ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS'E AİT *hspR* GENİNİN TÜTÜN BİTKİSİNE AKTARILMASI

Kafia Elmi AYEH

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2020

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Kafia Elmi AYEH tarafından hazırlanan **"*Mycobacterium tuberculosis*'e ait *hspR* geninin tütün bitkisine aktarılması"** 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

Mycobacterium tuberculosis'e ait _hspR_ geninin tütün bitkisine aktarılması

Kafia Elmi AYEH

Çankırı Karatekin Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Sezer OKAY

Mycobacterium tuberculosis'e karşı oldukça etkili bir aşı büyük talep görmektedir çünkü tüberküloz şu anda yüksek ölüm oranına sahip hastalıklardan biridir. Günümüzde, tek lisanslı tüberküloz aşısı olan BCG'nin çocuklardaki koruyuculuğu yüksektir ancak bu aşı yetişkinlerde yeterli koruyuculuk sağlamamaktadır. BCG'den daha etkin aşı çalışmaları devam etmektedir. Aşı geliştirme stratejilerinden birisi de transgenik bitkiler kullanılarak rekombinant proteinlerin elde edilmesidir.

Bu çalışmada, *M. tuberculosis* bakterisinde virülans faktörlerinden birisi olan HspR proteinini kodlayan genin pGFPGUS+ vektörüne klonlanarak tütün bitkilerine aktarılması, daha sonra transgenik tütün bitkilerinin doğrulanması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, pGEMT-*hspR* plazmidinden izole edilen *hspR*, *E.coli* DH5α hücreleri kullanılarak pGFPGUS+ vektörüne aktarılmıştır. *E. coli*'den izole edilen pGFPGUS+-*hspR Agrobacterium tumefaciens* bakterisine ve rekombinant *A. tumefaciens* aracılığıyla *hspR* geni tütün bitkilerine aktarılmıştır. Transgenik bitkilerin doğrulanması için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), poliakrilamit jel elektroforezi ve Western blot teknikleri kullanılmıştır. PZR ile *hspR* geninin tütün bitkilerine aktarıldığı doğrulanmış ancak Western blot deneyi ile protein üretimi doğrulanamamıştır.

2020, 65 sayfa

Anahtar Kelimeler: BCG, HspR, *Mycobacterium tuberculosis*, transgenik tütün

ABSTRACT

MSc. Thesis

Transfer of *hspR* gene from *Mycobacterium tuberculosis* in tobacco plant

Kafia Elmi AYEH

Çankırı Karatekin University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sezer OKAY

A highly effective vaccine against *Mycobacterium tuberculosis* is in great demand because tuberculosis is currently one of the diseases with the highest mortality rate. Today, protection of the only licenced tuberculosis vaccine, BCG, is high in children but its protection in adults is insufficient. Studies for the development of vaccines more efficient than BCG are ongoing. One of the vaccine development strategies is obtaining recombinant proteins by the utilization of transgenic plants.

In this study, cloning of the gene encoding HspR protein, one of the virulence factors in *M. tuberculosis*, to pGFPGUS+ vector, and its transfer to tobacco plants as well as verification of the transgenic tobacco plants were aimed.

For this, *hspR* gene isolated from pGEMT-*hspR* plasmid was transferred to pGFPGUS+ vector using *E. coli* DH5α cells. pGFPGUS+*hspR* from *E. coli* was transferred to *Agrobacterium tumefaciens,* and *hspR* gene was transferred to tobacco plants via the recombinant *A. tumefaciens*. Polymerase chain rection (PCR), polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot techniques were used to verify transgenic plants. Transfer of *hspR* gene to tobacco plants was verified by PCR but protein production was not verified via Western blot.

2020, 65 pages

Keywords: BCG, HspR, *Mycobacterium tuberculosis*, transgenic tobacco

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

"*Mycobacterium tuberculosis*'e ait *hspR* geninin tütün bitkisine aktarılması" adlı bu çalışma 2020 yılında hazırlanarak Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak sunulmuştur. Bu çalışmanın amacı, *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinde hastalığı tetikleyen faktörlerden birisi olan HspR proteinini kodlayan *hspR* geninin moleküler tekniklerle klonlanarak tütün bitkisine aktarılmasıdır. Tütün bitkileri tarafından üretilen HspR proteininin ekstraksiyonu ve bitki tarafından üretilen proteinin doğrulanması işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Moleküler Biyoloji dalında bana bu fırsatı veren akademik hayata atılmamı sağlayan ve tez çalışmamda planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren Sayın Hocam Doç. Dr. Sezer OKAY'a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Ayrıca, çalışmamın değişik aşamalarında gelişmem ve ilerlemem için üzerimde emeği olan saygıdeğer Hocam Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SEZGİN'e teşekkürlerimi sunarım.
Bu aşamaya gelmemde bana emeği geçen tüm hocalarıma, hakkı hiçbir zaman ödenemeyecek olan aileme, laboratuvar çalışmalarında yardım ve desteklerini gördüğüm Emine KAPDAN'a, Simge ÇİZGEN TAN'a, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Araştırma Görevlisi Özgün Fırat DÜZENLİ'ye ve tüm arkadaşlarıma teşekkür eder, sevgi ve saygılarımı sunarım.

KAFİA ELMİ AYEH
Çankırı, Ağustos 2020

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iv**
SİMGELERDİZİNİ vii
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
ÇİZELGELER DİZİNİ viii
1.GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1 Tüberküloz 3
2.1.1 Tüberkülozun Tarihçesi 5
2.1.2 Epidemiyoloji 7
2.1.3 Etiyoloji 8
2.2 Virülans Faktörleri 16
2.3 Isı Şoku Proteinleri 19
2.4 Yenilebilir Aşıların Geliştirmesi 22
3. MATERYAL VE YÖNTEM 28
3.1 Bakteri ve Plazmitler 29
3.2 Saklama ve Büyütme işlemleri 29
3.3 Primer Tasarımı 30
3.4 *hspR* Geninin pGFPGUS+ Vektörüne Aktarılması 30
3.5 *E.coli* DH5alfa Hücrelerine Transformasyon 31
3.6 Plazmit İzolasyonu 32
3.7 *hspR* Geninin *Agrobacterium tumefaciens* Hücrelerine Aktarılması 32
3.8 Transgenik Tütün Bitkilerinin Elde Edilmesi 34
3.9 Transgenik Tütün Bitkilerinin Doğrulanması 36
3.9.1 Bitkilerden DNA izolasyonu 36
3.9.2 PZR 37
3.9.3 Bitkilerden Protein İzolasyonu 37
3.9.4 Western Blot 38
4.BULGULAR 39
4.1 *hspR* Geninin pGFPGUS+ Vektörüne Klonlanması 39

4.2 Rekombinant *Agrobacterium tumefaciens* Hücrelerinin Elde Edilmesi 41
4.3 Transgenik Tütün Bitkilerinin Elde Edilmesi 41
4.4 Transgenik Tütün Bitkilerinin Doğrulanması 44
4.4.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu 44
4.4.2 Protein İzolasyonu ve Western Blot 44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....46
KAYNAKLAR 49
EKLER
EK-1 Kültür Ortamlarının Hazırlanması.....56
Ek-2 Solüsyon ve Tamponlar.....58
Ek-3 Kullanılan Kimyasal ve Enzimler.....63
ÖZGEÇMİŞ.....65

SİMGELERDİZİNİ

BCG	Calmette-Guérin basili
°C	Celcius
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
HIV	İnsan immün yetmezlik virüsü
HSP	Isı şoku proteini
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mM	Milimolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
MTBK	*Mycobacterium tuberculosis* kompleksi
PAGE	Poliakrilamit jel elektroforezi
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TB	Tüberküloz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Tüberkülozun yayılımı. 5

Şekil 2.2 *M. tuberculosis* elektron mikroskop görüntüsü. 14

Şekil 2.3 *M. tuberculosis* genom yapısı. 15

Şekil 2.4 *Agrobacterium tumefaciens* hücrelerinin elektron mikroskobu altındaki görüntüsü 26

Şekil 2.5 Bitkilerde *Agrobacterium tumefaciens*'in tümör indüksiyonundan (Ti) sorumlu bileşenler. 27

Şekil 3.1 pGFPGUS+ plazmidinin haritası. 29

Şekil 3.2 İklim kabininde inkübe edilip yetiştirilen tütün bitkisi örneği 34

Şekil 3.3 *A. tumefaciens* ile enfekte edilmiş tütün yaprakları. 35

Şekil 3.4 Transfeksiyon sonrası steril kağıt üzeinde kurutulmuş tütün yaprakları. 36

Şekil 3.5 pGFPGUS+*hspR* taşıyan *A. tumefaciens* ile tütün bitkilerinin transformasyonu. 36

Şekil 4.1 pGEMT-*hspR*vektörünün *Bam*HI ve *Bgl*II restriksiyon enzimleri ile kesimi, agaroz jel görüntüsü. 39

Şekil 4.2 *E. coli* hücrelerinde pGFPGUS+*hspR* vektörünün doğrulaması için yapılan plazmit izolasyonu agaroz jel görüntüsü. 40

Şekil 4.3 *E. coli* hücrelerinde pGFPGUS+*hspR* vektörünün PZR ile doğrulanması. 40

Şekil 4.4 *A. tumefaciens* bakterilerine aktarılmış pGFPGUS+*hspR* plazmitleri ile yapılan PZR sonucu. 41

Şekil 4.5 Transformasyon yapılan tütün eksplantlarında kallus oluşumu. 42

Şekil 4.6 Transformasyon yapılan tütün eksplantlarında gövde oluşumu. 42

Şekil 4.7 Transformasyon yapılan tütün eksplantlarında sürgün oluşumu. 43

Şekil 4.8 Transformasyon yapılan tütün eksplantlarında kök oluşumu. 43

Şekil 4.9 Transgenik tütün bitkilerinin doğrulanması için yapılan PZR sonucu. 45

Şekil 4.10 Transgenik tütün bitkilerine ait SDS-PAGE (A) ve Western Blot (B) görüntüleri. 45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Tüberküloz basilinin bulaşmasını etkileyen faktörler.....4
Çizelge 3.1 PZR'de kullanılan ileri ve geri primer özellikleri.....30

1.GİRİŞ

Tüberküloz (TB) tüm dünyada insan sağlığını tehdit eden en önemli enfeksiyonlardan birisidir. Tüberküloz hastalığı, *Mycobacterium tuberculosis* isimli bir bakteri aracığılı ile oluşan bulaşıcı bir hastalıktır. Kronik TB hastalığına, Robert Koch tarafından 1882'de keşfedilen *M. tuberculosis* neden olur (Koch 1982). Tüberküloz (TB) sebebinin bilinmesine, tedavisinin mümkün olmasına ve korunabilir bir hastalık olmasına karşın, halen dünyada en yaygın ve ölümcül bulaşıcı hastalıklardan biri olmaya devam etmektedir. Tipik olarak akciğerleri etkilemekte (pulmoner) olup bazen diğer bölgeleri de etkileyebilmektedir (ekstrapulmoner) (Anonim 2019).

Binlerce yıllık insanlık tarihi içinde insidansinda dalgalanmalar olsa da halk sağlığı bakımından kalıcı bir tehdit olmayı sürdürmüştür. Tek mikroorganizmanın yaptığı bu hastalık, yıllar içerisinde artış ve azalmalar göstererek tüm dünyada hala varlığını sürdürmektedir. Tüberküloz HIV/AIDS'ten sonra tek enfeksiyon ajanı ile çok sayıda ölümlere yol açan ikinci en büyük hastalıktır. İnsidansının yüksek olduğu yoksul ülkelerde tedavi edilememekte ve çoğu olgularda da TB ilaçları yetersiz kalmaktadır (Hilleman 2002).

İnsan sağlığının en büyük problemlerinden olan TB'den korunmak için yüzyıla yakın bir süredir Bacille Calmette-Guérin (BCG) aşısı kullanılmaktadır. Günümüzde TB'den korunmak için kullanılan BCG aşısı Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından yüksek prevalans ve insidans görülen ülkelere tavsiye edilmektedir. Ancak halen kullanılmakta olan BCG aşısının koruyuculuğunda büyük farklılıklar gözlenmekte, BCG ile etkili bir aşının sağlaması gereken düzeyde yeterli koruma sağlanamamaktadır. BCG aşı uygulamalarına rağmen TB'un bütün dünya açısından hala önemli bir enfeksiyon hastalığı olması yeni TB aşısı arayışlarına neden olmuştur (McGarvey *et al*. 1995).

Son zamanlarda, geleneksel aşı uygulama yolları mukozal bağışıklığın zayıf bir indükleyici olduğunu gösterilmiştir. Öte yandan, günümüzdeki aşılar, özellikle üretildikleri ülkelerdeki maliyetleri azaltıyorsa ve soğutmadan korunabiliyorsa daha yaygın olarak kullanılabilir. Gelişmekte olan ülkelerde aşı satın alınabilirliği, üreticiden

aşı kullanım alanına “soğuk zincir” ile götürme ihtiyacı ve enjeksiyona bağımlılıklar gibi bazı sınırlamalar nedeniyle sağlık hizmetlerinin önünde engeller oluşturmaktadır.

Dolayısıyla, daha etkili bir bağışıklık tepkisi oluşturmak ve enjekte edilebilir yoldan kaçınarak konforu artırmak için yeni bağışıklama yollarını kullanma olasılığı birçok araştırmanın konusudur (Punchapat *et al*. 2002). Bitkilerde yenilebilir bir aşının geliştirilmesi, bitki dokularının farklı ekspresyon sistemlerinde arzu edilen ve klinik olarak önemli birçok proteini üretmek için kullanılan bir teknolojidir (Maheshwari 1995). Bitki kaynaklı aşılar daha büyük güvenlik sağlar ve toplu aşılama için düşük maliyetli programlar öngörür. Yenilebilir aşılar, antijen içeren fakat patojeniteyi oluşturabilen başka hiçbir geni içermeyecek şekilde tasarlanmaktadır. Terapötik proteinleri eksprese eden transgenik bitkilerin, koruyucu antijenlerin oral üretimi ve verilmesi için ideal araçlar olduğu ileri sürülmüştür. Bitki hücre duvarının, bitki tarafından üretilen antijenin sindirimini geciktirdiği varsayılmaktadır; böylece daha fazla antijen emilir ve bağırsakla ilişkili dokuya sunulur (Hilleman 2002).

Bu tez çalışmasında, aşı antijenlerini bitkilerden elde etmek için *M. tuberculosis*’e ait *hspR* geninin klonlanması, tütün bitkilerine aktarılması, transgenik tütün bitkilerinden protein ekstraksiyonu ve transgenik bitkilerin doğrulama işlemleri gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tüberküloz

Tüberküloz yani halk arasında bilinen adıyla verem, kendisini fark ettirmeden ilerleyen ve dünyada hala en çok ölüme sebep olan hastalıktan biri olarak bilinmektedir. Küresel çabaya rağmen dünyada tüberküloz (TB) vakalarının sayısı artmaktadır. Tüberküloz hastalığı, yaygınlığındaki artış ve kontrolündeki güçlükler nedeniyle son 20 yıldır dünyanın gündemine yeniden oturmuş bulunmaktadır (Anonim 2019). Bu hastalık insan vücudunda uzun yıllar inaktif kalmakta, daha sonra hazırlayıcı faktörlerin etkisi ile aktif hale gelebilmektedir (Tait *et al*. 2000). Bu nedenlerden dolayı TB, insan sağlığını tehdit eden önemli hastalıklardan biridir.

En yaygın görüldüğü yerler Güney ve Doğu Asya ile Afrika kıtaları olsa da dünyanın tüm kıtalarında ve tüm ülkelerinde görülen TB, yılda 10,4 milyon kişinin verem hastalığı ile karşılaşmasına neden olur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) TB'u bir "küresel acil sağlık durumu" olarak açıklamıştır. Asya ve Afrika'da hastalara tanı konulamamasının en önemli nedenleri sağlık hizmetlerinin yetersizliği ve ekonomik sorunlardır. Tedavisi hem mümkün hem de ucuz olan bu hastalığın dünyamızda hala bu kadar acılara yol açması çok üzücüdür (Anonim 2017).

Tüberkülozun nedeni *M. tuberculosis* basili olmasına karşın, uzun bir süreç içerisinde toplulukların üzerilerindeki açlık, savaş, kötü çalışma koşulları, toplulukların yer degiştirmesi ve kalabalık ortamlarda yaşamak gibi toplumlarda stres yaratan faktörlerin TB'un yayılmasına ve asemptomatik enfeksiyondan hastalığın gelişmesine geçişte katkıda bulunduğu fark edilmiştir (Hocking and Choi 1997).

DSÖ, TB epidemisine karşı çok önemli bir adım atarak başlıca hastaların tedaviye uyumlarını sürdürmelerini amaçlayan, Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisini (DGT) önermiştir. Birçok ülkede DGT uygulanmaktadır ve TB kontrolünde bilinen en etkili yöntemdir. Güncel TB tedavisinde kullanılan mevcut ilaçlarla DGT dışında bir seçenek olmadığı çok açıktır (Anonim 2017).

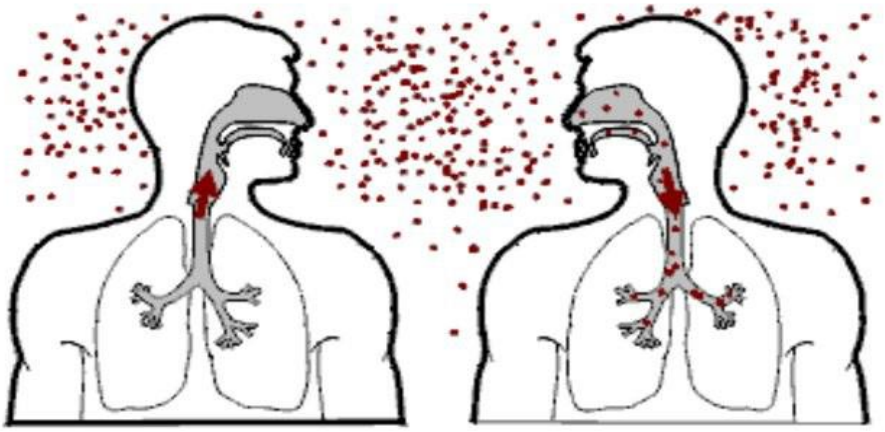
TB vücuttaki tüm organları etkileyebilmesine ve deriden inokulasyon ile gastrointestinal bulaşma yolları da bildirilmesine karşın, enfeksiyonun giriş kapısı hemen her zaman akciğer olmaktadır. Balgam mikroskopisinde asidorezistan bakteri pozitif olan ve akciğer grafisinde kaviter lezyonu olan hastalar daha çok çevreye bulaştırır. Larinks TB'lu olgular en fazla bulaştırıcılığa sahip olan olgulardır. Basillerin en sık yayılma yolu, akciğeri hasta olan kişinin öksürmesi, hapşırması, konuşması ve şarkı söylemesiyle akciğer sekresyonunun damlacık şeklinde havaya atılmasıdır (Schlossberg 1995) (Çizelge2.1).

Çizelge 2.1 Tüberküloz basilinin bulaşmasını etkileyen faktörler

Bulaştırıcıya bağlı faktörler	**Çevresel faktörler**
- Balgamdaki organizma sayısı - Balgamın aerosol oluşturması (öksürük, hapşırık, sulu balgam, nebulizator kullanımı) - Basilin canlılığı (antimikrobiyal ilaçlar) - Organizmaların virülansı	- Dilüsyon etkisi (damlacık çekirdeği içeren havanın miktarı) - Ventilasyon (belli bir alandaki havanın sirkülasyonu) - Nem oranı - Güneş ve UV ışığa maruziyet Kaynağa yakın olma (aile bireylerinde enfeksiyon ve hastalık daha fazladır) - Mikrobu alan kişide dayanıklılık unsurları - Bulaştırıcı ile aynı ortamda beraber geçirilen süre

Damlacıklar hızla kurur ve bazıları az sayıda basil içeren küçük damlacık çekirdekleri oluşturur. Daha büyük damlacıklar yere düşer ancak 1-10 μm boyutlarında olanlar, çevresel koşullara bağlı olarak uzun bir süre havada uçuşurlar. Bu boyuttaki damlacık (Şekil 2.1) çekirdekleri inhale edildiklerinde, terminal bronşlara ve alveollere ulaşabilirler. Boyutları 10 μm'den büyük olan partiküllerin çoğu, üst nazal geçişler sırasında tutulur ya da alt solunum yollarının mukosilier mekanizması tarafından farenkse atılarak yutulur ve zararsızca sindirilirler. Basil içeren damlacık çekirdekleri, aktif akciğer tüberkülozu olan hastalar tarafından sekresyonların akışkanlığına ve atılan

basil miktarina bağlı olarak üretilir, prodüktif öksürüğü olan ve balgam yaymaları pozitif bulunan hastalarda en yüksek sayıya ulaşırlar (Schlossberg 1995).



Şekil 2.1 Tüberkülozun yayılımı (Schlossberg 1995).

2.1.1 Tüberkülozun Tarihçesi

Tarih öncesi çağlardan beri bilinen ve insanlık tarihi kadar eski bir geçmişe sahip olan TB, Nikiforuk'un "*Mahşerin Dört Atlısı. Salgın ve Bulaşıcı Hastalıkların Tarihi*" isimli kitabına giren ve zengin, fakir, köylü, kentli ayırımı yapmaksızın toplumun her kesimini kıran bir hastalıktır (Dormandy 1999). Cok bulaşıcı ve kısa inkubasyon dönemli viral hastalıkların aksine uzun inkübasyon devri olan ve minimal enfeksiyöz bir hastalıktır.

Üç yüz milyon yıldan beri soyunu sürdüren verem basili, doğanın her yerinde, örneğin sularda, otlaklarda, toprakta, çamurda havada bulunur. Arkeolojik çalışmalar Avrupa'da sığırların ehlileştirilmesinin 9000 yıl önce başladığını, insanların soğuk iklim şartları sebebiyle ısınabilme ve korunma amacıyla ehlileştirdikleri hayvanları ev ve ahırlarda barındırdıkları bilinmektedir. Aynı ortamı paylaşan insan ve hayvanlar yüzünden aslında sığırlarda bulunan basilin insanlarda patojenite yapabilecek düzeyde mutasyon geçirerek *M. humanus*'a dönüşmüş olduğu hipotezi ortaya atılmıştır (Stead 1996).

TB basilinin genomu açığa çıktıktan sonra *M. tuberculosis*'in *M. bovis*'ten mutasyon sonucu gelişen bir bakteri olmadığı, her iki bakterinin de ortak bir atadan mutasyonlarla farklılaşmış iki tür olduğu anlaşıldı (Brosch *et al*. 2002). Sığır tipi mikobakteri önceleri

insanlarda lenf bezi ve kemik veremine yol açarken, sonradan akciğerde tahribat yapan ve öksürükle bulaşan bir hastalık etmeni haline gelmiştir. Verem basili başlangıçta sadece sahillerde yaşayan topluluklarda hastalık yapabilmiştir. Nitekim 1880'li yılarda Rusya'da seyrek görülmekteydi (Brosch *et al*. 2002).

XIX. yüzyılın ortalarında TB, Çin ve Hindistan'da görülmeye başlamıştır. Güney Sahra'da yaşayanlarda XX. yüzyılda bile tüberküloz bilinmiyordu. Verem Kuzey Amerika, Güney Afrika, Avustralya ve Yeni Zelanda'ya, hatta Eskimolara Avrupalılar tarafından taşınmıştır. Rezervasyon veya esir kamplarında tutulan kalabalık Amerikan yerlilerinde epidemi yapabilmiştir. Hastalığın ilk olarak M.Ö. yaklaşık 3000 yıl kadar önce Nil nehri yakınlarında bulunan, günümüzdeki adıyla Dra Abu-el-Naga kasabasında kanlı balgam çıkararak ölen bir kızda ortaya çıktığı düşünülmektedir. Daha sonraki yüzyıllarda verem hakkındaki bilgiler Eski Roma ve Yunan hekimlerinden öğrenilmektedir. İstanköy (Kos) adasında yaşamış olan Hipokrat (M.Ö. 460-350) kitabında, hastaların göğsüne kulağını yaslayarak akciğer seslerini dinlediğinde "rallerin sirke kabarcığı gibi olduğunu, plörezide ise sürtünme sesi duyulacağını" yazmıştır. M.S. II. yüzyılda yaşamış olan Eski Roma'nın ünlü hekimi Kapadokyalı Areteus, "veremin en önemli belirtileri kanlı balgam ve kronik öksürüktür, sesleri kısık, boyunları hafif bükük ve sert, parmakları silindirik fakat eklemleri şiş, vücutları iyice eridiği için kemikleri belirgindir" der (Daniel 1997).

Roma'da da çalışmış olan Bergama'lı Galen, her fonksiyonel bozukluğun organik bir nedeni vardır diye vurgulamıştır. Ona göre veremin bulaşıcılığı azdır ve ateş, hemoptizi ve terleme ile kendisini belli eder. Tedavi için perhiz, seyahat etmek ve egzersiz önermiştir (Yurdakök 1997). Verem tarihi hakkında araştırma yapanlar, M.Ö. ve M.S. yer alan asırlarda hastalığın Nil vadisinde, Yunanistan'da, Amerika'da, Kuzey Amerika'nın New England bölgesinde ve Avrupa'da beş epidemik yükselme ve azalma şeklinde dalgalanmalar yaptığını ortaya çıkarmışlardır. Tüberkülozun sosyal yönünü ve sanayi ekolojisinin önemini ilk kez ortaya çıkaran René Dubos isimli çevre bilimcisidir (Dormandy 1999).

Daha sonra Berlin Fizyoloji Topluluğu'nun 1882 yılı Mart ayındaki toplantısında, bakteriyolojinin kurucularından birisi olan Robert Koch, verem hastalığı etkeni olarak TB basilini keşfettiğini açıklamıştır (Sakula 1983). TB, yoksul kesimlerde çok daha yaygın olsa da toplumun en üst seviyesinde bulunan kişilerde bile kendisini gösterebilmektedir. Yakın geçmişte, antibiyotiklerin keşfi ile etkinliğini kaybeden TB basilinin, antibiyotiklere dirençli ve hatta neredeyse tüm bilinen antibiyotiklere dirençli olan süper dirençli genetik yapıya sahip yeni suşları ortaya çıkmaya başlamıştır. Bu yüzden TB hastalığının erken tanısı ve tam tedavisinin yapılabilmesi, tekrar önem kazanmıştır (Baylan 2012).

2.1.2 Epidemiyoloji

TB, dünyadaki en büyük 10 ölüm nedeninden biridir. Dünya nüfusunun yaklaşık dörtte birinde latent TB vardır, bu da TB ile enfekte olduklarını, ancak (henüz) hasta olmadıklarını ve hastalığı geçiremediklerini gösterir.

Yaşamları boyunca, TB basilleri ile enfekte olmuş kişilerin, hastalığı geliştirme riski %5'tir. Öte yandan, HIV ile yaşayan, yetersiz beslenen veya şeker hastası olanlar gibi bağışıklık sistemi yetersiz olanlarda risk daha yüksektir. Dünyanın tüm bölgelerinde görülür. 2016 yılında, en fazla vaka (yeni vakaların %45'i) Asya'da, ardından yeni vakaların %25'i Afrika görülmüştür. Yeni vakaların% 87'si TB yükü yüksek 30 ülkede, %65'i yedi ülkede (Hindistan, Endonezya, Çin, Filipinler, Nijerya, Pakistan ve Güney Afrika) görülmüştür. Küresel ilerleme, bu ülkelerdeki TB hastalığının önlenmesi için yapılacaklara bağlıdır.

HIV ile enfekte olmuş bireylerde, diğerlerinden daha aktif TB gelişmesi olasılığı 20 ila 30 kat fazladır. 2016'da HIV pozitif insanlar arasındaki ölümlerin yaklaşık %40'ı TB'ye bağlıdır ve yaklaşık 0,4 milyon kişi HIV ile ilişkili TB'den hayatını kaybetmiştir. Aynı yıl, %74'ü Afrika'da olmak üzere, HIV pozitif kişilere 1,4 milyon yeni TB vakası eklenmiştir (Anonim 2019).

2.1.3 Etiyoloji

Mycobacterium ailesinden olan *M. tuberculosis* genellikle tüberküloz basili olarak adlandırılır. Ayrıca tüberküloz, *M. tuberculosis'*in neden olduğu hastalığa tekabül eder (ki bu ana rezervuardır). Benzer bir hastalığa, bazen toplu olarak *M. tuberculosis* kompleksi (MTBK) olarak adlandırılan mikobakteriler, *M. bovis, M. africanum ve M. microti* neden olur (Brosch *et al*. 2002).

MTBK, neredeyse aynı nükleotit sekanslarına ve tamamen aynı olan 16S rRNA sekanslarına sahip birkaç *Mycobacterium* türünü içerir. Bu aşırı benzerlik, hepsinin ortak bir ataya sahip olduklarını kanıtlar. Bununla birlikte, konakçı tropizmi, fenotipleri ve patojenliği bakımından farklıdırlar. Aslında, bu türlerin bazıları insan patojenleri (*M. africanum, M. canettii*) veya kemirgen patojenleridir (*M. microti*) (Wirth 2008).

Mycobacterium bovis

M. tuberculosis, dünyadaki insan tüberkülozu için ana etkendir. Bununla birlikte, sığır tüberkülozuna neden olan *M. bovis* enfeksiyonlarının insanlarda hafife alınmamasını gösteren geniş kanıtlar vardır.

Bebekler ve çocuklar özellikle hayvanlardan kaynaklanan TB enfeksiyonlara karşı hassastır. Geçmişte bazı ülkelerde, ekstrapulmoner TB ve TB menenjit vakalarının %40'ına yakını *M. bovis* enfeksiyonundan kaynaklanmıştır (Myers and Steele 1969).

Gelişmiş ülkelerde, sığır TB'una 30 ya da 40 yıl önce yakalanmış yaşlı bir kişi bulmak daha kolaydır (Schliesser 1976). Hayvan kökenli tüberküloz, bu ülkelerdeki çocuklarda veya ergenlerde nadirdir. Beyaz ırkların, belki de atalarının çoğu "beyaz veba"dan kurtulduğundan, TB'a karşı doğal bir direnc veya kollektif bağışıklığa sahip görünmektedir. 1750-1900 arasında TB sözleşmesi yapmayan çok az bölge vardı ve bazı bölgelerde dört ölümden biri bu hastalıktan kaynaklanmaktaydı. Bu nedenle eskimolar ya da siyahîler gibi, insan veya sığır TB'u ile daha önce hiç temas etmemiş olan diğer popülasyonlar hastalığa karşı çok daha hassastır.

Bazı insan gruplarının süt tüketme şekli onları enfeksiyona maruz bırakabilir. Bazı ülkelerde, pastörize süt kullanımı yaygınken, bazılarında (örneğin Afrika ve Asya ülkelerinde) süt kaynatılması geleneksel yöntemlerle yapılır ve bu şekilde *M. bovis* ile kontaminasyon daha sık görülmektedir. Güney Afrika'da, süt su kabakları içinde tutulur ve asitlendirme *M. bovis*'i tahrip eder. Mesela Türkiye'de kaynamış süt geleneği büyük ölçüde *M. bovis* tarafından kirlenmeyi önler, ancak krema gibi süt ürünleri köylerde çiğ sütten hazırlanır ve insanlarda *M. bovis* kaynakları olabilir.

Hayvan kaynaklı tüberküloz, kesinlikle kırsal işçiler için mesleki bir tehlikedir. Et ve süt ürünleri ile uğraşanlar hastalığa şehir sakinlerine göre daha sık yakalanmaktadır (O'Reilly and Dabom 1995). Sosyo-ekonomik koşullar da enfeksiyon riskine katılmaktadır. İnsanlar sütlerini doğrudan besicilerden alırlarsa, eğitim eksikliği nedeniyle *M.bovis* ile bulaş tehlikesi büyüktür.

Sığır TB'unda iki faktör önemli bir rol oynamaktadır: sürü büyüklüğünün artması ve süt üretiminin iyileştirilmesi. Geçmişte, üretim düşük olduğundan büyük sürüler nadir olarak görülmekteydi. Sığırlarda enfeksiyon oranı yirminci yüzyılın ilk on yılında zirveye ulaşırken, insanlarda bu zirveye biraz daha erken ulaşılmıştır. Kuzey yarımkürede çoğu gelişmiş ülkede, *M. bovis* ile insan enfeksiyonu neredeyse yoktur. Daha az gelişmiş ülkelerde, TB eradikasyon kampanyalarının eşlik etmediği modern hayvancılık yöntemlerinin kullanılması sığır enfeksiyonu oranını artırabilmektedir.

Süt endüstrisinin gelişimi, Batı Avrupa'da yirminci yüzyılın başlarında sığır TB'u sıklığının artmasının temel nedeni idi. *M. bovis*'ten çıkan tek bir ineğin sütü, süthanelerde büyük miktarda sütü bulaştırabilir. Tüketim için gönderilmeyen kirli süt, çiftçiler tarafından buzağılarını beslemek için satın alınırdı. Bu nedenle, süt endüstrisi büyük ölçüde *M. bovis*'in sığır sürüsünün yayılmasına katkıda bulunmuştur. Tüm sütün pastörizasyonu, işletmelerde zorunlu hale getirildiğinde, sığır TB'u görülme sıklığı azalmış ve eradikasyon kampanyaları çok etkili olmuştur. Daha az gelişmiş ülkelerde kalitesi kontrol edilmemiş pastörize sütün dağıtımına karşı önlem alınmalıdır (O'Reilly and Dabom 1995).

Modern profilaksi kampanyaları eski zamanlardaki kampanyalarla devam etmektedir. İlk kampanyaların gerçekleştirilmesi 30 veya 40 yıl sürerken, en sonuncular sadece on yılda meyve vermiştir (Kleeberg 1963). Hastalığın kontrol altına alındığı ülkelerde, birçok vakanın ortak bir kaynaktan gelmesi nadirdir (Graves and Johson 1975). Spesifik bir salgında hastalık tek bir çiftlikten, tek bir hayvandan veya pazarlanan kontamine sütten kaynaklanabilir. Bu nedenle bir insan vakası tanımlandığında hastanın tüm ailesinin incelemesi önerilir.

Geçmişte, insanlarda sığır TB'u gelişiminde coğrafi bir faktör olarak, hayvanların kışı ahırda geçirdiği ve bu ahırlarda bakımının yapıldığı ülkelerde enfeksiyon oranları daha yüksekti. Bugün, ana coğrafi bölünme gelişmiş ve az gelişmiş ülkeler arasındadır ve büyükbaş hayvan yetiştirme yöntemleri risk derecesini belirlemektedir.

Zoonotik TB'un önlenmesi ve kontrolü, hayvan, insan ve çevre sağlığını birleştiren sektörler arası ve çok disiplinli bir yaklaşımı gerektirir. Tek sağlık yaklaşımı, hayvan-insan ara yüzündeki zorlukları kapsamlı bir şekilde ele almak için birçok lider kuruluş tarafından giderek daha fazla desteklenmektedir. Bununla birlikte, sığır TB'u, enfekte hayvanların kesimde karkaslarının ortadan kaldırılmasından dolayı önemli ekonomik kayıplara neden olmaya devam etmektedir. Sığır TB'u çiftçilerin (ve ülkelerin) ekonomisini olumsuz yönde etkilediğinden, bu ekonomik kaybın, özellikle fakir ve marjinal topluluklardaki geçim kaynakları üzerinde önemli bir etkisi vardır (O'Reilly and Dabom 1995).

Ek olarak, sığırların düzenli olarak izlenmesi ve test edilmesi, enfekte hayvanların ve diğer temas hayvanlarının aynı sürüden çıkarılması ve enfekte sürülerin hareketlerinin kontrolünden ek maliyetler söz konusudur (O'Reilly and Dabom 1995).

Mycobacterium africanum

1968'de, Dakar'da (Senegal), Castets ve arkadaşları, biyokimyasal testlerde *M. tuberculosis* ve *M. bovis* arasında bir özellik sergileyen ve *M. africanum* olarak

adlandırılan bir MTBK üyesi rapor ettiler. *M. africanum*, Batı Afrika'daki insan TB'unun yarısından sorumludur (Castets *et al*. 1968).

M. bovis gibi temelde sığırlarda hastalığa neden olan MTBK üyeleri insanlarda zoonotik hastalığa neden olabilirler. *M. africanum*'un ana konakçısı insanlardır ve aerosol yoluyla bulaşır (Alfredsen and Saxegaard 1992). *M. africanum*'un *M. tuberculosis*'e kıyasla genomunda yaklaşık 68 kilobaz kaybettiği bildirilmiştir. *M. tuberculosis* genom çalışmalarındaki ilerlemeler, MTBK türlerinin moleküler tanımlanmasının geliştirilmesini kolaylaştırmıştır.

Daha önce, biyokimyasal yöntemler *M. africanum*'u Batı Afrika ve Doğu Afrika olarak ayırıyordu. Filogenetik ağaçlar şimdi Doğu Afrika'ya ait *M. africanum*'u *M. tuberculosis* sensu stricto ile gruplandırır ve Batı Afrika'dan iki farklı *M. africanum* varyantını ayırt eder: *M. africanum* tip 1 ve tip 2 (Mostowy *et al*. 2004).

M. africanum tip 2 ile insan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonu arasında bir ilişki tanımlanmış ve Burkina Faso'daki küçük bir çalışmada da aynı eğilim gözlenmiştir. İlk hayvan çalışmaları tutarsız bir şekilde *M. africanum* virülansında bir azalma olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, *M. africanum* ve *M. tuberculosis* arasında risk faktörleri, klinik sunum veya sonuçların karşılaştırılması bildirilmemiştir. Her iki enfeksiyonun tedavisi aynıdır. *M. tuberculosis* senso stricto üzerine yapılan erken mikrobiyal çalışmalar, nispeten daha yüksek genomik delesyonları olan izolatlarla enfekte olmuş hastaların göğüs röntgeni üzerinde kaviter hastalık geliştirme ihtimalinin daha düşük olduğunu ortaya koymuştur (Mostowy *et al*. 2004) .

M. africanum, vücutta *M. tuberculosis* ile benzer bir enfeksiyon derecesine sahiptir. Ancak, HIV/AIDS ile yaşayan insanlar dışında, klinik hastalığa ilerleme olasılığı daha düşüktür. Endemik ülkelerde, HIV hastalığının sonraki aşamasında önemli bir fırsatçı enfeksiyonu temsil eder. Mikroskobik incelemede görünümü *M. tuberculosis* (basil, kordonlar) ile aynıdır. Koloniler disgonik, kaba, yassı, merkezi tomurcuklu renkli çubuklardır. Agar içine gömülü basil mikro aerofilik yaşar ve katı besiyeri Lowenstein Jensen (LJ) 'de 3-6 hafta sonra koloni gözlemlenir (Castets *et al*. 1968).

M. tuberculosis gibi, *M. africanum* suşlarının pirazinamide duyarlı olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, *M. bovis* gibi, *M. africanum*, zayıf bir niasin üreticisi olan nitrat negatif olma ve değişken sonuçlara rağmen piruvat ile desteklenmiş ortamlarda mikroaerofilik olarak büyüme eğilimindedir (Castets *et al*. 1968).

Mycobacterium microti

M. microti, 1937'de Wells tarafından "vole bacillus" adı altında yarasa üzerinde keşfedilmiştir (Kremer *et al*. 1998). Başlangıçta *M. tuberculosis* alt tür *muris* olarak adlandırılan etken sonradan *M. microti* olarak isimlendirilmiştir ve MTBK'nin bir üyesidir (Soolingen *et al*. 1998) 16S rRNA geninin ve 16S - 23S dâhili kopyalanmış aralayıcı bölgenin DNA sekansları göz önüne alındığında, *M. microti*'nin MTBK'nin bir üyesi olduğu gösterilmiştir. Geleneksel biyokimyasal testlerle primer izolasyon ve farklılaşma, bu türün çok yavaş büyümesiyle karmaşıklaşır (Kremer *et al*. 1998).

M. microti'nin MTBK'nin diğer üyelerinden ayrılması, biyokimyasal özellikler temelinde zordur, ancak genotipik yöntemlerle kolayca mümkündür. Filogenetik analizlere dayanarak, *M. microti* tarla faresine adapte olmuş bir MTBK ekotipi olarak sınıflandırılabilir. İngiltere'de *M. microti*'nin en muhtemel konağı olarak tarla faresi tanımlanmıştır. Bununla birlikte, diğer küçük kemirgenlerde de doğal enfeksiyon gözlenmiştir.

Avrupa genelinde sporadik insan vakaları bildirilmiş ve kediler, alpakalar, lamalar, porsuklar, domuzlar, sığırlar, atlar, köpekler ve gelincikler dâhil olmak üzere diğer bazı memeli türlerinde teşhis edilmiştir. Bunlar arasında *M. microti* TB'undan en sık etkilenen kedilerdir. Çok sayıda *M. microti* suşunun moleküler tiplemesi, sığırlarda *M. bovis* için gözlemlenene benzer bir coğrafi dağılımda genotipik çeşitlilik göstermiştir (Cavanagh *et al*. 2002).

Mycobacterium canettii

M. canettii, 1969'da Georges Canetti tarafından ilk kez izole edilen bir MTBK üyesidir (Fabre *et al*. 2010). Fırsatçı bir insan patojenidir ve *M. tuberculosis* enfeksiyonuna neden olan progenitör türlerdir. Kültürdeki kolonilerin pürüzsüz görünmesi onu diğer MTBK türlerinden farklı kılar (Fabre *et al*. 2010).

Ayrıca, *M. tuberculosis*'inkinden çok daha üstün, büyük bir genetik çeşitliliğe sahiptir. Son genomik çalışmalar *M. canettii*'yi mikobakterilerin ortak atası olarak yerleştirmektedir. *M. tuberculosis*'in tersine, *M. canettii*'nin rezervuarı ve bulaşma şekli tam olarak bilinmemektedir ve çevresel bir rezervuar hipotezi sıklıkla bahsedilmektedir. *M. canettii* enfeksiyonlarının klinik tanımlarına, özellikle Afrika Boynuzu'nda kalmış hastalarda, özellikle ganglionik tropizmde gözlenen güçlü ganglionik tropizmi olan akciğer (%52) ve ekstra-torasik (%32) lokalizasyonlar hâkimdir.

1969'da keşfedilmesinden bu yana, *M. canettii*'nin bilinen 70 suşunun çoğu, genellikle çocuklarda ve gurbetçi yetişkinlerde, özellikle Cibuti Cumhuriyeti'nde izole edilmiştir. Nitekim *M. canettii* enfeksiyonları ile ilgili klinik ve epidemiyolojik veriler üzerine yapılan bir araştırma, *M. canettii*'nin *M. tuberculosis*'e kıyasla daha çok gençleri enfekte ettiğini göstermiştir (Koeck *et al*. 2011).

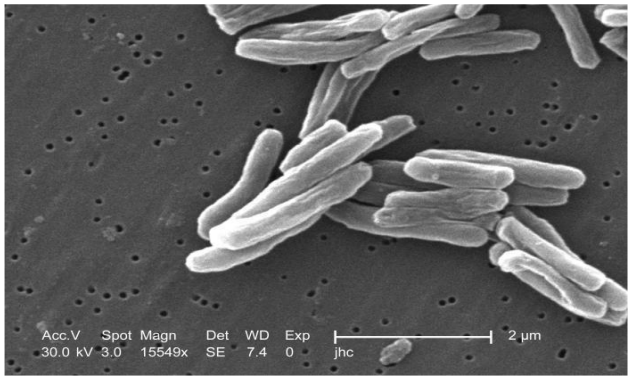
Doğrudan örnekler üzerinde uygulanan moleküler tespit teknikleri sadece MTBK tanısına izin verir. *M. canettii*'yi tam olarak tanımlamayı mümkün kılan ve antibiyogramı yapmak için gerekli materyali sağlayan kültürdür. Tanımlama fenotipik karakterlerle ancak daha fazla moleküler veya kütle spektrometrisi ile yapılabilir (Fabre *et al*. 2010).

Mycobacterium tuberculosis

Prokaryot aileminden, Firmicutes bölümünden, Actinobacteria sınıfından, Actinomycetales takımından, Mycobacteriaceae ailesinden, *Mycobacterium* cinsinden, *M. tuberculsosis* (Taylor *et al*. 2003) türüdür. *M. tuberculosis* (Koch basili),

tüberkülozdan sorumlu bakteridir. Robert Koch tarafından 1882'de keşfedilmiş ve 1998'de genomu dizilenmiştir.

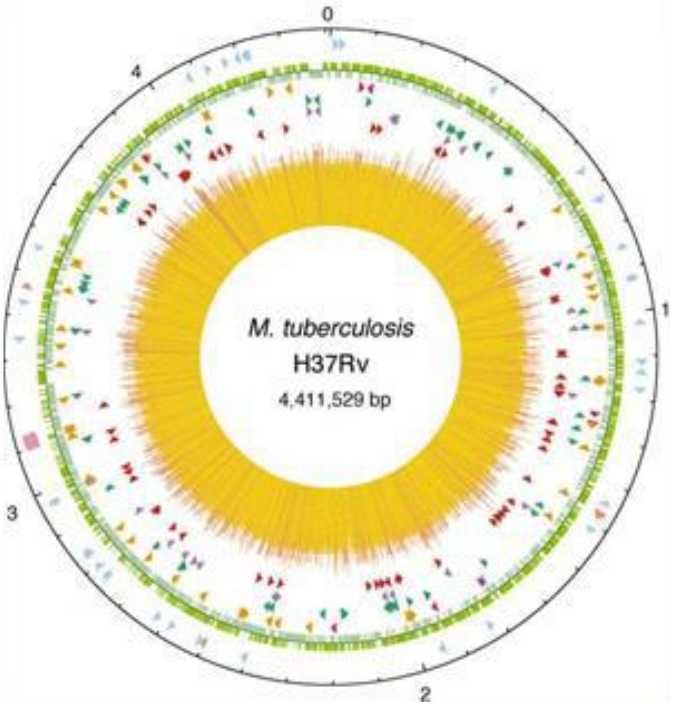
M. tuberculosis, düz veya hafif kavisli, hareketsiz, aerobik bir basildir. 0,3 ila 0,5 µm üzerinde 2 ila 5 µm arasındadır (Şekil 2.2). Diğer mikobakteriler gibi, *M. tuberculosis* de sıradan boyaları alır ve Gram boyaması net değildir. Genellikle Ziehl Neelsen ile renklendirilir. Görüntülemeyi kolaylaştırmak ve büyük serilerde zaman kazanmak için, auramin'i flüoresans mikroskobu okumasıyla kullanmak mümkündür. Renk genellikle parçalı veya granülerdir, basil Ziehl-Neelsen ile mavi bir arka plan üzerinde pembe görünür.



Şekil 2.2 *M. tuberculosis* elektron mikroskop görüntüsü (Todar 2008).

Patolojik numunelerde, koloniler düzensiz küçük kümeler şeklinde olurlar ve doğrudan inceleme, mutlak bir *M. tuberculosis*'in varlığı anlamına gelmez, aslında tüm mikobakteriler Ziehl-Neelsen ile boyanabilir. Bu nedenle inceleme raporu "aside dirençli basil" varlığından bahsedilir (Rastogi *et al*. 2001).

Hücre çeperi içten dışa doğru bir çift lipit tabakasından (plazma zarı), polimerlerden ve mikolik asitlerden oluşan bir tabaka ve bir ikinci çift lipit tabakasından oluşur. *M. tuberculosis*'in genomu 1998'de tamamen dizilenmiştir. 3.924 gen için 4.411.519 baz çiftinden (GC=%65.6) oluşan dairesel bir kromozomu vardır (Brosch *et al*. 2000) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 *M. tuberculosis* genom yapısı (Cole *et al.* 1998).

M. tuberculosis, özel ortam gerektiren çok yavaş büyüyen bir basildir (2 ila 6 hafta). En çok kullanılan katı ortam Lowenstein-Jensen veya birçok varyantından biridir (Coletsos, vs.). Bunlar, değişken oranlarda asparajin, gliserin veya malaşit yeşili olarak ilave edilen katı yumurta bazlı ortamlardır. Kültür ayrıca sıvı ortamda, örneğin Middlebrook Mikobakteri Büyüme İndikatörü Tüpünde (MGIT) veya otomatik sistemde mümkündür. Koloniler 2 ila 4 hafta sonra ortaya çıkar ve fildişi beyazı, kaba ve ortada yapışkandır. 2-3 ay sonra yavaş yavaş 3-4 mm büyür. Daha sonra karnabahar görünümündedirler. Tüm TB lezyonlarında TB basilleri, insan hücrelerinin hem içinde hem de dışında bulunur ve dış ortamda uzun süre kalabilir (kuru balgam) (Taylor *et al*. 2003).

Her ne kadar tüberkül basilleri tedavi edilmiş hastalarda latent formda varlığını devam ettirse de, epidemiyolojik anlamda "mikrop taşıyıcılarından" söz edilmez. Bu gizli basil, fibröz veya kalsifiye edilmiş bir kabuk ile çevrili derin odaklarda bulunur ve dışarıya atılmazlar. Sadece "aktif tüberküloz" hastaları bulaşma kaynağıdır. Bulaşma çoğunlukla hava yoluyla, ara sıra oral veya sindirim yoluyla olur. Bakteriler, hastalığa eşlik eden şiddetli öksürük krizleri sırasında solunum yoluyla dışarıya atılır (Brosch *et al*. 2000).

Akciğer TB'u, alveollere ulaşmak için yeterince küçük partiküllerin (8 mikrona eşit veya daha az) solunmasından kaynaklanır. *M. tuberculosis*, havaya ve toza karşı çok dirençli olma özelliğine sahiptir, bu da TB'u çok bulaşıcı bir hastalık yapar var (Brosch *et al*. 2000).

2.2 Virülans Faktörleri

M. tuberculosis, akciğer enfeksiyonuna neden olur. Bu organda bakteriler, fagozomlara olgunlaşabilen endositik bölmelerin yer aldığı alveolar makrofajlar tarafından yutulur. Normal şartlar altında, fagozomlar lizozomlarla kaynaşır ve hücre içi bakteriler lizozomal hidrolazlara, reaktif oksijene ve azot türlerine maruz kalır (Meena 2010).

Fagozomdan kaçış

Diğer patojenik bakterilerin aksine, *M. tuberculosis*'in klasik, toksin benzeri bir virülans faktörü yoktur. İnsanlarda *M. tuberculosis*, solunum sistemini primer giriş yolu olarak kullanır. İçinde çoğalabildiği alveoler makrofajlar tarafından yok edilmeye karşı direnç gösterir. Makrofajların fagozomlarında *M. tuberculosis*'in hayatta kalması için önemli unsurlardan biri, fagozomun lizozomla füzyonunu geciktirerek asitlenmeyi azaltma kapasitesidir (Russell 2001). Moleküler düzeyde, bu durum açıklığa kavuşturulamamıştır. İlgili mekanizmaların belirlenmesi bu alandaki araştırmaların en büyük zorluklarından birini oluşturmaktadır (Russell 2001).

Model olarak zebra balığının kullanıldığı çalışmalar granülom oluşumunun *M. tuberculosis*'in çoğalmasındaki artışla korele olduğunu göstermiştir. Bu korelasyon, granülomatöz yapı düzeyi ile makrofaj alımının indüklenmesinin bir sonucudur ve *M. tuberculosis*'in virülans faktörü ESAT-6'nın ekspresyonu ve salgılanması ile modüle edilir. *M. tuberculosis*'in gecikme evresine adapte olma kapasitesi, diğerlerinin yanı sıra, iki bileşenli DosR/DosS sisteminin ifadesine bağlıdır (Volkman *et al*. 2004).

Mikobakteriler, olgunlaşma sırasında farklı seviyelerde etki ederek fagozomun bakterisidal rolünü engelleyebilir. Bu modülasyonun merkezi elemanı, PIP3

(fosfoinositol-3 fosfat) oluşumunun *M. tuberculosis* tarafından inhibe edilmesidir. Bunu yapmak için *M. tuberculosis*, sitozolik Ca^{+2} seviyesini arttırmaktan sorumlu olan enzim olan sfingosin kinazın etkisini engelleyebilir.

M. tuberculosis zarfında bir lipit bileşiği olan lipoarabinomannan (LAM), bilinmeyen bir mekanizma ile kalsiyumun bloke edilmesi suretiyle sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonu üzerinde de etkili olabilir. Dolaysıyla, fagozom membranında PIP3 birikiminin olmaması, erken fagozomun geç endozomlarla füzyonu ile daha fazla olgunlaşmadan sorumlu olan EEA1 (early endosomal antigen 1) proteininin alımını önler (Volkman *et al*. 2004).

Ayrıca *M. marinum* üzerinde yapılan çalışmalar, *M. tuberculosis*'in sitozola çıkarak fagozomdan kurtulabildiğini açıkça tanımlamaktadır (Stamm *et al*. 2003; Simeone *et al*. 2012). *M. tuberculosis*'te, RD1 (region of difference 1) ve ESAT-6 (Early Secretory Antigenic Target 6 kDa), proteinlerini kodlayan genler, mikobakterilerin sitozole translokasyonu için gereklidir. Fagozomdan kaçma, *M. tuberculosis*'in konak hücre içinde daha çok çoğalmasını sağlar. Öte yandan, mikobakteri zarfı, *M. tuberculosis* fizyolojisinde çevreye karşı koruyucu bir bariyer olarak baskın rolü olan karmaşık bir yapıdır.

Virülans faktörü olarak lipitlerin rolü

M. tuberculosis'in canlılığı için gerekli olan lipitler (mikolik asitler, arabinogalaktan) dış ortam ile olan takası kontrol eder. Sitoplazmanın etrafını saran, diğer canlı organizmaların plazma zarlarına benzer şekilde esas olarak fosfolipidlerden ve proteinlerden oluşan bir çift lipit katmanı ile karakterize edilen bir plazma zarı bulunur. Periplazmik bir boşluk, plazma zarını üst üste üç katmandan oluşan parietal iskeletten ayırır. Birinci katman, kısa peptitlerle bağlanmış, tekrarlayan bir N-asetilglukosamin ve N-asetil/glikolilmuramik asit grubu peptidoglikandan oluşur. Peptidoglikan, bir hetero-polisakarit kompleksi olan ikinci tabakaya, arabinogalaktan ile kovalent olarak bağlanır (Fukuda *et al*. 2013). Son katmanda mikolik asitler, çok uzun dallı zincirlere sahip yağ asitleri ve ayrıca arabinogalaktan bulunur. Mikolik asitlerin katmanını oluşturan

hidrofobik yüzey, kovalent bağların bulunmamasından dolayı organik çözücülerle işlemden sonra geri kazanılabildiklerinden, diğer lipitlerin sabitlenmesini sağlar. Tüm mikolik asitler ve ekstrakte edilebilir lipitler, mikobakteriyel duvarın dış zarını oluşturur. Zarfın iki bileşeni, kapsül adı verilen bir yapıyla kaplanır. Bu yapı, esas olarak polisakkaritler (glukanlar, arabinanlar ve arabinomananlar) ve *M. tuberculosis*'teki proteinlerden oluşmaktadır. Mikobakteriyel zarfın spesifikliği, diğer Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere kıyasla kuru kütlesinin %60'ından fazlasına sahip, özellikle lipitler açısından zengin bir bileşik olmasıdır. Bu özellik, düşük geçirgenlik sağlar (Daffe and Rayrat 2008).

M. tuberculosis lipitleri, hepsi patogenezde yer alan üç kategoriden oluşur: fosfatidilinositollerden türetilen lipoglikanlar, mikosidazatlardan türetilen lipitler ve trehaloslardan türetilen lipitler. Fosfatidilinositollerden türetilen lipoglikanlar, tüm mikobakteriyel türlerde bulunan esansiyel lipitlerdir ve yapıları nispeten korunur.

Mikositoz türevleri, yani ftioserol dimikosidazatlar (DIM'ler), fenolglikolipitler (PGL'ler) ve para-hidroksibenzoik asit türevleri (p-HBAD'ler), MTBK'nin mikobakterileri tarafından sentezlenir. *M. gastri* hariç, hepsi patojen mikobakteridir. MTBK'nin klinik suşlarının hemen hemen tamamı, DIM'lerin sentezlenmesi açısından çalışılmıştır. Bu lipitler mikobakterilerin virülansında önemli rol oynar (Daffe and Rayrat 2008).

Trehaloz lipitleri, sentezi çalışılan türe bağlı olarak değişen lipitlerdir. Monomikolatlar (TMM'ler) ve trehaloz dimikolatlar (TDM'ler) gibi bazıları, tüm mikobakteri türlerinde bulunan lipitlerdir. TMM'ler, üzerine 6 veya 6' pozisyonunda bir mikolik asidin asile edildiği trehalozdan oluşan lipitlerdir. Mikobakteriyel zarfın ana bileşenleri olan TDM'ler patojenlikleri için özellikle çalışılmıştır. Aslında, in vivo olarak, meromikolik zincirin siklopropan fonksiyonlarının yokluğu veya mikolik asitlerin uzunluğu, *M. tuberculosis*'in virülansında bir azalmaya yol açar.

İn vivo olarak, diaçiltrehalozlar (DAT)/pentaaçiltrehalozlar (PAT), yüzey reseptörleri tarafından indüklenen basilin fagositozunu modüle ediyor gibi görünmektedir.

Saflaştırılmış DAT'lerin, ya makrofajlarla temas halinde veya *M. tuberculosis* ile enfeksiyonundan önce ön muamele sırasında tek başına bulunması, TNF-a, Il-6 gibi pro-enflamatuar sitokinlerin salgılanmasında bir azalmaya yol açmaktadır. Bu pro-enflamatuar sitokinlerin DAT'ler tarafından salgılanmasının inhibe edilme mekanizması, MAP kinaz yolağına bağlıdır. DAT'ler ayrıca T lenfositlerin ve özellikle antijene spesifik CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin çoğalmasını inhibe ederek enfeksiyonun kontrolünde rol oynarlar (Daffe and Rayrat 2008).

2.3 Isı Şoku Proteinleri

Isı şoku proteinleri (Hsp'ler), strese tepki olarak vücut tarafından sentezlenen proteinlerdir. Hsp'ler sitoprotektif rol oynar ve stresli koşullar altında hücre düzenini ve homeostazı sağlarlar. Hsp'ler, fizyolojik sıcaklıkta normal koşullar altında tüm ökaryotik ve prokaryotik hücrelerde önemli bir seviyede eksprese edilir.

Hsp'ler başlangıçta *Drosophila melanogaster* larvalarında, termal şok durumunda kromozom koruyucuları olarak keşfedilmiştir (Tissieres *et al*. 1974). Birçok ısı şoku proteini, yeni ortaya çıkan polipeptitlerin katlanmasını ve toplanmasını önleyerek ve uygun şekilde modifiye edilmiş proteinlerin proteinlerinin katlanmasını kolaylaştırarak hücresel fonksiyonların sürdürülmesi için gerekli olan moleküler şaperonlar olarak işlev görür (Lanneau *et al*. 2010).

Hsp'nin baskın sınıfı moleküler şaperonlardır (Ellis and Hemmingsen 1989). Moleküler şaperonlar ayrıca moleküler ağırlıklarına göre beş ana aileye ayrılır. Bu aileler Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 ve küçük Hsp'lerdir. Moleküler şaperonlar sadece proteinlerin uygun şekilde katlanmasını sağlamakla kalmaz, aynı zamanda yanlış katlanmış proteinleri imha etmeye yönlendirir. Son yıllarda, yanlış bir katlanmış proteini bozmak için şaperonların hücre içinde mevcut olan bir proteazla birleştiği birçok şaperon yardımlı bozunma yolu ortaya çıkmıştır. Hsp33 gibi birkaç başka küçük ısıyla indüklenen moleküler şaperon da bilinmektedir (Jakob *et al*. 1999).

M. tuberculosis'teki ısı şoku proteinleri

M. tuberculosis'in oksidatif stres altında hayatta kalabilmesi, patogenezinin önemli bir özelliğidir. Isı şoku proteinleri, normal ve stresli koşullar altında hücresel fonksiyonları korumak için gerekli moleküler şaperonlardır. Isı şoku proteinleri ayrıca antijen sunumunda, lenfositlerin ve makrofajların aktivasyonunda da rol oynar (Tsuchiya *et al*. 2009).

Mikobakteri virülansı, makrofaj içindeki patojenin hayatta kalması için ifade edilen birkaç gene bağlıdır. Birçok ısı şoku proteininin ekspresyonunun *M. tuberculosis*'teki stres koşulları altında arttığı gösterilmiştir (Monahan *et al*. 2001). *M. tuberculosis*'te yapılan proteom analiziyle, makrofajlar içinde 16 kDa alfa-kristallin (HspX), GroEL-1 ve GroEL-2 gibi Hsp'lerin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Hipoksi ve açlık, *M. tuberculosis*'te sabit bir faza neden olur, bu koşullar altında *hspX* ve *acr2*'nin ekspresyonunda artış olur (Sherman *et al*. 2001). Hsp'lerin *M. tuberculosis*'te aşırı ekspresyonu, koruyucu etkisi nedeniyle yabanıl türe kıyasla yüksek sıcaklıkta hayatta kalma şansını artırır (Stewart *et al*. 2001).

M. tuberculosis'in küçük bir ısı şok proteini olan Hsp16.3, TB enfeksiyonunun latent fazında baskın protein olarak birikir ve strese tepki olarak ekspresyonu artar (Valdez *et al*. 2002). Tüm küçük Hsp'lerde bulunan merkezi "alfa-kristalin" bölgesini içerir ve in vitro protein birikmesine karşı korur (Valdez *et al*. 2002).

Protein fosforilasyonu organizmalar tarafından çevresel değişikliklere uyum sağlamak için sıklıkla kullanılır. Hsp16.3 ve Hsp70, *M. tuberculosis* enfeksiyonu sırasında sentezlenen immünodominant proteinlerdir. Bu Hsp'lerin otofosforilasyon aktivitesine sahip oldukları gösterilmiştir (Preneta *et al*. 2004). *M. tuberculosis*'in genomu, ClpP1, ClpP2, ClpC1, ClpX ve ClpC2 ısı şoku proteinlerinin varlığını ortaya çıkarmıştır. *M. tuberculosis* kaynaklı ClpC1'in doğal ATPaz aktivitesine sahip olduğu ve herhangi bir adaptör proteininin yokluğunda bir şaperon olarak protein birikmesini önlediği gösterilmiştir (Kar *et al*. 2008).

Hsp'ler, nekrotik hücre ölümü sırasında veya hücre ölümünden bağımsız olarak hücre dışı olarak salınabilir ancak salınımının mekanizması belirsizdir (Tsan and Gao 2004). İnsan ve bakteri Hsp'leri, bağışıklık tepkisini uyarır. Bakteriyel Hsp'ler makrofajlarda sitokin üretimini hızlı ve doğrudan artırarak bağışıklığı modüle edebilir. Bu sitokinler, antijene spesifik T hücrelerinin aracılık ettiği konakçı bağışıklığının geliştirilmesinde önemli bir rol oynar (Friedland *et al*. 1993). Murin intraepitelyal lenfositleri (IEL), çözünür bir *M. tuberculosis* ekstraktına maruz bırakıldığında, yüksek IL-3, interferon-γ ve IL-6 ekspresyonu gösterir (Mendez-Samperio *et al*. 1995). Tüberküloz hastalarından alınan periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC'ler) Hsp65'e proliferatif bir yanıt göstermiştir (Mendez-Samperio *et al*. 1995).

Isı şoku proteini Hsp70'in C-terminal kısmının, IL-12, TNF-alfa, NO ve CC kemokinleri üretmek için insan monositlerindeki Th-l polarizasyon sitokinlerinin uyarılmasından sorumlu olduğu gösterilmiştir (Wang *et al*. 2002). Hsp70, IL-10 ekspresyonunu indükler ve T hücrelerinin in vitro çoğalmasını engeller. Hsp70'in enflamatuar bir potansiyelden ziyade immünosüpresif özelliklere sahip olduğu görülmektedir (Motta *et al*. 2007).

M. tuberculosis, makrofajlar içinde hayatta kalmayı sağlamak için konakçı yanıtını manipüle edebilir ve inhibe edebilir. Anti-enflamatuar sitokin IL-10'un *M. tuberculosis* ile enfekte olmuş makrofajlarda fagozom olgunlaşmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (O'Leary *et al*. 2010). HspX/Acr, hipokside ve in vivo kalıcılık sırasında bakterilerin hayatta kalması için gerekli olan nitrik okside maruz kaldığında ekspresyonu artan uyku hali düzeninin bir parçasıdır. Acr ayrıca enfeksiyon sırasında bir immünodominant antijendir (Roupie *et al*. 2007).

Daha önce bir Hsp için hazırlanan bağışıklık sistemi diğer Hsps'leri de tanıyabilir. Sarkoidoz (SA) çok sistemli granülomatöz otoimmün bir hastalıktır. SA ve TB'nin klinik ve histopatolojik görüntüleri benzerdir. *M. tuberculosis*'in ısı şoku proteinlerinin SA'nın oluşumunda rol oynayan proteinler olduğu düşünülmektedir (Chen and Moller 2008; Rajaiah and Moudgil 2009). *M. tuberculosis*'in Hsp'lerinin, SA ve TB granülomlarının oluşumunun patogenezinde önemli olabilecek apoptozda rol oynadığı

da önerilmektedir (Dubaniewicz *et al*. 2006a; Dubaniewicz *et al*. 2006b). İnsan ve mikobakteriye ait Hsp65 proteinleri arasında yüksek bir çapraz reaktivite vardır.

2.4 Yenilebilir Aşıların Geliştirmesi

Aşı kullanımı, vücudu enfeksiyonlara karşı korumak için bağışıklık sistemini aktive eder ve uyarır. Genellikle canlı, zayıflatılmış veya öldürülmüş bir patojen kullanılarak yapılan ve enjeksiyonla veya oral yolla verilen geleneksel aşılar tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak bunların üretimi yüksek maliyetler, fazla zaman ve iyi bir altyapı gerektirir (Hilleman 2002).

Aşıların büyük ölçekli üretimleri zaman alıcı olmasına rağmen, salgınları ve hastalıkların yeniden ortaya çıkmasını engellemede çok etkili oldukları bilinmektedir. Rekombinant aşıların ve diğer klinik olarak önemli proteinlerin seri üretimi için, bakteri, maya ve memeliler gibi standartlaştırılmış sistemler şu anda başarıyla kullanılmaktadır. Bu sistemler, daha fazla maliyet ve zaman gerektirdiği ve hedefin ölçeklenebilirliğini ve bütünlüğünü sınırladığı için avantajları kısıtlanmaktadır (Hilleman 2002).

Bitkilerde yenilebilir bir aşının geliştirilmesi, bitki dokularında farklı ekspresyon sistemleri aracılığıyla arzu edilen ve klinik olarak önemli proteinleri üretmek için kullanılan bir teknolojidir. Bu teknolojinin en önemli amacı, yenilebilir bir aşı üretip oral uygulama sonrası spesifik bir bağışıklık tepkisini indükleyerek hastalıklara karşı koruma sağlamaktır (Yusibov and Rabindran 2008).

Yenilebilir aşı terimi, Charles Arntzen tarafından Hugh Mason ve meslektaşları ile ortaya atılmıştır. İlk olarak ayçiçeği ve tütün bitkilerinde nopalin sentaz ve insan büyüme hormonu üretilmiştir. Farmasötik proteinlerinlerin transgenik bitkilerde üretimi yayınlandığından beri bitki moleküler tarım fikri tüm hızıyla devam etmiştir ve o zamandan beri endüstriyel ve tarımsal önemi olan birçok rekombinant proteinin üretimi gerçekleştirilmiştir (McGarvey *et al*. 1995). Bunlar arasında biyolojik olarak aktif

interferon alfa (IFN-α) D, insan IFN-α D ORF-II'sini taşıyan karnabahar mozaik virüsü kullanılarak şalgam bitkisinde üretilmiştir (Zoeten 1989).

Yenilebilir aşıların geliştirilmesi ve pazarlanması çaba ve zaman gerektirir, insan ve hayvan hastalıkları için geliştirilen birçok yenilebilir aşı vardır ve klinik çalışmaların farklı aşamalarına ulaşmıştır. Yenilebilir aşının oluşturulması, belirli bitkiler için transformasyon ve rejenerasyon protokollerini gerektirir. Seçilen gen, arzu edilen taşıma sistemi ile bitki hücrelerine gönderilir. Diğer taraftan, geleneksel aşıların üretimi çok pahalıdır ve depolanmaları için uygun bir saflaştırma ve soğutma gerektirir (Lal *et al*. 2007).

Yenilebilir aşılar çok dikkatli bir şekilde tasarlanmalı ve herhangi bir patojenite olasılığı göz ardı edilmemelidir. Bu aşılar çocuklar için çok yararlı olabilir, çünkü kalifiye tıbbi personel olmadan ağızdan alınabilir. Yenilebilir aşı kolaylıkla daha büyük ölçekte ve düşük maliyetle üretilebilir. İlgilenilen belirli hayvan türlerinde eprüvasyon deneyleri yapma olasılığı, yenilebilir bitkisel aşıların gelişmesini teşvik etmiştir. Yenilebilir aşı, istenen bitkilere istenen genin aktarılmasıyla geliştirilebilir. Transgenik bitkiler kullanılarak yenilebilir bir aşı geliştirmek için şu anda başarılı bir şekilde iki strateji uygulanmaktadır: nükleer/plastit transformasyonu ve geçici ekspresyon (Gómez *et al*. 2008).

Yenilebilir aşılar, en ucuz aşılar olarak kabul edilir, çünkü seri üretim için daha az maliyet gerektirir ve ağız yoluyla uygulanması kolaydır. Meyve ve sebze şeklinde çiğ olarak kullanılabilirler. Yenilebilir aşılar kurutulabilir ve soğuk depo gerektirmeyen bir formda kullanılabilir. Yenilebilir aşı, bağışıklık yanıtlarını iyileştirmek için bir adjuvan gerektirmez ve etkili bir şekilde verilebilir (Gómez *et al*. 2008) .

Transgenik bitki yenildikten sonra antijen bağırsak hücre duvarında emilir, M hücreleri tarafından alınır ve makrofajlara ve B hücrelerine geçer. Peyer yamaları ve bağırsakla ilişkili lenfoid dokulardaki T ve B hücreleri aracılığıyla serum IgG ve serum IgE tepkileri üretilir. Patojenik bir enfeksiyon meydana geldiğinde, T yardımcı bellek

hücreleri hızla antikorların üretimini ve salgılanmasını indükler ve salgılanan antikor hemen istila edici antijeni nötralize eder (Gómez *et al*. 2008) .

2.4.1 Bir Gen İfade Sistemi Olarak Bitkiler

Tüm canlı organizmalar için ana besin kaynağı olan çeşitli bitkiler uzun bir tarih boyunca yetiştirilmiş ve üretilmiştir. Gıda maddesi olarak katkısının yanı sıra, bitkiler şu anda enzim, büyüme faktörü, peptit veya antikor gibi geniş bir çeşitlilikte biyofarmasötiklerin üretimi için yeni kaynaklar olarak kabul edilmektedir (Streatfield 2006).

Bitkilerin, rekombinant protein üretimi için biyoreaktör olarak kullanılması, bitki genetiği, moleküler biyoloji ve biyoteknolojideki birçok gelişme sayesinde iyi bir şekilde tanımlanmıştır. Yıllar önce bir kavram olarak tanıtılan bitki biyoreaktörleri, diğer biyolojik kaynaklara ait yararlı proteinleri üretmek için manipüle edilen genetiği değiştirilmiş organizmalardır (GDO). Üretim için bakteri veya hayvan hücresi kullanımına kıyasla, bitki biyoreaktör sistemlerinde potansiyel toksinlerle veya insan patojenleri ile kontaminasyon riski minimumdur.

Alt ünite aşı proteinlerinin ağız yoluyla alımının, mukoza bağışıklık tepkilerini ortaya çıkarma şansının artması nedeniyle subkutan veya intramüsküler enjeksiyon aşılarından hücre aracılı yanıtlar bakımından daha etkili olduğu gösterilmiştir. Bitkilerde çok sayıda aşı antijeni başarıyla üretilmiştir ve bitkilerde antijen üretimi gelecekte iyi bir uygulama şeklini alabilir. Bu antijenler arasında *Borrelia burgdorferi*'nin OspA proteini, hepatit B virüsünün yüzey antijeni, *E. coli*'nin ısıya bağlı enterotoksinin B alt birimi, Norwalk virüsü antijeni ve kızamık antijenleri bulunur.

Ökaryotik hücrelere ve aynı zamanda memeliler gibi kompleks bir sisteme sahip olduklarından, transgenik bitkiler insan proteinlerine eşdeğer terapötik proteinler (biyoaktif proteinler) üretebilirler. Ayrıca antikorların üretiminde ağır ve hafif zincir immünoglobulinlerin ekspresyonu için tütün uygun bir ekspresyon sistemi olarak kullanılabilir. Ek olarak, mevcut bilgiler ışığında, insanları ve hayvanları enfekte edebilecek hiçbir bitki patojeni yoktur, böylece memeli hücreleri veya transgenik

hayvanlar tarafından üretilen proteinlerin aksine bitkiler tarafından üretilen proteinler bakteri veya virüs bulaşması riskini ortadan kaldırır (Flore Biteau 2009).

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 (Murashigeand Skoog 1962).

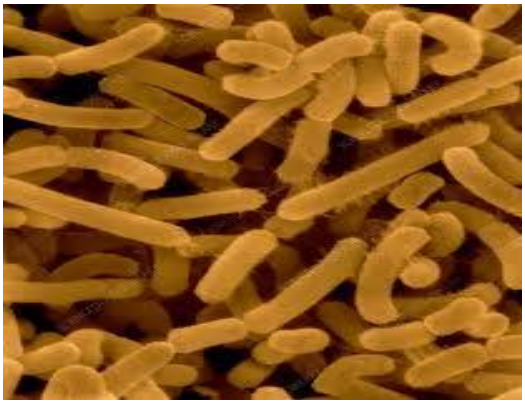
Tütün, çeşitli organizmalarda transgenlerin ekspresyonu için en yaygın kullanılan bitkidir, çünkü kolayca yetiştirilir ve işlenir, bol miktarda taze doku sağlar ve doku/hücre kültürü teknikleri iyi bilinmektedir. Bu bitki, çeşitli nedenlerden ötürü transgenik araştırmalarda bir model bitki sistemi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır: moleküler genetiği iyi anlaşılmıştır, genom bilgisi mevcuttur, genetik transformasyon kolayca gerçekleştirilebilir, tütün bitkileri in vitro ve sera koşullarında yetiştirilebilir ve büyük miktarda biyokütle üretir (Rice *et al*. 2005).

Ayrıca, rekombinant proteinlerin üretimi için kloroplast transformasyonu, tütünün verimliliğini daha fazla artıran bir sistemdir. Tütün bitkileri, ekstrakte edilebilen ve saflaştırılabilen farmasötikler ve biyopolimerler gibi değerli endüstriyel proteinlerin ve

enzimlerin üretimi için canlı fabrikalar olarak kullanılabilir. Aynı zamanda transgenik tütün bitkileri bitki-patojen etkileşimleri, çevresel tepkiler, büyüme regülasyonu ve yaşlanma gibi temel biyolojik fonksiyonları incelemek için ideal model organizmalardır (Rice *et al*. 2005).

2.4.2 *Agrobacterium tumefaciens* Transformasyonu

Agrobacterium, toprakta yaşayan, Gram negatif, spor oluşturmayan, hareketli bir basil bakteridir (Şekil 2.4). Bu bakteri bitkilere gen aktarımında kullanılmaktadır. *A. tumefaciens*, hayatta kalmasını sağlamak için başka bir organizmayı genetik olarak değiştirebilir.

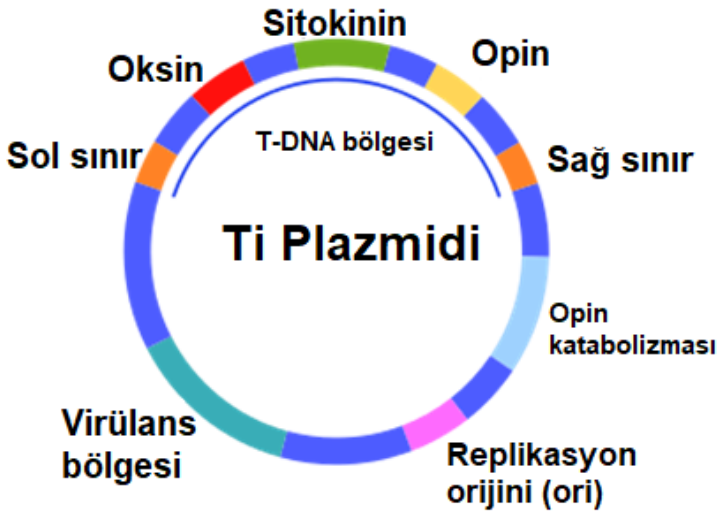


Şekil 2.4 *Agrobacterium tumefaciens* hücrelerinin elektron mikroskobu altındaki görüntüsü (Scimat 2016).

1907'de Erwin Smith ve arkadaşları *A. tumefaciens*'i enfekte ettiği bitkilerde tümöre sebep olan bir toprak bakterisi olarak tanımladılar. Günümüzde, bitkilere gen transferinde en yaygın olarak kullanılan araçlardan biridir. *A. tumefaciens*, bitkilerin tümöründen sorumlu tümör indüksiyonu (Ti) adı verilen bir plazmite (200 kb) sahiptir. Daha sonra *A. tumefaciens* parazitizminin plazmidin küçük bir parçasına dayandığı gösterilmiştir. T-DNA adındaki bu kısım, sağ ve sol sınırlarla çerçevelenmiş ve çeşitli genleri içeren bir DNA dizisidir. Bitki tümör özelliklerini sağlayan oksinlerin ve sitokininlerin anormal üretiminden sorumlu genleri içerir.

T-DNA'da, opinlerin sentezini uyaran genler de vardır. Opinler, enfekte bitki hücrelerinde bakteri suşlarının çoğalmasından sağlayan bir proteindir. Ti plazmidinde,

T-DNA'nın transferine ve entegrasyonuna yardımcı olan bir virülans bölgesi de vardır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Bitkilerde *Agrobacterium tumefaciens*'in tümör indüksiyonundan (Ti) sorumlu bileşenler (Sangwan 2017).

İstenilen genin bitki hücrelerine *A. tumefaciens* ile entegrasyonuna izin vermek için, T-DNA sekansının bileşenlerinin değiştirilmesi gerekir. Seçici genleri ekleyerek bakterilerin patojenik gücünden sorumlu olan genler inaktive edilir. Böylece Ti plazmidinin "silahsız "olduğu söylenir. Ancak, T-DNA ve virülans genlerinin iki kenarı değiştirilmemelidir. Daha sonra Ti plazmiti iki bölüme ayrılmalıdır. Bunlardan birisi virülans genleri içeren ancak T-DNA'sı olmayan plazmittir. Diğeri ise ilgili geni içeren rekombinant T-DNA'dır. İki plazmit, homolog rekombinasyon işlemiyle birleşir.

2.4.3 Transgenik Bitkilerin Analizi

Bitki transformasyonu, ökaryotik genlerin organizasyonunu ve düzenlenmesini anlamak ve ayrıca bitki biyolojisinin fizyoloji, genetik ve gelişimsel biyoloji gibi çeşitli yönlerini incelemek için önemli bir deneysel araç haline gelmiştir (Birch 1997). *A. tumefaciens*'in aracılık ettiği bitki transformasyonu, yabancı genlerin bitki genomuna sokulmasında en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Bu yöntem kullanılarak konak genomun mutlak korunumu ile yüksek düzeyde mükemmel transgenik lokuslar geliştirilebilir. Transfer

DNA'nın (T-DNA) entegrasyonunda yer alan moleküler mekanizmalar hala iyi karakterize edilmemiştir; bununla birlikte entegrasyonun rekombinasyonla gerçekleştiği düşünülmektedir. Transgenik lokusların düzenlenmesi genomik faktörler tarafından belirlenir ve transgenin eklenmesi için kullanılan yönteme bağlı değildir (Birchler 2011).

Derinlemesine bir araştırma için, transgeniklerde diğer genlerin ve metabolitlerin ekspresyonu üzerindeki etkiler incelenmelidir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) transgenik araştırmalarda önemli bir tekniktir, çünkü bitki materyali daha ileri doğrulayıcı analizler için sınırlayıcı bir faktör olduğunda varsayılan transgenik bitkileri gelişimin erken bir aşamasında tarayabilir. Yüksek hassasiyet, özgüllük, zaman ve düşük maliyetler PZR'nin bazı avantajlarıdır.

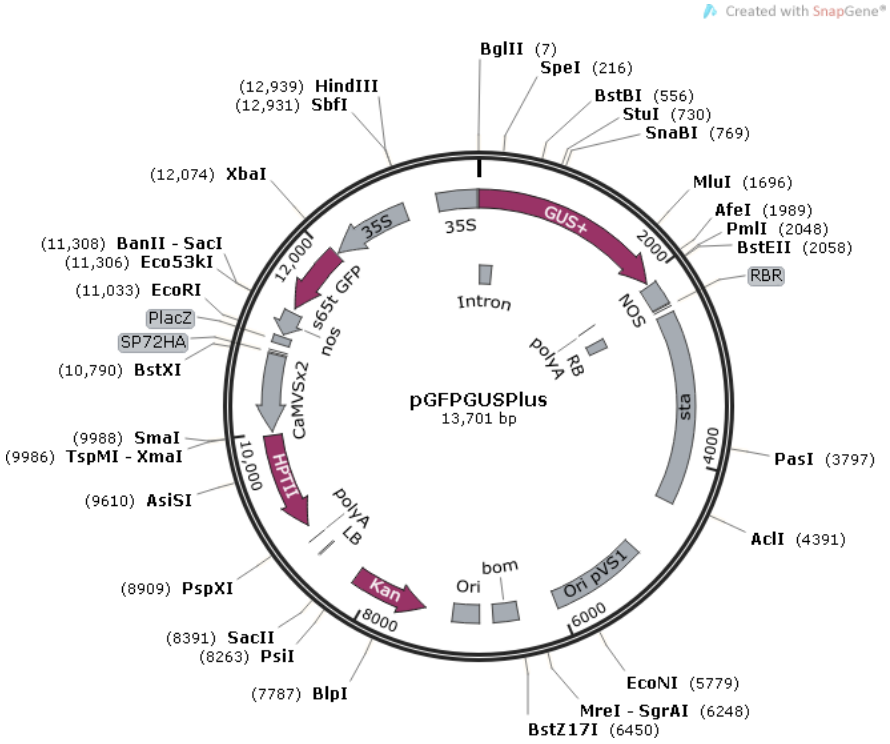
Bu yöntemde, transgen için benzersiz olan kesin olarak tanımlanmış bir fragman, transgen için spesifik primerlerin uzatılmasıyla in vitro amplifiye edilir ve amplifiye edilmiş fragmanın boyutuna göre elektroforezden sonra bir agaroz jelde görüntülenir. Amplifiye edilmiş ürün ayrıca sekanslama veya Southern blotlama ile teyit edilebilir. Bununla birlikte, çoğu durumda, transgenik içine yerleştirilen transgenin kopya sayısı, bunun mRNA ve proteinler düzeyinde ekspresyonu ve diğer hücresel aktiviteler üzerindeki etkisi hakkında ek bilgi gereklidir. Transgen ekspresyonu, RNA, protein ve biyoanaliz seviyelerinde değerlendirilebilir (Birchler 2011).

Sonuçta bir protein olarak ifade edilen transgen, Western blot analizi veya biyoanalitik test ile teyit edilebilir. Western blot, biyokimyasal reaksiyonla görüntülenen proteine özgü bir antikor ile gerçekleştirilir. Ek olarak, transgenin eklenmesinin etkisi, karşılaştırmalı bir proteomik yaklaşımla da görselleştirilebilir (Birchler 2011).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Bakteri ve Plazmitler

Tez kapsamında kullanılan *hspR* geni daha önceden klonlanmış halde (Okay *et al*. 2019) pGEMT-*hspR* plazmidini içeren *E.coli* hücrelerinde bulunmaktadır. *hspR* genini tütün bitkisine aktarmak için pGFPGUS+ plazmidi (Şekil 3.1) kullanılmıştır.



Şekil 3.1 pGFPGUS+ plazmidinin haritası.

3.2 Saklama ve Büyütme işlemleri

hspR genini (Okay *et al*. 2019) içeren *E.coli* hücreleri Luria Broth (LB) sıvı besiyerinde büyütülmüştür. Luria Agar (LA) katı besiyeri aylık kullanımı için +4°C'de muhafaza edilmiştir. Daha uzun süreli canlılıklarını korumak amacı ile %50 gliserol içiren LB içerisinde -80°C'de depolanmıştır. LB ve LA (Ek 1) besiyerlerine ampisilin 100 µg/mL, kanamisin 25 µg/mL konsantrasyonda eklenmiştir.

3.3 Primer Tasarımı

PZR'de kullanılan primerler (Çizelge 3.1), NCBI Gen Bankası'ndaki diziler kullanılarak Primer 3 ve BLAST programları aracılığı ile belirlenmiştir.

Çizelge 3.1 PZR'de kullanılan ileri ve geri primer özellikleri

Gen Adı	Primer	Nükleotit sekansı	Gen uzunluğu (bç)	GC oranı (%)	Tm (°C)
hspR	hspRF	5'-ggatccatggcgaagaacccaaag-3'	381	54,2	63,3
	hspRR	5'-agatcttcaccggcgcggtttcc-3'	381	60,9	65,8

3.4 *hspR* Geninin pGFPGUS+ Vektörüne Aktarılması

hspR geninin pGFPGUS+ vektörüne aktarılması için, ilk önce pGEMT-*hspR* plazmidini içeren *E.coli* hücreleri 15 mL Luria broth sıvı besiyeri ve 100 µg/mL ampisilin içeren falkon tüpüne ekilerek 24 saat 37 ºC'de inkübe edilmiştir.

pGEMT-*hspR* plazmidini elde etmek amacıyla LB sıvı besiyerinde büyütülmüş bakteri kültürü 12000 rpm'de 1 dakika çöktürülmüştür ve GeneJET plazmit izolasyon kiti (Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. Bunun için, pellet üzerine 250 µL süspansiyon solüsyonu eklenmiştir ve pellet kalıntısı kalmayana kadar pipetleme yapılmıştır. Karışıma 250 µL lizis solüsyon eklenmiştir ve tüpler 4-6 kez ters çevrilerek karıştırılmıştır. Karışıma 350 µL nötralizasyon solüsyonu eklenmiştir. Hücre lizatı 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda sıvı faz GeneJET spin kolona alınmıştır. 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek kolona iki seferde 500 µL yıkama solüsyonu eklenmiştir ve 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolon yeni

bir ependorf tüpe yerleştirilmiştir. Kolonun merkezine iki seferde toplam 50 µL elüsyon tamponu eklenmiştir. 12000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiş ve pGEMT-*hspR* plazmidi saflaştırılmıştır.

pGEMT-*hspR* plazmidinden *hspR*'yi kodlayan DNA fragmentini izole etmek için bir eppendorf tüpüne 1 µl *Bam*HI enzimi, 1 µl *Bgl*II enzimi, 4 µl buffer ve 14 µL pGEMT-*hspR* plazmidi eklenmiş ve 90 dakika 37 ºC'de inkübe edilip agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez işlemi, %0,8'lik agaroz jel düzeneğinde (Thermo Scientific) TAE **(**Ek 2**)** tamponunda gerçekleştirilmiştir. DNA örnekleri 6X DNA yükleme boyası (Thermo Scientific) ile birlikte jele yüklenmiştir. DNA bantlarının moleküler ağırlıkları 1000 bp DNA cetveli (Thermo Scientific) kullanılarak belirlenmiştir. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra örnekler agaroz jelde 90 Volt elektrik akımında 60 dakika yürütülmüştür. Yürütme işleminin ardından agaroz jel etidyum bromür çözeltisi (0,5 µg/mL, TAE tamponu) ile boyanmıştır. DNA bantları UV lambası (Vilber Lourmat) ile görüntülenmiştir.

Agaroz jelden kesilen *hspR* bandı GeneJET jel ekstraksiyon kiti (Thermo Scientific) kullanılarak izole edilmiştir. Elde edilen *hspR* fragmenti ve aynı yöntemler kullanılarak *Bgl*II enzimi ile kesilmiş pGFPGUS+ vektörü kullanılarak ligasyon yapılmıştır. Ligasyon reaksiyonu için 7 µL *hspR*, 1 µL pGFPGUS+, 1 µL ligaz tamponu ve 1 µL T4 DNA ligaz kullanılmıştır. Bu karışım 4 °C'de 16 saat inkübe edilmiştir.

3.5 *E.coli* DH5alfa Hücrelerine Transformasyon

pGFPGUS+ ve *hspR* ile elde edilmiş olan ligasyon ürünleri ve kompetan *E. coli* DH5α hücreleri kullanılarak transformasyon yapılmıştır. Bakterileri kompetan hale getirmek için, sıvı besiyerine (LB) ekilen ve bir gece 37°C 'de büyütülen *E.coli* DH5α kültürü 200 mL steril edilmiş LB'ye aktarılmıştır. Kültürün OD_{600} değeri 0,4-0,6'ya ulaşana kadar 37 °C'de 200 rpm'de çalkalayıcı inkübatörde büyütülmüştür. Kültür 10 dakika buzda bekletilip steril falkon tüplere aktarılarak 4500 rpm'de 5 dakika +4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda pellet üzerine filtre ile steril hale getirilen 20 mL kompetan tamponu (Ek 2) eklenmiştir ve 4500 rpm'de 5 dakika +4 °C'de santrifüj edilmiştir.

Kompetan hücreler buz üzerinde 15 dakika bekletilmiştir. 10 µL ligasyon ürünü (pGFPGUS+*hspR*) için 100 µL kompetan hücre kullanılmıştır. Hücre ve ligasyon ürün karışımı 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Süre sonunda hücreler su banyosunda 42°C'de 90 saniye ısı şokuna uğratılmıştır. Isı şokunun ardından hücreler hızlı bir şekilde buz üzerine alınmıştır ve 5 dakika bekletilmiştir. 5 dakika sonunda antibiyotik içermeyen 700 µL LB eklenmiştir. Karışım 37°C'de 100 rpm'de çalkayacı inkübatörde 90 dakika inkübe edilmiştir. Hücreler 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek 100 µL LB içinde bakteri pelleti çözündürülmüştür. Daha sonra hücreler kanamisinli LA plaklara ekilmiştir ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

3.6 Plazmit İzolasyonu

pGFPGUS+*hspR* taşıyan rekombinant *E. coli* hücrelerini belirlemek için manuel plazmit izolasyonu yapılmıştır. Bir gece önceden kanamisinli LA plaklara çizgi ekim yapılan bakteri kolonileri steril ortamda pipet ucu ile kullanılarak eppendorf tüplere alınmıştır. Tüplere 100 µL STE tampon (Ek 2) eklenmiştir ve çözünene kadar vortekslenmiştir. Tüpler buz üzerinde 20 dakika bekletilmiştir, sonra 60 µL lizis tampon (Ek 2) eklenmiştir ve vortekslenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır ve ardından tüpler 70°C'de su banyosunda 10 dakika inkübe edilmiştir. Sırasıyla, tüpler soğuk suya tutulmuş ve 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Sonunda tüpte bulunan süpernatan %0,8'lik agaroz jelde 1 saat (90 V) yürütülmüştür**.**

3.7 *hspR* Geninin *Agrobacterium tumefaciens* Hücrelerine Aktarılması

3.7.1 Kompetan *A. tumefaciens* Hazırlanması

LA besiyerinde daha önceden elde edilen *A. tumefaciens* kolonileri alınıp 20 mL kanamisinli LB besiyerine ekilmiştir ve 28 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Büyütülen kültür 250 mL steril LB'ye aktarılmıştır. OD_{600} 0,6-0,7'ya ulaşana kadar 28 °C'de 200 rpm'de çalkalayıcı inkübatörde 3saat büyütülmüştür. Bakteriler steril falkon tüplere aktarılarak 4500 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda tüpte bulunan pelletler yeni bir falkon tüpünde birleştirilip 25 mL Hepes ve gliserol eklendikten sonra 4500 rpm'de 10 dakika +4°C'de 3 kez yıkanmıştır. Pelletin üzerine

10 mL Hepes (Ek 2) ve gliserol ekenmiştir. İşlem sonunda bakteriler steril ependorf tüplere paylaştırılmıştır ve -80°C'de saklanmıştır.

3.7.2 Elektroporasyon Aracılığıyla pGFPGUS+*hspR* Plazmidi Aktarımı

E. coli DH5α'dan izole edilmiş pGFPGUS+*hspR* ve kontrol amacıyla *hspR* içermeyen pGFPGUS+ plazmitleri elektroporasyon tekniğiyle kompetan *A. tumefaciens* bakterilerine aktarılmıştır. Elektroporasyonda, yüksek voltajlı elektrik ile hücre zarında geçici porlar oluşturularak zarın geçirgenliği arttırılır. İstenilen geni taşıyan DNA parçasının hücre içine girmesi sağlanır.

Elektroporasyon işlemi için 40 µL kompetant *A. tumefaciens* hücreleri içeren steril küvete 4 µL pGFPGUS+*hspR* plazmidi eklenmiş ve Gene Pulser (BioRad) elektroporasyon cihazında *A. tumefaciens* programı kullanılarak transformasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Küvete 800 µL LB besiyeri eklenmiştir ve karışım steril eppendorf tüplerde 28°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra, hücreler kanamisinli LA besiyerinde yayılmıştır ve plaklar 28°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Rekombinant *A. tumefaciens* hücrelerini doğrulamak için sırayla manel plazmit izolasyonu ve PZR kullanılmıştır.

3.7.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

hspR genini taşıyan rekombinant *A. tumefaciens* hücrelerini doğrulamak için PZR yapılmıştır. Bunun için 5 µL *Taq* buffer, 5 µL $MgCl_2$, 1 µL hspRF primer, 1 µL hspRR primer, 1 µL dNTP, 3 µL plazmit, 1 µL *Taq* DNA polimeraz kullanılmıştır. Karışımın hacmi dH_2O ile 50 µL'ye tamamlanmıştır. PZR programı şu şekilde ayarlanmıştır: 1 döngü 94ºC 10 dk, 35 döngü (94ºC 1 dk, 60ºC 1 dk, 72ºC 1 dk), 1 döngü 72ºC 10 dk. PZR ürünleri %0,8'lik agaroz jelde 1 saat (90 V) yürütülmüştür.

3.8 Transgenik Tütün Bitkilerinin Elde Edilmesi

Çalışmada kullanılan tütünler, tohumların çimlendirilerek uygun doku kültürü şartlarında yetiştirilmesi ile elde edilmiştir. Malatya Şark Tütünü (*Nicotianatabacum* 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 and 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 (Şekil 3.2). 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.



Şekil 3.2 İklim kabininde inkübe edilip yetiştirilen tütün bitkisi örneği.

3.8.1 Gen Transferi

pGFPGUS+ (kontrol grubu) ve pGFPGUS+*hspR* plazmitlerini taşıyan *A. tumefaciens* hücreleri 28 °C'de 2 gün süreyle kanamisin içeren YEP (Ek 1) besiyerinde büyütülmüştür. İnkübasyon sonunda elde edilen bakteri kültürleri 3000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir ve pelleti OD_{600}'de 0,5-0,8'e gelene kadar RM (Ek 1) sıvısında 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. (Şekil 3.2) ve 30 dakika 28°C'de inkübatörde bekletilmiştir. Enfeksiyon sonrası (Şekil 3.3) yaprak diskleri, karanlıkta ve antibiyotik içermeyen bir ortamda (Ek 1) 4 gün boyunca büyütülmüştür (Şekil 3.4). Bu süre sonrasında eksplantlar, 3 dakika boyunca bir higromisin (20mg/mL) içeren sıvı RM ile yıkanmış daha sonra da higromisin (20mg/mL) ve Eqitax (4ml/L) 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 ve gelişimleri gözlenmiştir.



Şekil 3.3 *A. tumefaciens* ile enfekte edilmiş tütün yaprakları.



Şekil 3.4 Transfeksiyon sonrası steril kağıt üzeinde kurutulmuş tütün yaprakları.



Şekil 3.5 pGFPGUS+*hspR* taşıyan *A. tumefaciens* ile tütün bitkilerinin transformasyonu.

3.9 Transgenik Tütün Bitkilerinin Doğrulanması

3.9.1 Bitkilerden DNA izolasyonu

Transgenik tütün bitkilerinin *hspR* genini taşıdığını doğrulamak amacıyla pGFPGUS+ ve pGFPGUS+*hspR* ile transforme edilen bitkilerden, GeneJET Bitki Genomik DNA Saflaştırma Kiti (Thermo Scientific) kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Bunun için, tütün yaprakları ezilip 1 mL miktarı geçmeden 2 mL'lik eppendorf tüpte aktarılmıştır ve 350 µL lizis buffer A eklenmiştir. Karışıma 2 dakika sonikatör uygulanmıştır ve 50 µL lizis buffer B ve 20 µL RNase A eklenmiştir. Ardından 65°C'de su banyosunda 10 dakika inkübe edildikten sonra 130 µL presipitasyon solüsyonu

eklenmiştir ve 1-2 kez karıştırarak buzda 5 dakika bekletilmiştir. Sonra 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernatan (450-550 µL) temiz bir eppendorf tüpe aktarılmıştır. Ardından 400 µL "plant dDNA binding" solüsyonu ve 400 µl %96 etanol ekleyip iyice karıştırarak sıvı faz (600-700 µL) GeneJET spin kolona alınmıştır. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek kolona sırayla 500 µL yıkama solüsyonu I eklenmiştir ve 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra 500 µL yıkama solüsyonu II eklenmiştir ve 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra kolon yeni bir eppendorf tüpe yerleştirilmiştir. Kolonun merkezine iki seferde toplam 100 µL elüsyon tamponu eklenmiştir ve her seferde 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve DNA örnekleri -20 °C'de saklanmıştır.

3.9.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Transgenik bitkilerden elde edilen genomik DNA örnekleri kullanılarak PZR yapılmıştır. Bunun için, 5 µL *Taq* buffer, 5 µL $MgCl_2$, 1 µL hspRF primer, 1 µL hspRR primer,1 µL dNTP, 5 µL DNA, 1 µL *Taq* DNA polimeraz kullanılmıştır. Karışımın hacmi dH_2O ile 50 µL'ye tamamlanmıştır. PZR programı şu şekilde ayarlanmış: 1 döngü 94ºC 10 dk, 30 döngü (94 ºC 1 dk, 52 ºC 30 saniye,72 ºC 1 dk). PZR ürünleri %0,8'lik agaroz jelde 1 saat (90 V) yürütüldü. Kontrol grubu olarak pGFPGUS+ ile transforme edilmiş bitki, pozitif kontrol olarak ise pGEMT-*hspR* plazmidi kullanılmıştır.

3.9.3 Bitkilerden Protein İzolasyonu

pGFPGUS+ ve pGFPGUS+*hspR* ile transforme edilen tütünlerden protein izolasyonu Niu *et al*. (2018)'e göre yapılmıştır. Donmuş transgenik tütün yaprakları soğuk havanda ezilerek üzerine soğuk %10 trikloroasetik asit (TCA)/aseton karışımı eklenmiştir. Numuneler –20°C'de bir gece bekletilmiş ve 5,000 g ve 4°C'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Pelletler, soğuk aseton kullanılarak 10 dakika 5,000 g vet 4°C'de santrifüjle iki defa yıkanmıştır. Çökelen proteinler 1-3 dakika oda sıcaklığında kurutulmuş ve %0,5 SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 6,8) ve 20 mM DTT içeren tampon çözelti kullanılarak çözülmüştür.

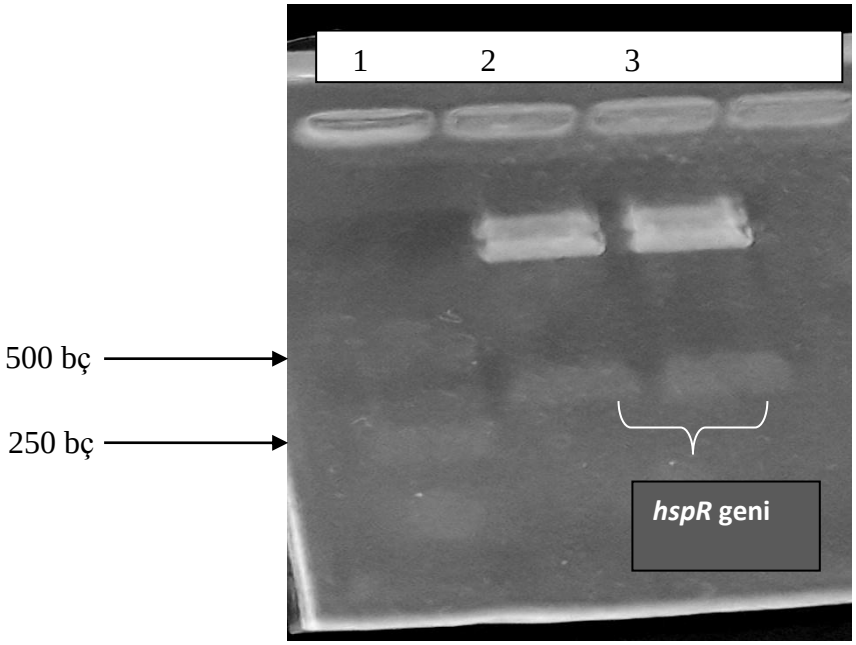
3.9.4 Western Blot

Transgenik tütün bitkilerinin HspR proteini üretimlerini doğrulamak için Western blot deneyi yapılmıştır. Protein örneklerini taşıyan SDS-poliakrilamit jel, Whatman kağıdı, 0,2 μm nitroselüloz membran (Bio-Rad, Hercules, CA) ve 1X transfer tamponu (Ek 2) kullanılarak Bio-Rad Mini Trans-Blot® Cell aracılığıyla proteinler membrana transfer edilmiştir. Membran, 1XTBS (Ek 2) ile hazırlanmış %10 süttozu içerisinde 37^{o}C'de 2 saat inkübe edilmiştir ve 1XTTBS (Ek 2) ile 10 dakika yıkanmıştır. Daha sonra, %5 süttozu ile 1:400 seyreltilmiş primer antikor (anti-HspR) içerisinde oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilen membran 1XTTBS ile 10 dakika yıkanmıştır. Ardından, membran %5 süttozu ile 6 μL:100 mL seyreltilmiş sekonder antikor (antimouse IgG, Sigma) içerisinde oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Membran tekrar 1XTTBS ile 10 dakika yıkandıktan sonra bantlar görülene kadar AP konjugat substrat (Bio-Rad, Hercules, CA) kiti uygulanmıştır, bantlar görülünce substrat uzaklaştırılıp membran distile su ile yıkanmıştır.

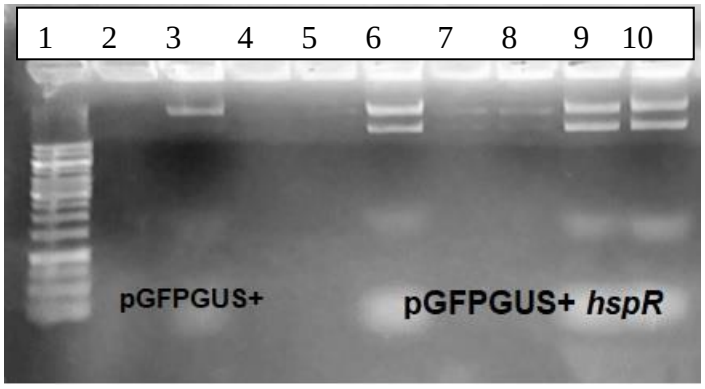
4.BULGULAR

4.1 *hspR* Geninin pGFPGUS+ Vektörüne Klonlanması

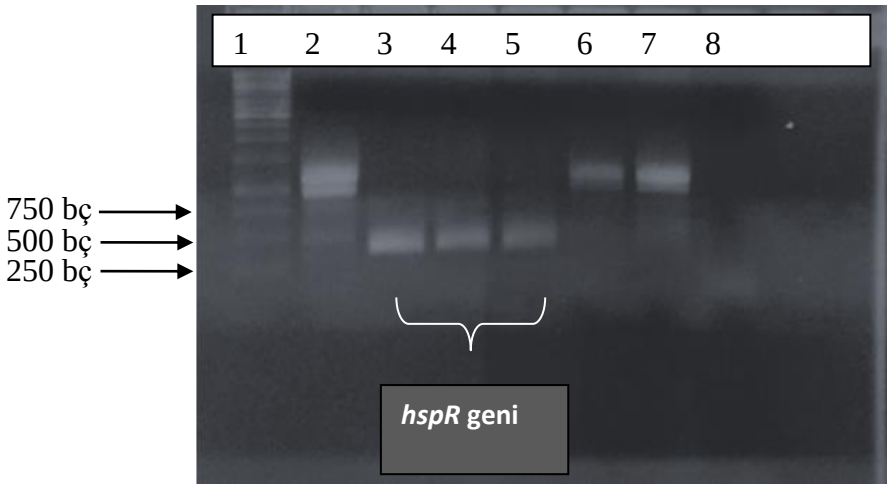
hspR genini pGFPGUS+ vektörüne aktarmak için, *hspR*'yi kodlayan DNA fragmenti *Bam*HI ve *Bgl*II restriksiyon enzimleri ile pGEMT plazmitinden kesilmiştir (Şekil 4.1). Elde edilen *hspR* fragmenti, *Bgl*II ile kesilen pGFPGUS+ vektörüne ligasyon yapılarak ligasyon ürünleri *E. coli* DH5α hücrelerine aktarılmıştır. pGFPGUS+*hspR* plazmidini taşıyan *E. coli* DH5α hücrelerini belirlemek için plazmit izolasyonu (Şekil 4.2) ve PZR (Şekil 4.3) yapılmıştır.



Şekil 4.1 pGEMT-*hspR* vektörünün *Bam*HI ve *Bgl*II restriksiyon enzimleri ile kesimi, agaroz jel görüntüsü.1: 1 kb DNA marker (GeneRuler). 2 ve 3: kesilmiş pGEMT ve *hspR* geni.



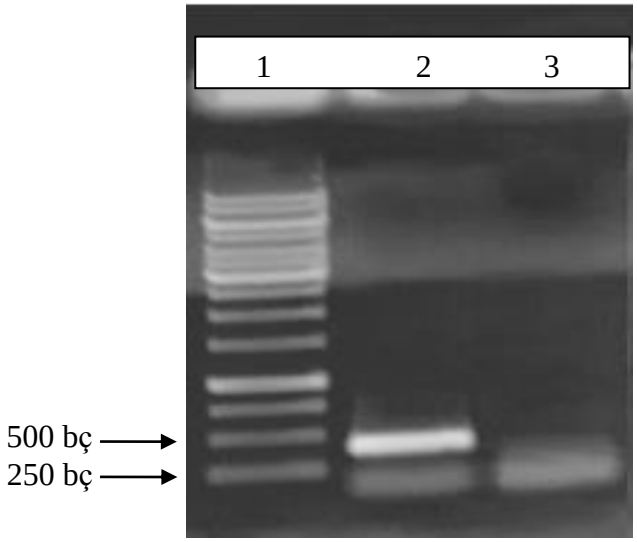
Şekil 4.2 *E. coli* hücrelerinde pGFPGUS+*hspR* vektörünün doğrulaması için yapılan plazmit izolasyonu agaroz jel görüntüsü.1: 1 kb DNA marker (GeneRuler); 2: boş; 3: kontrol (*hspR* geninin içeremeyen pGFPGUS+ plazmidi); 4-10: *hspR* genini taşıdığı düşünülen pGFPGUS+ plazmitleri. 6, 9 ve 10. örneklerde *hspR* taşıyan pGFPGUS+ elde edilmiştir.



Şekil 4.3 *E. coli* hücrelerinde pGFPGUS+*hspR* vektörünün PZR ile doğrulanması.1: 1 kb marker (GeneRuler); 2: kontrol (boş pGFPGUS+ plazmidi); 3-7: 380 bç *hspR* genini taşıdığı düşünülen pGFPGUS+ plazmitleri. 8: negatif kontrol. Burada 3, 4 ve 5. örneklerde *hspR* geni amplifiye olmuştur.

4.2 Rekombinant *Agrobacterium tumefaciens* Hücrelerinin Elde Edilmesi

E. coli DH5α'dan saflaştırılan pGFPGUS+*hspR* plazmidi elektroporasyonla kompetant *A. tumefaciens* hücrelerine transfer edilmiştir. Rekombinant *A. tumefaciens* hücrelerini doğrulamak için plazmit izolasyonu yapılmıştır ve bu plazmitler kullanılarak *hspR* geni için PZR yapılmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 *A. tumefaciens* bakterilerine aktarılmış pGFPGUS+*hspR* plazmitleri ile yapılan PZR sonucu.1: 1 kb marker (GeneRuler). 2: *hspR* PZR sonucu, 3: DNA içermeyen negatif kontrol.

4.3 Transgenik Tütün Bitkilerinin Elde Edilmesi

A. tumefaciens uygulaması sonrası tütün eksplantları karanlıkta antibiyotiksiz agarlı ortamda, daha sonra antibiyotikli higromisin (20mg/mL) ve Eqitax (4mL/L) içeren MS ortamına (EK 3) fotoperiyotta inkübe edildikten sonra sırayla kallus (Şekil 4.5), gövde (Şekil 4.6), sürgün (Şekil 4.7) ve kök oluşumu meydana gelmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.5 Transformasyon yapılan tütün eksplantlarında kallus oluşumu.



Şekil 4.6 Transformasyon yapılan tütün eksplantlarında gövde oluşumu.



Şekil 4.7 Transformasyon yapılan tütün eksplantlarında sürgün oluşumu.



Şekil 4.8 Transformasyon yapılan tütün eksplantlarında kök oluşumu.

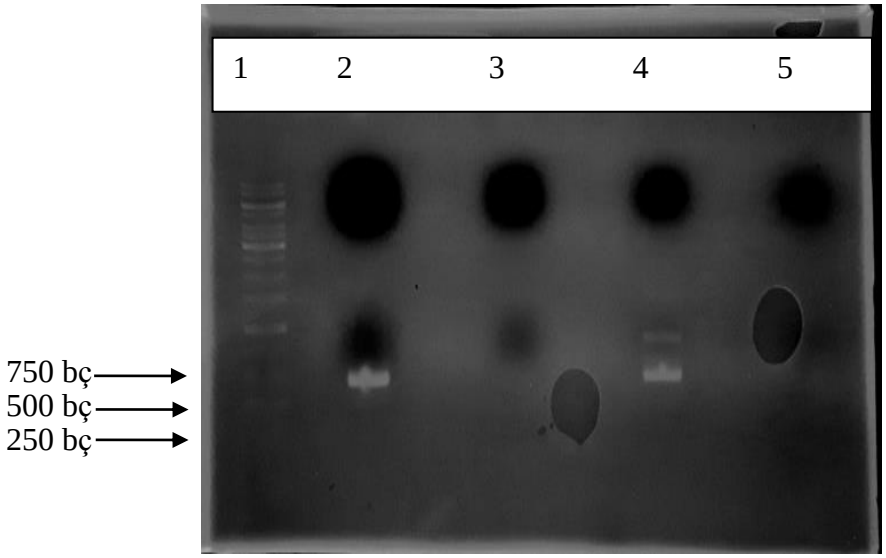
4.4 Transgenik Tütün Bitkilerinin Doğrulanması

4.4.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

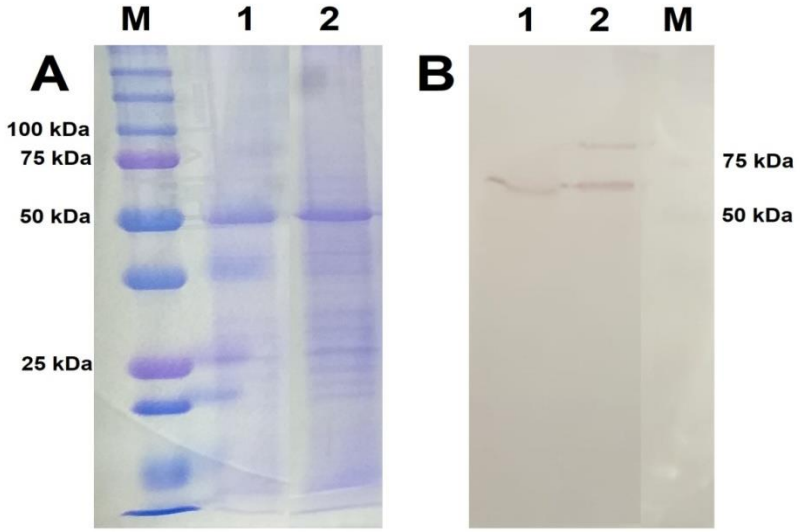
pGFPGUS+*hspR* ile transformasyon yapılan tütün bitkilerinin *hspR* genini taşıdığının doğrulanması için PZR tekniği kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak sadece pGFPGUS+ transforme edilen tütün bitkisinin DNA'sı ve pozitif kontrol olarak da pGEMT-*hspR* plazmidi kullanılmıştır. PZR ürünleri agaroz jelde yürütüldükten sonra *hspR* taşıyan tütün için 380 bç büyüklüğündeki *hspR* bandı görülmüş, ayrıca kullandığımız pozitif kontrol için de aynı seviyede (380 bç) bir bant görülmüştür. Kontrol bitkisinde ve DNA içermeyen negatif kontrolde bant gözlenmemiştir (Şekil 4.9).

4.4.2 Protein İzolasyonu ve Western Blot

Transgenik tütün bitkilerinde *hspR* proteinin üretimi doğrulanması için sırayla SDS-poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western blot teknikleri kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak sadece pGFPGUS+transforme edilen tütün bitkisinin proteini kullanılmıştır. HspR proteinin beklenen moleküler ağırlığı 15-17 kDa'dur. Tütün bitkilerinden elde edilen protein örneklerinin SDS-PAGE analizi sonucunda, kontrol (sadece pGFPGUS+ transforme edilen tütün) ile karşılaştırıldığında 15-17 kDa civarında belirgin bir bant gözlenmemiştir (Şekil 4.10A). Transgenik tütün tarafından HspR proteininin üretiminin gösterilmesi için anti-HspR antikoru ile Western blot çalışması da yapılmıştır. Beklenen moleküler ağırlıkta bir bant gözlenmemiştir. 60-80 kDa aralığında iki bant ortaya çıktı ancak kontrol bitkilerinde de aynı bantların gözlenmiştir (Şekil 4.10B).



Şekil 4.9 Transgenik tütün bitkilerinin doğrulanması için yapılan PZR sonucu. 1: 1 kb marker (GeneRuler); 2: pGFPGUS+*hspR* ile transformasyon yapılan tütün; 3: pGFPGUS+ ile transformasyon yapılan tütün; 4: pozitif kontrol; 5: DNA içermeyen negatif kontrol.



Şekil4.10 Transgenik tütün bitkilerine ait SDS-PAGE (A) ve Western Blot (B) görüntüleri.M: protein marker, 1:Kontrol (pGFPGUS+transforme edilen tütün bitkisi), 2: pGFPGUS+*hspR* transforme edilen tütün bitkisi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Şu anda onaylı tek TB aşısı, çocukluk çağı TB'unun şiddetli formlarına karşı etkili, zayıflatılmış *M. bovis* suşunu içeren BCG aşısıdır. Dünya çapında insanları TB'a karşı aşılamak için her yıl yaklaşık 120 milyon doz BCG kullanılmaktadır (DSÖ 2013). Bununla birlikte, BCG dünya çapında koruyucu aktivitesinde çarpıcı değişkenlik göstermektedir ve endemik bölgelerde yetişkinlerde akciğer TB'una karşı etkinliği sınırlıdır. Bu nedenle yeni, rasyonel olarak tasarlanmış TB aşısı adaylarına ihtiyaç vardır. *M. tuberculosis*'in birçok farklı elemanını, yüzey bileşenlerini ve salgılanan proteinlerini içeren aday alt ünite aşılar önerilmiştir (Walmsley and Arntzen 2000).

Solunum yolu, *M. tuberculosis*'in giriş kapısı ve enfeksiyonun ana bölgesi olduğundan, mukozal aşılamanın koruyucu bir bağışıklık tepkisi oluşturmada doğal bir avantajı olmalıdır. Mukozal uygulama, mukozal bir bağışıklık tepkisi oluşturmanın en iyi yoludur. İğne ile uygulama gerektirmemesi, dolayısıyla maliyetleri düşürmesi ve aşılama kolaylığını artırması gibi ek avantajlara sahiptir.

Terapötik proteinleri ifade eden transgenik bitkilerin, koruyucu antijenlerin üretimi ve ağızdan verilmesi için ideal araçlar olduğu düşünülmektedir. Bitki hücre duvarının, bitki kökenli antijenin sindirimini geciktirdiği ve bağırsaklara ulaştırdığı varsayılmıştır. Bitki hücrelerinin duvarları bağırsağı kolonize eden mikroplar tarafından sindirildiğinde antijenler bağışıklık sistemine veya kan dolaşım sistemine salınır. Böylece, daha fazla antijen emilir ve bağırsakla ilişkili lifoid dokuya sunulur. Bitki hücrelerinde biyo-kapsüllenmiş aşı antijenleri, ağızdan uygulandığında hem mukozal hem de sistemik bağışıklığı uyararak bakteriyel, viral, protozoan patojenlere veya toksinlere karşı koruma sağlar (Daniell*et al*. 2001).

Bitki kökenli antijenlerin kullanıldığı deneysel aşılar, artan etkinlik ve güvenlik dâhil olmak üzere, geleneksel teknolojilere göre birçok avantaj göstermiştir. Güvenli, çok yönlü ve ekonomik olması, transgenik bitkilerle oral uygulamayı ümit verici sistemlerden biri haline getirmektedir (Dorokhov *et al*. 2007). Bu avantajlarından dolayı

bitkilerde rekombinant protein antijenlerinin üretimi ile ilgili çalışmalar son yıllarda artmıştır (Rigano *et al*. 2006; Lakshmi *et al*. 2013).

Tütün, çeşitli organizmalardan transgenlerin ekspresyonu için yaygın olarak kullanılan bir bitkidir. Tütün bitkilerinde ifade edilen farklı organizmalardan alınan birçok gen arasında, bakteri kökenli genler yaygındır. *M. tuberculosis* ESAT-6 proteini, tütün bitkilerinde patates virüsü X vektör sistemi (PVX) kullanılarak üretilmiştir (Zelada *et al*. 2006). *Arabidopsis* bitkilerine de *E. coli* enterotoksini ve ESAT-6 füzyonu *Agrobacterium* aracılığıyla aktarılmış ve füzyon proteinin üretimi gösterilmiştir (Rigano *et al*. 2004). Bu tür çalışmalarda, gen ifadesinin başarılı olabilmesi için klonlanacak gende kodon optimizasyonu yapıldığı görülmektedir. Bizim çalışmamızda protein üretiminin başarılı olmamasının bir nedeni kodon optimasyonu yapılmadan bakteriden alınan genin tütün bitkilerine transfer edilmesi olabilir.

Tüberküloz antijenlerinin bitkilerde kloroplast transformasyonu ile ekspresyonunun diğer üretim sistemlerine göre birçok avantajı vardır. Transplastomik bitkiler, nükleer transgenik bitkilerden 100 kat daha fazla transkript birikimine rağmen transgen susturma özelliğinden yoksundur (Verma and Daniell 2007; Daniell*et al*. 2009). Çeşitli biyofarmasötik proteinlerin ve aşı antijenlerinin yüksek düzeyde ekspresyonu (toplam yaprak proteininin %72'sine kadar) kloroplast sistemi yoluyla elde edilmiştir (Ruhlman *et al*. 2010; Gisby *et al*. 2011). Bizim çalışmamızda nükleer transformasyon tercih edilmiştir ancak kloroplast transformasyonu sistemi kullanılsaydı daha iyi bir sonuç elde edilebilirdi.

TB'a karşı etkin bir aşı geliştirme yolunda, antijenlerin bitkisel sistemde üretimine yönelik yapılan bu çalışmada, *M. tuberculosis* HspR proteinin tütün bitkilerinde üretilebilmesi amaçlanmıştır. Sonuç olarak bu tez kapsamında kullanılan *hspR* geni daha önceden klonlanmış halde (Okay *et al*. 2019) pGEMT-*hspR* plazmidini içeren *E.coli* hücrelerinde saflaştırılmış ve pGFPGUS+ plazmidi kullanarak tütün bitkisine aktarılıp, *hspR* geninin transgenik tütünde varlığı başarılı bir şekilde gösterilmiştir. Ancak protein üretiminde beklediğimiz sonuç elde edilememiştir. Bitki transkripsiyonuna uygun kodon optimizasyonunun yapılmamış olması gen ekspresyonu

engellemiş olabilir. Transgenik bitkilerin kullanımı yoluyla yenilebilir bir aşının geliştirilmesi, ana engel, bitkilerdeki glikozilasyon yoludur. Transgenik yapıların transkripsiyonel aktivitesini geliştirmek için ayrıca promoter bölgelerin nükleotid bağlamını optimize etmek önerilmektedir (Cabanes-Macheteau *et al*. 1999).

HspR proteininin Western blot analizinde, beklenen banttan daha büyük moleküler ağırlıkta iki bant tespit edilmiştir. Bitkiler proteinleri translasyon sonrası modifikasyona uğratarak farklı formlara sokabilir. Ancak bizim çalışmamızda, *hspR* aktarılmayan kontrol bitkisinde de aynı bantların görülmesi, bunların özgün olmayan (non-spesifik) bantlar olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

Alfredsen, S.,& Saxegaard, F. 1992. An outbreak of tuberculosis in pigs and cattle caused by *Mycobacterium africanum*. The Veterinary record, 131(3), 51.

Anonim. 2017. Dünyada ve ülkemizde tüberküloz sorunu. https://www.toraks.org.tr/halk/News.aspx?detail=3753 Son erişim tarihi: 08.02.2020.

Anonim. 2013. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines, WHO Technical Report Series No. 979. https://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/TRS_979_Annex_3.pdf?ua=1 Son erişim tarihi: 11.08.2020.

Anonim. 2019. Küresel tüberküloz raporu https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis Son erişim tarihi: 03.01.2020.

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.

Baylan, O., Kisa, O., Albay, A., and Doganci, L. 2004. Evaluation of a new automated, rapid, colorimetric culture system using solid medium for laboratory diagnosis of tuberculosis and determination of anti-tuberculosis drug susceptibility. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 8(6), 772-777.

Baylan, O. 2012. İlaca dirençli tüberkülozun tedavisi. türkiye klinikleri tıp bilimleri Dergisi, 32(3), 788-804.

Birch, R. G. 1997. Plant transformation: problems and strategies for practical application. Annual review of plant biology, 48(1), 297-326.

Birchler, J. A. 2011. Plant chromosome engineering. J. A. Birchler (Ed.). Humana Press.

Brodin, P., Rosenkrands, I., Andersen, P., Cole, S. T., and Brosch, R. 2004. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors. Trends in microbiology, 12(11), 500-508.

Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K.,and Parsons, L. M. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proceedings of the national academy of Sciences, 99(6), 3684-3689.

Brosch, R. 2000. Genomics, biology, and evolution of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Molecular Genetics of Mycobacteria, 19-36.

Cabanes-Macheteau, M., Fitchette-Lainé, A. C., Loutelier-Bourhis, C., Lange, C., Vine, N. D., KC Ma, J., and Faye, L. 1999. N-Glycosylation of a mouse IgG expressed in transgenic tobacco plants. Glycobiology, 9(4), 365-372.

Castets, M., Boisvert, H., Grumbach, F., Brunel, M., and Rist, N. 1968. Tuberculosis bacilli of the African type: preliminary note. Revue de tuberculose et de pneumologie, 32(2), 179.

Cavanagh, R., Begon, M., Bennett, M., Ergon, T., Graham, I. M., de Haas, P. E., and Roholl, P. 2002. *Mycobacterium microti* infection (vole tuberculosis) in wild rodent populations. Journal of Clinical Microbiology, 40(9), 3281-3285.

Chen, E. S., and Moller, D. R. 2008. Etiology of sarcoidosis. Clinics in Chest Medicine, 29(3), 365-377.

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

Daffe, M., and Reyrat, J. M. 2008. The mycobacterial cell envelope. ASM Press.

Daniel, T. M. 1997. Captain of death: the story of tuberculosis. Boydell & Brewer.

Daniell, H., Singh, N. D., Mason, H., and Streatfield, S. J. 2009. Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. Trends in plant science, 14(12), 669-679.

Daniell, H., Streatfield, S. J., & Wycoff, K. 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. Trends in plant science, 6(5), 219-226.

Dormandy, T. 1999. The white death: a history of tuberculosis. New York University Press, 1999. 433 p.

Dorokhov, Y. L., Sheveleva, A. A., Frolova, O. Y., Komarova, T. V., Zvereva, A. S., Ivanov, P. A., and Atabekov, J. G. 2007. Superexpression of tuberculosis antigens in plant leaves. Tuberculosis, 87(3), 218-224.

Dubaniewicz, A., Kämpfer, S., and Singh, M. 2006. Serum anti-mycobacterial heat shock proteins antibodies in sarcoidosis and tuberculosis. Tuberculosis, 86(1), 60-67.

Ellis, R. J., and Hemmingsen, S. M. 1989. Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. Trends in biochemical sciences, 14(8), 339-342.

Fabre, M., Hauck, Y., Soler, C., Koeck, J. L., Van Ingen, J., Van Soolingen, D., and Pourcel, C. 2010. Molecular characteristics of "*Mycobacterium canettii*" the

smooth *Mycobacterium tuberculosis* bacilli. Infection, Genetics and Evolution, 10(8), 1165-1173.

Friedland, J. S., Shattock, R., Remick, D. G., and Griffin, G. E. 1993. Mycobacterial 65-kD heat shock protein induces release of proinflammatory cytokines from human monocytic cells. Clinical & Experimental Immunology, 91(1), 58-62.

Fukuda, T., Matsumura, T., Ato, M., Hamasaki, M., Nishiuchi, Y., Murakami, Y., and Kinoshita, T. 2013. Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis. MBio, 4(1).

Gisby, M. F., Mellors, P., Madesis, P., Ellin, M., Laverty, H., O'Kane, S., and Day, A. 2011. A synthetic gene increases TGFβ3 accumulation by 75-fold in tobacco chloroplasts enabling rapid purification and folding into a biologically active molecule. Plant biotechnology journal, 9(5), 618-628.

Gómez, E., Zoth, S. C., Carrillo, E., Roux, M. E., and Berinstein, A. 2008. Mucosal immunity induced by orally administered transgenic plants. Immunobiology, 213(8), 671-675.

Graves, S. R., and Johnson, R. C. 1975. Effect of pretreatment with *Mycobacterium bovis* (strain BCG) and immune syphilitic serum on rabbit resistance to Treponema pallidum. Infection and immunity, 12(5), 1029-1036.

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

Hilleman, M. R. 2002. Overview of the needs and realities for developing new and improved vaccines in the 21st century. Intervirology, 45(4-6), 199-211.

Hocking, T. L., and Choi, C. 1997. Tuberculosis: a strategy to detect and treat new and reactivated infections. Geriatrics (Basel, Switzerland), 52(3), 52-4.

Jakob, U., Muse, W., Eser, M., and Bardwell, J. C. 1999. Chaperone activity with a redox switch. Cell, 96(3), 341-352.

Kar, N. P., Sikriwal, D., Rath, P., Choudhary, R. K., and Batra, J. K. 2008. *Mycobacterium tuberculosis* ClpC1: Characterization and role of the N-terminal domain in its function. The FEBS Journal, 275(24), 6149-6158.

Kleeberg, H. H. 1963. Eradication of bovine tuberculosis: efforts and experiences of overseas countries and the position in South Africa. Journal of the South African Veterinary Association, 34(3), 393-402.

Koeck, J. L., Fabre, M., Simon, F., Daffe, M., Matan, A. B., Gérôme, P., and Pourcel, C. 2011. Clinical characteristics of the smooth tubercle bacilli '*Mycobacterium*

canettii' infection suggest the existence of an environmental reservoir. Clinical Microbiology and Infection, 17(7), 1013-1019.

Lal, P., Ramachandran, V. G., Goyal, R., and Sharma, R. 2007. Edible vaccines: current status and future. Indian journal of medical microbiology, 25(2), 93.

Lakshmi, P. S., Verma, D., Yang, X., Lloyd, B.,and Daniell, H. 2013. Low cost tuberculosis vaccine antigens in capsules: expression in chloroplasts, bio-encapsulation, stability and functional evaluation in vitro. PLoS One, 8(1), e54708.

Lanneau, D., Wettstein, G., Bonniaud, P., and Garrido, C. 2010. Heat shock proteins: cell protection through protein triage. TheScientificWorldJournal, 10.

McGarvey, P. B., Hammond, J., Dienelt, M. M., Hooper, D. C., Fu, Z. F., Dietzschold, B., and Michaels, F. H. 1995. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. Bio/technology, 13(12), 1484-1487.

Meena, L. S. 2010. Survival mechanisms of pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. The FEBS journal, 277(11), 2416-2427.

Mendez-Samperio, P., Gonzalez-Garcia, L., Pineda-Fragoso, P. R., and Ramos-Sanchez, E. 1995. Specificity of T cells in human resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. Cellular immunology, 162(2), 194-201.

Monahan, I. M., Betts, J., Banerjee, D. K., and Butcher, P. D. 2001. Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages. Microbiology, 147(2), 459-471.

Mostowy, S., Onipede, A., Gagneux, S., Niemann, S., Kremer, K., Desmond, E. P., and Behr, M. 2004. Genomic analysis distinguishes *Mycobacterium africanum*. Journal of clinical microbiology, 42(8), 3594-3599.

Motta, A., Schmitz, C., Rodrigues, L., Ribeiro, F., Teixeira, C., Detanico, T., and Bonorino, C. 2007. *Mycobacterium tuberculosis* heat-shock protein 70 impairs maturation of dendritic cells from bone marrow precursors, induces interleukin-10 production and inhibits T-cell proliferation in vitro. Immunology, 121(4), 462-472.

Myers, J. A., and Steele, J. H. 1971. Bovine tuberculosis control in man and animals. American Journal of Public Health 61(3), 636–637.

Niu, L., Zhang, H., Wu, Z., Wang, Y., Liu, H., Wu, X., and Wang, W. 2018. Modified TCA/acetone precipitation of plant proteins for proteomic analysis. PLoS One, 13(12), e0202238.

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.

O'Reilly, L. M., and Daborn, C. J. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. Tubercle and Lung disease, 76, 1-46.

O'Leary, S., O'Sullivan, M. P., and Keane, J. 2011. IL-10 blocks phagosome maturation in Mycobacterium tuberculosis–infected human macrophages. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 45(1), 172-180.

Preneta, R., Papavinasasundaram, K. G., Cozzone, A. J., and Duclos, B. 2004. Autophosphorylation of the 16 kDa and 70 kDa antigens (Hsp 16· 3 and Hsp 70) of *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiology, 150(7), 2135-2141.

Rajaiah, R., and Moudgil, K. D. 2009. Heat-shock proteins can promote as well as regulate autoimmunity. Autoimmunity reviews, 8(5), 388-393.

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

Rice, J., Ainley, W. M., and Shewen, P. 2005. Plant-made vaccines: biotechnology and immunology in animal health. Animal health research reviews, 6(2), 199.

Rigano, M. M., Dreitz, S., Kipnis, A. P., Izzo, A. A., and Walmsley, A. M. 2006. Oral immunogenicity of a plant-made, subunit, tuberculosis vaccine. Vaccine, 24(5), 691-695.

Roupie, V., Romano, M., Zhang, L., Korf, H., Lin, M. Y., Franken, K. L., and Huygen, K. 2007. Immunogenicity of eight dormancy regulon-encoded proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated and tuberculosis-infected mice. Infection and immunity, 75(2), 941-949.

Ruhlman, T., Verma, D., Samson, N., and Daniell, H. 2010. The role of heterologous chloroplast sequence elements in transgene integration and expression. Plant physiology, 152(4), 2088-2104..

Sakula, A. 1983. BCG: who were Calmette and Guerin?. Thorax, 38(11), 806.

Schliesser, T. 1976. Vorkommen und Bedeutung von Mykobakterien bei Tieren. Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, Series A Medical Microbiology Infectious Diseases,Virology, Parasitology, 235, 184–194.

Schlossberg, D. 1995. Tüberküloz. İstanbul: Bilimsel ve Teknik Yayınları Ceviri Vakfı.; 3-47.

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.

Sherman, D. R., Voskuil, M., Schnappinger, D., Liao, R., Harrell, M. I., and Schoolnik, G. K. 2001. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding α-crystallin. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98(13), 7534-7539.

Simeone, R., Bobard, A., Lippmann, J., Bitter, W., Majlessi, L., Brosch, R., and Enninga, J. 2012. Phagosomal rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. PLoS Pathog, 8(2), e1002507.

Stamm, L. M., Morisaki, J. H., Gao, L. Y., Jeng, R. L., McDonald, K. L., Roth, R., and Brown, E. J. 2003. *Mycobacterium marinum* escapes from phagosomes and is propelled by actin-based motility. The Journal of experimental medicine, 198(9), 1361-1368.

Stead, W. W. 1996. Epidemiology of the global distribution of tuberculosis. Microbe hunters: then and now. Medi-Ed Press, Bloomington, IL.

Stewart, G. R., Snewin, V. A., Walzl, G., Hussell, T., Tormay, P., O'Gaora, P., and Young, D. B. 2001. Overexpression of heat-shock proteins reduces survival of *Mycobacterium tuberculosis* in the chronic phase of infection. Nature medicine, 7(6), 732-737.

Streatfield, S. J. 2006. Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines. Methods, 38(2), 150-157.

Tait, A. R., Voepel-Lewis, T., Tuttle, D. B., and Malviya, S. 2000. Compliance with standard guidelines for the prevention of occupational transmission of bloodborne and airborne pathogens: a survey of postanesthesia nursing practice. The Journal of Continuing Education in Nursing, 31(1), 38-44.

Taylor, G. M., Stewart, G. R., Cooke, M., Chaplin, S., Ladva, S., Kirkup, J., and Young, D. B. 2003. Koch's Bacillus–a look at the first isolate of *Mycobacterium tuberculosis* from a modern perspective. Microbiology, 149(11), 3213-3220.

Tissiéres, A., Mitchell, H. K., and Tracy, U. M. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. Journal of Molecular Biology, 84(3), 389-398.

Tsan, M. F., and Gao, B. 2004. Cytokine function of heat shock proteins. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 286(4), C739-C744.

Tsuchiya, K., Kawamura, I., and Mitsuyama, M. 2009. Survival strategy of intracellular bacteria in macrophages. Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, nucleic acid, enzyme, 54(8 Suppl), 996-1001.

Valdez, M. M., Clark, J. I., Wu, G. J.,and Muchowski, P. J. 2002. Functional similarities between the small heat shock proteins *Mycobacterium tuberculosis* HSP 16.3 and human αB-crystallin. European journal of biochemistry, 269(7), 1806-1813.

Verma, D., and Daniell, H. 2007. Chloroplast vector systems for biotechnology applications. Plant Physiology, 145(4), 1129-1143.

Volkman, H. E., Pozos, T. C., Zheng, J., Davis, J. M., Rawls, J. F., and Ramakrishnan, L. 2010. Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. Science, 327(5964), 466-469.

Walmsley, A. M., and Arntzen, C. J. 2000. Plants for delivery of edible vaccines. Current opinion in biotechnology, 11(2), 126-129.

Wang, Y., Kelly, C. G., Singh, M., McGowan, E. G., Carrara, A. S., Bergmeier, L. A., and Lehner, T. 2002. Stimulation of Th1-polarizing cytokines, CC chemokines, maturation of dendritic cells, and adjuvant function by the peptide binding fragment of heat shock protein 70. The Journal of Immunology, 169(5), 2422-2429.

Wirth, T., Hildebrand, F., Allix-Béguec, C., Wölbeling, F., Kubica, T., Kremer, K., and Meyer, A. 2008. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. PLoS Pathog, 4(9), e1000160.

Yusibov, V., and Rabindran, S. 2008. Recent progress in the development of plant derived vaccines. Expert review of vaccines, 7(8), 1173-1183.

Zelada, A. M., Calamante, G., de la Paz Santangelo, M., Bigi, F., Verna, F., Mentaberry, A., and Cataldi, Á. 2006. Expression of tuberculosis antigen ESAT-6 in *Nicotiana tabacum* using a potato virus X-based vector. Tuberculosis, 86(3-4), 263-267.

EKLER

EK-1 Kültür Ortamlarının Hazırlanması.....56
EK-2 Solüsyon ve Tamponlar 58
EK-3 Kullanılan Kimyasal ve Enzimler.....59

EK-1 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.

3. Tütün alt kültür ortamı:

MS	4405,19 mg/L
pH5,6-5,72	
Agar	6,5g/L
Sükroz	30g/L
BA	2mg/L
NAA	0,2mg/L

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

YEP ortamı

Yeast	2,5 g
LB	12,5 g
Saf su	500mL

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

RM ortamı

MS	4405,19 mg/L
PH	5,6-5,72
Sükroz	30g/L

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

EK-2 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

Yükleme tamponu (10X)

Bromofenol mavisi (w/v)	%0.25
Ksilen siyanol FF (w/v)	%0.25
Sükro (w/v)	%40

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. 74

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

Boya uzaklaştırma solüsyonu

Metanol	100 mL
Glasiyal asetik asit	100 mL
Distile su	800 mL

3. *E. coli* Kompetan Hücre Tamponu

Tampon 1

RuCl	100 mM
KAc	30 mM
CaCl2	10 mM
Gliserol	%15

pH 5.8'e ayarlanır ve filtre edilir

Tampon 2

CaCl2	75 mM
RuCl	10 mM
MOPS	10 mM
Gliserol	%15

pH 6.5'e ayarlanır ve filtre edilir.

4. 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

5. Kompetan *A. tumefaciens* Hücre Hazırlama

HEPES tamponu:

Hepes	47,6 mg
Saf su	2000 mL
Gliserol	%10

6. Western Blot

Transfer tamponu (1X)

Metanol	l200 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

TTBS (Tween -Tris buffer saline) (1X)

Twin	%0,5
TBS	1X

EK-3 Kullanılan Kimyasal ve Enzimler

Akrilamit (Sigma)

Agar (Oxoid)

Agaroz (Biomax-Prona)

Ampisilin (Sigma)

*Bam*HI(Thermo)

*Bgl*II (Thermo)

Bromofenol mavisi (Merck)

Coomassie Mavi G-250 (Fluka)

Coomassie Mavi R-250 (Fluka)

EDTA (Sigma)

Etanol (Sigma)

Etidyum bromür (Sigma)

Glasiyal asetik asit (Merck)

Gliserol (Sigma)

Glisin (Merck)

HCl (Merck)

Kanamisin (Sigma)

KCl (Merck)

Luria Broth (Merck)

Metanol (Sigma)

MOPS (Sigma)

NaCl (Merck)

NaOH (Merck)

RuCl (Merck)

SDS (Sigma)

Sükroz (Sigma)

Taq DNA polimeraz (Thermo)

TEMED (Sigma)

Tris-baz (Merck)

Tris-HCl (Merck)

T4 DNA ligaz (Thermo)

Merkaptoetanol (Merck)

ÖZGEÇMİŞ

Adı: Kafia Elmi AYEH
Doğum Yeri: Cibuti
Doğum Tarihi: 04.09.1996
Medeni Hali: Bekar
Yabancı Dili: Francızca, İngilizce, Arapça, Somalice, Türkçe.
Adres: Cummhuriyet Mahellesi Şehit Pilot Üst Erdem Öztürk Sokak CAKIRAĞA APT:11/2
Tel: 05318545197
E-posta: kafiaayeh @gmail.com

Eğitim Durumu

Lise: Lycée d'Etat de Djibouti (2012)
Lisans: University of Djibouti (2015)
Yüksek Lisans: Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (2019)

Tezler

Lisans Tezi: Cibuti'de Gıda Güvenliği (2017)

Yayınlar

Kafia Elmi Ayeh, Sezer Okay, Mehmet Sezgin.*Mycobacterium tuberculosis*'e ait *hspR* geninin tütün bitkisine aktarılması.3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020) March 19-20, 2020 / Ankara, Turkey (Poster Presentation)