



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* TİP A
İNTOKSİKASYONLARI İÇİN KORUYUCU VE TEDAVİ
EDİCİ AMAÇLI REKOMBİNANT ENTEROTOKSİN,
ALFA VE BETA2 TOKSİN GELİŞTİRİLMESİ**

Alireza HANİFEHNEZHAD

**GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Fatma Seda BİLİR ORMANCI**

**ANKARA
2021**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* TİP A
İNTOKSİKASYONLARI İÇİN KORUYUCU VE TEDAVİ
EDİCİ AMAÇLI REKOMBİNANT ENTEROTOKSİN,
ALFA VE BETA2 TOKSİN GELİŞTİRİLMESİ**

Alireza HANİFEHNEZHAD

GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Fatma Seda BİLİR ORMANCI

ANKARA

2021

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* TİP A İNTOKSİKASYONLARI İÇİN KORUYUCU VE TEDAVİ EDİCİ AMAÇLI REKOMBİNANT ENTEROTOKSİN, ALFA VE BETA2 TOKSİN GELİŞTİRİLMESİ” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Alireza HANİFEHNEZHAD

Tarih:

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalında

Alireza HANİFEHNEZHAD tarafından hazırlanan

“*CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* TİP A İNTOKSİKASYONLARI İÇİN
KORUYUCU VE TEDAVİ EDİCİ AMAÇLI REKOMBİNANT ENTEROTOKSİN,
ALFA VE BETA2 TOKSİN GELİŞTİRİLMESİ ”” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri
tarafından YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY
ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

imza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Jüri Başkanı

imza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Raportör

imza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

imza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

imza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

imza
Unvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Clostridia</i>	3
1.2. <i>Clostridium perfringens</i>	5
1.2.1. <i>Clostridium Perfringens</i> 'in Genel Özellikleri	5
1.2.2. <i>Clostridium Perfringens</i> 'in Genetiği	8
1.2.3. <i>Clostridium Perfringens</i> 'in Virülans Faktörleri	9
1.2.4. Toksin Genlerinin Düzenlenmesinde İki-Kompotentli Regülatör Sistemlerin Roller	10
1.2.5. Virs/Virr Sistemi Tarafından Toksin Genlerinin Düzenlenmesi	11
1.3. Alfa Toksin (Cpa)	15
1.3.1. Rekombinant Cpa Üretim Stratejileri ve Hayvan Modeli Bağışıklamaları	16
1.4. Beta Toksin (Cpb)	21
1.4.1. Rekombinant Cpb Üretim Stratejileri ve Hayvan Modeli İmmünizasyonu	21
1.4.2. Rekombinant Alfa toksin ve bete toksin İmmünojenisite	24
1.5. <i>Clostridium perfringens</i> Enterotoksin(CPE)	28
1.5.1. Gastrointestinal (GI) Hastalıkta CPE'nin Önemi	28
1.5.2. CPE Proteinine Giriş	30
1.5.3. CPE'nin Genetiği	32
1.5.4. CPE Üretimi ve Regülasyonu	34
1.6. CPE'nin Hücresel Etkisi	38
1.7. CPE in vivo Etkiler	42
1.8. CPE'nin Aşı Olarak Kullanım Potansiyeli	43
1.9. <i>Clostridium Perfringens</i> Beta2 Toksin	44
1.10. <i>Clostridium Perfringens</i> Kaynaklı Enfeksiyon Hastalıklarının Patogenezi	45
1.10.1. Klostridyal Miyonekroz veya Gaz Kangren	45
1.10.2. Gıda İntoksikasyonu	46
1.10.3. Enteritis Nekrotikans	47
2. GEREÇ ve YÖNTEM	48
2.1. Gereç	48
2.1.1-Kullanılan Suşun Seçimi	48
2.1.2.Bakteri İzolasyon ve İdentifikasyon için Klasik Kültür yöntemler	48
2.1.2.1.Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC) Agar	48
2.1.2.2. Kanlı Agar	49

2.1.2.3. Cooked Meat Medium	49
2.1.2.4. Gram Boyama Gereçleri	49
2.1.2.4.1. Kristal Viyole	50
2.1.2.4.2. İyodin Solüsyonu	50
2.1.2.4.3. Alkol	50
2.1.2.4.4. Safranin	50
2.1.2.4.5. İmmersiyon Yağı	51
2.1.2.4.6. Işık Mikroskop	51
2.1.2.5. Laktoz Jelatin Medium	51
2.1.2.6. Nitrat Motilite Medium	52
2.1.2.7. Griess Ilosvay Ayraçları	53
2.1.2.7.1. Griess Ilosvay Solüsyonu A	53
2.1.2.7.2. Griess Ilosvay Solüsyonu B	53
2.1.2.7.3. Çinko Tozu	54
2.1.2.8. Hidrojen Peroksit Solüsyonu	54
2.1.2.9. Brain Heart Infusion Broth	54
2.1.2.10. Jar, Anaerojen Kit ve İndikatörü ile Parafin	55
2.1.2.11. Gliserol	55
2.1.3. Çalışmada Kullanılan Plasmid	55
2.1.4. Çalışmada Kullanılan Enzimler	57
2.1.5. Çalışmada Kullanılan <i>E.Coli</i> Suşları	57
2.1.6. Bakteri Besiyerleri	57
2.1.7. TBE Buffer	58
2.1.8. TE	58
2.1.9. DNA Ekstraksiyon	58
2.1.10. Primer Çiftleri	59
2.1.11. Jel Ekstraksiyon Kit	59
2.1.12. T4 DNA Ligaz	60
2.1.13. Thermo Scientific™ Genejet Plasmid Maxiprep Kit	60
2.1.14. IPTG (İzopropil B-D-L-Tiogalaktopiranosid	61
2.1.15. Magnehis™ Protein Purification System	61
2.1.16. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	61
2.1.16.1 Acrylamide/Bis (30% T, 2.67% C)	62
2.1.16.2. 1.5 M Tris-HCl	62
2.1.16.3. 0.5 M Tris-HCl	62
2.1.16.4. 10% (w/v) SDS	63
2.1.16.5. 2× SDS-PAGE	63
2.1.16.6. 10% (w/v) APS	63
2.1.16.7. SDS-PAGE	64
2.1.16.8. Coomassie Gel Stain	64
2.1.16.9. Coomassie Gel Destain	64
2.2.1. Kullanılan Suşun Seçimi ve Üretilmesi	65
2.2.2. Gram Boyama	66
2.2.3. Katalaz Testi	66
2.2.4. Laktoz Jelatin Testi	67
2.2.5. Nitrat Motilite Testi	67
2.2.6. Bakterilerin üretilmesi	68
2.2.7. DNA Ekstraksiyonu	69

2.2.8. Hedef Genom Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması	69
2.2.9. Rekombinant CPA Toksin (rCPA), CPE Toksin(rCPE), CPb2 Toksin(rCPb2) ekspresyonunun başlatılması	74
2.2.10. His-Tagged rCPA, rCPE ve rCPB2 Purifikasyonu	75
2.2.11. SDS-PAGE	76
2.2.12. Western Blot	77
2.2.13. Hücre Kültürü ve Rekombinant Proteinlerin Sitotoksosite Belirlemesi	78
3. BULGULAR	79
3.1. DNA Ekstraksiyonu	79
3.2. Pet-AH-CT-CPB2, Pet-AH-CT-CPE ve Pet-AH-CT-CPA Plasmidlerin Hazırlanması	80
3.3. Pet-AH-CT-CPB2, Pet-AH-CT-CPE ve Pet-AH-CT-CPA Plasmidlerin Doğrulanması	90
3.4. Pet-AH-CT-CPA, Pet-AH-CT-CPE ve Pet-AH-CT-CPB2 Plasmidlerin Western Blot'da Doğrulanması	91
3.5. Alpha, Enterotoksin ve CPB2 Rekombinant Proteinlerinin İn Vitro Toksik Aktivitesi	92
4. TARTIŞMA	95
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	101
ÖZET	103
SUMMARY	104
KAYNAKLAR	105
ÖZGEÇMİŞ	117

ÖNSÖZ

Aşılar, çoğunlukla patojenlerin zayıflatılmasına veya etkisizleştirilmesine dayalı olarak geliştirilmektedir. İmmünoloji, moleküler biyoloji, biyokimya, genomik ve proteomik alanındaki gelişmeler, aşılama alanına yeni bakış açıları kazandırmaktadır. Rekombinant proteinlerin kullanımı, birkaç koruyucu antijene karşı odaklanan bağışıklık tepkilerinin hedeflenmesine izin vermektedir. Gerekli özelliklere bağlı olarak büyük miktarlarda protein üretimine izin veren, farklı avantajlara sahip çeşitli ifade sistemleri bulunmaktadır. Kopyalanmayan plazmitlerden oluşan DNA aşıları, güçlü uzun vadeli hücresel bağışıklık tepkilerini indükleyebilmektedir. Prime-boost stratejileri, bağışıklık tepkisini genişletmek için farklı antijen dağıtım sistemlerini birleştirmektedir. Genel olarak, bu stratejilerin tümü avantaj ve dezavantajlar göstermektedir ve bunların kullanımı, hedef patojenin enfeksiyon mekanizmalarının ve koruma için gerekli olan bağışıklık tepkisinin bilinmesine bağlı olmaktadır.

Farklı etiyolojik ajanlardan gelen birkaç gen, aşı olarak test edilmek üzere klonlanmış, ifade edilmiş ve saflaştırılmıştır. Bakteri, maya, memeli hücreleri ve böcek hücreleri gibi antijenik protein bileşenleri için antijenik determinantı kodlayan DNA'nın eklenebildiği ve ifade edilebildiği çeşitli ifade sistemleri bulunmaktadır. Bununla birlikte, antijen ekspresyonu için sistem seçilmeden önce birkaç faktör dikkate alınmalıdır. Her bir spesifik ekspresyon vektörü ve promotör kullanılarak elde edilen ekspresyon seviyesi, seçilen markerler, rekombinant vektör tarafından translasyon sonrası modifikasyonun varlığı veya yokluğu, aşı olarak rekombinant antijenlerin üretiminin etkinliğine müdahale eden temel özelliklerdir. Bakteriyel ekspresyon sistemleri, kullanım kolaylığı ve yüksek düzeyde ekspresyon kapasiteleri nedeniyle en çok kullanılanlardır. Ancak, translasyon sonrası modifikasyonların (örn. glikosilasyon) gerekli olduğu antijenler için memeli veya böcek hücrelerinin kullanılması düşünülmelidir.

Günümüzde araştırılan aşıların çoğu, yüksek oranda saflaştırılmış rekombinant proteinlere veya patojenlerin alt birimlerine dayanmaktadır. Şu anda insanlarda kullanılan rekombinant protein aşılarının klasik örneği, hepatit B ve papilloma virüse karşı aşılardır.

Rekombinant proteinlere dayalı aşılar, güvenlik ve üretim maliyeti gibi geleneksel aşılarla karşılaştırıldığında çeşitli avantajlar sunsa da, çoğu tek başına verildiğinde zayıf veya zayıf immünojenisite gösterir ve bu nedenle koruyucu ve uzun süreli bir etki sağlamak için adjuvanların kullanılmasını gerektirmektedir.

Doktora eğitimi ve tez çalışmam süresince, desteğini ve bilgisini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Fatma Seda BİLİRORMANCI ve Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Tarık Haluk ÇELİK'e, tez jürilerim ve izleme komitesinde olan hocalarıma, Prof.Dr. Muammer GÖNCÜOĞLU, Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU, Prof.Dr. Yusuf DOĞRUER ve Doç. Dr. Erhan KEYVAN'a teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Aykut ÖZKUL'dan bu tez çalışması sırasında viroloji labratuvar ortamını kullandığım için teşekkür ediyorum. Son olarak aileme ve hayatıma sevgi katan hayat yoldaşım ve ömür dostuma teşekkürlerimi borç biliyorum.

SİMGELER VE KISALTMALAR

aa	Amino Acids
ATCC	American Type Culture Collection, Amerikan Tip KültKoleksiyonu
ATP	Adenozin Trifosfat
aw	Activity of Water, Su Aktivitesi
bp	Base Pair, Baz Çifti
CDC	Amerika Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi
CPA	<i>C. perfringens</i> Alpha Toksin
<i>Cpa</i>	<i>Clostridium perfringens</i> Alfa Toksin Geni
<i>Cpb2</i>	<i>Clostridium perfringens</i> beta 2 Toksin Geni
CPE	<i>C.perfringens</i> Enterotoksin
<i>cpe:</i>	<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoksin Geni
CPE:	<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoksini
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic Acid, Deoksiribonükleik Asit
dNTP	3'-Dideoxyribonucleoside 5 '-Triphosphate
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EYDT	Egg Yolk Diffusion Test

FBS	Foetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration, Amerika Gıda İlaç Dairesi
kDA	Kilo Dalton
kob	Koloni Oluşturan Birim
MAB	Monoclonal Antibody
Mb	Megabase Pair, Mega Baz Çifti
MID	Minimal İnfeksiyon Dozu
mM	Milimolar
MW	Molecular Weight
NCTC	National Collection of Type Cultures
ON	Overnight
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PLC	Phospholipase C
Rpm	Revolutions Per Minute
RT	Room Temperature
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SFP	Shahidi Fergosen Perfringens
TSC	Tryptose Sulphite Cycloserine
WHO	World Health Organization, Dünya Sağlık Örgütü
µm:	Mikrometre

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. <i>Clostridia</i> 'nın Filogenetik İlişkisi	4
Şekil 1.2. Shahidi Ferguson Perfringens Agar Üzerinde <i>Clostridium Perfringens</i> Üremesi, Siyah Koloniler Üreten Sülfid İndirgemesi ve Opak Bir Hale Üreten Lesitinaz Aktivitesi ile Karakterize Edilmektedir	7
Şekil 1.3. Blood Agar Üzerinde, <i>Clostridium Perfringens</i> Üremesi, Çift Hemoliz Zonları ile Karakterize Edilmesi Gösterilmektedir	7
Şekil 1.4. <i>Clostridium Perfringens</i> Alfa Toksin(CPA) Yapısı ve Rekombinant Antijen Olarak Üretimi için Ana Stratejiler	19
Şekil 1.5. <i>Clostridium Perfringens</i> Beta Toksin (CPB) Yapısı ve Rekombinant Bir Antijen Olarak Üretimi için Ana Stratejiler	23
Şekil 1.6. CPE Üretiminin Regülasyonu için Model	37
Şekil 1.7. <i>C. Perfringens</i> Enterotoksininin Etki Mekanizması	40
Şekil 2.1. Bu Çalışmada Kullanılan Plazmidinpet28a(+) Genom Haritası	56
Şekil 2.2. Pet28a (+) Klonlama ve Ekspresyon Bölgesi	56
Şekil 2.3. Cooked Meat Medium Besiyerinde Anaerobik Ortam Olarak Stoklanan <i>C.Perfringens</i> Suşları. B). <i>C. Perfringens</i> Şüpheli Kolonilerin TSC Agarda Görünümü	65
Şekil 2.4. Katalaz Test. A) Katalaz Pozitif; A) Katalaz Negatif Bakteri	66
Şekil 2.5. Laktoz Jelatin Testi	67
Şekil 2.6. <i>C. Perfringens</i> Şüpheli Kolonilerde Jelatinaz Aktivitesi Testi	67
Şekil 2.7. <i>C. Perfringens</i> Kolonileri için Yapılan Motilite ve Nitrat Redüksiyonu Testi	68

Şekil 3.1. DNA Lader,2: Alpha Toksin-Full, 3: C-Terminal-Alpha Toksin, 4: CPE-Full, 5: C-Terminal-CPE, 6: Cpb2 Full, 7: C-Terminal Cpb2	80
Şekil 3.2. Pet28(A) Vektör Kesimi	81
Şekil 3.3. Pet-CT-Alfa Konstraktın Doğrulanması	81
Şekil 3.4. Pet28-CT-CPE Konstraktın Doğrulanması	82
Şekil 3.5. Pet-CT-Cpb2 Konstraktın Doğrulanması	82
Şekil 3.6. Tez çalışmasında kullanılan DNA Ladder	83
Şekil 3.7. Pet-AH-CT-Alpha ve ktörün Genom Haritası	84
Şekil 3.8. Pet-AH-CT-Cpe ve ktörün Genom Haritası	85
Şekil 3.9. Pet-AH-CT-Cpb2ve ktörün Genom Haritası	86
Şekil 3.10. Pet-AH-CT-Cpe ve ktörün Genom ve Klonlanan Bölgenin Haritası	87
Şekil 3.11. Pet-AH-CT-Cpb2 ve ktörün Genom ve Klonlanan Bölgenin Haritası	88
Şekil 3.12. Pet-AH-CT-Cpa ve ktörün Genom ve Klonlanan Bölgenin Haritası	89
Şekil 3.13. Pet-AH-CT-CPA, Pet-AH-CT-CPE ve Pet-AH-CT-CPB2 ve Plasmidlerin Doğrulanması	90
Şekil 3.14. Pet-AH-CT-CPA, Pet-AH-CT-CPE ve Pet-AH-CT-CPB2 ve Plasmidlerin Western Blotd'a Doğrulanması	91
Şekil 3.15. Alpha Rekombinant Proteinlerinin İn Vitro Toksik Aktivitesi	92
Şekil 3.16. Enterotoksin Rekombinant Proteinlerinin İn Vitro Toksik Aktivitesi	93
Şekil 3.17. CPB2 Rekombinant Proteinlerinin İn Vitro Toksik Aktivitesi	94

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. <i>Clostridium Perfringens</i> 'in Toksinleri	9
Çizelge 2.1. Kullanılan Kesim Enzimleri ve Markası	57
Çizelge 2.2. Bakteri Besiyerlerinin Hazırlanması	58
Çizelge 2.3. Bu Çalışma İçin Primerler CLC, Main Workbench, Danimarka İle Tasarlandı	59
Çizelge 2.4. Çalışmada Kulalanan Primerler	70
Çizelge 2.5. Alpha-Full İçin PCR Miks Bileşenleri ve Programı	70
Çizelge 2.6. CT-Alpha İçin PCR Miks Bileşenleri ve Programı	71
Çizelge 2.7. Cpe-Full İçin PCR Miks Bileşenleri ve Programı	71
Çizelge 2.8. CT-Cpe İçin PCR Miks Bileşenleri ve Programı	71
Çizelge 2.9. Cpb2-Full İçin PCR Miks Bileşenleri ve Programı	72
Çizelge 2.10. CT- Cpb2 İçin PCR Miks Bileşenleri ve Programı	72
Çizelge 2.11. Pet-28a(+) Vektörünün ve PCR Ürünleri İçin Kullanılan Kesim Protokolü	73
Çizelge 2.12. Pet-28a(+) ve ktörünün ve PCR Ürünleri İçin Kullanılan T4 Ligaz İle Ligasyon Protokolü	73
Çizelge 2.13. Elde Edilen Klonanan Plazmitlerin (Pet28-AH-CT-Cpb2, Pet28-AH-CT-Cpe ve Pet28-AH-CT-Cpa) Doğrulanması İçin Koloni PCR Miks Bileşenleri ve Programı	74
Çizelge 2.14. SDS-Poliakrilamid Jellerinin Hazırlanması	77
Çizelge 3.1. <i>C.Perfringens</i> 'in İdentifikasyonu İçin Kullanılan Biyokimyasal Testler	79

1.GİRİŞ

Clostridium perfringens alfa toksin gaz kangreninde, hemoliz, trombosit agregasyonunda, kan damarlarının kasılmasında, süperoksit üretiminde, sitokin storm oluşumunda ve sonuç olarak ölüm meydana gelmesinde önemlidir. *C. perfringens* enterotoksin (CPE) gıda kaynaklı ve gıda kaynaklı olmayan insan gastrointestinal hastalıklarından ve gastrointestinal semptomlardan sorumludur. Nekrotik enteritte önemli virulans faktör olan *C. perfringens* beta2 toksini (CPB2) insanlar ve evcil hayvanlardaki gastrointestinal hastalıklarda potansiyel bir aksesuar toksini olarak tespit edilmektedir. Rekombinant toksin, *Clostridial* toksinlere karşı potansiyel koruyucu ve tedavi edici adaylar olarak tanımlanmaktadır.

Önerilen tez çalışmasının konusu, *Clostridium perfringens* tip A intoksikasyonları için koruyucu ve tedavi edici amaçlı rekombinant enterotoksin, Alfa ve Beta2 toksin geliştirilmesidir. *Clostridium perfringens*, *Clostridiaceae* familyasında, anaerobik, gram pozitif, sporlu, hareketsiz, çubuk formunda bir bakteridir. Etken alfa, beta, gama, epsilon ve iota toksinleri ile lesitinaz, hemolizin, hiyaluridaz, kollogenaz, DNase (deoksiribonükleaz) ve amilaz gibi hidrolitik enzimlerine göre A, B, C, D ve E olmak üzere tiplendirilir. *Clostridium perfringens*, doğada, hayvanların ve insanların bağırsaklarında yaygın olarak bulunan bir bakteridir (Linch ve ark, 2006; Maclane ve ark., 2013). *Clostridium perfringens* toksinlerinin *Clostridium perfringens*'in neden olduğu ve hafif seyirli gıda infeksiyonlarından, ölümcül nekrozlara kadar değişebilen hastalık tablolarının oluşumunda etkili 16 farklı virülens faktörü bulunmaktadır. Bunlardan 12 tanesi ürettiği toksinlerdir. Diğer önemli virülens faktörleri arasında enterotoksin, hemolizin, nöraminidaz (sialidaz) ve etkenin dinamik metabolik aktivitesi yer aldığı bildirilmektedir (Rodd ve Cole, 1991).

Bu tez çalışmasında, *Clostridium perfringens* intoksikasyonları için koruyucu ve tedavi edici amaçlı rekombinant enterotoksin, alfa ve beta2 toksin geliştirildi. Bu amaçla dünya çapında ve özellikle Türkiye' de en sık izole edilen *C.perfringens* type

A' ya karşı rekombinant toksinler geliştirilmiştir. Bu rekombinant proteinler koruyucu ve tedavi amaçla kullanıma hazırlanmıştır. Hazırlanan proteinler immün serum olarak gıda enfeksiyonların'da tedavi amaçlı kullanılabilir. Ayrıca *C.perfringens* teşhis kiti olarak enfeksiyona neden olan toksinlerin belirlenmesinde öneme sahiptir. Bu alışma ülkeye ekonomik olarak katkı sağlayacaktır. Bu tez alışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinasyon Birimi Koordinatrlė (BAP) tarafından desteklendi.

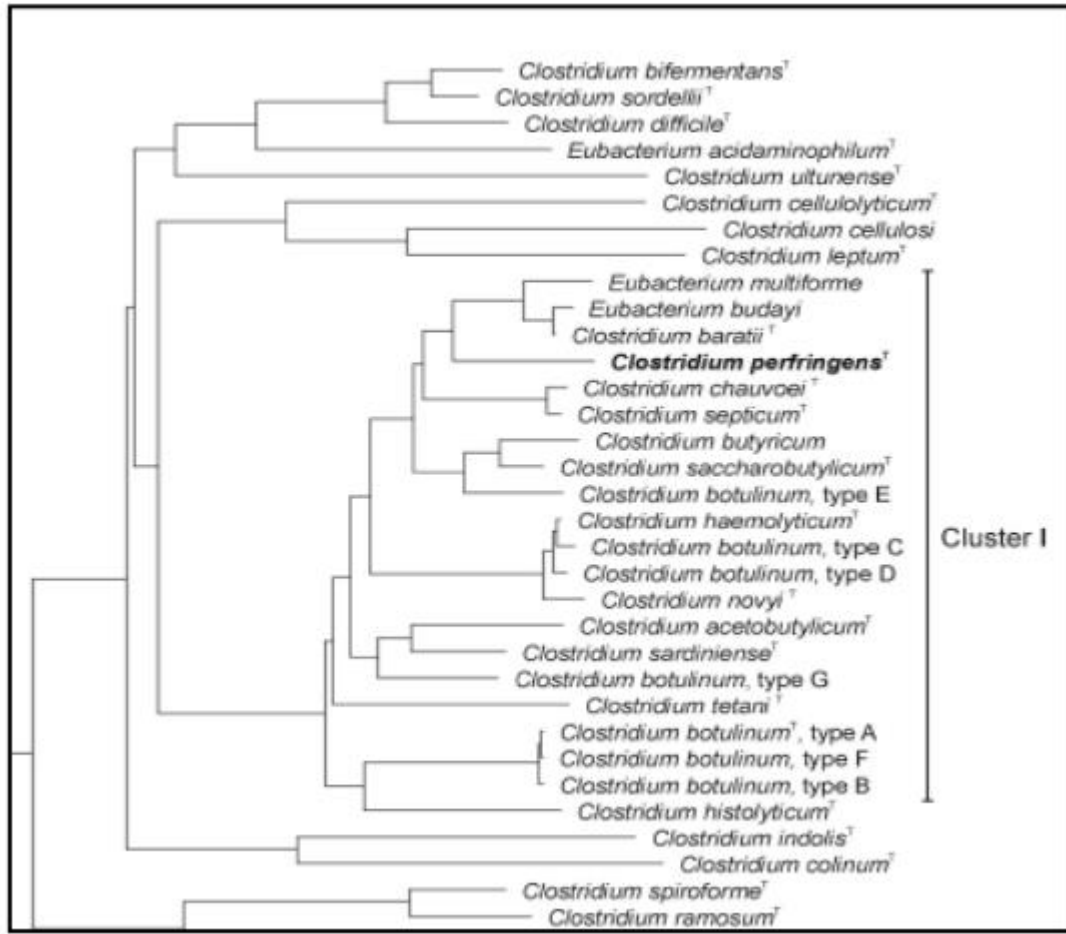


1.1. *Clostridia*

Clostridium genusu ilk olarak 1880'de Prazmowski tarafından tanımlanmıştır. Bu genus, farklı organizmalarda Gram pozitif, anaerobik, ısıya dayanıklı endosporlardan oluşması bildirilmektedir. *Clostridium* genus üyeleri, gram pozitif bakterilerin erken evriminde ortaya çıkan ortak bir aileden gelen tür olarak kabul edilmektedir. *Clostridial* türlerin yaklaşık üçte ikisi çevrede, hayvanlarda ve çürüyen bitki örtüsünde yaşayan zararsız saprofit olarak bilinmektedir. Bu genus, 35'i insanlarda ve hayvanlarda patojen olarak kabul edilen 120 farklı türden oluştuğu bildirilmektedir (Shimizu ve ark., 2002; Gohari ve ark., 2021).

Homoloji çalışmalarında, 23S rRNA moleküllerini kullanım sonucunda, 56 *Clostridial* türü dört major gruba ayrılmaktadır. Grup I ve II, düşük G+C içerikli (%24-32) iyi tanımlanmış türlerden ve grup III, başka bir gruba uymayan düşük G+C içerikli türlerden oluşmaktadır. Ayrıca Grup IV, yüksek G+C içeriğine sahip organizmalardan (%41-42) oluşması bildirilmektedir (Lyras ve Rood, 2006).

Clostridium genusunun 16S rDNA'ya dayalı filogenetik sınıflandırması, birkaç grup tarafından geniş çapta rapor edilmektedir. Ayrıca 16S rDNA dizilimine dayalı olarak, *Clostridium* genusu 120 doğru tanımlanmış türden oluşmaktadır. Stackebrandt ve ark. (1999), 16S rDNA analizine dayalı olarak *Clostridium* genusu için 19 farklı küme tanımlamaktadır. Filogenetik analiz, cinsin aheterojen organizmalar grubundan oluştuğunu göstermektedir. *Clostridium botulinum* ve *C. perfringens*, aynı kümeye ait gıda kaynaklı *clostridial* patojenler olarak belirlenmektedir (Şekil 1.1; Johanson ve ark., 2006).



Şekil 1.1. *Clostridia*'nın filogenetik ilişkisi (Johanson ve ark., 2006).

Toksin üreten bakteri türleri arasında en fazla toksin üreten bakteri genusu *Clostridia*'dır. Birkaç *Clostridial* toksini kodlayan genler, bütünleştirici olmayan lizojenik bakteriyofaj veya plazmitler üzerinde bulunmaktadır. Ekstrakromozomal elementler üzerinde virülans genlerinin varlığı, genetik instabilite ve nontoksijenik yapılara yatay gen transferi gibi fenotipik özellikler ile sonuçlanmaktadır. Patojenik *Clostridia* tarafından üretilen güçlü hücre dışı toksinler, patojenik *Clostridial* türlerin ortak bir özelliği olan hücre ve doku hasarına neden olmaktadır. Patojenik *Clostridia*, konakçı doku afinitelerine göre genel olarak üç grup olarak; nörotoksik, histotoksik ve enterotoksik *Clostridia*'dan oluşturulduğu bildirilmektedir (Lyras ve Rood, 2006; Gohari ve ark., 2021).

Özet olarak, *Clostridial* genusu, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. difficile* ve *C. tetani* gibi önemli patojenik türleri içerdiği bildirilmektedir. *Clostridia* genusu içindeki patojenik türlerin, konakçı doku üzerinde öldürücü etkileri olan güçlü toksinler ürettiği bilinmektedir. Bu virülans faktörlerini kodlayan genler, plazmitler üzerinde bulunur ve yatay gen transferi yoluyla edinildiği bildirilmektedir. Bu zoonotik organizmalar öncelikle toprak kaynaklıdır ve fırsatçı koşullar altında çok çeşitli memeli ve kuş türlerinde enfeksiyona neden olabildiği bildirilmektedir.

1.2. *Clostridium perfringens*

1.2.1. *Clostridium perfringens*'in Genel Özellikleri

Louis Pasteur 1861'de, ilk keşfedilen *clostridia* türü olarak *Clostridium butyricum*'u bildirmektedir. Amerikalı mikrobiyologlar Welch ve Nuttall tarafından 1892'de, gangrenli yaralardan gram pozitif, anaerobik bir organizma izole edildi ve organizma daha sonra *Clostridium* olarak tanımlandığı bildirilmektedir. Organizma, aşağıdaki gibi çeşitli isimlerle tanımlandığı bildirilmektedir: *Bacillus aerogenus capsulatus*, *Bacillus perfringens*, *Bacillus welchii* ve *Clostridium welchii*. Organizma şimdi *Clostridium perfringens* olarak bilinmektedir. Yüksek üreme hızı, oksijen toleransı ve genetik mekanizmasının manipülasyonu özellikleri nedeniyle, *C. perfringens*, toksijenik *clostridia* içinde bir prototip tür olarak bilindiği bildirilmektedir (Fisher ve ark., 2006; Kiu ve Hall, 2018).

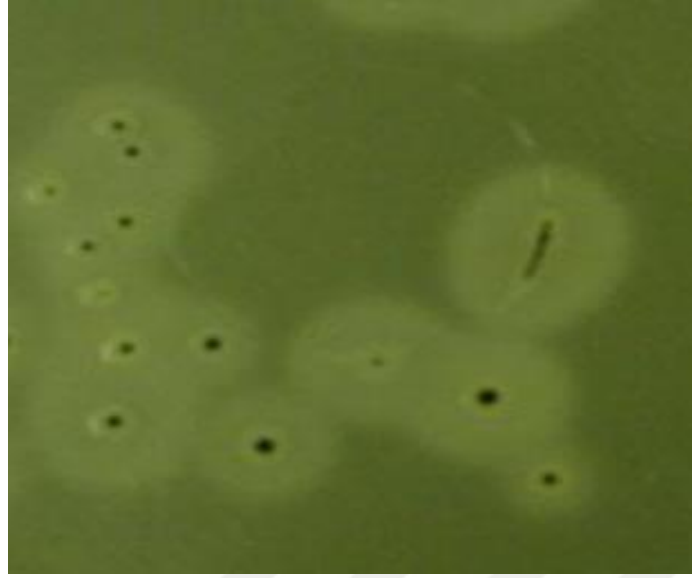
Clostridium perfringens, firmicutes filum (gram pozitif hücre duvarı bakterileri) içindeki *Clostridia* sınıfına ait olduğu bildirilmektedir. Filum içinde kümelenen diğer bakteri sınıfları *Clostridia* ile *Bacillales*, *Lactobacillales* ve *Mollicutes* varlığı bilinmektedir. *C. perfringens*, *Clostridiales* takımından(order), *Clostridiaceae* familyasında yer almakla birlikte *C.difficile*, *C. septicum*, *C. botulinum* ve *C. tetani* gibi

diğer önemli bakteriyel patojenlerle birlikte bulunmaktadır. *C. perfringens*; Gram pozitif, fakültatif anaerob (aerotolerant), hareketsiz, subterminal formda spor oluşturan, çubuk (rod) şeklinde; 0,6-2,4 µm genişliğinde ve 1,3- 9,0 µm uzunluğunda bir bakteri olarak bilinmektedir. Spor formu oval ve subterminaldir. Diğer Gram pozitif bakteriler gibi, *C. Perfringens*' de stoplazmik lipit membran, teikoik asitler ve kapsül polisakkaritlerini içeren kalın bir peptidoglikan katmandan oluşmaktadır. *C. perfringens* katalaz, oksidaz, indol negatif, lesitinaz (alfa toksin), ve kollajenaz pozitif, laktozu fermente edebilen, beta hemolitik, nitratı nitrite indirgeme ve sülfid indirgeme özelliğine sahip olduğu bildirilmektedir (Hailegebreal, 2017; Gohari ve ark., 2021).

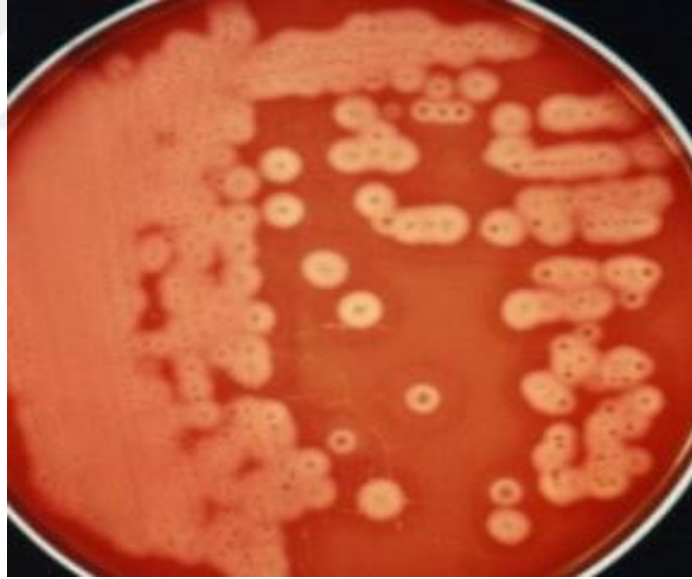
C. perfringens gelişimi 5,1- 9,7 aralığındaki pH'de ve optimum pH 6-7 aralığında değişmektedir. Sporlanma 5,1 ile 9,9 pH aralığında oluşmaktadır. *C. perfringens* 0,94-0,97 aralığındaki su aktivitesinde, 42-50°C sıcaklık aralığında gelişimini sürdürebilmektedir ve üreme, yüksek miktarda gaz (H₂) üretimi ile karakterize edildiği bildirilmektedir (Li ve McClane, 2006).

Clostridium perfringens anaerobik bir organizma olarak sitrik asit döngüsünden yoksundur ve aerobik solunum yoluyla ATP üretimi için gerekli genlere sahip değildir. *Clostridium perfringens*, enerjisini anaerobik fermantasyon yoluyla elde etmektedir. Bu fermantasyon sonucu asetik asit, butirik asit ve laktik asit ürünleri üretilmektedir (Fisher ve ark., 2006).

Egg yolk agar media plakları üzerinde üreyen *C. perfringens* lesitinaz aktivitesi ile karakterize edilirken, Shahidi Ferguson Perfringens (SFP) agar üzerindeki üreme, lesitinaz reaksiyonu ile birlikte siyah koloniler üreten sülfid indirgemesi ile karakterize edilmektedir. *C. perfringens* kolonilerinin kanlı agar plakları üzerinde çift hemoliz bölgeleri üretmekte ve bu reaksiyon *C. perfringens*'in özel tanımlaması için kullanıldığı bildirilmektedir (Allen ve ark., 2003)



Şekil 1.2. Shahidi Ferguson perfringens agar üzerinde *Clostridium perfringens* üremesi, siyah koloniler üreten sülfid indirgemesi ve opak bir hale üreten lesitinaz aktivitesi ile karakterize edilmektedir (Allen ve ark.,2003).



Şekil 1.3. Blood agar üzerinde, *Clostridium perfringens* üremesi, çift hemoliz zonları ile karakterize edilmesi gösterilmektedir (Allen ve ark., 2003).

Clostridium perfringens enerjisini mevcut besin kaynaklarının çürümesinden ve asidik yan ürünlerin oluşumundan almaktadır. Bakterinin bu anaerobik yaşam döngüsü, *C. perfringens* ile ilgili çeşitli patolojilerin gelişmesine yol açmaktadır.

Memeli gastrointestinal sistemi, organizmanın optimum gelişmesi ve çoğalması için gerekli olan iyi bir karbon kaynağı, yüksek sıcaklık ve diğer beslenme faktörlerini tamin etmektedir. Ayrıca, bağırsak fizyolojik dengesinin bozulması, *C. perfringens*'in çoğalmasını etkilemekte ve patojenik toksinlerin üretimini etkilediği bildirilmektedir (McClane, 2007).

1.2.2. *Clostridium perfringens*'in Genetiği

Clostridial türlerin genom boyutu 2 ila 6,5 Mbp arasında değişmektedir. *C. perfringens*'in üç suşunun genom dizisini diğer patojenik *clostridia*'lar ile karşılaştırılması sonucunda ortalama GC içeriğinin yaklaşık %28 olduğunu göstermektedir. *C. perfringens*'in genom boyutu 3-4 Mbp arasında değişildiği bildirilmektedir (Myers ve ark., 2006).

Shimizu ve ark. (2002), *C. perfringens*'in virölansla ilgili genlerinin kolonizasyon faktörleri ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Diğer bakterilerde tanımlanan hemolizine benzeyen beş olası hemolizin geni tespit edilmektedir. *C. perfringens*'in farklı toksin tiplerinin, plazmitler ve transpozonlar gibi kromozom dışı elementlerin edinilmesi yoluyla evrimleşmiş olabileceği bildirilmektedir (Johansson ve ark., 2006).

Clostridium perfringens'in, alfa toksin, beta toksin, teta toksin, iota toksin, epsilon toksin, kappa toksin ve ayrıca sialidaz dahil olmak üzere birçok hücre dışı toksin ve enzim üretme yeteneğine sahip olduğu bildirilmektedir. Yukarıda bahsedilen toksin üretimine ek olarak, bazı *C. perfringens* suşları enterotoksin ve yeni bir beta2 toksini de üretebildiği bildirilmektedir (Gurjar ve ark., 2007).

Alfa ve teta toksin kodlayan genler kromozom üzerinde bulunurken, diğer toksinleri kodlayan genler plazmitlerde bulunduğu bildirilmektedir. Enterotoksin (*cpe*) hem kromozomal hem de plazmidal genler tarafından sentezlenmektedir. Gıda zehirlenmesi izolatlarında enterotoksin (*cpe* geni) kromozomal, gıda zehirlenmesi olmayan insan gastrointestinal hastalık izolatlarında ve veteriner izolatlarında, plazmidal genler tarafından sentezlendiği bildirilmektedir (Uzal ve ark., 2014; Hassan ve ark., 2015).

Çizelge 1.1. *Clostridium perfringens*'in toksinleri (Johansson, 2006).

Toksin	Gene lokasyonu	Biyolojik aktivite
Alpha	kromosome	Sitolitik, hemolitik, dermonekrotik, letal
Theta	kromosome	Hemolitik, konakçı inflamatuvar yanıtının modülasyonu
Enterotoksin	kromosome/ Plasmid	Sitolitik, su ve iyon kaybı, Letal
Beta	Plasmid	Sitolitik, dermonekrotik, letal
Epsilon	Plasmid	Karaciğer, böbrek, sinir sisteminde ödemler
Iota (Ia & Ib)	Plasmid	Aktin hücre iskeletinin bozulması ve hücre zarı bütünlüğünü etkiler
Beta2	Plasmid	sitotoksik, letal

1.2.3. *Clostridium perfringens*'in virülans faktörleri

Clostridium perfringens, doğada, özellikle toprakta, insan ve hayvanların bağırsak yollarında yaygın olarak bulunan Gram pozitif anaerobik spor oluşturan bir bakteri olduğu bildirilmektedir. İnsanlarda klostridial miyonekroz (gazlı kangren) ve hafif enterotoksemiye neden olmaktadır. *C. perfringens*, ana toksin (α -, β -, ϵ - ve ι -toksinler) üretimine bağlı olarak beş tipe (A'dan E'ye kadar tipler) ayrıldığı bildirilmektedir. Ayrıca α -toksin (CPA), tüm *C. perfringens* tiplerinde korunmakta ve

yapısal gen kromozom üzerinde bulunmaktadır. Plazmid üzerinde yer alan diğer toksinler *C. perfringens*'in sınıflandırılması β -toksin (CPB, *cpb* geni), ϵ -toksin (ETX, *etx* geni) ve ι -toksin (ITX, *iap* ve *ibp* geni) kodlayan plazmitlerin varlığına dayandığı bildirilmektedir. *C. perfringens* tipleri arasında A tipi insanlarda patojen olarak kabul edildiği bildirilmektedir (Gohari ve ark., 2021).

Bir konakçı organizmada *C. perfringens*'in, gelişmesi için hem konak dokular küçük boyutlu besinlere parçalanmalı hem de besinlerin bakteri hücrelerine hızlı bir şekilde taşınması gerektiği bildirilmektedir. *C. perfringens*'in bu yeteneği, konakçıda hayatta kalmasını ve gelişmesini sağlamaktadır. *C. perfringens* gelişmesinde, konakçıdan elde ettiği şekeri anaerobik glikoliz yoluyla enerji üretmek için kullanmakta ve bu sırada bol miktarda gaz ürettiği bildirilmektedir (Ohtani ve Shimizu., 2016).

C. perfringens toksinleri spesifik gen düzenleyici sistemler tarafından düzenlenmektedir. Örneğin, bir *C. perfringens* tip A suşu tarafından *Clostridium perfringens* enterotoksin (CPE) üretimi, yalnızca bakteri sporlandığında gerçekleşmektedir. Ayrıca, birçok toksin geni, VirS/VirR iki bileşenli sistem ve bir yardımcı gen regülatör quorum-sensing sistemi tarafından düzenlendiği bildirilmektedir (Ohtani ve Shimizu., 2016; Gohari ve ark., 2021).

1.2.4. Toksin Genlerinin Düzenlenmesinde İki- Komponentli Regülatör Sistemlerin Roller

İki-komponentli sistemler, ortamın bileşimini algılamakta ve bilgileri hücreye iletmektedir. Normalde, bir iki-komponent sistem, zara bağlı histidin kinaz sensöründen (çevreyi veya uyarımları algılayan) ve transkripsiyonel regülatör olarak görev yapan bir sitoplazmik yanıt regatörden oluştuğu bildirilmektedir. Gen ekspresyonunu düzenleyen histidin kinaz sensörü, bir fosfat grubunu yanıt regülatöre

transfer ederek etkinleştirmektedir. *C. perfringens*- 13 suş genomunda iki-komponentli regülatör sistemlerinde 48 genin olduğu bildirilmektedir. Bu genlerin 28'i histidin kinaz sensörü genleridir ve diğer 20 gen yanıt regülatörleri olarak bildirilmektedir (Shimizu ve Ohtani., 2002).

1.2.5. VirS/VirR Sistemi Tarafından Toksin Genlerinin Düzenlenmesi

C. perfringens'teki önemli iki- komponentli düzenleyicilerden biri VirR/VirS sistemi bildirilmektedir. Araştırmacılar tarafından VirR/VirS sisteminin a-toksin geni *plc* , κ -toksin geni *colA* ve θ -toksin geni *pfoA* için düzenleyici olduğu belirtilmiştir. VirS, bir hidrofobik N-terminal alanına sahiptir ve bu bölge transmembran 4 ve 5 arasında bir sitoplazmik döngüde ve histidin kinaz sensörler C- terminal alanında yer aldıkları bildirilmektedir (Lyristis ve ark., 1994).

plc, *pfoA* ve *colA* toksin genleri VirS/VirR sistemi tarafından düzenlenmektedir. *pfoA* geni, majör ve minör promotörlere sahiptir, majör promotör VirS/VirR sisteminen etkilenmektedir. *ColA* geni yalnızca bir tanesi VirR/VirS sistemine bağlı olan iki major promotöre sahipken *plc* geni, VirR/VirS sisteminden etkilenen yalnızca bir promotöre sahip olması bildirilmektedir (Ba-Thein, 1996).

VirS/VirR sistemi kromozom üzerinde bulunmasına rağmen hem kromozom hem de plazmit üzerindeki genleri düzenlediği bildirilmektedir. Örneğin, *C. perfringens* tip A13 suşunda plazmitler üzerinde bulunan kollajen-adhesin geni (*cna*) negatif olarak düzenlenirken *cpb2*, sistem tarafından pozitif olarak düzenlendiği bildirilmektedir (Ohtani ve ark, 2003).

C. perfringens suşları, majör toksinlerin üretimine bağlı olarak A-E tiplerine ayrılmakta ve α -toksin geni dışında, majör toksinlerin genleri plazmit üzerinde bulunmaları bildirilmektedir. VirS/VirR, CPB üretiminin düzenlenmesi yoluyla C tipi suşların patojenitesine katkıda bulunmakta ve bu sistemin hem kromozom hem de plazmit üzerindeki genleri kontrol ettiğinden dolayı önemli bir düzenleyici olduğu bildirilmektedir (Ma, 2011).

C. perfringens tipe E suşları tarafından, İota toksin aktif olmayan bir formda üretilmekte ve bu toksini aktive etmek için proteaz tarafından proteoliz olması gerekmektedir. VirS/VirR düzenleyeci sisteme bağlı bir proteaz tarafından bu işlemin gerçekleştirildiği bildirilmektedir. Bu verilere bağlı olarak, VirS/VirR sistemi proteoliz için gerekli olan proteaz aktivitesini regüle ederek İota toksininin aktivitesini etkilediği bildirilmektedir (Gibert ve ark., 2000).

C. perfringens ürettiği toksinlere göre (CPA, CPB, ETX ve CPI), beş toksinotipe (A–E) gruplandığı bildirilmektedir. Her bir toksin tipi, hayvanlarda ve insanlarda farklı hastalıklara neden olmaktadır. Alfa toksin (CPA, *cpa* gen); tüm *C. perfringens* tiplerinde bulunmakta ve kromozomal gen tarafından sentezlenmektedir. Beta toksin (CPB, *cpb* gen), epsilon toksin (ETX, *etx* gen), İota toksin (ITX, *iap* ve *ibp* gen) bazı *C. perfringens* tiplerinde bulunmakta ve plazmidal genler tarafından sentezlenmektedir. PFO (perfringolizin O, θ ; teta toksin) kromozomal ve enterotoksin ise hem kromozomal hem de plazmidal genler tarafından sentezlendiği bildirilmektedir (Hassan ve ark., 2015; Uzal ve ark., 2014; Gohari ve ark., 2021).

C. perfringens hayvanlara ve insanlara iki ana yol ile bulaşmaktadır. Birinci yol iatrojenik veya travmatik yoldur, *C. perfringens* toksinotip A'ya özeldir ve gazlı kangrene veya malign ödemlere neden olduğu bildirilmektedir. İkinci yol, sporların yutulmasıdır. Sporların yutulması, *C. perfringens*'in aşırı üremesine ve buna bağlı olarak bağırsak florasında değişiklikler meydana gelmesine sebep olmakla birlikte

toksin üretimi sonucu enterotoksemi, nekrotik hemorajik enterit ve enterokolite neden olmaktadır. Bu ikinci enfeksiyon yolu, tüm toksin tiplerinde ortak olduğu tespit edilmektedir. CPA, CPB ve ETX'in neden olduğu hastalıklar, yüksek öldürücülük oranları ve yüksek zooteknik performansa sahip çiftlik hayvanlarını etkiledikleri için dünya çapında önemli ekonomik kayıplardan sorumlu olduğu bildirilmektedir (Dutra, 2016).

C. perfringens enfeksiyonlarının tedavisinde penisilin G, hiperbarik oksijen ve monoklonal antikorlar ve etkilenen dokuların cerrahi olarak çıkarılması bildirilmektedir (Lebrun ve ark., 2010; Garcia ve ark., 2014).

İnsanlarda bu tedaviler bir alternatif olarak tercih edilebilirken çiftlik hayvanları için bu seçenekler, ölüm çok hızlı gerçekleştiğinden genellikle geçerli değildir, bu nedenle, *C.perfringens* enfeksiyonlarına karşı profilaktik önlemlerin alınması araştırmalara bağlı olarak gerektiği bildirilmektedir (Veschi ve ark., 2012).

Bu alternatiflere rağmen şu anda CPA, CPB ve ETX toksinlerine karşı aşılama en iyi profilaktik önlemi olarak bildirilmektedir. Toksoidler, *C. perfringens*'ten elde edilmekte ve formaldehit kullanarak toksinlerin inaktive edilmesi sonucu elde edildiği bildirilmektedir (Lobato ve ark, 2010).

Toksoidler, nötralizan antikorların üretimini indüklese de, bazı dezavantajlar sunduğu bildirilmektedir. Örneğin, tamamlanmamış formaldehit inaktivasyonu nedeniyle kalıntı toksisite riski ve kalıntı formaldehit varlığı riski ile ilişkili olması tespit edildiği bildirilmektedir. Ayrıca, aşının gücü seriden seriye değişmektedir ve *C. perfringens*'in süpernatantın' dan üretilen toksoidler saf değildir (yani, diğer toksinler ve proteinler mevcuttur) ve bu, aşısındaki daha yüksek derecede antijen çeşitliliğini açıklamaktadır. *C. perfringens* önemli bir biyogüvenlik riski oluşturmaktadır ve katı

biyogüvenlik önlemlerinin uygulandığı bildirilmektedir (Cavalcanti ve ark., 2004; Thaysen-Andersen ve ark., 2007; Lobato ve ark., 2010).

C. perfringens'i yok etmek imkansız olduğu bildirilmektedir. *Escherichia coli*'de üretilen rekombinant versiyonlar yukarıda bahsedilen sorunlara çözümler sundukları için clostridial aşıya umut verici seçenek olarak zemin hazırlamaktadır. Patojenik olmayan *E. coli* kullanımı suşları ve rekombinant toksinlerin azaltılmış veya hiç toksisite göstermemesi gerçeği, doğal toksin üretimi ile bağlantılı bazı sorunları en aza indirebilmekte veya hatta ortadan kaldırabilmektedir. Bazı rekombinant toksinlerin neredeyse hiç toksisitesi olmadığı için, üretim sürecini daha basit ve daha güvenli hale getiren formaldehit kullanımına gerek olmamasını bildirmektedir. *E. coli*'deki rekombinant proteinler çözünür protein, çözünmeyen protein veya her iki formun bir karışımı olarak bildirilmektedir. Bu proteinlerin miktarı ve çözünürlüğünü etkileyen faktörler arasında *E. coli* ekspresyon suşu ve vektörü, kodlanan DNA ve protein dizileri, büyüme koşulları (örn., sıcaklık, ortam, vb.) ve indüktör konsantrasyonu sayılabildiği bildirilmektedir (Larentis ve ark., 2014; Moreira ve ark., 2014).

Aşı üretiminde rekombinant proteinlerin hem çözünür hem de çözünmez formları artıları ve eksileri sundukları bildirilmektedir. Çözünür rekombinant proteinlerin, bağışıklık kazandırmak için çok önemli olabilecek konformasyonel epitopları koruyarak, doğal protein ile aynı 3D konformasyonu sunması oldukça olasılığı bildirilmektedir. Hücre lizat süpernatantında (CLS) elde edilen çözünür rekombinant proteinlerin bir diğer avantajı, saflaştırma için denatüre edilmelerini gerektirmemeleri, sadece farklı kromatografi tekniklerinin bir kombinasyonu ile gerçekleştirilebilen LPS ve diğer proteinlerin çıkarılmasını gerektirmesi olduğu bilinmektedir (örn. afinite, iyon değişimi, boyut hariç tutma, vb.). Ayrıca, çözünmeyen proteinleri, inklüzyon cisimlerden arındırmak ve saflaştırmak için birkaç kez yıkama bilmekte ve/veya kromatografi teknikleri kullanılabilir. Ancak, çözünmeyen proteinler bağışıklık için çok önemli olan konformasyonel epitoplardan yoksun

olabilmesi bildirilmektedir. Saflaştırılmamış inklüzyon cisimcikleri ve CLS, hem deney hayvanlarında hem de çiftlik hayvanlarında *C. perfringens* toksinlerine karşı immünojenler olarak test edildiği bildirilmektedir (Lobato ve ark.,2010; Zeng ve ark., 2011; Bokori-Brown ve ark., 2014).

2.1. Alfa Toksin (CPA)

Alfa toksin (CPA), kromozomal gen *plc* tarafından kodlanmakta, her toksinotipde bulunmakta ve toksinotip A'da en yüksek seviyelerde eksprese edildiği bildirilmektedir. Aktif toksin CPA, sfingomyelinaz ve lektinaz aktivitesi ve yaklaşık 42.528 kDa ile 370-residüe uzunluğunda, çinko bağımlı bir fosfolipaz C(PLC) olduğu bildirilmektedir (Flores-Díaz ve ark., 2003; Sakurai ve ark., 2004).

Alfa toksin iki önemli bölgelere, N- terminal (1–246) ve C- terminal (247-370) bölündüğü bildirilmektedir. N-terminal bölgesi, toksin katalitik çekirdek içerir C-terminal bölge ve merkezi halka (55-93) ise, sırasıyla konak fosfolipidleri ve GM1a ganglioside bağlanmasından sorumlu olduğu bildirilmektedir (Oda ve ark., 2015).

Alfa toksine iki çinko iyonu (Zn^{2+}) bağlandığı araştırmacılar tarafından bildirilmektedir. Bir iyon His148 ve Glu152'ye bağlanması da enzimatik aktivite için çok önem taşımaktadır. Kalan iyon His11 ve Asp130'a bağlıdır ve yapısal işleve sahip olduğu bilinmektedir (Ferreira ve ark., 2016).

Histidin kalıntıları kalsiyumu bağlamakta ve toksinin konak hücre zarındaki fosfolipitleri bağlamasına yardımcı olduğu bildirilmektedir. Alfa toksin, intravasküler hemoliz, trombosit agregasyonu ve kılcal hasardan sorumlu olduğu

bildirilmektedir. Bu faktörler, lökositlerin ve oksijenin enfeksiyon bölgesine ulaşmasını engellemekte ve *C. perfringens*'in çoğalması için uygun bir ortam sağlamaktadır. Gazlı vakalarında, CPA, enfekte dokuda nötrofil migrasyonuna müdahale ederek, kemik iliğindeki olgun hücre sayısını en aza indirmekte ve komşu damarlarda nötrofil birikimine neden olarak bağışıklıktan kaçmaya yardımcı olduğu bildirilmektedir (Takehara ve ark., 2016).

1.3.1. Rekombinant CPA Üretim Stratejileri ve Hayvan Modeli Bağışıklamaları

CPA'yı kodlayan genin klonlanmasını ve ekspresyonunu içeren ilk çalışmalar, CPA'nın nükleotid dizisini ve protein moleküler ağırlığını belirlemektedir. Buna bağlı olarak, 28 amino asitli bir N- terminal sinyal peptidi ve toksinin bazı biyokimyasal özellikleri bildirilmektedir. Aşılama için toksik olmayan bir CPA versiyonunu elde etme girişiminde en yaygınları bölgeye yönelik mutajenez, doğal olarak toksik olmayan CPA üreten suşların izolasyonu, sadece N- veya C-terminal alanının ekspresyonu, kimerik toksinlerin ekspresyonu ve *Bacillus subtilis* sporlarının yüzeyinde ekspresyon gibi birçok stratejiler kullanıldığı bildirilmektedir (Hoang ve ark., 2008; Uppalapati ve ark., 2014; Shreya ve ark., 2015).

Mutajenez çalışmaları CPA toksisitesi için temel kalıntıları karakterize etmekte ve genetiği değiştirilmiş, toksik olmayan, immünojenik, rekombinant CPA üretimi için temel haline geldiği bildirilmektedir. H68G, H148G/L, D56G ve E152Q mutasyonlarının CPA'nın toksisitesini ortadan kaldırabildiği bildirilmektedir (Takehara ve ark., 2016).

Araştırmacılar bu kapsamda, T272P mutasyonunun CPA toksisitesini %35 oranında ve D336N, Y275N, D269N, Y331L, Y331F, Y307F ve Y275F'nin bölgeye

yönelik mutajenezi, hemolitik aktiviteyi sırasıyla %11, %11, %19, %30, %36, %38 ve %73 oranında azalmasını bildirilmektedir (Alape-Girón ve ark., 2000).

M13V, A174N, T177A, H212R, P295Q, S335P, I345V ve W360G mutasyonları ile CPA'nın (CPA-121A/91) doğal olarak oluşan toksik olmayan bir varyantını tanımlamışlar ve ayrıca bu varyant hemolitik, PLC veya sfingomyelinaz aktivitesi göstermediği bildirilmektedir. Alternatif bir çalışmada, CPA-121A/91 ile aşılamanın farelerin yaşam süresinin uzadığı, ancak ölümden koruyabilmemesi tespit edilmektedir. İlginç bir şekilde, H212R mutasyonunun, aşılama farelerinin %76'sını (17/21) ölümden koruyabildiği tespit edilmektedir. Bu sonuçlar, toksinin etki etmesi için olası epitoplara ve önemli bölgeler hakkında bazı bilgiler sağlayarak, hem koruyucu hem de terapötik antikörlerin geliştirilmesi için yararlı olduğu bildirilmektedir (Schoepe ve ark., 2006).

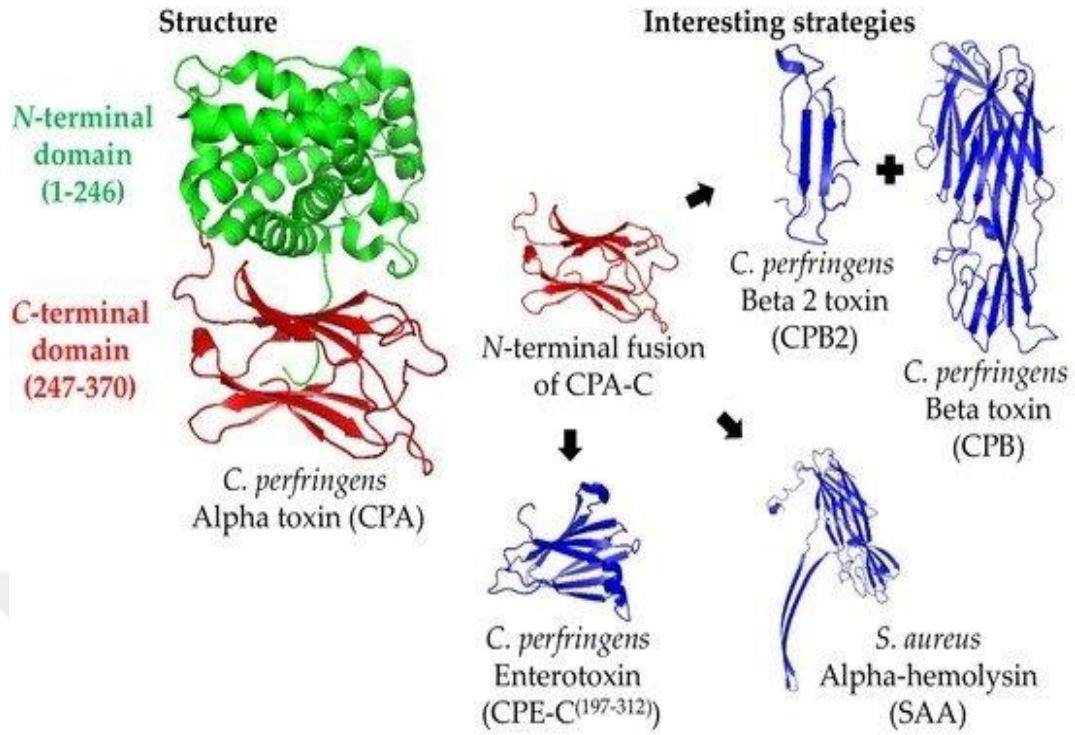
Rekombinant, mutasyona uğramamış CPA, dermonekrotik aktivite ile artık toksisite gösterebilmekte ve aşılama için uygun olmadığı bildirilmektedir. Formaldehit, doğal CPA'yı detoksifiye etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak aynı zamanda immünojenisiteyi de azaltma bildirilmektedir (Titball, 2005; Kulkarni ve ark., 2007; Goossens ve ark., 2016).

Alternatif olarak, aşılama için sahada doğrudan mutajenize edilmiş rekombinant veya doğal olarak oluşan toksik olmayan CPA kullanılabilmektedir; bununla birlikte, bu gibi durumlarda, bağışıklık tepkisi, yalnızca koruyucu epitoplara değil, tüm toksine karşı geliştiği bildirilmektedir. N - ve C- terminal bölgelerini (CPA-N⁽¹⁻²⁴⁶⁾ ve CPA-C⁽²⁴⁷⁻³⁷⁰⁾), *E. coli*'de ifade olan GST'ye fiyuz (GST-CPA-C⁽²⁴⁷⁻³⁷⁰⁾) edilmesi ve CPA-C⁽²⁴⁷⁻³⁷⁰⁾ (19 kDa) tek başına farelerde challenge sonucunda 50ug CPA veya 10⁹ *C. perfringens* hücrelerine karşı immunité sağladığı bildirilmektedir. Ancak hazırlanan rekombinant CPA-N⁽¹⁻²⁴⁶⁾ ile aşılama hayvanlarda alfa toksine (CPA) karşı koruculuk gösterildiği bildirilmektedir. Bu sonuçlar, CPA'nın konak hücreye

bağlanması bloke edilmesi ve bu toksine karşı bağışıklık kazandırarak enzimatik aktivitesini nötralize etme ihtiyacını ortadan kaldırmakla birlikte C- terminal alanını CPA'ya karşı ana aşı adayı haline getirdiği bildirilmektedir (Williamson ve Titball, 1993; Nagahama ve ark., 2013).

Farklı toksinlerin koruyucu epitoplarından oluşan kimera aşılar tasarlamak ve bağışıklık sağlamayan alanları hariç tutmak günümüzde önemli bir yaklaşım olarak bilinmektedir. Bu yaklaşım, üretim sürecini basitleştirmektedir, çünkü farklı toksinler için yürütülen birçok işlemin aksine, bir dizi toksine bağışıklık kazandırabilen bir kimera üretmek için yalnızca bir işlem gerektiğini bildirilmektedir. Bunu göz önünde bulundurarak, gereksiz alanları hariç tutarak tüm rCPA molekülünü modifiye etmek faydalı bir yaklaşım olması bilinmektedir. Aslında, rCPA-C⁽²⁴⁷⁻³⁷⁰⁾ alanı, aşı bileşeni olarak kullanılmaktadır ve bu deneysel aşılar için yeni kimeraların oluşturulmasına izin verildiği bildirilmektedir (Nuccitelli ve ark., 2011).

Araştırmacılar, CPA-C⁽²⁸⁴⁻³⁹⁸⁾ içeren bölgeyi bir rekombinant kimera *C. perfringens* enterotoksin'in (rCPAE) C-terminal kısmına (CPE-C⁽¹⁹⁷⁻³¹²⁾) fiyuz ederek, CPA ve CPE ile enfekte olan farelerin sırasıyla %100'ünün (12/12) ve %75'inin (9/12) koruduğunu bildirmektedirler. CPA-C⁽²⁸⁴⁻³⁹⁸⁾, *Staphylococcus aureus* Alfa-hemolizin (SAA⁽³⁶⁻²²¹⁾) N-terminal bölgesine fiyuz edilmesi sonucunda, CPA veya SAA ile enfekte edilen farelerin sırasıyla %100'ünde (6/6) ve %81,3'ünde (5/6) korundukları tespit edildiği bildirilmektedir (Shreya ve ark., 2015).



Şekil 1.4. *Clostridium perfringens* Alfa toksin (CPA) yapısı ve rekombinant antijen olarak üretimi için ana stratejiler.

Zeng ve ark. (2011), *C. perfringens* toksinlerine karşı dört aşı formülasyonunu ortaya koymaktadırlar: (1) rCPA; (2) bivalent CPB ve CPB2-rCPB2B1'den oluşan rekombinant kimera; (3) rCPB2B1 ve rCPA'nın birlikte uygulanması; ve (4) CPA, CPB ve CPB2—rCPAB2B1'den oluşan trivalent rekombinant kimera. Ancak, rCPA ile aşılanmış fareler, % 80 (24/30) ve Grup 3, %100 (30/30) koruma sağladığı tespit edilmektedir. Ayrıca Grup 4, %93 (28/30) koruma göstermektedir. Araştırmacılar, antijenleri alan gruplarda kıyas yaparak Grup 4'te gözlemlenen daha düşük korumanın, birçok antijenin sadece bir polipeptit zincirinde bir araya gelmesinden kaynaklanan konformasyonel epitoplardaki bir değişiklikten kaynaklandığını bildirmektedirler.

Goossens ve ark. (2016), bir çalışmada GST-CPA-C⁽²⁴⁷⁻³⁷⁰⁾ ile aşılanmış hayvanlar, tek başına CPA-C⁽²⁴⁷⁻³⁷⁰⁾ ile aşılanmış hayvanlardan daha az korunduğunu göstermişlerdir. Bu bilgi neticesinde C- terminalın koruyucu potansiyeli GST kullanıldığında bozulduğu bildirilmektedir.

Williamson ve Titball (1993), daha önce CPA-C⁽²⁴⁷⁻³⁷⁰⁾ ile aşılanmış farelerde GST-CPA-C⁽²⁴⁷⁻³⁷⁰⁾ ile aşılanmış farelere göre iki kat daha fazla nötralizan antikor ürettiklerini bildirmektedirler.

B. subtilis sporlarının yüzeyinde eksprese edilen GST-CPA-C⁽²⁴⁷⁻³⁷⁰⁾ kimera, aşılanmış hayvanların tükürük, dışkı ve akciğer örneklerinde hem sistemik IgG hem de sIgA üretimini ortaya çıkardığı bildirilmektedir (Hoang ve ark., 2008).

Bu sonuçlar, bağışıklığın oluşturulması için gerekli olanın yalnızca aşı bileşimi ve antijen tasarımı olmadığını, aynı zamanda antijenlerin bağışıklık sistemine sunulma şeklinin de yüksek dozlarda zorlamaya karşı bağışıklığın elde edilmesi için çok önemli olduğunu göstermektedir. Yeni aşılar tasarlanırken ve test edilirken, yalnızca klostridiyal toksinler için değil, aynı zamanda tüm patojenler için de tüm bu yönlerin dikkate alınması kuvvetle önerildiği bildirilmektedir (Ferreira ve ark., 2016).

Recombinant proteinlerin ifadesi için en çok kullanılan system *E. Coli* systemidir ve bu amaç için iki tür plazmit vektörü olarak pT7 ve pET kullanılmaktadır. Bu vektörler T7 promotörü, antibiyotik direnç geni ve ekspresyonun düzenlenmesi için *lacI* geni içermektedirler. *E.coli lac* operon'un kontrolü altında genomunda T7 DNA polimerazı kodlayan geni ihtiva eden BL21 (DE3) en yaygın olarak kullanılan suş olarak kullanılmaktadır. Laktoz veya benzer moleküller, örneğin alolaktoz veya *E. coli* tarafından metabolik olarak parçalanamayan galaktoz izopropil- β -1- d -galaktopiranosid (IPTG), lac operonunu indükleyebilmektedir. Ayrıca, rCPA ekspresyonu için, literatürde 0,3-1 mM IPTG konsantrasyonları başarılı olarak tanımlanmaktadır ve en ilginç olanı, kültür koşulları (yani ortam, sıcaklık ve indüksiyon süresi), çözünür rCPA'yı tanımlayan diğer çalışmalara çok benzemektedir. Hatalı protein katlanması nedeniyle birçok koruyucu epitop kaybolabileceğinden, çözünmeyen antijenlerin ekspresyonu her zaman

rekombinant aşı gelişimi için bir problem olarak algılandığı bildirilmektedir. Bu nedenle, indüktör konsantrasyonu ve süresi yani ifade koşullarının optimizasyonu araştırmacıların tarafından önerildiği bildirilmektedir (Ferreira ve ark., 2016).

1.4.Beta Toksin (CPB)

Beta toksin (CPB), *cpb* tarafından kodlanmakta ve beta-pore-forming toksinler (BPFT) olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca beta toksin heptamerik proteinler ailesinin bir üyesi olduğu bildirilmektedir. Bu genin ifadesi sonucu, 336 amino asitli bir protoksin elde edilmektedir. Beta toksinin plazma zarındaki lipid, fosfatidilkolin ve kolesterolden oluştuğu bildirilmektedir. Bu lipid katyon seçici kanallar geliştirmesine ve oligomerler oluşumuna izin verdiği bildirilmektedir (Uzal ve ark., 2010).

Tripsin beta toksin aktivitesini tamamen engellediği bildirilmektedir. Bu nedenle, düşük miktarlarda gastrik proteaz ürettikleri ve kolostrum ayrıca tripsin inhibitörleri içerdiği için yeni doğan hayvanlar CPB aracılı hastalık ile enfekte olma riski altında olduğu bildirilmektedir (Sakurai ve Nagahama, 2006; Uzal ve ark., 2010).

1.4.1. Rekombinant CPB Üretim Stratejileri ve Hayvan Modeli İmmünizasyonu

Aşı uzmanları için rekombinant aşılarda geliştirilmesini kolaylaştıran önemli bilgiler ve öneriler ortaya konulmaktadır. CPB içeren rekombinant aşılarda geliştirmek için kullanılan çeşitli stratejilerden özellikle dört yaklaşım bilinmektedir: (1) toksoitlerin üretimi için nokta mutasyonlarının eklenmesi; (2) tüm toksin sekansının ifadesi; (3) C- terminal alanının ifadesi (CPB-C^(143–311)); ve (4) diğer toksinleri

(örneğin, CPA, CPB2 veya ETX) veya *E.coli* 'nin ısıya dayanıklı enterotoksininin alt birimini (LTB) içeren kimerik antijenlerin ifadesi bildirilmektedir (Gurtner ve ark., 2010; Popescu ve ark., 2011; Autheman ve ark., 2013; Roos ve ark., 2015).

Aşı adayları oluşturmaya yönelik ilk bahsedilen yaklaşım açısından, Y203F, R212E ve R121Q mutasyonlarının LD₅₀'yi CPB ile sırasıyla 2.5, 12.5 ve 5.5 kat artırabildiği bildirilmektedir (Steinhorsdottir ve ark., 1998; Steinhorsdottir ve ark., 2000).

Nagahama ve ark. (2003), Y266A, L268G ve W275A mutasyonlarını kombinasyon halinde ekleyerek veya Tirozin veya Histidin için C265'i değiştirerek toksik olmayan bir rCPB molekülü elde ettiklerini bildirmektedirler. Bununla birlikte, bu yapıların hiçbirisi, hayvan modellerine enjekte edildiğinde koruyucu antikor üretme yetenekleri açısından değerlendirildiği bildirilmemektedir.

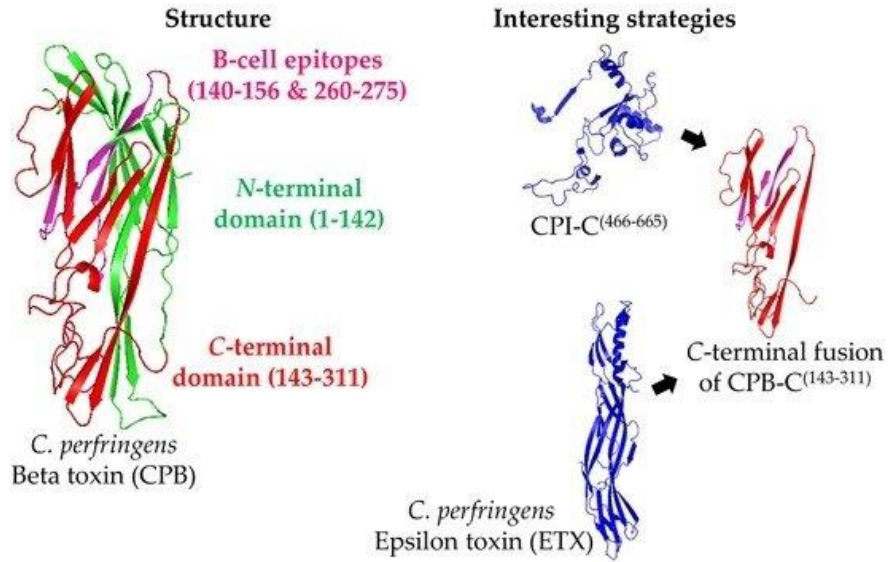
Bütün toksin sekansını kullanılan bir çalışmada, ekspresyon için PAE vektörüne CPB kodlayan sekansını klonlanması ve *E. coli* BL21 (DE3) starTM kullanılması bildirilmektedir (Milach ve ark., 2012). Elde edilen proteinin, üre ile süspanse edilmesi ve saflaştırmadan sonra, PBS ile yeniden katlama aşaması gerçekleştirilmesi ve tamamen toksik olmayan bir protein elde edilmesi ve bu proteinin, tavşanlara 100 ug enjekte edilmesi sonucunda 10 IU/mL koruyucu antikor üretebildiği bildirilmektedir (Lobato ve ark., 2010; Zeng ve ark., 2011).

CPB sekans analiz sonucu, C-terminal kalıntılarının (CPB⁽²⁵⁶⁻²⁷⁶⁾), *S. aureus*'tan (SAA⁽²⁴⁵⁻²⁶⁷⁾) alınan alfa toksininin C-terminal kısmı ile yakından ilişkili olduğu bildirilmektedir (Nagahama ve ark., 2003). Araştırmacılar bir in silico çalışmada, CPB'de (32-45, 140-156 ve 260-275 amino asitleri) üç B- hücre epitopun varlığını bildirmektedir. Bununla birlikte, epitop CPB⁽¹⁴⁰⁻¹⁵⁶⁾ daha fazla karakterizasyon için LTB molekülüne fizyon olmasına rağmen, bu epitopların hiçbirisi deneysel aşılarda test edilmemiştir, ancak koruyucu bağışıklık tepkilerine yol açabilecek proteinin küçük

bölgelerinin araştırılması için açık bir alan bıraktığı bildirilmektedir (Bhatia ve ark., 2014).

Epitopların henüz aşı adayları olarak test edilmediği gerçeği akılda tutulduğunda, diğer antijenlere fizyon edilen tam proteinlerin veya proteinin daha küçük parçalarının kullanılması da daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyan bir strateji olarak bilinmektedir (Şekil 2). CPI'nin (CPI-C⁽⁴⁶⁶⁻⁶⁶⁵⁾) C-terminal kısmına fizyon edilen CPB⁽¹⁴³⁻³¹¹⁾ bölgesi ile yapılan bir çalışmada, elde edilen protein, CPI ve CPB ile aşılanan farelerin sırasıyla %83 ve %91'ini koruyabildiği bildirilmektedir (Shreya ve ark., 2016).

Araştırmalara göre CPB'nin iki varyantı (rCPB2B1) kullanılarak aşılanan farelerde antijene karşı %90 (27/30) koruyuculuk sağladığı tespit edildiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada, rCPA artı rCPB2B1 birlikte enjeksiyonu, aşılanan fareler'de %100 (30/30) koruma ile sonuçlandığı bildirilmektedir (Zeng ve ark., 2011).



Şekil 1.5. *Clostridium perfringens* Beta toksin (CPB) yapısı ve rekombinant bir antijen olarak üretimi için ana stratejiler.

Heterolog ekspresyonun önemli yönü, kodon optimizasyonudur. Çoğu zaman, *E. coli* ekspresyonu için optimal kodonların kullanımı, daha yüksek bir protein veriminin elde edilmesini kolaylaştırmasına rağmen çözünür bir proteinin elde edilebilme garantisi vermediği bildirilmektedir. Sakurai ve Nagahama. (2006), *E. coli* için optimal kodonu kullandıklarında bile çözünmeyen bir rCPB elde ettiklerini ortaya koymaktadırlar. Mevcut literatür, antijenin çözünürlüğünü iyileştirmek için kimerik bir antijenin kullanılması yoluyla bu sorunun üstesinden gelmenin nasıl mümkün olduğunu açıklamaktadırlar. Ancak aynı çalışma, üretilen rCPAB2B1 ve rCPA çözünmez olduğunu bildirmektedir (Langroudi ve ark., 2013; Shreya ve ark., 2016).

Başka çalışmalarda, *E. coli* türlerinin, proteinin çözünürlüğünde etkin olduğu bildirilmektedir. Bakhshi ve ark. (2011), BL21'de (DE3) ifade edilen rekombinant beta toksinin (rCPB) çözünmez olduğunu ancak Rosetta'da (DE3) ifade edilenin ise çözünür olduğunu bildirmektedirler. Araştırmacılar, ekspresyon sıcaklığının (16-28°C) düşürülmesi, protein çözünürlüğünü artırmaya çalıştığı yaygın bir yaklaşım olduğunu bildirmektedirler.

1.4.2. Recombinant Alfa toksin (rCPA) ve Beta toksin (rCPB) İmmünojenisite

C. perfringens'in neden olduğu hayvan hastalıklarının immünoprofilaksisinde rekombinant antijenlerin yüksek potansiyeline rağmen, iki olumsuz özelliği vurgulamak önem taşımaktadır. Birinci olarak üretim süreci ve her bir antijenin ayrı ayrı saflaştırılması, bu teknolojinin kullanıma uygun olmadığı anlamına gelmektedir. İkincisi, bu antijenlerin koruyucu bağışıklık tepkisi (nötralizan antikorlar) oluşumuyla ilgili olmayan kısımlara sahip olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle, iki veya daha fazla antijen içeren rekombinant kimeraların gelişimi, klostridial immünoprofilaksi veya

diğer hastalıklarda dikkat çektiği bildirilmektedir (Gil ve ark., 2013; Marchioro ve ark., 2014).

Zeng ve ark. (2011), araştırmalarında iki rekombinant aşı (rCPA artı rCPB2B1 ve trivalent kimera rCPAB2B1), domuz ve sığır serumunda ve kolostrumunda nötralizan antitoksin üretme kapasitesini değerlendirmişler. Antitoksin seviyelerinin belirlenmesinde titrasyon için *C. perfringens*'in kültür süpernatantını kullandıklarını bildirmişlerdir. Elde edilen rekombinant rCPA ve rCPB2B1, sırasıyla domuz ve inek serumda 3 ve 8 IU/mL ve kolostrumunda 1 ve 6 IU/mL antitoksin titrelerini indüklediği bildirilmektedir. Trivalent rekombinant kimera rCPAB2B1, dişi domuzların ve ineklerin sırasıyla kolostrumunda 2 ve 6 IU/mL ve serumda 1 ve 2 IU/mL titrelerini indüklediği bildirilmektedir.

Benzer şekilde, fareler üzerinde yapılan çalışmalara göre, Trivalent recombinant kimera rCPAB2B1 hem serumda hem de domuz ve sığır matrislerinin kolostrumunda daha düşük titreleri indüklediği bildirilmektedir. Yukarıda bahsedilen araştırmalardaki rekombinant kimeralar, tek tek antijenlerin üretilmesi ihtiyacını ortadan kaldırmaktadır. Bununla birlikte, bu kimeralar, bozulmamış toksinler kullanılarak yapılmaktadır. Ayrıca, trivalent kimera rCPAB2B1 tarafından üretilen düşük antitoksin titreleri, molekülün olası uygunsuz konformasyonunu, maskeleyi veya koruyucu epitoplari değiştirmeyi önermektedir. Bu nedenle, her bir toksinin koruyucu alanlarının tanımlanması, çok değerli rekombinant kimeraların oluşturulması için önemli veriler sağlandığı bildirilmektedir (Uppalapati ve ark., 2014; Shreya ve ark., 2015).

Veteriner aşılari saflaştırılmış antijen içerdiginde, çözünmeyen proteinlerin ifadesi, çözündürme aşamaları, yeniden katlama ve saflaştırma işlemleri çok zahmetli ve zaman alıcı bir üretim sürecini içerdiginde ticari olarak geleneksel toksoidlerden daha az rekabetçi hale getiren üretim sürecini engellediği bildirilmektedir. Hücre

lizizinden sonra elde edilen rekombinant antijeni içeren hücresel fraksiyonların (inklüzyon cisimcikleri veya süpernatant lizat) kullanımından oluşan saflaştırılmamış rekombinant antijenlerle hayvanların bağışıklştırılması yoluyla mükemmel bir alternatif olduğu bildirilmektedir. Lobato ve ark. (2010), hayvanları aşlamak için doğrudan formaldehit ile inaktive edilmiş ~200 µg rETX inklüzyon cisimleri kullanarak ve tavşanlarda, keçilerde, koyunlarda ve sığırlarda sırasıyla 40, 14.3, 26 ve 13.1 IU/mL nötralize edici antitoksin titreleri elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Zeng ve ark. (2011), yaptığı bir çalışmada, farelerin, sığırların ve domuzların aşılmasında rCPA inklüzyon cisimciklerinin ve çok değerlikli kimeraların önemli etkinliklerinin olduğu gösterilmiştir. Inklüzyon cisimleri, hücre lizizinden kolayca elde edilebilmesinin ardından santrifüjleme ve yıkama döngüleri ile yarı saflaştırılabildiklerini bildirmektedirler. Ayrıca antijenin stabilitesinin arttırılması, proteazların etkisine müdahale edilmesi ve depozit etkisi ile immünolojik bir adjuvan olarak hareket edilmesi, antijeni yavaş yavaş serbest bırakması ve bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını geciktirdiği bildirilmektedir.

Çözündürme ve yeniden katlama aşamalarının ortadan kaldırılması ve aynı zamanda rekombinant antijenlerin saflaştırılması önemli bir ilerlemeyi temsil etmektedir. Saflaştırılmamış rekombinant antijenlerin kullanımı, kullanılan antijenlerin kalitesini korurken, rekombinant veteriner aşlarının üretildiği süreçte yer alan zaman ve maliyeti azaltan basit bir alternatif olarak bildirilmektedir. Bu nedenle, koruyucu alanları içeren bir rekombinant kimeranın saflaştırma işlemlerine gerek kalmadan kullanılması, *C. perfringens* toksinlerine karşı potansiyel bir aşığı temsil ettiği bildirilmektedir. *E. coli*'de rekombinant antijenlerin üretimi için yapılan çalışmalarda karşılaşılan en büyük sorun olarak insanlar ve hayvanlar için pirojenik olan potansiyel endotoksin (LPS) kontaminasyonları olduğu bildirilmesine rağmen, kobayların bağışıklanmasında saflaştırılmamış antijenler kullanıldığında yan etki bildirilmemektedir (Terepe, 2006; Moreira ve ark., 2016).

Geleneksel toksoid ile aşılanmış hayvanların her altı ayda bir yeniden aşılanması tavsiye edildiği bildirilmektedir. Bu nedenle, kullanılan aşılarda etkinlik değerlerini en üst düzeylere çıkarabilmek amacıyla kullanılacak adjuvan seçimi son derece önemli olduğu bildirilmektedir. $Al(OH)_3$ adjuvan olarak kullanımı, klostridiyal rekombinant aşılarla yaygın olduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte, $Al(OH)_3$ ve saponinler, süresi kısa olan bağışıklık tepkilerini indükler; bu nedenle yılda iki veya daha fazla olacak şekilde yeniden aşılama önerilmektedir. Yağ adjuvanları, daha yüksek ve kalıcı antikor titrelerini indüklediği bildirilmektedir. Bu nedenle, yalnızca veteriner aşılarda için arzu edilen yıllık aşılarla kullanım için uygun olduğu görülmektedir. Sonuç olarak, üretim hayvanlarında bu formülasyonların immünojenitesini belirlemek için, farklı adjuvanlarla bağlantılı, tek veya çok değerli (kimera veya birlikte uygulanan) rekombinant antijenik alanlar ile aşılanmış hayvanlarda antikorların dinamiklerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmaların gerektiğini bildirmektedirler (Aucouturier ve ark., 2001; Khorasani ve ark., 2016).

Deri altı enjeksiyon, rekombinant toksinlerin değerlendirilmesinde ana aşılama yöntemi olarak bilinmesine rağmen at, kedi, köpek gibi bazı hayvan türlerinde aşı uygulamalarını takiben enjeksiyon bölgesinde şiddetli reaksiyonlar meydana geldiği bildirilmektedir. Antijen konsantrasyonu, uygulama yolu ve dozların aralığı, bağışıklık tepkisinin süresini de etkileyen faktörler olarak bilinmektedir. Bu nedenle, bu faktörlerin her bir türün aşılanmasında oynadığı rolün ayrıntılı olarak değerlendirilmesi gerektiği araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Chandran ve ark., 2010).

Bernath ve ark. (2004), tarafından $Al(OH)_3$ adjuvanı kullanıldığında, toksoid ile aşılanmış koyunlar için aşılarda sekiz hafta olması gerektiği bildirilmektedir. İlk doz, ikinci dozun uygulanmasına kadar bağışıklık sağlamaktadır. Bundan sonra, antikorlarda ikinci bir pik elde edildiği ve bununla uzun süre koruma sağladığı bildirilmektedir. Antikorların dinamiklerini bir yıl boyunca veya serum antitoksinlerinin tespit edildiği tam süre boyunca izlemek ideal bir yaklaşım

olacaktır. Adjuvan, uygulama, doz aralığı ve farklı türlerdeki antijen konsantrasyonu gibi yukarıdaki faktörlerin tümünün değerlendirilmesi, rCPA, rCPB ve rETX içeren aşılarda geliştirilmesini ve kullanımını kolaylaştırmak için esas olarak araştırmacılar tarafından bildirilmektedir.

1.5. *Clostridium perfringens* Enterotoksin(CPE)

İnsanlarda ve çiftlik hayvanlarında önde gelen bir patojendir ve hem histotoksik hastalıklara hem de bağırsaklardan kaynaklanan hastalıklara, yani enterit veya enterotoksemiye (bağırsakta üretilen toksinlerin emilerek dolaşıma katıldığı ve ardından beyin gibi organlara zarar verdiği) neden olduğu bildirilmektedir (Li ve ark., 2010).

C. perfringens izolatlarının bazıları (yaklaşık olarak %5'i), *C. perfringens* enterotoksini (CPE) ürettiği bildirilmektedir. CPE-pozitif olarak bilinen bu suşların çoğu sınıflandırmada A tipi suşlar olarak yer alsa da bu enterotoksini üreten tip C ve D suşları da oldukça yaygın olarak bulunduğu bildirilmektedir. CPE-pozitif A, C ve D türleri tarafından üretilen CPE proteininin birincil amino asit dizisi yüksek oranda benzerlik göstermekle birlikte E tipi suşların sadece silent *cpe* sekansları taşıdığı düşünülmektedir, ancak bir çalışmada, varyant CPE üreten birkaç tip E suşunu belirlenmektedir. Bugüne kadar, B tipi suşları tarafından CPE üretimine ilişkin güvenilir bir rapor araştırmacılar tarafından bulunduğu bildirilmektedir (Freedman ve ark., 2016).

1.5.1. Gastrointestinal (GI) Hastalıkların oluşumunda CPE patojenlerinin Önemi

Çoğu gelişmiş ülkelerde gıda zehirlenmeleri üzerine yapılan araştırmalarda ortaya çıkan sonuçlara göre *Clostridium perfringens* tip A'nın en yaygın ikinci hastalık etkeni olarak yer aldığı bilinmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık

bir milyon bu gıda zehirlenmesi vakası vardır ve bu da yıllık yaklaşık 400 milyon dolarlık ekonomik kayba neden olduğu bildirilmektedir. Epidemiyolojik ve deneysel çalışmalarda, CPE'nin tip A gıda zehirlenmesinin diyare, abdominal kramp, sancı gibi klinik bulgular gösteren hastalar incelendiğinde sorumlu toksin olarak bulunduğu bildirilmiştir. *C. perfringens* tip A gıda zehirlenmesinde CPE'nin rolünü destekleyen çok sayıda epidemiyolojik kanıtın bir örneği, bu gıda kaynaklı hastalığı olan hastaların çoğunda dışkıda CPE'nin doğrudan saptandığı bildirilmektedir (Scallan ve ark., 2011; Hoffmann ve ark., 2012).

Geçtiğimiz on yılda, nispeten genç ve sağlıklı birçok insanın ölümüyle sonuçlanan, alışılmadık derecede şiddetli iki *C. perfringens* tip A gıda zehirlenmesi bildirilmektedir (Bos ve ark., 2005).

Bu salgınlar psikiyatri hastanelerinde ve genellikle kabızlık veya fekal impaksiyon yan etkileri olan psikoaktif ilaçlar alan hastaları etkilediği bildirilmektedir. Bu yan etkilerin, çoğu *C. perfringens* için tipik olan diyare gelişimine müdahale ettiğine inanılmaktadır. İshalin azaltılması, bağırsaklar ve CPE gibi toksinler arasında uzun süreli teması neden olmaktadır, bu da CPE'nin dolaşıma emilimini kolaylaştırmaktadır ve böylece bağırsak dışı organlara zarar verdiği bildirilmektedir. Bu hipotez, CPE'nin statik ince bağırsak halkalarından emildiğini gösteren fare çalışmalarından doğrudan deneysel destek aldığı bilinmektedir. Emilen CPE daha sonra karaciğer ve böbreklere bağlanarak, farelerde kalp durması ile ölüme, hiperpotasemiye (hyperpotasemia), organ hasarına neden olan bir enterotoksemiye yol açtığı araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Caserta ve ark., 2011).

C. perfringens tip A gıda zehirlenmesine ek olarak, CPE-pozitif tip A suşları, tüm antibiyotiğe bağlı diyare vakalarının yaklaşık %5-10'u dahil olmak üzere, gıda kaynaklı olmayan birkaç insan gastrointestinal hastalığına da neden olduğu çalışmalar sonucunda bildirilmektedir (Carman, 1997).

CPE, C tipi suşların bazı insan enteritis nekrotikans (EN) vakalarında etkili rol oynadığı bilinmektedir. Enteritis nekrotikans (EN), hastalık diyet nedeniyle düşük bağırsak tripsin seviyeleri ile ilişkilidir ve gıda kaynaklı bir hastalık olduğu bilinmektedir (McClane ve ark., 2006). EN'nin patogenezi için beta toksin açıkça gerekli olmakla birlikte, bu hastalığa neden olan bazı tip C suşları da CPE üretikleri bildirilmektedir (Ma ve ark., 2012).

Toksin mutantlarını ve saflaştırılmış toksinleri kullanan son hayvan modeli çalışmaları, CPE ve beta toksin için sinerjistik etkiler gösterdiğini bildirmektedir, bu da (bağırsaklarda beta toksin ile birlikte mevcut olduğunda) CPE'nin enteritis nekrotikans patogeneze katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. CPE'nin üretildiğinde D tipi hastalığa katkıda bulunup bulunmadığı hala araştırmacılar tarafından bilinmemektedir (Ma ve ark., 2014).

1.5.2. CPE Proteini

Tip A gıda zehirlenmeleri, *cpe* geninin klonlanması (1993) sonucu üretilen CPE proteininin yapısına bakıldığı zaman, 319 amino asit içeren birincil diziye sahip tek bir polipeptitten oluşan bir yapıdan oluştuğu ortaya çıktığı bildirilmektedir. Daha sonraki *cpe* nükleotid sekans çalışmaları, A tipi suşları tarafından üretilen CPE, *C. perfringens* C ve D tipi suşları tarafından yapılan CPE'de olduğu gibi aynı sekansa sahip olduklarını araştırmacılar bildirmektedirler (Collie ve ark., 1998).

Birkaç tip E, A, C ve D suşları tarafından oluşturulan klasik CPE'den 10 amino asit farklılığına sahip yeni bir CPE varyanı meydana gelmektedir. Toksisite için bu amino asit varyasyonlarının fenotipik sonuçları şu anda araştırmacılar tarafından bilinmemektedir (Miyamoto ve ark., 2011).

CPE proteini için yapı - fonksiyon ilişkisine yönelik bugüne kadar elde edilen bilgilerde, yapılan erken biyokimyasal ve klonlama çalışmaları ile CPE'nin C-terminal bölgesinin ilgili reseptörlere güçlü bir şekilde bağlanabilmesine rağmen sitotoksik aktivite üzerinde yeterli olamadığı bildirilmektedir (Horiguchi ve ark., 1987; Hanna ve ark., 1989).

Sentetik peptit yaklaşımlarının yanısıra yapılan klonlama çalışmaları ile birlikte güçlü reseptör bağlama aktivitesi gösteren bölgenin toksinin son 30 amino asidinde yer aldığı gösterilmiştir. Bu C- terminal bölgesindeki birkaç tirozin rezidüesinin reseptör bağlanması için önemli olduğu araştırmacılar tarafından gösterilmekte ve bildirilmektedir (Harada ve ark., 2007; Takahashi ve ark., 2008).

CPE'nin ilk 44 amino asidi sitotoksosite için gerekli olmadığı bildirilmektedir. Bu amino asitleri delesyon mutajenezi ile uzaklaştırmak, aslında CPE sitotoksik aktivitesini yaklaşık 2–3 kat arttırdığı bildirilmektedir. Doğal CPE'nin N- terminalin'den yaklaşık 25 veya 37 amino asidi (sırasıyla) uzaklaştıran bağırsak proteazları tripsin ve kimotripsin de aktive edilmiş bir toksin ürettiğinden, bu etki muhtemelen CPE aracılı hastalık için önem taşıdığı araştırmacılar tarafından bildirilmektedir. Amino asit 44'ün devamında ye alan amino asit dizilerinin çıkarılması ile CPE etkisinin hızla yok olduğu, bölgeye yönelik mutajenez çalışmaları ile daha sonra CPE'nin N- terminal yarısındaki birkaç amino asidi, özellikle D48 ve I51 kalıntılarını sitotoksosite için son derece önemli olarak tanımlamaktadır. Bu amino asit kalıntıları CPE oligomerizasyonu ve gözenek oluşumu için gerekli olduğu bildirilmektedir (Smedley ve ark., 2004; Ferreira ve ark., 2016).

Van Itallie ve ark. (2008), CPE'nin C-terminal (C-CPE) yarısının dizilimini göstermektedirler. Bu yapısal analiz ile birlikte C-CPE bölgesi, dokuz iplikli bir β -sandviç bölgesinin diğer birkaç por oluşturuvcu toksinin reseptör bağlama alanı ile

benzerlik gösterdiği bildirilmektedir. Reseptör bağlanma bölgesini içeren amino asit dizileri, C-CPE'nin yüzeyinde bir cep oluşturduğu araştırmacılar tarafından bildirilmektedir.

Bununla birlikte, CPE'nin N- terminal ucu, oligomerizasyonda tek görevli fonksiyon alanı değildir. N- terminal CPE residüeleri 80-106 (TM1 olarak adlandırılan bir bölge), diğer bakteriyel por oluşturucu toksinler için membran yerleştirilmesine ve gözenek oluşumuna aracılık ettiği bilinen β -hairpin halkalarına benzeyen alternatif hidrofilik ve hidrofobik amino asitlerden oluşmaktadır. Bölgeye yönelik mutajenez, bu TM1 bölgesinin hem CPE membran girişi hem de por oluşumu için önemli olduğunu bildirmektedirler (Chen ve ark., 2012).

2010 yılında yapılan çalışmalarla birlikte CPE proteininin tamamının yapısı iki ayrı yapılar tarafından bağımsız olarak çözüldüğü ortaya konulmuştur. Bu çalışmalar neticesinde CPE'nin yukarıda belirtilen C-terminal reseptör bağlanma alanından, oligomerizasyon ve por oluşumunda rol oynayan ayrı bir N-terminal bölgeden oluşan çift alanlı bir protein olduğunu açığa çıkarttığı bildirilmektedir. CPE'nin N-terminalı (rezidüe 1-34) yorumlanabilir bir yoğunluğa sahip değildir, bu da bozukluğu düşündürmekte ve mevcut olduklarında bu dizilerin neden CPE aktivitesini kısmen düşürdüğünü, yani oligomerizasyonu sterik olarak engelleyebileceklerini açıklamaya yardımcı olmaktadır. Membran yerleştirilmesinin yanı sıra por oluşumunda da yer alan TM1 bölgesinin, büyük ölçüde CPE'nin N-terminal alanında yer alan bir alfa heliksine karşılık geldiği bilinmektedir. Bu alfa heliksi muhtemelen CH-1 kompleksi tarafından membran penetrasyonu ve por oluşumu sırasında bir β -hairpin halkasına açıldığı araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Briggs ve ark., 2011; Kitadokoro ve ark., 2011).

1.5.3.CPE'nin Genetik Yapısı

Global izolatların yaklaşık %5'i *C. perfringens*'in A, C, D ve E türleri tarafından kodlanabilen CPE ürettiği bildirilmektedir. Enterotoksin geni (*cpe*) kromozom

üzerinde yer alabildiği gibi plazmitler üzerinde de bulunabilmektedir. Ayrıca hem kromozomal hem de plazmit kaynaklı *cpe* geni taşıyan hiçbir izolat henüz araştırmacılara göre bulunmadığı bildirilmektedir (McClane ve ark., 2006; Li ve ark., 2010 ; Miyamoto ve ark ., 2011).

Gıda zehirlenmesine neden olan *C.perfringens* A tipi suşların yaklaşık %70'i, *cpe* genini kromozomal üzerinde ve yaklaşık %30'u ve neredeyse tüm CPE-pozitif A tipi gıda kaynaklı olmayan insan GI hastalığı *C. perfringens* suşları, *cpe* genlerini plazmitler üzerinde taşıdığı bildirilmektedir (Collie ve ark., 1998; McClane ve ark., 2006).

C.perfringens tip A suşlarında tüm CPE- pozitif plazmidler pCPF5603 veya pCPF4969 ya aileleri, her ikisi de *cpe* A tipi suşlardaki plazmit ailelerinin ortak bir öncü plazmitinden (pCP13 benzeri bir plazmit) üretilmesi düşünülmektedir, ancak pCPF5603 plazmit ailesi artık beta2 toksini kodlayan geni ve bir varsayılan metabolik gen kümesini de taşıırken, pCPF4969 plazmit ailesi ayrıca VirS/VirR benzeri bir iki-komponentli regülatör sistemi ve bir bakteriyosin taşıdığı bildirilmektedir (Miyamoto ve ark., 2006).

C.perfringens tip C, D ve E suşlarında, *cpe* geni de plazmitlerde bulunmaktadır, ancak bunlar genellikle boyut olarak A tipi suşların *cpe* plazmitlerinden daha büyük oldukları bilinmektedir (Li ve ark., 2013). *C.perfringens* C tipi suşlarda, *cpe* plazmidi genellikle ~85 kb veya ~110 kb olarak bilinmektedir (Li ve ark., 2010). İlginç bir şekilde, bazı C tipi suşlardaki plazmitlerin *cpe* lokusu, pCPF5603 benzemekte ve hem 5' IS 1469 yerleştirme dizisine hem de 3' IS 1151 yerleştirme dizisine sahiptir. Bununla birlikte, diğer C tipi suşlardaki plazmit *cpe* lokusu, 3' IS 1470 ile A tipi suşların kromozomal *cpe* lokusuna daha çok benzediği bildirilmektedir (Gurjar ve ark., 2010).

C.perfringens D tipi suşlarda yer alan *cpe* geni ~75, 85 veya 110 kb büyüklüğünde plazmitlerde de yer aldığı bildirilmektedir. D tipi suşlardaki sıralı halde bulunan *cpe* bölgeleri, Tn1546'ya benzer iki varsayılan yukarı akış transpozaz geni ve tip A suşu F4969'daki *cpe* plazmitinde yer alan yapıya benzer sekansları ile eşsiz bir genetik organizasyona sahip olarak değerlendirildiği bildirilmektedir. Ancak bu genetik organizasyona rağmen tip D *cpe* lokusunun IS1470 benzeri bir yerleştirme dizisine sahip olmadığı da bilinmektedir (Li ve ark., 2010).

Son olarak, *C. perfringens*'in E tipi suşları genellikle *cpe* geni veya silent (suskun) *cpe* dizileri ile plazmitleri taşımaktadır. Ancak *cpe*'nin suskun kopyalarını taşıırken, bu plazmitler pCPF5603'e benzemektedirler, ancak çok daha büyük (~97 veya 135 kb) ve görünüşe göre *cpe* genlerinin yukarısına yerleştirilmiş iota toksin genleri taşımaktadır, dolayısıyla *cpe* ekspresyonunu ortadan kaldırdığı bildirilmektedir. Buna karşılık, yakın tarihli bir çalışmada, eksprese edilmiş bir *cpe* kopyasını taşıyan ~65 kb pCPF4969 benzeri bir plazmide sahip E tipi suşları tespit edildiği bildirilmektedir (Li ve ark., 2007; Miyamoto ve ark., 2011).

Yukarıdaki bulgular, *cpe* geninin, ya kromozomda (çoğu gıda zehirlenmesi izolatında) ya da bir dizi farklı, ancak sıklıkla ilişkili, konjugatif plazmitlerde bulunabileceğini, çeşitli *C. perfringens* suşlarında mevcut olduğunu açıkça bildirilmektedir.

1.5.4.CPE Üretimi ve Regülasyonu

C. perfringens gıda zehirlenmesi genellikle, A tipi kromozomal *cpe* suşlarının son derece dirençli sporları uygunsuz pişirmeden sağ çıktıklarında ve daha sonra vejetatif büyüyen hücrelere dönüştüklerinde meydana geldiği bildirilmektedir. Bu bakteriler kontaninegıdalarda bulunduğu süre boyunca çoğalarak yüksek sayılara ulaştığı bildirilmektedir. Çok sayıda hücre yutulursa, bazıları midenin asiditesinden

kurtularak bağırsağa geçtiği bildirilmektedir. Bununla birlikte, bir kez bağırsakta mevcut olan bu vejetatif hücreler kısa süre sonra sporlaşmaya başlamakta ve CPE üretmekleri bildirilmektedir. Sporülasyonun tamamlanmasında, ana hücre lize olmakta ve CPE'yi bağırsak lümenine bıraktığı bildirilmektedir (McClane ve ark., 2013).

Gıda kaynaklı olmayan CPE, insan gastrointestinal hastalığı sırasında, sporların asıl enfeksiyöz ajan olduğu düşünülmekte, bunu bağırsakta tekrarlanan spor gelişmeleri ve sporülasyon döngüleri (CPE üretimi ile birlikte) takip etmektedir. Bu döngü, gıda kaynaklı olmayan GI hastalık suşları tarafından daha fazla kolonizasyon kabiliyetine bağlı olabilmektedir ve muhtemelen bu hastalıkların *C. perfringens* tip A gıda zehirlenmesine kıyasla daha uzun sürmesini bildirilmektedir. Gıda kaynaklı olmayan GI hastalık suşlarında konjugatif plazmitlerde *cpe* geninin varlığı, kolonizasyonda yeterli, ancak doğal olarak CPE negatif, normal flora *C. perfringens* suşlarını bağırsak virülansına dönüştürerek bu hastalıklara katkıda bulunduğu bildirilmektedir (Brynstad ve ark., 2001).

Diğer *Clostridium* spp ve *Bacillus* spp.'deki sporülasyona benzer şekilde, *C. perfringens* sporülasyonu hiyerarşik bir düzenleme kademesini içerdiği bildirilmektedir (Li ve ark., 2010).

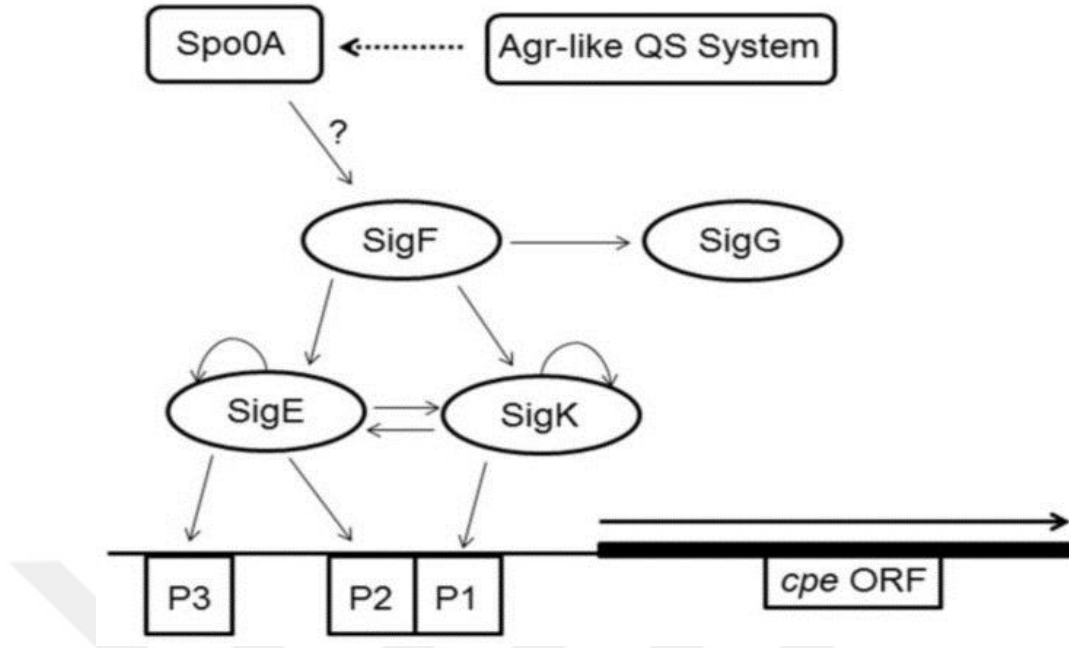
C. perfringens'in *in vivo* sporülasyonu esnasında, henüz bilinmeyen bir sinyal ile birlikte inorganik fosfat veya safra tuzlarının muhtemel varlığı ile esas sporülasyon düzenleyici olan Spo0A'nın aktivasyonuna sebep olduğu bildirilmektedir (Heredia ve ark.,1991; Philippe ve ark., 2006).

Diğer *Bacillus* ve *Clostridium* spp. ayrıca Spo0A'nın aktivitesi fosforilasyona bağlı olan bir yanıt düzenleyici protein olduğunu göstermektedir; fosforile Spo0A

daha sonra sporülasyon için gerekli olan genlerin yukarıdaki bölgelere bağlandığı bildirilmektedir. Bağlandıktan sonra fosforile edilmiş halde bulunan Spo0A, bu sporülasyon genlerinin ifade edilmesi bildirilmektedir. güçsüzleştirilmiş mutantlar kullanılarak, *C. perfringens*'in sporlanması ve CPE üretmesi için Spo0A'ya ihtiyacı olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Huang ve ark., 2004; Talukdar ve ark., 2015).

Fosforile edilmiş Spo0A aracılığıyla *C. perfringens*'in aktive edilmesi ile etkinliği oluşturulan hedef genler arasında SigF'yi kodlayan gen de yer aldığı bilinmektedir (Talukdar ve ark., 2015). SigF, alternatif bir sigma faktörü olarak *C. perfringens* sporülasyonu ve CPE üretimi için gerekli olan bir yapı olarak bilinmektedir. Ayrıca, bir *C. perfringens sigF* boş suşu kullanılarak, SigF'nin, her biri *C. perfringens*'de sporülasyonun tamamlanması için gerekli olan aşağı akış alternatif sporülasyona özgü sigma faktörlerinin, yani SigG, SigK ve SigE'nin üretimini düzenlediği bildirilmektedir. Ancak, SigF'nin (diğer üç sigma faktörünün üretimini düzenleyen) yanında, CPE üretimi için SigK ve SigE (ancak SigG değil) gerekli olduğu tespit edildiği bildirilmektedir (Li ve ark., 2010).

Cpe ifadesini düzenleyen A tipi suşlarda yer alan *cpe* geninin üstünde bulunan (kromozomal veya plazmit olsun) üç promotörün varlığı ile açıklanabildiği bildirilmektedir. Bu promotörlerden ilk sırada yer alan (P1), daha önce belirtilen SigK tanıma dizilerine benzer bölgeler içerirken, diğer ikinci ve üçüncü promotörler (P2 ve P3), SigE de yer alan tanıma dizileri ile uyduğu bildirilmektedir. Bu bilgiler birleştirildiğinde oluşan mevcut modelin, fosforile edilmiş Spo0A'nın SigF'nin transkripsiyonunu aktive ettiği ve ardından bunların tamamının sporülasyon için gerekli olan SigG, SigK ve SigE'nin transkripsiyonunu etkinleştirdiği ve son kalan ikisinin de CPE üretimi için esansiyel olduğu bildirilmektedir (Şekil1.5) (Ferreira ve ark., 2016).



Şekil 1.6. CPE üretiminin regülasyonu için model. CPE regülasyonu için bu güncellenmiş model, sporülasyon Spo0A'nın ana düzenleyicisinin, sporülasyona özgü sigma faktörlerinin ve CPE üretiminin regülasyonünde Agr-benzeri çekirdek algılama(quorum sensing) sisteminin rollerine ilişkin sonucu bütünleştirmektedir. Spo0A ve Agr sistemi tarafından CPE üretiminin düzenleyici mekanizmalarının henüz bilinmemesinden dolayı bu etkileşimlerin; kırık oklar/ oklar ve soru işaretleri ile gösterilmiştir. Gösterilen tüm düzenleyici faktörler sporülasyon için önem arz edip SigG dışında yer alanların tümü CPE üretimi için de esansiyeldir. CcpA (gösterilmemiştir) ayrıca CPE üretimini ve sporülasyonu henüz bilinmeyen bir yöntemle kontrol edildiği bildirilmektedir.

Fosforillenmiş Spo0A ve sporülasyona özgü alternatif sigma faktörlerine ek olarak, diğer birçok küresel regülatörün, *C. perfringens* tarafından sporlanma ve CPE üretiminde rol oynadığı bildirilmektedir (Ohtani ve ark., 2013).

Bu regülatörler arasında, karbon ve nitrojen kullanımında yer alan birçok genin ekspresyonunu doğrudan veya dolaylı olarak düzenleyen, birçok Gram pozitif bakteride bulunan küresel bir regülatör protein olan katabolit kontrol protein A (CcpA) bulunduğu bildirilmektedir (Richardson ve ark., 2015).

C. perfringens Tip A suşu, SM101'de *ccpA* geni homolog rekombinasyon ile bozulduğunda, hem sporülasyon hem de CPE üretimi büyük ölçüde azalmaktadır. Bununla birlikte, sporülasyonun ve CPE üretiminin bu CcpA'ya bağımlı regülasyonu içeren mekanizma bilinmemektedir. CcpA'ya ek olarak, *C. perfringens* Agr -benzeri çekirdek algılama sistemi, aynı zamanda, tip A suşu F5603 tarafından sporülasyon ve CPE üretimini de düzenlemektedir. Spesifik olarak, bu çekirdek tanıma sistemi, Spo0A üretimine bağlı olarak SigF, SigE, CPE ve sporülasyonu olumlu yönde düzenlendiği bildirilmektedir (Li ve ark., 2011).

Bir çalışma, sporülasyon sırasında SigE, SigF ve SigK ekspresyonu ve CPE üretimindeki bir artışı gösterdiği gibi, küçük RNA *vir X*'in sporülasyon ve CPE üretimini negatif olarak düzenlediğini bildirmektedir (Ohtani ve ark., 2013).

Birlikte ele alındığında, CPE'nin sıkı bir şekilde kontrol edilen düzenlemesi ve üretimi sırasında *C. perfringens* sporülasyonu, açıkça çeşitli global regülatörlere ve hiyerarşik bir şekilde hareket eden alternatif sporülasyon sigma faktörlerine bağlı olduğu bilinmektedir.

1.6. CPE'nin Hücresel Etkisi

Klaudinler, epitelyal ve endotelyal hücrelerde apikal hücre-hücre temas bölgelerinde bulunan sıkı bağlantıların (Tight Junction; TJ) temelini oluşturmaktadırlar. Klaudinler, memeli TJ'lerinin yapısını, işlevlerini düzenlemede önemli etkileri olan fibriller meydana getirebildiği bildirilmektedir. Klaudin ailesi, tipik olarak 20-27 kDa boyutunda olan 27 farklı proteinden, ayrıca dört transmembran alanından, kısa bir C- terminal sitoplazmik kuyruktan ve iki hücre dışı halkadan (ECL-1 ve ECL-2) oluştukları bildirilmektedir (Krause ve ark., 2008; Furuse, 2010; Gunzel ve Yu, 2013).

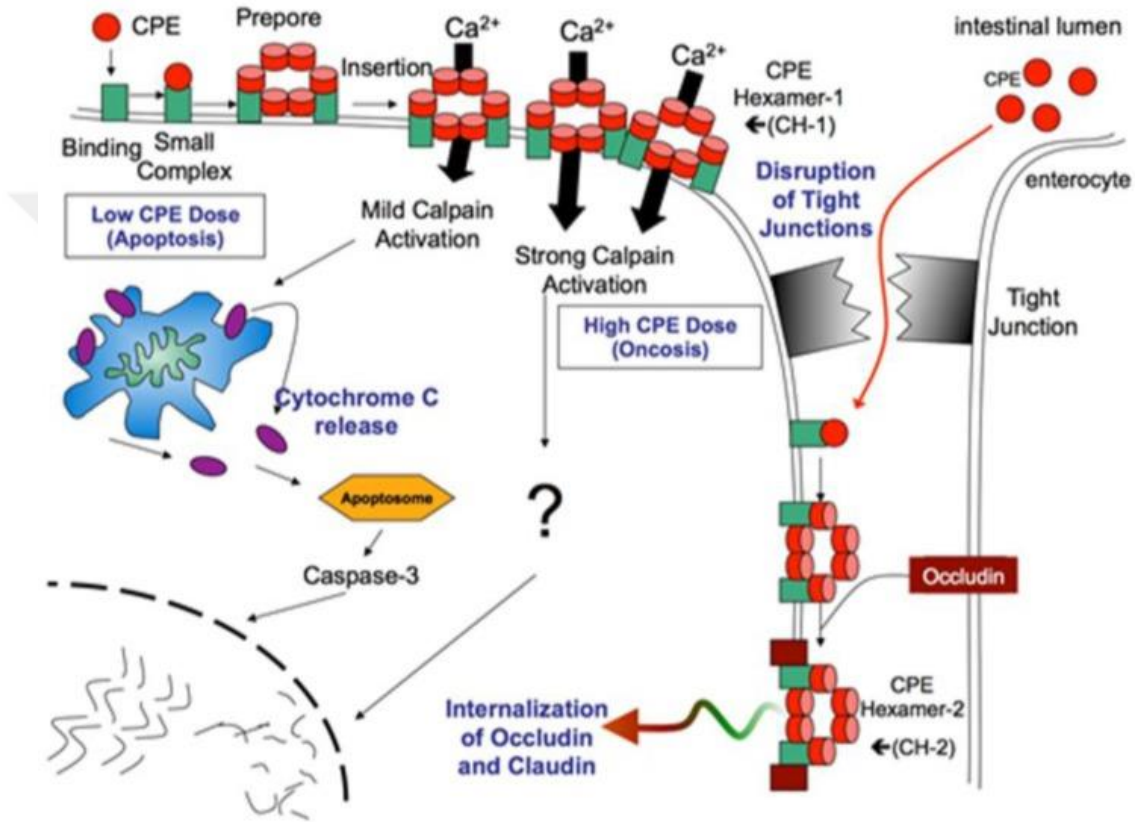
Klaudinler sıkı bağlantı protein (tight-junction) ailesinin üyeleri olarak CPE'nin konakçı hücrelere bağlanması için fonksiyonel reseptör olarak görev aldıkları bildirilmektedir. Ayrıca, araştırmalar neticesinde klaudin 3, 4, 6, 8 ve 14, kanıtlanmış CPE reseptörleri olarak bildirilmektedir. Bununla birlikte, klaudin ailesinin 27 üyesinin tümü CPE reseptörü değildir, çünkü klaudin 1, 2, 5 ve 10, CPE'yi patofizyolojik olarak ilgili toksin konsantrasyonlarında bağlamamaları bildirilmektedir (Lal-Nag ve ark., 2012; Shrestha ve McClane, 2013).

Kimerik klaudinlerin kullanılması ile yapılan çalışmalarda, bir klaudin'in CPE molekülünü bağlaması için ECL-2 bölgesinin önemli rol oynadığını bildirilmektedir. Peptid mapping çalışmaları, ECL-2 bölgesi içinde CPE bağlanması için önemli olan bir pentapeptit sekansı tanımlandığı bildirilmektedir. Bölgeye yönelik mutajenez, bu pentapeptitte bulunan bir Asn rezidüesinin CPE bağlanması için kritik bir evet/hayır belirleyicisi olduğunu ve bitişik rezidülerin CPE bağlanmasının afinitesini modüle ettiğini bildirmektedir (Winkler ve ark., 2009; Robertson ve ark., 2010).

CPE: ECL-2 etkileşimlerinin önemini vurgulayan sonuçlar değerlendirildiği zaman; yapılan son yapısal analizler klaudin reseptörlerinin ECL-1 ve ECL-2 bölgelerinin CPE ile etkileştiğini ve ECL-1 ile toksin arasındaki etkileşimlerin de bağlanma için önemli bir yer edindiğini bildirmektedir(Saitoh ve ark., 2015).

CPE'nin klaudin reseptörlerine bağlanması, CPE ve hem reseptör hem de reseptör olmayan klaudinleri içeren ~90 kDa'lık bir "küçük kompleks" oluşumu ile sonuçlandığı bildirilmektedir (Robertson ve ark., 2007). Bu küçük kompleks, sitotoksisiteyi uyarmak için tek başına etkili olmamakla birlikte birkaç küçük CPE kompleksinin, plazma membran yüzeyinde bir ön gözenek oluşturarak CPE oligomerizasyonunu desteklemek üzere bir etkileşime girebilmesi bildirilmektedir

(Smedley ve ark., 2007). Bu oligomerizasyon, bir CPE hekzameri ve hem reseptör hem de reseptör olmayan klaudinler içeren CH-1 adlı ~450 kDa'lık bir CPE “büyük kompleksin” oluşumuyla sonuçlandığı bildirilmektedir (Robertson ve ark., 2007; Ferreira ve ark., 2016).



Şekil 1.7. *C. perfringens* enterotoksininin etki mekanizması . CPE önce klaudin reseptörlerine bağlanmakta (yeşil kutuları) ve konakçı hücrelerin apikal yüzeyinde bulunur ve küçük bir kompleks oluşturmaktadır. Aynı zamanda reseptör olmayan klaudin içeren birkaç (yaklaşık altı) küçük kompleks, CPE oligomerizasyonunu teşvik etmekte ve plazma membran yüzeyinde bir ön gözenek oluşturmak için etkileşime girmektedir. Prepore'un CPE moleküllerindeki β -hairpin'ler daha sonra membranlara giren β -barreller oluşturarak CH-1 adlı aktif bir gözenek meydana getirmektedirler. Düşük doz CPE tedavisi, sınırlı bir kalsiyum akışına ve bazı sitoplazmik kalpain aktivasyonunun kaspaz-3 aracılı apoptoza neden olmaktadır. Yüksek doz CPE tedavisi, onkoz yoluyla hücre ölümünü indüklemek için güçlü bir kalsiyum akışı sitoplazmik kalpain aktivasyonuna neden olmaktadır. Hücrelerin morfoljik yapılarında meydana gelen hasarlar, hücrelerin bazolateral yüzeyini açığa çıkarmak yoluyla CH-1 kompleksi oluşturmak amacıyla CPE'nin diğer reseptörlere erişmesine olanak sağlamaktadırlar. Bu bazolateral yüzey maruziyeti ile birlikte CPE-reseptör olmayan

okludin ve klaudinin molekülleri sitoplazmada CH-2 adlı ikinci büyük bir kompleksin oluşumuna sebep olduğu bildirilmektedir (Ferreira ve ark., 2016).

CH-1 kompleksindeki CPE'den gelen β -hairpin bir β -barrel birleşir ve bu zarlara hızla girerek bir por oluşturmakta ve hassas memeli hücrelerinde plazma zarı geçirgenlik değişikliklerine neden olduğu bildirilmektedir. CPE poru katyona geçirgendir ve CPE kaynaklı hücre ölümü için gerekli değilse de önemli olan bir kalsiyum akışına izin verdiği bildirilmektedir (Chakrabarti ve ark., 2005; Ferreira ve ark., 2016).

Düşük CPE dozları, düşük sayıda por oluşumuyla sonuçlamakta ve orta düzeyde bir kalsiyum akışına neden olmaktadır. Kalmodulin ve kalpain aktivasyonunu içeren bir süreç yoluyla, bu sınırlı kalsiyum akışı, klasik apoptozun tüm ayırt edici özellikleriyle (örneğin sitokrom-c salınımı) CPE etkisine maruz kalan hücrenin kaspaz-3 vasıtasıyla ölümünü tetiklemektedir. Buna karşılık, daha yüksek CPE dozları çok sayıda por oluşumuna neden olarak büyük bir kalsiyum akışına neden olduğu bildirilmektedir. Kalmodulin ile beraber çok güçlü bir kalpain aktivasyonunu içeren bu yüksek miktarlarda oluşan kalsiyum akışı, onkoz (oncosis) olarak bilinen bir nekrotik hücre ölümü ile sonuçlandığı bildirilmektedir (Chakrabarti ve ark., 2003).

Uzun zaman, CPE'e maruz kalan hücrelerde, bazolateral hücre yüzeyinde morfolojik hasar ortaya çıktığı bilinmektedir. Bu, toksinin, epitelyal TJ'lerin yapısal bir bileşeni olan klaudinler ve okludinler içeren CH-2 daha da büyük (~600 kDa) bir kompleks oluşturacak şekilde bağlanmasına izin vermektedir. CH-2'nin sitotoksositeye katkısı henüz kesinliği net olmasa da okludin'in (ve klaudinlerin) CPE'ye maruz kalan hücrelere içselleştirilmesini açıklamaya katkı sağlayabildiği bildirilmektedir (Ferreira ve ark., 2016).

1.7. CPE *in vivo* Etkileri

İnsan dahil tüm memelilerin ince bağırsağında enfeksiyona neden olan mikroorganizmalardan birini CPEler oluşturduğu bilinmektedir. Bu hasar bağırsak mukozasında histolojik boyutta olup toksin benzeri bir şekilde insan ince bağırsak dokusuna *ex vivo* zarar verdiği belirlenmektedir. CPE'nin neden olduğu histolojik hasar, epitelyal nekroz ve deskuamasyonun yanı sıra ciddi villus kısalmasını içermektedir. Hayvan model çalışmalarının bu histolojik hasar gelişiminde CPE başlatılan sitotoksite bir rolü olduğunu desteklemektedir. Sitotoksik olmayan, ancak bağlanma yeteneğine sahip CPE türevleri tavşanların ince bağırsaklarında histolojik hasarın gelişmesine neden olmadığı bildirilmektedir. CPE'nin hücresel etkisini toksinin bağırsak etkileriyle daha fazla ilişkilendiren gözlemler, CPE'nin ilk önce bol miktarda CPE reseptörü klaudin 4 bulunan tavşan ince bağırsağında villus uçlarına zarar verdiği bildirilmektedir (Smedley ve ark., 2008).

CPE'nin neden olduğu bağırsak hasarı, CPE'nin neden olduğu sıvı ve elektrolit salgılanmasında önemli olmasa da, önemli bir katkıda bulunuyor gibi görünmektedir. Örneğin, tavşan ince bağırsak anslarında, CPE'nin neden olduğu histolojik hasarın başlangıcı ile sıvı ve elektrolit kaybının başlangıcı arasında yakın bir zamansal ilişki tespit edilmektedir. Ayrıca, histolojik hasara neden olabilen CPE dozları ile tedavi edilen hayvan modellerinin sadece ince bağırsaklarında sıvı ve elektrolit kayıpları bildirilmektedir (Sherman ve ark., 1994).

Uzun yıllar boyunca, bu organın reseptör klaudinlerin mevcudiyeti nedeniyle yüksek seviyelerde enterotoksin bağlama kabiliyetine rağmen, CPE'nin kolon üzerinde hiçbir etkisinin olmadığına inanılıyordu, ancak yakın tarihli bir çalışma, CPE'nin tavşan kolonunda histolojik hasara ve sıvı/elektrolit kayıplarına neden olduğunu göstermektedir. Bu sonuç, Oklahoma psikiyatri tesisindeki hastalarda meydana gelen şiddetli *C. perfringens* tip A gıda zehirlenmesi salgınında gözlenen nekrotizan koliti açıklamaya yardımcı olduğu bildirilmektedir (Garcia ve ark., 2014).

Daha önce bahsedildiği gibi, çalışmalar CPE'nin bağırsaklardan doğrudan emilebileceğini göstermektedir. Enterotoksinin dolaşımdaki bu görünümü, karaciğer ve böbrekler gibi bağırsak dışı organlara bağlanmasına yol açmaktadır. Bu etkileşimler, büyük ölçüde farelerde kalp durmasına neden olan hiperpotasemi nedeniyle ölümcül enterotoksemiye neden olduğu bildirilmektedir (Caserta ve ark., 2011).

CPE'nin neden olduğu enterotokseminin, psikiyatri hastanelerinde daha önce bahsedilen *C. perfringens* tip A gıda zehirlenmesi salgınlarının ciddiyetini açıklayabileceği öne sürülmektedir. Bu salgınlar ile birlikte kullanılan psikotropik ilaca bağlı kabızlık veya fekal impaksiyon yan etkileri olan aynı zamanda muhtemelen ishali geciktiren ve CPE'nin bağırsaklarla uzun süreli temasını geciktirerek toksin emilimini artırarak insanlarda ölüme neden olduğu bildirilmektedir (Ferreira ve ark., 2016).

1.8. CPE'nin Aşı olarak kullanım potansiyeli

Tanımlanmış bir sekans CPE fragmanı, epitop mapping çalışmalarında bir CPE-spesifik monoklonal antikorlar (MAb) paneli ile reaksiyona girerek enterotoksin proteini boyunca dağılmış, epitop sunumunda yer alan en az dört bölge tespit edilmiştir. Bir anti-CPE MAb, yani MAb 3C9 tarafından tanınan lineer bir epitop, enterotoksinin C-terminal bölgesinde 30 amino asit ile eşleşmektedir. CPE'nin C-terminal bölgesi enterotoksinin klaudin'e bağlanmasında rol oynamaktadır, bu nedenle MAb 3C9'un bu bölgede bulunan bir epitop ile reaktivitesi, bu monoklonalın CPE reseptör bağlanmasını bloke eden nötralizan bir antikor olduğu gözlemleriyle tamamen tutarlı olduğu bildirilmektedir (Shrestha ve ark., 2014).

C-terminal bölgesi CPE fragmanları sitotoksik olmadığından dolayı, bu fragmanlarda nötralizan bir epitopun varlığı, bunların potansiyel CPE aşı adayları olabileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla, bir tiroglobulin taşıyıcının, CPE'nin C-terminalında 30 amino asidine karşılık gelen sentetik bir peptit ile konjuge edilmesiyle test edilmektedir. Farelerin intravenöz yolla bu konjugat ile aşılmasının ardından yüksek titrelerde CPE-nötralizan antikor yanıtı oluşturmaktadır. Bu konjugat böylelikle bir aşı potansiyeline sahip olmakla birlikte, CPE aracılı hastalığa karşı bağırsak koruması için aday gösterilmektedir ancak henüz mukozal bir IgA yanıtını uyarma yeteneği açısından test edilmediği bildirilmektedir (Ferreira ve ark., 2016).

1.9. *Clostridium perfringens* beta2 toksin

Beta2 toksini (CPB2), 28 kDa ve por oluşturan bir toksin olarak ilk kez nekrotik enteritte maruz kalan domuz yavrusundan tespit edilmiştir. Daha sonra, bu toksini kodlayan gen (*cpb2*), insanlar, sığırlar, koyunlar ve keçiler, atlar, tavuklar ve domuzlar dahil olmak üzere çok çeşitli hayvanlardan ve enterik hastalığı olan insanlardan alınan izolatlarda tespit edilmiştir. *C. perfringens* türlerinin çoğu veya tümü, CPB ile önemli bir amino asit homolojisine sahip olmayan CPB2 ürettiği bildirilmektedir. İki ana *cpb2* varyantı "konsensüs" geni veya "atipik" gen bilinmektedir. Konsensüs geni hemen hemen her zaman domuz izolatlarında eksprese edilmektedir (>%90). Ancak domuz dışı izolatların *cpb2* genlerinin yaklaşık yarısının ekspresyon eksikliğine yol açan bir frameshift'e sahip oldukları bildirilmektedir. CPB2'nin farklı hayvan türlerinin bağırsak hastalıklarına katılımı da kanıtlanmadığı bildirilmektedir, çünkü *cpb2*-pozitif *C. perfringens* suşları genellikle sağlıklı hayvanlardan da izole edilmektedir. Aksine bir kanıt olmasından dolayı aksesuar ve minör toksin olarak kabul edildiği bildirilmektedir (Gohari ve ark., 2021).

İnsanlarda, toksin, antibiyotikle ilişkili ishalde enterotoksin ile ilişkilendirilmiştir. *C. perfringens* beta2 toksin aracılı enterik hastalıklarda gözlenen klinik belirtiler, dışkıda kan, karın ağrısı ve vücut kondisyon kaybı ile macunsu

ishalden sulu ishale kadar değişmektedir. Beta2 toksininin, nekrotik ve hemorajik enterit üretiminde *C. perfringens*'in diğer ana toksinleri ile sinerji içinde hareket edebileceği varsayılmaktadır. Sağlıklı hayvanlardan beta2 toksijenik *C. perfringens* izolasyonu, bir risk ve potansiyel bir sağlık tehlikesinin göstergesi olarak kabul edildiği bildirilmektedir. Enterik disbiyozonu uyandıran durumlar ve diğer predispozan faktörler klostridial hastalık salgınına yol açabildiği bildirilmektedir (Gurjar, 2008; Kiu ve Hall, 2018).

Clostridium perfringens beta2 toksini (CPB2) hayvanlarda ve insanlarda nekrotik enteritin önemli bir etken olarak görünmesinin yanında; saflaştırmanın zorluğu ve bu toksine karşı spesifik antikorların bulunmaması nedeniyle de patojenik etkinlikleri ve fonksiyonel mekanizmaları hakkında yapılan çalışmalar bir takım zorluklar içerdiği bildirilmektedir. Konu ile ilgili çalışmalar göz önüne alındığında biyolojik ve patolojik mekanizmalarının daha fazla araştırılması için saflaştırılmış bir CPB2 toksinine ve bu toksine karşı oluşmuş olan bir antikor elde etmek önemli olduğu bildirilmektedir (Zeng ve ark., 2016; Gohari ve ark., 2021).

1.10. *Clostridium perfringens* Kaynaklı Enfeksiyon Hastalıklarının Patogenezi

1.10.1. Klostridyal Miyonekroz / Gazlı Gangren

Gazlı gangren, insanlarda meydana gelen bakteriyel hastalıklarından biri olmakla birlikte hastalığın patogenezi, *Clostridium perfringens* tip A'nın vejetatif hücreleri veya sporları, büyük bir travmatik yaralanma veya cerrahi bir yarayla vücut boşluğuna girmesi ve infekte etmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. etkenin toprak veya diğer çevresel kotaminantlardan travma veya cerrahi müdahale sonucu oluşan yaradaki yumuşak dokuya ulaşması, diğeri ise yaralanan bölgelerde kan akımının bozulmasına bağlı oluşan oksijenden fakir alanların etkenin üremesi için ideal ortam oluşturmalarıdır. Etken antibiyotik tedavisi ve cerrahi müdahale kombinasyonu ile hızlı bir şekilde

kontrol edilmezse, hastada hızlı bir şekilde sistemik toksemi ve şok oluşturur; toksinler vücudun hemodinamik sistemleri üzerinde etki ederek ölüme neden olur. Hastalıkta rol oynayan birincil toksin α -toksin, enzimatik aktiviteye sahip olduğunu gösteren ilk bakteri toksinidir. *Clostridium perfringens* Tip A'nın, ürettiği α -toksin fosfolipaz C ve sfingomiyelinaz aktivitelerine sahip ölümcül bir dermonekrotik toksin olduğu bildirilmektedir (Rood., 1998; Stevens ve Bryant, 2002).

1.10.2. Gıda İntoksikasyonu

Clostridium perfringens, hem histotoksik hastalıklara hem de bağırsak hastalıklarına, yani enterit veya enterotoksemiye (bağırsakta üretilen toksinler dolaşıma emilir ve daha sonra beyne zarar verir) neden olan en etkili patojendir. Gıda enfeksiyonu, cpe geni taşıyan *Clostridium perfringens* Tip A ile kontamine gıdaların tüketilmesi sonucu oluşmaktadır. *Clostridium perfringens* kaynaklı gıda enfeksiyonlarının patogeneğinde gıdalara uygulanan ısıtma ve soğutma işlemleri önemlidir. Ette/et içeren yiyeceklerin uygun olmayan şekillerde ısıtma ve depolama koşullarında yada yiyeceklerin dondurulduktan sonra birkaç defa olmak üzere yeniden ısıtılması ile *Clostridium perfringens* sporlarının germinasyonunun yanında vejetatif hücrelerin hızla bir şekilde büyümesine sebep olduğu bildirilmektedir. İnce bağırsakta sporülasyon sonucu enterotoksin açığa çıktığında, epitel hücrelere bağlanarak, oluşturduğu doku hasarını takiben, sıvı ve iyon kaybı bildirilmektedir (Rood,1998; Uzal ve ark., 2014).

1.10.3. Enteritis Nekrotikans

Clostridium perfringens Beta2 toksini (CPB2) hayvanlarda ve insanlarda önemli bir nekrotik enterit faktörü olarak bildirilmektedir. Bununla birlikte, patojen rolleri ve fonksiyonel mekanizmaları, purifikasyon zorluğu ve toksine karşı spesifik

antikorların olmaması çalışmalarda problemler yarattığı bildirilmektedir. *Clostridium perfringens* tip C tarafından üretilen β -toksinin neden olduğu enteritis nekrotikans kontamine gıdaların tüketilmesi ile abdominal kramplar, kanlı diyare, kusma gibi semptomlarla karakterize olduğu bildirilmektedir. Bağırsaktaki cpb2-pozitif *C. perfringens* suşlarının varlığı insanlardaki bağırsak hastalıklarıyla ilişkilendirilmiştir. Bağırsakta oluşan nekrotik yangının, ilerleyen aşamalarda bağırsak obstrüksiyonları ve sistemik toksemi sonucu ölümlere neden olduğu bilinmektedir. Hastalığın mortalitesi % 15-25 arasında değiştiği bildirilmektedir (Brynsted ve Granum, 2002; Zeng ve ark., 2016).

Bu tez çalışmasında, *Clostridium perfringens* intoksikasyonları için koruyucu ve tedavi edici amaçlı rekombinant enterotoksin, alfa ve beta2 toksin geliştirildi. Bu amaçla dünya çapında ve özellikle Türkiye’ de en sık izole edilen *C.perfringens* type A’ ya karşı rekombinant toksinler geliştirilmiştir. Bu rekombinant proteinler koruyucu ve tedavi amaçla kullanıma hazırlanmıştır. Hazırlanan proteinler immün serum olarak gıda enfeksiyonların’da tedavi amaçlı kullanılabilir. Ayrıca *C.perfringens* teşhis kiti olarak enfeksiyon kaynağının hangi toksinleri içerdiğinden bilgi elde edilir. Bu çalışma ülkeye ekonomik olarak katkı sağlamaktadır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan Suşun Seçimi

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu'nda yer alan daha önce Anabilim Dalında Refrans Suş olarak kullanılan; *Clostridium perfringens* ATCC13124 (*cpa* gen için), NCTC 8239 (*cpa*, *cpe* genler için), ATCC 3626 (*etx*, *cpb* gen için) suşları kullanıldı.

2.1.2. Bakteri İzolasyon ve İdentifikasyon için Klasik Kültür yöntemler

2.1.2.1. Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC) Agar (Oxoid, CM 587)

- Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC) Agar (Oxoid CM587)
- *Perfringens* Selective Supplement (Oxoid SR0088E)

TSC agar içeriliğinde mevcut olan ferrik amonyum sitrat ve sodyum metabisülfid, *C. perfringens*'in sülfid indirgemesinin indikatörü olarak kolonilerin siyah görünüşe sahip olmasında rol oynadığı bilinmektedir. *Perfringens* TSC Selective Supplement (Oxoid, SR 88) refakatçi florayı inhibe ederek *C. perfringens* izolasyonu için seçicilik sağlamaktadır.

Hazırlanma yöntemi:

Agardan 23 g tartıldı ve 500 mL distile su ilave edildi manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Besiyerinin pH değeri 7'ye ayarlandı ve çözünmesi için sıcak su banyosuna konuldu. Besiyeri otoklavlanarak edilerek sterilize edildi. Daha sonra Perfringens Supplement besiyerine ilave edildi, soğutuldu ve steril petrilere paylaştırıldı.

2.1.2.2. Kanlı Agar

Bu test için BD BBLTM CDC Anaerobe 5% Sheep Blood Agar (111-251733-N-01) kullanıldı

2.1.2.3. Cooked Meat Medium (Oxoid, CM 81)

Cooked Meat Medium'da *Clostridia* türleri sakkarolitik (eti parçalayamadan asit ve gaz oluşumu, hidrojen sülfid üretebilme) ve proteolitik aktivite (eti parçalayarak kötü kokulu sülfür bileşikler oluşturma) göstermektedir.

Hazırlanma yöntemi:

Tüpler içerisine 1 g hazır besi yeri konuldu ve üzerine 10 mL distile su ilave edildi. Otoklavlandı ve steril hale getirilerek test için hazırlandı.

2.1.2.4. Gram Boyama Gereçleri

Bu çalışmada *Clostridium perfringens*' in doğrulamasında kullanılan bir yöntem olarak ele alındı ve bakterinin Gram pozitif olduğunu ve morfolojik özelliklerini tespit etmek için kullanıldı.

2.1.2.4.1. Kristal Viyole (Merck, 109218)

Bu test için kristal viyole solüsyonu kullanıldı. Bazik özellikteki nedeniyle, Gram pozitif bakteriler mor renge boyanması sağlandı. Gram pozitif bakterilerin hücre duvarında teikoik asidin oluşturduğu kalın peptidoglikan yapıdan dolayı pozitif bakteriler mor olarak tespit edildi.

2.1.2.4.2. İyodin Solüsyonu (Merck, 624M)

Bu çalışmada Lugol'un iyodini solüsyonu kullanıldı ve Kristal viyole ile boyana hücreler lugol ile muamile edildi, bu sayede Gram pozitif bakterilerin boyandığı mor renk kalıcı hale geldi.

2.1.2.4.3. Alkol (Merck, 100971.2500)

Hazır halde % 96 saflıkta olan etil alkol Gram boyama aşamasında dekolarizasyon için kullanıldı. Kristal viyole ve lugol sonrasında Gram pozitif bakterilerin mor rengi alkol ile muamile edildi.

2.1.2.4.4. Safranin (Merck, 94635)

Kırmızı renk olan safranin alkol ile rengini bırakan Gram negatif bakterilerin yeniden boyanması için kullanıldı.

2.1.2.4.5. İmmersiyon Yağı (Merck, 104699.0100)

İmmersiyon yağı, bakterilerin morfolojik değerlendirme aşamasında daha iyi görüntü almak için kullanıldı.

2.1.2.4.6. Işık Mikroskop

Boyanan preparatlar ışık mikroskobu (Nikon, Alphaphot, Japonya) ile 10x, 40x ve 100x objektifler ile değerlendirildi.

2.1.2.5. Laktoz Jelatin Medium

Mikroorganizmaların proteolitik aktivitelerini ortaya çıkarmak için jelatin kullanılmaktadır. Laktoz jelatin medium bir katı besi yeri olarak mikroorganizmaların laktoz fermentasyonu sonucu asit ve gaz oluşturma, jelatinin jelatinaz aktivitesiyle sınılaşma özelliklerini belirlemek için kullanılmaktadır. Dolayısıyla, aşağıda belirlenen bileşenler 1 litre distile suda çözdürüldü ve karışımın pH'sı 7,5'a ayarlandı. Daha sonra su banyosuna konuldu ve karışım içine jelatin yavaşça ilave edildi ve jelatinin erimesi sağlandı. Homojen hale gelen bu karışım, tüplere 10'ar mL olarak transfer edildi ve son olarak teste hazır hale gelmesi için otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilmesi sağlandı.

Bileşim:

Pepton kazein	15 g
Maya ekstraktı	10 g
Laktoz	10 g
Na ₂ HPO ₄	5 g

Jelatin	120 g
Fenol red (% 1)	5 mL
Distile su	1000 mL
pH	7,5 ± 0,2 25 °C

2.1.2.6. Nitrat Motilite Medium (Fluka 14305)

Nitrat Motilite Medium tüpte hazırlanan yarı-katı bir agar olarak bilinmektedir. Hareketli bakteriler agar’da bulanıklık oluşturarak ekim çizgisinin dışına ve hareketsiz bakteriler ekim çizgisinde üremektedirler. Besiyerine nitrat reaktifi ve çinko tozu ilave edildiğinde bakterinin nitratı nitrite veya amonyağa indirgeme özelliği tespit edilmektedir.

Bileşimi	g/L
Agar	3g
Disodyum hidrojen fosfat	2,5g
Galaktoz	5 g
Jelatin pepton (pankreatik)	5 g
Et ekstraktı	3 g
Potasyum nitrat	5 g

Hazırlanma yöntemi:

Hazır besiyerinden 23,5 g tartıldı ve 1 L distile suda çözdürüldü. Karışım üzerine 5 mL gliserin ilave edilip pH değeri ayarlandı ve sıcak su banyosunda eritildi. Daha sonra tüplere 11 ml ‘şer olarak dağıtıldı ve steril hale gelmesi için otoklav edildi.

2.1.2.7. Griess Ilosvay Ayraçları

Ayraçlar taze olarak eşit hacimde hazırlandı ve Griess Ilosvay A (% 0,5'lik alfa naftilamin) ve Griess Ilosvay B (% 0,8'lik sülfanilik asit) karışımından oluşmaktadır.

2.1.2.7.1. Griess Ilosvay Solüsyonu A

Solüsyonu hazırlamasında α -naftilaminden 0,5 g tartıldı ve 100 ml, 5 M'lik asetik asitte çözündürüldü.

Bileşimi

α -naftilamin (Merck; 8.22291.0100)	0,5 g/L
Asetik asit (5 M) (Merck; 1.00366.2500)	100 mL

2.1.2.7.2. Griess Ilosvay Solüsyonu B

Solüsyonu hazırlaması için sülfanilik asitten 0,8 g tartıldı ve 100 mL, 5 M'lik asetik asitte çözündürüldü.

Bileşimi

Sülfanilik asit (Merck; 1.00686.0250)	0,8 g/L
Asetik asit (5 M) (Merck; 1.00366.2500)	100 mL

2.1.2.7.3. Çinko Tozu (Merck, 1.08774.1000)

Çinko tozu nitrat redüksiyon testinde Griess Ilosvay solüsyonları ile reaksiyon gerçekleşmediği durumlarda nitrat varlığını tespit etmek için kullanıldı.

2.1.2.8. Hidrojen Peroksit Solüsyonu(Merck; 1.08597.1)

Hidrojen peroksit bakterilerde katalaz enzimini aktive eder. Katalaz, hidrojen peroksiti su ve oksijen olarak ayrıştırmakla birlikte toksik etkiyi ortadan kaldırır. Bakterilerin katalaz enzimi varlığını tespit etmek için % 3 hidrojen peroksit (H₂O₂) hazırlandı. Hazır % 30'luk hidrojen peroksitten 3 mL alındı ve üzerine 27 mL distile su ilave edildi bu % 3'lük H₂O₂ solüsyonu katalaz testi için kullanıldı.

2.1.2.9. Brain Heart Infusion Broth(Oxoid, CM 1135)

Brain Heart Infusion Broth bakterilerin hızla çoğalmasını ve gelişmesini sağlayan besiyeridir.

Bileşimi	g/L
Beyin infüzyonu	12,5
Sığır kalp infüzyonu	5
Proteoz pepton	10
Glukoz	2
Sodyum klorit	5
Disodyum fosfat	2,5
Potasyum nitrat	5
pH	7,4 ±0,2 @ 25 °C

37 g Brain Heart Infusion Broth tartılarak 1 L distile suda çözündürüldü ve tüplere 10 mL miktarda dağıtıldı. Tüpler otoklavda steril edildi ve pH 7,4 $\pm$ 0,2'ye ayarlandı.

2.1.2.10. Jar, Anaerojen Kit ve indikatörü ile Parafin

C. perfringens'in gelişimi ve anaerob ortam sağlaması için jar içerisinde AnaeroGen (Oxoid AN 025A- AN 035A) kitler ve indikatörü (Oxoid, BR0055) kullanıldı. Ayrıca *C. perfringens* izolatlarının Cooked Meat Medium ve Brain Heart Infüzyon Broth'da anaerob ortamda muhafaza edilmesi için katı halde olan parafin otoklavlandıktan sonra sıvı haldeyken tüplerde olan medium üzerine ilave edilerek kullanıldı.

2.1.2.11. Gliserol (Merck, 104092)

Plasmidler ve bakterileri -80 °C'de uzun süre muhafaza edebilmek için kullanıldı

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Plasmid

Klonlama basamağında pET28a(+) plazmidi ((Novagen) kullanıldı

2.1.4. Çalışmada Kullanılan Enzimler

Klonlama çalışmasında kullanılan tüm enzimler aşağıda belirlenmektedir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Kullanılan kesim enzimleri ve markası.

Enzimler	Marka
FD-EcoRI	ThermoScientific/ABD
FD-XhoI	ThermoScientific/ABD
Taq DNA polimeraz	ThermoScientific/ABD
Taq DNA Phusion	ThermoScientific/ABD
T4 DNA ligaz	ThermoScientific/ABD
T4 DNA polimeraz	ThermoScientific/ABD

2.1.5. Çalışmada Kullanılan *E.coli* Suşları

Tez çalışmasında genel klonlama amacıyla *E.coli* Max Efficiency DH5-alfa ve protein ekspresyonu için BL21(DE3) Star suşları kullanıldı.

2.1.6. Bakteri Besiyerleri

Bu tez çalışmasında klonlama ve plasmid hazırlama bölümünde besiyeri olarak Super Optimal Broth (SOC), Luria Bertani (LB) broth ve agar kullanıldı (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Bakteri besiyerlerinin hazırlanması.

LB broth		LB agar		SOC	
Yeast extract	5 g	Yeast extract	5g	Yeast extract	% 2 (w/v)
Tryptone	10 g	Tryptone	10g	Tryptone	% 0,5 (w/v)
NaCl	10 g	NaCl	10g	NaCl	10 mM
distile su	1 litre	distile su	1litre	KCl	2,5 mM
		Agar	20g	MgCl ₂	10 mM
				Glucose	20 mM

2.1.7. TBE Buffer pH=8 (10 X) 1000 ml

Tris base 890 mM 107,812 gr

Boric Acid 890 mM 55,0 gr

EDTA 25mM 9,25 gr

1000 ml double-distille su (ddH₂O) üzerlerine eklendi ve pH 8'e ayarlandı.

2.1.8. TE (for 100 ml)

Tris-Hcl pH=8 10mM 0,12 gr

EDTA 1mM 0,0322 gr

100 ml double-distille su (ddH₂O) üzerlerine eklendi ve pH 8'e ayarlandı.

2.1.9. DNA Ekstraksiyon

Bu çalışmada iki yöntem kullanıldı; 1. Boiling metod 2. İ-genomic BYF DNA Mini Kit (İntron Biotechnology).

2.1.10. Primer Çiftleri

Çizelge 2.3. Bu çalışma için primerler CLC, Main WorkBench, Danimarka ile tasarlandı.

PRİMER	Primer sekansları	bp (size gene)
Alpha-full-F: <u>GAATTC</u> ATGAAAAGAAAGATTTGT Alpha-full-R: <u>CTCGAG</u> TTTTATATTATAAGTTGAATT		1194
CT-Alpha-F: <u>CGGAATTC</u> AAAAGAACTAGTAGCTTACAT CT-Alpha-R: <u>CTCGAG</u> ATTTTATATTATAAGTTGA		347
Cpe-Full-F: <u>GAATTC</u> ATGCTTAGTAACAATTTAAATCC Cpe-Full-R: <u>CTCGAG</u> AAATTTTTTGAAATAATATTGAATAAGG		958
CT- Cpe-F: <u>GAATTC</u> AGATGTGTTTTAACAGTTCCATCTAC CT- Cpe-R: <u>CTCGAG</u> TAAAATTTTTTGAAATAATATTGAATAAGGG		407
Cpb2-Full-F: <u>GAATTC</u> ACAAATGAAAAAATTAATAGTAAAAG Cpb2-Full-R: <u>CCCTCGAG</u> ATAACAATAACCCTCACCAAATAC		798
CT-Cpb2-FWD: <u>GAATTC</u> CACCAAGTTTCAGAACTCA CT-Cpb2-REV: <u>CTCGAG</u> CAATAACCCTCACCAAATAC		355

GAATTC : Restriction enzyme EcoRI , CTCGAG: Restriction enzyme XhoI.

2.1.11. Jel Ekstraksiyon Kit (Catalog numbers K2100-12 and K2100-25)

Bu çalışmada jel ekstraksiyonu için Invitrogen™ PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Catalog numbers K2100-12 and K2100-25).

PureLink Hızlı Jel Ekstraksiyon Kiti, çeşitli yüzdelerde TAE veya TBE agaroz jellerinden DNA parçalarını hızlı ve verimli bir şekilde saflaştırmağa olanak tanır. DNA, PureLink silika membran bazlı hızlı jel ekstraksiyon kolonları kullanılarak farklı erime noktalarına sahip agaroz jellerden ~30 dakikada ekstrakte edilebilir ve saflaştırılabilir.

2.1.12. T4 DNA Ligaz (Thermo Scientific; Catalog number: EL0011)

Thermo Scientific T4 DNA Ligaz, dubleks DNA veya RNA'da yan yana yerleştirilmiş 5'-fosfat ve 3'-hidroksil terminalleri arasında bir fosfodiester bağı oluşumunu katalize eder. Enzim, dubleks DNA, RNA veya DNA/RNA hibritlerindeki tek zincirli çentikleri onarır. Aynı zamanda, kohezif veya kör uçlarla(blunt) DNA parçalarını birleştirir, ancak tek sarmallı nükleik asitler üzerinde hiçbir aktivitesi yoktur.

T4 ligazın kullanım alanları

- Restriksiyon enzimi tarafından üretilen DNA fragmanlarının klonlanması
- PCR ürünlerinin klonlanması
- Çift sarmallı oligonükleotid bağlayıcıların veya adaptörlerin DNA'ya bağlanması
- Bölgeye yönelik mutageniz
- Güçlendirilmiş parça uzunluğu polimorfizmi (AFLP)
- Ligaz aracılı RNA tespiti
- Dubleks DNA, RNA veya DNA/RNA hibritlerinde Nick onarımı
- Lineer DNA'nın kendi kendine sirkilasyonu

2.1.13. Thermo Scientific™ GeneJET Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Scientific™ K0491)

GeneJET™ Plazmid Maksiprep Kiti, rekombinant *E.coli* kültürlerinden yüksek kaliteli plazmid DNA'nın büyük ölçekli izolasyonu için tasarlanmıştır. Kit'de silika bazlı membran teknolojisini kullanılmaktadır.

2.1.14. IPTG (izopropil β -D-l-tiogalaktopiranosid; Catalog Number AM9462, AM9464)

IPTG proteinlerin aşırı ekspresyonunda kullanıldı. Bu uygulama için önerilen yoğunluk 0,1-0,4 mM olarak hazırlandı. Ancak kullanılan miktar bakteri vektörü ve suşuna göre değişir.

IPTG tipik olarak suda 0.1-0.84 M (23,8-200 mg/mL) stok çözeltiler olarak hazırlandı ve 0,2 μ m tek kullanımlık filtreden geçirilmesiyle sterilize edildi. Alikotlandı ve -20°C 'de kullanım için saklandı.

2.1.15. MagneHis™ Protein Purification System(Promega; V8500)

Protein saflaştırılması veya purifikasyonu için kullanıldı. MagneHis™ Protein Saflaştırma Sistemi, polihistidin veya HQ etiketli, eksprese edilmiş proteinlerin saflaştırılması için basit, hızlı, güvenilir bir yöntem sağlamaktadır.

2.1.16. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE)

SDS poliakrilamid jel elektrophorezi, proteinlerin moleküler ağırlıklarına bağlı olarak bir poliakrilamid jel içinde ayrılmasına neden olmaktadır. Proteinler amfoterik molekküllerdir. Proteinleri tek yönlü hareket ettirebilmek için, üzerlerine düzgün bir şekilde negatif yük yaratılır. SDS proteinleri denatüre etmekte ve onlara negatif yük sağlamaktadır.

2.1.16.1 Acrylamide/Bis (30% T, 2.67% C) Catalog #161-0125, 37,5:1 acrylamide/bis powder

Acrylamide (29,2 g/100 ml)	87,60 g
N'N'-bis-methylene-acrylamide	2,40 g

Deyonize saf su (diH₂O) ile 300 ml tamamlandı. Filter'den geçirildi ve +4°C buzdolabında karanlık ortamda saklandı (30 gün kullanma süresi).

2.1.16.2. 1.5 M Tris-HCl, pH 8,8 (150 ml) (catalog #161-0798, 1 L)

Tris base (18,15 g/100 ml)	27,23 g
Deyoniz saf su (diH ₂ O)	80 ml

6 N HCl HCl kullanarak pH 8,8'e ayarlandı ve deyonize saf su ile 150ml 'ye tamamlandı ve +4°C buzdolabında saklandı.

2.1.16.3. 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (catalog #161-0799, 1 L)

Tris base	6,00 g
diH ₂ O	60 ml

6 N HCl kullanarak pH 6,87'e ayarlanıp ve deyonize saf su ile 100 ml 'ye tamamlandı ve +4°C buzdolabında saklandı.

2.1.16.4. % 10 (w/v) SDS (100 ml) (catalog #161-0416)

SDS 10,00 g

diH₂O 90 ml

Hafifçe karıştırarak eritildi ve deyonize saf su ile (diH₂O) 100 ml tamamlandı.

2.1.16.5. 2× SDS-PAGE (Laemmli, 30 ml) (catalog #161-0737)

62,5 mM Tris-HCl, pH 6.8, % 2 SDS, % 25 glycerol, % 0.01 bromophenol blue, % 5 β-mercaptoethanol (taze halde eklensin)

0.5 M Tris-HCl, pH 6,8 3,75 ml

% 50 Glycerol 15,0 ml

% 1.0 Bromophenol blue 0,3 ml

%10 SDS 6,0 ml

diH₂O 30 ml tamamlandı

β-mercaptoethanol (950 µl sample buffer için 50 µl) kullanmadan önce taze olarak eklendi.

2.1.16.6. % 10 (w/v) APS (günlük taze hazırlanır) (catalog #161-0416)

Ammonium persulfate 0,10 g

diH₂O 1 ml

2.1.16.7. 10× SDS-PAGE (1 L) (cata log #161-0732)

(250 mM Tris, 1,92 M glycine, % 1SDS, pH 8,3)

Tris base	30,30 g
Glycine	144,10 g
SDS	10,00 g
diH ₂ O	1 L' tamamlandı

❖ pH'ı (~pH 8,3) ayarlamaya gerek yoktur.

2.1.16.8. Coomassie Gel Stain (1 L)

Coomassie Blue R-250	1,0gr
Methanol	450 ml
H ₂ O	450 ml
Glacial acetic acid	100 ml

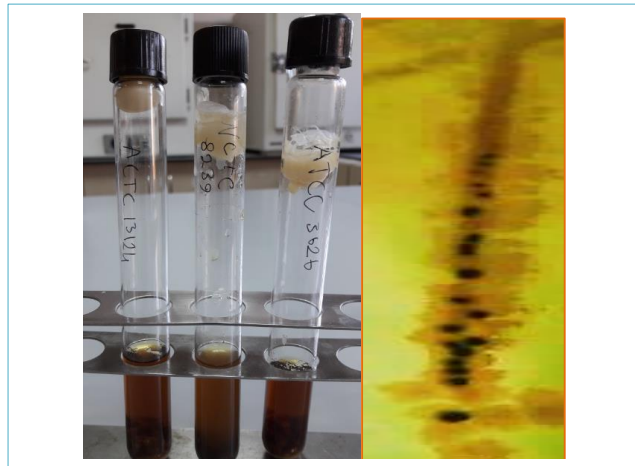
2.1.16.9. Coomassie Gel Destain (1 L)

Methanol	100ml
Glacial acetic acid	100ml
H ₂ O	800ml

2.2. Yöntem

2.2.1. Kullanılan Suşun Seçimi ve Üretilmesi

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu'nda yer alan daha önce Anabilim Dalında Refrans Suş olarak kullanılan; *Clostridium perfringens* ATCC13124 (*cpa* gene için), NCTC 8239 (*cpa*, *cpe* genler için), ATCC 3626 (*etx*, *cpb* gen için) suşları kullanıldı. Cooked Meat Medium (Oxoid, CM 81) içerisinde muhafaza edilen suşlar tekrar Cooked Meat Medium kullanılarak (Oxoid, CM 81) 37 °C'de, 24 saat anaerob ortamda zenginleştirildi. Üreyen bakteri Medium'dan çizme plak yöntemiyle Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC: (OXOID CM 587)) agara ekim yapıldı ve anaerob koşullarda (AnaeroGen[™]Gaz Kitleri, OXOIDAN0025A ve Jar kullanarak) 46°C'de 24 saat inkübe edildi. TSC agarda üreyen siyah renkli etrafında zon oluşturan *C. perfringens* kolonilerden tekrar TSC agara ekim yapıldı ve anaerob koşullarda 46°C'de 24 saat inkübe edildi. Ancak siyah koloniler *C. perfringens* identifikasyonu için katalaz (% 3'lük H₂O₂), laktoz fermentasyonu, Gram boyama, jelatinaz üretimi, nitrat indirgeme ve hareketlilik testi yani klasik kültür metoduyla izolasyon ve identifikasyon Scholch ve ark. (1996)'ın çalışmalarında kullandıkları yöntem ile yapıldı.



Şekil.2.3. Cooked Meat Medium besiyerinde anaerobik ortam olarak stoklanan *C.perfringens* suşları. B).*C. perfringens* şüpheli kolonilerin TSC agarda görünümü.

2.2.2. Gram Boyama

TSC agarda izole edilen koloniler steril öze ile lam üzerine alındı. Steril distile su ile süspanse edildi ve lam üzerine yayıldıktan sonra kuruması için bekletildi. Alev üzerinden birkaç kez geçirilerek koloniler tespit edildi. Lamın üzerine kristal viyole eklendi ve boyanması için bekletildi. Boyanı kaldırmak ve temizlemek amacıyla lam distile su ile yıkandı, daha sonra lam üzerine iyodin solüsyonu damlatarak boyandı ve bekletildikten sonra distile su ile yıkandı. Lam % 96'lık etil alkol ile muamele edildi ve takiben distile su ile yıkandı. Ardından lam safranin ile muamele edilerek tekrar distile su ile yıkandı. Lam kurutuldu ve mikroskopta koyu mor menekşe renkli bakteriler Gram pozitif olarak değerlendirildi.

2.2.3. Katalaz Testi

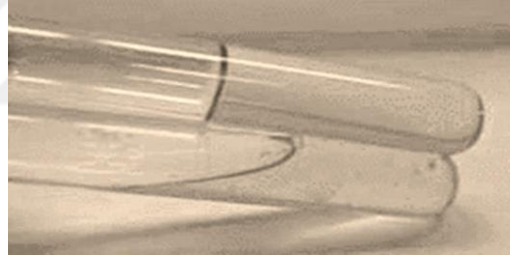
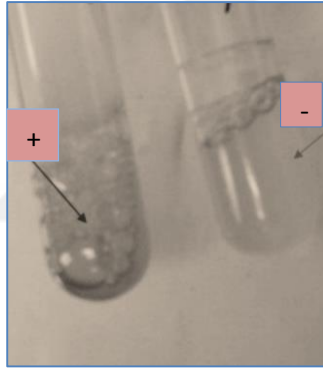
Koloniler özeyle temiz bir lam üzerine alındı ve bir damla distile su ile süspanse edildi. Daha sonra üzerine % 3'lük H₂O₂ damlatılıp karıştırıldı, *C. perfringens* katalaz negatif olduğu için lamda kabarcık oluşturmayan koloniler tespit edildi.



Şekil.2.4. Katalaz Test. A) Katalaz Pozitif; B) Katalaz Negatif Bakteri.

2.2.4. Laktoz Jelatin Testi

Koloniler laktoz jelatin besiyeri içeren tüplere iğne uçlu öze ile dik olarak inokule edildi ve daha sonra 37 °C’de 24 saat aerobik ortamda inkübe edildi. Laktoz fermentasyonu neticesinde besiyerinin rengi pembeden, sarıya değişti ve gaz kabarcıkları oluşturması tespit edildi (Şekil 2.5). Tüpler +4°C’de 1 saat soğutuldu ve jelatinin kıvamı kontrol edildi, sıvı halde ise pozitif olarak değerlendirildi. Buzdolabında inkübe edilmeden önce katı halde bulunan jelatinin kıvamı kontrol edildi. Jelatinaz pozitif koloniler jelatini parçalamakta ve sıvı hale geçmesi tespit edildi (Şekil 2.6.).



Şekil 2.5. Laktoz Jelatin Testi; Şekil 2.6. *C. perfringens* şüpheli kolonilerde jelatinaz aktivitesi testi.

2.2.5. Nitrat Motilite Testi

TSC agardan koloniler iğne uçlu öze ile Nitrat Motilite Medium bulunan tüplere dik olarak inokule edildi 37°C’de 24 saat aerobik ortamda inkübe edildi. İnokule edilen hat boyunca üreme hareket negatif olarak değerlendirildi.

Besiyerine 200 ul Griess Ilosvay A ve 200 ul Griess Ilosvay B reaktifleri damlatıldı. Besiyeri ile reaktiflerin temas ettiği alanda kırmızı renk oluşumu nitratın nitrite indirgenliğinin göstergesi olarak nitrat redüksiyon pozitif değerlendirildi.



Şekil 2.7. *C. perfringens* kolonileri için yapılan motilite ve nitrat redüksiyonu testi.

Biyokimyasal testlerin sonucunda edilen suşlar tezain moleküler aşaması için Cooked Meat Medium besiyerinde anaerob koşullarda oda sıcaklığında muhafaza edildi.

2.2.6. Bakterilerin üretilmesi

Clostridium perfringens ATCC13124 (*cpa* gene için), NCTC 8239 (*cpa*, *cpe* genler için), ATCC 3626 (*etx*, *cpb* gen için) suşların üretmek amacıyla Cooked Meat

Medium(CMM) besiyerinde muhafaza edilen suşlardan kültür süpernatantı alındı ve yeni bir CMM'ye inoküle edilerek gece boyunca 37°C'de anaerob koşullar altında kültürlendi. Daha sonra kültür süpernatantı süspansiyonunun küçük bir hacmi bir Brain Heart Infusion (BHI) medium ortamına inoküle edildi ve gece boyunca 37°C'de kültürlendi. Enterotoksin elde etmek için BHI ortamında kültürlenen süpernatantın %1'i, modifiye edilmiş bir Duncan-Strong (DS) ortamına inoküle oldu ve üretimin tanımlanması ve yeni enterotoksinin saflaştırılması için 37°C'de dört gün boyunca kültürlendi.

2.2.7. DNA Ekstraksiyonu

Brain Heart Infusion da kültürlenen izolatlardan 1'er ml mikrosantrifüj tüplerine alındı ve 12 000 g' de 5 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Daha sonra DNA'nın purifikasyonu için süpernatant atıldı ve peletlerin üzerine 200 µL steril distile su ilave edildi. Bakteri hücrelerinin lize olması için su banyosunda 95 °C'de 20 dakika bekletildi. Tekrar süspansiyon 12 000 g de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen dna miktarı nanodrop kullanarak saf bakteri DNA (260/280 oranı: 1,8-2) elde edildi. DNA ekstraktları PCR aşamasına kadar -20 °C'de muhafaza edildi

2.2.8. Hedef Genom Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

Alfa toksin (Cpa, ATCC13124) ve *beta2 toksin (Cpb2, ATCC 3626)* ve *enterotoksin(Cpe, NCTC 8239)*'lerin C-terminal bölgeleri seçildi ve phusion TaqPolimeraz (ThermoScientific) ile PCR analizi gerçekleştirildi. Bu çalışma için tasarlanmış primerler bir yazılım (CLC, Main WorkBench, Danimarka) ile tasarlandı. Primerlerin tasarımında Dünya Gen Bankası (GenBank) arşivine daha önce girilen genom dizilerinden yararlandı ve sunulan bu primerler ile C-terminal bölgesinin çoğaltılması hedeflendi. Bu amaçla uygulanacak PCR için standart reaksiyon karışımı

hazırlandı ve reaksiyon basamaklarına ait ısı değerleri gradient termal çevirici ile optimize edildi. Elde edilen bakteri DNA'dan, istenen bölgeler spesifik primerler ile doğrulandı.

Çizelge 2.4. Çalışmada kulalanan primerler.

PRİMER	Primer sekansları	bp (size gene)
Alpha-full-F: <u>GAATTC</u> ATGAAAAGAAAGATTTGT Alpha-full-R: <u>CTCGAG</u> TTTTATATTATAAGTTGAATT		1194
CT-Alpha-F: <u>GAATTC</u> AAAAGAACTAGTAGCTTACAT CT-Alpha-R: <u>CTCGAG</u> ATTTTATATTATAAGTTGA		347
Cpe-Full-F: <u>GAATTC</u> ATGCTTAGTAACAATTTAAATCC Cpe-Full-R: <u>CTCGAG</u> AAATTTTTTGAAATAATATTGAATAAGG		958
CT- Cpe-F: <u>GAATTC</u> AGATGTGTTTTAACAGTTCCATCTAC CT- Cpe-R: <u>CTCGAG</u> TAAAATTTTTTGAAATAATATTGAATAAGGG		407
Cpb2-Full-F: <u>GAATTC</u> ACAAATGAAAAAATTAATAGTAAAAG Cpb2-Full-R: <u>CTCGAG</u> ATAACAATAACCCTCACCAAATAC		798
CT-Cpb2-FWD: <u>GAATTC</u> CACCAAGTTTCAGAACTCA CT-Cpb2-REV: <u>CTCGAG</u> CAATAACCCTCACCAAATAC		355

Çizelge 2.5. Alpha-full için PCR miks bileşenleri ve programı.

Bileşenler	Konsantrasyon	Isı Döngüsü
5 X phusion HF buffer	4 µl	98 °C'de 30 s 98 °C'de 10 s 51 °C'de 15 s 72 °C'de 40 s 72 °C'de 10 dk } 30 siklus
10 mM dNTP mix	1 µl	
Primer F (10 pmol/µl)	0,5 µl	
Primer R (10 pmol/µl)	0,5 µl	
Phusion DNA polymerase (2u/µl)	0,5 µl	
Nükleaz Free Su	10,5 µl	
DNA	3 µl	
Toplam	20 µl	

Çizelge 2.6. *CT-Alpha* için PCR miks bileşenleri ve programı.

Bileşenler	Konsantrasyon	Isı Döngüsü
5 X phusion HF buffer	4 µl	98 °C'de 30 s 98 °C'de 10 s 50 °C'de 15 s 72 °C'de 30 s 72 °C'de 10 dk 30 siklus
10 mM dNTP mix	1 µl	
Primer F (10 pmol/µl)	0,5 µl	
Primer R (10 pmol/µl)	0,5 µl	
Phusion DNA polymerase (2u/µl)	0,5 µl	
Nükleaz Free Su	10,5 µl	
DNA	3 µl	
Toplam	20 µl	

Çizelge 2.7. *Cpe-Full* için PCR miks bileşenleri ve programı.

Bileşenler	Konsantrasyon	Isı Döngüsü
5 X phusion HF buffer	4 µl	98 °C'de 30 s 98 °C'de 10 s 55 °C'de 15 s 72 °C'de 35 s 72 °C'de 10 dk 30 siklus
10 mM dNTP mix	1 µl	
Primer F (10 pmol/µl)	0,5 µl	
Primer R (10 pmol/µl)	0,5 µl	
Phusion DNA polymerase (2u/µl)	0,5 µl	
Nükleaz Free Su	10,5 µl	
DNA	3 µl	
Toplam	20 µl	

Çizelge 2.8. *CT-Cpe* için PCR miks bileşenleri ve programı.

Bileşenler	Konsantrasyon	Isı Döngüsü
5 X phusion HF buffer	4 µl	98 °C'de 30 s 98 °C'de 10 s 58 °C'de 15 s 72 °C'de 30 s 72 °C'de 10 dk 30 siklus
10 mM dNTP mix	1 µl	
Primer F (10 pmol/µl)	0,5 µl	
Primer R (10 pmol/µl)	0,5 µl	
Phusion DNA polymerase (2u/µl)	0,5 µl	
Nükleaz Free Su	10,5 µl	
DNA	3 µl	
Toplam	20 µl	

Çizelge 2.9. *Cpb2-Full* için PCR miks bileşenleri ve programı.

Bileşenler	Konsantrasyon	Isı Döngüsü
5 X phusion HF buffer	4 µl	98 °C’de 30 s 98 °C’de 10 s 56 °C’de 15 s 72 °C’de 32 s 72 °C’de 10 dk 30 siklus
10 mM dNTP mix	1 µl	
Primer F (10 pmol/µl)	0,5 µl	
Primer R (10 pmol/µl)	0,5 µl	
Phusion DNA polymerase (2u/µl)	0,5 µl	
Nükleaz Free Su	10,5 µl	
DNA	3 µl	
Toplam	20 µl	

Çizelge 2.10. *CT- Cpb2* için PCR miks bileşenleri ve programı.

Bileşenler	Konsantrasyon	Isı Döngüsü
5 X phusion HF buffer	4 µl	98 °C’de 30 s 98 °C’de 10 s 57 °C’de 15 s 72 °C’de 30 s 72 °C’de 10 dk 30 siklus
10 mM dNTP mix	1 µl	
Primer F (10 pmol/µl)	0,5 µl	
Primer R (10 pmol/µl)	0,5 µl	
Phusion DNA polymerase (2u/µl)	0,5 µl	
Nükleaz Free Su	10,5 µl	
DNA	3 µl	
Toplam	20 µl	

Elde edilen PCR ürünleri ve pET-28a(+) vektörünün FastDigest EcoRI (ThermoScientific, # FD0275) ve FastDigest XhoI (ThermoScientific, #FD0694) ile kesilip (Çizelge 2.6), T4 DNA ligaz enzimi ile (ThermoScientific, #EL0014) ligasyonları yapıldı. Aşağıda PCR ürününün enzim ile kesim protokolü bildirilmektedir(Çizelge 2.7).

Çizelge 2.11. pET-28a(+) vektörünün ve PCR ürünleri için kullanılan kesim protokolü.

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı derecesi ve zaman
Fastdigest 10X buffer	2 µl	37°C de 20 dk
XhoI fastdigest	1 µl	
KpnI fastdigest	1 µl	
Nükleaz Free Su	14 µl	
DNA (PCR ürünü ya da vektör) (1µg)	2 µl	
Toplam	20 µl	

Çizelge 2.12. pET-28a(+) vektörünün ve PCR ürünleri için kullanılan T4 ligaz ile ligasyon protokolü.

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı derecesi ve zaman
10X T4 ligaz buffer	2µl	22°C de 15 dk
pET-28a(+) vektör (20-100 ng)	1µl	
PCR insert	3 µl	
Nükleaz Free Su	13 µl	
T4 ligaz enzimi	1µl	
Toplam	20 µl	

Kesim gerçekleştikten sonra kit (Invitrogen™ PureLink™ Quick Gel Extraction Kit; Catalog numbers K2100-12 and K2100-25) yardımıyla PCR insertler ve vektör jelde yürütüldü ve ekstraksiyon kullanılan kit önerileri başlığı altında protokol'a göre yapıldı. Elde edilen ürünler ligasyona tabi tutuldu. Daha sonra DH5-alfa competent bakteriye (DH5- alpha Competent cells, ThermoScientific, #18265017) ligasyon ürünlerinin transformasyonu yapıldı. Bu amaçla 2 µl ligasyon ürününden alındı, 50 µl hacminde hazırlanan DH5-alfa kompetent bakteriye eklendi ve 30 dakika buzda bekletildi. Ardından 42°C'de 90 saniye bekletilip, son basamakta 400 µl Super Optimal Broth' dan (SOC) bakteri üzerine eklendi ve 37°C de 1 saat 250 rpm'de karıştırıldı. Kanamycin içeren (50µg/ml) LB agar plate üzerine yayma plak yöntemi ile ekim yapıldı ve gece boyunca 37°C'de bekletildi. Pozitif koloniler elde etmek için koloni

PCR yapıldı. Koloni PCR protokolu (Çizelge 2.8) bildirilmektedir. Pozitif koloniler 37°C’de 16 saat Luria-Bertani (LB) Broth içerisinde (kanamycin) çoğaldı ve plazmid ekstraksiyon kiti (Thermo Scientific™ GeneJET Plasmid Maxiprep Kit; Thermo Scientific™ K0491) kullanarak plazmid ekstraksiyonu yapıldı. Daha sonra ikinci doğrulama için XhoI ve EcoRI kullanarak elde edilen plazmid üzerinde restriksiyon enzim kesimi gerçekleştirildi.

Çizelge 2.13. Elde edilen klonanan plazmitlerin (pET28-AH-CT-Cpb2, pET28-AH-CT-Cpe ve pET28-AH-CT-Cpa) doğrulanması için koloni PCR miks bileşenleri ve programı.

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı döngüleri
10 X Taq buffer	3 µl	94 °C’de 10 dk 94 °C’de 1 dk Her inserte göre annealing derecesi kullandı ve zaman olarak 30 s seçildi - 25siklus 72 °C’de 2 dk 72 °C’de 10 dk
MgCl2 (25 mM)	2,4 µl	
10 mM dNTP mix	0,7 µl	
Forward primer için	0,5 µl	
Revers primer için	0,5 µl	
Taq DNA polymerase (5u/µl)	0,3 µl	
Nükleaz Free Su	19,6µl	
Toplam	27 µl	

2.2.9. Rekombinant CPA Toksin (rCPA), CPE Toksin(rCPE), CPb2 Toksin(rCPb2) ekspresyonunun başlatılması

Yukarıdaki pET28-AH-CT-Cpb2, pET28-AH-CT-Cpe ve pET28-AH-CT-Cpa plazmitleri, *E. coli* BL21 (DE3) competent cell’e transfere edildi ve pET28a için Kanamisin antibiyotiği kullanıldı. Koloniler seçildikten sonra LB/kanamycin kültürüne inoküle edildi ve 250 rpm’de O/N olarak 37°C inkübatörde karıştırıldı. (kanamisin konsantrasyonu 50 µg/ml). Kültürlenmiş bakteri hücreleri, transgen ekspresyonunun induksiyonu için kullanıldı. O/N kültürden %1(V/V) oranında kanamisin içeren (50 µg/ml) LB broth medium içerisine inoküle edilerek 37°C’de bakterinin logaritmik faza ulaşana kadar inkübatöre ve 250 rpm’de karıştırıldı ve OD600 (determined by optical density 600 nm)= 0,6 ulaşınca kadar karıştırıldı. Bu

aşamanı takiben IPTG (izopropil β -D-l-tiogalaktopiranosid), 1 mM konsantrasyonda kültür üzerine ilave edildi ve 4-5 saat boyunca 37 ° C'de karıştırılmaya devam edildi. Örnekleri 1,000-3,000 x g'de 15 dakika süreyle 4 ° C'de santrifüj bırakıldı ve süpernatantı alınarak daha ileri analiz için -80 ° C'de pelletleri donduruldu.

2.2.10. His-Tagged rCPA, rCPE ve rCPB2 Purifikasyonu

pET28a(+) vektör sisteminde ifade edilen rCPA, rCPE ve rCPB2, His-tagged olduğundan hedef proteinin en yüksek purifiyesi için MagneHis™ Protein Purification System (Promega; V8500) kiti kullanarak protokola uygun protein purifikasyonu yapıldı. Elde edilen protein SDS-PAGE ile analiz edildi.

1. 1 ml bakteri kültürü bir mikrosantrifüjde 10.000 x g'de 2 dakika santrifüjlendi ve süpernatant tamamen çıkarıldı.
2. Hücre peleti 1X FastBreak™ Hücre Lizis Reaktifinde yeniden süspanse edildi.
3. Liyofilize DNase I, lize edilmiş bakteri kültürüne 1µl ilave edildi ve bir döner mikser veya çalkalama platformu üzerinde oda sıcaklığında 10-20 dakika çalkalanarak inkübe edildi.
4. 1X FastBreak™ Hücre Parçalama Reaktifinde yeniden süspanse edilen hücre peletine 30µl MagneHis™ Ni-Particle eklendi.
5. Tüp ters çevrilerek karıştırıldı (yaklaşık 10 kez) ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
6. Tüp, MagneHis™ Ni-Parçacıklarını yakalamak için yaklaşık 30 saniye boyunca manyetik standı yerleştirildi.
7. Bir pipet kullanılarak süpernatant dikkatlice çıkarıldı.

8. Tüp manyetik standdan çıkarıldı 10 ul MagneHis™ Bağlayıcı/Yıkama Tamponu MagneHis™ Ni-Partiküllerine eklendi ve karıştırmak için pipetlendi.
9. Tüp, MagneHis™ Ni-Parçacıklarını yakalamak için yaklaşık 30 saniye boyunca manyetik standda yerleştirildi. Bir pipet kullanılarak süpernatant dikkatlice çıkarıldı.
10. Yıkama aşaması, toplam 3 yıkama için 2 kez tekrarlandı.
11. Tüp manyetik standdan çıkarıldı ve 100 ul MagneHis™ Elüsyon Tamponu eklendi ve karıştırıldı.
12. Örnek 1-2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve MagneHis™ Ni-Partiküllerini yakalamak için manyetik bir standda yerleştirildi. Bir pipet kullanılarak saflaştırılmış proteini içeren süpernatant çıkarıldı ve numuneler hem SDS-PAGE hem de fonksiyonel tahlil ile analiz edildi.

2.2.11. SDS-PAGE

Protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile belirlendi. İlgili proteinlerin ifadesi ve saflığı, proteinin % 12,5 sodium dodecyl Sulphate polyacrylamide jelinde (SDS-PAGE) çözündürülmesi, ardından Coomassie G250 blue silvir boyama ile tespit edildi. Eksperese olan Hisstaggged proteinler Western Blottan sonra His-tagged monoklonal antikor ile tesbit edildi.

SDS-poliakrilamid jelleri, Laemmli'ye (1970) göre hazırlandı (Çizelge 2.5). Bu çalışmada 15 µg protein, 2x sample loading buffer ile karıştırıldı ve 95 °C'de 10 dk bekletildi. Daha sonra yükleme boyası sonuna ulaşana kadar bir Mini-Protean elektroforez cihazı (Bio-Rad) kullanılarak 1X running buffer'de 10-15 V /cm çalıştırıldı. Bu çalışmada elektroforez yürütülmesi 50 v'da 10 dk sonra 10-15 V / cm 100v'de 1saat programı kullanıldı.

Çizelge 2.14. SDS-poliakrilamid jellerinin hazırlanması.

Resolving Jel %12.5 -5ml		Stackig JEL (% 4)-4ml	
30%Acrylamide/bisacrylamide	2.08µl	30%Acrylamide/bisacrylamide	680 µl
H ₂ O	1.57µl	H ₂ O	2.72 µl
1.5M Tris(pH 8.8)	1.25µl	1M Tris(pH 6.8)	500 µl
10% SDS	50µl	10% SDS	40 µl
10% APS	50µl	10% APS	40 µl
TEMED	5µl	TEMED	4 µl

2.2.12. Western Blot

Trans-Blot Turbo sistemi, proteini jelden membrana 3 dakika gibi kısa bir sürede aktarabilen hızlı bir protein transfer aparatıdır. SDS-PAGE ‘den elde edilen jeldeki proteini PVDF membrana transfer etmek için jel 10-15 dakika Towbin buffer’de bekletildi. Membran metanole daldırıldı ve ardından hemen 5 dakika Towbin Buffer’de bekletildi ve metanoldan temizlendi. Daha sonra sırasıyla filter paper, membran, jel ve filter paper kullanarak protein transferi için cihaz 2,5A’de ve 25V’da 10 dakikaya ayarlandı. Daha sonra membran 1X TBS içinde çözülen % 5 skim not fat milk (yağsız süt) ile 1 saat inkübe edildi ve ardından 1X TBST (1X TBS’de % 0.5 Twin) içinde her biri 5 dakika olmak üzere 3 kez çalkalayarak yıkandı. Daha sonra membran 1 saat oda sıcaklığında 1:1000 seyreltilmiş Primer antikor Anti-6X His tag® antibody [HIS.H8] ab1818 ile inkübe edildi. Tekrar Membranı yıkama tamponu içinde(1X TBST) her biri 5 dakika olmak üzere 3 kez çalkalayarak yıkandı ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca 1X TBST’de 1:5000 seyreltilmiş ikincil antikor Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) (ab6789) ile muamile edildi. Daha sonra membran 1X TBST kullanarak her biri 5 dakika olmak üzere 3 kez çalkalayarak yıkandı. Son olarak membran üzerine ECL substrat eklendi ve görüntülendi.

2.2.13. Hücre kültürü ve rekombinant proteinlerin sitotoksisite belirlenmesi

İnsan kolon karsinoma hücreleri (CaCo-2) Hücreler DMEM medium içinde kültürlendi %10 FBS ile desteklendi. Tüm inkübasyon adımları 37°C'de %5 karbon dioksit varlığında gerçekleştirildi.



3. BULGULAR

Bu çalışma kapsamında, *Clostridium perfringens* ATCC13124 (*cpa* gene için), NCTC 8239 (*cpa*, *cpe* genler için), ATCC 3626 (*etx*, *cpb* gen için) suşları Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu'nda yer alan daha önce Anabilim Dalında Refrans Suş olarak kullanılmıştır. Bu pozitif suşlar öncelikle kültür yöntemi kullanarak doğruluk açısından biokimyasal testlere tabi tutuldu ve çalışmanın amacı yönünde doğrulandı ve elde edilen sonuçlar veya bulgular özet olarak Çizelge 3.1'de bildirilmektedir.

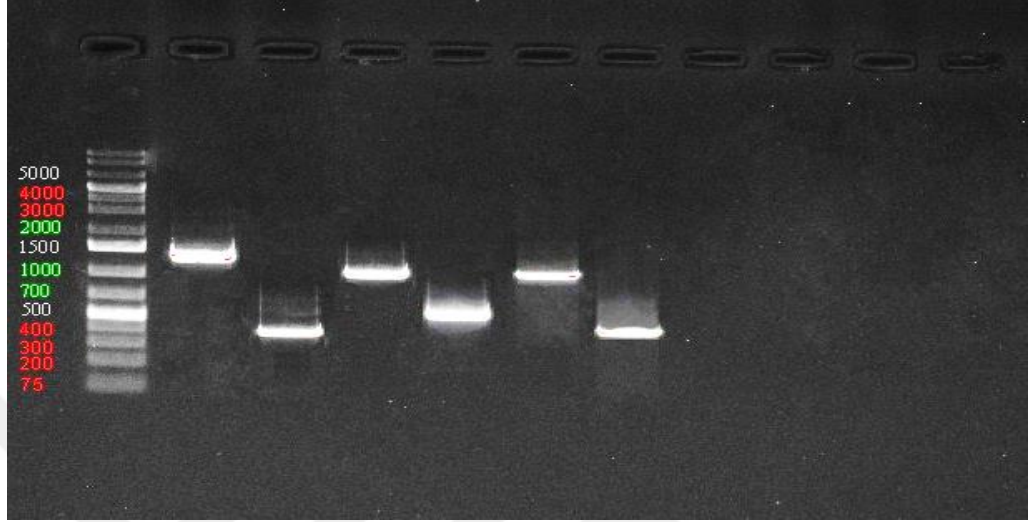
Çizelge 3.1. *C.perfringens*'in identifikasyonu için kullanılan biyokimyasal testler.

Katalaz T.	Oksidase T.	Indol T.	Gram Boyama	Asit Fosfataz	Hareket	Nitrat İndirgeme	Jelatinaz	Laktoz Fermantasyon
-	-	-	+	+	-	+	+	+

3.1. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyon için bakteriler uygun besiyerilerde anaerob koşullarda çoğatıldı ve boiling metod ve DNA ekstraksiyon kiti kullanarak yaklaşık 1µg olacak şekilde saf bakteriyal DNA (260/280 oranı: 1,8-2) elde edildi. Elde edilen bakterial DNA, *Clostridium perfringens* Alfa, Beta, enterotoksin ve bu toksinlerin C-terminal bölgesine yönelik spesifik primerler ile de doğrulandı. *Clostridium perfringens* alfa,

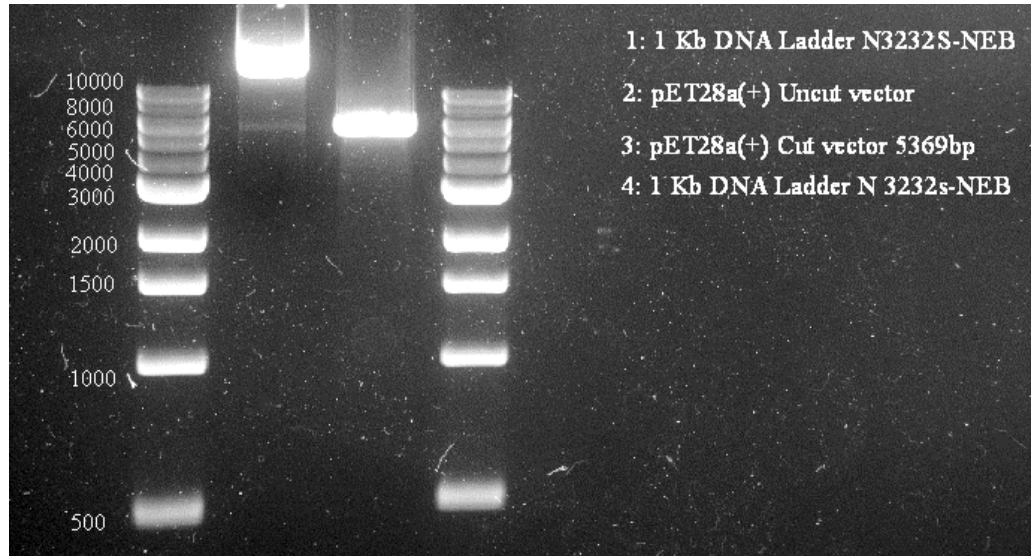
beta ve entrotoksin bölgeleri Phusion enzimi ile belirlenen koşullarla çoğaldı. Uygun bağlanma derece ise her toksin için farklı tespit edildi (Şekil 3.1).



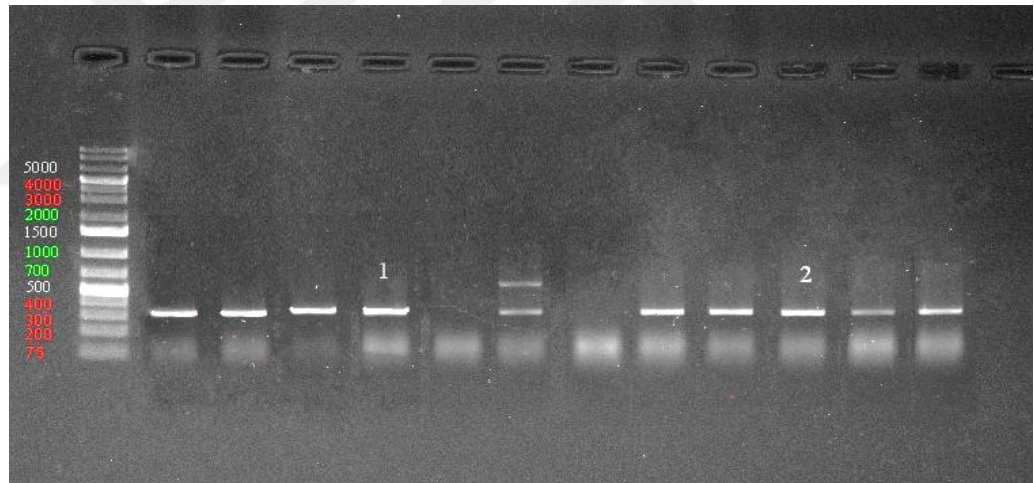
Şekil 3.1. 1: DNA Lader 1kbp, 2: Alpha toksin-full (1194bp), 3: C-terminal-Alpha toksin (347bp), 4: CPE-Full (958bp), 5: C-terminal-CPE (407bp), 6: Cpb2 full (798), 7: C-terminal cpb2 (355bp).

3.2. pET-AH-CT-CPB2, pET-AH-CT-CPE ve pET-AH-CT-CPA Plasmidlerin Hazırlanması

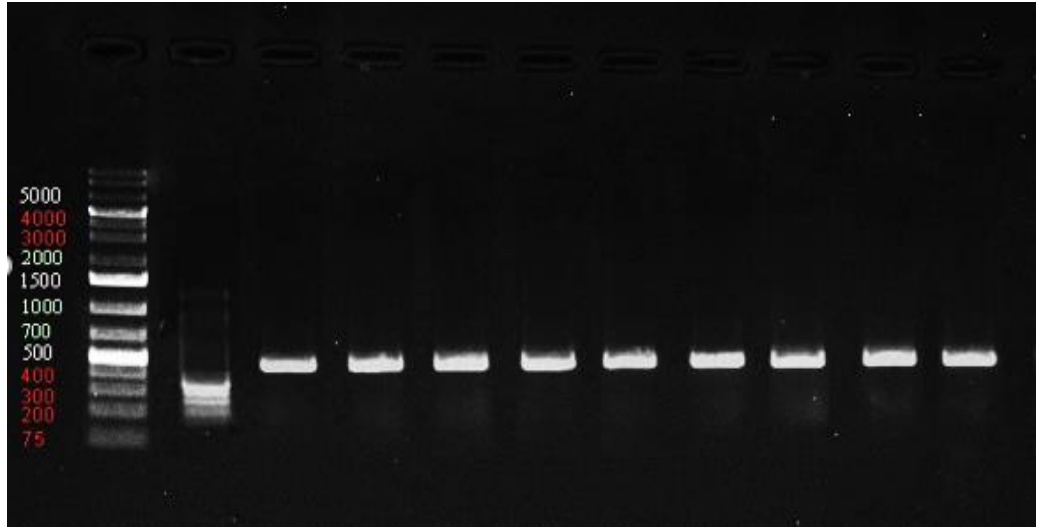
Sekansları teyit edilmiş PCR *cpa*, *cpe* ve *cpb2* gen DNA'sı, klasik yöntem ile pET28a bakteri ekspresyon vektörünün His-tagged akışına uygun, restriction sitesine klonlandı. Bu işlem için vektör ve PCR kullanarak elde edilen toksin bölgeleri kesim enzimleri ile kesildi. Elde edilen pET-CT-CPB2, pET-CT-CPE ve pET-CT-CPA plazmid koloni PCR ile transforme bakterilerden seçildi. plazmid ekstraksiyonu yapıldı ve pozitif koloniler XhoI ve EcoRI ile kesildi ve doğrulandı. Ayrıca C-terminal bölgelerinin ve klonlanmsı doğrultusunda koloni PCR kullanarak tespit edildi (Şekil 3.2; Şekil 3.3; Şekil.3.4; Şekil 3.5; Şekil 3.6; Şekil 3.7; Şekil 3.8; Şekil 3.9; Şekil 3.10; Şekil 3.11).



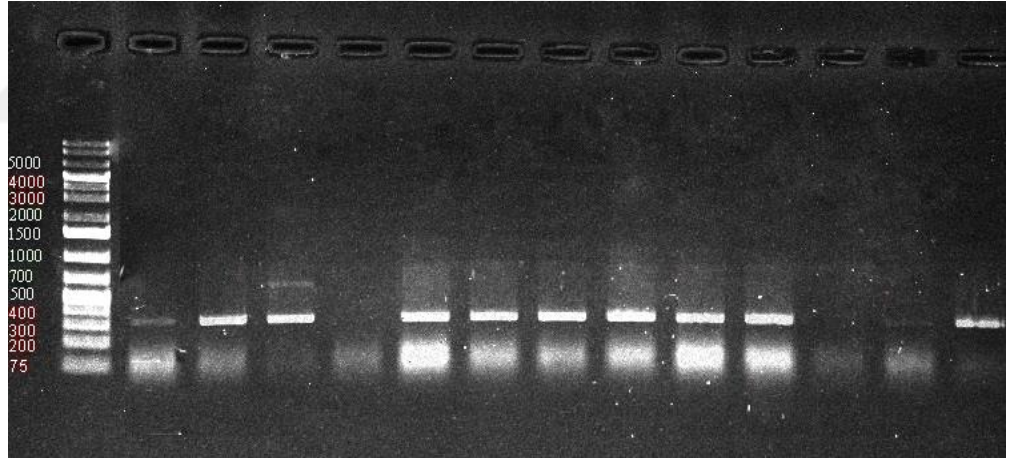
Şekil 3.2. pET28(a) vektör kesimi.



Şekil 3.3. pET-CT-Alfa konstraktın doğrulanması. Koloni PCR ile yapılan doğrulamada 347 bp spesifik CT-Alfa içeren bant. Toplam 12 koloniden (C1-12), 9 koloni pozitif olarak tespit edildi. Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Ready-to-Use - 75-20,000 bp- DNA ladder olarak kullanıldı.

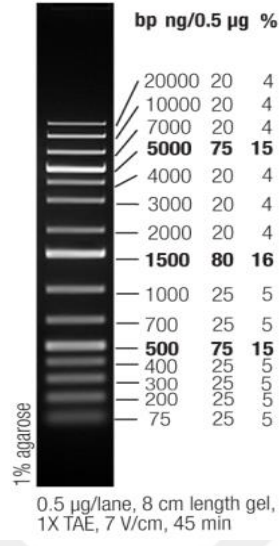


Şekil 3.4. pET28-CT-CPE konstraktın doğrulanması. Koloni PCR ile yapılan doğrulamada 407 bp spesifik CT-CPE içeren bant. Toplam 10 koloniden (C1-10), 9 koloni pozitif olarak tespit edildi. Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Ready-to-Use - 75-20,000 bp- DNA ladder olarak kullanıldı.



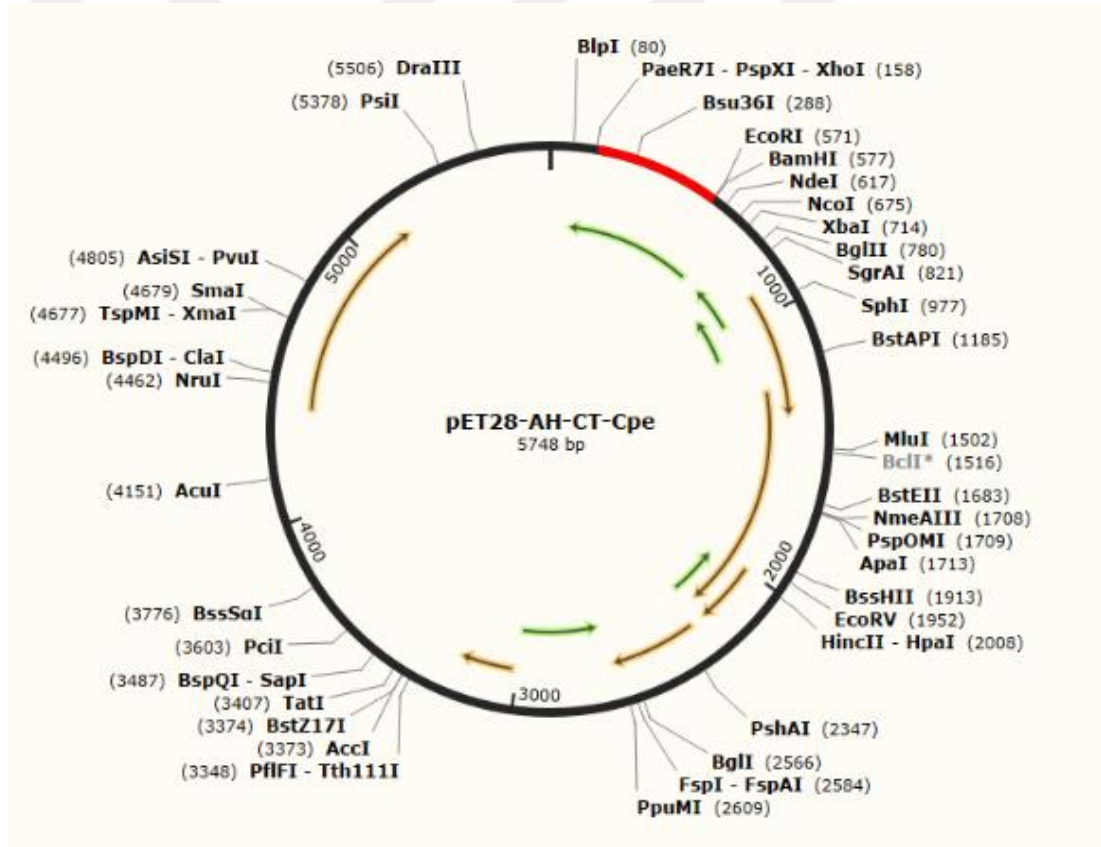
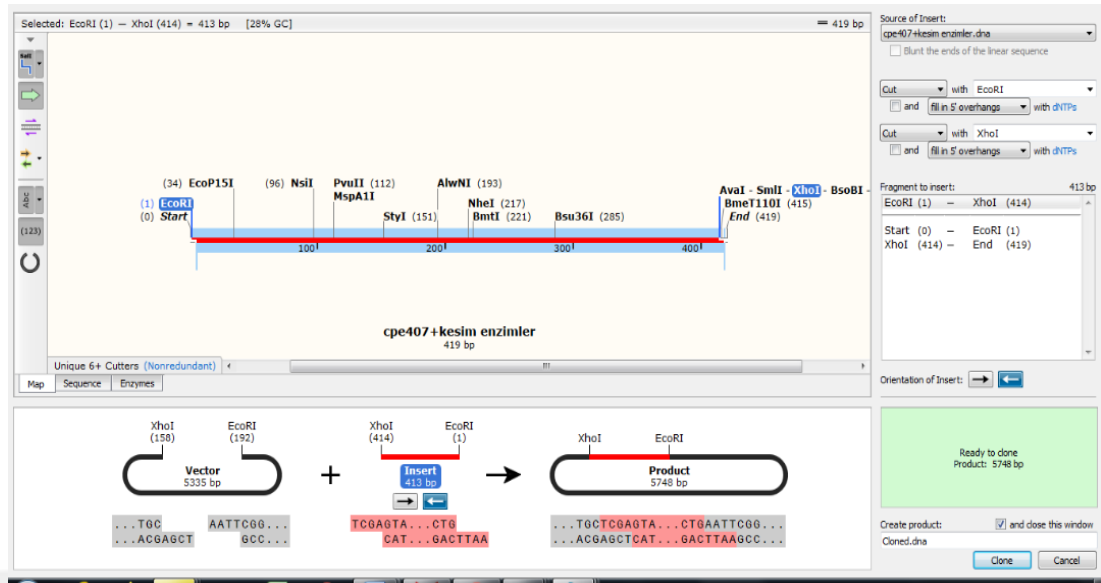
Şekil 3.5. pET-CT-CPb2 konstraktın doğrulanması. Koloni PCR ile yapılan doğrulamada 355 bp spesifik CT-CPb2 içeren bant. Toplam 13 koloniden (C1-13), 10 koloni pozitif olarak tespit edildi. Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Ready-to-Use - 75-20,000 bp- DNA ladder olarak kullanıldı.

O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use

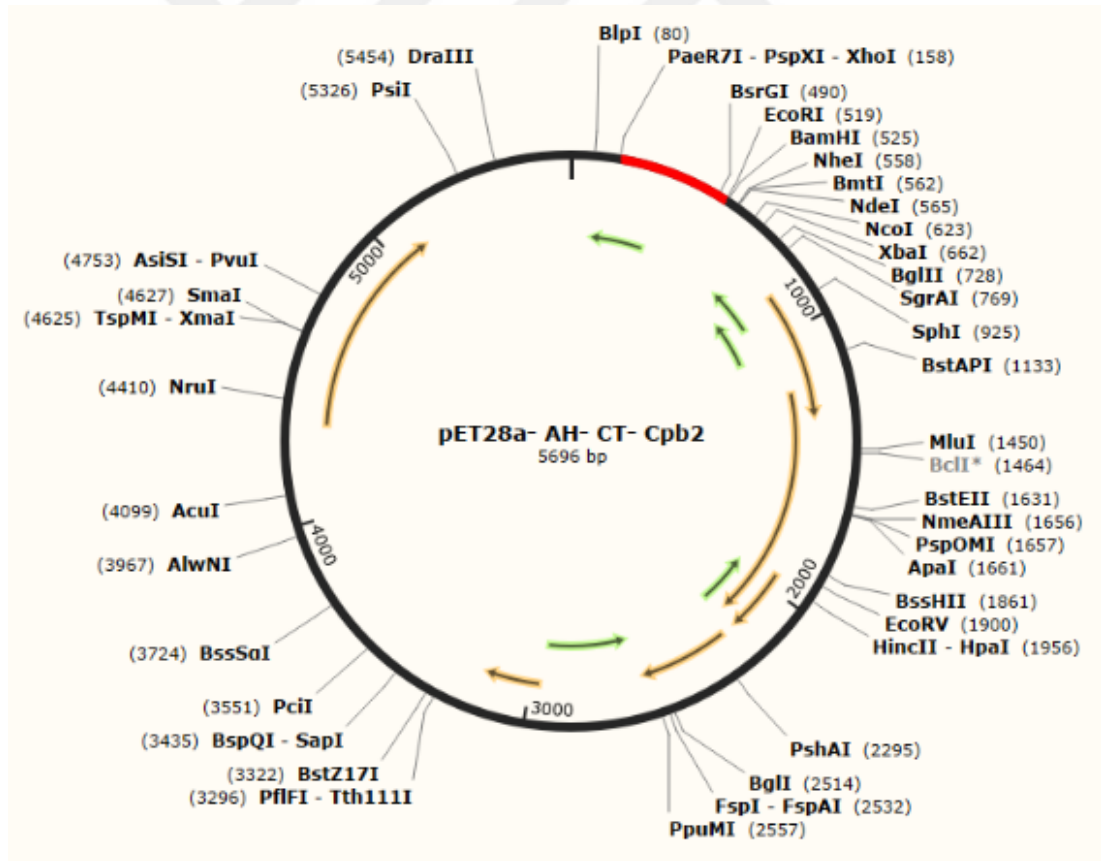
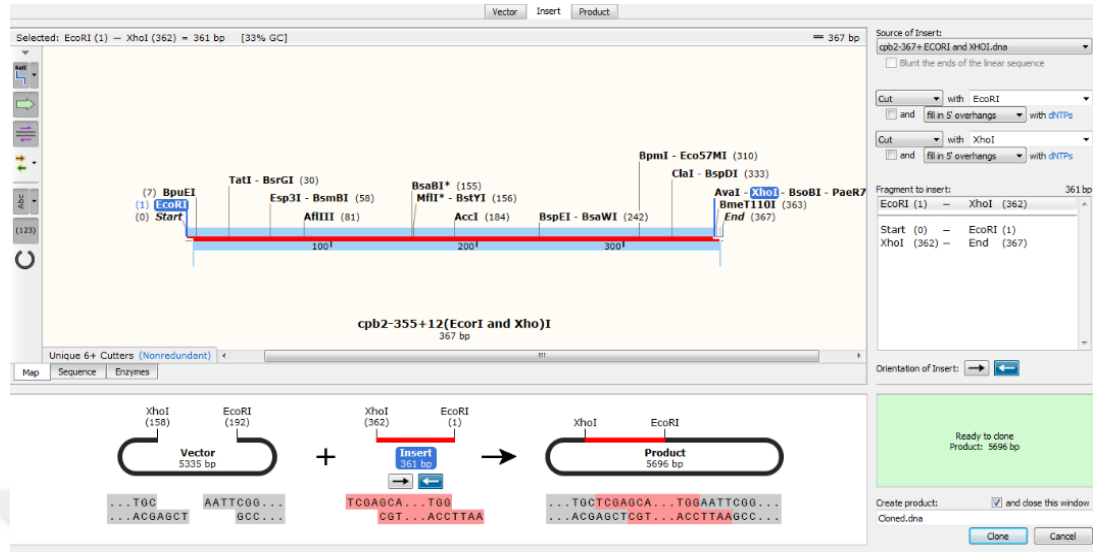


Şekil 3.6. Tez çalışmasında kullanılan DNA Ladder.

Thermo Scientific O'GeneRuler 1 kb Plus
DNA Ladder, ready-to-use Pub. No.
MAN0013051 Rev.



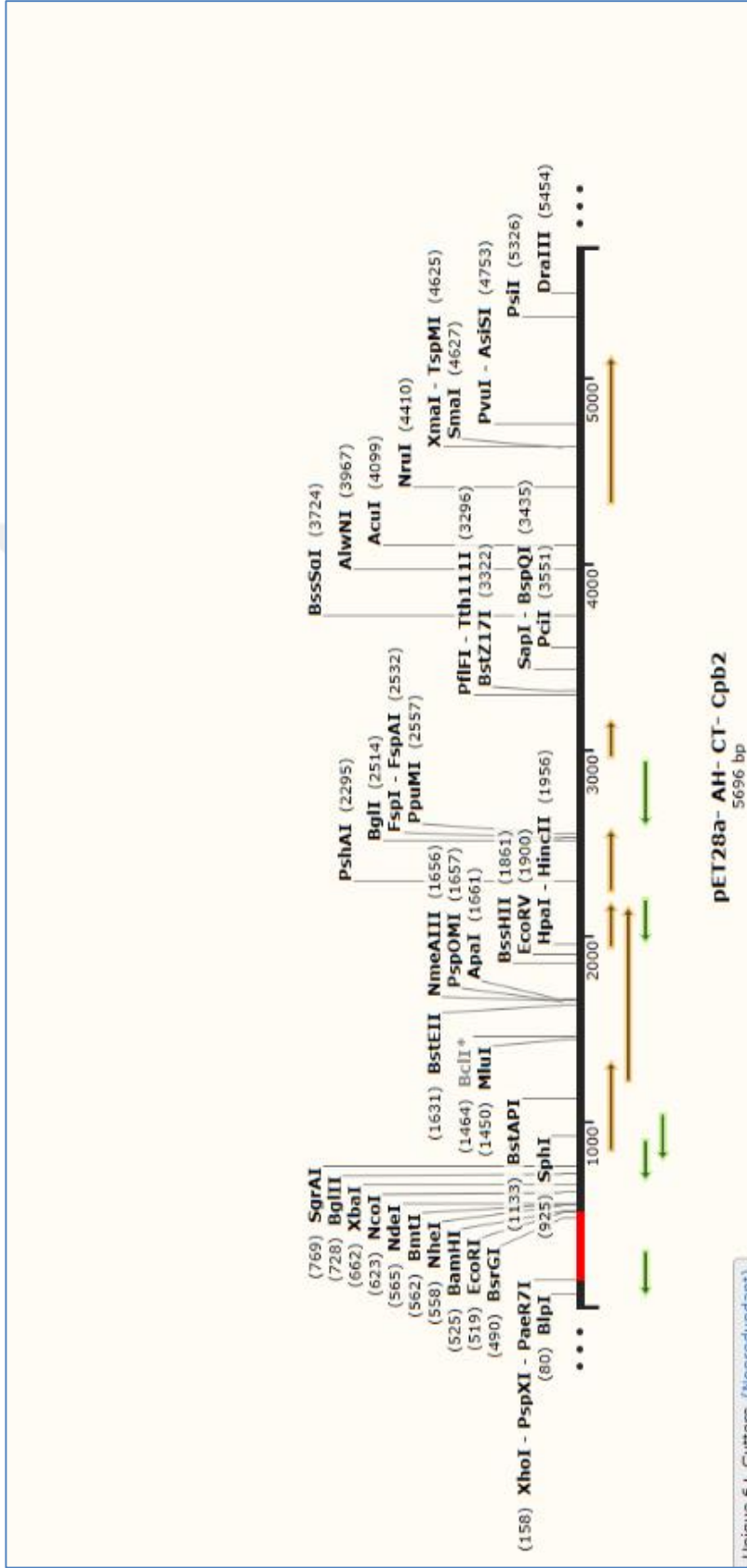
Şekil 3.8. pET-AH-CT-Cpe Vektörün Genom Haritası.



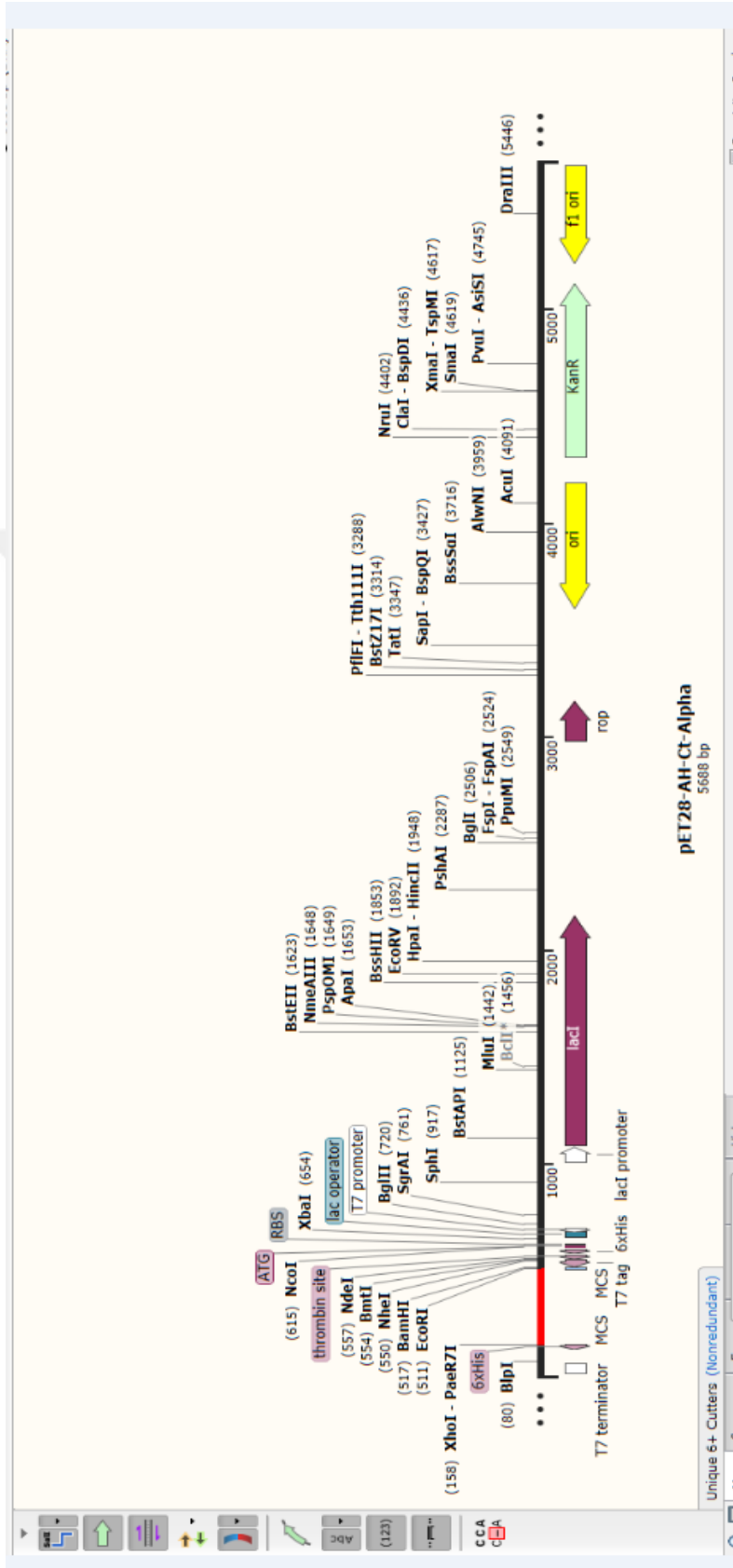
Şekil 3.9. pET-AH-CT-Cpb2Vektörün Genom Haritası.



Şekil 3.10. pET-AH-CT-Cpe Vektörün Genom ve klonlanan bölgenin Haritası.



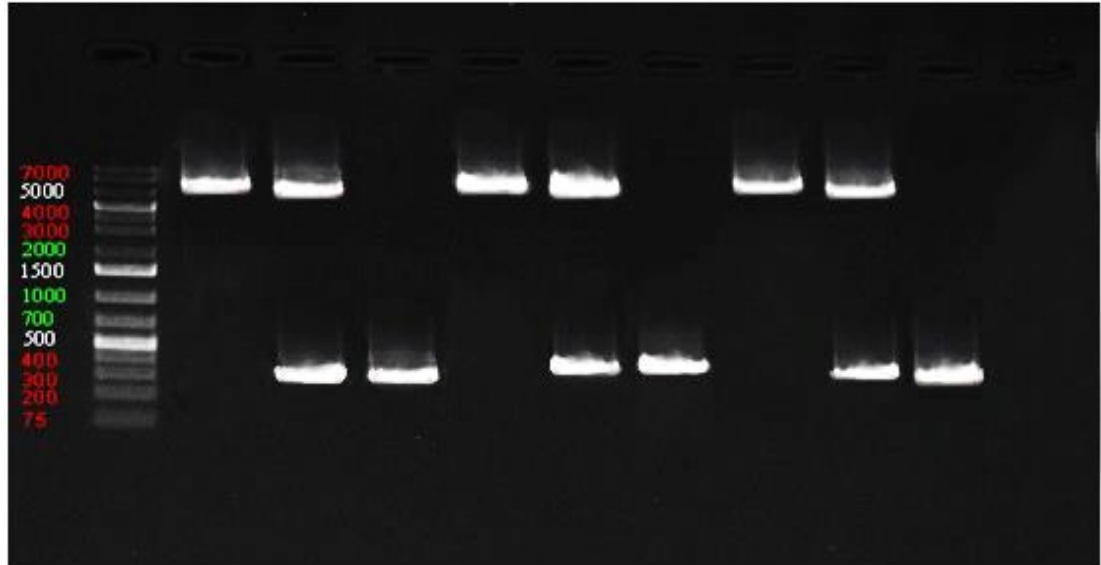
Şekil 3.11. pET-AH-CT-Cpb2 Vektörün Genom ve klonlanan bölgenin Haritası.



Şekil 3.12. pET-AH-CT-Cpa Vektörün Genom ve klonlanan bölgenin Haritası.

3.3. pET-AH-CT-CPB2, pET-AH-CT-CPE ve pET-AH-CT-CPA Plasmidlerin doğrulanması.

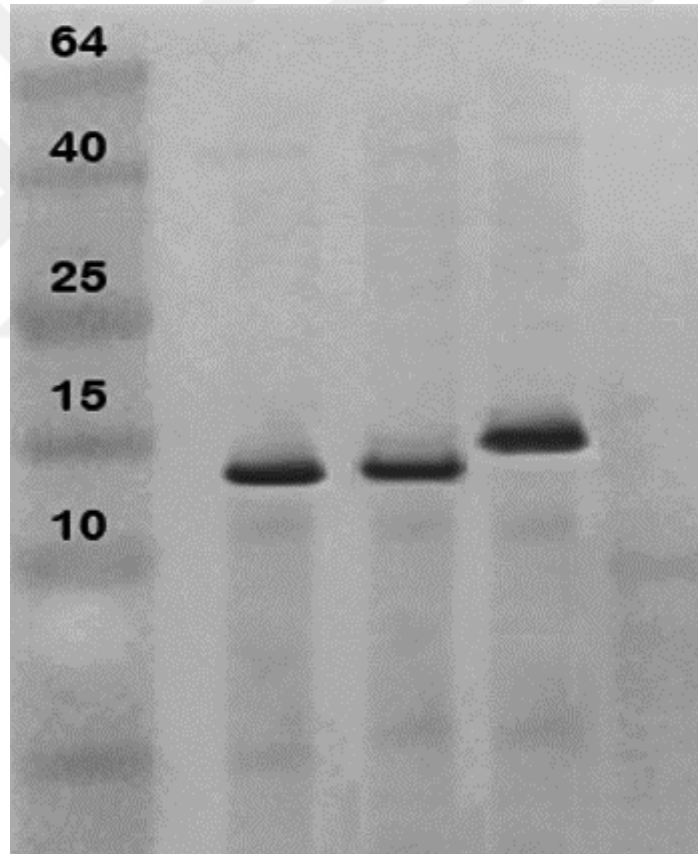
Bu plazmidler, doğrulanması için ekstraksiyondan sonra XhoI ve EcorI kesimi ile gerçekleşti. Ayrıca plasmidlerden insert elde etmek için ve doğrulanması için standart primerleri kullanarak PCR yapıldı (Şekil 3.13). Son basamak olarak bu konstraktlar dizini yeni nesil sekanslama ile kontrol edildi. Yeni nesil sekansın sonuçları IGV programı ile analiz edildi ve mutasyon bulunmadı.



Şekil 3.13. pET-AH-CT-CPA, pET-AH-CT-CPE ve pET-AH-CT-CPB2 ve Plasmidlerin doğrulanması. 1), pET-AH-CT-Cpa plasmidin doğrulanması(5688bp). 2), pET-AH-CT-Cpa plasmidin XhoI ve EcorI kesim enzimleri ile doğrulanması. Kesilen plasmid(5335bp) insert: (353bp). 3). Standart primer PCR kullanarak pET-AH-CT-Cpa için insert dogrulama: (347bp). 4), pET-AH-CT-Cpe plasmidin doğrulanması(5748bp). 5), pET-AH-CT-Cpe plasmidin XhoI ve EcorI kesim enzimleri ile doğrulanması. Kesilen plasmid(5335bp) insert: (413bp). 6), Standart primer PCR kullanarak pET-AH-CT-Cpa için insert dogrulama: (407bp). 7), pET-AH-CT-Cpb2 plasmidin doğrulanması(5696bp). 8), pET-AH-CT-Cpb2 plasmidin XhoI ve EcorI kesim enzimleri ile doğrulanması. Kesilen plasmid(5335bp) insert: (361bp). 3), Standart primer PCR kullanarak pET-AH-CT-Cpa için insert dogrulama: (355bp).

3.4. pET-AH-CT-CPA, pET-AH-CT-CPE ve pET-AH-CT-CPB2 ve Plasmidlerin western blotd'a doğrulanması

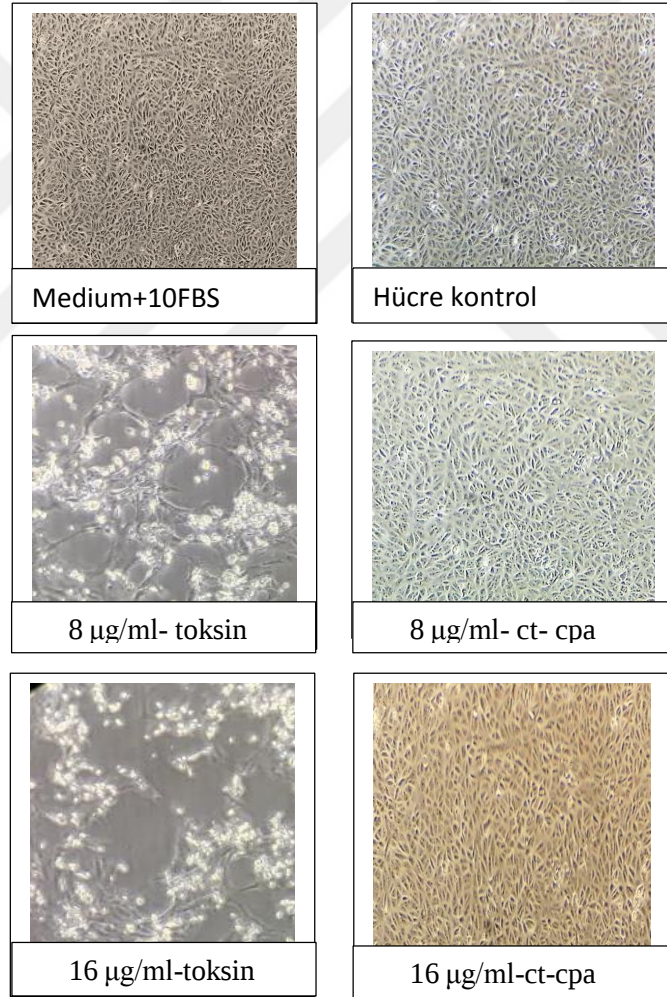
Plasmidler protein ekspresyonuna tutuldu ve elde edilen proteinler saflaştırıldı ve daha sonra 15ug olarak SDS-PAGE jele yüklendi. Daha sonra western blot için jeldeki proteinler PVDF membran'a transfer edildi. Membran skim milk non fat ile bloklandı ve Anti-6X His tag® antibody [HIS.H8] ab1818 ve sekonder antikor kullanarak inkübe edildi ve istenilen bantlar elde edildi.



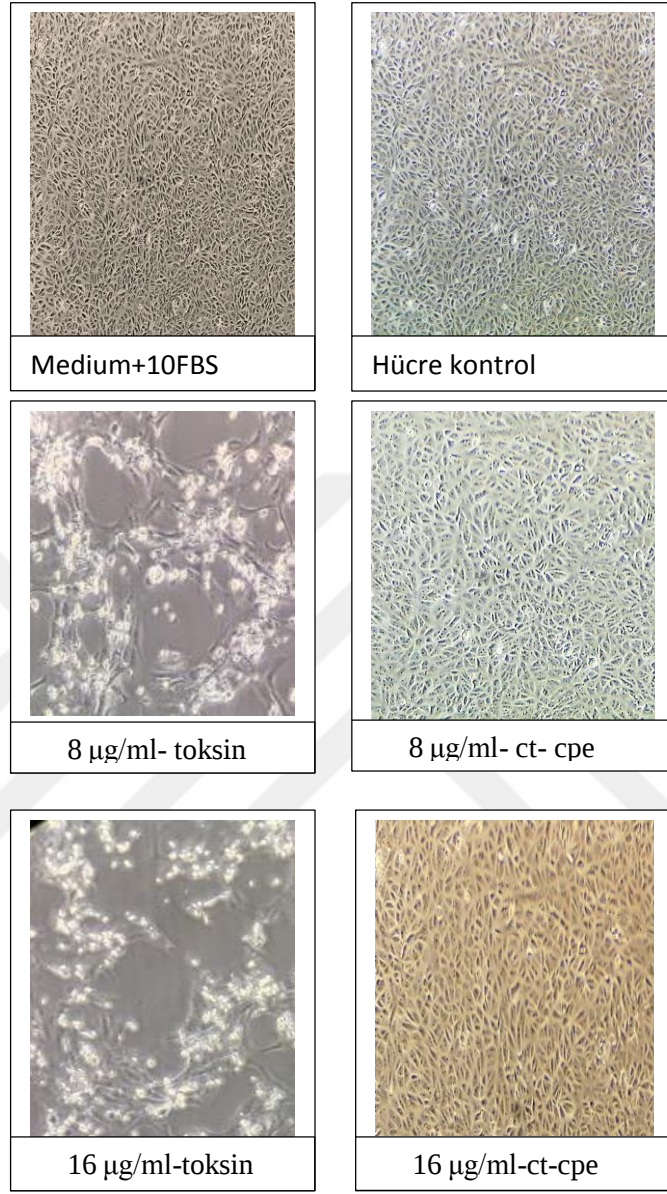
Şekil 3.14. pET-AH-CT-CPA, pET-AH-CT-CPE ve pET-AH-CT-CPB2 ve Plasmidlerin western blotd'a doğrulanması. 1) protein ladder; 2) pET-AH-CT-Cpa (yaklaşık 13kd); 3) pET-AH-CT-Cpe(yaklaşık 13.5kd) ve pET-AH-CT-Cpb2 (yaklaşık 15kDa).

3.5. Alpha, Enterotoksin ve CPB2 rekombinant proteinlerinin in vitro toksik aktivitesi

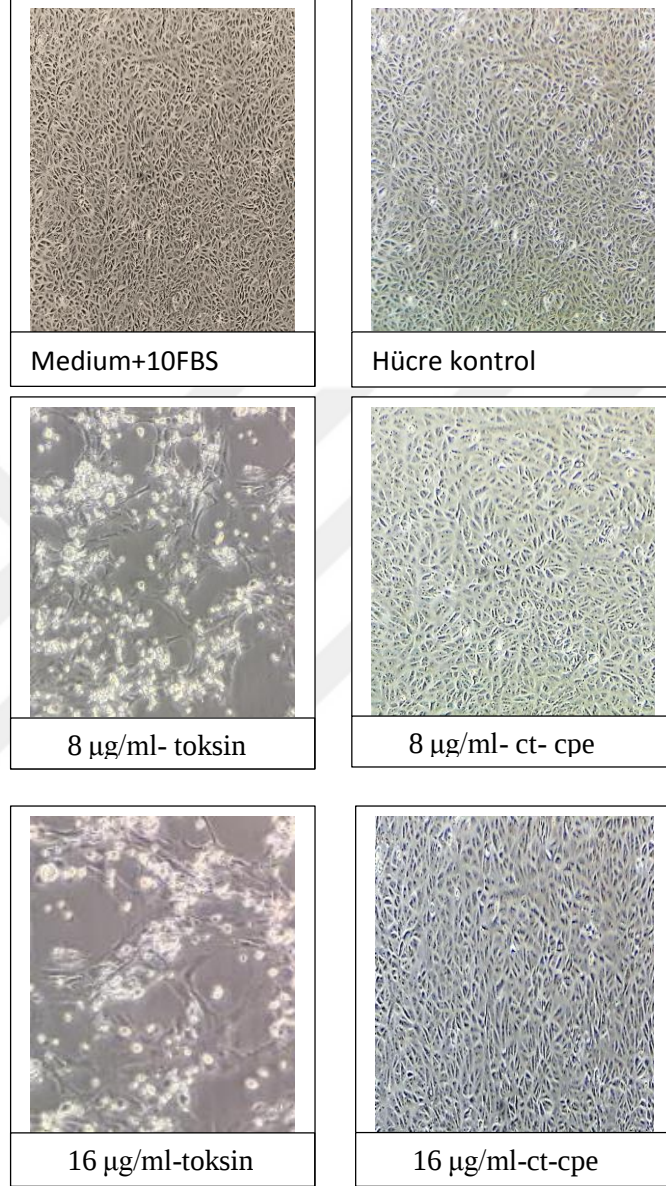
Elde edilen proteinlerin toksisitesini belirlemek amacıyla CaCo2 hücre hattı kullanılarak doğrulandı. Rekombinant proteinler, %10 FBS ile iki farklı konsantrasyonda (8ug /ml ve 16ug/ml) takviye edilmiş Eagle's Minimum Essential Medium'da seyreltildi ve 48 well plakalarda CaCo2 hücreler üzerine eklendi (Her seyreltme için well başına 0,5 ml). Hücreler 37 °C'de inkübe edildi ve 5, 12 ve 24 saat sonra mikroskopik olarak incelendi. Negatif kontrol olarak, CaCo2 hücreleri sadece ortam ile kültürlendi (Sonuçlar Şekil 3.14-15-16).



Şekil 3.15. Alpha rekombinant proteinlerinin in vitro toksik aktivitesi.



Şekil 3.16. Enterotoksin rekombinant proteinlerinin in vitro toksik aktivitesi.



Şekil 3.17. CPB2 rekombinant proteinlerinin in vitro toksik aktivitesi.

4. TARTIŞMA

Clostridium perfringens, gıda enfeksiyonları ve salgınları için önemli bir ajandır ve halk sağlığı programlarında önemli bir endişe kaynağıdır. *C. Perfringens* gıdalarla bulaşabilen ve sıklıkla rastlanılan bir hastalıktır. Gazlı olarak da bilinen klostridial miyonekroz, insanlarda ve hayvanlarda *C. perfringens* suşlarının neden olduğu önemli bir histotoksik enfeksiyondur. Clostridiosis enfeksiyonları yaygın morbitideyle birlikte yüksek ölüm oranı ve yüksek insidansa sahiptir. Bununla birlikte, yüksek oranda neonatal mortalite görülmesi sebebiyle çiftlik hayvanları için ekonomik açıdan önemli bir endişe kaynağıdır. Hastalığın hızlı seyri nedeniyle küratif tedavi mümkün değildir; bu nedenle aşının bu hastalık için en iyi profilaktik önlem olduğu bildirilmektedir. CPA toksini tüm *C. perfringens* türleri tarafından üretilmektedir ve enterotokseminin patogeneğinde ve indüklenmesinde rol oynayan önemli bir immünojenik antijen olduğu açıklanmaktadır (Goossens ve ark., 2016).

A tipi suşun enterotoksemindeki rolü oldukça kapsamlı bir şekilde tartışılmaktadır. Yakın zamanda, doğal CPA formuna ve formaldehit ile inaktive edilmiş toksoide karşı üretilen nötralizan antikorların, *C. perfringens* enfeksiyonları 'na karşı protektif olduğu gösterilmektedir. Bu etkili bir strateji olmasına rağmen, aktif toksinin kullanımı güvenli değildir ve immünojenisiteyi azaltmasına rağmen formaldehit inaktivasyonu gerekmektedir ve kalıntı formaldehit varlığı ile kalıntı toksisite ve aşırı duyarlılık riski ilişkilendirilmektedir. Geleneksel clostridial aşılarda; detoksifikasyon, saflaştırma ve antijen konsantrasyonu basamakları bulunmaktadır. Son yıllarda, genetik tekniklerin geliştirilmesi, üç boyutlu çalışmaların ve yapısal aşılamanın benimsenmesinin artması nedeniyle, araştırmacılar aşılarda rekombinant proteinler üretmek için daha fazla yöntem geliştirmeye odaklanmaktadır. Üç boyutlu yapıların çalışmaları ve CPA toksininin fonksiyonel karakterizasyonu, bir katalitik N-terminal alanı ve daha küçük bir membran bağlayıcı C-terminal alanı olmak üzere iki ayrı alanın varlığını ortaya koymaktadır. Ancak sadece C-terminal bağışıklık koruyucudur. Nagahama ve ark. (2013), GST-CP251-

370 ve GST-CP281-370 ile immünize edilmiş farelerin, alfa toksinin öldürücü etkilerine karşı koruma sağladığını ve ayrıca 10 LD₁₀₀ doz canlı madde enjekte edilen hayvanların hayatta kalmasını sağladığını bildirmektedir.

Shreya ve ark. (2013), farelerin bivalent kimerik protein Cpae ile immunizasyonu neticesinde, bu aşının *C. perfringens* tip A toksemisine karşı önemli düzeyde koruyucu olduğunu öne sürmektedirler. Bu sebeple, enzimatik ve toksin aktivitesinden yoksun C-terminal alanı, alfa-toksin aşısı için immünojen görevi görebilmektedir. C-terminal alanının sahip olduğu koruyucu immünojenlik özelliğinin sebebi tam olarak bilinmemektedir fakat C-terminal alana karşı bir antikorun ilk membran bağlanma durumunu engellemiş olması bildirilmiştir (Shreya ve ark., 2015).

Son dönemlerde, deneysel rekombinant *C. perfringens* aşılar üzerine yoğunlaşmış birçok araştırma yapılmaktadır. *E. coli*'de eksprese edilen rekombinant aşılar, laboratuvar hayvanlarında yüksek bağışıklık ile sonuçlanmaktadır (Aziminia ve ark., 2016). Ayrıca monovalent rekombinant CPA aşısı sonuçları farelerde koruyucu olarak gösterilmektedir (Nagahama ve ark. 2013). *C. perfringens* tip A türünden *cpe* (enterotoksinin) C-terminal bölgesine karşı monovalent rekombinant aşılar, BALB/c fareleri ve kobaylar üzerinde herhangi bir sistemik etki göstermedikleri bildirilmektedir (Taherian Fard ve ark., 2010). Bir çalışmada, bivalent rekombinant fuzyon olmuş ETX-CPB aşısının farelerde ve tavşanlarda koruyucu olduğunu kanıtlanmaktadır (Langroudi ve ark., 2013). Başka bir çalışmada, *C. perfringens* ve Shiga toksininin (*Escherichia coli*) alt biriminden gelen bivalent rekombinant CPE (C-terminal bölgesi) üzerinde yapılan bir çalışma, bunların farelerde koruyucu olduklarını göstermektedir (Hosomi ve ark., 2019). Ayrıca deneysel Trivalent rekombinant CPA, NetB ve TpeL, yüksek antikor titresi ile sonuçlanarak, bu hazırlanan rekombinant aşı klostridial hastalığa karşı aday bir aşı olduğunu ortaya koymaktadır (Rostami ve ark. 2016). Bir diğer çalışmada başarılı bir deneysel tetravalent rekombinant aşı CPA, CPB, ETX ve NetB bildirilmektedir (Zaragoza ve ark., 2019). Bu araştırmalar, hayvanların bağışıklanmasında multivalent rekombinant

aşıların geleneksel aşılarla kıyasla etkili olabileceğini göstermektedir (Goossens ve ark. 2016).

Bir çalışmada, CPA toksininin birkaç truncate olmuş formu (truncated rBacCPAH6) bakulovirüsler kullanılarak Sf21 böcek hücreleri gibi bir heterolog ekspresyon sisteminde ilk kez üretildiği bildirilmektedir. Bakulovirüsler, N-terminal alanı ve varsayılan sinyal dizisinin 28 amino asidi (aa) içermemekte ve truncat olan rBacCPA279-363H6, rBacCPA279- 370H6, rBacCPA250-363H6 ve rBacCPA250-370H6 proteinlerini üretebildiğini göstermektedirler (Forti ve ark.,2020).

Bakulovirüs ekspresyon sistemi sıklıkla, N-glikosilasyonu içerenler gibi translasyon sonrası modifikasyonların yapılmasını mümkün kılma kabiliyeti nedeniyle seçilmektedir; bu nedenle, CPA toksininin C-terminal alanının amino asit dizisinin bir analizi NetNGlyc 1.0 sunucusu tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu analizin sonuçları, 364 ila 370 aa kalıntıları arasında Asn-Xaa-Ser/Thr'de varsayımsal bir N glikosilasyon sahasının varlığını öngörmektedir; bu nedenle, istenmeyen glikosilasyonu önlemek için bu bölge iki yapıda da çıkarıldı (rBacCPA279-363H6 ve rBacCPA250-363H6). Aynı zamanda, hiçbir dört truncat rekombinant rBacCPAH6 proteini glikolise edilmedi, lektroforetik hareketlilikte hiçbir artışa rastlanmadı ve western blot analizi, beklenen molekül ağırlıkları 11,12,15 ve 16 KDa olan immün reaktif bantların varlığını gösterdi (Forti ve ark., 2020).

Ayrıca başka çalışmalarda, birkaç deneysel rekombinant aşısı hazırlanmış ve immünolojik yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre; rekombinant proteinlere karşı üretilen antikor, normal toksinden daha etkilidir (Daryaei ve ark., 2017; Noshahri ve ark., 2016).

Araştırmalardan elde edilen bilgiler sayesinde, *N* - ve *C*- terminal bölgelerini (CPA-N⁽¹⁻²⁴⁶⁾ ve CPA-C⁽²⁴⁷⁻³⁷⁰⁾), *E. coli*'de ifade olan GST'ye fizyon (GST-CPA-C⁽²⁴⁷⁻³⁷⁰⁾) edilmesi ve CPA-C⁽²⁴⁷⁻³⁷⁰⁾ (19 kDa) tek başına farelerde challenge sonucunda 50ug CPA veya 10⁹ *C. perfringens* hücrelerine karşı immunité sağlamaktadır. Fakat CPA-N⁽¹⁻²⁴⁶⁾ ile aşıl原因 hayvanların CPA'ya karşı korunmadığı ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar, CPA'nın konak hücreye bağlanması bloké edilmesi ve bu toksine karşı bağışıklık kazandırarak enzimatik aktivitesini nötrálize etme ihtiyacını ortadan kaldırmakla birlikte *C*- terminal alanını CPA'ya karşı ana aşı adayı haline getirmektedir (Williamson ve Titball, 1993; Nagahama ve ark., 2013).

Araştırmalar sonucunda, minör CPE ve CPB2 toksinlerinin majör alfa enterotoksin ile sinerji halinde hareket edebileceğı şélinde ifade edilmiştir. Bugüne kadar, CPB2 toksininin kesin rolü, özellikle hem insanlarda hem de hayvanlarda belirsiz olması bildirilmektedir. CPB2 toksininin varsayımsal rolü üzerine ve biyolojik aktivitesinin incelenmesi *C. perfringens* patogenezi, monoklonal antikorlar gibi spesifik reaktiflerin eksikliği nedeniyle engellenmektedir. Bu antikorların kullanımına dayalı ELISA gibi hızlı ve etkili immünolojik tahlillerin mevcudiyeti, toksinin tanımlanmasında ve ayrıca, bağırsak yolundaki proteinlerin biyolojik aktivitesine ve bunun *C. perfringens* ile ilişkili enterotoksemiye neden olmaları veya basit bir virölans faktörünü temsil edip etmediklerine ilişkin araştırmalar için zemin hazırlaması yönünden önem taşımaktadır (Serroni ve ark., 2017).

İnsanlarda ve hayvanlarda *C. perfringens* tarafından indüklenen nekrotik enterit tüm dünyaya yayılmıştır. Bu hastalık, bu anaerobik bakteri tarafından üretilen CPB2 toksinleri gibi majör ve minör toksinlerin etkisine bağlanmaktadır. CPB2'nin in vitro sitotoksitesi ve diyare gelişimindeki rolü ile ilgili bilgiler oldukça tartışmalıdır. Önceki çalışmalar, hem konsensüs hem de atipik CPB2 enterotoksininin in vitro sitotoksitede rol oynamadığını bildirmişlerdir. Ayrıca, diğér çalışmalar CPB2'nin domuz ve insan kaynaklı *C. perfringens*'ten türetildiğini göstermiştir.

Suşlar, insan Caco-2 ve I407 bağırsak hücresinde doza bağlı sitotoksik aktivite göstermektedirler (Freedman ve ark.,2015).

Çalışmalar alfa toksinin sığır endotel hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri varlığını bildirmektedir. Ayrıca PFO ile sinerjik etki içinde hareket etmekte ve neredeyse tüm hücreler vahşı tip gazlı gangren *C. perfringens* suşunun süpernatantına maruz kaldıktan sonra ayrılmaktadır. Endotel hücreleri, vasküler lümen ve çevreleyen doku arasındaki hücre, makromolekül ve sıvı değişimini kontrol eden hayati bir bariyer oluşturmaktadır. Endotel bariyerinin bozulması, doku ödemi ve kanama ile birlikte damar geçirgenliğinin artmasına neden olmaktadır. Ayrıca, CPA, muhtemelen vasküler lökostat ve lokal iskemiye artırarak lökosit yapışmasını uyarmaktadır. İnsan enterosit benzeri CaCo-2 hücre dizisi, bağırsak mukozasının emici ve savunma özelliklerinin bir modeli olarak son yirmi yılda yaygın olarak kullanılmaktadır (Verherstraeten ve ark., 2013).

Shreya ve ark. (2015), elde ettikleri rekombinant Cpae'nın CaCo-2 hücre zarına bağlandığını ancak herhangi bir toksisite göstermediğini bildirmektedirler. Bir başka çalışmada, truncat rekombinant CPA ve tam uzunlukta PLC proteinleri ile etkilenen CaCo-2 hücrelerinin hücre canlılığını ve metabolik olarak aktif hücrelerin yüzdesini değerlendirmek için pozitif kontroller ile karşılaştırıldı. Bu çalışmada rCPA250-363H6 kullanılarak bağırsak epitel hücre hatları üzerinde sitotoksikite çalışmaları yapıldı ve bakulovirüs sistemlerinde üretilen bu antijenin, *C. perfringens*'te bulunan tam uzunluktaki PLC ve doğal toksine kıyasla toksik olmadığını doğrulandı. Aslında, CaCo-2 hücrelerinin morfolojik özelliklerinde hiçbir değişiklik gözlenmedi ve 100 µ/ml'ye kadar bir konsantrasyonda mevcut olan truncat rekombinant CPA proteinleri kullanılarak MTS tahlili yapıldıktan sonra minimal bir sitotoksikite (yaklaşık %10) rapor edildi. Ayrıca bunun yerine, kültürlenmiş hücrelerin birleşik tek tabakası, 10 µg/ml tam uzunlukta PLC veya dört kata kadar seyreltilmiş bir kültür süpernatanı ile temas ettikten sonra CaCo-2 hücre hasarı gözlemlendi (Forti ve ark., 2020).

Bu tez çalışmasında ilk önce *Clostridium perfringens*'in CPA, Cpb2 ve CPE toksininin C-terminal bölgesini ifade eden rekombinant plasmidler pET-AH-CT-CPA, pET-AH-CT-CPE ve pET-AH-CT-CPB2 üretildi. Daha sonra, MagneHis™ Ni-Partiküller ile hızlı ve basit bir yöntem uygulanarak yüksek miktarlarda saflaştırılmış ürün elde edildi. Elde edilen rekombinant protein verimli bir şekilde saflaştırıldı ve varlığı western blot ve antikolar kullanarak doğrulandı. Ayrıca CaCo-2 hücreleri testinde herhangi bir sitotoksosite ortaya çıkarmadığı gözlemlendi.

Bu çalışmada elde edilen rekombinant proteinler daha önceki araştırmalara ve onlardan elde edilen sonuçlara uyumluluk göstermektedir. Çalışmada elde edilen veriler yeni rekombinant protein aşılarının geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, Türkiye’de ilk olarak *Clostridium Perfringens* tip A intoksikasyonları için koruyucu ve tedavi edici amaçlı rekombinant enterotoksin, alfa ve beta2 toksin geliştirilmiştir. Elde edilen rekombinant plazmitler pET-AH-CT-CPA, pET-AH-CT-CPE ve pET-AH-CT-CPB2, klonlama, doğrulama aşamalarından geçirilmiş ve sonuçlar uygun ve başarılı bulunmuştur.

Bu çalışmada plazmitler, *E. coli BL21* (DE3) competent cell’e transfer edilmiştir ve IPTG (izopropil β -D-l-tiogalaktopiranosid) kullanarak protein ekspresyonu yapılmıştır. Elde edilen rekombinant proteinler MagneHis™ Ni-Partiküller ile hızlı ve basit bir yöntem uygulanarak yüksek miktarlarda saflaştırılmış bir ürün elde edilmiştir. Bu ürünler testlere tabi tutulmuş ve sonuçların başarılı olduğu kanıtlanmıştır.

Genetiği değiştirilmiş aşılar, bakteri aşılarının kültür ve üretimindeki zahmetli çalışmaların azalması nedeniyle umut verici adaylar olarak görünmektedir. Rekombinant aşıların üretimi toksik olmayan, üstün stabilite ve biyogüvenlik ile Clostridial enfeksiyonlara karşı yüksek verimli bir süreç olarak kabul edilmektedir.

Bu tür ajanlar, kronik olabilen ve genellikle toksinler ile gıda zehirlenmesine ve daha şiddetli CPE aracılı gıda zehirlenmesi veya CPE aracılı gıda kaynaklı olmayan hastalıkların tedavisi için faydalı olabilmektedir.

Dünyada 1900'lü yıllardan beri klostridial aşıların büyük ölçekli üretimleri değişmeden kalmıştır. Bununla birlikte, nanoaşıların ve rekombinant aşıların etkili olduğu ve laboratuvar hayvanlarında geleneksel aşılara potansiyel alternatifler

olabileceğini kanıtlamaktadır. Ancak yeni nesil aşılar için saflaştırma ve inaktivasyon aşamaları, antijen sunumu ve konsantrasyonu, aşı sunumu ve özellikle polivalan aşılarla karşı spesifik immün yanıtların uyarılması önemlidir.

C. perfringens kaynaklı rekombinant toksinler, çiftlik hayvanlarında koruyucu bağışıklık tepkisini indüklemeye etkili olduğu bildirilmektedir. Ayrıca toksinlerin üzerine yapılan araştırmalar, yalnızca C-terminal bölgelerinin koruma sağlayabileceğini bildirmiştir. Bu araştırmalar ve bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar neticesinde toksinlerin C-terminal bölgesini kullanarak rekombinant protein ürettiğine ve güvenilir bir aşı adayı olduğuna dair bilgiler sunulmaktadır.

C. perfringens alfa toksin gaz gangren, hemoliz, trombosit agregasyonu, kan damarlarının kasılması, süperoksit üretimi, sitokin fırtınası oluşumunda ve tüm bu olgulara bağlı ölüm meydana gelmesinde önemlidir. *C. perfringens* enterotoksin (CPE) gıda kaynaklı ve gıda kaynaklı olmayan insan gastrointestinal hastalıklarından sorumludur. Nekrotik enterit için beta2 toksin (CPB2) önemli bir virulans faktör olarak bildirilmektedir. İnsanlardaki ve evcil hayvanlardaki gastrointestinal hastalıklarda potansiyel bir aksesuar toksindir. Rekombinant proteinler, *Clostridial* toksinlere karşı potansiyel koruyucu ve tedavi edici adaylardır. Ayrıca, bu proteinlerin yüksek immünojenik gücü, bir aşının geliştirilmesinde kullanılmasının yolunu açabilmektedir.

ÖZET

***Clostridium Perfringens* Tip A İntoksikasyonları İçin Koruyucu ve Tedavi Edici Amaçlı Rekombinant Enterotoksin, Alfa ve Beta2 Toksin Geliştirilmesi**

Clostridium perfringens, sağlıklı insan ve hayvanların gastrointestinal sisteminde bulunan, spor oluşturan gram pozitif ve 18'e kadar toksin üreten bir bakteridir. Türler, bakterinin ürettiği toksinlere göre beş toksin tipine (A-E) ayrılmaktadır: alfa, beta, epsilon veya iota. Clostridial toksinler, hem insanlarda hem de hayvanlarda çok çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilen *Clostridium perfringens*'in temel patojenik virulansıdır. *C. perfringens* alfa toksin gaz kangreninde, hemoliz, trombosit agregasyonunda, kan damarlarının kasılmasında, süperoksit üretiminde, sitokin fırtınası oluşumunda ve sonuç olarak ölüm meydana gelmesinde önemlidir. *C. perfringens* enterotoksin (CPE) gıda kaynaklı ve gıda kaynaklı olmayan insan gastrointestinal hastalıklarından ve gastrointestinal semptomlardan sorumludur. *C. perfringens* beta2 toksini (CPB2) nekrotik enterite önemli bir virulans faktörüdür ve insanlardaki ve evcil hayvanlardaki gastrointestinal hastalıklarda potansiyel bir aksesuar toksindir. Rekombinant toksin proteinleri, Clostridial toksinlere karşı potansiyel koruyucu ve tedavi edici adaylarıdır. Nötralize edici antikorlar üreten aşılar, şu anda kullanımda olan en yaygın profilaktik önlemler olarak bildirilmektedir. Bu aşılar toksinlerin C-terminal bölgesini içermektedir. Rekombinant aşılar geleneksel toksoidlere göre çeşitli avantajlar sunmaktadır. Bu tez çalışmasında, *Clostridium perfringens* tip A intoksikasyonları için koruyucu ve tedavi edici amaçlı rekombinant enterotoksin, Alfa ve Beta2 toksin pET-AH-CT-CPA, pET-AH-CT-CPE ve pET-AH-CT-CPB2 geliştirildi. Ayrıca bu çalışma, üretilen rekombinant protein aşılarının kullanılan ana stratejileri ve bu moleküllerin insan ve hayvan enfeksiyonlarına özellikle gıda enfeksiyonlarına karşı bir antiserum ve aşı olarak potansiyelini tartışmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Alfatoksin, Beta2 toksin, *Clostridium perfringens*, Enterotoksin, Rekombinant teknoloji.

SUMMARY

Development of Rekombinant Enterotoksin, Alpha and Beta2 Toksins for Preventive and Therapeutic Purposes for *Clostridium perfringens* Type A Intoxications

Clostridium perfringens is a spore-forming gram-positive and up to 18 toksin-producing bacterium found in the gastrointestinal tract of healthy humans and animals. Species are divided into five toksin types (A-E) according to the toksins produced by the bacteria: alpha, beta, epsilon, or iota. Clostridial toksins are main pathogenic virulence of *Clostridium perfringens* that have been associated with a wide range of diseases in both humans and domestic animals. *Clostridium perfringens* alpha-toksin is an important agent in gas gangrene and causes hemolysis, platelet aggregation, contraction of blood vessels, superoxide generation, cytokine storm, and ultimately death. *C. perfringens* enterotoksin (CPE) is responsible for causing the gastrointestinal symptoms of several *C. perfringens* food- and nonfood-borne human gastrointestinal diseases. *C. perfringens* beta2 toksin (CPB2) is an important virulent factor of necrotic enteritis and a potential accessory toksin in gastrointestinal diseases of humans and domestic animals. The use of rekombinant toksin against different types of toksins may be an effective approach in the prevention and therapeutic of intoxication caused produced by *C. perfringens*. Rekombinant toksin proteins are potential preventive and therapeutic candidates against Clostridial toksins. Vaccines that produce neutralizing antibodies are reported as the most common prophylactic measures currently in use. These vaccines contain the C-terminal region of toksins. Rekombinant vaccines offer several advantages over conventional toxoids. In this thesis, rekombinant enterotoksin, Alpha and Beta2 toksins for preventive and therapeutic purposes for *Clostridium Perfringens* type A intoxications pET-AH-CT-CPA, pET-AH-CT-CPE and pET-AH-CT-CPB2 were developed. In addition, this study discusses the main strategies used in rekombinant protein vaccines and the potential of these molecules as an antiserum and vaccine against human and animal infections, especially food infections.

Keywords: Alpha-toksin, Beta2 toksin, *Clostridium perfringens*, Enterotoksin, , Rekombinant technology.

KAYNAKLAR

- ALAPE-GIRÓN A, FLORES-DÍAZ M, GUILLOUARD I, NAYLOR CE, TITBALL RW, RUCAVADO A, LOMONTE B, BASAK AK, GUTIÉRREZ JM, COLE ST, THELESTAM M (2000). Identification of residues critical for toxicity in *Clostridium perfringens* phospholipase C, the key toksin in gas gangrene. *Eur J Biochem*, **16**:5191-5197.
- ALLEN SD, CHRISTOPHER LE, AND LYERLY DM., Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA (2003). *Clostridium. Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. ASM, Washington, D.C, 835-856.
- AUCOUTURIER J, DUPUIS L, GANNE, V. (2001). Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*, **19**: 2666 – 2672.
- AUTHEMAN D, WYDER M, POPOFF M, DHERDE K, CHRISTEN S, POSTHAU S H (2013). *Clostridium perfringens* beta-toksin induces necrostatin-inhibitable, calpain-dependent necrosis in primary porcine endothelial cells. *PLoS ONE*, **8**: e64644.
- AZİMİNİA P, PİLEHCHİAN-LANGROUDİ R, ESMAEİLNİA K(2016). Cloning and expression of *Clostridium perfringens* type D vaccine strain epsilon toksin gene in *E. coli* as a rekombinant vaccine candidate, *Iranian Journal of Microbiology*, **8**:226-231.
- BERNÁTH S, FÁBIÁN K, KÁDÁR I, SZITA G, BARNA T (2004). Optimum time interval between the first vaccination and the booster of sheep for *Clostridium perfringens* type D different authors suggest very different time intervals for the revaccination of sheep, even when similarly, adjuvanted vaccines are used again. *Acta Vet. BRNO*, **73**:473–475.
- BOKORI-BROWN M, HALL C, VANCE C, COSTA S.F, SAVVA C.G, NAYLOR CE, COLE AR, BASAK A.K, MOSS DS, TITBALL RW (2014). *Clostridium perfringens* epsilon toksin mutant Y30A-Y196A as a rekombinant vaccine candidate against enterotoxemia. *Vaccine*, **32**: 2682–2687.
- BOS J, SMITHEE L, MCCLANE B, DISTEFANO RF, UZAL F, SONGER JG, MALLONEE S, CRUTCHER JM (2005). Fatal necrotizing colitis following a foodborne outbreak of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A infection. *Clin. Infect. Dis*, **40**: E78–E83.

- BRIGGS DC, NAYLOR CE, SMEDLEY JG, LUKOYANOVA N, ROBERTSON S, MOSS DS, MCCLANE BA, BASAK AK (2011). Structure of the food-poisoning *Clostridium perfringens* enterotoxin reveals similarity to the aerolysin-like pore-forming toxins. *J. Mol. Biol.*, **413**: 138–149.
- BRYNESTAD S, SARKER MR, MCCLANE BA, GRANUM PE, ROOD JI (2001). The enterotoxin (cpe) plasmid from *Clostridium perfringens* is conjugative. *Infect. Immun.*, **69**:3483–3487.
- CARMAN RJ (1997). *Clostridium perfringens* in spontaneous and antibiotic-associated diarrhoea of man and other animals. *Rev. Med. Microbiol.*, **8**: S43–S45.
- CASERTA JA, ROBERTSON SL, SAPUTO J, SHRESTHA A, MCCLANE B.A, UZAL FA (2001). Development and application of a mouse intestinal loop model to study the in vivo action of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect. Immun.*, **79**: 3020–3027.
- CAVALCANTI M, PORTO T, PORTO A, BRANDI I, LIMA FILHO J, PESSOA JUNIOR A (2004). Large scale purification of *Clostridium perfringens* toxins: A review. *Braz. J. Pharm. Sci.*, **40**: 151–164.
- CHAKRABARTI G, MCCLANE B.A. (2005). The importance of calcium influx, calpain and calmodulin for the activation of Caco-2 cell death pathways by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Cell. Microbiol.*, **7**: 129–146.
- CHAKRABARTI G, ZHOU X, MCCLANE BA (2003). Death pathways activated in Caco-2 cells by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect. Immun.*, **71**: 4260–4270.
- CHANDRAN D, NAIDU SS, SUGUMAR P, RANI G S, VIJAYAN SP, MATHUR D GARG LC, SRINIVASAN V (2010). Development of a recombinant epsilon toxoid vaccine against enterotoxemia and its use as a combination vaccine with live attenuated sheep pox virus against enterotoxemia and sheep pox. *Clin. Vaccine Immunology*, **17**:1013–1016.
- CHEN J, MA M, UZAL FA, MCCLANE BA (2014). Host cell-induced signaling causes *Clostridium perfringens* to upregulate production of toxins important for intestinal infections. *Gut Microbes*, **5**:1–12.
- CHEN J, THEORET JR, SHRESTHA A, SMEDLEY JG, MCCLANE BA (2012). Cysteine-scanning mutagenesis supports the importance of *Clostridium perfringens* enterotoxin amino acids 80 to 106 for membrane insertion and pore formation. *Infect. Immun.*, **80**: 4078–4088.

- COLLIE RE, KOKAI-KUN JF, MCCLANE BA (1998). Phenotypic characterization of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates from non-foodborne human gastrointestinal diseases. *Anaerobe*, **4**: 69–79.
- DUTRA I (2016). Clostridioses Doenças Que Mais Matam Bovinos. Available online: <http://www.beefpoint.com.br/radares-tecnicos/sanidade/clostridioses-doencas-que-mais-matam-bovinos-5068>.
- FISHER DJ, FERNANDEZ-MIYAKAWA ME, SAYEED S, ADAMS V, POON R, ROOD, JI, UZAL FA, MCCLANE BA (2006). Dissecting the contributions of *Clostridium perfringens* Type C toxins to lethality in the mouse intravenous injection model. *Infect Immun*, **73**: 5200-5210.
- FORTI K, CAGIOLA M, PELLEGRINI M(2020). Generation of rekombinant baculovirus expressing atoxic C-terminal CPA toxin of *Clostridium perfringens* and production of specific antibodies. *BMC Biotechnol*, **20**:1-7.
- FLORES-DÍAZ M, ALAPE-GIRÓN A. (2003). Role of *Clostridium perfringens* phospholipase C in the pathogenesis of gas gangrene. *Toxicon*, **42**: 979–986.
- FREEDMAN JC, MCCLANE BA, UZAL FA (2016). New insights into *Clostridium perfringens* epsilon toxin activation and action on the brain during enterotoxemia. *Anaerobe*, **41**: 27–31.
- FURUSE M (20120). Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*, **2**:2-7.
- GARCIA JP, BEINGESSER J, BOHOROV O, BOHOROVA N, GOODMAN C, KIM D, PAULY M, VELASCO J, WHALEY K, ZEITLIN L (2014). Prevention and treatment of *Clostridium perfringens* epsilon toxin intoxication in mice with a neutralizing monoclonal antibody (c4D7) produced in *Nicotiana benthamiana*. *Toxicon*, **88**: 93–98.
- GIBERT M, PETIT L, RAFFESTIN S, OKABE A, POPOFF MR (2000). *Clostridium perfringens* iota-toxin requires activation of both binding and enzymatic components for cytopathic activity. *Infect. Immun*, **68**: 3848–3853.
- GIL LAF, CUNHA CEP, MOREIRA GMSG, SALVARANI FM, ASSIS RA, LOBATO, FCF, MENDONÇA M, DELLAGOSTIN OA, CONCEIÇÃO FR (2013). Production and evaluation of a rekombinant chimeric vaccine against *Clostridium botulinum* neurotoxin types C and D. *PLoS ONE*, **8**:14-23.

- GOHARI MEHDIZADEH IMAN, A NAVARRO MAURÍCIO, JIHONG LI, ARCHANA SHRESTHA, FRANCISCO UZAL & BRUCE A. MCCLANE. (2021) Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. *Virulence*, **12**: 723-753
- GUNZEL D, YU A (2013). Claudins and the modulation of the tight junction permeability. *Physiol. Rev*, **93**: 525–569.
- GOOSSENS E, VERHERSTRAETEN S, VALGAEREN BR, PARDON B, TIMBERMONT L, SCHAUVLIEGE S, RODRIGO-MOCHOLÍ D, HAESBROUCK F, DUCATELLE R, DEPREZ PR (2016). The C-terminal domain of *Clostridium perfringens* alpha toxin as a vaccine candidate against bovine necrohemorrhagic enteritis. *Vet. Res*, **47**: 56-78.
- GURJAR A, LI J, MCCLANE BA (2010). Characterization of toxin plasmids in *Clostridium perfringens* type C isolates. *Infect. Immun*, **78**: 4860–4869.
- GURTNER C, POPESCU F, WYDER M, SUTTER E, ZEEH F, FREY J, VON SCHUBERT C, POSTHAUS H (2010). Rapid cytopathic effects of *Clostridium perfringens* beta-toxin on porcine endothelial cells. *Infect. Immun*, **78**: 2966–2973.
- HAILEGEBREAL G (2017). A Review on *Clostridium perfringens* food poisoning. *Glob. Res. J. Publ. Health and Epidemiol*, **4(3)**: 104-109.
- HANNA PC, WNEK AP, MCCLANE BA (1989). Molecular cloning of the 31 half of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene and demonstration that this region encodes receptor-binding activity. *J. Bacterial*, **171**: 6815–6820.
- HASSAN KA, ELBOURNE LD, TETU SG, MELVILLE SB, ROOD JI, PAULSEN IT (2015). Genomic analyses of *Clostridium perfringens* isolates from five toxin types. *Res. Microbiol*, **166**: 255–263.
- HARADA M, KONDOH M, EBIHARA C, TAKAHASHI A, KOMIYA E, FUJII M, MIZUGUCHI H, TSUNODA S, HORIGUCHI Y, YAGI K. (2007). Role of tyrosine residues in modulation of claudin-4 by the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Biochem. Pharmacol*, **73**: 206–214.
- HEREDIA NL, LABBE R G, RODRIQUEZ MA, GARCIA-ALVARODO JS, GROWTH (1991). Sporulation and Enterotoxin Production by *C. perfringens* type A in the presence of human bile salts. *FEMS Microbiol. Lett*, **84**: 15–22.

- HOANG TH, HONG HA, CLARK GC, TITBALL RW, CUTTING SM (2008). Rekombinant *Bacillus subtilis* expressing the *Clostridium perfringens* alpha toxoid is a candidate orally delivered vaccine against necrotic enteritis. *Infect. Immun*, **76**: 5257–5265.
- HOFFMANN S, BATZ MB, MORRIS JG, JR (2012). Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *J. Food Prot*, **75**:1292–1302.
- HORIGUCHI Y, AKAI T, SAKAGUCHI G (1987). Isolation and function of a *Clostridium perfringens* enterotoksin fragment. *Infect. Immun*, **55**: 2912–2915.
- HOSOMI K(2019). Development of a bivalent food poisoning vaccine: augmented antigenicity of the C-terminus of *Clostridium perfringens* enterotoksin by fusion with the B subunit of Escherichia coli Shiga toksin 2, *International Immunology*,**31**: 91-100.
- HUANG IH, WATERS M, GRAU RR, SARKER MR(2004). Disruption of the gene (spo0A) encoding sporulation transcription factor blocks endospore formation and enterotoksin production in enter toxigenic *Clostridium perfringens* type A. *FEMS Microbial. Lett*, **233**: 233–240.
- JOHANSSON A, ASPAN A, BAGGE E, BÅVERUD V, ENGSTRÖM BE, JOHANSSON KE (2006). Genetic diversity of *Clostridium perfringens* type A isolates from animals, food poisoning outbreaks and sludge. *BMC Microbiol*, **6**: 4-7.
- KIU R, CAİM S, ALEXANDER S (2017). Probing genomic aspects of the multi-host pathogen *Clostridium perfringens* reveals significant pangenome diversity, and a diverse array of virulence factors. *Front Microbiol*, **8**:24-85.
- KRAUSE G, WINKLER L, MUELLER SL, HASELOFF RF, PIONTEK J, BLASIG, IE (2008). Structure and function of claudins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**: 631–645.
- KHORASANI A, MADADGAR O, SOLEIMANJAHİ H, KEYVANFAR H, MAHRVANI H (2016). Evaluation of the efficacy of a new oil-based adjuvant ISA 61 VG FMD vaccine as a potential vaccine for cattle. *Iran J Vet Res. Winter*, **17**:8-12.
- KULKARNI RR, PARREIRA VR, SHARIF, S, PRESCOTT JF. (2007). Immunization of broiler chickens against *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. *Clin. Vaccine Immunol*, **14**:1070–1077.

- KITADOKORO K, NISHIMURA K, KAMITANI S, FUKUI-MIYAZAKI A, TOSHIMA H, ABE H, KAMATA Y, SUGITA-KONISHI Y, YAMAMOTO S, KARATANI H. (2011). Crystal structure of *Clostridium perfringens* enterotoxin displays features of beta-pore-forming toxins. *J. Biol. Chem*, **286**: 19549–19555.
- LANGROUDI R.P, SHAMSARA M, AGHAÏYPOUR, K.(2013) Expression of *clostridium perfringens* epsilon-beta fusion toxin gene in *E. coli* and its immunologic studies in mouse, *Vaccine*, **31**: 3295-3299
- LAL-NAG M, BATTIS M, SANTIN AD, MORIN PJ (2012). Claudin-6: A novel receptor for CPE-mediated cytotoxicity in ovarian cancer. *Oncogenesis*. **1**:1-6.
- LANGROUDI RP, SHAMSARA M, AGHAÏYPOUR K (2013). Expression of *Clostridium perfringens* epsilon-beta fusion toxin gene in *E. coli* and its immunologic studies in mouse. *Vaccine*, **31**: 3295–3299.
- LARENTIS A, NICOLAU FMQ, ESTEVES GD, VARESCHINI D, DE ALMEIDA FV, DOS REIS M, GALLER, R, MEDEIROS M (2014). Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and micro bioreactor. *BMC Res*,**7**.
- LYRAS D, ROOD JI (2006). Clostridial genetics. In the Gram Positive Pathogens. Edited by Fischetti, VA Novick RP, Ferretti, JJ, Portnoy, DA, and Rood, J.I. ASM Press, Washington DC, 672-687 pp.
- LEBRU M, MAINIL JG, LINDEN A (2010). Cattle enterotoxaemia and *Clostridium perfringens*: Description, diagnosis and prophylaxis. *Vet. Rec*,**167**:13–22.
- LOBATO FCF, LIMA CGRD, ASSIS RA, PIRES PS, SILVA ROS, SALVARANI FM, CARMO AO, CONTIGLI C, KALAPOTHAKIS E (2010). Potency against enterotoxaemia of a rekombinant *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid in ruminants. *Vaccine*, **28**: 6125–6127.
- LI, J, ADAMS V, BANNAM TL, MIYAMOTO K, GARCIA JP, UZAL FA, ROOD JI, MCCLANE BA (2013). Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, **77**: 208–233.
- LI J, CHEN J, VIDAL JE, MC CLANE BA (2011). The agr-like quorum-sensing system regulates sporulation and production of enterotoxin and beta2 toxin by *Clostridium perfringens* type A non-food-borne human gastrointestinal disease strain F5603. *Infect. Immun*, **79**: 2451–2459.

- LI J, MIYAMOTO K, SAYEED S, MCCLANE B.A. (2010). Organization of the cpe locus in CPE-positive *Clostridium perfringens* type C and D isolates. *PLoS ONE*, **5**: e10932.
- LI J, MIYAMOTO K, MCCLANE BA (2007). Comparison of virulence plasmids among *Clostridium perfringens* type E isolates. *Infect. Immun*, **75**: 1811–1819.
- LI J, MCCLANE BA (2006). Comparative effects of osmotic, sodium nitrate-induced, and pH-induced stress on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying chromosomal or plasmid-borne enterotoxin genes. *Appl. Environ. Microbiol*, **72**: 7620-7625.
- MA M, VIDAL J, SAPUTO J, MCCLANE BA, UZAL F. (2011). The virs/virr two-component system regulates the anaerobic cytotoxicity, intestinal pathogenicity, and enterotoxemic lethality of *Clostridium perfringens* type C isolate CN3685. *mBio*, **2**: 33-81.
- MARCHIORO SB, FISCH A, GOMES CK, GALLI V, HAESBROUCK F, MAES D, DELLAGOSTIN O, CONCEIÇÃO F.R. (2014). Local and systemic immune responses induced by a recombinant chimeric protein containing Mycoplasma hyopneumoniae antigens fused to the B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin LT_B. *Vet. Microbiol*, **173**: 166–171.
- MCCLANE BA, UZAL FA, MIYAKAWA MF, LYERLY D, WILKINS TD (2006). The enterotoxin clostridia. In *The Prokaryotes*, 3rd ed; Dworkin M, Falkow S, Rosenberg, E, Schleifer H, Stackebrandt E, Eds; Springer NY Press: New York, NY, USA, 688–752
- MCCLANE BA, ROBERTSON S, LI J (2013). *Clostridium perfringens*. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*; Doyle, M.P., Buchanan, R.L., Eds.; ASM Press: Washington, DC, USA, 465–489.
- MILACH A, DE LOS SANTOS JR, TURNES CG, MOREIRA AN, DE ASSIS RA, SALVARANI FM, LOBATO FCF, CONCEIÇÃO FR (2012). Production and characterization of *Clostridium perfringens* recombinant toxoid. *Anaerobe*, **18**: 363–365.
- MIYAMOTO K, YUMINE N, MIMURA K, NAGAHAMA M, LI J, MCCLANE BA, AKIMOTO S (2011). Identification of novel *Clostridium perfringens* type E strains that carry an iota toxin plasmid with a functional enterotoxin gene. *PLoS ONE*, **6**: 23-76.
- MOREIRA G, CUNHA C, SALVARANI F, GONÇALVES L, PIRES P, CONCEIÇÃO F, LOBATO F (2014). Production of recombinant botulinum antigens: A review of expression systems. *Anaerobe*, **28**: 130–136.

- MOREIRA C, JR, CUNHA CEP, MOREIRA GSMG, MENDONÇA M, SALVARANI FM, MOREIRA AN, CONCEIÇÃO FR (2016). Protective potential of rekombinant non-purified botulinum neurotoksin serotypes C. *Anaerobe*, **40**: 58–62.
- NAGAHAMA M, ODA M, KOBAYASHI K, OCHI S, TAKAGISHI T, SHIBUTANI M, SAKURAI J. (2013). A rekombinant carboxy-terminal domain of alpha-toksin protects mice against *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Immunol*, **57**: 340–345.
- NUCCITELLI A, COZZI R, GOURLAY L.J, DONNARUMMA D, NECCHI F, NORAIS N, TELFORD J.L, RAPPUOLI R, BOLOGNESI M, MAIONE D. (2011). Structure-based approach to rationally design a chimeric protein for an effective vaccine against Group B Streptococcus infections. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 10278–10283.
- ODA M, TERAOKA Y, SAKURAI J, NAGAHAMA M (2015). Membrane-binding mechanism of *Clostridium perfringens* alpha-toksin. *Toksins*, **7**: 5268–5275.
- OHTANI K, KAWSAR HI, OKUMURA K, HAYASHI H, SHIMIZU T (2003). The virr/virs regulatory cascade affects transcription of plasmid-encoded putative virulence genes in *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiol. Lett.* **222**: 137–141.
- OHTANI K, HIRAKAWA H, PAREDES-SABJA D, TASHIRO K, KUHARA S, SARKER M.R, SHIMIZU T (2013). Unique regulatory mechanism of sporulation and enterotoksin production in *Clostridium perfringens*. *J. Bacterial*, **195**: 2931–2936.
- OYSTON PCF, PAYNE DW, HAVARD HL, WILLIAMSON ED, TITBALL RW (2011). Production of a non-toxic., Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M, Roy S, Jones JL, Grffin, PM, Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerg. Infect. Dis*, **17**: 7–15.
- PHILIPPE V, MENDEZ M, HUANG IH, ORSARIA L, SARKER MR, GRAU RR (2006). Inorganic phosphate induces spore morphogenesis and enterotoksin production in the intestinal pathogen *Clostridium perfringens*. *Infect.Immun*, **74**: 3651–3656.
- RICHARDSON AR, SOMERVILLE GA, SONENSHEIN AL (2015). Regulating the intersection of metabolism and pathogenesis in gram-positive bacteria. *Microbiol Spectr*, **3**:12-24.
- ROBERTSON S, SMEDLEY JG, III MCCLANE, BA (2010). Identification of a claudin-4 residue important for mediating the host cell binding and action of *Clostridium perfringens* enterotoksin. *Infect. Immun*, **78**: 505–517.

- ROOD JI (1998). Virulence genes of *Costridium perfringens*. *Annu. Rev. Microbiol*, **52**: 333–360.
- ROOS S, WYDER M CANDI A, REGENSCHEIT N NATHUES C, VAN IMMERSEEL F, POSTHAUS H (2015). Binding Studies on isolated porcine small intestinal mucosa and in vitro toxicity studies reveal lack of effect of *C. perfringens* beta-toksin on the porcine intestinal epithelium. *Toksins*, **7**: 1235–1252.
- ROSTAMÍ A (2016). Design and expression of a chimeric vaccine candidate for avian necrotic enteritis. *Protein Engineering, Design and Selection*, **30**: 39-45.
- POPESCU F, WYDER M, GURTNER C, FREY J, COOKE RA, GREENHILL AR, POSTHAUS H (2011). Susceptibility of primary human endothelial cells to *C. perfringens* beta-toksin suggesting similar pathogenesis in human and porcine necrotizing enteritis. *Vet. Microbiol*, **153**: 173–177.
- SAITOH Y, SUZUKI H, TANI K, NISHIKAWA K IREI K, OGURA Y, TAMURA A, TSUKITA S, FUJIYOSHI Y (2015). Structural insight into tight junction disassembly by *Clostridium perfringens* enterotoksin. *Science*, **347**: 775–778.
- SAKURAI J, NAGAHAMA M, ODA M (2004). *Clostridium perfringens* alpha-toksin: Characterization and mode of action. *J. Biochem*, **136**: 569–574.
- SAKURAI J, NAGAHAMA M (2006). *Clostridium perfringens* beta-toksin: Characterization and action. *Toksin Rev*, **25**: 89–108.
- SERRONÍ A, MAGİSTRALİ CF, PEZZOTTİ G, BANO L, PELLEGRİNİ M, SEVERİ G, Dİ PANCRAZİO C, LUCIANİ M, TITTARELLİ M, TOFANİ S, DE GIUSEPPE A (2017). Expression of deleted, atoxic atypical rekombinant beta2 toksin in a baculovirus system and production of polyclonal and monoclonal antibodies. *Microb Cell Fact*, **25**: 16-94.
- SCHOEPE H, NEUBAUER A, SCHLAPP T, WIELER LH, BALJER G (2006). Immunization with an alphetoksin variant 121A/91-R212H protects mice against *Clostridium perfringens* alphetoksin. *Anaerobe*, **12**: 44–48.
- SHIMIZU T, OHTANI K, HIRAKAWA H, OHSHIMA K, YAMASHITA A, SHIBA T, OGASAWARA N, HATTORI M, KUHARA S, HAYASHI H. (2002). Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**: 996–1001.

- SHERMAN, S, KLEIN E, MCCLANE B.A. (1994). Clostridium perfringens type A enterotoxin induces concurrent development of tissue damage and fluid accumulation in the rabbit ileum. *J. Diarrheal Dis. Res*, **12**: 200–207.
- SHRESTHA A, MCCLANE B.A. (2013). Human claudin-8 and -14 are receptors capable of conveying the cytotoxic effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *mBio*, **4**: 3-15
- SHRESTHA A, ROBERTSON S, GARCIA J, BEINGASSER J, MCCLANE, B.A, UZAL F.A. (2014). A synthetic peptide corresponding to the extracellular loop 2 region of claudin-4 protects against *Clostridium perfringens* enterotoxin in vitro and in vivo. *Infect. Immun*, **82**: 80-97.
- SHREYA D, MAJUMDER S, KINGSTON JJ, BATRA HV (2016). Generation and characterization of rekombinant bivalent fusion protein r-Cpib for immunotherapy against *Clostridium perfringens* beta and iota toxemia. *Mol. Immunol*, **70**:140–148.
- SHREYA D, UPPALAPATI SR, KINGSTON JJ, SRIPATHY MH, BATRA HV (2011). Immunization with rekombinant bivalent chimera r-Cpae confers protection against alpha toxin and enterotoxin of *Clostridium perfringens* type A in murine model. *Mol. Immunol*, **65**:51–57.
- SMEDLEY JG, SAPUTO J, PARKER JC, FERNANDEZ-MIYAKAWA ME, ROBERTSON SL, MCCLAN BA, NUZAL FA (2008). Noncytotoxic *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) variants localize CPE intestinal binding and demonstrate a relationship between CPE-induced cytotoxicity and enter toxicity *Infect. Immun*, **76**: 3793–3800.
- SMEDLEY JG, MCCLANE BA (2004). Fine-mapping of the N-terminal cytotoxicity region of *Clostridium perfringens* enterotoxin by site-directed mutagenesis. *Infect. Immun*, **72**: 6914–6923.
- STACKEBRANDT E, RAINEY FA (1997). Phylogenetic relationships. In *The Clostridia - molecular biology and pathogenesis*. Edited by JI. Rood BA McClane G, Songer RW, Titball, Academic Press. San Diego.
- STEINTHORSDDOTTIR, V, FRIDRIKSDOTTIR V, GUNNARSSON E, ANDRÉSSON O.S. (1998). Site-directed mutagenesis of *Clostridium perfringens* beta-toxin: Expression of wild-type and mutant toxins in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett*, **158**: 17–23.

- STEINTHORSDOTTIR V, HALLDÓRSSON H, ANDRÉSSON O.S. (2000). Clostridium perfringens beta-toksin forms multimeric transmembrane pores in human endothelial cells. *Microb. Pathog*, **28**: 45–50.
- TAHERIAN FARD A. (2010) Cloning and expression of C-terminal of Clostridium perfringens type A enterotoksin and its biological activity, *African Journal of Microbiology Research*, **4**: 1469-1474.
- TAKAHASHI A KOMIYA E KAKUTANI H YOSHIDA T FUJII M HORIGUCHI Y MIZUGUCHI H, TSUTSUMI Y, TSUNODA S, KOIZUMI N(2008). Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal region of C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoksin, by site-directed mutagenesis. *Biochem. Pharmacol*, **75**: 1639–1648.
- TERPE K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **72**: 211–222.
- TITBALL RW (2005). Gas gangrene: An open and closed case. *Microbiology*, **151**:2821–2828.
- THAYSEN-ANDERSEN M, JORGENSEN SB, WILHELMSEN ES, PETERSEN JW, HOJRUP P (2007). Investigation of the detoxification mechanism of formaldehyde-treated tetanus toksin. *Vaccine*, **25**: 2213–2227.
- UPPALAPATI SR, KINGSTON JJ, MURALI HS, BATRA HV (2014). Heterologous protection against alpha toksins of *Clostridium perfringens* and Staphylococcus aureus induced by binding domain rekombinant chimeric protein. *Vaccine*, **32**:3075–3081.
- UZAL FA, VIDAL JE, MCCLANE BA, GURJAR AA (2010). *Clostridium perfringens* toksins involved in mammalian. *veterinary diseases*, **29**: 997–1003.
- VESCHI J, DUTRA I, AALVES M PERRI S, ZAFALON L, FERNANDEZ-MIYAKAWA M (2012). Sorological evaluation of polyvalent commercial vaccines against enterotoxemia in goats. *ARS Vet*, **28**: 222–226.

WILLIAMSON ED, TITBALL RW(1993). A genetically engineered vaccine against the alpha-toksin of *Clostridium perfringens* protects mice against experimental gas gangrene. *Vaccine*, **11**: 1253–1258.

WINKLER L GEHRING C, WENZEL A MULLER S.L, PIEHL C, KRAUSE G, BLASIG, IE, PIONTEK J (2009). Molecular determinants of the interaction between *Clostridium perfringens* enterotoxin fragments and claudin-3. *J. Biol. Chem*, **284**: 18863–18872.

ZARAGOZA NE(2019). Vaccine Production to Protect Animals Against Pathogenic *Clostridia*, *Toksins*, **11**: 525-536.

ZENG J, DENG G, WANG J, ZHOU J, LIU X, XIE Q, WANG Y (2011). Potential protective immunogenicity of rekombinant *clostridium perfringens* fusion toksin in mice, sows and cows. *Vaccine*, **29**: 5459–5466.