılmıştır. Bu aşamada tütün bitkilerinden aseptik koşullarda alınan yaprak diskleri (yaklaşık 1-2 cm çapında), MS besin ortamına BA 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L ve 30 g/L sukroz ile 8 g/L agar ilave edilmiş rejenerasyon ortamına (RM) dikilmişlerdir. Ortam pH'sı 5.6 olarak ayarlanmış ve otoklavda 121 ºC ve 1.2 atm basınç altında 20 dk steril edilmiştir. Tütün yaprağı diskleri tüplerde 50mL AgT kullanılarak enfekte edilmiştir. Yaprak diskleri, karanlıkta ve antibiyotik içermeyen bir ortamda 4 gün boyunca büyütülmüştür (Şekil 3.2). Bu süre sonrasında eksplantlar, 3 dakika boyunca bir kez cefotaxim Na (25mg/L) içeren sıvı RM ile yıkanmış daha sonra da higromisin içeren MS ortamına (EK 3) dikilmiştir. MS ortamına aynı zamanda BA 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L ve 30 g/L sukroz ile 8 g/L agar ilave edilmiştir (EK 3). 3 hafta boyunca 25±2ºC, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşularda

büyütülmüştür. Eksplantlar 3 hafta sonra antibiyotik ve büyüme düzenleyici madde içermeyen MS ortamında normal büyüme koşulları altında (25 ± 2ºC, 16 saat ışık) 3 hafta süreyle inkübe edilmiştir.



Şekil 3.2 pGFPGUS+*mmaA4* taşıyan *A. tumefaciens* ile tütün bitkilerinin transformasyonu.

3.12 Transgenik Tütün Bitkilerinin Doğrulanması

3.12.1 Bitkilerden DNA İzolasyonu

GeneJET Bitki Genomik DNA Saflaştırma Kiti (Thermo Scientific) kullanılarak üreticinin tavsiyelerine uygun olarak transgenik tütün bitkilerinden genomik DNA örnekleri elde edildi. Öncelikle, donmuş bitki örnekleri soğutulmuş havan kullanılarak öğütüldü. 350 µl Lizis Buffer A, numaralandırılmış eppendorf tüpüne eklendi. Ardından sonikasyon işlemi başlatıldı. Eppendorf tüp içindeki karışım, her seferinde 10 saniyelik bir duraklama ile toplam 1 dakika süreyle işlendi. Daha sonra karışıma 20 µl RNase A ve 50 µl Lizis Buffer B ilave edildi ve 65 ° C su banyosunda 10 dakika tutuldu. Bu süre boyunca homojen bir süspansiyon elde etmek için her 2-3 dakikada bir vortekslendi. Bu işlemden sonra karışıma 130 µl presipitasyon çözeltisi ilave edildi ve tüp 2-3 kez elle çalkalanıp buz üzerine yerleştirildi ve 5 dakika bekletildi. Daha sonra 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra tüplerde oluşan süpernatan kısım yeni numaralandırma ile steril Eppendorf tüpüne alındı. 400 µl bağlama solüsyonu ve 400 µl etanol eklendi ve 1 dakika vortekslendi. Daha sonra bu karışım, bir GeneJET genomik DNA saflaştırma kolonuna maksimum 700 µl'ye aktarıldı ve 8.000 rpm'de 1 dakika

santrifüjlendi. Geriye kalan karışım kolonlara ilave edilerek 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek kolon altına kalan sıvı döküldü. Daha sonra 500 µl yıkama tamponu I ilave edildi ve 10.000 ila 40 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi, kolon altında kalan sıvı döküldü. Daha sonra 500 µl yıkama tamponu II eklendi ve 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi, kolon altında kalan sıvı döküldü. Bu işlemden sonra kolon altındaki eppendorf tüpleri değiştirildi ve kolona 25 µL elüsyon tamponu ilave edildi 5 dakika bekledikten sonra 8,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı ve DNA örnekleri steril bir Eppendorf tüpüne alınarak 4 ° C'de tutuldu.

3.12.2 PZR

Transgenik tütün bitkilerinde *mmaA4* geninin varlığını doğrulamak için pGFPGUS+*mmaA4* ve pGFPGUS+ ile transformasyonu gerçekleştirilen tütün bitkilerine ait genomik DNA örnekleri, pozitif kontrol olarak da pGEMT+*mmaA4* plazmidi kullanılarak Bölüm 3.3'te anlatıldığı şekilde PZR işlemi gerçekleştirildi.

3.12.3 Bitkilerden Protein İzolasyonu

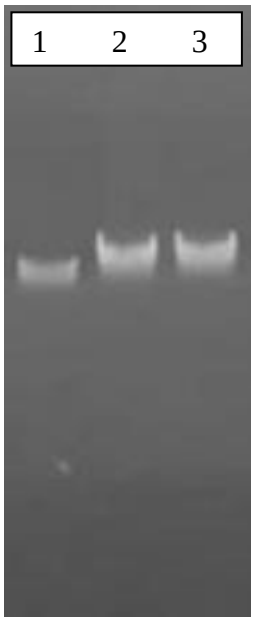
pGFPGUS+*mmaA4* ve kontrol grubu olarak pGFPGUS+ kullanılarak transformasyonu gerçekleştirilen tütün bitkilerinden protein izolasyonu yapıldı (Niu *et al*. 2019). Transgenik tütün yaprakları -80ºC'den alındı ve soğuk havan kullanılarak toz haline getirildi. Eppendorf tüplere alınan bitkilerin üzerine soğuk %10 trikloroasetik asit (TCA)/aseton karışımı eklendi. Bu karışım –20˚C'de bir gece inkübe edildi. Daha sonra, karışım 4˚C'de 5,000 g hızda 30 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatan uzaklaştırılarak pell*et al*ındı ve 4˚C'de 5,000 g'de 10 dakika santrifüjle soğuk aseton kullanılarak iki defa yıkandı. Pellet içerisindeki proteinler oda sıcaklığında 1-3 dakika bekletildi ve üzerlerin 20 mM DTT, %0,5 SDS ve 50 mM Tris-HCl (pH 6,8) içeren tampon çözelti eklendi.

3.12.4 Western Blot

Transgenik tütün bitkilerinde MmaA4 proteini varlığını doğrulamak için Western blot tekniği kullanıldı. Bitkilerden izole edilen protein örnekleri SDS-poliakrilamit jel elektroforezinde yürütüldü. Whatman kağıdı, poliakrilamit jel ve 0,2 μm nitroselüloz membran (Bio-Rad, Hercules, CA) 1Xtransfer tamponu (EK 3) kullanılarak ıslatıldı ve üst üate dizildi. Proteinlerin membrana transferi, Bio-Rad Mini Trans-Blot® Cell kullanılarak gerçekleştirildi. 1XTBS (EK 3) ile hazırlanmış %10 süttozu içerisine konulan membran 2 saat 37^{o}C'de inkübe edildi ve 10 dakika 1XTTBS (EK 3) ile yıkandı. Ardından, membran 1:400 oranında (%5 süttozu içerisinde) seyreltilmiş anti-MmaA4 primer antikor içerisinde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi ve 10 dakika 1XTTBS ile yıkandı. Daha sonra 6 μl:100 ml (%5 süttozu içerisinde) seyreltilmiş antimouse IgG sekonder antikor (Sigma) kullanılarak membran 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. 10 dakika 1XTTBS ile yıkanan membrana bantlar görülene kadar AP konjugat substrat (Bio-Rad, Hercules, CA) kiti uygulandı. Bantlar görünür hale gelince membran distile su ile yıkandı.

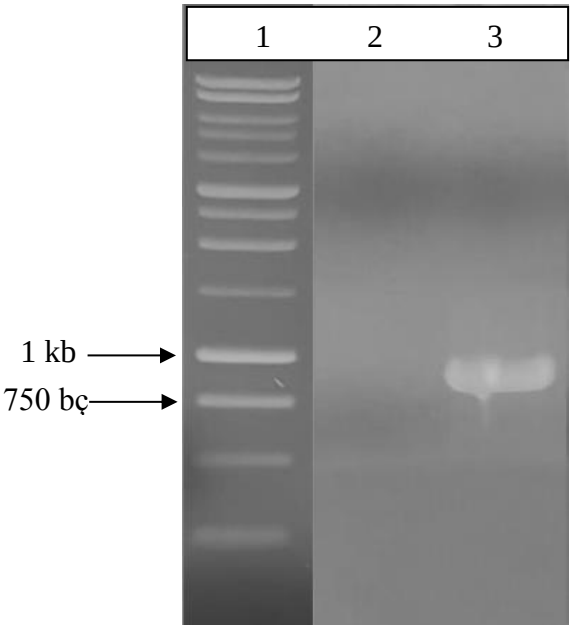
4. BULGULAR

*Bam*HI ve *Bgl*II ile pGEM-T plazmidinden kesilen *mmaA4* geni ve sadece *Bgl*II restriksiyon enzimiyle kesilmiş pGFPGUS+ vektörü kullanılarak ligasyon yapıldı. Ligasyon ürünleri *E. coli*'ye aktarıldı. *mmaA4* geninin pGFPGUS+ vektörüne başarılı bir şekilde aktarıldığı *E. coli*'den izole edilen plazmitlerle gösterildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 *E. coli*'den izole edilen pGFPGUS+*mmaA4* vektörünün doğrulanması. 1: pGFPGUS+ plazmidi; 1-2: *mmaA4* geninin içeren pGFPGUS+ plazmitleri.

E. coli'den izole edilen pGFPGUS+*mmaA4* plazmidi *Agrobacterium tumefaciens*'e elektroporasyonla aktarıldı. Kanamisinli besiyerinde üreyen kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldı. pGFPGUS+*mmaA4* plazmidinin *A. tumefaciens*'te varlığını doğrulamak için bu bakteriden izole edilen plazmitler kullanılarak PZR yapıldı ve 906 bç *mmaA4* geninin başarılı bir şekilde elde edildiği gösterildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 *A. tumefaciens* bakterilerinden izole edilen pGFPGUS+*mmaA4* plazmidinin PZR ile doğrulanması. 1: 1 kb DNA marker (GeneRuler); 2: DNA içermeyen negatif kontrol; 3: *A. tumefaciens*'e'den alınan pGFPGUS+*mmaA4* plazmidinden amplifiye edilen *mmaA4* geni.

Daha sonra, pGFPGUS+*mmaA4* ve kontrol grubu olarak pGFPGUS+ plazmitlerini içeren rekombinant *A. tumefaciens* bakterileri kullanılarak transgenik tütün bitkilerine transformasyon yapıldı (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 pGFPGUS+*mmaA4* taşıyan *A. tumefaciens* ile tütün bitkilerinin transformasyonu (4. gün).

Antibiyotik içeren steril tepsilerde transgenik tütün bitkilerinde sağlıklı bir şekilde kök ve gövde oluşumu gözlendi (Şekil 4.4-4.5).

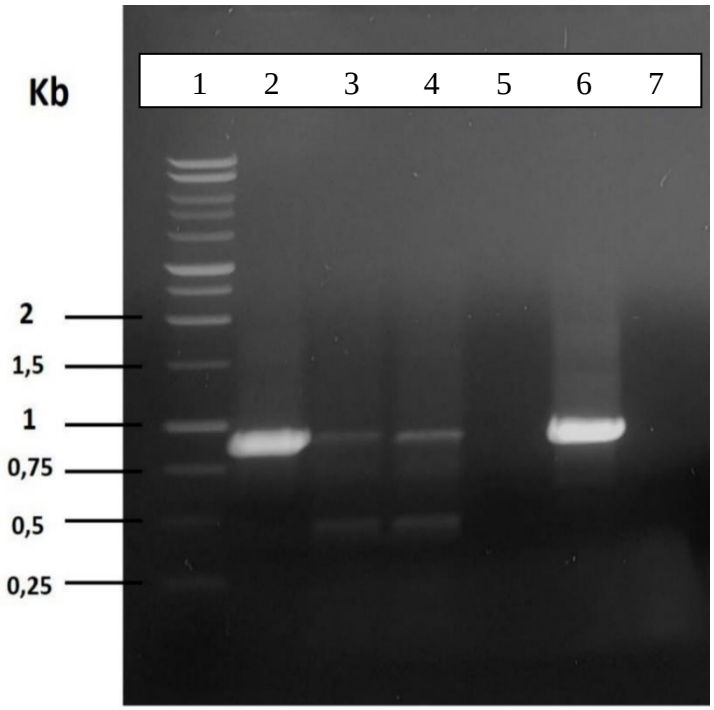


Şekil 4.4 Tranformasyondan 3 hafta sonra pGFPGUS+*mmaA4* taşıyan *A. tumefaciens* ile transformasyonu sağlanan tütün bitkilerinde kök ve gövde oluşumu.



Şekil 4.5 Tranformasyondan 6 hafta sonra pGFPGUS+ ve pGFPGUS+*mmaA4* taşıyan *A. tumefaciens* ile transformasyonu sağlanan tütün bitkilerinin gelişimi.

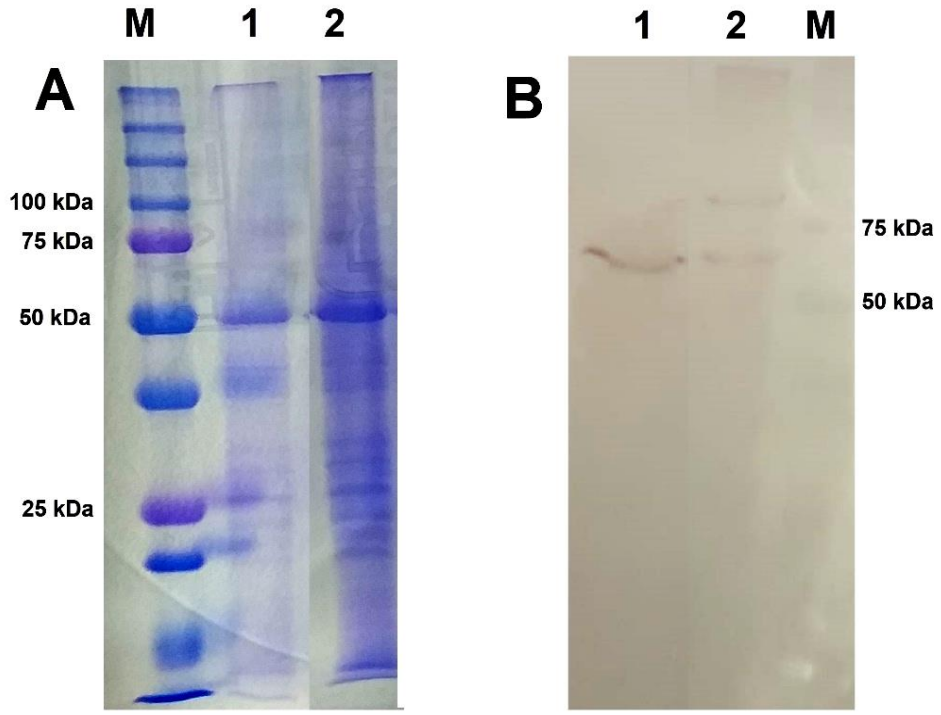
Transgenik tütün bitkilerinde *mmaA4* geninin varlığını doğrulamak için pGFPGUS+*mmaA4* ve pGFPGUS+ ile transforme edilen tütün bitkilerinden genomik DNA izolasyonu yapıldı. Bu DNA örnekleri ve pozitif kontrol olarak da pGEMT+*mmaA4* plazmidi kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirildi. Sonuç olarak, pGFPGUS+*mmaA4* ile transforme edilen bir bitkide güçlü bir *mmaA4* bandı gözlenirken iki bitkide bu bant zayıf gözlendi ve özgün olmayan (non-spesifik) bantlar da görüldü. pGFPGUS+ ile transforme edilen bitkide ve DNA içermeyen negatif kontrolde herhangi bir bant gözlenmezken pozitif kontrolde de beklenen büyüklükte bir bant görüldü (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Transgenik tütün bitkilerinde *mmaA4* geninin varlığının PZR ile doğrulaması. 1: 1 kb DNA marker (GeneRuler); 2-4: pGFPGUS+*mmaA4* ile transforme edilen bitki DNAsı; 5: pGFPGUS+ ile transforme edilen bitki DNAsı; 6: pGEMT+*mmaA4* pozitif kontrol; 7: DNA içermeyen negatif kontrol

Transgenik tütün bitkilerinde MmaA4 proteininin üretimini göstermek için pGFPGUS+*mmaA4* ve pGFPGUS+ ile transforme edilen tütün bitkilerinden total protein izolasyonu yapıldı ve protein örnekleri SDS-PAGE ile analiz edildi (Şekil 4.7A). *mmaA4* taşıyan ve taşımayan bitkilerin protein profilleri arasında bir farklılık gözlenmedi. Aynı protein örneklerine, anti-MmaA4 antikoru kullanılarak Western blot analizi yapıldı (Şekil

4.7B). Western blot sonucunda, beklenen moleküler ağırlıkta (34.6 kDa) bir bant görülmedi. Yaklaşık 60 ve 80 kDa büyüklüğünde iki bant gözlendi ancak aynı bantların mmaA4 taşımayan transgenik bitkide de gözlenmesi bu bantların özgün olmayan bağlanmalar olduğunu gösterdi.



Şekil 4.7 Transgenik bitkilerin SDS-PAGE (A) ve Western Blot (B) sonucu. M: Prestained protein marker 1: pGFPGUS+ ile transforme edilen tütün bitkisi; 2: pGFPGUS+*mmaA4* ile transforme edilen tütün bitkisi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tüberküloz, *M. tuberculosis* enfeksiyonunun neden olduğu önemli bir hastalıktır ve dünya çapında varlığını sürdürmektedir (Taylor *et al*. 2003). *M. tuberculosis* ile enfeksiyona karşı sınırlı koruma sağlayan dünyadaki tek lisanslı tüberküloz aşısı, *M. bovis* Bacillus Calmette Guerin'dir (BCG) (Li *et al*. 2014). Canlı zayıflatılmış ve rekombinant aşılar gibi birçok yeni tüberküloz aşısı preparatı şu anda deneysel çalışmalara tabi tutulmaktadır (Li *et al*. 1999).

Mikolik asitler, mikobakteriyel hücre duvarının ana bileşenidir ve dış zarın geçirgenliğine ve bütünlüğüne olduğu kadar virülansa da katkıda bulunur (Glickman *et al*. 2000; Dubnau *et al*. 2000). Mikolik asit biyosentetik yolunun bozulması, onaylı ilaçlar izoniazid (INH), etiyonamid (ETH), izoksil (ISO) ve kimyasal müdahale için kanıtlanmış ve etkili bir terapötik hedeftir. Tiyasetazon (TAC), farklı mekanizmalarla olmasına rağmen bu yola karşı etkilidir (Alahari *et al* 2007; Schroeder *et al*. 2002; Barry *et al*.2007).
Bir tiyosemikarbazon olan TAC, düşük maliyeti nedeniyle esas olarak gelişmekte olan ülkelerde kullanılan eski bir anti-tüberküloz bileşiğidir. Bununla birlikte TAC, HIV pozitif hastalarda potansiyel olarak deride ciddi aşırı duyarlılık reaksiyonları nedeniyle Afrika'da nadiren kullanılmaktadır (Nunn *et al*. 1991).

BCG'nin TAC ile muamelesi, öncü meromikolik asidinin modifikasyonları için gerekli olan mikolik siklopropanant asit sentazlarının (CMAS) inhibisyonuna bağlı olarak mikolik asit içeriğinde bir azalmaya yol açar (Alahari *et al*. 2007) .

M. tuberculosis mikolik asitler, uzun bir alfa-alkil yan zincire sahip β-hidroksi yağ asitleridir (Asselineau and Ledrer 1950). Aşı suşu *M. bovis* BCG, benzer bir mikolik asit profiline sahiptir (Minnikin *et al*. 1983) Duvar lipidlerinin, özellikle mikolik asitlerin sentezi, mikobakterilerin in vivo hayatta kalması için gereklidir. Bu nedenle, mikolatların kimyasal modifikasyonlarında yer alan enzimlerin yapı-fonksiyon ilişkilerinin incelenmesi özel dikkat gerektirir. Bu, çoklu ilaca dirençli suşlar dahil olmak üzere *M. tuberculosis* için yeni, daha etkili anti-tüberküloz ilaçlarının bulunmasına yardımcı olacaktır.

MmaA4'ün farelerde (mikolik asit metiltransferaz) hücresel ve humoral immün yanıtı artırdığı gösterilmiştir (Okay vd. 2019). Etkin bir anti-tüberküloz aşısının geliştirilmesinde, yani aşı proteinlerini üretmek için transgenez ile modifiye edilmiş bitkilerin kullanımı alternatif bir yaklaşım sunmaktadır. Ağızdan emilen bu proteinler, kişiyi enfeksiyona karşı korumak için gereken bağışıklık tepkisini uyarmalıdır.

Bu çalışmada, *M. tuberculosis*'e ait *mmaA4* geni tütün bitkisine aktarılarak, aşı antijeni olarak kullanılabilecek MmaA4'ün bitkisel üretimi hedeflenmiştir. Bu amaçla, *mmaA4* geni pGFPGUS+ vektörüne klonlanarak tütün bitkilerine transformasyonu sağlandı. Kontrol grubu olarak da sadece pGFPGUS+ vektörü ile transformasyon yapıldı. Transgenik tütün bitkilerinin antibiyotik içeren besin ortamında başarıyla geliştikleri gözlendi. Bu bitkilerden elde dilen genomik DNA'nın *mmaA4* genini taşıdıkları PZR ile teyit edildi.

Transgenik tütünlerden elde edilen proteinler analiz edildiğinde, SDS-PAGE sonucunda *mmaA4* taşıyan ve taşımayan bitkilerin protein profilleri arasında bir fark gözlenmedi. Gözle ayırt edilemeyecek kadar az bir MmaA4 üretiminin olabileceği varsayımıyla daha hassas bir analiz için Western blot deneyi gerçekleştirildi. Western blot sonucunda beklenen moleküler ağırlıktan daha büyük bantlar elde edildi. Bu bantlar bitkinin MmaA4 proteinini değişikliği uğratması sonucu ortaya çıkmış olabilirdi ancak aynı bantların mmaA4 taşımayan transgenik bitkide de gözlenmesi, bu bantların özgün olmayan bir bağlanma sonucu başka proteinlere ait olduğunu göstermiştir.

Bu çalışma sonucunda, *M. tuberculosis*'e ait *mmaA4* geni başarılı bir şekilde pGFPGUS+ vektörüne klonlanarak *A. tumefaciens* aracılığıyla tütün bitkisine aktarılmıştır. Transgenik tütünlerde MmaA4 proteinin üretiminin görülmemesinin nedeni bakteriyel bir genin bitkilerde ekspresyonu için kodon optimizasyonunun yapılmamış olması muhtemeldir. Gen ekspresyonunun olup olmadığının anlaşılabilmesi için gerçek zamanlı reverse transkripsiyon PZR (qRT-PCR) yöntemi kullanılabilir.

KAYNAKLAR

Ada, G. 2003. Overview of vaccines. In: Vaccine protocols (2nd ed.). Edited by Robinson, A., Hudson, M.J., Cranage, M.P. Humana Press, New Jersey, USA. pp. 1-14.

Adams, L.G. Khare, S. Lawhon, S.D. Rosetti, C.A. Lewin, H.A. Lipton, M.S. Turse, J.E. Wylie, D.C. Bai, Y. and Drake, K.L. 2011. Enhancing the role of veterinary vaccines reducing zootonic diseases of humans: Linking systems biology with vaccine development. Vaccine, 29(41), 7197–7206.

Agarwal, N. Lamichhane, G. Gupta, R. Nolan, S. and Bishai, W. R. 2009. Cyclic ampintoxication of macrophages by a *Mycobacterium tuberculosis* adenylate cyclase. Nature, 460 (7251), 98-102.

Agger, E. M. and Andersen P. 2001. Tuberculosis subunit vaccine development: on the role of interferon-ɣ. Vaccine, 19; 2298-2302.

Anuradha, Alahari., Xavier, Trivelli., Yann, Guérardel., Lynn G Dover., Gurdyal S Besra., James C Sacchettini., Robert C Reynolds., Geoffrey D Coxon., Laurent, Kremer. 2007. Thiacetazone, an antitubucular drug that inhibits cyclopropanation of cell wall mycolic acids in mycobacteria. PLoS ONE, 2(12): e1343.

Anonim 2019. World Health Organization Global Tuberculosis Report. 2016. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en *Erişim Tarihi*: 18.02.2019

Anonim 2020a. Web Sitesi. *https://mycobrowser.epfl.ch/genes/Rv0642c. Erişim Tarihi:05.05.2020*

Anonim 2020b. Web Sitesi. *https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2005/pr48/fr/ Erişim Tarihi:05.05.2020*

Anonim 2020c. Web Sitesi. *https://www.vaccines.gov/basics/types Erişim Tarihi:05.05.2020*

Anonim 2020d. Web Sitesi. *https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/vaccins-les-points-essentiels Erişim Tarihi:05.05.2020*

Anonim 2020e. Web Sitesi. *www.addgene.org/64401 . Erişim Tarihi:05.05.2020*

Aronson, N. Santosham, M. and Comstock, G. 2004. Long-term efficacy of BCG vaccine in American Indians and Alaska Natives: A 60-year follow-up study. JAMA, 291; 2086-2091.

Aslan, G., Kuyucu, N., Çalıkoğlu, M., Ersöz, G., Ülger, M., Günal, S. ve Emekdaş, G. 2009. *Mycobacterıum Bovıs'in* Etken Olduğu Tüberküloz Olguları. ANKEM Dergisi, 23(4); 182-187.

Asselineau, J. and Lederer, E. 1950. Structure of the mycolic acids of mycobacteria. Nature, 166**,** 782-783.

Babaoğlu M, Yorgancılar M, Akbudak MA (2001). Doku Kültürü: Temel Laboratuar Teknikleri. Bitki Biyoteknolojisi Cilt I Doku Kültürü ve Uygulamaları (M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan Editörler) s. 1-35, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya.

Barry CE, III, Crick CD, McNeil MR. 2007.Targeting the formation of the cell wall core of *Mycobacterium tuberculosis*. Infectious Disorders - Drug Targets, 7(2):182–202.

Brennan, P. 2003. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 83, 91-7.

Brennan, M. J., Fruth, U. and Milstien, J. 2007. Development of new tuberculosis vaccines: A global perspective on regulatory issues. PLoS Medicine, 4, 1299-1302.

Brosch, R., Gordon, S. and Eiglmeier, K. 2000. Genomics, biology, and evolution of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. In: Hatfull GF, Jacobs WR Jr; eds. Molecular Genetics of Mycobacteria. 1st ed. Washington, DC: ASM Press;: 19-36.

Brosch, R. Gordon, S. Marmiesse, M. Brodin, P. Buchrieser, C. Eiglmeier, K. Garnier, T. Gutierrez, C. Hewinson, G. Kremer, K. Parsons, M. Pym, A. Samper,S. Soolingen, van D. and Cole, S. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. PNAS, 99 (6); 3684-3689.

Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D. and Gordon, S. V. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence, Nature, 393 (6685), 537-544.

Delogu, G. and Brennan, M. J. 2001. Comparative immune response to PE and PE_PGRS antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. Infection and Immunity, 69 (9); 5606-5611.

Desmond, E., Ahmed, A. T., Probert, W. S., Ely, J., Jang, Y., Sanders, C. A., Lin, S. and Flood, J. 2004. *Mycobacterium africanum* Cases, California. Emerging Infectious Diseases, 10 (5); 921-923.

Di Pasquale, A., Preiss, S., Da Silva, F. T. and Garçon, N. 2015. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. Vaccines (Basel), 3(2), 320-343.

Dubnau, E. Chan, J. Raynaud, C. Mohan, V.P. Lane´ elle, M.A. Yu, K. Quemard, A. Smith, I. and Daffe, M. 2000. Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Molecular Microbiology 36, 630–637.

Engleberg, N. C., Dirita, V. J. and Dermody, T. S. 2013. Mechanisms of Microbial Disease 5th ed. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 257-269.

Forrellad, M. Klepp, L. Gioffre, A. Sabio y García, J. Morbidoni, H., de la Paz Santangelo, M. Cataldi, A. and Bigi, F. 2012. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex.Virulence, 4(1); 3-66.

Frothingham, R. Hills, H. G. and Wilson K. H. 1994. Extensive DNA sequence conservation throughout the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Journal of Clinical Microbiology, 32 (7); 1639-1643.

Gao, Q. Kripke, K. and Arinc, Z. 2004. Comparative expression studies of a complex phenotype: cord formation in *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 84, 188-96.

Glickman MS, Cox JS, Jacobs WR. 2000. A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Molecular Cell, 5(4), 717–27.

Gökçay, G., Partalci, A., Bas, F. and Neyzi, O. 2000. Tuberculin reactivity in young children following neonatal BCG vaccination. Journal of Tropical Pediatrics 46, 51-2.

Grange, J. M., Gibson, J. and Osborn, TW. 1983. What is BCG? Tubercle, 64; 129-139.

Griffith, D. 1999. Nontuberculosis Mycobacteria. D Armstrong, J Cohen (ed) Infectious Diseases, Mosby, London.

Gutierrez, MC., Brisse, S. and Brosch, R. 2005. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathogens, 1 (5), 52-62.

Hatipoğlu, R. 1999. Bitki Biyoteknolojisi (2.Basım). Adana: Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları Genel Yayın No:190.

Junqueira-Kipnis, A. P., Marques Neto, L. M. and Kipnis, A. 2014. Role of Fused *Mycobacterium tuberculosis* immunogens and adjuvants in modern tuberculosis vaccines. Frontiers in Immunology, 5;188.

Kıter, G., ve Uçan, E.S., 2001. Tüberkülozdan korunma. Toraks Dergisi, 2(1):85-90.

Klegerman, M.E. 1992. Vaccines. Pharmaceutical Biotechnology. Interpharm Press. p.:64-76

Kocagöz, S. 2014. Aşı teknolojileri ve aşı tipleri. Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi.

Kubica, T. Agzamova, R. Wright, A. Rakishev, G. Rüsch-Gerdes, S. and Niemann S. 2006. *Mycobacterium bovis* Isolates with *M. tuberculosis* Specific Characteristics. Emerging Infectious Diseases, 12 (5); 763-765.

Jackson, M. Raynaud, C. Laneelle, M. A. Guilhot, C. Laurent-Winter, C. Ensergueix, D. Gicquel, B. and Daffe, M. 1999. Inactivation of the antigen 85C gene profoundly affects the mycolate content and alters the permeability of the *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. Molecular Microbiology 31, 1573–1587.

Li, Z. Howard, A. Kelley, C. Delogu, G. Collins, F. and Morris, S. 1999. Immunogenicity of DNA vaccines expressing tuberculosis proteins fused to tissue plasminogen activator signal sequences. Infection and Immunity, 67 (9), 4780-4786.

Li, W. Deng, G. Li, M. Zeng, J. Zhao, L. Liu, X. and Wang, Y. 2014. A recombinant adenovirus expressing CFP10, ESAT6, Ag85A and Ag85B of *Mycobacterium tuberculosis* elicits strong antigen-specific immune responses in mice. Molecular Immunology, 62 (1), 86-95.

Lin, M. Y. and Ottenhoff, T.H. 2008. New insights into host-pathogen interactions identify new targets for vaccination against latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. Biological Chemistry, 389, 497-511.

Lisby, G. 1999. Application of nucleic acid amplifi cation in clinical microbiology. Molecular Biotechnology, 12; 75-99.

Liu, J. Barry, C.E. 3rd, Besra, G.S. and Nikaido, H. 1996. Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. Journal of Biological Chemistry 271, 29545–29551.

Martin, C. 2005. The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG? European Respiratory Journal 26, 162-167.

Minnikin, D.E., Minnikin, S.M., Dobson, G., Goodfellow, M., Portaels, F., van den Breen, L., and Sesardic, D. 1983. Mycolic acid patterns of four vaccine strains of Mycobacterium bovis BCG. Journal of General Microbiology, 129, 889–891.

Niederweis, M. 2003. Mycobacterial porins: new channel proteins in unique outer membranes. Molecular Microbiology, 49, 1167-1177.

Nikiforuk, A. 2000. Mahşerin Dördüncü Atlısı. İletişim Yayıncılık A.Ş. İstanbul; Sayfa: 49-66.

Niu, L. Zhang, H. Wu, Z. Wang, Y. Liu, H. *et al*. 2019. Correction: Modified TCA/acetone precipitation of plant proteins for proteomic analysis. PLOS ONE, 14(1), e0211612.

Nunn, P. Kibuga, D. Gathua, S. *et al*. 1991. Cutaneous hypersensitivity reactions due to thiacetazone in HIV-1 seropositive patients treated for tuberculosis. Lancet, 337(8742), 627–630.

Okay, S., Çetin, R., Karabulut, F., Doğan, C., Sürücüoğlu, S., Kurt Kızıldoğan, A., 2019. Immune responses elicited by the recombinant Erp, HspR, LppX, MmaA4, and

OmpA proteins from *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 66(2), 12-13.

Pym, A. and Small, P. 2006. Mycobacterial evolution: Insights from genomics and population genetics. In: Seifert HS, Dirita VJ; eds. Evolution of Microbial Pathogens. 1st ed. Washington, DC: ASM Press, 301-325.

Rastogi, N. Legrand, E. and Sola, C. 2001. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. Revue Scientifique et Technique, 20 (1), 21-54.

Rieder H.L. 1999. Epidemiologic Basis of Tuberculosis. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Paris.

Ryll, R. Kumazawa, Y. and Yano, I. 2001. Immunological properties of trehalose dimycolate (cord factor) and other mycolic acid-containing glycolipids review. Microbiology and Immunology, 45, 801-811.

Schroeder, EK. Souza, ONd, Santos, DS. Blanchard, JS. Basso, LA. 2002. Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. Current Phamaceutical Biotechnology, 3(3),197–225.

Sezgin, M. and Dumanoğlu, H. 2014. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from immature cotyledons of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.). In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, 50(1), 58-68.

Skerman, V. McGowan, V. and Sneath, P. 1980. Approved Lists of Bacterial Names. International Journal of Systematic Bacteriology, 30 (1), 225–420.

Smith, I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence, Clinical Microbiology Reviews, 16 (3), 463.

Smith, N. H. Crawshaw, T. Parry, J. and Birtles, R. J. 2009. Mycobacterium microti: More Diverse than Previously Thought. Journal Of Clinical Microbiology, 47 (8), 2551-2559.

Stead, W. 1996. Epidemiology of the global distribution of tuberculosis. In: Koprowski H, Oldstone MBA. Eds. Microbe Hunters. Then and Now. Medi- Ed Pres; 23: 311- 317

Takayama, K. Wang, C. and Gurdyal, S. 2005. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. Clinical Microbiology Reviews, 18, 81-101.

Taylor, G. M., Stewart, GR. and Cooke, M. 2003. Koch's bacillus - a look at the fi rst isolate of *Mycobacterium tuberculosis* from a modern perspective. Microbiology, 149, 3213-3220.

Todar, K. 2008. Todar's online textbook of bacteriology. "textbookofbacteriology.net"

Van-Deun, A., Hossain, M. A., Gumusboga, M. and Rieder, H. L. 2008. Ziehl-Neelsen staining: theory and practice. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 12, 108-110.

Van Ingen, J. Rahim, Z. Mulder, A. Boeree, M.J. Simeone, R. van Sooligen, D. 2012. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. Emerging Infectious Diseases, 18, 653–655.

EKLER

EK 1 Boyut Belirteçleri 49

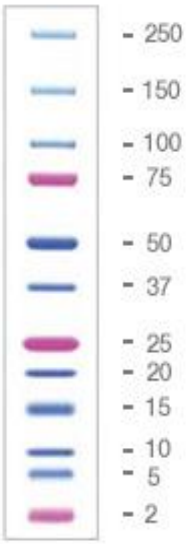
EK 2 Bakteri Kültür Ortamlarının Hazırlanması 50

EK 3 Solüsyon ve Tamponlar 51

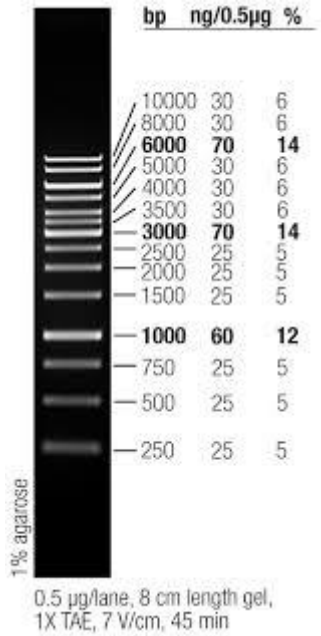
EK 4 Kullanılan Kimyasal ve Enzimler 55

EK 1

Boyut Belirteçleri



Şekil 1 Precision Plus Protein Dual Xtra prestained marker (BioRad 1610377).



Şekil 2 GeneRuler 1 kb DNA marker (Thermo Scientific).

EK 2

Bakteri Kültür Ortamlarının Hazırlanması

1. Luria Broth (LB)

Distile su	1000 mL
Luria Broth	25 g

Steril etmek için 121 °C'de 20 dakika otoklavlanır.

2. Luria Agar (LA)

Distile su	1000 mL
Luria Agar	40 g

Steril etmek için 121 °C'de 20 dakika otoklavlanır.

YEB

Bacto-yeast extract	1 g
Beef extract	5 g
1,8% Bacto-agar	18g(agar plakası)
Peptone	5 g
Sucrose	5 g
pH	7,2
Distile su	1000 mL'ye tamamlanır

Steril etmek için 121 °C'de 20 dakika otoklavlanır.

EK 3

Solüsyon ve Tamponlar

1. Agaroz Jel Elektroforezi

TAE tampon (50X)

Tris-baz	242 g
Glasiyal asetik asit	57.1 mL
EDTA (0.5 M, pH 8.0)	100 mL
Distile su	1000 mL'ye tamamlanır

2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Akrilamit/Bis

Akrilamit	146 g
N.N'-Metilen bis akrilamit	4 g
Distile su	500 mL'ye tamamlanır

Filtrelenir, ışıktan korunur ve +4°C'de saklanır.

Tris HCl (1.5 M)

Tris-baz	54,45 g
Distile su	150 mL

pH 8.8'e ayarlanır ve toplam hacim 300 mL'ye distile su ile tamamlanır. +4°C'de saklanır.

Tris HCl (0.5 M)

Tris-baz	6 g
Distile su	60 mL

pH 6.8'e ayarlanır ve toplam hacim 100 mL'ye distile su ile tamamlanır. +4°C'de saklanır.

Koşturma tamponu (10X)

Tris- baz	30 g
Glisin	144 g
SDS	10 g
Distile su	1000 mL'ye tamamlanır

Örnek yükleme tamponu (4X)

Tris- HCl (1 M, pH 6.8)	2 mL
EDTA (0.5 M)	1 mL
Gliserol	4 mL
SDS	0.8 g
β-merkaptoetanol	0.4 mL
Bromofenol mavisi	0.008 g
Distile su	10 mL'ye tamamlanır

Coomassie Mavi R-250 Boyası

Coomassie Mavi R-250	0.25 g
Metanol	125 mL
Glasiyal asetik asit	25 mL
Distile su	100 mL

3. Western Blot

Transfer tamponu (1X)

Metanol	200 mL
Tris-baz	3.63 g
Glisin	14.4 g
SDS	0.37 g

Distile su	1000 mL'ye tamamlanır

TBS (Tris buffer saline) (1X)

Tris-baz	2.42 g
NaCl	29.2 g
Distile su	1000 mL'ye tamamlanır

Bloklama solüsyonu

%0,5 Twin, 1XTBS

4. *E. coli* Kompetan Hücre Tamponu

Tampon 1

RuCl	100 mM
KAc	30 mM
$CaCl_2$	10 mM
Gliserol	%15

pH 5.8'e ayarlanır ve filtre edilir

Tampon 2

$CaCl_2$	75 mM
RuCl	10 mM
MOPS	10 mM
Gliserol	%15

pH 6.5'e ayarlanır ve filtre edilir

5. Plazmit İzolasyonu

STE tamponu

Sükroz (w/v)	%10.3

Tris-HCl (ph 8.0)	25 mM
EDTA (pH 8.0)	25 mM

Lizis tamponu

NaOH	0.3 M
SDS (w/v)	%2

6.Tütün Bitkilerine Transformasyon

RM (1L)

MS tuzları	4.405 g
Sukroz	30g

MS

MS tuzları	4.405 g
Sukroz	30 g
Agar	6,5 g

Antibiyotikler

Equitax (ya da augmentin)	4mL/L
Higromisin	20mg/mL

Hormonlar

BAP	1g/L
NAA	0.1g/L

EK 4

Kullanılan Kimyasal ve Enzimler

Akrilamit (Sigma)
Agar (Oxoid)
Agaroz (Biomax-Prona)
Ampisilin (Sigma)
*Bam*HI (Thermo)
*Bgl*II (Thermo)
Bovin-serum albumin (Merck)
Bromofenol mavisi (Merck)
Coomassie Mavi G-250 (Fluka)
Coomassie Mavi R-250 (Fluka)
dNTP (Fermentas),
*Hind*III (Thermo)
EDTA (Sigma)
Etanol (Sigma)
Etidyum bromür (Sigma)
Glasiyal asetik asit (Merck)
Gliserol (Sigma)
Glisin (Merck)
Kanamisin (Sigma)
KCl (Merck)
Luria Broth (Merck)
Metanol (Sigma)
$MgCl_2$ (Fermentas)
MOPS (Sigma)
N.N'Metilen-bis akrilamit (Sigma)
NaCl (Merck)
NaOH (Merck)
RuCl (Merck)
SDS (Sigma)

Süt tozu (Sigma)

Sükroz (Sigma)

Taq DNA polimeraz (Thermo)

Tris-baz (Merck)

Tris-HCl (Merck)

Tween-20 (Merck)

T4 DNA ligaz (Thermo)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı:	YAHYA Moumine Ali
Doğum Yeri:	Djibouti/Çibuti
Doğum Tarihi:	30.06.1996
Medeni Hali:	Bekar
Yabancı Dili:	Fransızca, İngilizce, Arapça, Türkçe
Adres:	Yeni Mah. Dotluk Sok, Atayıldız Apt 3 Merkez/ÇANKIRI
Tel:	05380709681
E-posta:	yahya123moumin@hotmail.com

Eğitim Durumu

Lise:	Cibuti Devlet Lisesi (2014)
Lisans:	Cibuti Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü(2017)
Yüksek Lisans:	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (2020)

Staj

Ulusal Doğa Tarihi Müzesi (Smithsonian Institution, 2016)