

**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**MOLEKÜLER BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**MOLEKÜLER BİYOTEKNOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**pRTA, YENİ BİR VEKTÖR VE TA KLONLAMA:  
BİLİNMEYEN ANTİBİYOTİK DİRENÇ GENLERİNİN  
KARAKTERİZASYONU İÇİN YÖNTEM**

**HANİFE SALİH**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. BÜLENT BOZDOĞAN**

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-19052 proje numarası ile desteklenmiştir ve Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein (REDPROM) Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

**AYDIN-2020**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Hanife SALİH tarafından hazırlanan “pRTA, yeni bir vektör ve TA klonlama: Bilinmeyen antibiyotik direnç genlerinin karakterizasyonu için yöntem” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21/08/2020

Üye (T.D.) : Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN Aydın Adnan  
Menderes Üniversitesi  
Üye : Prof. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL Aydın Adnan  
Menderes Üniversitesi  
Üye : Prof. Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN Akdeniz Üniversitesi

### ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün ..... tarih ve ..... sayılı oturumunda alınan ..... nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, her konuda yardım ve hoşgörüsü ile bana destek olan, bana olan güvenini ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim, aldığım akademik derslerin yanında bana çalışma disiplini ve araştırma merakı aşilayarak iyi bir araştırmacı olmam yolunda katkıda bulunan, akademik hayatım boyunca örnek alacağım kıymetli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yüksek lisans eğitimim boyunca ilgisini, yardımlarını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL'e ve tezimin değerlendirmesi sürecinde bilgi ve tecrübeleri ile yol gösteren ve destek olan Prof. Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN'a görüş ve tavsiyelerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Birçok farklı alanda bilimsel bakış açımın zenginleşmesine katkıda bulunan ve laboratuvar olanaklarını sonuna dek kullanmama izin vererek birçok metodu deneyimlememe imkan sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Serhan SAKARYA'ya desteği için çok teşekkür ederim.

Yüksek lisansım süresince tüm akademik çalışmalarımnda bitmek bilmeyen sorularıma benimle yanıt arayan ve ufkumu açan, gerek arkadaşılığıyla gerek araştırmacılığıyla bana yol gösteren her konuda yanımda hissettiğim, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen hocam Dr. Erman ORYAŞIN'a en içten dileklerle teşekkürlerimi sunuyorum.

Yükseköğrenimime başladığım günden itibaren benimle güzel dostluğunu paylaşan değerli arkadaşım yüksek lisans öğrencisi Yunus DOĞAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yaşamımda her zaman yanımda olan en büyük desteğim, başarıım için maddi ve manevi hiçbir şeyi esirgemeyen, her konuda sonsuz özverileriyle beni minnettar kılan annem Seval SALİH'e, babam Necati SALİH'e ve kardeőim Burak Mehmet SALİH'e içtenlikle teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
RESİMLER DİZİNİ .....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
ÖZET .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Antibiyotikler ve Etki Mekanizmaları .....	2
2.1.1. Hücre Duvarını Hedefleyen Antibiyotikler .....	3
2.1.1.1. Beta-laktamlar .....	4
2.1.1.2. Glikopeptidler.....	4
2.1.2. Protein Sentezini İnhibe Eden Antibiyotikler.....	4
2.1.2.1. 30S alt ünite inhibitörleri.....	5
2.1.2.1.1. Aminoglikozidler.....	5
2.1.2.1.2. Tetrasiklinler.....	5
2.1.2.2. 50S alt ünite inhibitörleri.....	5
2.1.2.2.1. Kloramfenikol.....	5
2.1.2.2.2. Makrolidler .....	6
2.1.3. DNA Replikasyon İnhibitörleri .....	6
2.1.3.1. Florokinolonlar .....	6
2.1.4. Folik Asit Metabolizması İnhibitörleri .....	6
2.1.4.1. Sülfonamidler ve trimetoprim .....	6
2.2. Antimikrobiyal Direnç.....	7
2.2.1. Antimikrobiyal Direncin Ortaya Çıkışı .....	8
2.2.1.1. Mikroorganizmalarda antimikrobiyal direncin gelişimi.....	10
2.2.1.2. Bireylerde dirençli bakteri kolonizasyonu.....	11

2.2.1.3. Antibiyotiklere direnç ve yayılması .....	11
2.2.2. Antibiyotik Direnç Tipleri .....	12
2.2.2.1. İntrinsik direnç.....	12
2.2.2.2. Kazanılmış direnç .....	13
2.2.2.2.1. Kromozomal direnç .....	13
2.2.2.2.2. Plazmidlere bağlı direnç .....	14
2.2.2.2.3. Transpozonlara bağlı direnç .....	15
2.3. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları.....	15
2.3.1. Antibiyotik Modifikasyonu veya Degredasyonu.....	15
2.3.2. Antibiyotiklerin Hücre İçi Akümüasyonunun Engellenmesi .....	16
2.3.3. Antibiyotik Tutulması.....	17
2.3.4. Hedef Değişirme / Baypas / Koruma Mekanizmaları .....	17
2.4. Moleküler Klonlama.....	19
2.4.1. TA Vektör Üretimi .....	23
2.4.2. DNA Fragmantasyon Yöntemleri.....	23
2.4.2.1. Fiziksel yolla DNA fragmentasyonu .....	23
2.4.2.2. Enzimatik yollarla DNA fragmentasyonu .....	24
2.4.2.3. Kimyasal yolla fragmentasyon .....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. Gereç.....	25
3.1.1. Cihazlar.....	25
3.1.1.1. Thermal cyclers.....	25
3.1.1.2. Thermo shaker .....	25
3.1.1.3. Otoklav .....	25
3.1.1.4. Santrifüj .....	25
3.1.1.5. Etüv.....	26
3.1.2. Bakteri Suşları .....	26
3.1.2.1. <i>Esherichia coli</i> DH10B suşu .....	26
3.1.2.2. Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ADU1 suşu .....	26
3.1.2.3. Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ADU2 suşu .....	26
3.1.3. Kullanılan Plazmidler .....	27
3.1.3.1. pUC19 plazmidi.....	27
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler .....	27
3.1.4.1. Trypton soya agarı.....	27

3.1.4.2. Tripton soya broth .....	27
3.1.4.3. AXI besiyeri .....	27
3.1.4.4. Brain heart (Infusion) agar .....	28
3.1.4.5. Brain heart (Infusion) broth.....	28
3.1.4.6. Skim milk powder .....	28
3.1.4.7. Agaroz jel elektroforezi .....	28
3.1.5. Çalışmada Kullanılan Enzimler .....	29
3.1.5.1. Taq polimeraz .....	29
3.1.5.2. Restriksiyon enzimleri .....	29
3.1.5.3. Modifikasyon enzimleri.....	29
3.1.5.4. Fragmantasyon enzimi.....	29
3.1.6. Çalışmada Kullanılan Programlar .....	29
3.2. Yöntem .....	30
3.2.1. pRTA Vektörünün Oluşturulması .....	30
3.2.1.1. pRTA vektörünün oluşturulmasında kullanılacak olan vektörün omurgasının eldesi30	
3.2.1.2. pRTA vektörünün promotör-ribozomal bağlanma sekansının dizaynı ve eldesi .....	32
3.2.1.3. pRTA-omurga ve prom-RBS çift iplikli oligonükleotidinin restriksiyon enzimi ile kesimi .....	33
3.2.1.4. Saflaştırılmış restriksiyon ürünlerinin ligasyonu.....	33
3.2.1.5. Ligandın <i>E. coli</i> DH10B suşuna transformasyonu, pRTA vektörünün oluşumunun doğrulanması .....	34
3.2.1.6. pRTA vektöründe bulunan prom-RBS sekansının etkinliğinin test edilmesi.....	35
3.2.1.7. pRTA vektöründe prom-RBS varlığının sekans analizi ile doğrulanması .....	36
3.2.2. Modifiye TA Yöntemi ile pRTA Vektörüne Antibiyotik Direnç Geni Klonlanması..	36
3.2.2.1. Eritromisin direncine sahip <i>S. aureus</i> ADU2 suşundan DNA izolasyonu .....	36
3.2.2.2. Genomik DNA'nın fragmentaz enzimi ile parçalanması .....	37
3.2.2.3. DNA fragmanlarının 5' ve 3' uçlarının kütleştirilmesi .....	37
3.2.2.4. DNA fragmanlarının 3' ucuna terminal deoksিনükleotidil transferaz enzimi ile ddTTP eklenmesi .....	38
3.2.2.5. pRTA vektöründen PCR yolu ile AT vektörü oluşturulması .....	38
3.2.2.6. Eritromisin direnç geninin klonlanması .....	39
4. BULGULAR .....	40
4.1. pRTA Vektörünün Oluşturulması .....	40

4.1.1. pRTA Vektörünün Oluşturulmasında Kullanılacak Olan Vektörün Omurgasının Eldesi.....	40
4.1.2. pRTA Vektörünün Oluşturulmasında Kullanılacak Olan Promotör-Ribozomal Bağlanma Fragmanının Oluşturulması .....	41
4.1.3. pRTA Vektör Adaylarının Seçilmesi .....	42
4.1.4. pRTA Vektörüne Yerleştirilen Prom-RBS Sekansının İşlevselliğinin Doğrulanması	44
4.1.5. pRTA- <i>aac(6')</i> - <i>aph(2')</i> de Prom-RBS Analizi.....	49
4.2. pRTA Amplikonuna Genomdan Antibiyotik Direnç Geni Klonlanması .....	51
4.2.1. Antibiyotik Direncine Sahip ADU2 Suşundan Elde Edilen Genomik DNA'nın Fragmentasyonu .....	52
4.2.2. pRTA Vektörünün PCR ile Çoğaltılması ve AT Vektörünün Oluşturulması .....	55
4.2.3. AT Vektörü ve Fragmente DNA ile Antibiyotik Direnç Geni Klonlama .....	56
4.2.4. Klonlanan Eritromisin Direnç Geninin Sekans ile Doğrulanması.....	58
5. TARTIŞMA.....	59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	65
KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ.....	73

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>BHA</b>	: Brain Heart (Infusion) Agar
<b>BHB</b>	: Brain Heart (Infusion) Broth
<b>ddTTP</b>	: Dideoksitimidin trifosfat
<b>dTTP</b>	: Timidin Trifosfat
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin tetraasetik asit
<b>g</b>	: Gram
<b>IPTG</b>	: İzopropil Beta-d-1-tiyogalaktopiranosid
<b>MCS</b>	: Çoklu Klonlama Bölgesi
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>Pmol</b>	: Pikomol
<b>Prom</b>	: Promotör
<b>RBS</b>	: Ribozomal Bağlanma Bölgesi
<b>rpm</b>	: Revolution per minute
<b>T4 PNK</b>	: T4 Polinükleotid Kinaz
<b>TBE</b>	: Tris / Borat / EDTA
<b>TdT</b>	: Terminal deoksinükleotidil transferaz
<b>TSB</b>	: Trypton Soya Broth
<b>TSA</b>	: Trypton Soya Agarı
<b>X-Gal</b>	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil--D-galaktosidaz
<b>pRTA</b>	: REDPROM AT Klonlama Plazmidi



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Antibiyotiklerin etki mekanizması .....	3
Şekil 2. Antibiyotikler ve kimyasal yapıları.....	7
Şekil 3. Antibiyotiklerin ve antibiyotik direncinin ekolojisi .....	8
Şekil 4. Direnç genlerinin mikroorganizmaya alınması, genetik elementler vasıtasıyla patojenlere taşınması ve klonal ve küresel yayılımı .....	9
Şekil 5. Bakterilerdeki farklı antibiyotik direnç mekanizmalarının şematik gösterimi .....	19
Şekil 6. Restriksiyon enzimleri tarafından üretilen DNA uçlarının tipi.....	20
Şekil 7. Geleneksel klonlama, TA klonlama, ligasyondan bağımsız klonlama, dikişsiz klonlama ve rekombinasyonel klonlama yöntemlerine genel bakış. ....	22
Şekil 8. pRTA vektör omurgası oluşturmak için kullanılan primerlerin ismi, lokasyonları ve oluşan ampikon.....	31
Şekil 9. Dizayn edilen promotör ve RBS sekansı .....	33
Şekil 10. AT vektörü oluşturulmakta kullanılan primerlerin pRTA vektörü üzerinde lokasyonu ve oluşan AT vektörü. ....	39
Şekil 11. pRTA vektör haritası.....	44
Şekil 12. pRTA vektörüne yerleştirilen prom-RBS sekansının işlevselliğini doğrulamak amacıyla yapılan pRTA-aac(6')-aph(2') konstrüksiyonu. ....	49
Şekil 13. Modifiye TA yönteminin akışı.....	52
Şekil 14. pRTA, pBlueScript II SK (+) ve pCR™2.1 vektörlerinin haritaları .....	63

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.</b> PCR ile çoğaltılan 2686 bazlık pRTA vektör omurgası. ....	40
<b>Resim 2.</b> Prom-RBS sekansının çift iplikli DNA'sı.....	41
<b>Resim 3.</b> pRTA vektör adaylarının ve pUC19 vektörünün ampPR&M13R primer çifti ile kurulan PCR ampliconları. ....	42
<b>Resim 4.</b> Aday pRTA plazmidleri ve pUC19 vektörünün XhoI&HindIII enzimleri ile kesimi.....	43
<b>Resim 5.</b> aac(6')-aph(2') geninin PCR ampliconu.....	45
<b>Resim 6.</b> pRTA vektör adayları, pUC19 vektörü ve aac(6')-aph(2') ampliconlarının EcoRI&HindIII enzimleri ile restriksiyonu. ....	46
<b>Resim 7.</b> Klonlamanın gerçekleştiği pRTA vektörüne aac(6')-aph(2')'e spesifik primerlerle yapılan koloni PCR ampliconları. ....	47
<b>Resim 8.</b> aac(6')-aph(2') gentamisin direnç geni klonlanmış pRTA vektörünün kesilmiş ve kesilmemiş formu. ....	48
<b>Resim 9.</b> pRTA vektörüne yerleştirilmiş olan prom-RBS'nin sekans analizi. ....	50
<b>Resim 10.</b> pRTA vektörünü içeren E. coli DH10B suşunun AXI besiyerinde görünümü....	51
<b>Resim 11.</b> MRSA ADU2 suşunun total DNA'sı.....	53
<b>Resim 12.</b> MRSA ADU2 suşunun genomik DNA'sının fragmentasyonu.....	54
<b>Resim 13.</b> PCR ile çoğaltılmış AT vektörü.....	55
<b>Resim 14.</b> Modifiye TA yöntemi ile eritromisin direnci klonlanmış transformantların koloni PCR ampliconları. ....	56
<b>Resim 15.</b> Eritromisin direncine sahip ve koloni PCR ile insert boyutu belirlenmiş klonlardan izole edilen plazmidlerin EcoRI&HindIII enzimi ile kesilmemiş ve kesilmiş formu. ....	57
<b>Resim 16.</b> Geliştirilen modifiye TA yöntemi ile klonlanan eritromisin direnç genini taşıyan 2. transformantın sekans analizi.....	58

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Çalışmada kullanılan primerler ve sekansları.....	31
<b>Tablo 2.</b> PCR işlemine ait reaksiyon bileşenleri ve mastermixin hazırlanma oranları .....	32
<b>Tablo 3.</b> Çalışmadaki PCR işlemlerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı .....	32

## ÖZET

### **pRTA, YENİ BİR VEKTÖR VE TA KLONLAMA: BİLİNMEYEN ANTİBİYOTİK DİRENÇ GENLERİNİN KARAKTERİZASYONU İÇİN YÖNTEM**

**Salih H. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoteknoloji Anabilim Dalı (Disiplinlerarası), Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2020.**

Antibiyotikler en yaygın kullanılan ilaçlar arasındadır. Enfeksiyonların tedavisinde kullanıldığı gibi besi hayvanları ve bitkilerin büyümelerini hızlandırmak amacı ile de kullanılmaktadır. Genellikle vücuttan atıldıktan sonra da aktif halde kalan antibiyotiklerin bilinçsiz kullanımı antibiyotik direncinin gelişmesinde önemli bir faktördür. Son yıllarda çoklu antibiyotik direncine sahip suşların görülme sıklığı ve yaygınlığı artmaktadır. Antibiyotik direncine sebep olan genlerin karakterizasyonu direnç sorununun ortaya konması ve mücadele yollarının belirlenebilmesi açısından önemlidir. Bu çalışmanın temel amacı antibiyotik direncine neden olan bilinen veya bilinmeyen genlerin klonlanmasına imkan veren bir yöntem geliştirmektir. Bu amaçla, antibiyotik direnç genlerinin klonlanmasında oryantasyon sorunu yaşanmaması için çoklu klonlama bölgesinin her iki yönünden de ekspresyon sağlanabileceği vektör geliştirilmesi hedeflenmiştir. Oluşturulan pRTA vektörünün omurgası pUC19 vektöründen faydalanılarak invers PCR yoluyla elde edilmiştir. Dizayn edilen promotör ve RBS sekansı, vektör omurgasında hedeflenen lokasyona yerleştirilmiştir. Dual promotöre sahip vektörde promotör ve RBS'nin yerleşmesi ve fonksiyon gördüğünün belirlenmesi sekans analizi ve klonlama çalışmaları ile tespit edilmiştir. Geliştirilen klonlama yönteminde kullanılan 3' uçlarında tek adenin bazı uzantısı bulunduran vektör, pRTA vektöründen PCR yoluyla elde edilen bir vektördür ve "AT vektörü" olarak adlandırılmıştır. Eritromisin direncine sahip *S. aureus* suşunun total DNA'sı fragmentaz enzimi ile rasgele parçalanıp istenen boyutlarda fragmentler oluşturulmuştur. Fragmentlerin 3' uçlarına AT vektörüne bağlanabilmesi için timin bazı eklendikten sonra fragmentler ve vektör ligasyonla bağlanmıştır. Oluşan ligand *E. coli* DH10B suşuna aktarılmış ve 200 µg/ml eritromisin içeren besi yerinde seçilmiştir. Çoğalan kolonilerdeki insertlerin sekans analizi yapıldığında direnç sağlayan genin *ermC* olduğu ve plazmid üzerinde taşındığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak dual promotöre sahip ve mavi-beyaz

seçilime imkan veren bir vektör geliştirilmiştir. Geliştirilen bu vektörden elde edilen AT vektörü plazmid izolasyonuna kıyasla daha verimli şekilde PCR yoluyla elde edilmiştir. Klonlanacak direnç genlerini içeren fragmanlar fragmentaz enzimi ile rasgele lokasyonlardan parçalanarak direnç geninin içinden kesilme ihtimalini düşürmüştür. Ayrıca direnç geninin klonlanabilecek boyutta fragmanlar oluşturmasını sağlayarak klonlama başarısını arttırmıştır. Bu tezde, yeni bir vektör ve bilinen ve bilinmeyen direnç genlerinin klonlanması için yeni bir yöntem geliştirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Antibiyotik Direnci, Direnç Geni Klonlama, Klonlama Vektörü, Modifiye TA Klonlama.

## ABSTRACT

### **pRTA, A NEW VECTOR AND TA CLONING: A METHOD FOR CHARACTERIZATION OF NOVEL ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES**

**Salih H. Aydın Adnan Menderes Aydın Adnan Menderes University Health Sciences Institute of Molecular Biotechnology (Interdisciplinary), Master's Thesis, Aydın, 2020.**

Antibiotics are among the most widely used drugs. They are used in the treatment of infections as well as in order to accelerate the growth of livestock and plants. Unconscious use of antibiotics, which remain active after excreted from the body, is an important factor in the development of antibiotic resistance. Over time, the frequency and prevalence of strains with multiple antibiotic resistance increases. The identification of the genes that cause antibiotic resistance is important to reveal the importance of the hazard. The main aim of this study is to develop a method that allows cloning of known or unknown genes that cause antibiotic resistance. For this purpose, it is aimed to develop a vector in which the expression can be obtained from both orientations in the multiple cloning region in order to avoid orientation problems in the cloning of antibiotic resistance genes. The backbone of the pRTA vector generated was obtained by inverse PCR using the pUC19 vector. The promoter and RBS sequence designed in this study were placed at the targeted location in the vector backbone. The placement of the promoter and RBS into the vector which has dual promoter was determined by sequence analysis and cloning studies. The vector which carries adenin base at 3' overhang used in the developed cloning method was obtained by amplifying pRTA vector and it is called AT vector. The total DNA of *S. aureus*, which is known to have erythromycin resistance, was randomly fragmented with the fragmentase enzyme and fragments of desired sizes were created. After adding thymine base to 3' overhang of fragments, the fragments become complementary to AT vector and fragments and vector were ligated. The ligand was transferred to the *E. coli* DH10B strain and the colonies were selected on the agar that contains 200 µg/ml erythromycin. The inserts at the transformants were sequenced and it was found that the gene providing resistance was *ermC* and it was carried on the plasmid. As a result, the vector constructed has been developed with a dual promoter that provides expression of the multiple cloning site and allows for blue-white selection. The AT vector amplified from developed pRTA vektor is more fruitful compared to plasmid isolation.

The fragments containing the resistance genes to be cloned were cleaved from random locations with the fragmentase enzyme, thereby reducing the possibility of being cut through the resistance gene. It also increased the cloning success by allowing the resistance gene to produce fragments that can be cloned. In this thesis, a new vector and a new method for cloning known and unknown resistance genes have been developed.

**Keywords:** Antibiotic Resistance, Resistance Gene Cloning, Cloning Vector, Modified TA Cloning.

# 1. GİRİŞ

Antibiyotikler 1940'lı yıllardan sonra enfeksiyon tedavisinde kullanılmaya başlanmış ve bu moleküllere karşı patojen bakterilerin direnç geliştirmesi ve direncin yayılması da antibiyotik kullanımının yaygınlaşmasıyla ilişkilendirilmiştir. Günümüzde kullanılabilir tüm antibiyotiklere direnç geliştirmiş bakteriler vardır ve nadir değildir. Dünya sağlık örgütü (WHO) antibiyotiklere direnç sorununu sağlık alanında karşılaştığımız ilk 10 temel sorun arasında saymıştır (2019). Antibiyotiklere direnç mekanizmalarının tespiti amacıyla fenotipik ve genotipik yöntemler geliştirilmiştir. Fenotipik yöntemler arasında antibiyogram gibi yaklaşık 70 yıldır kullanılan testler veya daha eski olan tüp dilüsyon testleri sayılabilir (Bauer ve ark, 1959). Genetik testler ise bilinen bir genin varlığının araştırılması temeline dayanır. Bu amaçla hibridizasyon yöntemleri ve PCR yöntemleri en yaygın kullanılan yöntemlerdir. Ancak her iki yöntemde de bilinen genlerle çalışmak gerekmektedir. Eğer henüz bilinmeyen bir direnç geni antibiyotik direncinin nedeni ise tarama için kullanılan yöntemler yetersiz kalmaktadır. Bilinmeyen direnç geni karakterizasyonu için klonlama ve sekans analizi yapılması gerekmektedir. Çalışmanın amacı özellikle bilinmeyen direnç genlerinin klonlanması için yöntem geliştirmektir. Bu amaca ulaşmak için 2 hedefi vardır. İlk hedef klonlama çalışmalarında kullanılabilir, insertin ifadesini ortantasyona bağlı olmaksızın gerçekleştirebilecek vektör geliştirmektir. Çalışmanın ikinci hedefi ise oluşturulan yeni vektörden faydalanılarak antibiyotik direnç genlerinin klonlanmasını sağlayacak bir yöntem geliştirmektir. Direnç geni klonlanacak örneklerden izole edilen DNA'ların fragmentaz enzimi ile hedeflenen boyutlarda rasgele fragmanlar haline gelmesi ve amplikon yapıdaki geliştirilen AT vektörüne vektöre klonlanması hedeflenmiştir. Geliştirilen bu yöntemle bilinen veya bilinmeyen direnç genlerinin klonlanıp karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın temel hipotezi oluşturulan AT vektörünün, vektör görevini yerine getirmesi ve fragmentaz enzimi ile oluşturulan fragmanlardan antibiyotik direnç geninin klonlanması ve karakterize edilebilmesidir.



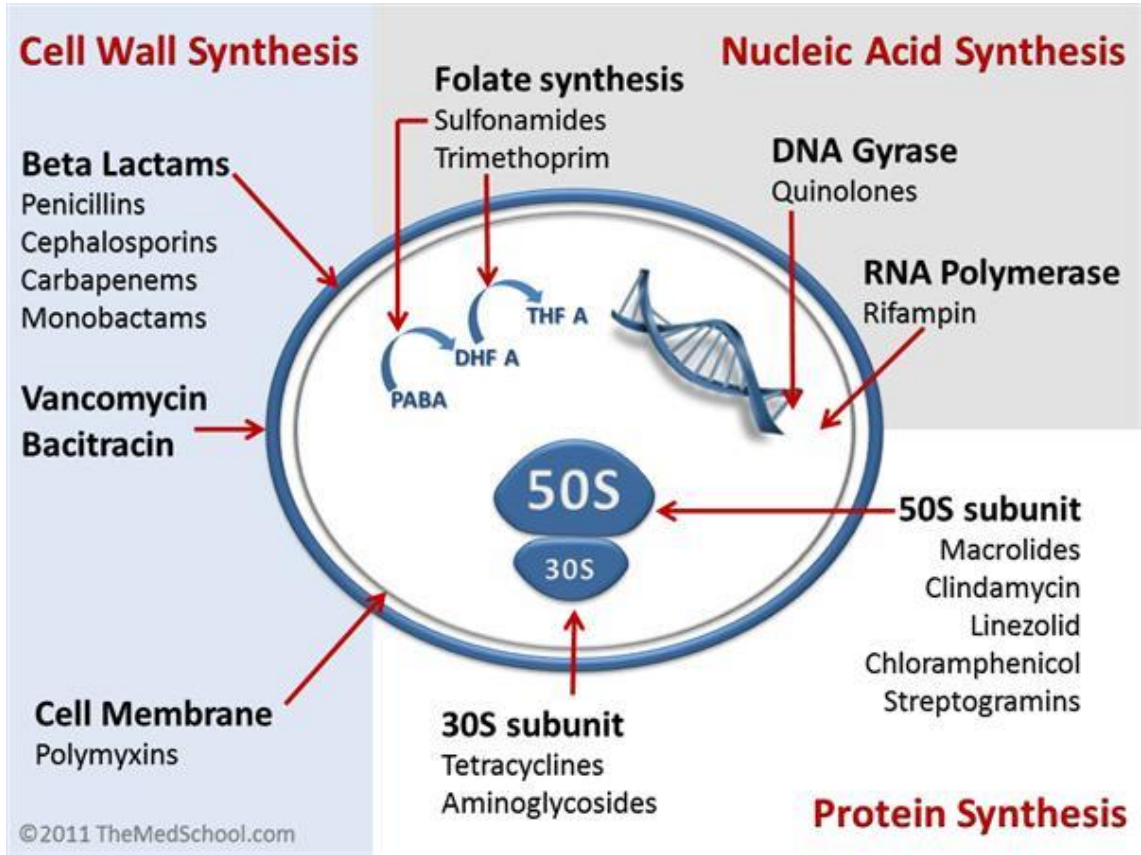
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Antibiyotikler ve Etki Mekanizmaları

Modern anlamda ilk antibiyotik salvarsan'dır. Sifiliz hastalığının tedavisi için *Magic bullet* teorisinin sahibi Paul Ehrlich tarafından bulunan bu antibiyotik kaşifine 1908 yılında Nobel ödülü kazandırmıştır (Gelpi ve ark, 2015). Ancak yaygın kullanılan ilk antibiyotik olan penisilin 1927 yılında Alexander Fleming tarafından yanlışlıkla keşfedilmiştir. Uzun süre bekletilen Stafilokok kültür petriplerinde küfe rastlamıştır. İlginç olan ise Stafilokok bakterisinin küfün yakınında büyüyememesidir. Gözlemin devamında yapılan çalışmalarda küfün ürettiği maddenin antibakteriyel etkisi olduğu ortaya konmuştur (Ribeiro ve ark, 2019). Antibiyotik çağının başlaması bulaşıcı hastalıkların tamamen biteceği inancını doğurmuştur. Antibiyotiklerin hastalık kaynağı olan patojen bakterileri seçici olarak hedefleyebilen, aynı zamanda konağa zarar vermeyen bir ilaç olduğu düşünülmüştür. A. Fleming penisilin düşük dozda ya da kısa süreli kullanımının penisilin direncine yol açabileceğine dikkat çeken ilk kişidir (Zaman ve ark, 2017).

1947 yılında antibiyotik ilk olarak Waksman tarafından “bakteri ve diğer mikroorganizmaların büyümelerini durduran hatta onları yok etme kapasitesine sahip mikroorganizmalar tarafından üretilen kimyasal madde” olarak tanımlanmıştır. Günümüzde antibiyotiğin birden fazla tanımı vardır: (I) Patojen bakterileri inhibe eden ya da öldüren doğal ya da sentetik kökenli organik kimyasal; (II) Herhangi bir antimikrobiyal madde; (III) Waksman geleneğinde ise, mikrobiyal kökenli antimikrobiyal maddelerle sınırlıdır. Genel kanı ise, doğal, yarı-sentetik veya sentetik olmasına bakılmaksızın herhangi bir antimikrobiyal madde antibiyotiktir (Mohr, 2016).

Antibiyotiklerin hem mikroorganizmayı öldüren bakteriyosidal etkiye hem de bakterinin büyüme ve bölünmesini durduran bakteriyostatik etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Bu etkilerini hücrenin duvar sentezini, protein sentezini, DNA replikasyonunu ve folik asit metabolizmasını inhibe ederek gerçekleştirebilir (Şekil 1) (Kapoor ve ark, 2017).



Şekil 1. Antibiyotiklerin etki mekanizması (Kapoor ve ark., 2017)

### 2.1.1. Hücre Duvarını Hedefleyen Antibiyotikler

Bakteri hücreleri şeker-amino asit polimerlerinin oluşturduğu peptidoglikan yapıyı içeren hücre duvarı ile çevrilidirler. Peptidoglikan tabakada, glikan iplikleri birbirlerine transglikozidaz enzimi, glikan ipliklerinden uzanan peptid zincirleri ise birbirlerine transpeptidaz enzimi ile bağlanarak çapraz bağlanma gerçekleşir. Penisilin bağlayan proteinler (PBP) peptidoglikan monomerinin D-alanil-D-alanin kısmının mevcut peptidoglikan zinciriyle çapraz bağlanmasını sağlar. Bu çapraz bağlanmalarla güçlü bir hücre duvarı oluşur (Miyachiro ve ark, 2019). Beta-laktamlar ve glikopeptidler hücre duvar sentezini inhibe eden antibiyotiklerdir (Sarkar ve ark, 2017).

### **2.1.1.1. Beta-laktamlar**

Peptidoglikan tabaka hücreye stabilite sağlayan bakteriyel hücre duvarının ana bileşenidir. Peptidoglikanın oluşumunda peptidler arası çarpaz bağlanmayı gerçekleştiren transpeptidazlar görev alır. Beta laktam antibiyotikleri ise transpeptidazlara bağlanarak peptidoglikan sentezini inhibe eder. Beta laktamların hedefinde penisilin bağlayan protein (PBP) olarak da bilinen transpeptidazlar vardır. Beta laktamların PBP'ye bağlanması transpeptidasyon reaksiyonunu sekteye uğratar. Bunun sonucunda, bakteride otolitik sürecin başlaması indüklenir ve liziz gerçekleşir. Beta laktam antibiyotikleri, 3 karbon ve 1 nitrojenden oluşan beta laktam halkasını bulundururlar. Sefalosporinin ortak kimyasal yapısı Şekil 2'de gösterilmiştir. Penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler en yaygın kullanılan beta laktam antibiyotiklerdir (Pandey ve Cascella, 2020).

### **2.1.1.2. Glikopeptidler**

Glikopeptidler, Gram pozitif patojenlere bağlı enfeksiyonların tedavisinde kullanılan glikosile ribozomal olmayan peptidlerdir. Glikopeptidler, sitoplazmik membranın dış yüzeyinde sentezlenen peptidoglikanın zincirinin asil D-alanil-D-alanin ucuna bağlanarak peptidoglikan sentezini inhibe etmektedirler. Glikopeptidler doğal ve yarı-sentetik olarak bulunurlar. Vankomisin ve teikoplanin doğal glikopeptidlere ve oritavansin ve dalbavansin yarı-sentetik glikopeptidlere örnektirler (Binda ve ark, 2014). Vankomisinin kimyasal yapısı Şekil 2'de gösterilmektedir.

### **2.1.2. Protein Sentezini İnhibe Eden Antibiyotikler**

DNA'dan mesajcı RNA (mRNA) sentezlenmesi transkripsiyon ve ribozomun mRNA'dan protein sentezlemesi ise translasyon olarak bilinmektedir. Protein sentezinde ribozom ve sitoplazmik faktörler görev almaktadır. Bakteri ribozomu 30S ve 50S alt ünitelerinden oluşmaktadır. Antimikrobiyaller bakteri ribozomunun 50S ve 30S alt ünitesini hedefleyerek protein sentezini inhibe etmektedir (Arenz ve Wilson, 2016).

### **2.1.2.1. 30S alt ünite inhibitörleri**

#### **2.1.2.1.1. Aminoglikozidler**

Aminoglikozidlerin asıl hedefi ribozomlara ulaşabilmek için sitoplazmik membranı geçmesi gerekmektedir. Geçiş için membran oksijen ve aktif proton hareket kuvveti gerektiren enerji bağımlı aktif bakteri taşıma mekanizması bulundurulmalıdır. Bu sebeplerle, aminoglikozidler oksijenli ortamda etkilerini gösterir ve anaerobik bakterilere karşı etkisizdirler. Aminoglikozidlerin hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotiklerle kullanıldığında, düşük dozda aminoglikozidlerin hücreye penetrasyonunu arttırarak sinerjistik etki göstermektedir. Aminoglikozidler ribozomun 30S alt ünitesinin 16S-rRNA'sı ile etkileşim kurarak ribozomun A bölgesine bağlanır. mRNA'nın yanlış okunmasına ve erken sonlandırmaya sebep olur. Böylece, aminoglikozidler protein sentezini inhibe eder. Tobramisin, gentamisin ve streptomisin en bilinenleridir (Kapoor ve ark., 2017). Tobramisinin kimyasal yapısı Şekil 2'de gösterilmiştir.

#### **2.1.2.1.2. Tetrasiklinler**

Tetrasiklinler de aminoglikozidler gibi 30S alt ünitenin 16S-rRNA'sına bağlanarak amino-asil tRNA'nın ribozomun A bölgesine bağlanmasını engeller ve protein sentezini inhibe ederler. Tetrasiklin, doksisisiklin ve minosiklin en bilinenleridir (Kapoor ve ark., 2017). Tetrasiklinin kimyasal yapısı Şekil 2'de gösterilmiştir.

### **2.1.2.2. 50S alt ünite inhibitörleri**

#### **2.1.2.2.1. Kloramfenikol**

Kloramfenikol ribozomun 50S alt ünitesinin 23S r-RNA'sının peptidil transferaz boşluğu sekansı ile etkileşime girer. Böylece, tRNA'nın ribozomun A bölgesine bağlanmasına engel olur ve peptid bağı oluşmasını engelleyerek protein sentezini inhibe eder (Kapoor ve ark, 2017). Kloramfenikolün kimyasal yapısı Şekil 2'de gösterilmiştir.

### **2.1.2.2. Makrolidler**

Makrolidler protein sentezine başladıktan sonra ama erken aşamasında etki ederler. 50S alt ünitesinin 23S rRNA'nın peptidil transferaz merkezine (PTC) bağlanarak uzayan peptidin 5-11 amino asitken erken ayrılmasına neden olarak protein sentezinin devam etmesine engel olurlar. PTC'de yer alan 2058 nolu adenin (*E. coli* numaralandırması) asıl bağlanma bölgeleridir ve ökaryot hücrelerde adenin yerine guanin olması ökaryotlarda etkisiz olmasına neden olur (Dinos, 2017). Eritromisin ve azitromisin en bilinenleridir ve eritromisinin kimyasal yapısı Şekil 2'de gösterilmiştir.

### **2.1.3. DNA Replikasyon İnhibitörleri**

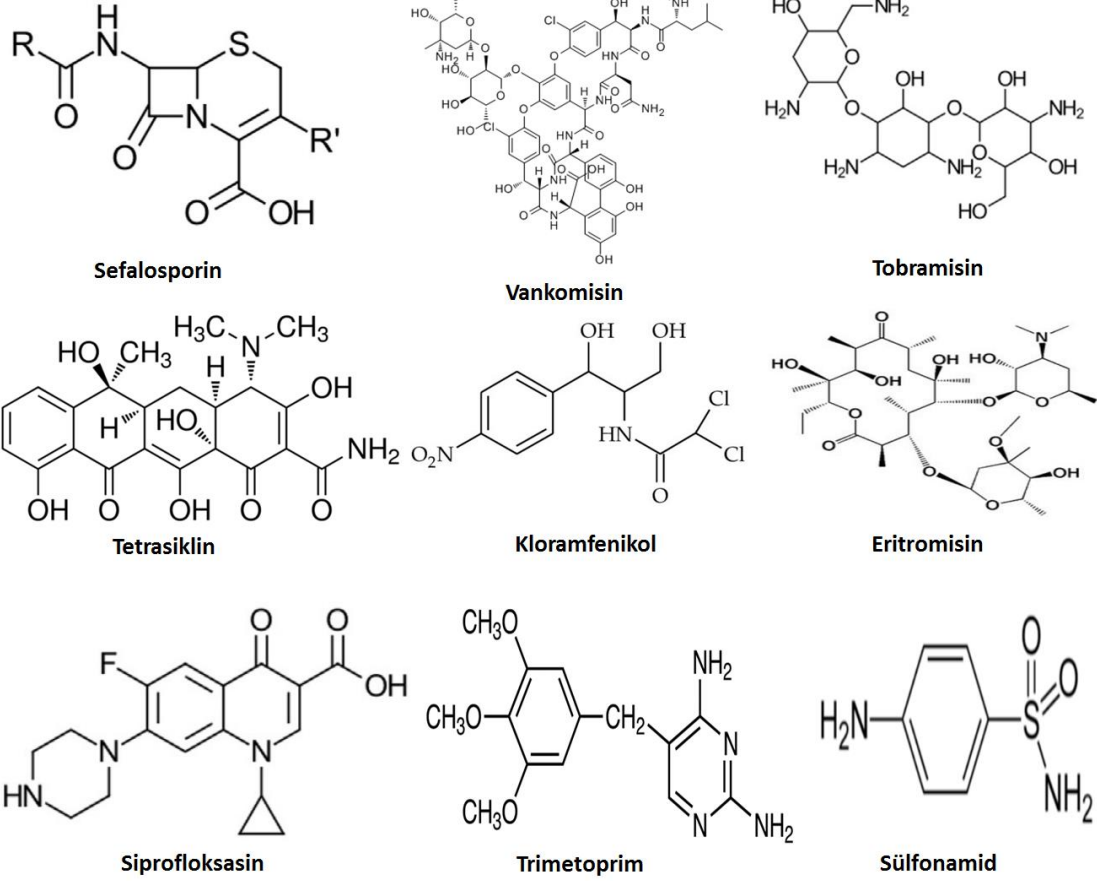
#### **2.1.3.1. Florokinolonlar**

DNA'nın hücre içindeki topolojik durumunu topoizomeraz 2 olarak adlandırılan enzimler belirler. Prokaryotlarda giraz ve topoizomeraz IV enzimleri DNA süpersarımını çözmek için DNA'yı kesip tekrar bağlayarak gerginliği azaltan DNA topoizomerazların kestikleri DNA'ları yeniden bağlamalarını inhibe etmektedir. Böylece DNA fragmantasyonuna neden olur ve bakteriyosidal etki gösterirler (Aldred ve ark, 2014). Siproflaksasin ve levofloksasin en bilinenleridir ve siproflaksasin kimyasal yapısı şekil 2'de gösterilmiştir.

### **2.1.4. Folik Asit Metabolizması İnhibitörleri**

#### **2.1.4.1. Sülfonamidler ve trimetoprim**

Her iki ilaç da folik asit metabolizmasında görev alan enzimleri inhibe ederler. Bu ilaçlar kombinlenerek kullanıldığında sinerjistik etki gösterirler ve mutasyona bağlı direnç gelişim oranını düşürürler. Sülfonamidler dihidropteroat sentazı ve trimetoprim dihidrofolat redüktazı inhibe eder (Kapoor ve ark., 2017). Trimetoprim ve sülfonamidin kimyasal yapıları Şekil 2'de gösterilmiştir.



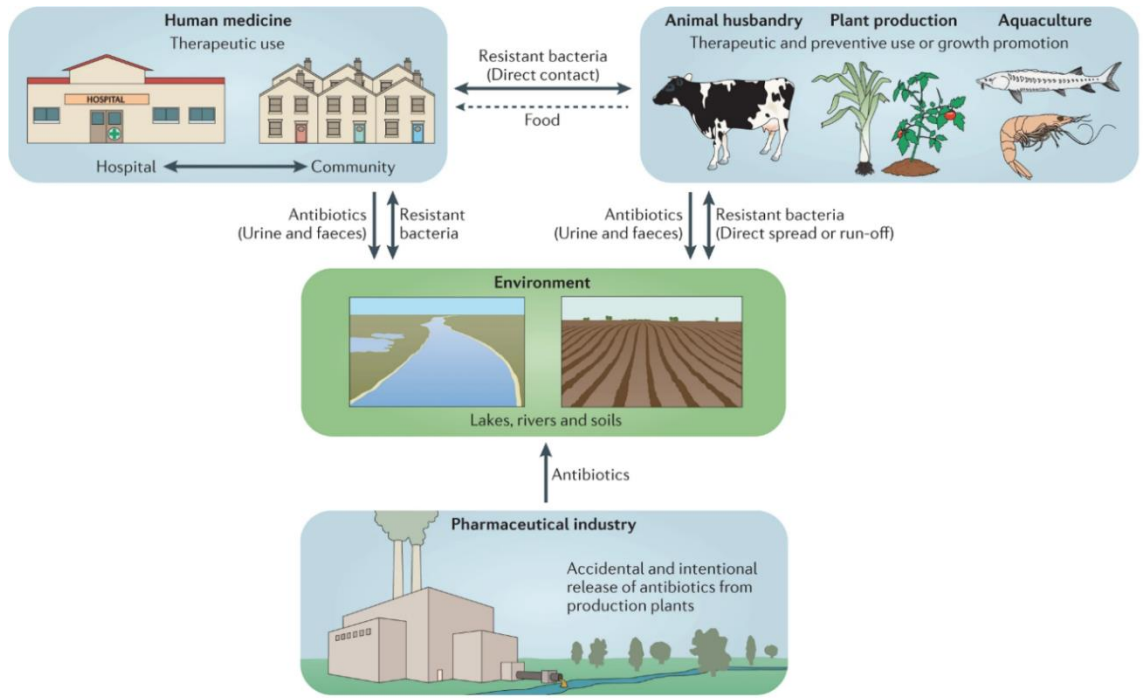
**Şekil 2.** Antibiyotikler ve kimyasal yapıları

## 2.2. Antimikrobiyal Direnç

Antibiyotik direnci Dünya sağlık örgütü tarafından en önemli ilk 10 sağlık sorunu arasında sayılmıştır ve dünyada, yılda antibiyotik direnci nedeniyle 750000 kişi ölmektedir. Yeni antibiyotik geliştirilmemesi ve mevcut antibiyotiklere direncin yayılması önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Antibiyotiklerin gereksiz kullanımının antibiyotik direncinin yayılmasında önemli bir faktör olduğu belirlenmiştir.

Antimikrobiyaller hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde, hayvancılık, bitki üretimi ve su ürünlerinin kültüründe enfeksiyon tedavisinde, enfeksiyon önleyici olarak ve büyümeyi indüklemeye amacıyla kullanılmaktadır. Kullanılan antibiyotiklerin suya ve toprağa geçişi idrar ve dışkı yoluyla ya da ilaç endüstrisinin bilinçli veya bilinçsiz şekilde antibiyotikleri çevreye bırakmasıyla gerçekleşmektedir. Bu da çevrede dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına ve yayılımına sebep olmaktadır. Çevreye salınan

antibiyotiklerin büyük bir kısmı (antibiyotik çeşidine bağlı olarak %20-80) çevreye aktif formda salınmaktadır. Antibiyotiklerin aktif formları insanlarda, hayvanlarda ve çevrede bulunan bakterilere seçici baskı uygulamaktadır. Bakteriler üzerindeki seçici baskı, farklı çevrelere geçiş yapabilen ve diğer bakterilerle alışverişte bulunabilen dirençli bakterilerin seçilimine zemin hazırlamaktadır. Bunun sonucu olarak, antibiyotik direnç genleri ve determinantlarının yayılım potansiyeli ortaya çıkmıştır. Antimikrobiyallerin ve dirençli bakterilerin canlı, çevre ve ilaç endüstrisindeki döngüsü şekil 3’de gösterilmiştir (Andersson ve Hughes, 2014).



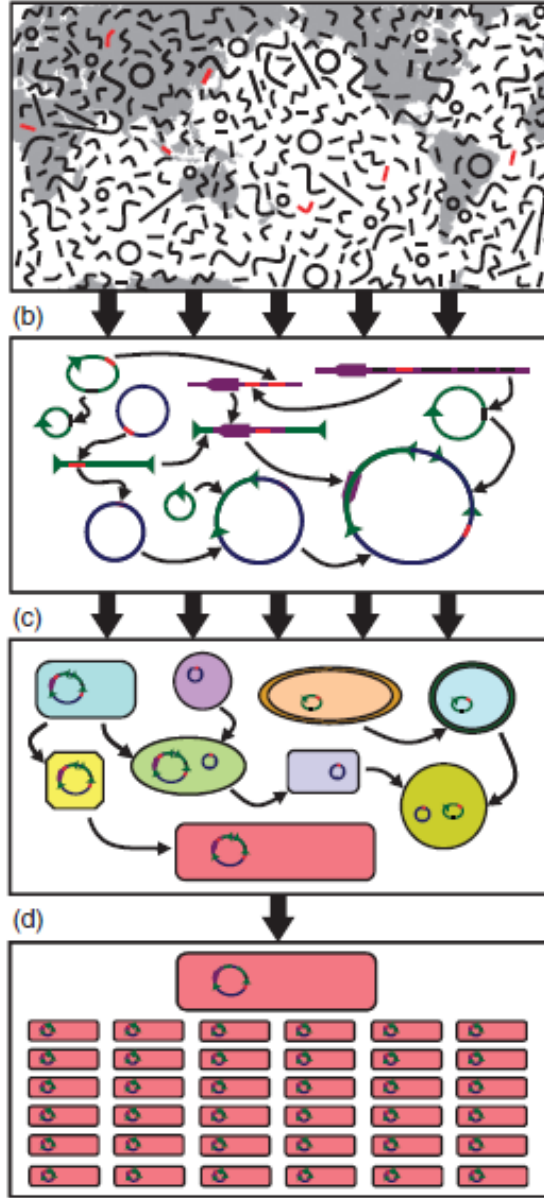
Nature Reviews | Microbiology

**Şekil 3.** Antibiyotiklerin ve antibiyotik direncinin ekolojisi (Andersson ve Hughes, 2014)

### 2.2.1. Antimikrobiyal Direncin Ortaya Çıkışı

Antibiyotiklere direnç genleri antibiyotik kullanımından önce de var olmasına karşın bu genlerin bakteriler arası transferi, patojen bakterilere aktarılması ve yayılması antibiyotiklerin kullanılmaya başlanmasıyla artmıştır. Antibiyotik kullanımının yaygınlaşması öncesinde farklı işlevleri olan veya belirli mikroorganizmalarda veya başka canlılarda potansiyel antimikrobiyal direnç genleri bulunmaktaydı hatta mobil genetik elementler tarafından da taşınabilmekteydi. Antibiyotik uygulaması ile antimikrobiyal dirence sahip

patojenlerin “başarılı klon” olarak klonal ve küresel yayılımı mümkün olmuştur (Şekil 4) (Stokes ve Gillings, 2011).



**Şekil 4.** Direnç genlerinin mikroorganizmaya alınması, genetik elementler vasıtasıyla patojenlere taşınması ve klonal ve küresel yayılımı (Stokes ve Gillings, 2011)



### 2.2.1.1. Mikroorganizmlarda antimikrobiyal direncin gelişimi

Doğal seçim sürecinde mikroorganizmalar kendileri için toksik olan maddelere karşı pek çok mekanizma geliştirmiştir. Antimikrobiyal ilaçların çoğu çevresel mantar ve saprofit bakteriler tarafından doğal olarak üretilmektedirler ve bu antimikrobiyaller antibiyotik direnci sağlayan genetik çeşitliliğin oluşmasında rol almışlardır. Bu direnç genlerinin yalnızca bir kısmı insan patojenlerinde tanımlanmıştır (Holmes ve ark, 2016). Doğal olarak gelişen antibiyotik dirençlerinden biri de insan sağlığı için büyük önemi olan beta-laktamlara karşı direnç sağlayan beta-laktamazlardır. Yapılan bazı çalışmalar, *Klebsiella oxytoca*'daki beta-laktamaz genlerinin evrimsel tarihinin 100 milyon yıldan fazla zamandır devam ettiğini göstermektedir (Aminov, 2009).

Saprofit organizmalar tarafından üretilen antimikrobiyallerin, aynı ortamda yaşayan diğer organizmaların büyümelerini inhibe ederek ortamında kendisine avantaj sağlamak amacıyla ürettiği düşünülmektedir. Yapılan bazı çalışmalar ise, etkileşimin sanılandan daha karmaşık olduğunu ortaya koymaktadır. Öncelikle, saprofitler tarafından üretilen antimikrobiyal moleküllerin topraktaki konsantrasyonunun diğer bakterilerin büyümesini inhibe etmek için düşük olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak, kanıtlar antimikrobiyaller subletal dozda olsa bile bakteri fizyolojisinde önemli etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Subletal antibiyotiklerin mikrobiyal adaptif evrim ivmesini arttırdığı ve sinyal molekülü gibi davranarak mikrobiyal ve konak gen ekspresyonunu etkilediği ortaya konmuştur (Andersson ve Hughes, 2014). Saprofit bakterilerin klinikte sıklıkla kullanılan geniş spektrumlu karbapenem üretiminde görevli olan bazı genlerin aynı zamanda *quorum sensing* ve biyofilm oluşumunda rol alabileceği düşünülmektedir. Bu bulgulara göre antimikrobiyallerin istenmeyen etkilerinin antimikrobiyal dirençten fazlası olabileceği düşünülmektedir.

Doğal antimikrobiyallerin yanı sıra sentetik antimikrobiyalere karşı da direnç oluşmaktadır. Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi'nin (2015) verilerine göre 2012 yılında Avrupa'da hastalardan izole edilen *E. coli* suşlarının klinikte sıklıkla kullanılan sentetik antimikrobiyallerden biri olan florokinolona karşı direncin 10-40% olduğunu bildirilmiştir. Birçok direnç mekanizması hedefin değiştirilmesi, dışa atım sistemlerini artışı, florokinolon inaktivasyonu ve hedefin DNA bağlanma proteinleri ile korunmasıyla ortaya çıkmıştır (Redgrave ve ark, 2014).

### 2.2.1.2. Bireylerde dirençli bakteri kolonizasyonu

Yenidoğanlar anne sütü ile beslenmelerine bağlı olmaksızın doğumun ardından *Enterobacteriaceae* tarafından kolonize edilirler. Hindistan'da yapılan bir çalışmada, emzirilen bir günlük bebeklerin %14,3'ünün beta-laktam antibiyotiklerinin inaktivasyonunu gerçekleştiren geniş spektrumlu beta-laktamaz enzimini bulunduran *Enterobacteriaceae* tarafından kolonize olduğu gösterilmiştir. Bebekler 60 günlük olduğunda ise bu oran 41,5%'e yükselmiştir (Kothari ve ark, 2013). Sağlıklı bağırsak mikrobiyotasının oluşmasında çevre, içme suyu ve yemekler büyük öneme sahiptir. Şimdiye kadar incelenen her ortamda, Antarktika dahil her kıtada, toprakta denizde, içme sularında, çevrede, gıda ürünlerinde antimikrobiyallere dirençli bakteriler izole edilmiştir. Mikrobiyom erken yaşlarda oluşur. Direnç genlerini de içeren çeşitli mikroorganizmalar gastrointestinal sistemde veya ciltte enfeksiyona sebep olmadan bulunabilir.

Dokunulmamış ekosistemde antimikrobiyal dirençli ve hassas türler dengededirler. İnsan mikrobiyotası da antibiyotik baskısına maruz kalmadığı sürece doğal dirençli kommensal mikroorganizmaları vücudunda bulundurur. Antimikrobiyal maruziyeti sonucu seçilim baskısı oluşur ve yalnızca antimikrobiyal dirence sahip ya da yeni mutasyonlarla veya direnç genleriyle bu direnci edinen mikroorganizmaların hayatta kalmaları ve çoğalmalarına sebep olur (Aminov, 2009). Antimikrobiyal kullanımı insan mikrobiyotası ve patojenler üzerinde seçilim baskısı oluşturarak dirençli organizmaların hastalarda kalıcı olmasına sebep olabilir (Bell ve ark, 2014). Klinikte antimikrobiyal kullanımı insan mikrobiyotasının yüksek dozda antimikrobiyallere maruz kalmalarına sebep olmaktadır. Yayınlanan bir vaka raporunda ertapenem ile tedavi edilen bir hastada *de novo* direnç gelişimi bildirilmiştir (Elliott ve ark, 2006). Bazı hastalarda enfeksiyona sebep olan bakterilerin mutasyon oranının arttığı görülmüştür. Bazı antimikrobiyaller mutasyon oranını arttırmakta ve direnç seçilimini teşvik etmektedirler (Blazquez ve ark, 2002).

### 2.2.1.3. Antibiyotiklere direnç ve yayılması

Antimikrobiyaller tedavide sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak reçete edilen veya kullanılan antibiyotiklerin yaklaşık %50'sinin gereksiz olduğu ve endikasyon dışı kullanıldığı kabul edilir. Antibiyotiklerin gereksiz, yanlış veya aşırı kullanımı antimikrobiyal direncin ortaya çıkmasında ve yayılmasında ana sebeplerden biridir. Avrupa Hastalık Önleme ve

Kontrol Merkezi'nin verilerine göre 2011-2012 yıllarında Avrupa'da antibiyotik kullanan hastaların %30-40'ının yatan hastalar olduğu bildirilmiştir ve toplam antibiyotik reçetelerinin büyük bir kısmı ise ayakta hastalara yazılmaktadır. Antimikrobiyal reçetelenmesi ve kullanımının kontrollü yapılması önerilmektedir ancak son yıllarda ihtiyatlı kullanım gerçekleştirilmektedir. Bu sayede, hafif de olsa antimikrobiyal dirençte azalma gözlenmiştir (Livermore ve ark, 2013). İnsanlarda antimikrobiyal kullanımı ve direnç arasındaki etkileşim karmaşıktır ve henüz çözülebilmemiş değildir. Bu etkileşimdeki faktörler patojen ilaç ilişkisi, patojen-konak ilişkisi, patojendeki mutasyon oranı, antimikrobiyal dirençli klonların ortaya çıkışı, patojenin insanlar, hayvanlar ve çevre arasında bulaşma oranı ve çapraz dirençtir. Aşı alım oranları, farklı sağlık sistemleri, göç ve turizm, sanitasyon ve nüfus yoğunlukları gibi halk sağlığı faktörleri de direnç yaygınlığını etkilemektedir (Holmes ve ark., 2016). Sonuç olarak, antimikrobiyal kullanımının direncin ortaya çıkmasındaki rolü her ilaca ve her mikroorganizmaya özgüdür.

### **2.2.2. Antibiyotik Direnç Tipleri**

Bakterilerde antibiyotiklere karşı başlıca 2 tip direnç vardır. Bunlar intrinsik (doğal) ve kazanılmış direnç olarak 2'ye ayrılırlar.

#### **2.2.2.1. İntrinsik direnç**

Bir türde bulunan tüm suşların belirli antibiyotiklerden etkilenmemesi intrinsik direnç olarak adlandırılır. İntrinsik direnç genellikle kromozomal olarak kodlanmıştır. Bu direnç genellikle bakterinin yapısal ve biyokimyasal özellikleri sayesinde ortaya çıkar. Bakterilerin doğal olarak antibiyotiklerin bağlanma hedef bölgesini içermemesi, spesifik olmayan dışa aktarım pompaları ya da bakteri membranından geçirgenliğin düşük seviyede olmasıyla bakteriler bu direnç çeşidine sahip olabilirler (Çiftci ve Aksoy, 2015). Bu mekanizmalar organizmanın çekirdek genetik yapısında sabitlenir. İyi bilinen intrinsik direnç sistemlerden biri *Escherichia coli*'deki çok geniş substrat spesifitesine sahip olan ve farklı antibiyotik, boya, deterjan ve dezenfektan sınıflarını dışa aktarabilen AcrAB/TolC pompa sistemidir. Diğer bir intrinsik direnç mekanizması ise, *E. coli* ve diğer Gram negatif bakterilerde bulunan vankomisin direncidir. Bu direnç dış zarın geçirgenliği azaltarak bariyer gibi davranması

sonucunda oluşur. İntrinsik direnç düşük seviyede antibiyotik direnci sağlamasına rağmen, bağışıklığı baskılanmış hastalarda fırsatçı patojenler haline gelebilir (Peterson ve Kaur, 2018).

#### **2.2.2.2. Kazanılmış direnç**

Kazanılmış direnç, tür olarak bir antibiyotiğe hassas olan bakterilerin o antibiyotiğe dirençli hale gelmesiyle oluşur. Bu genellikle o antibiyotikle teması sırasında veya tekrarlanan tedaviler sonrasında oluşur. Popülasyonda antibiyotiğe karşı direnç gelişir ve dirençli bakteriler baskın hale gelir. Antibiyotik direncine sahip bakteriler antibiyotik baskısıyla seçilerek yayılırlar. Kazanılmış direnç kromozomal, plazmidik veya transpozon aracılığıyla gelişir ve genellikle yatay gen transferi ile aktarılır (Öztürk, 1997).

##### **2.2.2.2.1. Kromozomal direnç**

Kromozomda gerçekleşen spontan mutasyon veya mutasyonlar sonucu kromozomal direnç oluşmaktadır. Mutasyon gerçekleşme sıklığı her hücre bölünmesinde  $10^{-5}$  ile  $10^{-10}$  arasındadır. Kromozomda gerçekleşen mutasyonla kazanılan direnç bir veya birden çok aşamada ortaya çıkmaktadır.

**Bir aşamalı mutasyon:** Bakterilere uygulanan antibiyotiğin bir veya birkaç uygulanmasının ardından ileri derecede direnç gelişebilir. Streptomisin tipi direnç buna örnektir. *E. coli* ve *Staphylococcus aureus*'ta rifampisine karşı bu tipte direnç gelişir. *Enterobacter sp.*, *Serratia sp.*, indol pozitif *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi kromozomal beta laktamaz genine sahip bakterilerde gerçekleşen tek aşamalı mutasyonla sefalosporinlere karşı direnç gelişebilir. Gerçekleşen bu mutasyon ya beta-laktamaz salgılanmasında artışa ya da beta laktamaz spektrumunda genişlemeye neden olarak sefalosporinlerin yıkımını neden olur.

**Çok aşamalı mutasyon:** Direnç seviyesinin gerçekleşen her bir mutasyon ile artması ile direnç oluşur. Gerçekleşen mutasyon, porin üretiminin bozulmasına yol açar. Bu da bakterinin antibiyotiğe olan geçirgenliğini azaltabilir. *P. aeruginosa*'da *oprD*'deki azalma karbapenem direncine neden olur (Meletis ve ark, 2012). Diğer bazı mutasyonlar da antibiyotiğin bağlandığı hedefin değişmesine sebep olabilir (Örneğin, rifampisin direncine sahip mutant hücrede, RNA polimerazın mutasyonla rifampisine duyarsız hale gelmesi),

Kinolon direncinde mutasyonlar topoizomeraz enzimini quinolon resistance determining region (QRDR) bölgesinde oluşur. Direnç oluşturabilecek düzeyde olabilmesi için aynı bölgede birden fazla mutasyon olması gerekir. Mutasyonlar nedeniyle topoizomeraz enziminin kinolona duyarlılığının azalması dirence neden olur (Huseby ve ark, 2017).

Kromozomal mutasyon yoluyla gelişen direncin farklı bakterilere yayılımı gerçekleşmez ve mutasyonun gerçekleştiği bakterilerin metabolizmasında meydana gelen değişiklik sebebiyle üremesi kısıtlanabilir. Kromozomal mutasyonla gelişen ve klinik öneme sahip dirençlere örnek olarak rifampisin, izoniazid, kinolon direnci verilebilir.

#### **2.2.2.2. Plazmidlere bağlı direnç**

Plazmid kromozomdan ayrı replike olabilen bir DNA parçasıdır. Plazmidler, antimikrobilyallere ve ağır metallerle direnç sağlayan genleri taşıyabileceği gibi çeşitli virülans faktörlerini de taşıyabilirler. Klinik suşlarda plazmidle bağlı direnç daha yaygın görülür. R plazmidleri olarak adlandırılan direnç plazmidleri bir veya birden fazla antibiyotiğe karşı direnç genlerini bulundurabilirler. Direnç plazmidleri hassas bakterilere transdüksiyon, transformasyon veya konjugasyon ile geçerek direnç kazandırır ve direncin yayılmasına sebep olurlar. Transdüksiyonda, bakteriyofajlar direnç plazmidleri ile birleşir ve direnç genleri taşınarak diğer diğer bakterilere aktarılır. Beta laktamaz geninin hassas stafilokoklara aktarımı ve salmonellalara direnç genlerinin aktarımı buna örnektirler. Transformasyonda, dirençli bakterinin liziz olması ile ortama dağılan plazmid veya DNA fragmentleri hassas bakteriler tarafından hücre içine alınır ve bakterinin DNA'sına katılır. Konjugasyonda ise, hücre teması yoluyla R plazmidleri dirençli bakteriden hassas bakteriye aktararak antibiyotik direnci kazandırılır. Plazmidlerin aktarılmasının farklı yollarının olması ve aktarımın farklı türler arasında gerçekleşebilmesi sebebiyle antibiyotik direncinin yayılmasında büyük öneme sahip olduğu bilinmektedir. Sefalosporinler, sulfonamidler, makrolitler, aminoglikozitler, penisilinler, kloramfenikol, nitrofurantoin ve fusidik aside karşı geliştirilen direncin sorumlusu genellikle plazmidlerdir (Öztürk, 1997).

### 2.2.2.2.3. Transpozonlara bağlı direnç

Transpozonlar, DNA molekülleri arasında (kromozomdan plazmide veya plazmiden kromozoma) geçiş yapabilen DNA dizileridir. Transpozonların plazmidlerden farklı ise, bağımsız şekilde replikasyonlarını gerçekteştirmemeleridir. Kloramfenikol, tetrasiklinler, ampisilin, kanamisin ve trimetoprima karşı gelişen dirençte transpozonlar önemlidir. Kısa süre içerisinde çoklu ilaç direncinin ortaya çıkıp yayılmasında transpozonların önemli rolü vardır.

R plazmidlerinde olduğu gibi, transpozonların aktarımı da yalnızca aynı tür bakteriler arasında sınırlı kalmamaktadır. Farklı cins bakterilere de aktarılabilir. Gonokoklarda penisilinaz üretiminden sorumlu plazmidlerin *Haemophilus influenza*'ya geçişi veya *Shigella* spp bakterilerde tetrasiklin, kloramfenikol, streptomisin ve ampisilin direncinden sorumlu plazmidin *E. coli*'ye geçişi verilebilir (Öztürk, 1997).

## 2.3. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

Antibiyotik üretimini gerçekteştiren mikroorganizmalarda direnç genleri antibiyotik sentezini sağlayan genlerle bir arada bulunmakta hatta ko-ekspresyon gerçekteşmektedir (Mak ve ark, 2014). Antibiyotik direnci 6 farklı mekanizma halinde ortaya çıkabilir.

### 2.3.1. Antibiyotik Modifikasyonu veya Degredasyonu

Antibiyotik modifikasyonu enzimatik aktiviteyle antibiyotiklerin antibiyotik özelliği olmayan metabolitlerine dönüşmesi antibiyotiklerin inaktivasyonu olarak tanımlanır. Pek çok farklı antibiyotik için bu direnç mekanizması vardır ve özellikle aminoglikozid, kloramfenikol ve beta laktam antibiyotiklerine karşı bu direnç mekanizması yaygındır (şekil 5A). N-asetil transferaz (AAC), O-fosfotransferaz (APH) ve O-adeniltransferaz (ANT) gibi aminoglikozid modifikasyon enzimleri aminoglikozid antibiyotiklerinin asetilasyon, fosforilasyon ve adenilasyonunu gerçekteştirerek dirence neden olur. Bu direnç enzimleri antibiyotik üreticisinde de bulunabilir (Peterson ve Kaur, 2018). Kloramfenikole direnç sağlayan kloramfenikol asetil transferaz enzimleri kloramfenikolü asetilleyip modifiye ederek direnç sağlar. Kloramfenikol asetil transferaz enzimleri klinik suşlarda sıklıkla bulunmasına rağmen

kloramfenikolün sentezini gerçekleştiren *Streptomyces* türlerinden bu enzimlerin tanımlandığına dair sadece birkaç rapor mevcuttur (Murray ve ark, 1989; Schwarz ve ark., 2004). Beta laktamlara karşı direnç beta laktamazlar olarak bilinen antibiyotik hidrolize edici enzimler tarafından sağlanır (Şekil 5B).

### 2.3.2. Antibiyotiklerin Hücre İçi Akümüasyonunun Engellenmesi

Antibiyotiklerin hücre içinde akümüasyonunu yani birikmesini engelleyen pompa sistemleri, DrrAB, OtrC, TlrC ve MlbYZ gibi ABC pompalarındaki gibi ATP hidrolizinden enerji kullanarak veya MFS, MATE, SMR ve RND ailesi pompalarındaki gibi proton gradyanları kullanılarak antibiyotiği hücreden çıkarır (Şekil 5C). Antibiyotiklerin pompa sistemiyle hücre dışına atılması tek başına direnç sağlayabilmekle beraber genellikle antibiyotik modifikasyonu veya hedeflerin modifikasyonu mekanizmaları ile birlikte bulunur. Antikanser olarak kullanılan daunorubisin ve doksorubisin antibiyotiklerini üreten *Streptomyces peucetius*'ta bulunan antibiyotik dışa aktarım mekanizması bu konuda en çok çalışılmış mekanizmalardandır. Bu antibiyotikler DNA bazları arasına girerek interkalasyona sebep olmaktadır. Böylece, DNA replikasyonu inhibe olmaktadır. Bu antibiyotiklerin dışa aktarımının, bu antibiyotiklerin sentezinden sorumlu olan gen kasedinde bulunan bir gen tarafından sentezlenen proteinle gerçekleştiği gösterilmiştir (Guilfoile ve Hutchinson, 1991). Klinik suşlarda hücre içinde antibiyotik birikiminin engellenmesi antibiyotiğin dışa aktarılması ve/veya geçirgenliğinin azaltılmasıyla gerçekleşir. Antibiyotiğin geçirgenliği doğal olarak geçirgen olmayan porinler nedeniyle, porinlerinin doğal olarak olmaması nedeniyle, zorunlu olmayan transporterlerin mutasyon ile kaybı nedeniyle ve porin kanallarının daralması nedeniyle azalabilir ve dirence sebep olur (Delcour, 2009). Geçirgenliğin azalması özellikle geçirgenlik bariyeri oluşturan ve hidrofilik antibiyotiklere karşı içsel direnç sağlayan dış membrana sahip Gram-negatif bakteriler için önemlidir (Nikaido, 2003). Porin genlerinde meydana gelen mutasyon veya ekspresyondaki değişikliklerin Gram-negatif bakterilerin hidrofilik antibiyotiklere duyarlılığını daha fazla etkilediği gösterilmiştir (Li ve ark, 2012). Antibiyotik dışa aktarımını sağlayan genler intrinsik veya kazanılmış direnç olabilirler. Bazı bilinmeyen dışa aktarım pompa genleri plazmid ile aktarılabilir ya da dışa aktarım pompalardan sorumlu genlerde meydana gelen mutasyon ile overekspresyon gerçekleşir (Van Bambeke ve ark, 2000). Dışa aktarımdan

görevli olan pompaların çoklu antibiyotik direnci sağladığı da bilinmektedir (Blanco ve ark, 2016).

### 2.3.3. Antibiyotik Tutulması

Antibiyotiğe bağlanarak antibiyotiğin hedefe bağlanmasını engelleyen proteinler vasıtasıyla da direnç sağlanabilir (Şekil 5E). Bleomisin antibiyotiğini sentezleyen mikroorganizmalardadirenç gelişmesi için metal bağlı veya metal içermeyen antibiyotiklerin TlmA, BlmA, and ZbmA proteinleri tarafından tutulması ile gerçekleşir (Sugiyama ve Kumagai, 2002). Vankomisin toleranslı *Staphylococcus aureus* (VISA)'larda çok katmanlı kalın hücre duvarı antibiyotiklerin hedefe ulaşmasını engeller. *Pseudomonas aeruginosa*'da ise biyofilm oluşumu antibiyotiği biyofilmde tutarak hedefe ulaşmasını engeller.

### 2.3.4. Hedef Değiştirme / Baypas / Koruma Mekanizmaları

B-laktamlar, glikopeptidler, makrolidler, linkozamidler, streptograminler ve aminoglikozitler gibi pek çok antibiyotiğe karşı hedef değiştirme mekanizması geliştirilerek direnç oluşması sözkonusudur (Şekil 5D). Beta laktam antibiyotikleri penisilin bağlayan proteinlerin (PBP) substratları ile benzer yapıya sahiptir. Böylece, antibiyotik PBP'lerin aktif bölgelerine bağlanarak onları inhibe etmektedirler (Fernandes ve ark, 2013). Antibiyotik üreticisi olan *Streptomyces* türlerinde Gram-pozitif olmalarına rağmen, PBP'lerin fazla ekspresyonu veya beta laktamlara karşı düşük afiniteye sahip PBP'lere sahip olmaları sayesinde penisiline karşı yüksek dirence sahiptirler (Ogawara, 2016). Bakterilerde üç sınıf PBP (A, B ve C) bulunur. Bu PBP'lerin bazıları beta laktamları bağlayan bir serin / treonin olmamasından dolayı beta laktamlara karşı düşük afiniteye sahiptir (Peterson ve Kaur, 2018).

Vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptitler, peptidoglikan monomerlerindeki D-Ala-D-Ala ile birleşerek hücre duvarı transpeptidasyonunu ve transglikosilasyonunu inhibe eder. Peptidoglikan monomerinin D-Ala-D-Ala'dan D-Ala-D-Lac ya da D-Ala-D-Ser'a dönüşmesiyle glikopeptidlerin afinitesi sırasıyla 1000 ve 6 kat azalır ve direnç gelişir (Bugg ve ark, 1991).

Hedef molekülde değişiklik olması, 50S ribozomal altünitesine bağlanan makrolid, linkozamid ve streptogramin (MLS) antibiyotiklerine karşı direnç oluşmasında rol alır. 23S

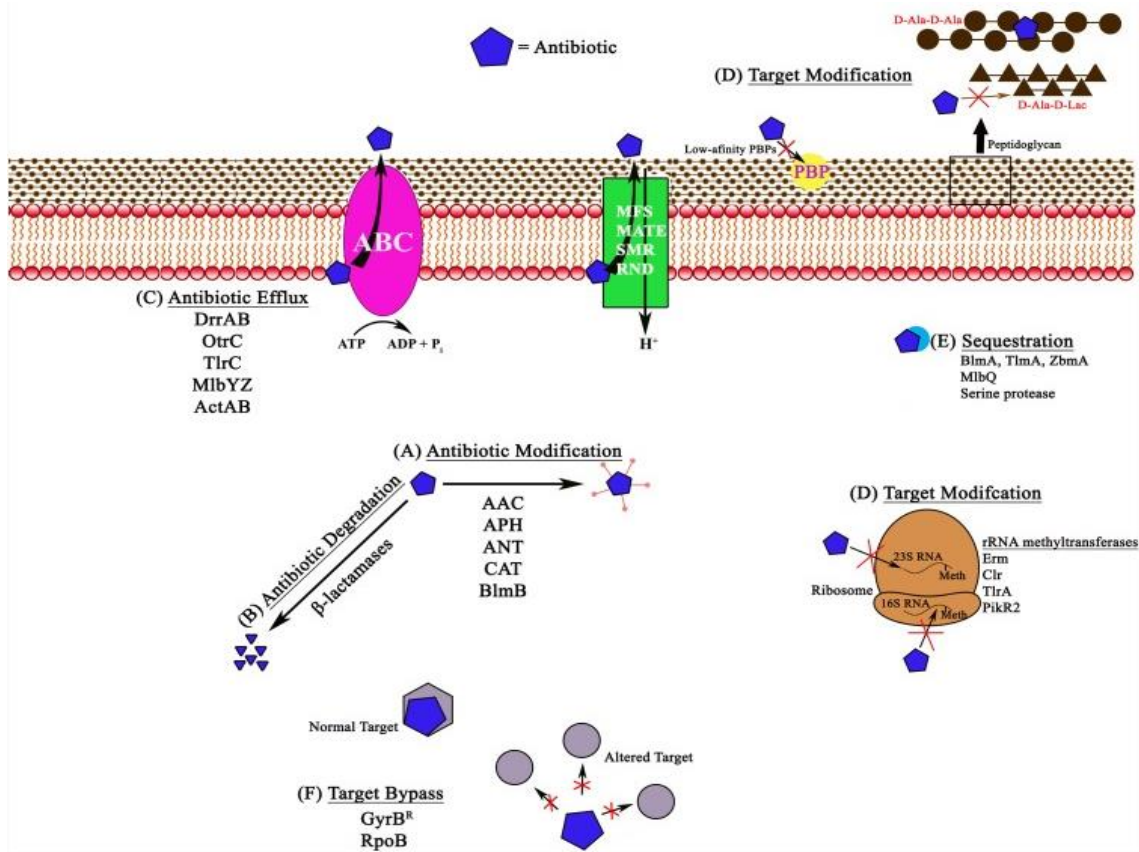


rRNA'nın 2058 nolu adenin bazının rRNA metiltransferazlar tarafından metillenmesi ile antibiyotiğin hedefine bağlanması engellenir (Douthwaite ve ark, 2004). Tek metillenme ortalama direnç düzeyi sağlarken, dimetillenme yüksek düzeyde direnç sağlar (Fyfe ve ark, 2016). Aynı adenin yerine başka bir bazın gelmesiyle oluşan mutasyonlar da direnç oluşumuna neden olur.

Aminoglikozidlere karşı direnç sağlanması, 16S rRNA metiltransferazların A1408 veya G1405 uzantısının metillenmesi ile gerçekleşir (Shakil ve ark, 2008).

Bypass mekanizmasında ise, hedefe benzeyen ek düşük afiniteli hedefler üretilerek orijinal hedef antibiyotiğin etkisinden kurtarılır. Örneğin, novobiyosin direnci için DNA giraz ek B alt birimi, platensimisine direnç için alternatif bir yağ asidi sentaz enzimini ve rifamisin direnci için alternatif dirençli RNA polimeraz sentezi gerçekleştirilir (Peterson ve Kaur, 2018).

Antibiyotiğin hedef bölgesinden uzak tutulması koruma mekanizması ile gerçekleşir. *Streptomyces peucetius*'te daunorubisin direnç proteini DNA bazları arasına giren daunorubisinin DNA'ya tutunmasını engeller. Bu sayede, normal transkripsiyon ve replikasyon gerçekleşir (Prija ve Prasad, 2017).



Şekil 5. Bakterilerdeki farklı antibiyotik direnç mekanizmalarının şematik gösterimi (Peterson ve Kaur,2018)

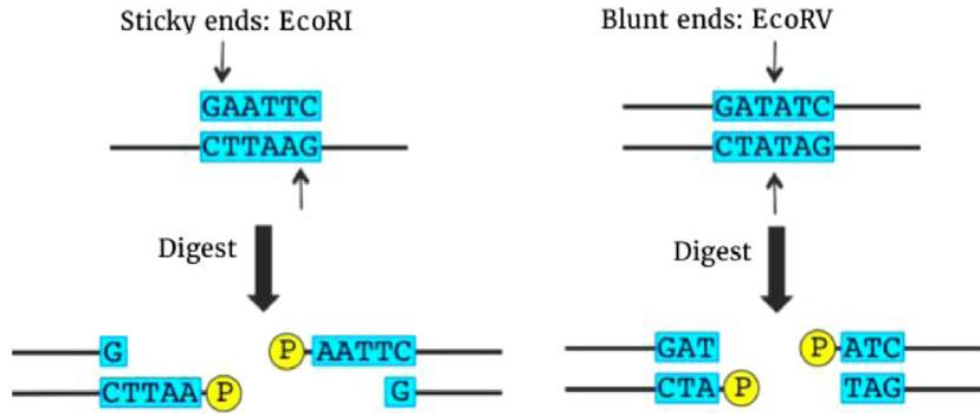
## 2.4. Moleküler Klonlama

Moleküler klonlama, rekombinant DNA molekülünü taşıyan canlı popülasyonu oluşturmak için kullanılan bir tekniktir. Rekombinant DNA öncelikle *in vitro* koşullarda vektöre yerleştirilerek oluşturulur. Sonrasında, konakçı organizmaya aktarılır ve vektör sayesinde kendi kendine replikasyon gerçekleştirerek hücre içerisinde çoğalır. Konakçı olarak genellikle patojen olmayan ve kolaylıkla çoğalabilen *E. coli* kullanılır.

Moleküler klonlama tekniğinin geliştirilmesi restriksiyon endonükleaz enzimlerinin keşfi ile başlamıştır. Bu enzimler DNA'da belirli sekansları tanıyıp belirli lokasyonlardan keserek aktivite göstermektedirler. Bu enzimler ile genom gibi büyük DNA'ların parçalanıp küçük fragmentler haline getirmeye imkan sağlar. Bu fragmentler vektörle DNA ligaz enzimi yardımıyla birleştirilirler. Vektörler, konakçı içerisinde kromozomdan ayrı replike olabilen küçük sirküler plazmidlerdir (Lederberg, 1998).

Restriksiyon endonükleazlar klonlama amacıyla büyük DNA fragmentlerinin kesilerek küçük fragmentlere dönüştürülmesi için kullanılabilir. PCR'da kullanılacak olan primerlere restriksiyon kesim bölgelerinin eklenmesi ile ampliconlarda da restriksiyon kesim bölgeleri oluşturulmasıyla da klonlamada kullanılabilir. Böylece, amplicon ve vektörün ortak enzimlerle restriksiyonu gerçekleştirilip ligasyon ile rekombinant DNA oluşturulabilmektedir.

Restriksiyon endonükleazları hem yapışkan uç hem de küt uç oluşturabilirler (Şekil 6). Yapışkan uçlar, DNA'nın 3' veya 5' ucunda oluşabilen tek sarmallı çıkıntılardır. Küt uçta ise çıkıntı bulunmamaktadır. Her iki uçta da ligasyon gerçekleştirilebilir ve her ikisi de avantaj ve dezavantaja sahiptirler. Yapışkan uçlu bir fragment ligasyonunun başarılı olması için, birleştirilecek iki çıkıntının tamamlayıcı Watson-Crick baz eşleşmesine sahip olması gerekmektedir. Küt uçlu fragmentlerde ise böyle bir gereklilik yoktur ve daha esnektir. Ancak, küt uçlu fragmentlerin ligasyonu, iki parçanın bağlanma stabilitesi eksikliğinden dolayı yapışkan uç fragmentlerin ligasyonundan daha az etkilidir. Ayrıca, yapışkan uçlar modifikasyon enzimleri ile küt uçlara dönüştürülebilirler. Günümüzde, restriksiyon endonükleazlar yardımıyla klonlama **geleneksel klonlama** adıyla aktif ve yaygın şekilde kullanılmaya devam etmektedir (Bertero ve ark, 2017).



**Şekil 6.** Restriksiyon enzimleri tarafından üretilen DNA uçlarının tipi. Yapışkan veya küt uçlar üreten restriksiyon enzimlerinin örnekleri. Oklar kesilen yerleri göstermektedirler. Restriksiyon reaksiyonu sonrası 5 'uçlara bağlı fosfat grupları sarı ile gösterilmiştir.(Bertero ve ark, 2017).

Geleneksel klonlamaya ek olarak geliştirilmiş ve geliştirilmekte olan avantaj ve dezavantajlarıyla pek çok klonlama yöntemi bulunmaktadır (Bertero ve ark, 2017) (Şekil 7).

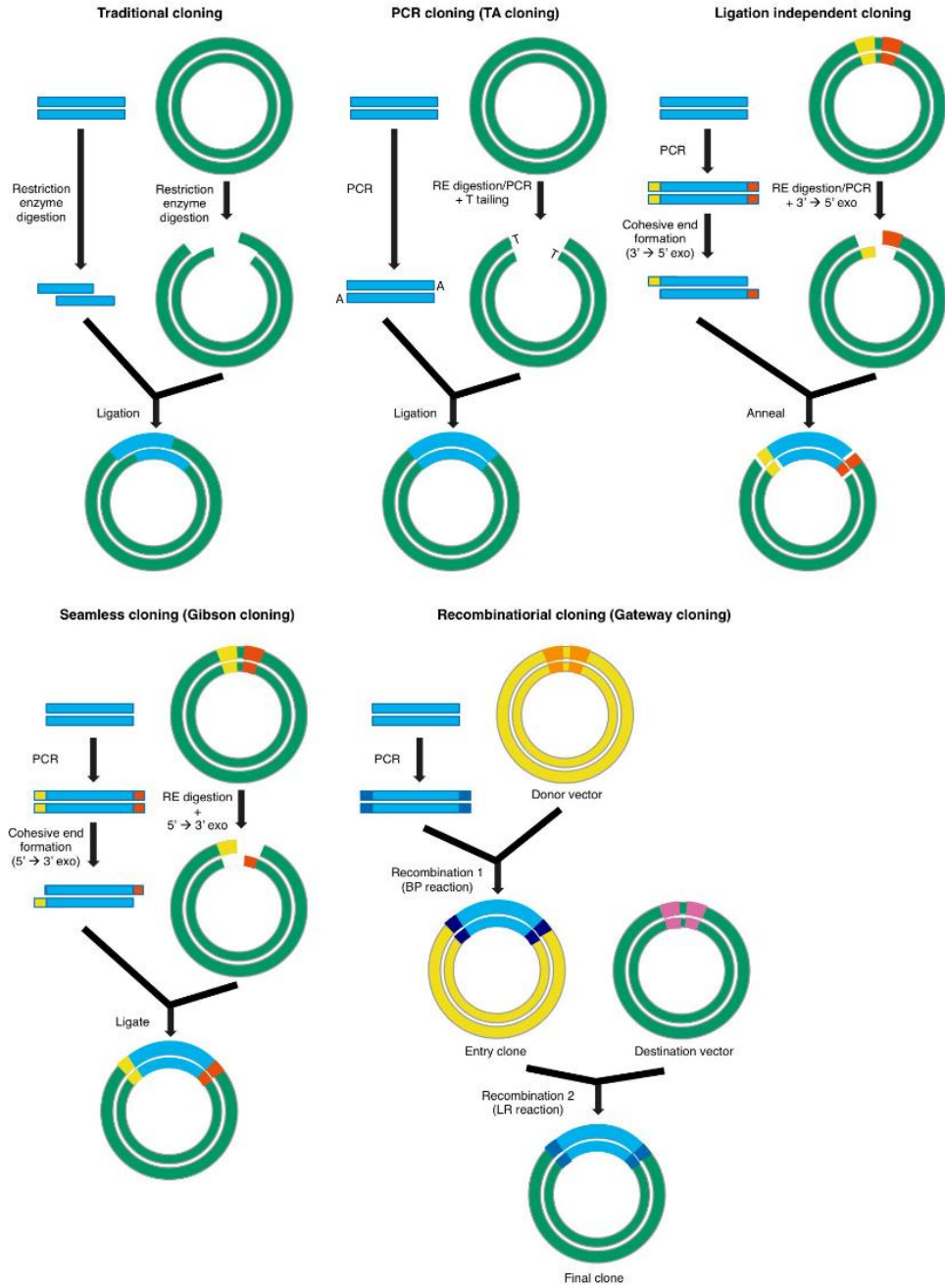
**PCR (TA) klonlamada,** PCR ile çoğaltılan DNA fragmentiyle herhangi bir restriksiyon enzimi ile kesime gerek duymadan doğrudan ligasyon gerçekleştirilebilmektedir. En yaygın olarak kullanılan PCR klonlama yöntemlerinden birinde, amplifikasyon işlemi sırasında DNA fragmanlarının 3 'uçlarına Taq polimeraz tarafından eklenen bir adenin çıkıntısından yararlanılır. Bu "A-kuyruklu" PCR ürünler doğrudan "T-kuyruklu" vektörlerle bağlanabilir. Dolayısıyla bu yöntem "TA" klonlaması olarak bilinir.

**Ligasyondan bağımsız klonlama (LBK)** genellikle, klonlanacak fragmana hedef vektöre homolog olan kısa DNA dizileri eklenmesi ile gerçekleştirilir. Bu dizilerin eklenmesi PCR amplifikasyonu sırasında modifiye primerler kullanılarak kolayca gerçekleştirilir. Vektör ve insert arasındaki tamamlayıcı yapışkan uçlar 3' uçtan 5' uca ekzonükleaz aktivitesine sahip enzimler kullanılarak oluşturulur ve elde edilen iki molekül daha sonra karıştırılır ve tavlanır. Elde edilen plazmid, konakçı organizma tarafından verimli bir şekilde onarılabilen dört tane tek sarmallı DNA deliğine sahiptir. Ortaya çıkan ürün herhangi bir yeni restriksiyon enzimi bölgesi veya başka istenmeyen diziler içermez (Bertero ve ark, 2017).

**Dikişsiz (Seamless) klonlama,** bir veya daha fazla DNA fragmanının bir vektöre sekanstan bağımsız ve iz bırakmadan yerleştirilmesine olanak sağlayan bir klonlama tekniğidir. Bu yöntemlerden en iyi bilineni, 10 taneye kadar fragmentin kolayca

birleştirilebildiği Gibson Assembly yöntemidir. LBK'ye benzer şekilde, klonlanacak fragmentlerin her iki ucuna homolog DNA dizilerinin eklenmesine dayanır. Daha sonra, bir ekzonükleaz, bir DNA polimeraz ve bir DNA ligazının uygulanmasıyla rekombinant DNA'nın üretimi gerçekleşir. Hem vektör hem klonlanacak insert 5' uçtan 3' uca ekzonükleaz aktivitesine sahip enzim ile muamele edilerek 3' çıkıntılara sahip DNA molekülleri elde edilir. Homolog dizilere sahip vektör ve insertin tavlanmasının ardından DNA polimeraz boşlukları doldurur ve DNA ligaz DNA'da oluşan delikleri birleştirir (Bertero ve ark, 2017).

**Rekombinasyonel klonlamada**, bölgeye özgü DNA rekombinazları, rekombinasyon bölgeleri olarak bilinen uygun dizileri içeren iki molekül arasında DNA parçalarını değiş tokuş yapabilen enzimler kullanılır. Bu kategoride en yaygın olarak kullanılan sistem, bir DNA parçasını çeşitli rekombinasyon bölgelerinden değiştirmek için BP Klonaz ve LR Klonaz enzimlerinin kullanıldığı Gateway Klonlama Sistemi'dir. İlk olarak uygun rekombinasyon bölgeleri klonlanacak fragmentin her iki ucuna modifiye primerlerin kullanıldığı PCR yardımı ile yerleştirilir. Ardından, giriş klonu oluşturmak için donör vektör ile birleştirilir. Bu giriş klonu, asıl amaçlanan yapıyı oluşturmak için bir hedef vektörü ile tekrar birleştirilir. Gateway klonlamayı kolaylaştırmak amacı ile ticari olarak geniş bir giriş vektör koleksiyonu bulunmaktadır (Bertero ve ark, 2017).



**Şekil 7.** Geleneksel klonlama, TA klonlama, ligasyondan bağımsız klonlama, dikişsiz klonlama ve rekombinasyonel klonlama yöntemlerine genel bakış. Klonlama yaklaşımlarının şematik örnekleri (Bertero ve ark, 2017).

#### 2.4.1. TA Vektör Üretimi

TA vektörü ticari olarak temin edilebilmektedir ancak temin edilen vektörler tek kullanımlık olup masraflıdır. Taq polimeraz, terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) ve XcmI enzimleri ile laboratuvarında kolay ve az maliyetle üretilebilmektedir. Taq polimeraz enzimi ortamda yalnızca dTTP bulunması durumunda lineer ve küt uçlu vektörün 3' ucuna

yüksek oranda dTTP eklemektedir (Marchuk ve ark, 1991). Taq polimeraz enzimi ile TA vektör üretme başarısının linearizasyonda kullanılan restriksiyon enziminin DNA'nın 3' uçlarında bulunan nükleotide bağlı olduğu öne sürülmektedir (Hu, 1993). TdT enzimi, ddTTP ile reaksiyon kurulduğunda lineer ve küt uçlu vektörün 3' ucuna bir tane ddTTP eklemektedir ve bu yolla TA vektörü oluşturmaktadır (Zhou ve Gomez-Sanchez, 2000). Tanıdığı nükleotid sekansını asimetrik kesen ve bir bazlık kuyruk oluşturan XcmI restriksiyon enzimi ise kesimin gerçekleşeceği yerin antisense ipliğine timin nükleotidi gelecek şekilde vektörün çoklu klonlama bölgesinde 2 noktaya yerleştirilir. Bu sayede, XcmI enzimi ile kesim gerçekleştirildiğinde TA vektörü oluşur (Arashi-Heese ve ark., 1999).

#### **2.4.2. DNA Fragmentasyon Yöntemleri**

DNA fragmentasyonu fiziksel, enzimatik ve kimyasal yollarla gerçekleştirilebilmektedir.

##### **2.4.2.1. Fiziksel yolla DNA fragmentasyonu**

Fiziksel fragmentasyonda ultrasonikatör tercih edilmektedir. Sonikasyon kütüphane oluşturulması ve alt klonlamada (subcloning) yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA örnekleri kısa süreli ses dalgaları sebebiyle hidrodinamik parçalanmaya uğrarlar. Bu parçalanma rastgele gerçekleşir ve sonikasyonun süresi ve periyotların sıklığı ile fragmentlerin boyutu düzenlenebilmektedir. Oluşan fragmentler genellikle DNA'nın 3' veya 5' uçlarında uzantılar bulundurlar. Bu fragmanlar T4 DNA polimeraz enzimi ile kütleştirilir ve küt uçlu klonlama gerçekleştirilir. Sonikasyon ile DNA fragmentasyonunun DNA'nın A-T nükleotidleriyle zengin bölgelerde kırılmaya sebep olmaktadır. Bu da, fragmentasyonun tam olarak rasgele gerçekleşmeyeceğini, belirli bölgelerden kırılarak gerçekleşeceğini göstermektedir (Deininger, 1983).

#### **2.4.2.2. Enzimatik yollarla DNA fragmentasyonu**

Daha önce bahsedildiği üzere bu yöntemde restriksiyon endonükleazlar sıklıkla kullanılırlar. Seçilecek restriksiyon enzimleri küt veya yapışkan uç oluşturan enzimlerden amaca uygun olarak, hedeflenen DNA'nın boyutuna göre seçilir. Fragmentasyonda kullanılan restriksiyon enzimi ile vektöre klonlama yapılır (Bozdoğan ve ark, 2003; Brown ve ark, 2010). Ayrıca, DNAz I enzimi de mangan iyonu varlığında DNA'da çift iplikte kesik oluşturmakta ve fragmentasyonda kullanılmaktadır. DNAz I enziminin DNA'yı rasgele kestiği bilinmektedir (Anderson, 1981). Bunlara ek olarak, ticari enzimatik kitlerde fragmentasyonda kullanılmaktadır. Bunlardan biri olan, NEBNext™ dsDNA Fragmentase enzim karışımı DNA'yı rasgele fragmente etmektedir. Enzimlerden biri DNA ipliklerinden birinde rasgele kesik oluştururken diğeri kesik bulduğu noktayı tanıyarak karşı iplikte görece yakın bir noktada kesim gerçekleştirir. Genellikle DNA'nın 3' veya 5' uçlarında kısa uzantılar oluşur. Hedeflenen fragment boyutuna göre inkübasyon süresi değiştirilerek kullanılmaktadır (Dunham ve Friesen, 2013).

#### **2.4.2.3. Kimyasal yolla fragmentasyon**

Demir-EDTA kompleksi gibi kimyasallarla DNA fragmentasyonu gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntemin avantajları birbirine yakın boyutlarda fragmentler oluşturulabilmesi, herhangi bir ekipmana ihtiyaç duyulmadan reaksiyonun oda sıcaklığında gerçekleştirilebilmesi ve örnek hacmi veya DNA miktarında bir kısıtlama olmamasıdır (Gyarmati ve ark, 2013).

## **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

### **3.1. Gereç**

#### **3.1.1. Cihazlar**

##### **3.1.1.1. Thermal cyclers**

Çalışma boyunca PCR reaksiyonları LONGGENE A300 thermal cyclers kullanılarak gerçekleştirildi.

##### **3.1.1.2. Thermo shaker**

İnkübasyonların bir kısmı MSC-100 Thermo Shaker Incubator kullanılarak gerçekleştirildi.

##### **3.1.1.3. Otoklav**

Sterilizasyon aşamalarında Hirayama HV-50L (Japonya) kullanıldı.

##### **3.1.1.4. Santrifüj**

Santrifüj aşamalarında Hettich Microlitre centrifuge MIKRO 200 (Almanya) kullanıldı.

##### **3.1.1.5. Etüv**

Bakterilerin kültürlenmesi aşamalarında Memmert Incubator Oven INB200 kullanıldı.



### **3.1.2. Bakteri Suşları**

#### **3.1.2.1. *Esheria coli* DH10B suşu**

Kompetan hücre özelliğine sahip olan *E. coli* DH10B suşu stok kültürden 37 °C’de TSA besiyerinde gecelik inkübasyonla kültürlendi. Bu suşun sıvı besiyerinde kültürlenmesi TSB ile gerçekleştirildi. Bu kültür klonlama çalışmalarında kullanıldı.

#### **3.1.2.2. Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ADU1 suşu**

Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ADU1 suşu REDPROM laboratuvarı suş koleksiyonundan temin edildi. Stoktan BHA besiyerine ekim yapılmış ve 37 °C’de gece boyu inkübe edildi. Bu suşun sıvı besiyerinde kültürlenmesi BHB ile gerçekleştirildi. Suşun gentamisin direncine sahip olduğu bilinmektedir. Oluşturulan pRTA vektörüne yerleştirilen prom-RBS sekansının işlevselliğinin doğrulanmasında kullanıldı.

#### **3.1.2.3. Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ADU2 suşu**

Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ADU2 suşu REDPROM laboratuvarı suş koleksiyonundan temin edildi. Stoktan BHA besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C’de gece boyu inkübe edildi. Bu suşun sıvı besiyerinde kültürlenmesi BHB ile gerçekleştirildi. Suşun eritromisin direncine sahip olduğu bilinmektedir. Geliştirilen yöntemin doğrulanmasında bu suş kullanıldı.

### **3.1.3. Kullanılan Plazmidler**

#### **3.1.3.1. pUC19 plazmidi**

pUC19 (<https://www.addgene.org/50005/>) bir klonlama vektörüdür. Hücre içi kopya sayıları yaklaşık 500-700’dür. Çoklu klonlama bölgesi (MCS)’nin akış yukarısında *lac* promotörü bulunur. Bu çalışmada pRTA vektörünün omurgasının oluşturulmasında kullanıldı.

### **3.1.4. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler**

#### **3.1.4.1. Tripton soya agarı**

Besiyeri hazırlanırken 11.1 g tripton soya agar (Merck, Almanya) 300 mL distile suda çözüldü. Otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edilen besiyeri steril petrilere döküldü. Bakterilerin aktifleştirilmesinde ve klonlama çalışmalarında kullanıldı.

#### **3.1.4.2. Tripton soya broth**

Besiyeri hazırlanırken 7.2 g tripton soya broth (Merck, Almanya) 300 mL distile suda çözüldü. Otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edilen besiyeri steril tüplere döküldü. Çalışmada kompetan hücreleri hazırlamada kullanıldı.

#### **3.1.4.3. AXI besiyeri**

Önceden hazırlanmış TSA besiyeri 50 °C’ye kadar soğutuldu. Besiyeri içerisine, final konsantrasyonu ampisilin (100 µg/mL), IPTG (1 mM)( Thermo Scientific, ABD), X-Gal (50 µg/ml)(Thermo Scientific, ABD) olacak şekilde ampisilin, IPTG ve X-Gal eklendi. İyice karıştırılarak steril petrilere döküldü. Mavi-beyaz koloniler için seçici besiyeri olarak kullanıldı.

#### **3.1.4.4. Brain heart (Infusion) agar**

Besiyeri hazırlanırken 4,7 g brain heart (Infusion) agar (OXOID, ABD) 100 mL distile suda çözüldü. Otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edilen besiyeri steril tüplere döküldü. Çalışmada MRSA suşlarını kültürlemede kullanıldı.

### **3.1.4.5. Brain heart (Infusion) broth**

Besiyeri hazırlanırken 3.7 g 2.1.1.1. brain heart (Infusion) broth (OXOID, ABD) 100 mL distile suda çözüldü. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilen besiyeri steril tüplere döküldü. Çalışmada MRSA suşlarını kültürlemede kullanıldı.

### **3.1.4.6. Skim milk powder**

Skim milk powder (OXOID, ABD) distile su içerisinde %10'luk bir karışım hazırlandı. Hazırlanan çözelti taze süt ile eşdeğerdir ve çözelti 110°C'de 5 dakika süreyle otoklavlama yoluyla sterilizasyon gerçekleştirildi.

### **3.1.4.7. Agaroz jel elektroforezi**

Agaroz jeli hazırlanmasında, Tris (BioShop, Kanada, 45 mM), Borik asit(BioShop, Kanada, 45 mM), EDTA (Merck, Almanya, 1 mM) solüsyonu (0.5x TBE) içerisine gerekli yüzdeye göre agaroz(GeneDirex, Amerika) tartılıp eklendi ve mikrodalgada ısıtıldı. Agaroz solüsyon içinde tamamen çözüldükten sonra yaklaşık 50 °C'ye kadar soğutularak içine SafeView eklenip jel kasetine döküldü. Katılaştıran jel içinde 0.5x TBE olan elektroforez tankına koyuldu. Yüklenen ampikonlar 100 volt, 100 mA akımda 30 dakika yürütüldü.

## **3.1.5. Çalışmada Kullanılan Enzimler**

### **3.1.5.1. Taq polimeraz**

100 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 500 mM KCl, 0.8% (v/v) Nonidet P40, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM deoksinükleotid trifosfat (dNTP) set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Taq DNA Polymerase, 5 U/μL (Thermo Scientific™) kullanıldı.

### **3.1.5.2. Restriksiyon enzimleri**

FastDigest HindIII, FastDigest EcoRI ve FastDigest XhoI (Thermo Scientific™) enzimleri FastDigest buffer ile kullanıldı.

### **3.1.5.3. Modifikasyon enzimleri**

T4 DNA Polymerase, 5 U/μL(Thermo Scientific™) enzimi 5X reaksiyon tamponu (335 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25 °C), 33 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 84 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ile kullanıldı.

T4 Polynucleotide Kinase (T4 PNK), 10 U/μL (Thermo Scientific™) enzimi 10X reaksiyon tamponu A (500 mM Tris-HCl (pH 7.6 at 25 °C), 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT, 1 mM spermidine) ve 10 Mm ATP (Adenozin trifosfat) ile kullanıldı.

### **3.1.5.4. Fragmantasyon enzimi**

NEBNext® dsDNA Fragmentase® enzimi 10X NEBNext dsDNA Fragmentase Reaction Buffer ile kullanıldı.

### **3.1.6. Çalışmada Kullanılan Programlar**

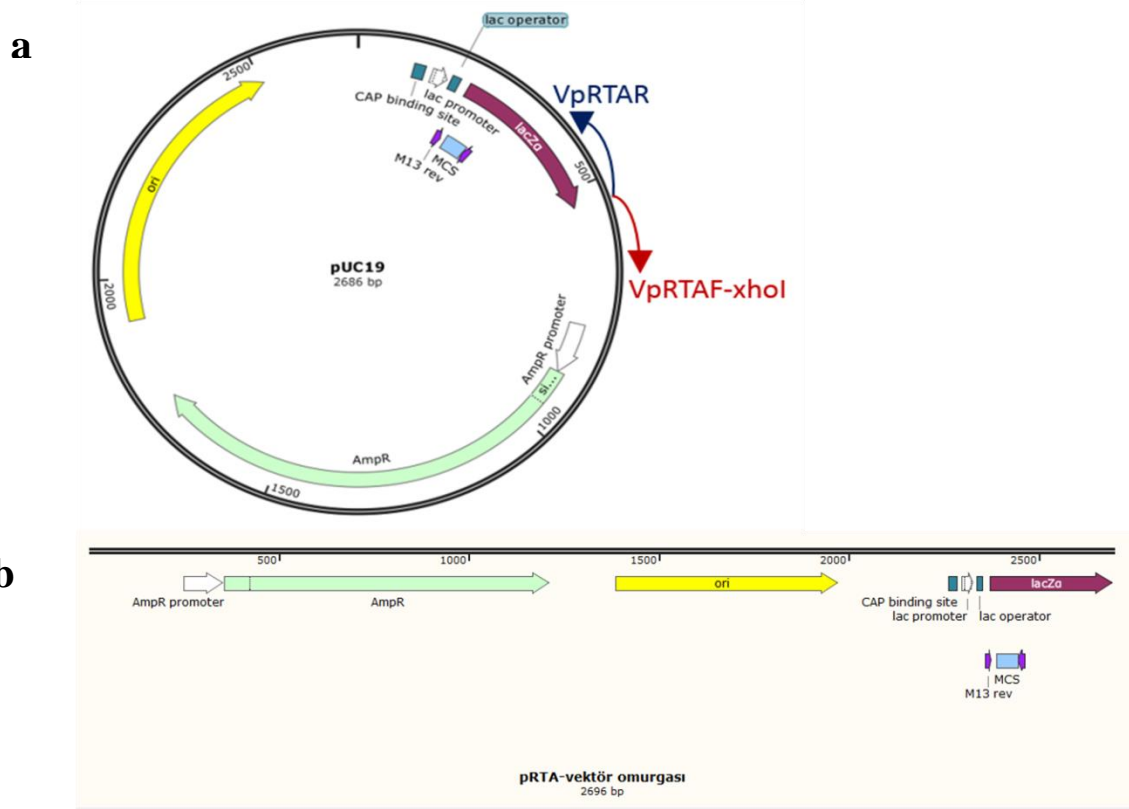
Vektör konstrüksiyonlarının oluşturulmasında Snapgene programı kullanılmıştır.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. pRTA Vektörünün Oluşturulması

#### 3.2.1.1. pRTA vektörünün oluşturulmasında kullanılacak olan vektörün omurgasının eldesi

pRTA vektörünün konstrüksiyonu geleneksel restriksiyon yöntemleriyle vektör dizaynından farklıdır. Oluşturulacak vektör omurgası PCR yoluyla elde edildi (Salih ve ark., 2020). Omurganın oluşturulmasında pUC19 vektöründen faydalanıldı. pUC19 vektörünün izolasyonu Presto™ Mini Plasmid Kiti ile üreticinin talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Vektör omurgasının oluşturulması için pUC19 vektörü *lacZ* geni bitiminden itibaren bu çalışmada tasarlanmış olan VpRTAF-XhoI & VpRTAR primer çifti (Tablo 1) kullanılarak çoğaltıldı. VpRTAF-XhoI primerinin 5' ucuna XhoI kesim bölgesi eklenerek tasarlandı. PCR Tablo 2'de verilen içerik ve konsantrasyonlarda ve Tablo 3'de verilen koşullarda gerçekleştirildi. PCR ürünleri 1%'lik agaroz jelde yürütüldü ve GenepHlow™ PCR Cleanup Kiti ile saflaştırıldı. Primerlerin pUC19 vektöründeki lokasyonları Şekil 8a'da ve oluşan omurga Şekil 8b'de gösterildi.



**Şekil 8.** pRTA vektör omurgası oluşturmak için kullanılan primerlerin ismi, lokasyonları ve oluşan amplikon. 8a'da primerlerin ismi ve lokasyonları, 8b'de bu primerlerle kurulan PCR'dan elde edilen amplikon gösterilmektedir.

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan primerler ve sekansları

Primer Adı	Sekansı	Referans
VpRTAF-xhoI	5'-TGACCTCGAGTAAGCCAGCCCCGACACC-3'	Bu çalışma
VpRTAR	5'-ACTATGCGGCATCAGAGCAG-3'	Bu çalışma
Sense iplik	5'-AGCTGTACCTCCTTAGCTAGCATTATATATATA TATATATATATTGTCAACTCGAG-3'	Bu çalışma
Antisense iplik	5'CTCGAGTTGACAATATATATATATATATATATAATGC TAGCTAAGGAGGTACAGCT-3'	Bu çalışma
AACAPHFE	5'-ATGCGAATTCATGAATATAGTTGAAAATG-3'	Bu çalışma
AACAPHRH	5'GTACAAGCTTTCAATCTTTATAAGTCCTTT-3'	Bu çalışma
ampPR	5'-GAATACTCATACTCTTCCTTTTTC-3'	Bu çalışma
pRTA-F	5'-GGTACCGAGCTCGAATTCAC-3'	Bu çalışma
pRTA-R	5'-GGATCCTCTAGAGTCGACCT-3'	Bu çalışma
M13F	5'-GTA AACGACGGCCAGT-3'	Vieira ve ark.
M13R	5'-GAGCGGATAACAATTCACACAGG-3'	Vieira ve ark.

**Tablo 2.** PCR işlemine ait reaksiyon bileşenleri ve mastermixin hazırlanma oranları

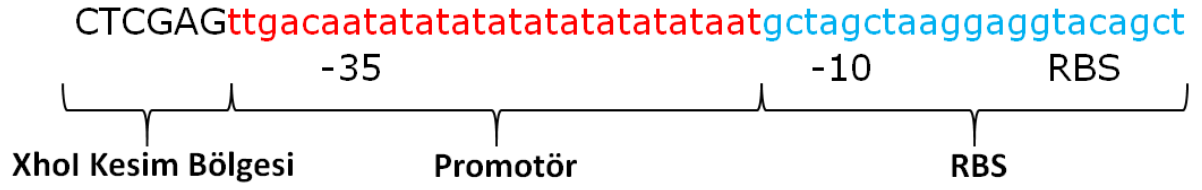
Malzeme (Konsantrasyon)	İstenen Son Konsantrasyon	1 örnek için (µl)
Deionize steril su		41,3 µl
Buffer with MgCl <sub>2</sub> (10X)	1 X	5
dNTP (10 mM)	0,2 mM	1
Primer-F (100 pmol)	0,4 pmol	0,2
Primer-R (100 pmol)	0,4 pmol	0,2
Taq Polimeraz (5 U)	0,3 µl/ 50 µl	0,3
DNA		2
TOPLAM		50

**Tablo 3.** Çalışmadaki PCR işlemlerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

PCR Döngüsü	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü
İlk denatürasyon	94	4	1
Denatürasyon	94	0,5	
Bağlanma	55	0,5	35
Uzama	72	1,5	
Son uzama	72	6	1

### 3.2.1.2. pRTA vektörünün promotör-ribozomal bağlanma sekansının dizaynı ve eldesi

pUC19 vektöründe insert için yalnızca *lacZ* yönünde promotör mevcuttur. İntert ters oryantasyonda olduğunda ekspresyon gerçekleşmemektedir. Her iki yönde de insertin ekspresyonunu sağlamak için hem sense hem de anti-sense yönünde promotör olması düşünüldü ve bu amaçla anti-sense yöne de promotör ve RBS eklenmesine karar verildi. Bu amaçla alternatif promotör ve ribozomal bağlanma sekansı (prom-RBS) <http://parts.igem.org> adresinden faydalanılarak tasarlandı ( Tablo 1, Şekil 9). Dizayn edilen promotör konstitütif bir *E. coli* promotörüdür. Dizayn edilen sekansın oryantasyonunu belirlemek amacıyla promotör sekansı öncesine XhoI kesim bölgesi eklendi. Belirlenen 56 baz çiftlik sekansın sense ve anti-sense iplikleri oligonükleotid olarak sentezletirildi ve bu sekanslar Tablo 1’de verildi. Her bir oligonükleotid finalde 10 pmol olacak şekilde dilüsyon gerçekleştirildi. Seyreltilmiş oligolardan 10’ar µl bir tüp içerisine alınarak 94°C’de 5 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası oda sıcaklığında soğumaya bırakılan 20 µl’lik örnekten 5 µl alınarak 2%’lik agaroz jelde yürütüldü.



**Şekil 9.** Dizayn edilen promotör ve RBS sekansı

### 3.2.1.3. pRTA-omurga ve prom-RBS çift iplikli oligonükleotidinin restriksiyon enzimi ile kesimi

PCR yöntemiyle çoğaltılan pRTA omurgası ve sentezletirilen promotör-RBS çift iplikli oligonükleotidi ayrı tüplerde restriksiyona tabi tutuldu. Bu amaçla 10 µl DNA, 7 µl distile su, 2 µl 10X FastDigest tamponu ve 1 µl FastDigest XhoI enzimi kullanılarak reaksiyon kuruldu ve 37°C’de 30 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir örnekten 5’er µl alınarak agaroz jelde görüntüleme yapıldı. Kalan 15 µl ürüne 85 µl distile su eklenerek 100 µl’ye tamamlandı ve üzerine 1:1 hacimsel oranı sağlayacak şekilde 100 µl Fenol-Kloroform-İzoamilalkol (25:24:1) eklendi. Sonrasında hafifçe vortekslenerek ve 13000 rpm’de 5 dakika +4°C’de santrifüjlendi. Üst fazlar yeni bir ependorfa alınarak birleştirildi ve 10:1 hacimsel oranı sağlayacak şekilde 20 µl 3 M Sodyum Asetat (pH:5.2) eklenip karıştırıldıktan sonra 1:1 hacimsel oranı sağlayacak şekilde 200 µl %100’lük isopropanol eklenerek karıştırıldıktan sonra -20 °C’de 30 dakika bekletildi. İnkübasyondan sonra 30 dakika boyunca 15 000 rpm’de +4 °C’de santrifüjlendi. Supernatant atılarak pellet üzerine 400 µl %70’lik etanol eklendi ve 5 dakika 15 000 rpm’de +4 °C’de santrifüjlendi. Supernatant atılıp pellet kurutulduktan sonra 17 µl distile su ile çözüldü.

### 3.2.1.4. Saflaştırılmış restriksiyon ürünlerinin ligasyonu

Ligasyon reaksiyonu için 17 µl restriksiyon ürünlerinin üzerine 2 µl 10X T4 DNA ligaz tamponu ve 1 µl T4 DNA Ligaz (5 U/µL) eklendi ve gece boyu 22°C’de inkübe edildi. Ertesi gün, T4 DNA ligazın inaktivasyonu için ligand 65°C’de 10 dakika inkübe edildi.



### 3.2.1.5. Ligandın *E. coli* DH10B suşuna transformasyonu, pRTA vektörünün oluşumunun doğrulanması

Öncelikle, *E. coli* DH10B suşu kompetan hale getirildi. Bunun için Sambrook'un CaCl<sub>2</sub>'lü kimyasal transformasyon yöntemi kullanıldı (Sambrook ve ark, 2001). DH10B suşunun TSA'ya ekimi gerçekleştirildi ve 37°C'de gecelik inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, TSA'da büyüyen bakterilerden tek koloni alındı ve 10 ml TSB besiyerine ekilerek gecelik inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, 10 ml besiyeri içerisinde 1 ml alınarak 50 ml TSB besiyerine ekimi gerçekleştirildi. Hücrelerin logaritmik büyüme (log) fazına ulaşması için yaklaşık 3 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi. Log fazına ulaşmış DH10B kültürü 25 dakika boyunca buzda bekletildi ve bu süre sonunda 5000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüjlendi. Supernatant atıldı ve 10 ml su ile resüspansiyon yapıldı. Tekrar su ile yıkama gerçekleştirildikten sonra, elde edilen pellet 10 ml 10%'luk gliserollü su ile resüspansiyon yapıldı ve 5000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüjlendi. Supernatant atıldı ve 30 ml 80 mM MgCl<sub>2</sub>-20 mM CaCl<sub>2</sub> solüsyonu ile resüspansiyon yapıldı. Sonrasında, 5000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüjlendi. Pellet 1 ml 0.1 M'lık CaCl<sub>2</sub> çözeltisinde resüspansiyon yapıldı ve 100'er µl olacak şekilde eppendorflara dağıtıldı. 100 µl kompetan hücre üzerine 10 µl ligand eklendi ve karıştırıldı. Kompetan hücre-ligand karışımı 20 dakika boyunca buzda bekletildi. Sonrasında, 1 dakika boyunca 42 °C'de tutuldu ve sonrasında hemen buza alınıp 2 dakika boyunca buzda bekletildi. 1000 µl sıvı besiyeri eklenip 37 °C'de 240 rpm'de çalkalanarak bir saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, kültürden 200 µl alınarak 100 µg/ml ampisilin, 1 mM izopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit (IPTG) ve 50 µg/ml 5-bromo-4-kloro-3-indolil--D-galaktosidaz (X-gal) olan TSA besiyerine ekim yapıldı. Gece boyu 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, büyüyen mavi kolonilerden rastgele 16 koloni seçildi. Seçilen kolonilere Tablo 1'de verilen ampPR&M13R primer çifti ile koloni PCR kuruldu. Prom-RBS sekansının yerleştiğini gözlemek amacıyla aynı primer çifti kullanılarak pUC19 plazmidini de PCR kuruldu ve ampikonlar 2%'lik agaroz jelde yürütüldü. Prom-RBS sekansının yerleşmesi durumunda pRTA vektöründen elde edilen ampikonun pUC19 vektöründen elde edilen ampikondan 56 bp daha büyük olması beklenmekteydi. Bu koşulu sağlayan 2 ampikonun çoğaltıldığı plazmidler pRTA vektör adayı olarak belirlendi ve sonraki adımda kullanıldı.

PCR yöntemi ile belirlenen aday pRTA vektörlerini içeren kolonilerden ve pUC19 vektörünü içeren *E. coli* DH10B'den sıvı besiyerine ekim yapıldı ve plazmid izolasyonu gerçekleştirildi. pRTA vektörünün hem XhoI hem HindIII enzim kesim bölgelerini içermesi

ve kesilmesi ile 363 bp ve 2380 bp'lik bant oluşturması gerekmektedir. pUC19 vektörünün ise HindIII enzim kesim bölgesi taşıyıp XhoI enzim kesim bölgesi taşıyamaması sebebiyle 2686 bp'lik bant oluşturması gerekmektedir. pRTA ve pUC19 plazmidleri XhoI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve 2%'lik agaroz jelde yürütülmüştür. pRTA vektörünün doğrulanması ikili kesimden sonra 363 bp ve 2380 bp olmak üzere 2 bant oluşturmasıyla olur.

### 3.2.1.6. pRTA vektöründe bulunan prom-RBS sekansının etkinliğinin test edilmesi

Gentamisin direnç geni bulunduran MRSA *S. aureus* ADU1 suşu 10 µg/ml gentamisin içeren BHA besiyerine ekilmiş ve gecelik inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, birkaç koloni pipet ucu ile alınarak 1 ml saf su içerisinde homojenize edildi. Ardından, örnek 13000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi. Supernatantın uzaklaştırılması sonrası, pellet 100 µl EasyDNA (RTech şirketi, Türkiye) solüsyonu içerisinde çözüldü. Homojenize edilmiş örnek 56°C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi ve süre bitiminden sonra vortekslendi. Sonrasında, 100°C'de 8 dakikalık inkübasyon sonrası oda sıcaklığına getirildikten sonra vortekslendi ve 13000 rpm'de 3 dakika santrifüjlenerek PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere hazır hale getirildi.

Gentamisin direnç geni *aac(6')-aph(2')*'ı çoğaltmak için tasarlanan primer sekansları genbankasından AP003367.1'deki gen sekansına uygun olarak belirlendi. Bu aşamada Tablo 1'de verilen AACAPHFE&AACAPHRH primer çifti kullanılarak Tablo 2 ve 3'teki koşullarda PCR geręekleřtirildi. Primer çiftine, pUC19'daki *lac* promotörüne göre ters oryantasyonun ve bu çalışmada dizayn edilen promotöre göre doğru oryantasyonun sağlanacağı enzim kesim bölgeleri eklendi. Bunlar forward primerde EcoRI enzim sekansı ve revers primerde HindIII enzim sekansı olacak şekilde tasarlandı. AACAPHFE forward primeri genin ATG kodonundan başlayacak şekilde dizayn edilip akış yukarıda bulunan promotör ve RBS sekansı çoğaltılmadı.

Aday pRTA vektörlerinin ve pUC19 vektörünün izolasyonu 3.2.1.1.'deki yöntemle geręekleřtirildi. Aday pRTA vektörleri, pUC19 vektörü ve *aac(6')-aph(2')* fragmanı için çift enzimle ayrı ayrı restriksiyon kuruldu. Reaksiyon için 10 µl DNA, 6 µl moleküler su, 2 µl FastDigest tamponu, 1 µl FastDigest HindIII ve 1 µl FastDigest EcoRI enzimi kullanıldı. Reaksiyon 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir örnekten 5'er µl alınarak agaroz jelde görüntüleme yapıldı. Kalan ürünler için 3.2.1.3.'teki Fenol-Kloroform-İzoamilalkol (25:24:1) yöntemi ile saflaştırma geręekleřtirildi. Saflaştırmanın

ardından, 3.2.1.4.'teki yöntemle ligasyon gerçekleştirildi ve 3.2.1.5.teki yöntemle ligandın *E. coli* DH10B suşuna transformasyonu gerçekleştirildi. Aday pRTA vektörlerinin içeren transformantlar 100 µg/ml ampisilin, 10 µg/ml gentamisin, 1 mM IPTG ve 50 µg/ml X-gal içeren TSA besiyerine ekildi ve gecelik inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, çoğalan kolonilere gentamisin direnç geni için dizayn edilen primerlerle koloni PCR gerçekleştirildi ve amplikonlar 1%'lik agaroz jelde yürütüldü. pUC19 vektörünü içeren transformantlar ise 100 µg/ml ampisilin, 1 mM IPTG ve 50 µg/ml X-gal içeren TSA besiyerine ekilmiştir ve gecelik inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, çoğalan 8 koloniye gentamisin direnç geni için dizayn edilen primerlerle koloni PCR yapıldı ve amplikonlar 1%'lik agaroz jelde yürütüldü.

### **3.2.1.7. pRTA vektöründe prom-RBS varlığının sekans analizi ile doğrulanması**

3.2.1.6'da elde edilen pRTA vektörüne yerleştirilmiş Prom-RBS'nin işlevselliğinin doğrulanmış olduğu kolonilere Tablo 1'de verilen ampPR&M13R primer çifti ile koloni PCR yapıldı. Prom-RBS sekansını içeren amplikon sekanslatıldı ve BLAST uygulamasında yerleştirilmesi hedeflenen prom-RBS sekansı ile karşılaştırıldı.

## **3.2.2. Modifiye TA Yöntemi ile pRTA Vektörüne Antibiyotik Direnç Geni Klonlanması**

### **3.2.2.1. Eritromisin direncine sahip *S. aureus* ADU2 suşundan DNA izolasyonu**

Çalışmada kullanılan MRSA ADU2 suşunun fenotipik olarak eritromisin direncine sahip olduğu bilinmektedir. 200 µg/ml eritromisin içeren TSA besiyerine ADU2 suşunun ekimi yapıldı ve gecelik inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün antibiyotikli 10 ml besiyerine tek koloni ekim yapıp gecelik inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, Bakteri genomik DNA izolasyon kiti (Genemark) üretici firmanın direktifleri doğrultusunda kullanılarak genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Gecelik bakteri kültürü (10 ml) 5000 rpm hızda 2 dakika boyunca santrifüj edildi ve supernatant uzaklaştırıldı. Pellet -80°C'de 5 dakika boyunca bekletildikten sonra 37°C'de 2 dakika bekletildi. Ardından, pellet 180 µl lizozim+lizostafin solüsyonu içerisinde çözüldü ve 30 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi. Sonrasında, 200 µl ekstraksiyon solüsyonu eklendi. Proteinaz K solüsyonundan 20 µl eklendikten sonra vortekslendi ve 56°C'de 1 saat inkübe edildi. Örnek 13000 rpm'de 5 dakika boyunca

santrifüjlendi. Supernatant yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 4 µl RNAz eklenip oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Ardından, 200 µl bağlanma solüsyonu eklendi ve karıştırıldı. Örnek 70°C’de 10 dakika boyunca inkübe edildi. Üzerine 200 µl etanol eklendi ve karıştırıldıktan sonra kolona aktarıldı. Sonra, 13000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüj yapıldıktan sonra filtrat uzaklaştırıldı ve kolona 300 µl bağlanma solüsyonu eklenerek tekrar 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj gerçekleştirildi. Filtrat uzaklaştırıldıktan sonra 700 µl yıkama solüsyonu eklendi ve santrifüj işlemi tekrarlandı. Yıkama işlemi bir kez daha gerçekleştirildi. Filtrat uzaklaştırıldıktan sonra 13000 rpm’de 5 dakika santrifüj yapıldı. Kolon yeni bir tüpe alındı ve 100 µl moleküler su ile elüsyon gerçekleştirildi. Elde edilen genomik DNA 1%’lik agaroz jelde yürütüldü.

### **3.2.2.2. Genomik DNA’nın fragmentaz enzimi ile parçalanması**

DNA’yı spesifik olmayan bölgelerden keserek fragmente eden NEBNext® dsDNA Fragmentase enzimi farklı sürelerde DNA ile inkübe edilerek hedeflenen fragman boyut aralığını sağlayan süre belirlendi ve 4 dakika inkübasyonun istenilen boydaki fragmanları elde etmek için uygun olduğu saptandı. 10 µl genomik DNA, 2 µl 10X Fragmentase reaksiyon tamponu, 2 µl fragmentaz enzimi ve 6 µl moleküler su kullanılarak reaksiyon kuruldu ve 37°C’de 4 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 5 µl alınarak 1%’lik agaroz jelde yürütüldü. Kalan örnek derhal 3.2.1.3.’teki Fenol-Kloroform-İzoamilalkol (25:24:1) yöntemi ile saflaştırma gerçekleştirildi ve pellet 16 µl moleküler su ile çözüldü.

### **3.2.2.3. DNA fragmanlarının 5’ ve 3’ uçlarının kütleştirilmesi**

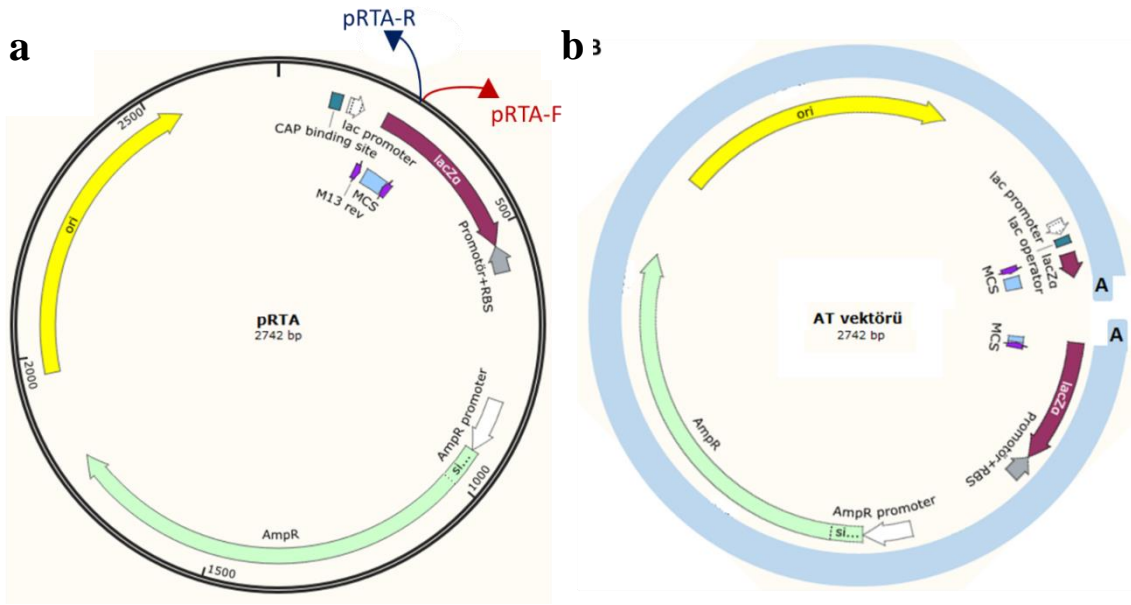
Fragmantasyon sonucunda oluşan fragmanların uçları küt, 3’ veya 5’ uzantılı olabilmektedir. DNA uçlarını kütleştirmek amacı ile T4 DNA polimeraz enzimi ile reaksiyon kuruldu. 16 µl DNA fragmanları üzerine 4 µl 5X reaksiyon tamponu, 1 µl 8 mM dNTP miksi ve 1 µl T4 DNA polimeraz enzimi (1 unite) eklenerek reaksiyon kuruldu ve 5 dakika boyunca 23°C’de inkübe edildi. Ardından, 3.2.1.3.’teki Fenol-Kloroform-İzoamilalkol (25:24:1) yöntemi ile saflaştırma gerçekleştirildi ve pellet 50 µl moleküler su ile çözüldü.

#### **3.2.2.4. DNA fragmanlarının 3' ucuna terminal deoksinükleotidil transferaz enzimi ile ddTTP eklenmesi**

52 µl uçları kütleştirilmiş DNA fragmanı alınmış ve üzerine 15 µl 5X reaksiyon tamponu, 4 µl 1 mM ddTTP ve 6 µl Terminal Deoksinükleotidil Transferaz (20 ünite/ µl) enzimi eklendi ve 37°C'de 2 saat inkübasyon ile gerçekleştirildi. Ardından, 3.2.1.3.'teki fenol-Kloroform-İzoamilalkol (25:24:1) yöntemi ile saflaştırma gerçekleştirildi ve pellet 10 µl moleküler su ile çözüldü.

#### **3.2.2.5. pRTA vektöründen PCR yolu ile AT vektörü oluşturulması**

Ticari olarak satılan TA vektörlerinde PCR sonucu elde edilen ampikonda uzantıların adenin olmasından yararlanılarak vektörlerde timin uzantısı oluşturulur. Bu çalışmada oluşturduğumuz vektörde ise vektör PCR ile elde edildiği için adenin uzantısı içermektedir. Bu nedenle, vektör TA vektörü değil AT vektörü olarak isimlendirildi. Tablo 1'de verilen pRTA-F & pRTA-R primer çifti T4 Polinükleotid Kinaz (Thermo Scientific™) ile T4 Polinükleotid Kinaz ile fosforlandı. Reaksiyon için 2 µl 10 pmol pRTA-F primeri, 2 µl 10 pmol pRTA-R primeri, 3 µl ATP, 3 µl 10X A reaksiyon tamponu, 1 T4 PNK enzimi ve 19 µl su karıştırıldı ve 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. Ardından, fenol-Kloroform-İzoamilalkol (25:24:1) yöntemi ile saflaştırma gerçekleştirildi ve pellet 10 µl moleküler su ile çözüldü. pRTA vektörünün tamamı bu primer çifti ile Taq polimeraz enzimi kullanılarak çoğaltıldı ve vektör olarak kullanıma hazır hale getirildi. pRTA vektöründen AT vektörü oluşturmak için kullanılan primerlerin lokasyonu Şekil 10a'da ve oluşan AT vektörü ise Şekil 10b'de gösterildi. Taq polimeraz enziminin kullanılması ile çoğaltılan vektör 3' ucunda tek adenin nükleotidini bulunduracak şekilde elde edildi. PCR ürünleri GenepHlow™ PCR Cleanup Kiti ile saflaştırıldı.



**Şekil 10.** AT vektörü oluşturulmakta kullanılan primerlerin pRTA vektörü üzerinde lokasyonu ve oluşan AT vektörü. a'da AT vektörünü oluşturmakta kullanılan forward ve revers primerlerin lokasyonu ve amplifikasyon yönü gösterilmektedir. b'de 3' ucunda tek adenin bazı bulunduran AT vektörü gösterilmektedir.

### 3.2.2.6. Eritromisin direnç geninin klonlanması

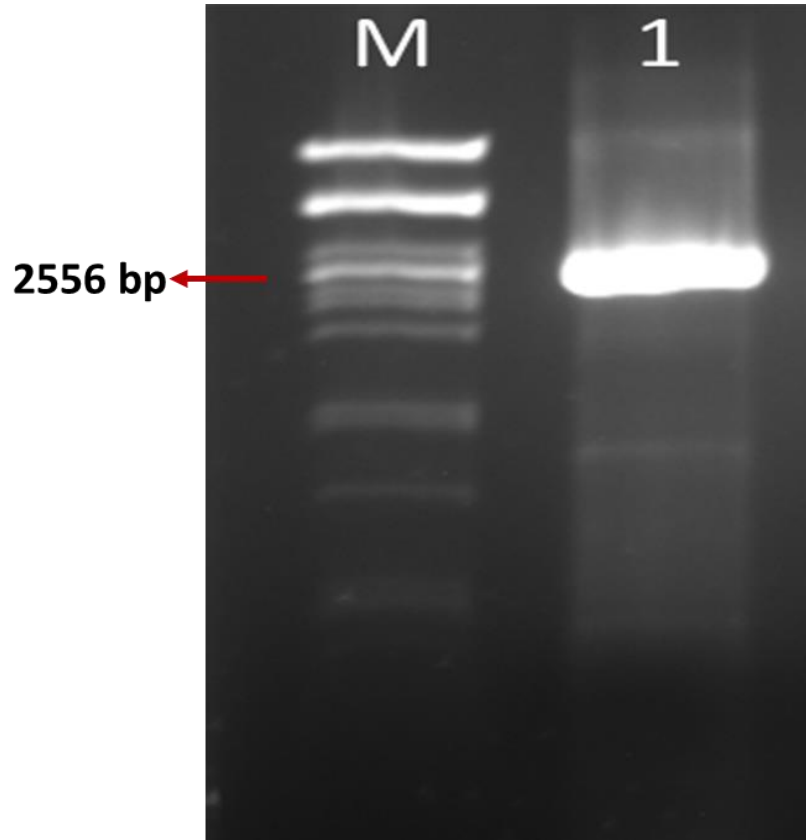
10 µl fragmanite genomik DNA, 7 µl AT vektörü, 2 µl 10X T4 DNA ligaz tamponu ve 1 µl T4 DNA Ligaz (5 U/µL) eklendi ve gece boyu 22°C'de inkübe edildi. Ertesi gün, T4 DNA ligazın inaktivasyonu için ligand 65°C'de 10 dakika inkübe edildi. Ligandın 3.2.1.6.'deki yöntemle *E. coli* DH10B suşuna transformasyonu gerçekleştirildi. Transformantların 100 µg/ml ampicilin, 200 µg/ml eritromisin, 1 mM IPTG ve 50 µg/ml X-gal içeren TSA besiyerlerine ekimi yapıldı. Ertesi gün çoğalan kolonilere M13F&M13R primer çifti ile koloni PCR yapıldı ve ürünler agaroz jelde yürütüldü. Bant elde edilen kolonilerden Presto™ Mini Plasmid Kiti ile plazmid izolasyonu gerçekleştirildi ve klonlanan DNA fragmanının boyutunu belirleme amacıyla EcoRI ve HindIII enzimleri kullanılarak 3.2.1.3.'deki yöntemle restriksiyon reaksiyonu gerçekleştirildi ve üründen 5 µl 1%'lik agaroz jelde yürütüldü. İnsert M13F&M13R primer çifti ile PCR yöntemiyle çoğaltıldı ve ampikonunun sekans analizi Medsantek firması (İstanbul) tarafından yapıldı. Sekans nucleotide-nucleotide BLAST programı analiz edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. pRTA Vektörünün Oluşturulması

#### 4.1.1. pRTA Vektörünün Oluşturulmasında Kullanılacak Olan Vektörün Omurgasının Eldesi

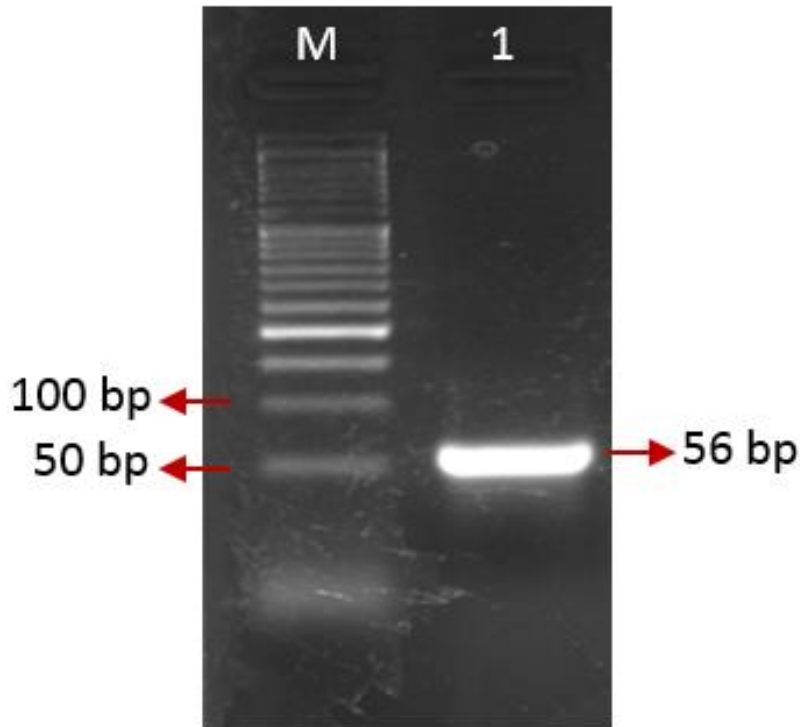
pUC19 vektörü kullanılarak dizayn edilen pRTA vektörü VpRTAF-xhoI & VpRTAR primer çifti ile invers PCR yoluyla *lacZ* bitiminden itibaren belirtilen koşullarda çoğaltıldı. Toplam 2686 bp amplikonun 1%'de agaroz jeldeki görüntüsü Resim 1'de lambda-PstI markeri eşliğinde gösterildi.



**Resim 1.** PCR ile çoğaltılan 2696 bazlık pRTA vektör omurgası. 1 numaralı kuyuda dizayn edilen spesifik primerlerle pUC19 vektöründen çoğaltılan pRTA vektör omurgası gösterilmiştir. pRTA vektör omurgası 2696 bp'lik bant oluşturmaktadır. M: Lambda-PstI marker, 1: pRTA vektör omurgası.

#### 4.1.2. pRTA Vektörünün Oluşturulmasında Kullanılacak Olan Promotör-Ribozomal Bağlanma Fragmanının Oluşturulması

<http://parts.igem.org> adresinden faydalanılarak dizayn edilen promotör-RBS sekansına uygun tek iplikli oligonükleotidler uygun koşullarda inkübe edildikten sonra 56 bp'lik promotör-RBS çift iplikli DNA elde edildi. Elde edilen fragman 100bp Opti-DNA Marker (abm, G016) ile birlikte 2% 'lik jelde yürütüldü ve 56 bp'lik bant görüntüledi (Resim 2).

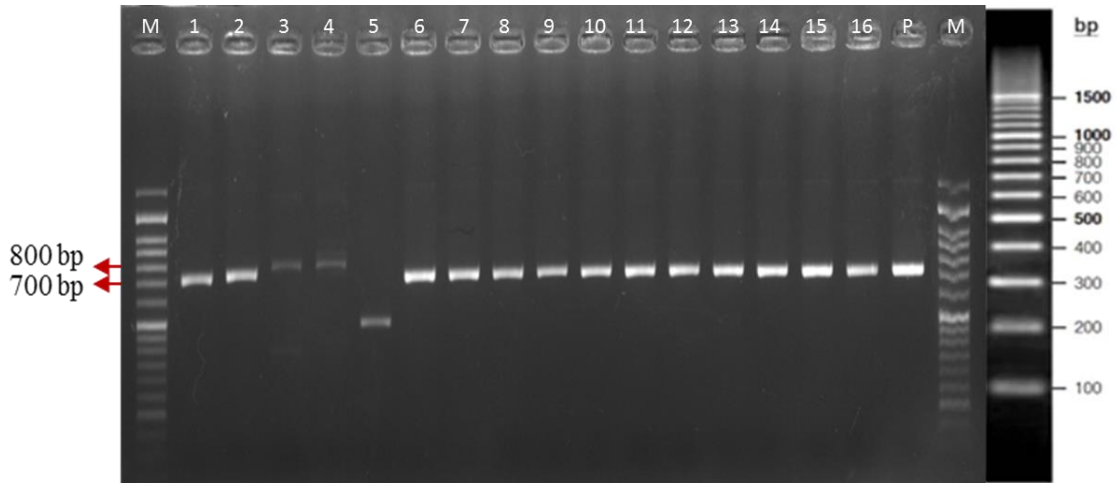


**Resim 2.** Prom-RBS sekansının çift iplikli DNA'sı. İnkübasyon yoluyla çift iplikli DNA haline getirilen prom-RBS fragmanı. Oligonükleotid olarak ayrı ayrı iplikler halinde sentezletirilen prom-RBS DNA dizisi 95°C'de birlikte inkübe edilmelerinin ardından olması gereken 56 bp'lik bant jelde gözlendi. M: 100bp Opti-DNA Marker, 1: Çift iplikli Prom-RBS DNA'sı.



### 4.1.3. pRTA Vektör Adaylarının Seçilmesi

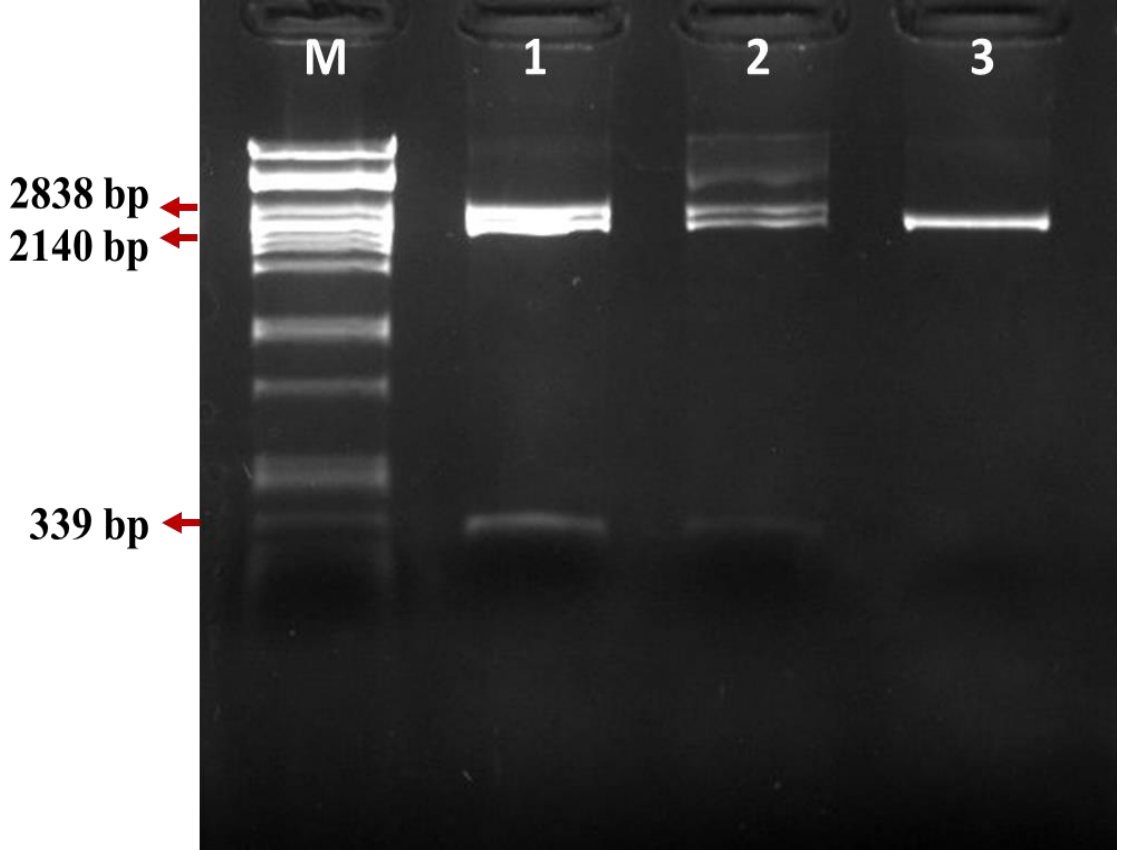
pRTA omurga amplikonu ve promotör-RBS çift iplikli DNA'sının restriksiyon ve ardından ligasyon reaksiyonu sonucunda elde edilen ligand *E. coli* DH10B suşuna transforme edildi ve seçici AXI besiyerine ekim yapıldı. Ertesi gün petride mavi kolonilerin oluşumu gözlemlendi. Oluşan mavi kolonilerden rasgele 16 koloni seçildi ve ampPR&M13R primer çifti ile belirtilen koşullarda koloni PCR kuruldu. Bu reaksiyonda kontrol olarak pUC19 vektörü kullanıldı. pRTA vektörünün oluşması durumunda amplikonun 767 bp'lik boyutta olması, pUC19'dan elde edilen amplikonun ise 711 bp'lik boyutta olması yani 2 amplikon arasında 56 bp'lik boyut farkı olması gerekmektedir. Resim 3'te 3 ve 4 numaralı amplikonların 767 bp'lik boyutta olduğu ve pUC19 amplikonunun 711 bp'lik boyutta olduğu ve aralarında yaklaşık 56 bp'lik fark olduğu jelde gösterildi. 3 ve 4 numaralı örneklerin ait olduğu koloniler aday pRTA vektörlerini içermektedir ve sonraki adımda bu vektörleri içeren suşlar kullanıldı.



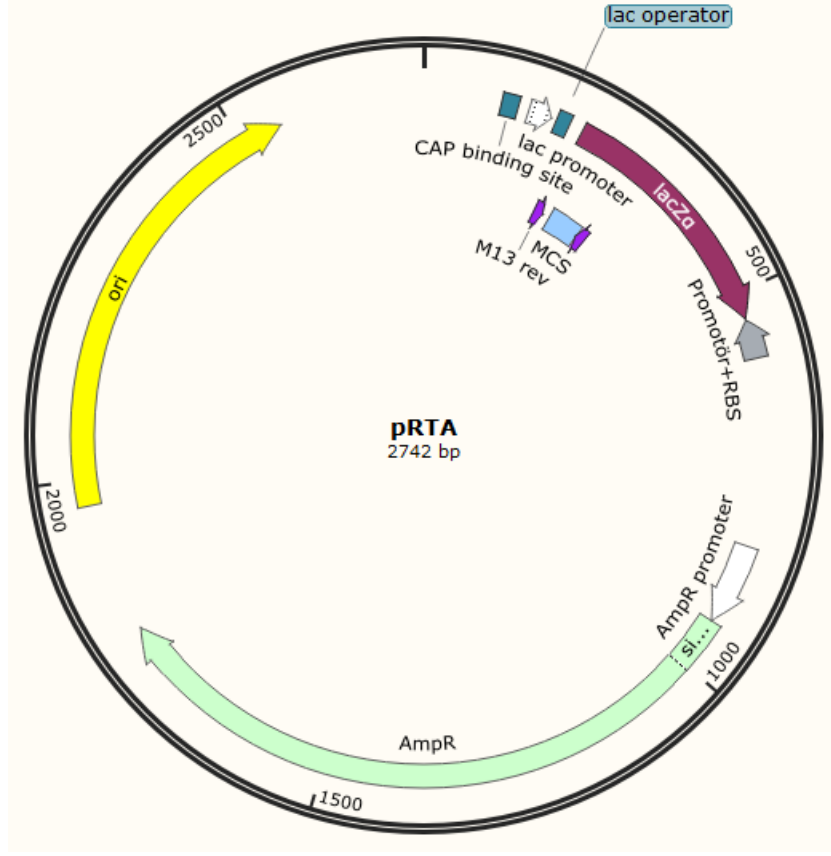
**Resim 3.** pRTA vektör adaylarının ve pUC19 vektörünün ampPR&M13R primer çifti ile kurulan PCR amplikonları. 3 ve 4. kuyucuktaki bantların beklenen 767 bp'lik boyutta ve pUC19 amplikonunun beklenen 711 bp'lik boyutta olduğu ve aralarında yaklaşık 56 bp'lik fark olduğu görülmektedir. M: GeneRuler™ 100bp Plus DNA Marker, P: pUC19 ampliconu, 1-16 aday pRTA amplikonları.

Aday vektörler ve pUC19 plazmidi izole edildikten sonra XhoI ve HindIII enzimleri ile kesildi ve restriksiyon ürünleri Resim 4'te gösterildi. Aday vektörlerin hem XhoI hem de HindIII kesim bölgesini içermesi sebebiyle restriksiyon sonucunda 362 bp'lik ve 2380 bp'lik 2 bant oluşmuştur. Bu restriksiyonlarda kısmi kesim gerçekleşmesi sebebiyle ayrıca 2742

bp'lik bant da oluşmuştur (Resim 4). pUC19 vektörü HindIII kesim bölgesini içerip XhoI kesim bölgesini içermemesi nedeniyle tek bir yerden kesilmiş ve 2686 bp'lik bant oluşturmuştur. pRTA vektörünün haritası Şekil 11'de gösterilmiştir.



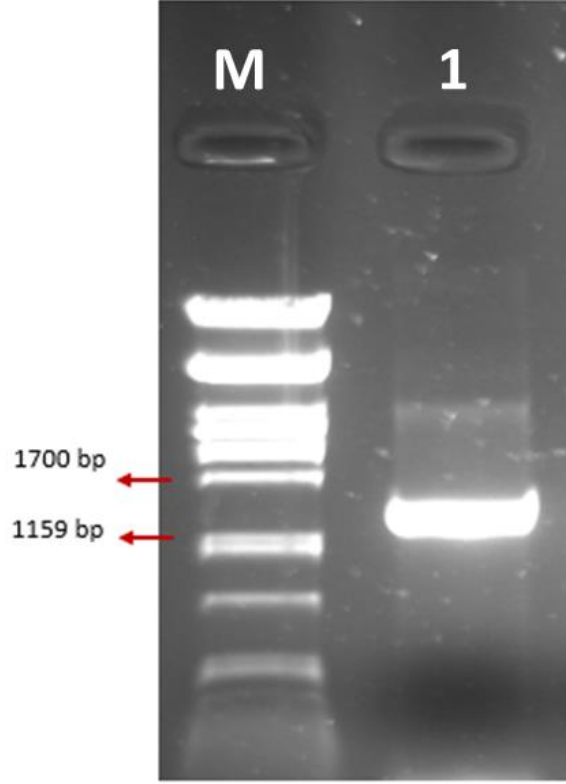
**Resim 4.** Aday pRTA plazmidleri ve pUC19 vektörünün XhoI&HindIII enzimleri ile kesimi. 1 ve 2 numaralı kuyuda, vektörlerin kesim bölgelerini bulundurdıkları XhoI ve HindIII enzimleri ile kesildiği ve beklenen 362 bp ve 2380 bp'lik bantları oluşturduğu gözlemlendi. Ayrıca, bu kuyularda kısmi kesim sebebiyle 2742 bp'lik bant görülmektedir. P kuyusunda ise, XhoI kesim bölgesini bulundurmayıp HindIII kesim bölgesini bulunduran pUC19 vektörünün HindIII enzimi tarafından kesildiği ve 2686 bp'lik bant oluşturduğu gösterilmiştir. M: Lambda PstI marker, P: pUC19 vektörü, 1 ve 2: Aday pRTA vektörleri.



**Şekil 11.** pRTA vektör haritası. Çoklu klonlama bölgesinde her iki yönden de ifadenin sağlanmasına imkan verecek promotör-RBS sekansı yerleştirilmiş pRTA vektörü şekilde gösterilmektedir.

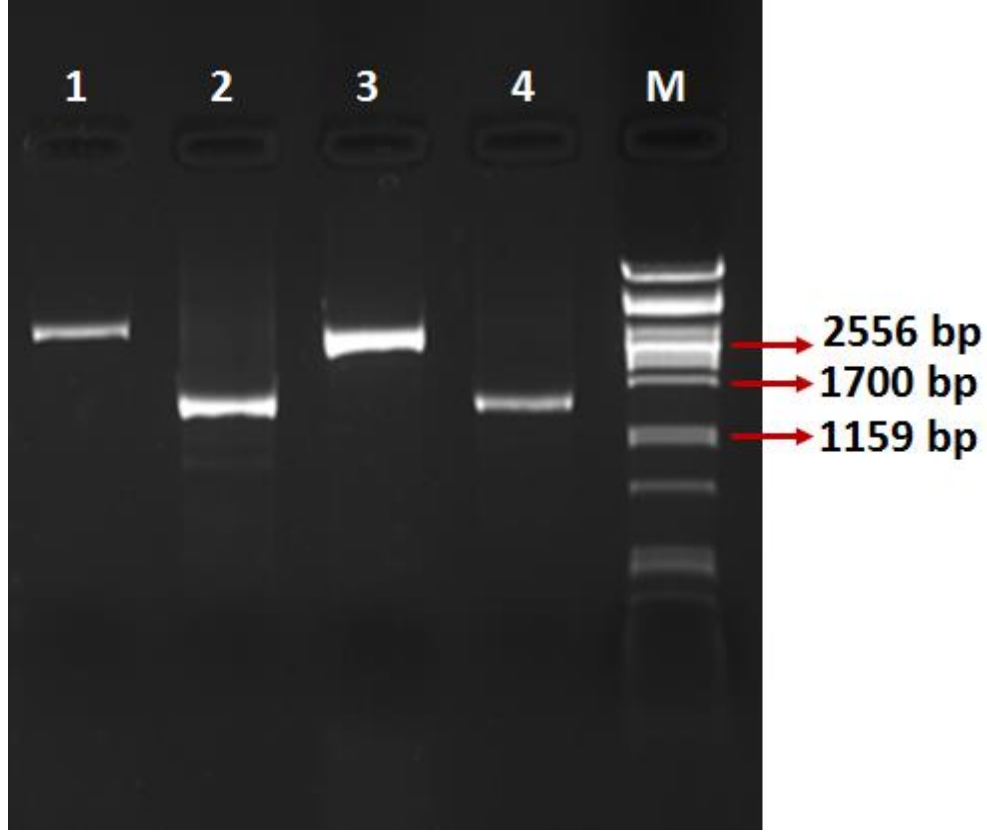
#### 4.1.4. pRTA Vektörüne Yerleştirilen Prom-RBS Sekansının İşlevselliğinin Doğrulanması

Dizayn edilen spesifik primerlerle gentamisin direncinden sorumlu *aac(6')-aph(2')* geni pUC19 plazmidine göre ters oryantasyonda yerleştirilecek şekilde primerler kullanılarak çoğaltıldı ve PCR ampliconları 1%'lik agaroz jelde yürütüldü (Resim 5).



**Resim 5.** *aac(6')*-*aph(2')* geninin PCR amplikonu. 1. kuyuda *aac(6')*-*aph(2')* genine spesifik primerlerle kurulan PCR ürünleri gösterilmektedir. Bu kuyulardaki bant *aac(6')*-*aph(2')* geninin 1440 bp'lik boyutu ile eşleşmektedir. M: Lambda PstI marker, 1: *aac(6')*-*aph(2')* amplikonu.

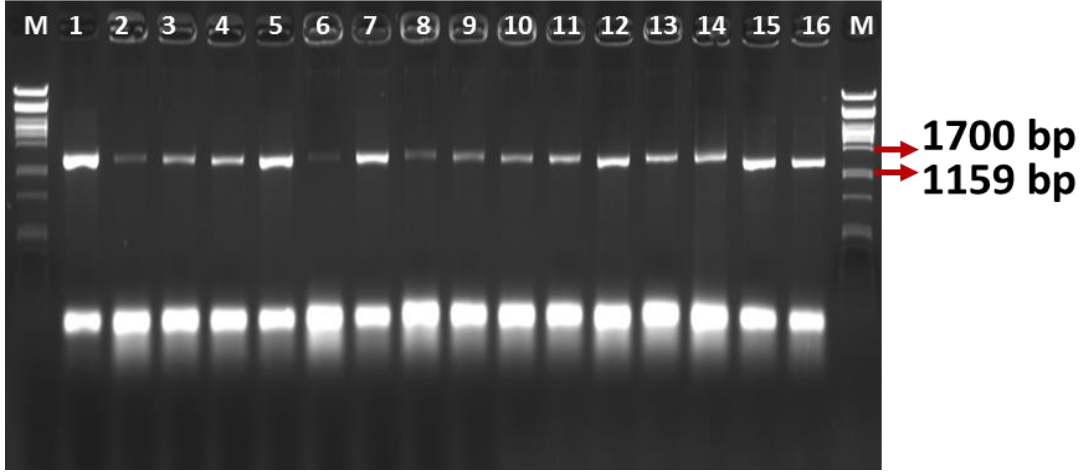
Aday pRTA vektörleri ve *aac(6')*-*aph(2')* amplikonunun EcoRI ve HindIII enzimleri ile restriksiyonu sonrasında oluşan ürünler 1%'lik agaroz jelde yürütüldü ve Resim 6'da gösterildi.



**Resim 6.** pRTA vektör adayları, pUC19 vektörü ve aac(6')-aph(2') ampliconlarının EcoRI&HindIII enzimleri ile restriksiyonu. Kuyulardaki vektör ve ampliconlar EcoRI&HindIII enzimleriyle kesilmiştir. pRTA vektör adaylarından yaklaşık 2700 bp, pUC19 vektöründen yaklaşık 2640 bp'lik restriksiyon ürünü oluştu. aac(6')-aph(2') ampliconlarının kesimi ile beklenen 1440 bp'lik boyutta bant görüldü. 1 ve 3: pRTA vektör adayları, 2 ve 4: aac(6')-aph(2') ampliconu. M: Lambda PstI marker.

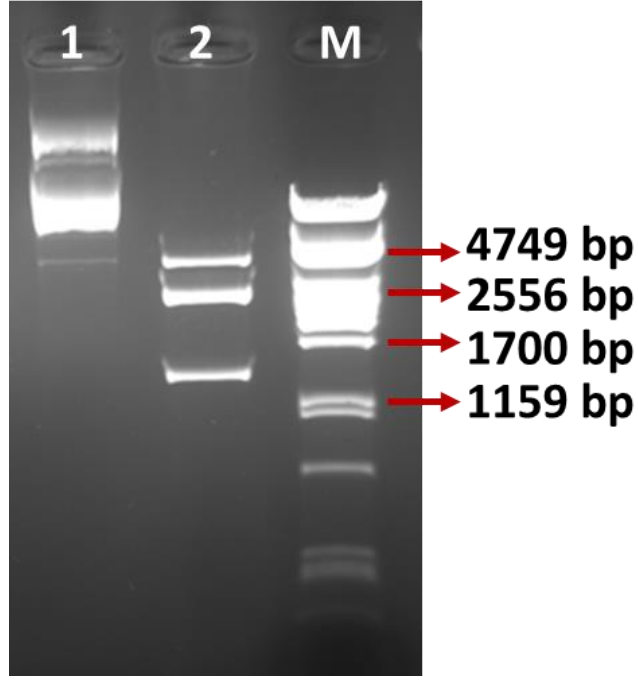
Restriksiyonu gerçekleştirilmiş aday pRTA vektörleri ve ampliconlar ligasyon reaksiyonu sonrası *E. coli* DH10B suşuna transforme edildi. Aday pRTA vektörlerini içeren transformantlar 10 µg/ml gentamisin içeren AXI besiyerinde besiyerinde seçildi.

10 µg/ml gentamisin içeren AXI besiyerinde büyüyen hücrelere AACAPHFE&AACAPHRH primerleri ile koloni PCR yapıldı ve ampliconlar 1% 'lik agaroz jelde yürütüldü ve Resim 7'de gösterildi. Resim 7'de görülen bantlar beklenen 1440 bp boyutundadır.

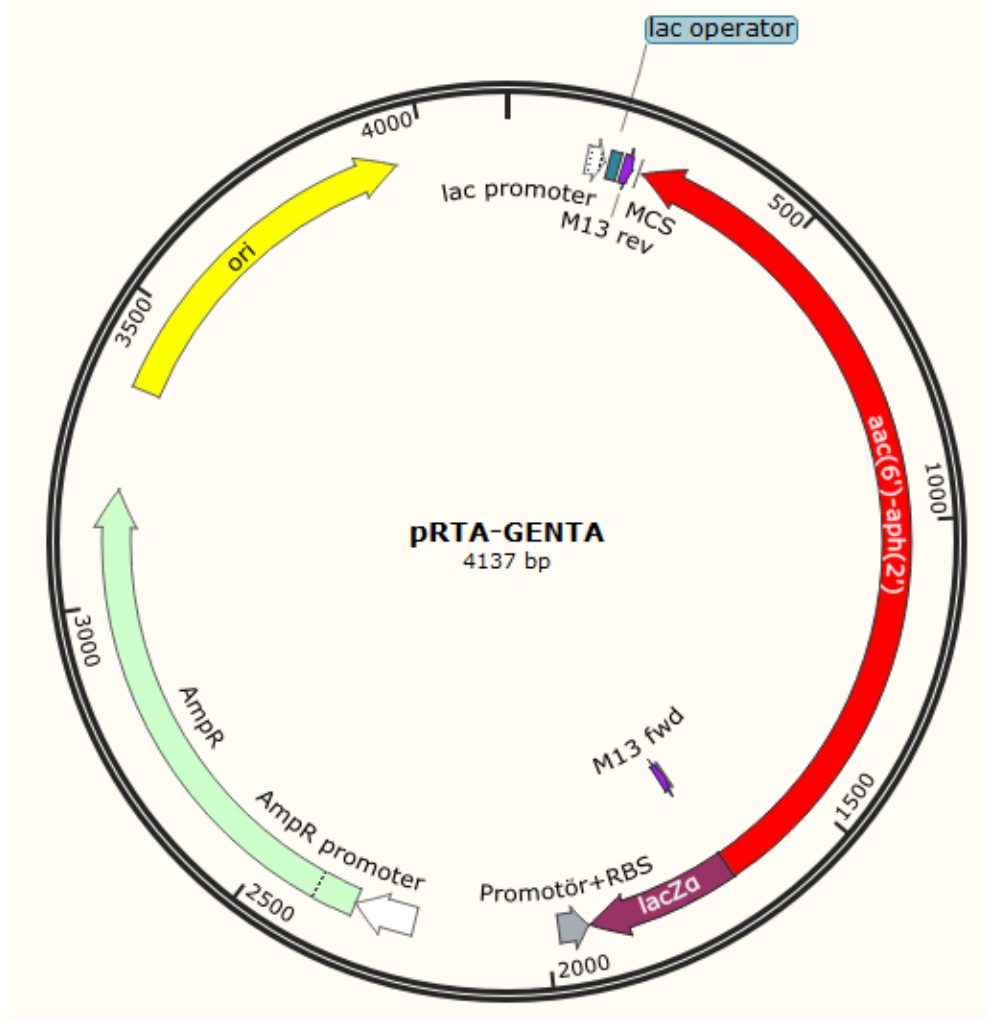


**Resim 7.** Klonlamanın gerçekleştiği pRTA vektörüne *aac(6')*-*aph(2')*'e spesifik primerlerle yapılan koloni PCR amplikonları. 1-16 numaralı kuyularda 10 µg/ml gentamisin içeren AXI besiyerinde büyüyen kolonilere *aac(6')*-*aph(2')*'e spesifik primerleriyle yapılmış koloni PCR amplikonları görülmektedir. M: Lambda PstI marker, 1-16: Seçici besiyerinde büyüyen kolonilere yapılan koloni PCR amplikonları.

Koloni PCR ile doğrulanan kolonilerden biri seçildi ve plazmid izolasyonu sonrası HindIII ve EcoRI enzimleri ile kesildi. Restriksiyon ürünü 1% 'lik agaroz jelde yürütüldü ve resim 8'de yaklaşık 2700 bp boyutunda pRTA vektörü ve 1440 bp boyutunda *aac(6')*-*aph(2')* fragmanı olmak üzere 2 bant oluştu. *aac(6')*-*aph(2')* geninin pRTA vektörüne klonlanması ile oluşturulan konstrüksiyon Şekil 12'de gösterildi. Bu şekilde *aac(6')*-*aph(2')* geninin ifadesinin çalışmada dizayn edilen prom-RBS sekansı ile sayesinde gerçekleştiği gösterilmektedir.



**Resim 8.** *aac(6')*-*aph(2')* gentamisin direnç geni klonlanmış pRTA vektörünün kesilmiş ve kesilmemiş formu. 1 numarada vektör sirküler yapıdadır ve farklı boyutlarda görülmüştür. 2 numarada insert olan *aac(6')*-*aph(2')* 1440 bp'lik bant ve pRTA vektörü 2742 bp'lik bant oluşturmuştur. En üstteki bant ise kısmi kesim sebebiyle oluşmuştur ve vektör ile insertin boyutunun toplamı (4182 bp) kadardır. M: Lambda PstI marker, 1: pRTA- *aac(6')*-*aph(2')* vektörünün kesilmemiş formu, 2: pRTA- *aac(6')*-*aph(2')* vektörünün kesilmiş formu.



Şekil 12. pRTA vektörüne yerleştirilen prom-RBS sekansının işlevselliğini doğrulamak amacıyla yapılan pRTA-aac(6')-aph(2') konstrüksiyonu.

#### 4.1.5. pRTA-aac(6')-aph(2')de Prom-RBS Analizi

Nucleotide-nucleotide BLAST programı kullanılarak yapılan ikili karşılaştırmada beklenen lokasyonda bire bir benzerlik bulunduğu ve hedeflenen oryantasyonda yerleştiği tespit edildi (Resim 9). Koloni PCR, plazmid restriksiyonu ve sekans yoluyla doğrulama yapılan aday vektör asıl vektör olarak belirlendi ve sonraki çalışmalarda kullanıldı. Ayrıca, bu vektörü içeren suştan skim milk ile stok alındı ve -80 °C'de saklandı. pRTA vektörünü içeren *E. coli* DH10B suşunun AXI besiyerindeki görüntüsü resim 10'de gösterildi.



<b>Job Title</b>	<b>BULENT_BOZDOGAN_VPRTA_YPUC19R_</b>		
<b>RID</b>	<a href="#">G3TV4D42114</a>	Search expires on 07-06 22:44 pm	<a href="#">Download All</a> ▾
<b>Program</b>	Blast 2 sequences <a href="#">Citation</a> ▾		
<b>Query ID</b>	lcl Query_27141 (dna)		
<b>Query Descr</b>	BULENT_BOZDOGAN_VPRTA_YPUC19R_		
<b>Query Length</b>	755		
<b>Subject ID</b>	lcl Query_27143 (dna)		
<b>Subject Descr</b>	prom+RBS		
<b>Subject Length</b>	56		
<b>Other reports</b>	<a href="#">MSA viewer</a> <a href="#">?</a>		

Descriptions
Graphic Summary
Alignments
Dot Plot

Alignment view Pairwise  CDS feature [?](#) [Restore defaults](#)

*1 sequences selected* [?](#)

[Download](#) ▾ [Graphics](#)

**prom+RBS**  
Sequence ID: **Query\_27143** Length: **56** Number of Matches: **1**

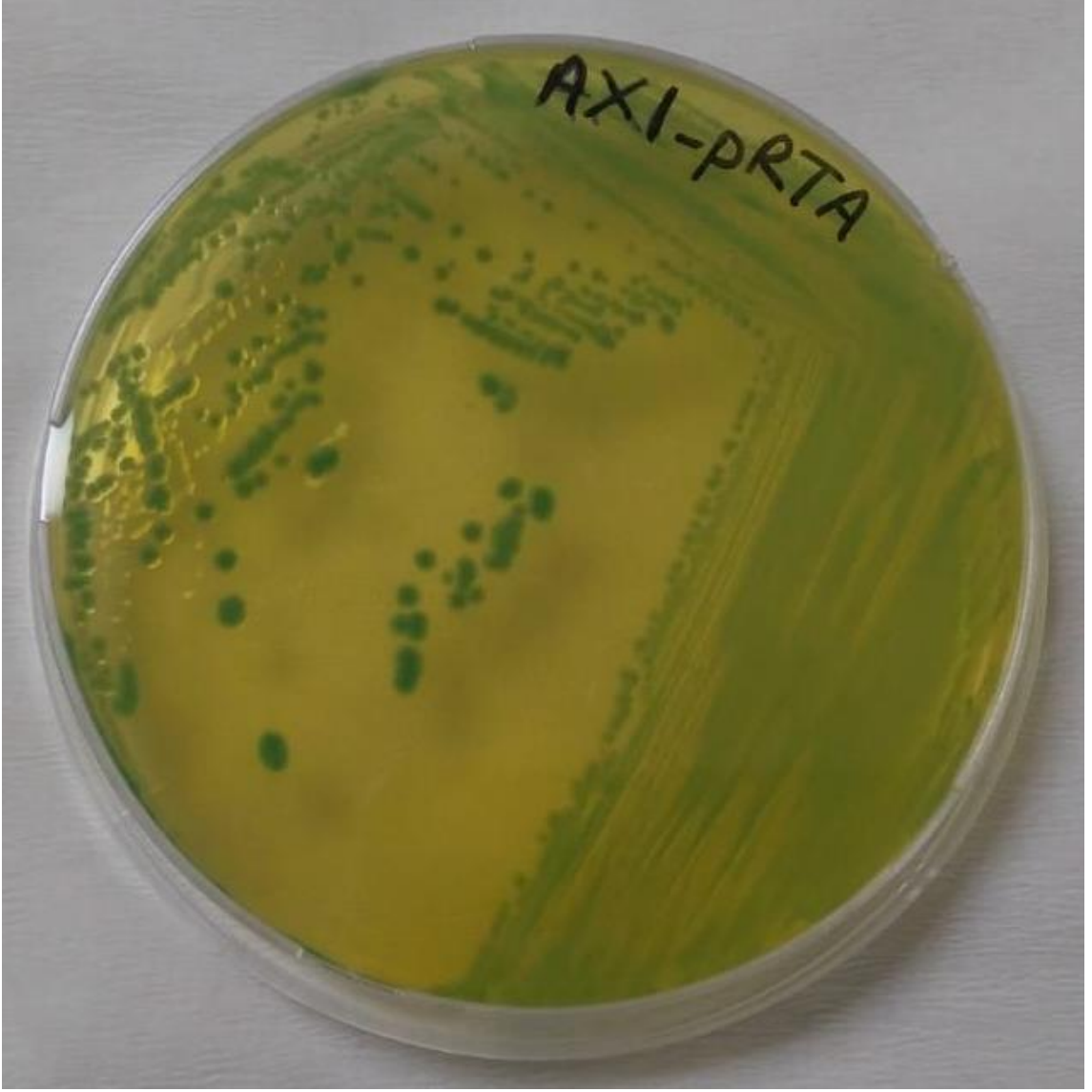
Range 1: 1 to 56 [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
102 bits(112)	6e-27	56/56(100%)	0/56(0%)	Plus/Minus

```

Query 332 AGCTGTACCTCCTTAGCTAGCATTatatatatatatatatatatTGTCAACTCGAG 387
Sbjct 56  AGCTGTACCTCCTTAGCTAGCATTATATATATATATATATATATTGTCAACTCGAG 1
          
```

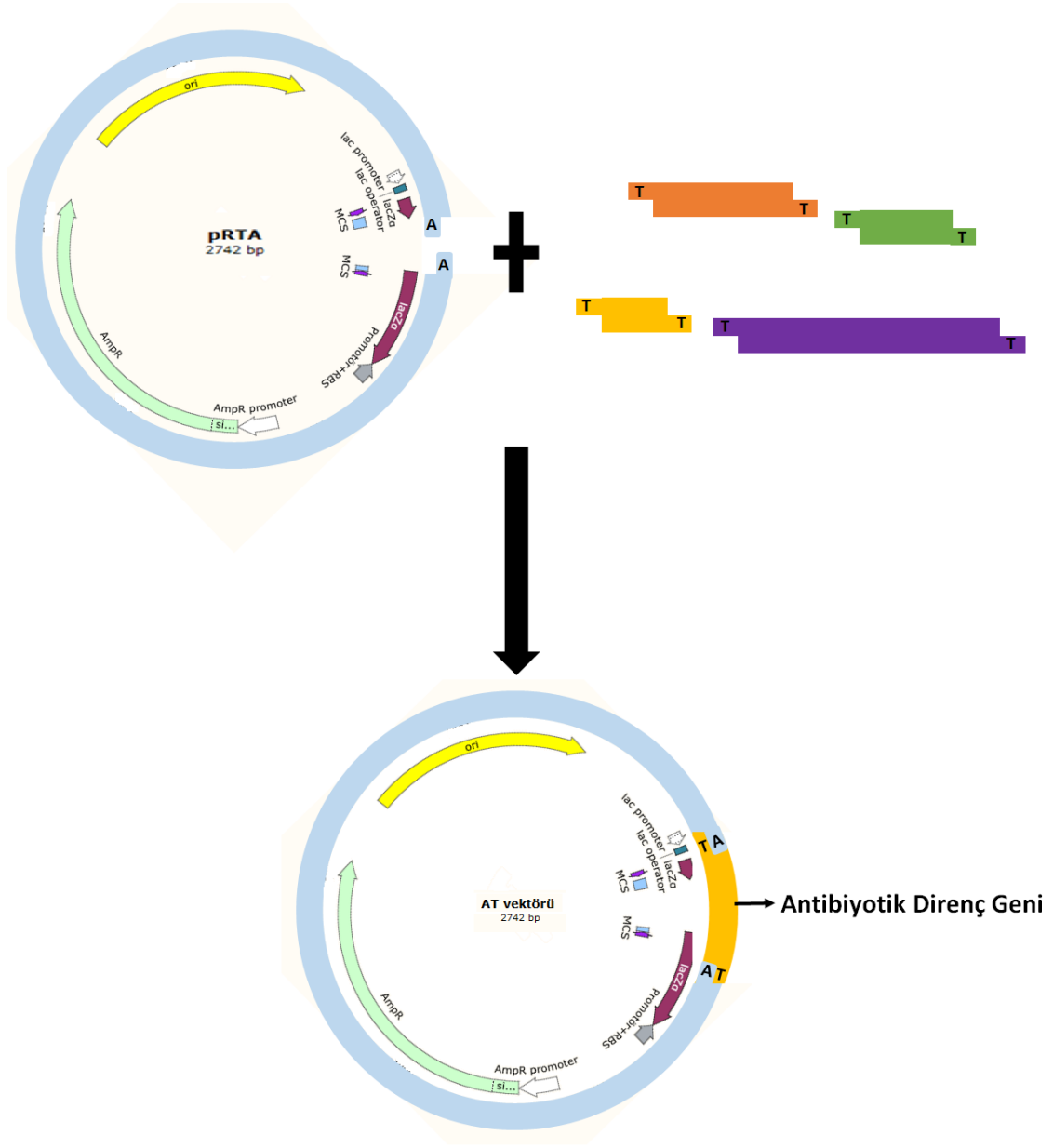
**Resim 9.** pRTA vektörüne yerleştirilmiş olan prom-RBS'nin sekans analizi. Sekansa gönderilmiş örnek ve tasarlanmış olan prom-RBS sekansının birbiriyle %100 uyumlu olduğu ve hedeflenen oryantasyonda yerleştiği tespit edildi.



**Resim 10.** pRTA vektörünü içeren *E. coli* DH10B suşunun AXI besiyerinde görünümü.

#### **4.2. pRTA Amplikonuna Genomdan Antibiyotik Direnç Geni Klonlanması**

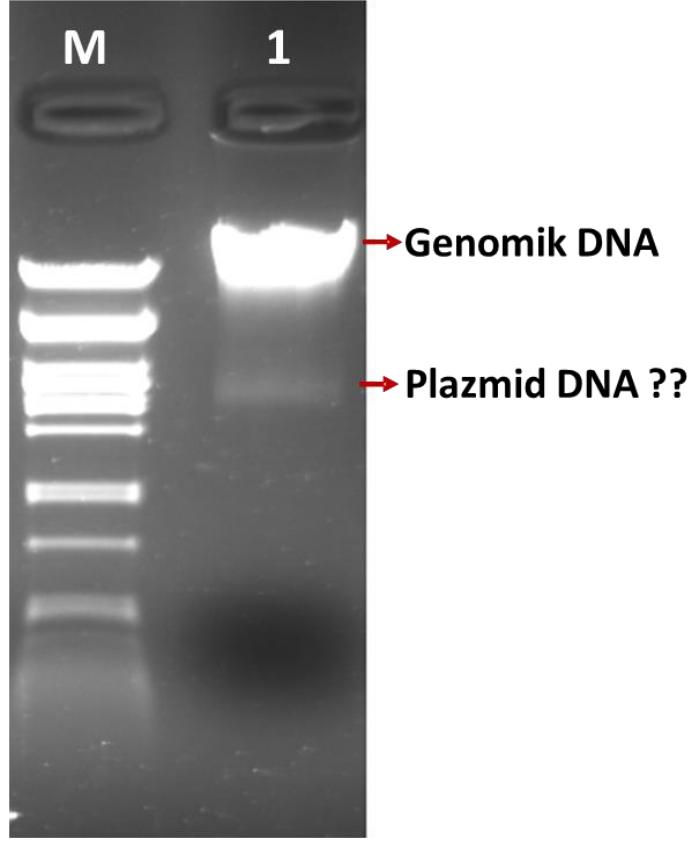
Modifiye TA yönteminin iş akışı Şekil 13'te gösterilmektedir. pRTA vektöründen amplifiye edilmiş AT vektörüne fragmente edilmiş total DNA'dan antibiyotik direnç geni klonlanması gerçekleştirilmektedir.



Şekil 13. Modifiye TA yönteminin akışı.

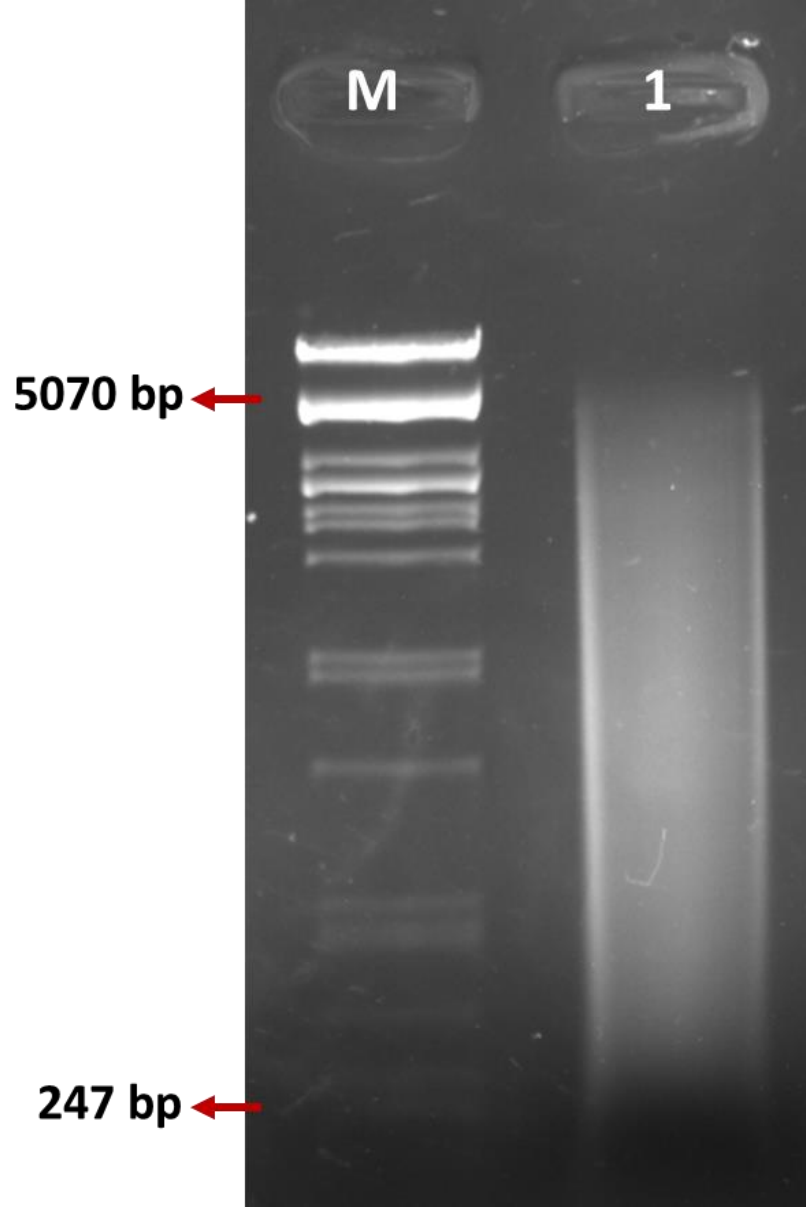
#### 4.2.1. Antibiyotik Direncine Sahip ADU2 Suşundan Elde Edilen Genomik DNA'nın Fragmantasyonu

MRSA ADU2 suşundan elde edilen genomik DNA 1% 'lik agaroz jelde yürütüldü ve elde edilen genomik DNA ve plazmid DNA'sı olduğu düşünülen bant resim 11'de gösterildi.



**Resim 11.** MRSA ADU2 suşunun total DNA'sı. Total DNAda kromozomal DNA dışında plamid yapısına benzer bir bant da görülmektedir. 1 numaralı kuyucukta eritromisin direncine sahip MRSA ADU2 suşunun genomik DNA'sı ve plazmid DNA'sı olduğu düşünülen bir bant görülmektedir. M: Lambda PstI marker. 1: MRSA ADU2 suşundan elde edilen genomik DNA.

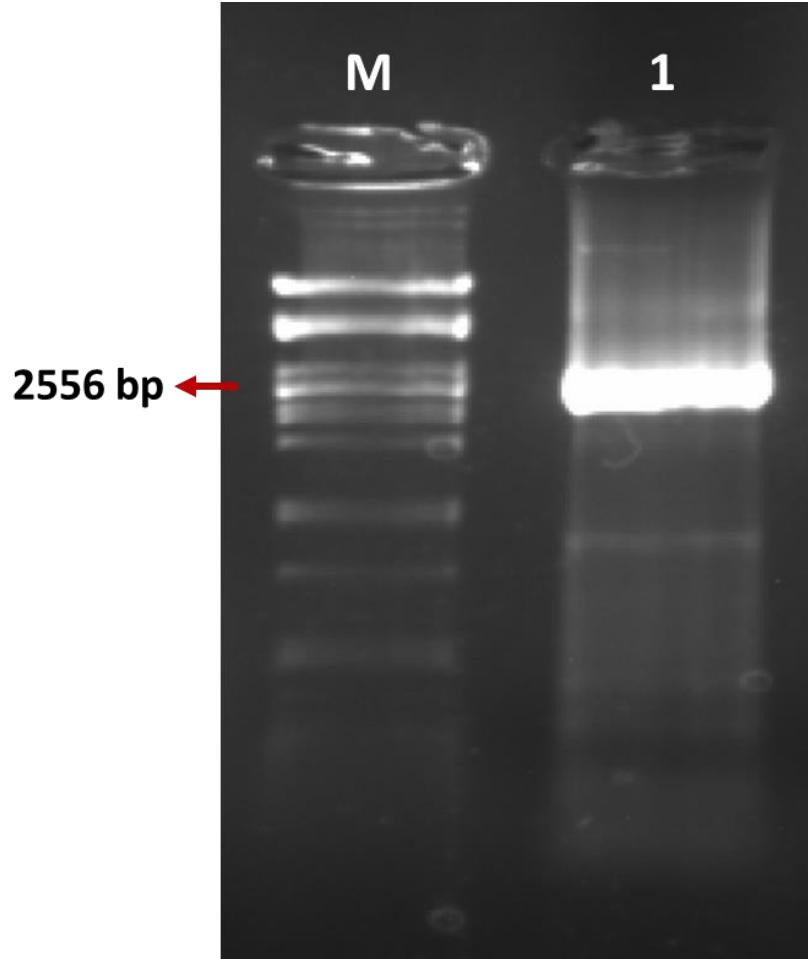
Fragmentaz enzimi ile fragmente edilen Genomik DNA'nın farklı boyutlarda dağılımı (200-5000 bp) resim 12'de gösterildi.



**Resim 12.** MRSA ADU2 suşunun genomik DNA'sının fragmentasyonu. 1 numaralı kuyuda ADU 2 suşunun genomik DNA ve plazmid DNA'sının fragmentaz enzimi ile parçalanmış hali gösterilmektedir. Fragmentlerin boyutları 200-5000 bp arasında değişmektedir. M: Lambda PstI marker, 1: MRSA ADU2 suşunun fragmente genomik DNAsı.

#### 4.2.2. pRTA Vektörünün PCR ile Çoğaltılması ve AT Vektörünün Oluşturulması

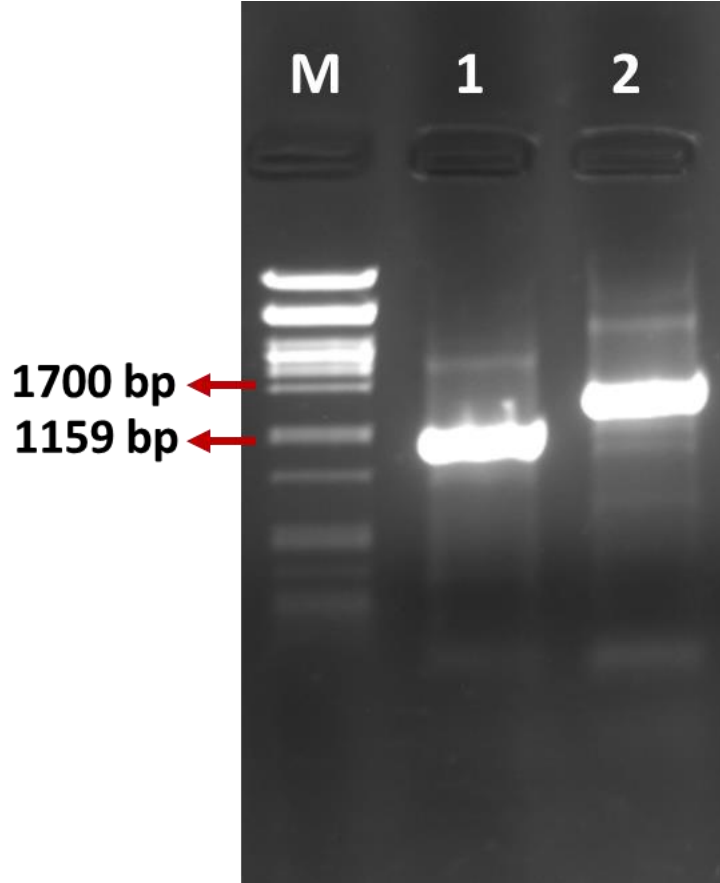
pRTA vektörü dizayn edilen spesifik pRTA-F&pRTA-R primer çiftiyle çoğaltıldı ve resim 13'te beklenen 2742 bp'lik boyutta bant görüldü. Bu ampliconlar AT vektörü olarak kullanıldı.



**Resim 13.** PCR ile çoğaltılmış AT vektörü. 1 numaralı kuyuda dizayn edilen spesifik primerlerle pRTA vektörünün tamamı Taq polimeraz enzimi ile invers PCR yoluyla çoğaltılmıştır ve AT vektörü elde edilmiştir. AT vektörü DNA'nın 3' uçlarında bir tane adenin bazı bulundurmaktadır ve direk klonlamada kullanılabilir. Bantın boyutu 2742 bp'dir. M: Lambda PstI marker, 1: pRTA vektörünün dizayn edilen spesifik primerlerle amplifikasyonu.

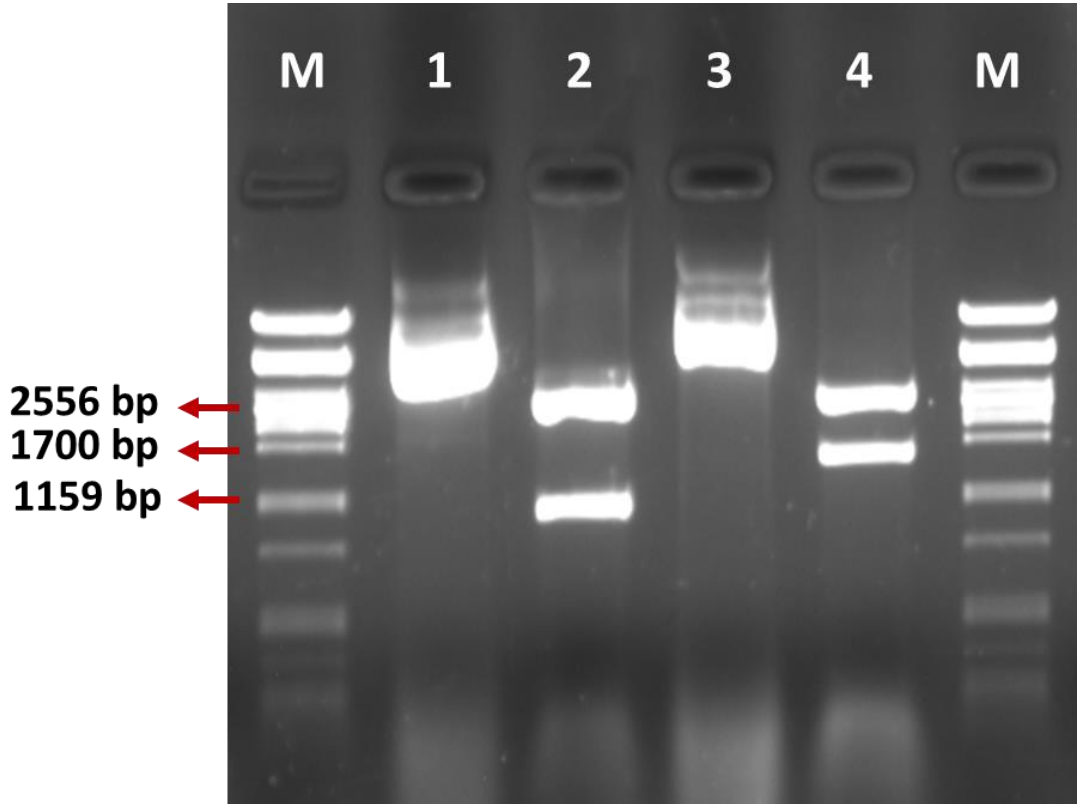
#### 4.2.3. AT Vektörü ve Fragmente DNA ile Antibiyotik Direnç Geni Klonlama

AT vektörü ve fragmente DNA ligandı *E. coli* DH10B suşuna aktarıldı. 200 µg/ml eritromisin ve 100 µg/ml ampisilin içerikli TSA besiyerinde büyüyen kolonilere M13F&M13R primer çifti ile uygun koşullarda koloni PCR yapıldı. Koloni PCR sonucunda yaklaşık 1000 bp ve 1600 bp boyutlarında bantlar elde edildi ve resim 14'te gösterildi.



**Resim 14.** Modifiye TA yöntemi ile eritromisin direnci klonlanmış transformantların koloni PCR amplikonları. 1 numaralı kuyudaki amplikon yaklaşık 1000 bp'lik bant ve 2 numaralı kuyudaki amplikon yaklaşık 1600 bp'lik bant oluşturmuştur. M: Lambda PstI marker, 1: Eritromisin direnç geni klonlanmış transformant 1'in koloni PCR amplikonu, 2: Eritromisin direnç geni klonlanmış transformant 2'nin koloni PCR amplikonu.

Bu kolonilerden elde edilen plazmidlerin EcoRI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucunda, ilk plazmid yaklaşık 1000 ve 2700 bp boyutlarında 2 bant oluştu ve kesilen ikinci plazmid ise yaklaşık 1600 ve 2700 bp boyutlarında 2 bant oluştu (Resim 15).

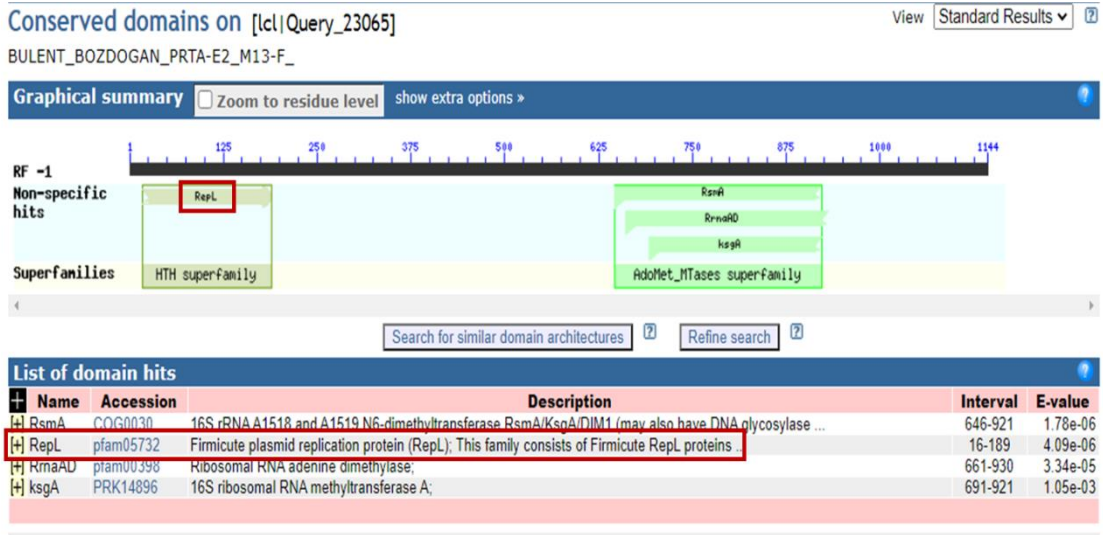


**Resim 15.** Eritromisin direncine sahip ve koloni PCR ile insert boyutu belirlenmiş klonlardan izole edilen plazmidlerin EcoRI&HindIII enzimi ile kesilmemiş ve kesilmiş formu. Koloni PCR yoluyla insert boyu belirlenmiş 1. transformanttan izole edilen plazmidin kesilmemiş formu 1 numaralı kuyuda ve EcoRI&HindIII enzimleri ile kesilmiş formu 2 numaralı kuyuda gösterilmiştir. 1 numaralı kuyuda vektör sirküler haldedir ve farklı boyutlarda görülmektedir. 2 numaralı kuyuda ise PCR’da 1000 bp’lik boyutta görülen insert yine 1000 bp’lik bant olarak ve vektör yaklaşık 2700 bp’lik bant olarak gözlenmiştir. Koloni PCR yoluyla insert boyutu belirlenmiş 2. transformanttan izole edilen plazmidin kesilmemiş formu 3 numaralı kuyuda ve EcoRI&HindIII enzimleri ile kesilmiş formu 4 numaralı kuyuda gösterilmiştir. 3 numaralı kuyuda vektör sirküler haldedir ve farklı boyutlarda görülmektedir. 4 numaralı kuyuda ise PCR’da 1600 bp’lik boyutta görülen insert yine 1600 bp’lik bant olarak ve vektör yaklaşık 2700 bp’lik bant olarak gözlenmiştir. M: Lambda PstI marker, 1: 1. transformanttan izole edilen plazmidin kesilmemiş formu, 2: 1. transformanttan izole edilen plazmidin kesilmiş formu, 3: 2. transformanttan izole edilen plazmidin kesilmemiş formu, 4: 2. transformanttan izole edilen plazmidin kesilmiş formu.



#### 4.2.4. Klonlanan Eritromisin Direnç Geninin Sekans ile Doğrulanması

Geliştirilen modifiye TA yöntemi ile klonlanan eritromisin direnç genleri translated nucleotide-protein (blastx) programı ile analiz edildi ve genlerin ermC direnç geni olduğu tespit edildi. Buna ek olarak yaklaşık 1600 bp'lik insertin plazmid replikasyonu ile ilişkili RepL proteini olduğu tespit edildi (Resim 16). Böylece bu direnç geninin plazmid ile taşındığı öğrenildi.



**Resim 16.** Geliştirilen modifiye TA yöntemi ile klonlanan eritromisin direnç genini taşıyan 2. transformantın sekans analizi. Sekans analizine göre eritromisin direnç geni tespitinin yanı sıra plazmid replikasyonu ile ilişkili RepL proteini de eşleşme gösterdi. Eritromisin direnç geninin plazmid üzerinde taşındığı tespit edildi.

## 5. TARTIŞMA

Antibiyotik direnci Dünya sağlık Örgütü tarafından en önemli sağlık problemleri arasında sayılmaktadır. Tüm mevcut antibiyotiklere dirençli suşlarla enfeksiyon oluşması artık nadir görülen olaylar arasında sayılmamaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre (2019) antibiyotiklere direncin gelişmesi ve yaygınlaşması yanında yeni antibiyotiklerin de ilaç firmaları tarafından geliştirilmemesi gelecekte direnç sorununun daha da yaygınlaşacağını ve önemli toplum sağlığı problemi olacağını göstermektedir.

Antibiyotikler pek çok patojenin tedavisinde etkin şekilde kullanılmasının yanı sıra hayvancılık, bitki üretimi ve su kültüründe enfeksiyon tedavisinde, enfeksiyonu önlemek ve hayvanlarda büyümeyi teşvik etmek amacıyla da kullanılmaktadır. Ancak antibiyotiklerin gereksiz ve yanlış kullanımı mikroorganizmaların antibiyotiklere tolerans kazanmalarına ve direnç mekanizmaları geliştirmelerine neden olmakta ve dolayısıyla antibiyotiklere dirençli suşların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Buna ek olarak, antibiyotiklerin hem kullanımının yaygın olması hem de kullanımdan sonra genelde antibiyotiklerin etkinliğini kaybetmiş metabolitlerine dönüşmemesi nedeniyle çevrede antibiyotik birikimine sebep olmaktadır. Buna bağlı olarak çevre mikroorganizmaları da antibiyotik direnç mekanizması geliştirmekte ve antibiyotik direnç genleri çevrede bulunabilmektedir. Farklı habitatlarda bulunan mikroorganizmalar arasında direnç geni aktarılmakta ve yayılmaktadır (Stokes ve Gillings, 2011). Direnç genleri taşıyan patojen olmayan organizmaların bu genleri patojen organizmalara aktarması durumunda hem direnç yayılımı artmakta hem de tedavi seçenekleri kısıtlanmaktadır.

Antibiyotik direncine sahip suşların taranması için en yaygın kullanılan yöntemler, moleküler yöntemlerdir, özellikle PCR yöntemidir. Yaygın yöntem olarak hastadan veya çevreden alınan örneklerden bakteriler izole edilip fenotipik olarak direnç tespiti gerçekleştirilmekte veya izole edilen suşlardan veya doğrudan örnekten ekstrakte edilen DNA'larda "bilinen" antibiyotik direnç genlerinin varlığı PCR yoluyla tespit edilmektedir. Ancak fenotipik veya moleküler yolla direnç varlığı taramasının yetersiz kaldığı ya da yanlış bilgi verdiği durumlar olabilmektedir. Örneğin, alınan örnekteki direnç profilini belirlemek amacıyla fenotipik yöntemlerle tarama yapılmaktadır. Fenotipik tarama için öncelikle her bir organizmanın saflaştırılması ve kültürlenmesi gerekmektedir. Ancak tüm organizmaların kültürü yapılamamakta veya kültür koşulları her laboratuvarında sağlanamayabileceği için

alınan örnekteki direnç profili tam olarak bilinmemektedir. Moleküler yöntemlerde ise ancak bilinen direnç genlerinin taraması yapılabilmekte ve bilinmeyen fakat direnç sağlayan genlerin varlığı tespit edilememektedir. Buna ek olarak, PCR yöntemi ile pozitif sonuç veren suşlar psödogen ya da ekspresyonu gerçekleşmeyen genler olabilmekte ve fenotipik olarak o dirence sahip olamayabilmektedir. Moleküler ve mikrobiyolojik yöntemlerin birlikte kullanıldığı antibiyotik direnç genlerinin varlığının tespit edilebildiği yöntemlerden biri ise izole edilen genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile fragmente edilecek klonlanmasıdır. Ancak bu yöntemde kullanılan restriksiyon enzimlerinin belirli sekansları tanınması ve kesmesi genin içinden kesilerek etkinliğini kaybetmesine sebep olabilir ya da geni içeren fragmentin büyük olması klonlanma ihtimalini düşürmektedir. Bu çalışmada geliştirilmiş olan yöntemde hem fenotipik hem de moleküler yolla “bilinen” ve “bilinmeyen” direnç genleri tespit edilebilmekte ve oluşan fragmentler klonlanabilir boyutta olabilmektedir.

pUC19 vektöründe anlamlı iplikte *lacZ* geninin ifadesini sağlayan *lac* promotörü bulunmaktadır. Klonlanması hedeflenen genler *lacZ* geni içerisinde bulunan çoklu klonlama bölgesinin içinde bulunmaktadır ve *lac* promotörü ile genin ifadesi gerçekleşmektedir. Hedeflenen genin klonlanması ile genellikle *lacZ* geninin bütünlüğü bozulur ve Xgal'i parçalayan beta-galaktosidaz enziminin *lacZ-alfa* fragmenti oluşmaz. Böylece, klonlamanın gerçekleştiği koloniler beyaz, gerçekleşmediği koloniler ise mavi kalır. Ancak pUC19 vektöründe bulunan promotörlerin özellikle *lac* promotörünün minus strandde bulunması klonlanacak DNA'nın ifadesinin gerçekleşmesi için promotör ile aynı oryantasyonda olmasını zorunlu kılmaktadır. Hedef genin restriksiyon enzim bölgesi içeren primerler ile PCR ile çoğaltılarak klonlanması durumunda oryantasyon belirlenebilmektedir ancak küt uçlu, TA klonlama ve fragmente ürünlerin klonlanmasında ise oryantasyon problemi ortaya çıkmaktadır. Çalışmanın ilk adımında üretilmiş olan pRTA vektörü ile bu olumsuzluk ortadan kaldırılmıştır. Bu vektörde *lacZ* geni bitimine plus strandde konstitütif yani sürekli sentez yapan *E. coli* promotörü yerleştirilmiştir ve yerleştirilen promotörün yerleştirildiği sekans yoluyla, promotörün etkinliği ise promotör ile aynı yönde direnç geni klonlanarak doğrulanmıştır. Böylece, PCR ürününün restriksiyon enzimiyle, küt ve TA klonlamada veya fragmente ürünlerin klonlanmasında oryantasyon ayarlanması gerekmeyecektir.

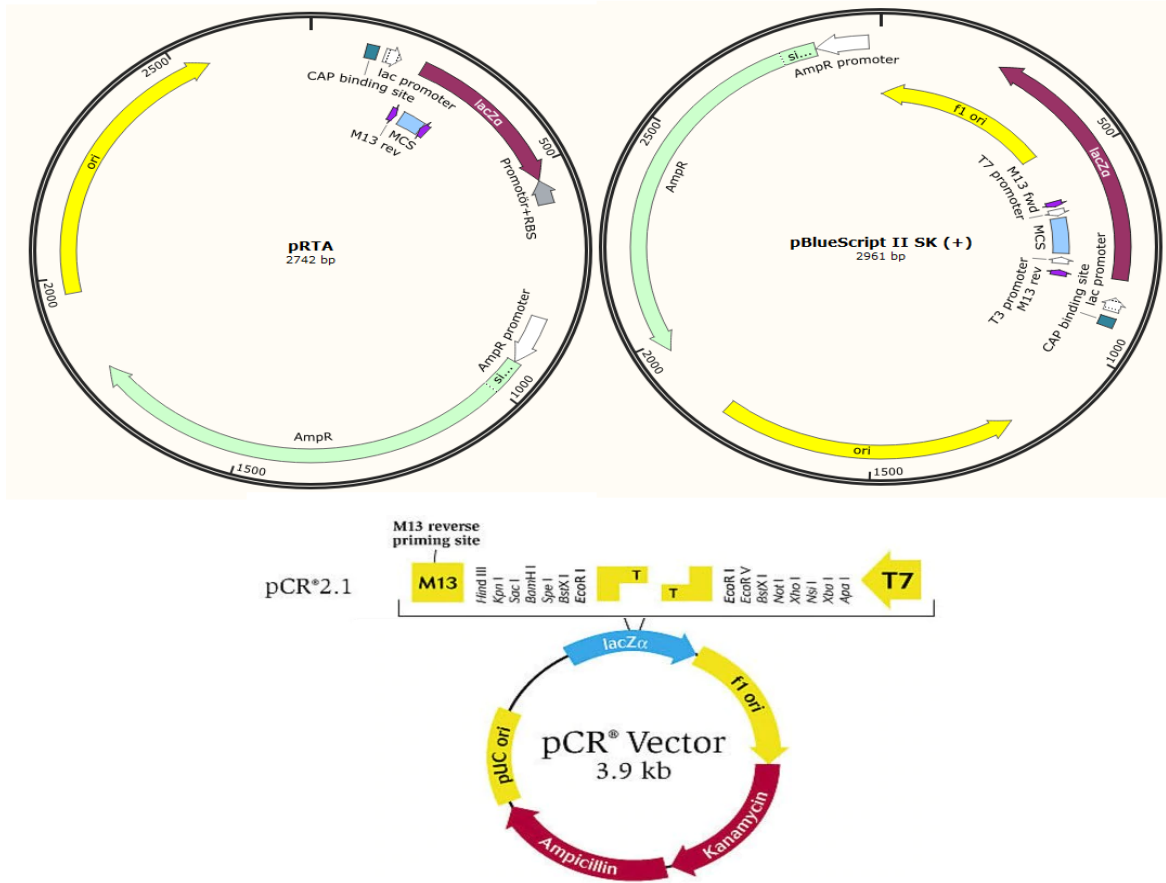
Çalışmanın 2. adımında, pRTA vektörünün dizayn edilen primer çifti ile çoklu klonlama bölgesindeki SmaI enzim kesim bölgesinden itibaren Taq polimeraz enzimiyle invers PCR yoluyla çoğaltılarak PCR-tabanlı vektör elde edilmiştir. PCR tabanlı pRTA vektörü 3' ucunda çoğunlukla tek adenin bazı bulundurmaktadır. PCR yöntemi ile elde edilen

vektör hem TA klonlama için 3' ucunda adenin bazına sahiptir hem de plazmid izolasyonu ile karşılaştırıldığında daha yüksek verimle plazmid elde edilmesi mümkün olmuştur.

Çalışmada kullanılan MRSA ADU2 suşunun fenotipik olarak eritromisin direncine sahip olduğu bilinmemekte fakat hangi direnç geninin bunu sağladığı bilinmemektedir. Direnç geninin karakterizasyonu için bu suştan elde edilen genomik DNA fragmantaz enzimi ile fragmente edilmiştir. Fragmentasyon için restriksiyon enzimlerin tercih edilmeme nedeni belirli bölgelerden keserek direnç geninin klonlanma ihtimalini düşürmesi ve fiziksel parçalamanın tercih edilmeme nedeni parçalama sırasında fragmentasyonun rasgele olmayıp genellikle AT bazları açısından zengin bölgelerden gerçekleşmesidir. Fragmentaz enziminin tercih edilme nedeni fragmentasyonun rasgele bölgelerden gerçekleşmesi ve inkübasyon süresi ile oluşacak fragmanların boyut aralığının belirlenebilmesidir. Bu sayede, direnç genini taşıyan fragmanlar klonlanabilir boyutta olacak ve genin içerisinden kesilmediği fragmanların oluşmasının yanı sıra oluşacak klonlar sadece direnç genini taşımayacaktır. Genin akış yukarı veya akış aşağısında kalan DNA parçalarının aidiyetiyle ilgili de bilgi verecektir. Direnç geninin plazmid veya transpozon ile taşınıp taşınmadığıyla ilgili de bilgi verecektir.

Geliştirdiğimiz klonlama yönteminin benzerini kullanan ticari ürünler bulunmamaktadır ve ilk olacaktır. Ancak çift yönlü promotör içeren ticari ampikon klonlama kitleri vardır. Örneğin pBlueScript II SK (+) (Agilent, Katalog no: 212205) ve pCR™2.1 (Invitrogen™, Katalog no: K203040) ticari vektörleri de çoklu klonlama bölgesine klonlanan genin her iki strandde ifadesini sağlayan promotörler bulundurmaktadır (Şekil 14). pBlueScript II SK (+) vektörü *E. coli*'de transkripsiyonu sağlayan *lac* promotörünü ve T7 RNA polimeraz kodlayan suşlarda transkripsiyonu sağlayan T7 promotörünü bulundurmaktadır. Bununla birlikte, *lac* promotörü ile aynı yönde T3 promotörü de bulunmaktadır. T7 RNA polimeraz, T7 bakteriyofajında bulunan DNA'dan RNA sentezini gerçekleştiren bir RNA polimeraz enzimidir ve T7 RNA promotörüne spesifiktir (Tabor 1990). T7 RNA polimeraz geni BL21(DE3) gibi bazı özel *E. coli* suşlarına yerleştirilmiştir (Jeong ve ark, 2009). Çoklu klonlama bölgesine klonlanacak insertin ifadesini sağlamak için T7 promotörünü bulunduran pBlueScript II SK (+) ve pCR™2.1 gibi çok sayıda vektör bulunmaktadır. Bu vektörlerin bahsi geçen suşa aktarılmasıyla insertin ifadesi gerçekleşebilir. T7 RNA polimerazın tercih edilme sebebi *E. coli* RNA polimerazına göre daha çok mRNA sentezlemesidir (Tabor, 1990). T3 RNA polimeraz ise T3 bakteriyofajında bulunmakta ve DNA'dan mRNA sentezini gerçekleştirmektedir. T3 RNA polimeraz T3 promotörünü spesifik olarak tanır. T3 ve T7 RNA polimerazlar aktivitelerini *in vitro* transkripsiyonla da gerçekleştirebilmektedir. *In vitro* transkripsiyonda RNA polimeraz enzimi DNA'da kendisine

spesifik promotörü tanıyarak mRNA sentezini gerçekleştirir (Beckert ve Masquida, 2011). T7 promotörü içeren plazmiddeki insert ancak T7 RNA polimeraz üretebilen suşa aktarıldığında eksprese olmaktadır. T3 RNA polimerazını üretebilen *E. coli* henüz oluşturulmadığı için T3 promotörü taşıyan plazmidler için *in vitro* transkripsiyon tercih edilmelidir. pCR™2.1 vektörü ise ticari olarak üretilmiş TA vektörüdür ve lac promotörü ile T7 promotörünü bulundurmaktadır. pBlueScript II SK (+) vektöründe olduğu gibi T7 promotörünün insertin ifadesini sağlaması için T7 RNA polimeraz üreten özel suş kullanılmalıdır ya da *in vitro* transkripsiyon ile ifade gerçekleşmelidir. Bakteriyofaj polimeraz kodlayan suşların tüm laboratuvarlarda bulunamaması ve *in vitro* transkripsiyonun masraflı ve ürünlerinin uzun süre saklanabilir olmaması sebebi ile oryantasyon gözetilmeksizin ifade sağlayan promotörlerin *E. coli* promotörü olması avantajlıdır. Çalışmada üretilen pRTA vektörünün bu özellikte olması onu avantajlı kılmaktadır. Ancak yerleştirilen promotör-RBS sekansının çoklu klonlama bölgesine görece uzak kalmasının klonlama başarısını etkileyebileceği düşünülmektedir. Bu sebeple, bir sonraki çalışmada etkinliği kanıtlanmış promotör-RBS sekansı *lacZ-alfa* bütünlüğünü bozmadan çoklu klonlama bölgesinin daha yakınına yerleştirilecektir.



**Şekil 14.** pRTA, pBlueScript II SK (+) ve pCR™2.1 vektörlerinin haritaları

TA klonlama uzun yıllardan beri kullanılan ve genellikle amplikon klonlamakta kullanılan bir yöntemdir. TA vektörü ticari olarak temin edilebilmekle birlikte laboratuvarlarda da üretilmektedir. Küt uç oluşturarak kesen restriksiyon enzimleri ile lineer hale getirilen vektöre Taq polimeraz veya terminal dinükleotidil transferaz enzimi ile timin bazı eklenmesi en yaygın kullanılan yöntemdir (Zhou 2000). Alternatif olarak DNA'nın 3' ucunda tek timin bazı bulunduracak şekilde kesim yapan HphI gibi restriksiyon enzimleri ile kesmektir (Mead ve ark, 1991). Yakın zamanda TA vektörü oluşturmak için yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde DNA polimeraz enzimi ile çoğaltılarak vektör elde edilmektedir. Wang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada tek primerli PCR (single primer based-PCR) yöntemi kullanılarak TA vektör oluşturmuşlardır. Bu yöntemde, DNA kaynağı olarak kullanılan vektör 5' ucunda adenin 3' ucunda timin bazı bulundurmalıdır. Sense ve anti-sense ipliğe bağlanacak olan primerlerin fosforlu olması ve primerin 5' ucunda adenin bazı bulunmayacak şekilde eşleşmesi gerekmektedir. Her iki primer ile kurulan PCR'da tek iplikli DNA amplifikasyonu gerçekleştirilmektedir. Elde edilen amplikonlar bir araya getirilip denaturasyon ve ardından renaturasyon ile çift iplikli TA vektör oluşturulmaktadır (Wang ve ark, 2007). Diğer bir

çalışmada ise TA vektörü oluşturmak için vektör küt uçlu amplifikasyon gerçekleştiren DNA polimeraz enzimi ve fosforlanmış primerlerle invers PCR yoluyla çoğaltılmaktadır. Saflaştırılan vektöre TdT enzimi ile timin bazı eklenerek TA vektör oluşturulmaktadır (Chen 2015). Bu tez çalışmasında geliştirdiğimiz vektör ise TA vektörü olarak değil AT vektörü olarak tasarlanmıştır. Vektörde adenin uzantısı vardır. Bu amaçla çoklu klonlama bölgesinde belirlenen bir noktadan itibaren Taq polimeraz enzimi kullanılarak invers PCR yoluyla çoğaltılmış ve kolaylıkla ve yüksek miktarda vektör elde edilebilmiştir.. Geliştirdiğimiz AT vektörü ile klonlamanın gerçekleşebilmesi için klonlanacak insert DNA'nın 3 ucunda timin bazı bulunması gerekmektedir. Bu da küt uçlu fragmana Taq polimeraz enzimi ya da TdT enzimi ile timin eklenmesi ile gerçekleştirilebilir. Klonlanacak insert fragmentasyon yoluyla elde edilmiş ise uçları kütleştirilmiş fragmanlara yine Taq polimeraz enzimi ya da TdT enzimi ile timin bazı eklenebilir. Geliştirilen modifiye TA yönteminin asıl hedefi örneklerden saflaştırılan DNAlardaki bilinen veya bilinmeyen direnç genlerinin klonlanmasıdır. Çalışmada geliştirilen yöntemle antibiyotik direnç geninin karakterize edilmesinin yanında genin taşındığı genetik yapının da (plazmid, transpozon, kromozom) tespitine de imkan vermektedir. Geleneksel TA klonlamanın dezavantajı klonlanacak DNA'nın oryantasyonunun belirlenememesi ve bu sebeple ekspresyonun her zaman gerçekleşmemesidir. Bu sorunun üstesinden gelmek için hedeflenen oryantasyona göre amplifikasyonda kullanılacak primerlerden birisinin 5' ucu ve vektörün 5' uçlarından biri yine doğru oryantasyonu sağlayacak şekilde fosforlanır (Zhou 2000). PCR ampliconlarının TA yöntemi ile doğru oryantasyonda klonlanmaları için bu yöntemler varken fragmente DNA'lar için oryantasyon belirlenememektedir. Bu çalışmada kullanılan vektördeki çoklu klonlama bölgesinde sense ve anti-sense iplikte insertin ekspresyonunu sağlayacak promotörlerin bulunması klonlanacak fragmente DNA'ların oryantasyon düzenlenmesi gerektirmeden ekspresyonunun gerçekleşmesini sağlamaktadır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Antibiyotik direnci günümüzün en önemli sağlık sorunları arasındadır. Yaygın antibiyotik dirençlerinin yaygınlığının ve dirence sebep olan genlerin tespit edilmesinin antibiyotik direnci ile savaşmada önemli bir rolü vardır. Bu çalışmada, bilinen veya bilinmeyen direnç genlerinin tespit edilebilmesi için vektör ve yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Geliştirilen pRTA vektörünün oryantasyon göz etmeden klonlama yapmak için yeterli olduğu ancak dizayn edilen ve yerleştirilen promotör ve RBS sekansının çoklu klonlama bölgesine daha yakın bir lokasyona yerleştirilmesinin ekspresyonu arttırabileceği düşünülmektedir. Sonraki çalışmalarda, bununla ilişkili deneyler yürütülecektir. Geliştirilen yöntemin ise antibiyotik direnç genlerinin klonlanması için uygun olduğu tespit edilmiştir.



## KAYNAKLAR

- Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N.** Mechanism of quinolone action and resistance, *Biochemistry*, 2014, 53(10):1565-1574.
- Aminov RI.** The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature, *Environmental Microbiology*, 2009, 11(12), 2970-2988.
- Anderson S.** Shotgun DNA sequencing using cloned DNase I-generated fragments, *Nucleic Acids Research*, 1981, 9(13), 3015-3027.
- Andersson DI, Hughes D.** Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics, *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(7), 465-478.
- Arashi-Heese N, Miwa M, Shibata H.** XcmI site-containing vector for direct cloning and in vitro transcription of PCR product, *Molecular Biotechnology*, 1999, 12(3), 281.
- Arenz S, Wilson DN.** Bacterial protein synthesis as a target for antibiotic inhibition, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2016, 6(9), a025361.
- Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi.** “Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014.”, *ECDC Report*, TQ-AM-15-001-EN-N, Stockholm, 2015, s 11-25.
- Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi.** “Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals”, *ECDC Report*, TQ-01-19-007-EN-N, Stockholm, 2019, s 22-30.
- Bauer AW, Perry DM, Kirby WMM.** Single-Disk Antibiotic-Sensitivity Testing of Staphylococci: An Analysis of Technique and Results, *Archives of Internal Medicine*, 1959;104(2):208–216.
- Beckert B, Masquida B.** Synthesis of RNA by in vitro transcription, *Methods in Molecular Biology*, 2011, 703:29-41

- Bell BG, Schellevis F, Stobberingh E, Goossens H, Pringle M.** A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance, *BMC Infectious Diseases*, 2014, 14(1), 13.
- Bertero A, Brown S, Vallier L.** Methods of Cloning, In: Morteza J, Francesca S, Mehdi J (Eds), *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, 2017, s. 19-39. Academic Press.
- Binda E, Marinelli F, Marcone GL.** Old and new glycopeptide antibiotics: action and resistance, *Antibiotics*, 2014, 3(4), 572-594.
- Blanco P, Hernando-Amado S, Reales-Calderon JA, Corona F, Lira F, Alcalde-Rico M, Martinez JL.** Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants, *Microorganisms*, 2016, 4(1), 14.
- Blazquez J, Oliver A, Gomez-Gomez JM.** Mutation and evolution of antibiotic resistance: antibiotics as promoters of antibiotic resistance?, *Current Drug Targets*, 2002, 3(4), 345-349.
- Bozdogan B, Galopin S, Gerbaud G, Courvalin P, Leclercq R.** Chromosomal aadD2 encodes an aminoglycoside nucleotidyltransferase in *Bacillus clausii*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(4), 1343-1346.
- Brown MG, Mitchell EH, Balkwill DL.** Screening for Novel Antibiotic Resistance Genes, *In Metagenomics*, 2010, s. 265-271. Humana Press, Totowa, NJ.
- Bugg TD, Wright GD, Dutka-Malen S, Arthur M, Courvalin P, Walsh CT.** Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA, *Biochemistry*, 1991, 30(43), 10408-10415.
- Chen, X., Zhang, H., Zhang, Y., Cui, W., Long, C., Jia, X., & Wang, H.** An improved inverse PCR protocol for the generation of T-vectors, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2015, 47(2), 142-144.
- Çiftci A, Aksoy A.** Antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları, *Türkiye Klinikleri Veteriner Bilimleri-Farmakoloji ve Toksikoloji-Özel Konular*, 2015, 1(2), 1-10.
- Deininger PL.** Random subcloning of sonicated DNA: application to shotgun DNA sequence analysis, *Analytical Biochemistry*, 1983, 129(1), 216-223.

**Delcour AH.** Outer membrane permeability and antibiotic resistance, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2009, 1794(5), 808-816.

**Dinos GP.** The macrolide antibiotic renaissance, *British Journal of Pharmacology*, 2017, 174(18):2967-2983

**Douthwaite S, Crain PF, Liu M, Poehlsgaard J.** The tylosin-resistance methyltransferase RlmAII (TlrB) modifies the N-1 position of 23 S rRNA nucleotide G748, *Journal of Molecular Biology*, 2004, 337(5), 1073-1077.

**Dunham JP, Friesen ML.** A cost-effective method for high-throughput construction of illumina sequencing libraries, *Cold Spring Harbor Protocols*, 2013, (9), pdb-prot074187.

**Elliott E, Brink AJ, van Greune J, Els Z, Woodford N, Turton J, Livermore DM.** In vivo development of ertapenem resistance in a patient with pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* with an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, *Clinical Infectious Diseases*, 2006, 42(11), e95-e98.

**Fernandes R, Amador P, Prudêncio C.**  $\beta$ -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance, *Reviews in Medical Microbiology*, 2013, 24(1), 7-17.

**Fluit AC., Visser MR, Schmitz FJ.** Molecular detection of antimicrobial resistance, *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, 14(4), 836–871.

**Fyfe C, Grossman TH, Kerstein K, Sutcliffe J.** Resistance to macrolide antibiotics in public health pathogens, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2016, 6(10), a025395.

**Gelpi, A, Gilbertson, A, Tucker, JD.** Magic bullet: Paul Ehrlich, Salvarsan and the birth of venereology, *Sexually Transmitted Infections*, 2015, 91(1), 68–69.

**Guilfoile PG, Hutchinson CR.** A bacterial analog of the *mdr* gene of mammalian tumor cells is present in *Streptomyces peucetius*, the producer of daunorubicin and doxorubicin, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991, 88(19), 8553-8557.

**Gyarmati P, Song Y, Hällman J, Källner M.** Chemical fragmentation for massively parallel sequencing library preparation, *Journal of Biotechnology*, 2013, 168(1), 95-100.

**Holmes AH, Moore LS, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, Piddock LJ.** Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance, *The Lancet*, 2016, 387(10014), 176-187.

**Hu G.** DNA Polymerase-catalyzed addition of nontemplated extra nucleotides to the 3' of a DNA fragment, *DNA and Cell Biology*, 1993, 12(8), 763-770.

**Huseby DL, Pietsch F, Brandis G, Garoff L, Tegehall A, Hughes D.** Mutation Supply and Relative Fitness Shape the Genotypes of Ciprofloxacin-Resistant *Escherichia coli*, *Molecular Biology and Evolution*, 2017, 34(5):1029-1039.

**Jeong H, Barbe V, Lee CH, Vallenet D, Yu DS, Choi SH, Hur CG.** Genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21 (DE3), *Journal of Molecular Biology*, 2009, 394(4), 644-652.

**Kapoor G, Saigal S, Elongavan A.** Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians, *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology*, 2017, 33(3), 300.

**Kothari C, Gaind R, Singh LC, Sinha A, Kumari V, Arya S, Deb M.** Community acquisition of  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae in neonatal gut, *BMC Microbiology*, 2013, 13(1), 136.

**Lederberg J.** Plasmid (1952–1997), *Plasmid*, 1998, 39(1), 1-9.

**Li H, Luo YF, Williams BJ, Blackwell TS, Xie CM.** Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies, *International Journal of Medical Microbiology*, 2012, 302(2), 63-68.

**Livermore DM, Hope R, Reynolds R, Blackburn R, Johnson AP, Woodford N.** Declining cephalosporin and fluoroquinolone non-susceptibility among bloodstream Enterobacteriaceae from the UK: links to prescribing change?, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, 68(11), 2667-2674.

**Mak S, Xu Y, Nodwell JR.** The expression of antibiotic resistance genes in antibiotic-producing bacteria, *Molecular Microbiology*, 2014, 93(3), 391-402.

**Marchuk D, Drumm M, Saulino A, Collins FS.** Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products, *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(5), 1154.

**Mead DA, Pey NK, Herrnstadt C, Marcil RA, Smith LM.** A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid, *Biotechnology*, 1991, 9(7), 657-663.

**Meletis G, Exindari M, Vavatsi N, Sofianou D, Diza E.** Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *Hippokratia*, 2012, 16: 303–307.

**Miyachiro MM, Contreras-Martel C, Dessen A.** Penicillin-Binding Proteins (PBPs) and Bacterial Cell Wall Elongation Complexes. In *Macromolecular Protein Complexes II: Structure and Function* (pp. 273-289), Springer, 2019, Cham.

**Mohr KI.** History of antibiotics research. In: Stadler M, Dersch P (Eds.), *How to Overcome the Antibiotic Crisis*, Springer, Cham, 2016, s 237-272.

**Murray IA, Gil JA, Hopwood DA, Shaw WV.** Nucleotide sequence of the chloramphenicol acetyltransferase gene of *Streptomyces acrimycini*, *Gene*, 1989, 85(2), 283-291.

**Nikaido H.** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited, *Microbiol, Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, 67(4), 593-656.

**Ogawara H.** Distribution of PASTA domains in penicillin-binding proteins and serine/threonine kinases of Actinobacteria, *The Journal of Antibiotics*, 2016, 69(9), 660-685.

**Öztürk R.** Antibiyotiklerin etki mekanizmaları, antimikrobik ilaçlara karşı direnç gelişmesi ve günümüzde direnç durumu, *İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu*, 1997, 27-51.

**Pandey N, Cascella M.** Beta Lactam Antibiotics, *StatPearls*, 04.06.2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545311/>

**Peterson E, Kaur P.** Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens, *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9, 2928.

**Prija F, Prasad R.** DrrC protein of *Streptomyces peucetius* removes daunorubicin from intercalated dnrI promoter, *Microbiological Research*, 2017, 202, 30-35.

**Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJ.** Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success, *Trends in Microbiology*, 2014, 22(8), 438-445.

**Ribeiro da Cunha B, Fonseca LP, Calado CR.** Antibiotic discovery: where have we come from, where do we go?, *Antibiotics*, 2019, 8(2), 45.

**Salih H, Oryaşın E, Bozdoğan B.** pADU94, Kloramfenikol Direncine Sahip Klonlama ve Ekspresyon Vektörü, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 2020, 50(1), 027-034.

**Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Preparation and Transformation of Competent *E. coli* using Calcium Chloride. In: Irwin N, Janssen K. (Eds.), *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2001. A. New York: cold Spring Harbor laboratory Press

**Sarkar P, Yarlagadda V, Ghosh C, Haldar J.** A review on cell wall synthesis inhibitors with an emphasis on glycopeptide antibiotics, *Medicinal Chemistry*, 2017, 8(3), 516-533.

**Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A.** Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol, *FEMS Microbiology Reviews*, 2004, 28(5), 519-542.

**Shakil S, Khan R, Zarrilli R, Khan AU.** Aminoglycosides versus bacteria—a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground, *Journal of Biomedical Science*, 2008, 15(1), 5-14.

**Stokes HW, Gillings MR.** Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens, *FEMS Microbiology Reviews*, 2011, 35(5), 790-819.

**Sugiyama M, Kumagai T.** Molecular and structural biology of bleomycin and its resistance determinants, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2002, 93(2), 105-116.

**Tabor, S.** Expression using the T7 RNA polymerase/promoter system, *Current Protocols in Molecular Biology*, 1990, 11(1), 16-2.

**Van Bambeke F, Balzi E, Tulkens PM.** Antibiotic efflux pumps, *Biochemical Pharmacology*, 2000, 60(4), 457-470.

**Wang B, Zheng F, Quan J, Li X, Liu Y, Sun B, ... Zhang J.** A PCR-based technique to construct T-vectors for high-throughput cloning of PCR products, *Analytical Biochemistry*, 2007, 2(363), 303-305.

**WEB\_1.** (2017) <http://parts.igem.org>. <http://parts.igem.org/Promoters>. (19.07.2020)

**WEB\_2.**(2019) <https://www.who.int/>. <https://www.who.int/emergencies/ten-threats-to-global-health-in-2019>. (19.07.2020)

**Zaman SB, Hussain MA, Nye R, Mehta V, Mamun KT, Hossain N.** A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. *Cureus*, 2017, 9(6).

**Zhou MY, Gomez-Sanchez CE.** Universal TA cloning, *Current Issues in Molecular Biology*, 2000, 2, 1-8.

## ÖZGEÇMİŞ

**Soyadı, Adı** : SALİH, Hanife  
**Uyruk** : T.C.  
**Doğum yeri ve tarihi** : Kayseri / 17.11.1994  
**E-mail** : hanifesalih94@gmail.com  
**Yabancı Dil** : İngilizce

### EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü (Moleküler Biyoloji ve Genetik)	2018

### BURSLAR ve ÖDÜLLER

Pseudomonas aeruginosa Suşları Üzerine Etkili Laboratuvarımızda Saflaştırılan Bakteriyofajların Fenotipik ve Genotipik Karakterizasyonu. TÜBİTAK 1001 Projesi, 218S464 (Bursiyer)

### AKADEMİK YAYINLAR

#### 1. MAKALELER

pADU94, Kloramfenikol Direncine Sahip Klonlama ve Ekspresyon Vektörü, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi

#### 2. PROJELER

Pseudomonas aeruginosa Suşları Üzerine Etkili Laboratuvarımızda Saflaştırılan Bakteriyofajların Fenotipik ve Genotipik Karakterizasyonu. TÜBİTAK 1001 Projesi, 218S464, 2019-2020 (Bursiyer)

Markersız Plazmid Amplikonuyla Direnç Geni Avcılığı, TÜBİTAK 1001 Projesi, 119Z640, 2020 (Hak Sahibi)

pRTA, yeni bir vektör ve TA klonlama: Bilinmeyen antibiyotik direnç genlerinin karakterizasyonu için yöntem, BAP yüksek lisans tezi projesi, TPF-19052, 2020 (Araştırmacı)



## **ÜYE OLUNAN BİLİMSEL KURULUŞLAR**

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Genç Bilim İnsanları Komisyonu (TMC-GençBil)