



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



KANATLI HAYVANLARDA POTANSİYEL AŞI ADAYI SALMONELLA TYPHIMURIUM MUTANT SUŞUNUN GELİŞTİRİLMESİ

Asena Esra ERDEM

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU**

**ANKARA
2022**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KANATLI HAYVANLARDA POTANSİYEL AŞI ADAYI
SALMONELLA TYPHIMURIUM MUTANT SUŞUNUN
GELİŞTİRİLMESİ**

Asena Esra ERDEM

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU

**Bu tez çalışması, T.C. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Müdürlüğü'nün 21L0239008 numaralı projesi ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2022

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Kanatlı Hayvanlarda Potansiyel Aşı Adayı *Salmonella* Typhimurium Mutant Suşunun Geliştirilmesi” 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: Asena Esra ERDEM

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mikrobiyoloji Anabilim Dalında
Asena Esra ERDEM tarafından hazırlanan “Kanatlı Hayvanlarda Potansiyel Aşı Adayı
Salmonella Typhimurium Mutant Suşunun Geliştirilmesi” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY
ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

	İmza Unvanı Adı ve Soyadı Üniversitesi Jüri Başkanı	
İmza Unvanı Adı ve Soyadı Üniversitesi Raportör		İmza Unvanı Adı ve Soyadı Üniversitesi Üye
İmza Unvanı Adı ve Soyadı Üniversitesi Üye		İmza Unvanı Adı ve Soyadı Üniversitesi Üye

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

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1. <i>Salmonella</i> Hakkında Genel Bilgiler	1
1.2. <i>S. Typhimurium</i> Genel Özellikleri	4
1.3. <i>Salmonella</i> Aşıları	6
1.3.1. İnaktif <i>Salmonella</i> Aşıları	8
1.3.2. Subunit <i>Salmonella</i> Aşıları	8
1.3.3. Canlı Attenüe <i>Salmonella</i> Aşıları	9
1.4. Lambda (λ) Red Rekombinasyon Yöntemi	10
1.5. <i>aroA</i> Geni	15
1.5.1. Şikimat Yolu ve Enzimleri	15
1.5.2. <i>aroA</i> Gen Delesyonunun Bakteri Metabolizması Üzerine Etkileri	17
2. GEREÇ VE YÖNTEM	20
2.1. GEREÇ	20
2.1.1. Kullanılan Bakteri Suşları	20
2.1.2. <i>S. Typhimurium</i> İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri, Biyokimyasal Testler ve Antiserumlar	20
2.1.3. <i>S. Typhimurium</i> Suşlarının Seçiminde Kullanılan Antibiyotikler ve Antibiyogram için Besiyeri	21
2.1.4. Moleküler Analizlerde Kullanılan Malzemeler ve Ekipmanlar	21
2.1.5. Mutasyon Aşamalarında ve Sonrasında Kullanılan Malzeme, Ekipman, Besiyerleri ve Antibiyotik Diskleri	22
2.2. YÖNTEM	23
2.2.1. Tez Çalışmalarında Kullanılacak <i>S. Typhimurium</i> Suşunun Seçilmesi	23
2.2.1.1. <i>S. Typhimurium</i> İzolasyon ve İdentifikasyonu	23
2.2.1.2. <i>S. Typhimurium</i> Suşlarının Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi	24
2.2.1.3. <i>S. Typhimurium</i> Suşlarında <i>aroA</i> Geninin PCR ile Tespiti	24
2.2.2. <i>S. Typhimurium</i> Suşunda <i>aroA</i> Gen Delesyonu ile Mutant Suş Eldesi (RED/ ET Rekombinasyonu)	27
2.2.2.1. Homoloji Kolları ile Çevrili Fonksiyonel Bir Kasetin PCR Tekniği ile	

Oluşturulması	27
2.2.2.2. Red/ET Ekspresyon Plazmidi pRedET(amp) ile Transformasyon Aşaması	29
2.2.2.3. FRT-PGK-gb2-neo-FRT Kasetinin pRedET (amp) İçeren S. Typhimurium Suşuna Transformasyonu	31
2.2.3. Rekombinasyon İşleminin PCR Testi ile Doğrulanması	34
2.2.4. Mutant S. Typhimurium Suşundan pRedET (amp)'in çıkarılması	35
2.2.5. Mutant S. Typhimurium Suşunun Fenotipik Karakterizasyonu	36
2.2.5.1. Mutant Suşun Biyokimyasal Özellikleri ve Koloni Morfolojisinin İncelenmesi	36
2.2.5.2. Mutant Suşun Hareket Özelliklerinin İncelenmesi	37
2.2.5.3. Mutant Suşun Antibiyotik Direnç Profilinin İncelenmesi	38
3. BULGULAR	40
3.1. S. Typhimurium Suşunun Seçim Bulguları	40
3.1.1. S. Typhimurium İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	40
3.1.2. Antibiyotik Direnç Profiline Göre Suş Seçimi Bulguları	41
3.1.3. <i>aroA</i> Geni Varlığına Göre Suş Seçimi Bulguları	41
3.2. S. Typhimurium Suşunda <i>aroA</i> Gen Delesyonunun Gerçekteştirilerek Mutant Suşun Elde Edilmesi (RED/ET Rekombinasyonu) Bulguları	42
3.2.1. Homoloji Kolları ile Çevrili Fonksiyonel Bir Kasetin PCR Tekniği ile Oluşturulmasına Ait Bulgular	42
3.2.2. Red/ET Ekspresyon Plazmidi pRedET (amp) ile Transformasyon Bulguları	43
3.2.3. FRT-PGK-gb2-neo-FRT Kasetinin pRedET (amp) İçeren S. Typhimurium Suşuna Transformasyonu Bulguları	45
3.2.4. Rekombinasyon İşleminin PCR Testi ile Doğrulanmasına Ait Bulgular	46
3.2.5. Mutant S. Typhimurium Suşundan pRedET (amp)'in çıkarılması Bulguları	47
3.2.6. Mutant S. Typhimurium suşunun Fenotipik Karakterizasyon Bulguları	47
3.2.6.1. Mutant Suşun Biyokimyasal Özellikleri ve Koloni Morfolojisi Bulguları	47
3.2.6.2. Mutant Suşun Hareket Özellikleri Bulguları	49
3.2.6.3. Mutant Suşun Antibiyotik Direnç Profili Bulguları	49
4. TARTIşMA	51
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	57
ÖZET	58
SUMMARY	59
KAYNAKLAR	60
ÖZGEçMİş	68

ÖNSÖZ

Salmonella enfeksiyonları tüm dünyada hem insan sağlığını hem de hayvan sağlığını etkileyen en önemli sorunlardan biri olmuştur. Özellikle kanatlı hayvan orijinli gıdalardan bulaşıp insanlarda hastalıklara sebep olan *S. Typhimurium* gibi etkenler yıllardır araştırılmaktadır. Kanatlı hayvanlarda asemptomatik olup insan sağlığını tehlikeye atan bu etkenlere karşı en etkili ve ekonomik mücadele yöntemlerinden biri aşılama değildir. Aşılama sayesinde güvenli gıda üretimi sağlanabilecek ve insanlarda bu etkenlerin sebep olduğu enfeksiyonlar azalacaktır.

Günümüzde çeşitli tekniklerle üretilen aşılar mevcuttur. Bu tekniklerden lambda red rekombinasyon yöntemi ile çeşitli gen delesyonları sağlanabilir ve oluşan rekombinant bakterilerle aşı adayı suşlar oluşturulabilir. Ayrıca yapılan gen delesyonları genlerin işlevlerinin tespit edilebilmesi imkanını da sunar.

Bu tez çalışması kapsamında tüm dünyada önemli halk sağlığı problemlerinden biri olan *S. Typhimurium* suşu kullanılarak Lambda red yöntemiyle *aroA* gen delesyonu yapılmış ve mutant aşı adayı suşlar elde edilmiştir.

Öncelikli alanımın “Aşı Çalışmaları” olduğu ve “YÖK 100/2000 Doktora Projesi” kapsamında T.C. Yükseköğretim Kurulu tarafından desteklenen bu tez çalışması ayrıca “Kanatlı Hayvanlarda Potansiyel Aşı Adayı *Salmonella* Typhimurium Mutant Suşunun Geliştirilmesi” adlı ve “21L0239008” nolu Öncelikli Alan Lisansüstü Tez Projesi (Doktora) kapsamında T.C. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Bu iki kuruma teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca ilgi ve desteklerini esirgemeyen başta danışman hocam sayın Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU olmak üzere, çalışmalarım hakkında fikir ve görüşleriyle yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Mehmet AKAN’a, Mikrobiyoloji

Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hakan YARDIMCI'ya ve Sayın Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK'a, tez döneminde bilgilerinden oldukça faydalandığım çalışma arkadaşım Uzm. Vet. Hekim Tajelser İ. B. ADAM'a ve değerli doktora dönem arkadaşlarıma, tüm hayatım boyunca her alanda desteklerini her zaman yanımda hissettiğim annem Ayşe Gül ERDEM'e, babam Recep ERDEM'e, kardeşim Betül H. ERDEM'e ve bugünleri görmesini hep temenni ettiğim fakat yanımda olamayan sevgili dedem Muzaffer DÜNDAR'a sonsuz teşekkür ederim.



SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
α	Alfa
amp	Ampisilin
β	Beta
BAC	Bakteriyel Yapay Kromozom
bp	Base Pair
C	Sitozin
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
Δ	Genin önüne getirilince delesyonu temsil eder.
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dsDNA	Çift Sarmallı Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EPSPS	5-Enolpiruvilşikimat-3-Fosfat Sentaz
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FLP	Flippase
FRT	Flippase Tanıma Bölgesi
γ	Gama
G	Guanin
g	The Gravitational Force
H ₂ S	Hidrojen Sülfür
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ISO	International Organization for Standardization
iNTS	invaziv Non-Tifoidal <i>Salmonella</i>
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
λ	Lambda
LB	Luria-Bertani

LPS	Lipopolisakkarit
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
ml	Mililitre
ms	Milisaniye
NA	Nutrient Agar
neo	Neomisin
ng	Nanogram
nt	Nükleotid
NTS	Non-Tifoidal <i>Salmonella</i>
O/F	Oksidasyon/Fermentasyon
ONPG	Ortho-Nitrophenyl-β-galactoside
PABA	P-Amino Benzoik Asit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Phe	Fenilalanin
RNase A	Ribonuclease A
rpm	Revolutions per Minute
rRNA	Ribozomal Ribo Nükleik Asit
sn	Saniye
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
SPI	<i>Salmonella</i> Patojenite Adası
ssDNA	Tek Sarmallı Deoksiribo Nükleik Asit
subsp.	Subspecies
T3SS	Tip 3 Salgılama Sistemleri
TBE	Tris-Borate-EDTA
TDA	Triptofan Deaminaz
TNF-α	Tümör Nekrozis Faktör alfa
tRNA	Transfer Ribonükleik Asit
Trp	Triptofan
TSB	Tryptic Soy Broth
TSI	Triple Sugar Iron

Tyr	Tirozin
UV	Ultraviyole
VP	Voges Proskauer
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Lambda red genlerinin çalışma mekanizması	15
Şekil 3.1. <i>S. Typhimurium</i> suşlarının taşıdığı <i>aroA</i> genlerine ait PCR ürünlerinin (297 bp) jel elektroforez görüntüsü (M: DNA ladder, N: Negatif kontrol)	41
Şekil 3.2. FRT-PGK-gb2-neo-FRT kaseti için PCR ürününün boyutunun (1737 bp) jel elektroforez görüntüsü (M: DNA ladder)	42
Şekil 3.3. Transformasyon aşaması sonrasında pRedET (amp) içeren <i>S. Typhimurium</i> suşunun 50 µg/ml ampisilinli LB agarda üremesi	43
Şekil 3.4. Transformasyon sonrasında oluşan kolonilerin ampisilinli LB agarda pasajlanması	44
Şekil 3.5. Saha suşunun ve pRedET (amp) içeren suşun ampisilinli LB agarda karşılaştırılması	44
Şekil 3.6. Rekombinasyon aşaması sonrasında <i>S. Typhimurium</i> suşunun 50 µg/ml kanamisinli LB agarda üremesi	45
Şekil 3.7. Saha suşu ve mutant suşların <i>aroA</i> gen varlığına ait jel elektroforezi görüntüsü (M: DNA ladder; 1, 2, 3 ve 4 numaralı örnekler saha suşu (297 bp); 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 numaralı örnekler mutant suşlar ve N: Negatif kontrol)	46
Şekil 3.8. Saha suşu ve mutant suşların PCR ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü (M: DNA ladder; 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 ve 11 numaralı örnekler mutant (2165 bp); 3, 6, 9 ve 12 numaralı örnekler saha suşu (1712 bp) ve N: Negatif kontrol)	46

Şekil 3.9. Microgen markalı biyokimyasal identifikasyon kitinin A paneli kullanılarak yapılan biyokimyasal testler (A: Mutant suş; B: Saha suşu; 1: Lizin; 2: Ornitin; 3: H₂S; 4: Glukoz; 5: Mannitol; 6: Ksiloz; 7: ONPG; 8: İndol; 9: Üreaz; 10: Voges proskauer; 11: Sitrat; 12: Triptofan deaminaz)

48

Şekil 3.10. Saha suşunun ve mutant suşun TSI besiyerinde görüntüsü (A: Saha suşu; B: Mutant suş)

48

Şekil 3.11. Saha suşunun ve mutant suşun XLD agarda görüntüsü (A: Saha suşu; B: Mutant suş)

49



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Tasarlanan <i>aroA</i> primerlerinin baz dizilimi	25
Çizelge 2.2. <i>S. Typhimurium</i> suşlarında <i>aroA</i> geni varlığının araştırılması için uygulanan amplifikasyon koşulları	26
Çizelge 2.3. Fonksiyonel bir kaset oluşturmak için tasarlanan Oligonükleotidlerin baz dizilimi	27
Çizelge 2.4. FRT-PGK-gb2-neo-FRT kasetini oluşturmak için uygulanan amplifikasyon koşulları	28
Çizelge 2.5. Tasarlanan konfirmasyon primerlerinin baz dizilimi	34
Çizelge 2.6. Mutant suşlarla saha tipi suşu karşılaştırmak için ayarlanan amplifikasyon koşulları	35
Çizelge 2.7. Antibiyogram için kullanılan diskler, firmaları ve konsantrasyonları	39
Çizelge 3.1. MICROGEN GN ID A paneli kullanılarak yapılan biyokimyasal testler ve sonuçları	40
Çizelge 3.2. Saha suşu ve mutant suşun antibiyotik zon çaplarının karşılaştırılması	50

1. GİRİŞ

1.1. *Salmonella* Hakkında Genel Bilgiler

Salmonella ile ilgili ilk çalışma, Eberth tarafından 19. yüzyılda gerçekleştirilmiştir (Jajere, 2019). 1884 yılında Amerikalı bakteriyolog Daniel Elmer Salmon ve Theobald Smith tarafından *Salmonella choleraesuis* ilk kez domuz bağırsağından izole edilmiş ve *Salmonella* adını Daniel Elmer Salmon'dan almıştır (Chiu, 2007 ve Jajere, 2019). Başlangıçta "*Bacillus choleraesuis*" olarak adlandırılan organizma daha sonra Lignieres tarafından "*Salmonella choleraesuis*" olarak değiştirilmiştir. Antiserumlar kullanılarak belirlenen serolojik sınıflandırmayla birçok *Salmonella* serotipi ayırt edilmiştir (Su ve Chiu, 2007).

Salmonella; *Enterobacteriaceae* familyasından, 0,2-1,5 x 2-5 µm boyutlarında, Gram negatif, çomak şeklinde, fakültatif anaerob, spor oluşturmayan, tüm serovarları (*S. Gallinarum* ve *S. Pullorum* hariç) peritrik flagellaları ile aktif hareket edebilen, laktoz, indol ve üreaz negatif, H₂S pozitif, optimum olarak 37°C'de üreyen, hücre içi hayvan ve insan patojenidir (Jajere, 2019; Mastroeni ve ark., 2001; Songer ve Post, 2012 ve Suez ve ark., 2013).

Laboratuvar ortamında *Salmonella* identifikasyonunu sağlamak için çeşitli besiyerleri kullanılabilir. MacConkey agarda *Salmonella* kolonileri laktoz fermentasyonunu sağlayamadıklarından renksiz koloniler şeklinde görülür. Fakat, daha spesifik izolasyon ve identifikasyon için Hektoen enterik (HE) agar, Ksiloz Lisin Deoksikolat (XLD) agar ve *Salmonella Shigella* (SS) agar gibi diğer katı selektif besiyerleri kullanılabilir. Bu genusun karakteristik bir metabolik özelliği olan H₂S üretimi besiyerlerinde siyah merkezli koloniler şeklinde görülmektedir. Ayrıca Kligler's Iron agar (KIA) ve Triple Sugar Iron (TSI) agarda da H₂S ve gaz oluşumu gözlemlenebilir (Fàbrega ve Vila, 2013).

Salmonella, başlangıçta karbon kaynağı olarak sitratı ve nitrojen kaynağı olarak lizini metabolize etmesi ve ayrıca hidrojen sülfür üretebilmesi ile karakterize edilmekteydi. Fakat sadece klasik biyokimyasal testler kullanılarak bu genusun temel üyeleri açık bir şekilde ayırt edilemeyebilir. Modern sınıflandırma ise bunun yerine serolojiye ve moleküler yöntemlere dayanır (Dekker ve Frank, 2015). Mevcut ISO 6579 yöntemi ise birçok *Salmonella* referans merkezi tarafından benimsenmiştir ve diğer *Salmonella* standart tespit yöntemlerine benzemektedir (Jajere, 2019).

Salmonella sınıflandırmasının karmaşık bir geçmişi vardır. Bu durum kısmen, cins içindeki filogenetik ilişkileri karakterize etmek için fenotipik, genotipik ve serolojik yöntemler kullanan birçok araştırmacıdan ve bazen de isimlendirme konusundaki anlaşmazlıklardan kaynaklanmaktadır (Dekker ve Frank, 2015). Günümüzde ise dünyadaki çoğu *Salmonella* referans merkezi, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından tavsiye edilen *Salmonella* isimlendirme sistemini benimsemektedir. Bu sistem, *Salmonella* genusunu 16S rRNA dizi analizindeki farklılıklara göre iki türe ayırır (Jajere, 2019). Buna göre, *Salmonella* genusu, *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* diye bilinen iki türden oluşur. *S. enterica* ise, *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *indica* ve *S. enterica* subsp. *houtenae* diye adlandırılan altı alt gruba ayrılmıştır (Issenhuth- Jeanjean ve ark., 2014). *Salmonella* serotiplerinin çoğunluğu (% 59), *S. enterica* subsp. *enterica*'ya aittir ve bu gruptaki en yaygın olan O antijen serogrupları ise, A, B, C1, C2, D ve E'dir. Bu serogruplardaki suşlar insanlarda ve sıcakkanlı hayvanlarda *Salmonella* infeksiyonlarının yaklaşık % 99' una neden olmaktadır. *S. bongori* ve *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *indica*, *S. enterica* subsp. *houtenae* ise genellikle soğuk kanlı hayvanlardan, çevreden ve nadir olarak da insanlardan izole edilir (Brenner ve ark., 2000).

Kauffman ve White sınıflandırma sistemi, filogeniye dayalı alt türlerin sınıflandırılmasında kullanılan farklı bir sistemdir. Bu sistem, somatik (O), Kapsül (K) ve flagella (H) dahil olmak üzere üç ana antijenik belirleyiciyi baz alarak

Salmonella'yı serotiplere ayırır (Brenner ve ark., 2000 ve Jajere, 2019). Ayrıca *S. enterica* subsp. *enterica*'ya ait serovarlar genellikle serovarin ilk izole edildiği coğrafik yerle ilgili bir adla belirtilirken, serovar ismi italik olmayan Roma harfleriyle ve ilk harfi büyük olacak şekilde yazılır (Issenhuth- Jeanjean ve ark., 2014).

Patogenez açısından *Salmonellalar* iki ana gruba ayrılabilir. Birinci gruptaki serotipler (konakçıya özgü serotipler) tipik olarak sistemik hastalıktan sorumludur ve çok nadiren insanlarda gıda zehirlenmesine sebep olabilirler. Diğer gruptakiler ise tipik olarak gıda zehirlenmesinden sorumludur ve yumurtlama döneminde olan hayvanlarda, çok genç veya yaşlı hayvanlarda veya bazı viral enfeksiyonlardan sonra olduğu gibi yalnızca belirli koşullar altında sistemik hastalıklara sebep olabilirler (Barrow, 2007).

Tifoidal *Salmonella* serovarlari olan *S. enterica* subsp. *enterica* Typhi ve Paratyphi ateş ve karın ağrısıyla karakterize, sistemik enterik ateşe neden olan insan konakçı patojenlerdir. *S. enterica* subsp. *enterica* serovarlari olan Enteritidis ve Typhimurium ise çok çeşitli konakları enfekte edebilen ve invaziv non-tifoidal *Salmonella* (iNTS) hastalıklarından sorumludur (La Rock ve ark., 2015 ve Zhi ve ark., 2019). Bunlar, insanlarda, kümes hayvanlarında, sığırlarda ve domuzlarda akut gastroenterite neden olurlar, ancak bağışıklık sistemi baskılanmış konaklarda, çok genç ve yaşlı bireylerde ve bazen de sağlıklı yetişkin insanlarda veya hayvanlarda bakteriyemiye ve sistemik enfeksiyona neden olabilirler (La Rock ve ark., 2015).

Dünyanın en zararlı gıda kaynaklı patojenlerinden biri olan *Salmonella*, 2500'den fazla tanınmış serovari ile büyük bir taksonomik grup içermekte ve bu serovarlari bazıları insan enfeksiyonlarından sorumlu olmaktadır (Proroga ve ark., 2019). İnsan ve hayvanlarda gastrointestinal hastalık sebebi önemli bir zoonotik patojen olan bu etkenle kontamine olmuş kümes hayvanı ürünleri, insan *Salmonella* enfeksiyonlarının başlıca kaynaklarından birisidir (Desin ve ark., 2013). *Salmonella* etkenlerinin kanatlı ürünlerine bulaşması kanatlı etlerinde dışkı-karkas, yumurtalarda

ise dışkı-kabuk şeklinde olmaktadır (Akan, 2008). *Salmonella* serotiplerinin çoğu birden fazla konakçıya bulaşabilirken, bazıları ise yalnızca tek bir konakçı türünü enfekte etmektedir (Helm ve ark., 2004). Örneğin *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis* gibi birkaç serotip insanlarda enfeksiyona neden olabilirken, kümes hayvanları da bunlar için büyük bir rezervuardır (Dar ve ark., 2017).

Salmonella enfeksiyonlarının patogeneğinde birçok virulans faktörünün çeşitli görevler üstlendiği bildirilmiştir. Bu faktörler arasında kapsül, flagella, plazmidler, adezyon sistemleri ve *Salmonella* patojenite adası (SPI)-1 ve SPI-2 ve diğer SPI'lerde kodlanan tip 3 salgılama sistemleri (T3SS) yer almaktadır (Jajere, 2019). *Salmonella* patogeneğinde önemli bir özellik, fagositik olmayan hücrelerin invazyonudur (Sánchez-Vargas ve ark., 2011). Enfeksiyona neden olma yeteneği, *Salmonella* kromozomu üzerinde kodlanmış bir dizi virulans faktörün varlığından kaynaklanmaktadır (Prajapat ve Saini, 2012). İnvazyona dahil olan ve hücre içi hayatta kalmak için gerekli olan virulans genleri, *Salmonella* patojenite adaları (SPI'ler) olarak adlandırılan büyük kromozomal DNA bölgelerinde kümelenir. (Banda ve ark., 2018 ve Sánchez-Vargas ve ark., 2011). SPI'ler, operon olarak bilinen kompakt ve farklı bir genetik birim olarak işlev gören virulans genlerini taşıyan kromozomal bölgelerdir. Bu bölgeler, kromozomun geri kalanından, DNA'nın diğer bölümleriyle karşılaştırıldığında daha fazla miktarda G + C (guanin ve sitozin) varlığıyla farklı bir yapı gösterir (dos Santos ve ark., 2018).

1.2. *S. Typhimurium* Genel Özellikleri

Salmonella enterica, insanlarda tifoid ateşe neden olan tifo serovarları (Typhi ve Paratyphi) ve daha geniş bir konakçı aralığına sahip ve sıklıkla zoonotik etkenlerden oluşan non-tifoidal *Salmonella* (NTS) serovarlarına ayrılır (Gordon, 2011). iNTS hastalığı ise, önemli bir halk sağlığı sorunudur ve bununla ilgili en yaygın olarak ilişkilendirilen *S. enterica* serovarları *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* ve *S. Dublin*'dir (Balasubramanian ve ark., 2019).

S. Typhimurium, intestinal epitel hücreleri enfekte edebilen ve intestinal mukozanın yangısına neden olabilen bir Gram negatif enterik patojendir (Akbar ve ark., 2003). Konakçı hücrelerde invazyon ve vücutta yayılma kabiliyeti, virulans genleri ile yakından ilgilidir. *S. Typhimurium* ve *S. Typhi*, DNA'larında bulunan genlerin yaklaşık % 90'ını paylaşır (Konjugasyon, transformasyon ve transdüksiyon yoluyla). Kalan % 10'u ise, enfeksiyona katkıda bulunan ve bu serotipin patojenite derecesini belirleyen yapılar, ürünler ve stratejiler olarak tanımlanan virulans faktörleri kodlayan genleri içerir. *S. Typhimurium*'da, bu genlerin çoğu *Salmonella* Patojenite Adalarında (SPI) bulunur. Fimbria ve flagellayı kodlayan bir kısım gen ise kromozomun diğer kısımlarında bulunmaktadır. *S. Typhimurium* ve *S. Typhi*'deki bugüne kadar tanımlanan beşer patojenite adası ılımlı (temperate) bakteriyofajların yerleşmesi için temel nokta olan tRNA genlerinin içinde veya yanındadır (Songer ve Post, 2012). Bunlardan SPI-1 ve SPI-2 en tanınmış ve çalışılmış olanlarıdır (dos Santos ve ark., 2018).

S. Typhimurium, gıdadan, insan ve hayvan klinik vakalarından sıklıkla izole edilen serotiplerden biridir. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 1,4, [5], 12: i: - (STM), *fljB* kodlu ikinci faz H antijeninden yoksun bir monofazik *S. Typhimurium* serotipidir. Bu serotip, birçok ülkede insan enfeksiyonlarının ortaya çıkış nedeni olarak kabul edilmiştir. *S. Typhimurium*, kümes hayvanları ve ruminantlar dahil geniş bir konakçı dağılımına sahipken, hayvanlarda tespit edilen monofazik *S. Typhimurium* izolatlarının çoğu domuzlara aittir. Önemli olarak, *grvA* geni sadece *S. Typhimurium* suşlarında bulunurken, *sopE*, *sodC*, *gtgB* ve *gipA* esas olarak *S. 1,4, [5], 12: i: -* izolatlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farkla tespit edilmiştir (Proroga ve ark., 2019).

Dünya kanatlı ürünlerinin yaklaşık yüzde yirmi kadarı *Salmonella* ile kontamine edilmiştir ve biyofilm oluşumu yoluyla insan ve hayvan çevrelerinde ve tesislerde uzun süre kalabilmektedir. İnsanlarda kanatlı ürünleri tüketiminden kaynaklanan ve gıda zehirlenmelerine sebep olan *Salmonella* salgınlarının çoğunda Enteritidis ve *Typhimurium* serovarları izole edilmiştir (Afshari ve ark., 2018 ve Pesingi ve ark., 2017). Her yerde bulunan *S. Typhimurium*, insanları ve hayvanları

etkileyen, en sık bildirilen NTS serovarlarından biri olmasının yanında 2001'den 2007 yılına kadar Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, Avustralya ve Yeni Zelanda'da en yaygın olanıdır (Almeida ve ark., 2018 ve Herrero-Fresno ve ark., 2014) Aynı dönemde, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* serovarından sonra Afrika, Asya, Avrupa ve Latin Amerika'daki en yaygın olan ikinci serovar olarak görülmüştür (Almeida ve ark., 2018).

Çevresel ortamlara ve farklı hayvan türlerinin bağırsaklarına adapte olmuş 200'den fazla farklı *S. Typhimurium* suşu tanımlanmıştır. Bu suşların genom içeriği oldukça benzerdir. *S. Typhimurium*, *Salmonella* patojenitesinin araştırılmasında ve aşı geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmıştır (Luo ve ark., 2012).

1.3. *Salmonella* Aşıları

Salmonella, dünya çapında hem insanlarda hem de hayvanlarda önemli derecede mortalite ve morbiditeye neden olan büyük bir sosyo-ekonomik tehdittir (Dar ve ark., 2018). Birçok ülkede, epidemiyolojik kayıtlarda bakteriyel gıda kaynaklı enfeksiyonların önde gelen nedenlerinden biri olan NTS serovarları, halk sağlığı yönünden önemli zoonotik patojenlerdir (Kapperud ve ark., 1998 ve Zhao ve ark., 2017). *Salmonella*'nın doğal ortamda yaygın şekilde bulunması ve global gıda zincirindeki prevalansı, ekonomi ve halk sağlığıyla ilgili kaygıları uyandırmaktadır (Kapperud ve ark., 1998). Artan halk sağlığı endişesi nedeniyle, *Salmonella*'nın gıda kaynaklı bulaşmasının önlenmesi, kanatlı hayvancılık sektörü için en önemli konulardan biri olmaya devam etmektedir (Dar ve ark., 2018).

Kanatlı hayvanlarda kontrol önemli bir sorun haline gelmiştir ve sonradan kazanılmış veya doğuştan gelen bağışıklık, bu sorunun önüne geçmenin bir yolu olarak görülmektedir (Barrow, 2007). Özellikle kanatlı sürülerinde konakçıya adapte olmayan *Salmonella* türlerinin yaygınlığını kontrol etmek için kesinlikle etkili önlemlere ihtiyaç vardır (Desin ve ark., 2013).

Gıda endüstrisi ve zoonotik enfeksiyonlar insanlarda *Salmonella* enfeksiyonlarının ana kaynağını oluşturduğundan, *Salmonella*'ya karşı hayvan aşıları, bu mikroorganizmaların hayvanlardan insanlara bulaşmasını önlemek veya sınırlamak için etkili bir önlem olabilir. Ayrıca, bu aşılar, insanlarda invaziv *Salmonella* enfeksiyonunun tedavisinde özel bir engel olan, çoklu ilaca dirençli *Salmonella* suşları ile hayvan kolonizasyonunun önlenmesine de yardımcı olabilir (Sánchez-Vargas ve ark., 2011).

Salmonella ile enfekte olan hastalar genellikle florokinolonlar, trimetoprim-sülfametoksazol, ampisilin veya geniş bir etki spektrumuna sahip sefalosporinlerden oluşan antibiyotiklerle tedavi edilmektedir. Etkinliklerinin iyi olmasına rağmen, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Typhi* ve *S. Paratyphi* için çoklu ilaç direncinin ortaya çıkması nedeniyle kullanımlarında sınırlamaların arttığı bilinmektedir. Bundan dolayı da aşılama gerekli ve geçerli bir uygulama olarak kabul edilmektedir (Gayet ve ark., 2017).

Kümes hayvanlarının aşılanması, kapsamlı bir *Salmonella* kontrol programının bir parçası olarak diğer kontrol önlemleriyle birlikte, kanatlı sürülerinde *Salmonella* prevalansının azaltılmasında önemli bir strateji olup, gıda kaynaklı *Salmonella* enfeksiyonlarının azaltılmasına ve daha güvenli gıda tedarikine yol açmaktadır. Bu durum ise insan *Salmonella* enfeksiyonlarının daha düşük oranda görülmelerini sağlayacaktır (Desin ve ark., 2013). Aşı ile profilaktik korunma bulaşıcı hastalıklara karşı en uygun maliyetli önlem olduğundan, uygun aşılarda geliştirilmesi ve bağışıklık kazandırma stratejileri, çağdaş biyomedikal araştırmaların en zorlu konularından biridir (Felgner ve ark., 2016).

Etkili bir *Salmonella* aşısında; mukozal ve sistemik enfeksiyonlara karşı koruma sağlama, aşının hem insanlar hem de hayvanlar için avirulent olması, saçılmayı ve yumurta kontaminasyonunu azaltmak için bağırsak kolonizasyonunu azaltması, düşük uygulama maliyeti gibi kriterler aranır (Wolfenden ve ark., 2010). Test edilen *Salmonella* aşıları; inaktif, canlı-attenüe ve subunit aşılar olarak üç kategoriye

ayrılmıştır. İdeal olarak aşı, güvenli, çapraz koruyucu, iyi tanımlanmış ve tüm türlerde *Salmonella* enfeksiyonunun kontrolü için önemli olduğu düşünülen hücresel bağışıklığa neden olmalıdır (Desin ve ark., 2013).

1.3.1. İnaktif *Salmonella* Aşıları

İnaktif bakteri aşıları, ısı, formalin, gibi farklı yöntemlerle inaktive edilmiş bakterilerden oluşur. İnaktive edilen aşılarının çoğu kas içinden veya deri altından uygulanır ve en az iki kez aşılanma gerektirir. Avantajı risk oluşturabilecek canlı bir organizma içermemesi, dezavantajı ise konakçı tarafından kısa süre içinde elimine edilebilir olması ve adjuvantların kullanımının gerekli olmasıdır (Desin ve ark., 2013).

Salenvac® (Merck, NJ, ABD) ve Layermune SE® (Ceva Biomune, KS, ABD) gibi inaktif *S. Enteritidis* aşı suşları dünyanın birçok bölgesinde kullanılmıştır (Desin ve ark., 2013).

1.3.2. Subunit *Salmonella* Aşıları

Subunit aşılar ya tek bir antijenden ya da çok sayıda tanımlanmış antijenden (genelde proteinlerden) oluşur. Bu bileşenler genellikle bakteri hücrelerinin yüzeyinde bulunur ve önemli virulans özelliklerine sahiptir. Bu aşı türü inaktif aşılar gibi canlı organizmalarla ilişkili düzenleyici ve biyolojik komplikasyonlardan yoksundur (Desin ve ark., 2013).

Salmonella'da flagellar filamenti oluşturan önemli bir yüzey yapısı olan FliC proteininin bir kısmını içeren bir peptit, tavukları immunize etmek için subunit aşı olarak kullanılmıştır (Desin ve ark., 2013 ve Toyota-Hanatani ve ark., 2009).

1.3.3. Canlı Attenüe *Salmonella* Aşıları

Canlı bakteriyel aşıların bağışıklık kazandırmadaki diğer yaklaşımlara göre birçok avantajı vardır: bakterilerin *in-vivo* yayılması basittir; ağız yoluyla uygulanabilir, böylece steril iğne enjeksiyonları ve özel olarak eğitilmiş personel ihtiyacından kaçınılabilir ve bakteriler liyofilize halde taşınabilecekleri için soğuk zincirlere ihtiyaç duymazlar (Felgner ve ark., 2016).

Canlı attenüe *Salmonella* aşı suşları, konakçı organizmada hayatta kalmak için gerekli olan gen mutasyonları veya delesyonları içerebilir. Bu suşların kullanımıyla, aşıların herhangi bir yaştaki kanatlılara içme suyu ile oral yoldan verilebilmesi ve hem antikora dayalı hem de hücrel immun yanıt aktivasyonu yoluyla koruyucu immunitenin indüklenmesi dahil çeşitli avantajlar sağlar (Desin ve ark., 2013).

Salmonella onlarca yıldır canlı aşı adayları olarak düşünülmüştür (Felgner ve ark., 2016). Genetik olarak tanımlanmış *S. Typhimurium* aşı suşlarının en iyi örnekleri *aroA* veya *aroCD*, *crp* / *cya*, *phoPQ*, *ompR* ve *htrA* mutantlarını içerir (Valentine ve ark., 1998). Ayrıca kanatlı üreticilerine sunulan çeşitli *Salmonella* canlı aşılarının çoğu lisanslı ve ticari olarak temin edilebilirdir. *S. Gallinarum* 9R suşu (Nobilis® SG 9R) Avrupa'da *S. Gallinarum* ve *S. Enteritidis*'e karşı kullanılabilen iyi bilinen bir canlı aşı suşudur (Desin ve ark., 2013). Avustralya'da, Bioproperties VaxSafe™ STM1 suşu, lisanslı ve ticari olarak uygun *S. Typhimurium* aşısıdır. Bu aşı canlı attenüe bir *aroA* delesyon mutantıdır (Howard ve ark., 2018). Ayrıca canlı attenüe bir adenin-histidin oksotropik *S. Enteritidis* suşunun (Gallivac® Se), üç aşılamadan sonra koruyuculuğu gösterilmiştir (Desin ve ark., 2013 ve Springer ve ark. 2011). Megan VAC ise Amerika Birleşik Devletleri'nde kümes hayvanları için lisanslanan ilk canlı aşıdır ve bir *S. Typhimurium* $\Delta cya \Delta crp$ mutantıdır (Dórea ve ark., 2010).

Kanatlı hayvan sağlığı için çeşitli şirketler geleceğin aşı teknolojileri olarak DNA aşıları dışında bakteriyel ve viral vektörlü aşılar yönelmişlerdir. Ekspresyonu güçlü bir ökaryotik promotörün kontrolü altında aşı antijenlerini kodlayan bir

bakteriyel plazmitten oluşan DNA aşılılarıyla ilgili olarak *S. Typhimurium*'a karşı SopB'nin ve özellikle SopB'nin son 261 amino asidinin DNA aşısı adayı olarak tanımlanması bu yönde önemli bir adımdır (Desin ve ark., 2013; Nagarajan ve ark., 2009 ve Saade ve Petrovsky, 2012).

Fakültatif intraselüler patojenlerin çoğu, yeni aşılama stratejileri için canlı taşıyıcılar olarak kullanılmıştır. *Salmonella* bazlı olarak kullanılan aşılar, düşük üretim maliyeti, oral uygulama, genetik stabilite ve güvenlik dahil olmak üzere avantajları vardır. Canlı attenüe *Salmonella*'yı aşı taşıyıcıları olarak kullanan yeni stratejilerin çoğu, hayvan modellerinde umut verici sonuçlara yol açmıştır (Hegazy ve Hensel, 2012).

Hedef olarak belirlenmiş bazı genlerin çıkarılmasını sağlamak, araştırmacılar tarafından, aşı üretimi, gen işlevinin gösterilmesi ve protein yapılarının veya ekspresyonun daha iyi anlaşılması gibi birçok amaç için kullanılır. Lambda Red sistemi de bu gen çıkarma yöntemlerinden birisidir (Azari ve ark., 2015).

1.4. Lambda (λ) Red Rekombinasyon Yöntemi

Bakteriyofaj lambda (λ) rekombinasyon proteinlerini ve kısa DNA homolojilerini kullanan *in-vivo* yöntem “recombineering” (recombination-mediated genetic engineering) olarak adlandırılmıştır (Sawitzke ark., 2007). Bu yöntem, restriksiyon enzimlerinin ve DNA ligazın *in-vitro* kullanımı olmadan DNA moleküllerini *in-vivo* olarak tasarlamının basit ve etkili bir yoludur. Recombineering, kısa (50 bp civarı) homoloji segmentleri arasındaki homolog rekombinasyonu katalize etmede özellikle etkili olan faj λ 'nın Red proteinleri veya *E. coli*'nin Rec profajından RecET olmak üzere fajdan türetilmiş proteinler tarafından gerçekleştirilir (Datta ve ark., 2008).

Red rekombinasyon işlevleri, λ pL operonunda üç bitişik gen, *gam*, *bet* ve *exo* tarafından kodlanır. RecET işlevleri ise, birçok *E. coli* K-12 suşunun genomunda bulunan kriptik lambdoid Rac profajı üzerinde bulunan iki bitişik gen olan *recE* ve *recT* tarafından kodlanır. Çeşitli çalışmalara göre, Exo/Beta ve RecE/RecT protein çiftleri, dizi düzeyinde ilişkili olmasa da işlevsel olarak eşdeğerdir (Datta ve ark., 2008). Faj λ 'dan λ Red ve *E. coli* Rac profaj'dan RecET, yaygın olarak bulunan iki faj bazlı homolog rekombinasyon sistemidir. Her iki faj tabanlı sistemde, lineer çift sarmallı DNA'nın (dsDNA) rekombinasyonu, 30 bp kadar az homoloji gerektirir (Karinsey, 2007; Yu ve ark., 2000 ve Zhang ve ark., 1998).

Genetik rekombinasyon, genlerin veya gen parçalarının yeniden düzenlenmesi olarak tanımlanır (Hillyar, 2012). *Saccharomyces cerevisiae* mayasında, kısa dizi homoloji uzantılarının varlığında DNA fragmanlarının kromozomla rekombinasyona uğrama yeteneği ise, gen değiştirme ve modifikasyon için PCR tabanlı yöntemlerin geliştirilmesine yol açmıştır (Baudin ve ark., 1993 ve Uzzau ve ark., 2001).

Homolog rekombinasyon *E. coli*'de çeşitli yaklaşımlarda kullanılmıştır. Bunlar, bağımsız replikonlar arasındaki, örneğin bir plazmit ile *E. coli* genomu veya bir BAC arasındaki rekombinasyonu içerir (Zhang ve ark., 1998). Homolog rekombinasyon reaksiyonunda RecE ve RecT'yi eksprese eden bir plazmit kullanılarak recBC suşuna aktarılmış ve RecE ve RecT'nin çok önemli bir rekombinasyon reaksiyonuna aracılık ettiği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 1998). Buna göre ET klonlama, recE ve recT proteinlerinin aracılık ettiği homolog rekombinasyona dayanan bir yöntemdir (Muyrers ve ark., 1999 ve Zhang ve ark., 1998).

ET rekombinasyonu, *E. coli*'de genetik değişiklikler yapmanın bir yoludur ve BAC'ler gibi büyük DNA moleküllerini restriksiyon alanı gereksinimleri olmaksızın tasarlamak için geliştirilmiştir (Angrand ve ark., 1999).

Red α /Red β ET klonlama reaksiyonlarında test edilmiş ve RecE/RecT ile benzer verimlilikleri gözlemlenmiştir. Buna göre, recET ve Red faj operonlarının benzer

şekilde bir 5'→3' eksonükleaz ve bir bağlanma proteinini birleştirdiği görülmektedir. Yani RecE yolu, λ fajının Red yoluna benzerdir (Zhang ve ark., 1998).

Faj lambdadan türetilen Red rekombinasyon sistemi ise, ilgili PCR primerlerinin hedeflenen gen veya genlere homoloji sağladığı *E. coli*'de genetik değişiklikler yapmak için kullanılan basit ve oldukça uygun bir yöntemdir (Datsenko ve Wanner, 2000 ve Mosberg ve ark., 2010). Aynı zamanda kromozomal, plazmit veya BAC üzerinde silme, ekleme ve nokta mutasyonları oluşturmak için çok basit bir yol sağlar (Mosberg ve ark., 2010). Bu yöntemde rekombinasyon, kolayca çıkarılabilen, düşük kopya numaralı bir plazmid üzerinde indüklenebilir bir promotörün kontrolü altında sentezlenen faj λ Red rekombinazı gerektirir (Datsenko ve Wanner, 2000).

Bakteriyofaj lambdanın Red rekombinasyon sistemi, çeşitli bakteri ve mantarlarda kromozomal genleri etkisiz hale getirmek için kullanılmıştır (Lesic ve Rahme, 2008). Bölgeye özgü kromozomal gen nakavtları, faj rekombinasyon proteinlerini eksprese eden hücrelere kısa homolog yan DNA dizileri ile antibiyotiğe dirençli genler gibi seçilebilir belirteçler dahil edilerek ve uygun ortam üzerinde seçim yapılarak kolayca elde edilir (Datsenko ve Wanner, 2000 ve Karlinsey, 2007). Ayrıca, faj aracılı rekombinasyon ile gen delesyonlarının, bölgeye özgü mutasyonların ve gen füzyonlarının yapımı, çeşitli DNA klonlama adımlarına olan ihtiyacı ortadan kaldırarak *in-vivo* olarak gerçekleşir (Karlinsey, 2007). Prosedür, aşamalı PCR protokolü ile elde edilen ve hedef lokusa homolog bir bölge ile çevrili bir antibiyotik kasetininin lambda Red rekombinasyon sistemini eksprese eden bir suşa elektroporasyonundan oluşur (Lesic ve Rahme, 2008).

λ Red rekombinasyon sisteminin kullanılması, PCR tarafından oluşturulan fragmanların dizili genomlarda spesifik kromozomal lokasyonlara hedeflenmesini sağlar (Karlinsey, 2007). Bu yaklaşımın yararlarını gösterebilmek için, inaktive edilecek gene bitişik bölgelere homolog olan primerler ve FRT (FLP tanıma bölgesi) bölgelerince çevrelenen antibiyotik direnç genleri taşıyan template plazmidler kullanarak PCR ürünleri oluşturulur. İlgili PCR ürünleri kullanılarak kromozomal

gen veya genlerde bozulma yapılır. Mutant genler veya operonlar, PCR ürünü DNA'nın bir Red ekspresyon plazmidini taşıyan bakterilere sokulduktan sonra antibiyotiğe dirençli koloniler olarak izole edilir. Bu prosedür, özellikle *E. coli* ve diğer bakterilerin genom analizinde geniş ölçüde kullanılabilir, çünkü prosedür saha tipi hücrelerde uygulanabilir (Datsenko ve Wanner, 2000).

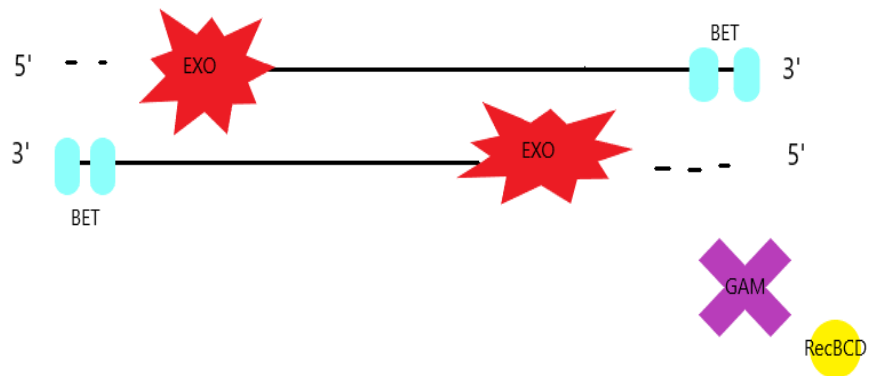
Buradaki temel strateji, bir kromozomal diziyi, kısa homoloji uzantılarına sahip primerler kullanılarak PCR ile üretilen seçilebilir bir antibiyotik direnç geniyle değiştirmektir. Bu ise yan homojilerde Red aracılı rekombinasyon ile başlar. Seçimden sonra direnç geni, direnç genini çevreleyen doğrudan tekrarlanan FRT bölgeleri üzerinde etkili olan FLP rekombinazı eksprese eden yardımcı bir plazmid kullanılarak da çıkarılabilir. Red ve FLP yardımcı plazmitleri, sıcaklığa duyarlı oldukları için uygun sıcaklıkta inkübasyonla çıkarılabilir (Datsenko ve Wanner, 2000).

Faj bazlı bu sistemler, kromozomal genetik mühendisliği için çok yönlü ve alternatif bir yöntem olarak ortaya çıkmaktadır. Bu yöntem, hücrede homolog rekombinasyona aracılık etmek için lineer DNA fragmanlarının 5' uçlarında sadece kısa homoloji bölgeleri gerektiren faj rekombinasyon proteinlerini kullanır. Bu işlem, zaman alıcı *in-vitro* DNA klonlamasını önleyerek kromozomal genetik mühendisliğini kolaylaştırır (Karlinsky, 2007).

Red sistemi, ürünleri sırasıyla Gam, Bet ve Exo olarak adlandırılan, γ , β ve α olmak üzere üç gen içerir (Datsenko ve Wanner, 2000 ve Murphy, 1998). Red genleri arasında *exo* (veya *red α*), *bet* (veya *red β* veya basitçe β) ve *gam* (veya γ) bulunur. *Exo*, *bet* ve *gam* genleri sırasıyla 24 kDa eksonükleaz Exo, 28 kDa ssDNA bağlayıcı protein Bet ve 16 kDa polipeptit Gam'ı kodlar (Hillyar, 2012). λ Red genleri hücrelerde lineer dsDNA'nın faj bağımlı homolog rekombinasyonunu desteklemek için gereken genlerdir (Karlinsky, 2007 ve Yu ve ark., 2000).

Exo, çift sarmallı dsDNA üzerinde işlemsel olarak hareket eden bir 5'-3' eksonükleazdır. Bet, tamamlayıcı ssDNA zincirlerini bağlayabilen tek sarmallı bir DNA (ssDNA) bağlayıcı (annealing) proteinidir. Red rekombinasyon işlevlerine, konakçı RecBCD eksonükleazını inhibe eden Gam yardımcı olur. RecBCD, *E. coli*'nin ana rekombinasyon sistemindeki anahtar enzimlerden biri olsa da, aktivasyonu, saha tipi lambda DNA'sında bulunmayan Chi bölgelerinin (5'GCTGGTGG3') varlığına bağlıdır (Murphy, 1998). Bet ve Exo birlikte yaklaşık 50 bazın kısa homolojileri arasındaki rekombinasyonu katalize ederler (Thomason ve ark., 2007). Exo ve Bet lineer DNA'nın uçlarında çok kısa homolojiler kullanabilir. Ancak homoloji çok kısaysa (<40 nt) ve eşleştirme verimli değilse, Bet bağlı kalabilir ve verimsiz rekombinasyona neden olabilir (Yu ve ark., 2000).

Lambda eksonükleaz (Exo), dsDNA'yı 5'-3' yönünde bozarak girintili bölgelerde tek iplikli DNA bırakır. Beta, Exo tarafından üretilen tek zincirli bölgelere bağlanır ve homolog genomik hedef bölgeye bağlanmayı teşvik ederek rekombinasyonu kolaylaştırır (Mosberg ve ark., 2010). Gam'ın rolü, konakçı RecBCD eksonükleaz V'yi inhibe etmek, yani λ faj DNA'sının RecBCD tarafından teşvik edilen sindirimini önlemektir, böylece Exo ve Bet, rekombinasyonu başlatmak için DNA uçlarına erişebilir (Datsenko ve Wanner, 2000 ve Murphy, 1998). Bu durum Şekil 1.1'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Lambda red genlerinin çalışma mekanizması.

Datsenko ve Wanner (2000), Red genlerini düşük kopya sayılı bir plazmide klonlamıştır. Elde edilen mutantlardan kolay çıkarılmasını sağlamak için sıcaklığa duyarlı replikasyonu gösteren bir vektör kullanmıştır. Ayrıca PKD20 ve pKD46 plazmidlerinin, indükleyici olmayan koşullar altında istenmeyen rekombinasyon olaylarından kaçınmak için iyi düzenlenmiş bir promotörün kontrolü altında Red sistemini eksprese ettiği sonucuna varmışlardır.

pKD46, rekombinasyonu kolaylaştırmak için bir arabinoz ile indüklenebilir promotörden lambda red rekombinasyon proteinlerini eksprese etmek için yaygın olarak kullanılır. Ayrıca bu plazmid ampisiline dirençli, sıcaklığa duyarlıdır (Datsenko ve Wanner, 2000 ve Quick ve ark., 2010).

1.5. *aroA* Geni

1.5.1. Şikimat Yolu ve Enzimleri

Aromatik amino asitler, ubikinon ve K vitamini gibi aromatik bileşikler, bir organizmanın metabolizması için önemli ön koşullardır. Birçok organizma bu aromatik metabolitleri şikimat yolu ile sentezleyebilir (Mir ve ark., 2015). Aromatik amino asitler olan fenilalanin, tirozin ve triptofan üretimine götüren ortak yol olan şikimat yolu, hayvanlarda bulunmayan, sadece mikroorganizmalarda ve bitkilerde bulunan metabolizmanın bir parçasını oluşturur (Herrmann ve Weaver, 1999). Şikimat yolu memelilerde bulunmadığından, bu yolun enzimleri, potansiyel antimikrobiyal hedefler olarak büyük ilgi görmüştür (Priestman ve ark., 2005). Bu nedenle yol, herbisitler, antibiyotikler ve canlı aşılar için önemli bir hedeftir (Herrmann ve Weaver, 1999).

Bakterilerde, aromatik amino asitlerin sentezi, pre-korizat yol olarak bilinen yedi enzimatik reaksiyondan oluşan ortak, doğrusal bir biyokimyasal yolla başlar

(McArthur ve ark., 2003). Bu yol, fosfoenolpiruvat ve eritroz 4 fosfatı yedi enzimatik olarak katalize edilmiş adım yoluyla korizmata dönüştürür ve korizmat, çeşitli aromatik bileşiklerin sentezi için bir öncü görevi görür. Bu enzimlerin mikroorganizmaların yaşayabilirliği için hayati bir rol oynadığı gösterilmiştir (Mir ve ark., 2015).

Şikimat yolunun yedi enzimi, başta *E. coli* ve *S. Typhimurium* olmak üzere bakteriler üzerinde yapılan çalışmalarla keşfedildi (Herrmann ve Weaver, 1999). 5-enolpiruvilşikimat-3-fosfat sentaz (EPSPS) enzimi, şikimat yolunun altıncı enzimidir. Bu enzim bitkilerde, mantarlarda ve apicomplexan parazitleri de dahil olmak üzere mikroorganizmalarda aromatik amino asitlerin ve birçok aromatik metabolitin sentezi için gereklidir (Priestman ve ark., 2005).

aroA lokusu tarafından kodlanan EPSPS enzimi, bakterilerde glifosat inhibisyonunun hedef bölgesidir (Stalker ve ark., 1985). Glifosat, yabani ot kontrolünde güvenli bir herbisit olarak kullanılır ve mikroorganizmalarda ve bitkilerde aromatik amino asit biyosentetik yolunda anahtar bir enzim olan EPSPS'yi inhibe eder (He ve ark., 2001 ve Sun ve ark., 2005).

Çeşitli organizmalardan farklı *aroA* enzimleri (EPSPS) iki sınıfa ayrılmıştır (Yı ve ark., 2016). Sınıf I enzimler, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Aeromonas salmonicida*, *Petunia petunia* ve *Arabidopsis thaliana*, *Proteus mirabilis* ve *Klebsiella pneumoniae* dahil tüm mikroorganizma ve bitkilerde bulunur (He ve ark., 2001; Liu ve Cao, 2018 ve Sun ve ark., 2005). Sınıf I enzimler doğal olarak glifosata duyarlıdır (Sun ve ark., 2005). Sınıf II *aroA* enzimlerinin ise, sınıf I enzimleriyle %30'dan az dizi benzerliği vardır ve ancak yüksek bir glifosat konsantrasyonunda aktivitelerini gerçekleştirebilirler (Yı ve ark., 2016). Sınıf II enzimleri, *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium tumefaciens* CP4 ve *Pseudomonas* sp. suşu PG2982 gibi mikroorganizmalardan tanımlanmıştır. (He ve ark., 2001 ve Sun ve ark., 2005). Genel olarak, sınıf I EPSPS dizileri içeren türler glifosata duyarlıyken,

sınıf II dizileri olan türler dirençli olma eğilimindedir. Sınıf II, transgenik bitkilerde glifosat toleransını arttırmak için kullanılmıştır (Liu ve Cao, 2018).

Aromatik (aro) yolun genlerinde hasar olan *Salmonella* suşlarının, memeli dokularında eksik olan p-aminobenzoik asit (PABA) gereksinimleri nedeniyle zayıflatıldığına inanılmaktadır ve bu suşlar, öldürücü organizmanın tehdidine karşı koruyucu bağışıklık sağlar (McKelvie ve ark., 2008).

1.5.2. *aroA* Gen Delesyonunun Bakteri Metabolizması Üzerine Etkileri

aroA geni, memeli konakçılarda serbestçe bulunmayan aromatik amino asitlerin sentezinde ve bakterinin virulans ve immunojenitesi üzerinde etkin rol oynamaktadır. Bu gen aromatik amino asitlerin biyosentezine katılan EPSPS'yi kodlar ve glikolizi doğrudan aromatik amino asitlerin sentezine bağlayan şikimat yolun bir parçasıdır. Şikimat yolunun *aroA*'nın silinmesiyle kesilmesi, yağ asitleri ve amino asit metabolizmaları için *Salmonella*'nın metabolizması üzerinde geniş bir etkiye sahiptir (Felgner ve ark., 2016).

aroA geninin işlev bozukluğu, bakterinin 4-aminobenzoik asit, 2,3 dihidroksibenzoik asit ve aromatik amino asitler; Fenilalanin (Phe), Tirozin (Tyr) ve Triptofan (Trp) için oksotrofisine yol açar. Bu oksotrofi ise attenüe bakteriyel aşılarda geliştirilmesinde kullanılmıştır (Vivas ve ark., 2004). Oksotrofik mutantların oluşturulması, canlı aşı potansiyeli sergileyen rasyonel olarak zayıflatılmış suşların üretilmesi için popüler bir yöntem olmuştur. *aroA*'nın mutasyonu yoluyla pre-korizmat yolunun bozulması, bir dizi rasyonel attenüasyon çalışmada ortak bir strateji olmuştur (McArthur ve ark., 2003).

Yapılan çalışmalarda *aroA* gen delesyonunun mikroorganizmaları metabolik olarak attenüe ettiğini ve ayrıca bakteriyel fizyoloji, virulans ve immünojenite üzerinde büyük ölçüde pleiotropik etkilere neden olduğu gösterilmiştir. Bu delesyon

aromatik amino asitler için *Salmonella*yı okzotrofik hale getirir. Ayrıca, bu genin pleiotropik özelliğinin olması sayesinde buradaki bir mutasyon bakterinin birçok özelliğini değiştirir. *aroA* delesyonu yapılmış *Salmonella* suşlarının oldukça zayıflatıldığı ve uygun vektör sistemleri olduğu düşünülmektedir. Buna göre, *aroA* mutasyonunun genellikle güvenli olduğu ve bakteriyel suşlar için evrensel olarak kullanıldığı kabul edilmiştir. Yapılan çalışma sonuçları, *aroA* delesyonu yapılan *Salmonella* suşlarının immünojenitesinin, bakteriyel aşı taşıyıcılarının ve immünoterapinin optimize edilmesi için avantajlı olabileceğini göstermektedir. *aroA* delesyonu, glikolizisi aromatik amino asit sentezine bağlayan yolu keser. Bu kesinti, bakterilerde ozmotik stres yaratabilecek ve sırayla tüm gözlemlenen değişiklikleri ortaya çıkarabilecek negatif feedback ile hücre içi piruvat birikimine yol açar. Bu durum bakterinin büyümesini yüksek oranda zayıflatır. Bakteri konakçıda patojenik olmadan fakat bir bağışıklık tepkisi meydana getirecek kadar uzun süre kalır, yani canlı aşı olmak için ideal bir aday haline gelir (Felgner ve ark., 2016 ve Mombarg ve ark., 2014).

Aro genlerindeki mutasyonların aromatik amino asitlerde oksotrofiye sebep olması durumu *S. enterica*'nın aro mutantlarının attenüasyonunun ve evcil hayvanların oral yolla aşılama yönünden canlı aşılar olmasının temel sebebidir (Malcova ve ark., 2009).

Yapılan çalışmalara göre, *aroA* delesyonu yapılan mutant bakteriler, sistemik uygulamadan sonra proinflatuar sitokin tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) seviyelerinin artmasına neden olmuştur. *aroA*'nın silinmesi, *Salmonella*'nın immünoestimülatör özelliklerini artırır. Buna göre, *aroA* delesyonu yapılan suşlar tümör terapötik yaklaşımlarında oldukça etkilidir ve *aroA* mutasyonu ile zayıflatılmış bakterilerin aşılama dışında ve bakteri aracılı tümör tedavisi için de uygun vektör sistemleri haline gelebileceği sonucu çıkarılmıştır (Felgner ve ark., 2016).

Gliserofosfolipidler dış zarın önemli bir bileşenidir ve zar bütünlüğü için de oldukça önemlidir. *aroA* mutantında gliserofosfolipidlerin metabolizması

gecikmiştir. Gliserofosfolipidlerin yanında, sentezleri bozulursa zar stabilitesini etkileyebilecek olan ubikuinonların sentezinin iptali, EDTA'ya duyarlılığı artırmıştır (Felgner ve ark., 2016). Yani, *Salmonella*'daki şikimat yolunun kesintiye uğraması oksotrofi ile sonuçlanıp, aynı zamanda albümin veya EDTA'ya karşı duyarlılığını da artırır (Felgner ve ark., 2016 ve Sebkova ve ark., 2008).

Sonuç olarak, *aroA* delesyonu yapılan *Salmonella* suşlarının yüksek oranda atenüe olduğu varsayılır ve uygun vektör sistemleri olarak kabul edilir (Felgner ve ark., 2016 ve Hoiseth ve Stocker, 1981).

Bu tez çalışması, kanatlı orijinli *S. Typhimurium* suşunda lambda red rekombinasyon tekniğiyle *aroA* gen delesyonunun sağlanarak potansiyel aşı adayı suşun elde edilmesini amaçlayan Türkiye'deki ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. GEREÇ

2.1.1. Kullanılan Bakteri Suşları

Bu tez çalışmasında, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı suş koleksiyonundan kanatlı hayvan karkaslarından ve kümes altlığından izole edilen ve ribotiplendirme kütüphanesinde en çok ribopaterni olan 12 adet *S. Typhimurium* suşu kullanıldı. Bu suşlar, biyokimyasal testler ve ISO6579 protokollerine göre yeniden serotiplendirilip teyit edildikten sonra tez çalışmasında kullanılmak üzere çalışmaya eklendi. Çalışmada yer alan suşların seçiminde ayrıca antibiyotik direnç özellikleri ve *aroA* geni içermeleri de göz önünde bulunduruldu.

2.1.2. *S. Typhimurium* İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri, Biyokimyasal Testler ve Antiserumlar

S. Typhimurium izolasyon ve identifikasyonunda Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar, Nurient agar (NA) ve McConkey agar kullanıldı.

Tez çalışmasında biyokimyasal testlerde Triple Sugar Iron (TSI) besiyeri ve içinde lizin, ornitin, H₂S, glukoz, mannitol, ksiloz, ONPG (β -galaktosidaz), indol, üreaz, voges proskauer, sitrat ve triptofan deaminaz testlerinin bulunduğu Microgen markalı (Microgen GN ID) biyokimyasal identifikasyon kiti A paneli kullanıldı.

Statens Serum Institut, Denka Seiken, BioRad, SSI diagnostica ve Microgen markalı antiserumlar kullanılarak “O” ve “H” antijenlerine dayalı serotiplendirme yapıldı.

2.1.3. S. Typhimurium Suşlarının Seçiminde Kullanılan Antibiyotikler ve Antibiyogram için Besiyeri

Antibiyogram yaparken Mueller-Hinton Agar ve uygun suş seçimi için ampisilin ve kanamisin antibiyotik diskleri (Oxoid) kullanıldı.

2.1.4. Moleküler Analizlerde Kullanılan Malzemeler ve Ekipmanlar

Steril Kabin: Class II, Safety Cabinet (Thermo Scientific).

DNA Ekstraksiyon Kiti: GeneJet Genomic DNA Purification Kit #K0721, #K0722 (Thermo Scientific).

Vorteks Cihazı: Thermo Scientific Vortex.

Santrifüj Cihazı: MicroCL 21 Microcentrifuge (Thermo Scientific).

Spektrofotometre: NanoDrop™ ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

PCR Cihazı: ARKTIK Thermal Cycler (Thermo Scientific).

PCR Master Mix: Thermo Scientific PCR Master Mix (2X).

PCR Aşamalarında Kullanılan Su: Nuclease-free Water (Thermo Scientific).

Hassas Terazî: Scaltec, SBC41.

Jel Elektroforez Ünitesi Cihaz: OWL A2 Large Gel System (Thermo Scientific).

Jel Elektroforez Ünitesi Güç Kaynağı: Serva Bluepower 500 Electrophoresis Power Supply.

Bilgisayarlı Jel Elektroforez Görüntüleme Cihazı: G:BOX (Syngene) UV transillüminatörlü görüntüleme sistemi.

Agaroz: Prona Agarose, Biomax.

Elektroforez Tampon Solüsyonu: 10x TBE (Tris-borate-EDTA) (Himedia).

Boyama Solüsyonu: SafeView Classic (abm).

DNA Ladder: GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder (SM0321) (Thermo Scientific).

Loading Dye: 6X TriTrack DNA Loading Dye (Thermo Scientific).

2.1.5. Mutasyon Aşamalarında ve Sonrasında Kullanılan Malzeme, Ekipman, Besiyerleri ve Antibiyotik Diskleri

Gen Delesyon Kiti: *E. coli* Gene Deletion Kit By Red®/ET® Recombination, Quick & Easy, Cat. No. K006 (Gene Bridges).

Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC) Medium (Condalab): Özellikle transformasyon aşamasında olmak üzere yüksek verim sağlamak için kullanıldı.

Luria-Bertani (LB) Broth / Agar, Miller (Himedia): Suş canlandırmada kullanıldı.

50 µg/ml Ampisilinli Luria-Bertani (LB) Broth: Oxoid™ Ampicillin Selective Supplement (Thermo Scientific) kullanılarak hazırlandı.

50 µg/ml Ampisilinli Luria-Bertani (LB) Agar: Oxoid™ Ampicillin Selective Supplement (Thermo Scientific) kullanılarak hazırlandı.

50 µg/ml Kanamisinli Luria-Bertani (LB) Agar: Oxoid™ Kanamycin Sulphate Supplement (Thermo Scientific) kullanılarak hazırlandı.

%10'luk L-Arabinoz (Sigma): Red/ET Rekombinasyon proteinlerinin ekspresyonunu indüklemek için kullanıldı.

%10'luk Gliserol ve Steril Distile Su: Yıkama solüsyonu olarak kullanıldı.

15 ve 50 ml'lik Santrifüj tüpleri, Thermo Scientific: Santrifüj aşamalarında kullanıldı.

McFarland Dansitometre: Grant Bio DEN-1 McFarland Densitometer.

İnkubatörler: Nüve EN500 İnkubatör.

Çalkalayıcı İnkübatör: Environmental Shaker – Incubator ES-20, HVD Life Sciences.

Soğutmalı Santrifüj: Hermle Z 366 K centrifuge.

Elektroporasyon Küveti: Gene Pulser/MicroPulser Electroporation Cuvettes, 0,1 cm (Bio-Rad).

Elektroporasyon Cihazı: MicroPulser Electroporator (Bio-Rad).

PCR Saflaştırma Kiti: GeneJet PCR Purification Kit #K0701, #K0702 (Thermo Scientific).

Primerler: Çalışmada kullanılan primerlerin tasarımında “Primer3” programı kullanıldı.

Red/ET Ekspresyon Plazmidi: pRedET (amp).

FRT yanlı PGK-gb2-neo kaset oluşturmak için PCR-template (plazmid DNA):

FRT-PGK-gb2-neo-FRT template DNA.

Antibiyotik Diskleri: Rekombinasyon aşamaları bittikten sonra saha suşu ve rekombinant suşu karşılaştırmak adına Oxoid ve Bioanalyse markalarından Ampisilin, Kanamisin, Tetrasiklin, Kloramfenikol, Neomisin, Gentamisin, Streptomisin, Siprofloksasin, Sefotaksim, Trimetoprim-Sülfametoksazol, Trimetoprim, Nalidiksik asit, Amoksisilin, Amoksisilin klavulanik asit, Meropenem, İmipenem, Enrofloksasin, Oksitetrasiklin ve Polimiksin B antibiyotik diskleri kullanıldı.

Tryptic Soy Broth (TSB): Hareket özelliklerini incelemek için kullanıldı.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Tez Çalışmalarında Kullanılacak *S. Typhimurium* Suşunun Seçilmesi

2.1.1.1. *S. Typhimurium* İzolasyon ve İdentifikasyonu

Daha önce ribotiplendirilmesi yapılmış olan ve suş koleksiyonunda saklanan *S. Typhimurium* suşlarında herhangi bir kontaminasyon riskini önlemek ve yeniden teyit ve serotiplendirme amacıyla ISO6579 protokolü uygulandı. Bunun için ilk olarak ilgili suşlar XLD agarda 37°C'de 24 saat inkübe edilerek canlandırıldı. Burada oluşan siyah merkezli şeffaf kolonilerden steril öze yardımıyla birer tane alınarak nutrient agara ekimleri yapıldı. Ertesi gün oluşan kolonilere kit kullanılarak biyokimyasal testler yapıldı ve ardından antiserumlar kullanılarak O (somatik) ve H (flagellar) antijenlerine bakılıp Kauffmann-White Şemasına göre değerlendirildi. Böylece serotiplendirilmesi ve biyokimyasal testleri yapılmış olan suşların *S. Typhimurium* olduğu doğrulandı.

2.1.1.2. S. Typhimurium Suşlarının Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi

Suşlara European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) kriterlerine göre antibiyogram yapıldı. Antibiyotik diskleri olarak ampisilin ve kanamisin kullanıldı ve bunlara karşı en duyarlı olan suşlar çalışmaya dahil edildi.

2.1.1.3. S. Typhimurium Suşlarında *aroA* Geninin PCR ile Tespiti

Serotiplendirilmesi yapılan ve antibiyotik dirençliliklerine göre seçilen suşlardan 9 tanesinde *aroA* geninin varlığına bakılmasına karar verildi. Bu suşların moleküler tanısında kullanılmak üzere DNA izolasyonunda GeneJet Genomic DNA Purification Kiti (Thermo Scientific) kullanıldı. Bunun için öncelikle 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine 500 µl nükleaz free water eklenip, içerisine taze kültüre edilmiş iki adet *S. Typhimurium* kolonisi eklendi. Kitte belirtilen işlemlerin yapım aşaması aşağıda şu şekilde sıralandı:

- Mikrosantrifüj tüplerine alınan örnekler 10 dakika kadar 5000 x g'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- Peletler 180 µl Digestion solüsyonu içerisinde iyice karıştırıldı. Üzerine 20 µl Proteinase K enzimi eklenip uniform olana kadar iyice vortekslendi.
- Peletler tamamen eriyene kadar ara sıra vortekslenerek 56°C'de 30 dk kadar ısı bloğunda inkübe edildi.
- Üzerine RNase A solüsyonundan 20 µl eklendi, vortekslenerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika daha inkübasyonu sağlandı.
- Numuneye Lizis solüsyonundan 200 µl eklendi. Homojen bir karışım elde edilinceye kadar yaklaşık 15 sn vortekslenerek iyice karıştırıldı.
- Üzerine 400 µl %50'lik etanol eklenip tekrardan vortekslendi.

- Hazırlanan lizat bir toplama tüpüne yerleştirilmiş olan GeneJET Genomic DNA Purifikasyon column tüplerine aktarıldı ve 1 dk 6000 x g’de 1 dakika santrifüj edildi. Daha sonra toplama tüpü atıldı ve column yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- Üzerine 500 µl Wash Buffer I (etanol eklenmiş) eklenip 1 dk 8000 x g’de santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atılarak column tüpü yeniden toplama tüpüne yerleştirildi.
- Column üzerine 500 µl Wash Buffer II (etanol eklenmiş) eklenip maksimum hızda (12000 x g) 3 dakika kadar santrifüj edildi. Ardından columnn 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
- Column merkezi üzerine 60 µl Elution Buffer eklenip 2 dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra 1 dk kadar 8000 x g’de santrifüj yapıldı.
- Purifikasyon column tüpü uzaklaştırıldıktan sonra ve elde edilen DNA yoğunluğu ve saflığı UV spektrofotometre (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) ile ölçülerek belirlendi. İlgili DNA’lar kullanılmak üzere -20 de saklandı.

Ekstraksiyon işlemi tamamlandıktan sonra Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) aşamasına geçildi. Seçilen suşlarda *aroA* geninin varlığının ortaya konması için 297 bp’lık hedefe spesifik primerler tasarlandı (Çizelge 2.1). Tasarlanan primerler HPLC metodu ile saflaştırılmış olarak temin edildi.

Çizelge 2.1. Tasarlanan *aroA* primerlerinin baz dizilimi.

ST- <i>aroA</i> -F 5’- CGGTGAATTGCACGCCATAG- 3’
ST- <i>aroA</i> -R 5’- GACAGTGCGACCAGTGAGAA- 3’

Konvansiyonel PCR yönteminin kullanıldığı bu çalışmada her bir örnek için kullanılan reaksiyon miktarları aşağıdaki gibi belirlendi. Negatif kontrol için ise Template DNA yerine nükleaz free water kullanıldı.

Reaksiyon karışımı	Miktarı
PCR Master Mix:	12,5 µl
ST- <i>aroA</i> -F:	1 µl
ST- <i>aroA</i> -R:	1 µl
Nükleaz-free water:	8,5 µl
Template DNA:	2 µl

PCR tüplerine alınan ve reaksiyon hacimleri 25 µl olarak ayarlanan numuneler thermal cycler cihazına konularak amplifikasyon koşulları ayarlandı (Çizelge 2.2) ve PCR reaksiyonu başlatıldı.

Çizelge 2.2. *S. Typhimurium* suşlarında *aroA* geni varlığının araştırılması için uygulanan amplifikasyon koşulları.

Adımlar	Sıcaklık	Süre	Siklus Sayısı
Ön denatürasyon	94°C	3 dk	1
Denatürasyon	94°C	1 dk	30
Bağlanma	54°C	1 dk	
Uzama	72°C	1 dk	
Son uzama	72°C	7 dk	1

Amplifikasyon sonrası elde edilen PCR ürünlerinin değerlendirmesinde agaroz jel elektroforezi uygulandı. Bunun için 20 ml 10x TBE 180 ml distile su ile karıştırıldı. Hassas terazi ile ölçülen 3 gram agaroz bu karışımla birleştirildi. Mikrodalga fırına alınarak çözünmesi sağlandı. Jel soğumaya başladığında üzerine boyama solüsyonu olarak 15 µl SafeView eklendi ve karıştırılarak yatay jel elektroforezi tablasına döküldü. Donması sağlanınca PCR test örnekleri alınarak 6xLoading Dye ile karıştırılıp jele yüklendi. Jelin ilk gözüne ve negatif kontrolden sonrasına marker (DNA ladder) konuldu. 60 dk süre ile 180 voltta elektroforez işlemi uygulandı. Görüntüleme işlemi için ise UV transillüminatör görüntüleme sistemi kullanılarak değerlendirme yapıldı.

2.2.2. *S. Typhimurium* Suşunda *aroA* Gen Delesyonu ile Mutant Suş Eldesi (RED/ ET Rekombinasyonu)

S. Typhimurium suşunda *aroA* gen delesyonunun gerçekleştirilerek aşı adayı olabilecek mutant suşun oluşturulması amacıyla Lambda Red rekombinasyon yönteminin uygulandığı bu aşamalar Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Kiti Cat. No. K006'dan uyarlanarak yapıldı.

2.2.2.1. Homoloji Kolları ile Çevrili Fonksiyonel Bir Kasetin PCR Tekniği ile Oluşturulması

Homoloji kolları ile çevrili fonksiyonel bir kaset oluşturmak için FRT-PGK-gb2-neo-FRT template DNA (plazmid DNA) ve Çizelge 2.3'de belirtilen tasarlanmış ve HPLC metoduna göre saflaştırılmış olan oligonükleotidler (upper ve lower) kullanıldı. Bu oligonükleotidlerin ilk 50 nükleotid dizisi homoloji kollarını oluşturmak için, geriye kalan ve altı çizili kısımlar ise Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion kitinde belirtildiği gibi PCR amplifikasyonu için tasarlandı. Tasarlanırken amaçlanan yerleştirme bölgelerine doğrudan bitişik (5') 50 nükleotid seçildi ve bunların 3' ucuna amplifikasyon için gerekli olan diziler eklendi.

Çizelge 2.3. Fonksiyonel bir kaset oluşturmak için tasarlanan oligonükleotidlerin baz dizilimi.

ST-Upper-F	5'-
ATGGAATCCCTGACGTTACAACCCATCGCGCGGGTCGATGGCGCCATTAA <u>AATTAACCCTCA</u>	
<u>CTAAAGGGCG</u> - 3'	
ST-Lower-R	5'-
TTAGGCAGGCGTACTCATTGCGGCCAGTTGTTGCGAAATAATCAGGGAACG <u>TAATACGACTCA</u>	
<u>CTATAGGGCTC</u> - 3'	

Aşağıda belirtilen reaksiyon karışımından beş adet PCR tüpüne ayrı ayrı hazırlanarak PCR işlemine başlandı.

Reaksiyon karışımı	1 örnek için	5 örnek için
PCR Master Mix:	25 µl	125 µl
ST-Upper-F	2 µl	10 µl
ST-Lower-R:	2 µl	10 µl
Nükleaz-free water:	20 µl	100 µl
FRT-PGK-gb2-neo-FRT template DNA:	1 µl	5 µl

Her bir tüpte 50 µl PCR karışımı olacak şekilde tüm örnekler (5 adet PCR tüpü) thermal cycler cihazına yerleştirildi ve amplifikasyon koşulları Çizelge 2.4'te belirtildiği gibi ayarlandı.

Çizelge 2.4. FRT-PGK-gb2-neo-FRT kasetini oluşturmak için uygulanan amplifikasyon koşulları.

Adımlar	Sıcaklık	Süre	Siklus Sayısı
Ön denatürasyon	98°C	3 dk	1
Denatürasyon	98°C	10 sn	35
Bağlanma	55°C	30 sn	
Uzama	72°C	90 sn	
Son uzama	72°C	10 dk	1

Amplifikasyon aşaması bittikten sonra her biri 50 µl'lik olan PCR ürünleri tek bir eppendorfta toplanarak 250 µl'lik ürün elde edildi. PCR işleminin başarılı olduğundan emin olmak için 1 µl kadar ürün agaroz jel elektroforezinde kontrol edildi ve görüntüleme cihazında bakıldı. İstenilen bp aralığında görüntülenmesinin ardından GeneJet PCR Purification Kiti (Thermo Scientific) kullanılarak ürün saflaştırıldı. Kite belirtilenlere göre yapım aşamaları aşağıdaki gibi sıralanmıştır.

- PCR ürününe 1:1 hacminde Binding Buffer eklendi. Yani 250 µl PCR ürününe 250 µl Binding Buffer eklendi.
- Elde edilen karışım GeneJET purifikasyon column tüpüne yerleştirildi. 1dk

boyunca 10 000 rpm’de santrifüj edildi ve dipte toplanan sıvı atıldı.

- Column tüpü üzerine etanol ile seyreltilmiş 700 µl Wash Buffer eklendi. Ardından 10 000’rpm de 1 dk santrifüj edilerek dipte toplanan sıvı atıldı.
- Kalan Wash Bufferı tamamen çıkarmak için boş olan column tüpü 1dk boyunca 10 000 rpm’de tekrardan santrifüj edildi.
- Column tüpü temiz 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- 50 µl Elution Buffer column merkezine bırakılarak 14 000 rpm’de 1 dk santrifüj yapıldı.
- Purifikasyon column tüpü atılarak, mikrosantrifüj tüpünde kalan ve miktarı 50 µl olan saflaştırılmış DNA konsantrasyonu daha sonra kullanılmak üzere -20 °C’de saklandı.

2.2.2.2. Red/ET Ekspresyon Plazmidi pRedET (amp) ile Transformasyon Aşaması

İşlemlere başlamadan önce *aroA* geni pozitif, ampicilin ve kanamisin antibiyotiklerine duyarlı *S. Typhimurium* suşlarından bir tanesi seçilip LB agara ekimi yapılarak 37°C’de 24 saat inkübe edildi. Bakteri seçimi için tek koloni ekim yöntemi kullanıldı. Ayrıca antibiyotiksiz LB broth ve 50 µg/ml ampicilinli LB agar hazırlandı.

Transformasyon aşamaları aşağıda sıralandığı gibidir.

1. adım:

15 ml’lik santrifüj tüpüne 10 ml antibiyotiksiz LB broth konuldu. İçerisine antibiyotiksiz LB agarda canlandırılan taze kolonilerden öze yardımı ile bir veya iki adet alınarak eklendi ve 37°C’de 24 saat çalkalayıcı etüvde inkübasyona bırakıldı.

2. adım:

Çalışmalara başlamadan en az 2 saat önce 0,1 cm aralıklı elektroporasyon kuvvetleri, steril distile su, %10'luk gliserol buza gömülerek soğutuldu. Soğutmalı santrifüj çalıştırılarak ısısının 2°C civarında olması sağlandı.

- 2 adet 50 ml'lik santrifüj tüpü içerisine 25'er ml LB broth konuldu. İçine 25'er µl bir önceki gün inkübasyonu sağlanan taze kültürden ilave edildi.
- Çalkalayıcı inkübatör 37°C'ye ve hızı ise 220 rpm'e ayarlandı. Santrifüj tüpleri inkübatöre yatay olarak yerleştirildi ve yarım saatte bir McFarland dansitometre ile bulanıklığı ölçüldü. Yaklaşık 3 saat sonra tekrar ölçülerek inkübatörden santrifüj tüpleri alınıp tek bir santrifüj tüpünde birleştirildi ve hızlıca buza gömüldü. Tamamen soğuyana kadar yaklaşık 30 dk buza bekletildi.
- Önceden çalıştırılarak ısısı 2°C'ye düşürülen soğutmalı santrifüj cihazına buz içerisinde bekletilen santrifüj tüpü konularak 4500 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj yapıldı. Santrifüj bitince süpernatant hızlı bir şekilde uzaklaştırılarak pelet hızlıca buza gömüldü.
- Pelete 10 ml kadar distile su eklendi ve vorteks yardımıyla iyice karıştırıldı. Homojenizasyon sağlandıktan sonra 2°C'de 4500 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edildi. Oluşan süpernatant atılıp pelet buza gömüldü ve bu adım bir kez daha tekrarlandı.
- Oluşan pelete %10'luk gliserolden 10 ml kadar eklenerek vortekslendi ve ayar değiştirilmeden santrifüj işlemine devam edilerek oluşan pelet hızlıca buza gömüldü. Ardından bu adım tekrar edildi.
- Pelet miktarına göre yaklaşık 200 µl %10'luk gliserol santrifüj tüpüne konulup peletle süspanse edildi. Ardından bu karışım 4 adet 2 ml'lik eppendorflara eşit olarak paylaştırıldı ve buza gömüldü.
- İçinde 50 µl kültür olan eppendorflardan biri alınarak üzerine 10 µl (200 ng) Red/ET ekspresyon plazmidi eklendi ve buza gömülerek yaklaşık 15 dk bekletildi.
- Geriye kalan elektrokompotent hücrelerden kontrol amaçlı bir tanesi alınıp NA'a yayma ekim yapılarak 24 saat kadar 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

Diğer elektrokompotent hücreler ise bir aksilik çıkması durumunda kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı.

- Buzda bekletilen plazmidli karışım 0,1 cm aralıklı elektroporasyon küvetine pipet yardımıyla aktarıldı. Sonra küvet Elektroporasyon Cihazına (MicroPulser Electroporator, Bio-Rad) 1,35 kV ayarlanarak yerleştirildi ve 5 ms'lik tek vuruş uygulandı. Tekrar buza gömülerek 15 dk daha bekletildi.
- Elektroporasyon küveti buzdan alınarak üzerine antibiyotiksiz 1 ml SOC eklendi. Yavaşça yaklaşık 10 kere pipetasyon yapıldıktan sonra her şey 2 ml'lik eppendorfa aktarıldı.
- Eppendorf çalkalayıcı inkübatörde 220 rpm hızda 30°C'de 4 saat kadar inkübasyona bırakıldı. PRedET'in 37°C'de kaybolacağı göz önünde bulunduruldu.
- 4 saat sonra santrifüj yapılarak süpernatantın bir kısmı döküldü. Ardından 100 µl kadar örnek alınarak 50 µg/ml ampisilin içeren LB agara yayma ekim yapıldı ve 24 saat 30°C'de inkübe edildi.
- Ertesi gün üremesi beklenen koloniler kontrol edildi ve pasajlandı.

2.2.2.3. FRT-PGK-gb2-neo-FRT Kasetinin pRedET (amp) İçeren S. Typhimurium Suşuna Transformasyonu

Bu aşamalara başlamadan önce % 10'luk L-arabinoz, %10'luk gliserol, %10'luk distile su, SOC besiyeri, 50 µg/ml ampisilin içeren LB broth hazırlandı. Kanamisinli LB agar hazırlanırken ilk olarak kitte belirtildiği gibi 15 µg/ml konsantrasyon ayarlandı. Fakat ilgili suşun bu besiyerinde üremesiyle kanamisin konsantrasyonu 50 µg/ml olarak değiştirildi.

1. adım:

Transformasyon aşamasında elde edilen kolonilerden 4-5 tane alınıp 50 µg/ml ampisilin içeren 5 ml LB brotha pasajlaması yapıldı. Ertesi gün bu karışımdan 50 µl alınıp yine 50 µg/ml ampisilin içeren 5 ml LB brotha pasajlaması yapıldı. Pasajlama

boyunca numuneler 30°C’de çalkalayıcı inkübatörde 24 saat kadar inkübe edildi. Bu pasajlama işlemine 5 gün boyunca devam edildi.

2. adım:

Bu adıma başlamadan en az 2 saat önce distile su, %10’luk gliserol ve 0,1 cm aralıklı elektroporasyon kuvvetleri buza gömülerek soğutulması sağlandı. Ayrıca soğutmalı santrifüj çalıştırılarak ısı 2°C’ye düşürüldü.

- 2 adet santrifüj tüpü hazırlanarak içerisine 25’er ml taze ampisilinli LB broth (50 µg/ ml ampisilin içeren) konuldu. Daha sonra her bir tüpe önceden ampisilinli LB brothta üretilen taze kültürden 25 µl ve %10’luk L-arabinozdan 900 µl eklendi. L-arabinoz Red/ET Rekombinasyon proteinlerinin ekspresyonunu indükleyecektir. Ardından 30°C’de, çalkalamalı inkübatörde 220 rpm hızda yaklaşık 2 saat inkübasyona bırakıldı.
- 37°C rekombinasyon için gerekli olan proteinlerin eksprese edildiği sıcaklıktır. Hücre başına sıcaklığa duyarlı plazmidin yaklaşık 5 kopyası vardır ve bir saat boyunca herhangi bir yavru hücre hala ortalama 2-3 kopyaya sahip olacaktır. Ayrıca rekombinasyon proteinlerini eksprese etmeye devam edecektir.
- Bu yüzden 1 saat kadar da 37°C’de inkübe edilerek ara sıra McFarland dansitometre ile bulanıklığı ölçüldü. İstenilen değer aralıklarına ulaşıncaya tüpler inkübatörden alındı.
- Her iki tüpün içeriği tek bir tüpte toplanıp hızlıca buza gömülerek yaklaşık 30 dk soğuması sağlandı.
- Soğutmalı santrifüj cihazında 2°C’de 4500 rpm hızda 10 dk santrifüj edildi. Tüpteki süpernatantın hepsi hızlıca dökülerek pelet buza gömüldü.
- Pelet üzerine 10 ml distile su eklenerek iyice vortekslenip homojenizasyonu sağlandı. Sonra hızlıca soğutmalı santrifüjde aynı hızda 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve bu adım bir kez daha tekrarlandı.
- Oluşan pelet 10 ml %10’luk gliserol ile iyice vortekslenildikten sonra 10 dk aynı hızda santrifüj edildi ve süpernatant atılarak bu adımın tekrarı sağlandı.

- Daha sonra pelet üzerine 200 µl %10'luk gliserol eklenip vortekslenerek homojenize bir süspansiyon elde edildi.
- Bu karışım 4 adet 2 ml'lik eppendorflara eşit olarak paylaştırılarak buza gömüldü. İçinde 50 µl kültür olan eppendorflardan biri seçilerek üzerine daha önce oluşturulan kasetten 10 µl eklendi ve 15 dk kadar buz içinde bekletildi.
- Geriye kalan elektrokompotent hücrelerden bir tanesi alınarak NA'a kontrol amaçlı olarak yayma ekim yapıldı. Diğerleri ise -80°C'ye kaldırıldı.
- İçinde kaset olan eppendorftaki karışım alınarak soğutulmuş olan elektroforez küvetine (0,1 cm aralıklı) aktarıldı. Daha sonra küvet Elektroporasyon Cihazına (MicroPulser Electroporator, Bio-Rad) yerleştirildi ve 1,35 kV ayarlanarak 5 ms'lik tek vuruş uygulandı. Ardından küvet cihazdan alınarak buzda 15 dk kadar bekletildi.
- Buzda bekletme işlemi tamamlandıktan sonra küvete SOC besiyerinden 1 ml ilave edilerek yaklaşık 10 kere pipetasyon yapıldı. Daha sonra küvetin içerisindekiler 2 ml'lik steril bir eppendorfa aktarıldı.
- Rekombinasyonu gerçekleştirmek üzere kültür 37°C'de çalkalayıcı inkübatörde 220 rpm hızda 4 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.
- 4 saat sonra inkübatörden alınan örnek 4500 rpm'de 1 dk boyunca santrifüj edildi. Dipte peletle beraber 100 µl sıvı kalacak şekilde ayarlanıp geriye kalan süpernatant uzaklaştırıldı.
- Kalan sıvı karışım yeniden süspanse edildikten sonra 50 µg/ml kanamisin içeren LB agara ekilerek 24 saat 37°C'de inkübe edildi.
- Ertesi gün oluşan koloniler kontrol edildi ve koloniler arasında mutant olmayanlar da olacağı için saflaştırma işlemi yapıldı. Ardından 3 kere kanamisinli agarda pasajlandı.
- PCR işlemi ile suşlar doğrulandı.

2.2.3. Rekombinasyon İşleminin PCR Testi ile Doğrulanması

Yapılan rekombinasyon işleminde başarılı olduğu düşünülen kolonilerin konfirmasyonu amacıyla PCR kullanıldı. Bunun için karşılaştırma yapabilmek adına, hem rekombinasyon işlemi uygulanan kolonilerden hem de saha suşu canlandırıldıktan sonra elde edilen kolonilerinden GeneJet Genomic DNA Purification kiti (Thermo Scientific) kullanılarak ekstraksiyon işlemi yapıldı. Ekstraksiyon işlemi sonrasında PCR aşamalarına geçildi.

Mutant suşların doğrulanması ve saha suşuyla karşılaştırması amacıyla 2 ayrı primer çifti kullanıldı. Daha önce *S. Typhimurium*'da *aroA* geninin tespitinde kullanılan primer (ST-*aroA*-F 5'- CGGTGAATTGCACGCCATAG-3', ST-*aroA*-R 5'- GACAGTGCGACCAGTGAGAA- 3') çifti ile daha önce belirtilen yöntemle PCR gerçekleştirildi. İkinci olarak konfirmasyon amacıyla kullanılan ve HPLC metodu ile saflaştırılarak sipariş edilen primerlerin baz dizilimi ise Çizelge 2.5'te belirtildiği gibi tasarlandı.

Çizelge 2.5. Tasarlanan konfirmasyon primerlerinin baz dizilimi.

ST-conf-F 5'- GTTAGCGGACAATACGCTGGA- 3'
ST-conf-R 5'- ATCGCCACCGCCAGTAGTAAT- 3'

Konvansiyonel PCR yapılan her bir örnek için hazırlanan reaksiyon karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı.

Reaksiyon karışımı	Miktarı
PCR Master Mix:	12,5 µl
ST-conf-F:	1 µl
ST-conf-R:	1 µl
Nükleaz-free water:	8,5 µl
Template DNA:	2 µl

Reaksiyon hacimleri 25'er µl olarak ayarlanan PCR tüpleri thermal cyclera yerleştirildi. Ardından amplifikasyon koşulları Çizelge 2.6'da gösterildiği gibi ayarlandı.

Çizelge 2.6. Mutant suşlarla saha tipi suşu karşılaştırmak için ayarlanan amplifikasyon koşulları.

Adımlar	Sıcaklık	Süre	Siklus Sayısı
Ön denatürasyon	95°C	3 dk	1
Denatürasyon	94°C	30 sn	35
Bağlanma	64°C	1 dk	
Uzama	72°C	90 sn	
Son uzama	72°C	10 dk	1

PCR işleminden sonra agaroz jel elektroforezi yapıldı ve bilgisayarlı jel elektroforez görüntüleme cihazı kullanılarak suşların ampikon büyüklükleri değerlendirildi.

2.2.4. Mutant *S. Typhimurium* Suşundan pRedET (amp)'in Çıkarılması

Beamish ve ark. (2004), sıcaklığa duyarlı olan pKD46'nın, yüksek sıcaklıkta (42°C'de) kolayca elimine edilebileceğini belirtmişlerdir. Buna göre çalışmada kullanılan ve sıcaklığa duyarlı olan pRedET için de aynı durumun geçerli olabileceği düşünüldü. Bu amaçla ilgili suşun canlandırılması için LB agara ekimi yapılarak 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Bunun ardından tek düşen bir koloni alınarak kontaminasyon riskinin de önüne geçebilmek adına kanamisin içeren LB agara ekimi yapıldı ve 42°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonu takiben örneklenen tek kolonilerin kanamisinli besiyerine bir seri pasajları gerçekleştirildi. Özellikle 3. ve 4.

pasajlarda elde edilen kolonilerin kontrolleri yapılarak plazmidin çıkıp çıkmadığı kontrol edildi. Beşinci pasajın ardından suşun ampisilinli LB agara ekimi ve 30°C’de 24 saat inkübasyonu sağlandı ve bu agarda üreme durumu gözlemlendi. İstenilen sonuç elde edilince suşlar toplandı ve -20°C’ye saklandı.

2.2.5. Mutant *S. Typhimurium* Suşunun Fenotipik Karakterizasyonu

Fenotipik değerlendirme yapabilmek adına hem saha suşu hem de mutant suşun çeşitli besiyerleri ve kitler kullanılarak biyokimyasal özellikleri, koloni morfolojileri, hareket özellikleri ve antibiyotik direnç profilleri belirlenerek karşılıklı değerlendirildi. Ayrıca, mutant suşa ISO6579’a uygun olarak serotiplendirme işlemi yapıldı.

2.2.5.1. Mutant Suşun Biyokimyasal Özellikleri ve Koloni Morfolojisinin İncelenmesi

Microgen markalı biyokimyasal identifikasyon kitinin (Microgen GN ID) A paneli kullanılarak biyokimyasal testler yapıldı. Kitin çalışma prensiplerine göre aşağıdaki uygulamalar gerçekleştirildi:

- 3 ml fizyolojik tuzlu su içerisine taze hazırlanmış kültürden tek bir koloni alınarak iyice karıştırıldı.
- Testin yapıldığı kuyucukları kapatan yapışkan bant dikkatlice kaldırıldı.
- Steril bir pastör pipeti kullanılarak her bir kuyucuğa 3-4 damla (100 µl kadar) bakteri süspansiyonundan eklendi.
- Daha sonra 1, 2, 3 ve 9 numaralı kuyucuklara (siyah daire şeklindeki) 3-4 damla mineral yağ damlatılarak kaplandı.
- Yapışkan bant kuyucukların üzerine uygun bir şekilde kapatılarak 24 saat 37°C’de inkübasyona bırakıldı ve okunma aşamasına geçildi.

- Ertesi gün yapışkan bant çıkarılarak renk tablosuna göre pozitif reaksiyonlar kaydedildi.
- Ardından kuyucuklara uygun ayıraçlar eklendi. Bunun için öncelikle 8. kuyucuğa 2 damla kovaks ayırıcı eklenerek 60 saniye beklendi. Süre sonunda sonuçlar okundu ve kaydedildi. Kite göre kırmızı rengin oluşması pozitif reaksiyon olarak kabul edildi.
- 10. kuyucuğa 1 damla VP I ayırıcı ve ardından 1 damla da VP II ayırıcı eklendi ve 15 dakika sonra sonuçlar okundu. Kite göre koyu pembe/kırmızı rengin oluşması pozitif reaksiyon olarak kabul edildi.
- 12. kuyucuğa 1 damla TDA ayırıcı eklendi ve 60 saniye sonra sonuçlar okundu. Kite göre kiraz kırmızısı rengin oluşması pozitif reaksiyon olarak kabul edildi.
- Son olarak bütün bu sonuçların değerlendirilmesi yapıldı.

Mutant suşun hem koloni morfolojisinin değerlendirilebilmesi hem de saha suşuyla karşılaştırması amacıyla TSI besiyerine, XLD agara, MacConkey agara, O/F besiyerine, Kanlı agara ve Nutrient agara ekimleri yapıldı. Ayrıca kanlı agarda hemoliz özellikleri de karşılaştırıldı.

2.2.5.2. Mutant Suşun Hareket Özelliklerinin İncelenmesi

Tryptic Soy Broth (TSB) kullanılarak hem mutant suşun hem de saha suşunun hareket yeteneği karşılaştırmalı olarak incelendi. Bunun için taze kültürlenmiş olan kolonilerden birer tane alınarak hazırlanmış iki ayrı TSB'nin tam ortasına steril öze yardımıyla ekimleri yapıldı. 37°C'de yaklaşık 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra değerlendirmeleri yapıldı.

2.2.5.3. Mutant Suşun Antibiyotik Direnç Profilinin İncelenmesi

İşlemlere başlamadan önce mutant suş ve karşılaştırma yapmak amacıyla saha suşu LB agara ekilerek 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün elde edilen taze koloniler kullanılarak disk difüzyon yöntemiyle antibiyogram yapıldı. Bunun için öncelikle Muller-Hinton agar hazırlanarak petrilere döküldü. Serum fizyolojik içerisine taze hazırlanmış kültürlerden eklenerek inokulum süspansiyonu hazırlandı ve McFarland dansitometre ile ölçülüp bulanıklığı 0,5 olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan inokulum içerisine steril pamuklu eküvyon çubuğu daldırıldı ve pamuğun ıslanması sağlandı. Ardından eküvyon çubuğu petri üzerinde hiç boş alan kalmayacak şekilde sürülerek ekim işlemi gerçekleştirildi. Kullanılmasına karar verilen antibiyotik emdirilmiş diskler seçilerek eşit aralıklarla agar üzerine pens yardımıyla yerleştirildi. Disklerin aralarında belirli bir boşluk olmasına ve agar yüzeyi ile sıkı bir temas halinde bulunmasına dikkat edildi. İşlemler tamamlandıktan sonra 37°C de 24 saat kadar inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün disklerin zon çapları EUCAST standart protokolüne göre yorumlanıp ölçülerek antibiyotik dirençlilikleri karşılaştırıldı.

Bu tez çalışmasında kullanılan antibiyotik diskleri, firma adı ve µg cinsinden konsantrasyonları Çizelge 2.7’de verilmiştir.

Çizelge 2.7. Antibiyogram için kullanılan diskler, firmaları ve konsantrasyonları.

Antibiyotik disk adı	Firma adı	Konsantrasyonu (µg/disk)
Ampisilin (AMP)	Oxoid	10
Kanamisin (K)	Oxoid	30
Tetrasiklin (TE)	Oxoid	30
Kloramfenikol (C)	Bioanalyse	30
Neomisin (N)	Oxoid	10
Gentamisin (CN)	Oxoid	10
Streptomisin (S)	Oxoid	10
Siprofloksasin (CIP)	Oxoid	5
Sefotaksim (CXT)	Oxoid	30
Trimetoprim- Sülfametoksazol (SXT)	Oxoid	25
Trimetoprim (W)	Oxoid	5
Nalidiksik asit (NA)	Oxoid	5
Amoksisilin (AML)	Oxoid	10
Amoksisilin klavulanik asit (AMC)	Bioanalyse	30
Meropenem (MEM)	Oxoid	10
İmipenem (IPM)	Oxoid	10
Enrofloksasin (ENR)	Bioanalyse	5
Oksitetrasiklin (T)	Bioanalyse	30
Polimiksin B (PB)	Oxoid	300

3. BULGULAR

3.1. S. Typhimurium Suşunun Seçim Bulguları

3.1.1. S. Typhimurium İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Tez çalışması için ISO6579 standartlarına göre değerlendirilmek üzere seçilen 12 adet S. Typhimurium suşunun XLD agara ekimi sonucu, şeffaf renkli, parlak ve siyah merkezli koloniler elde edildi. Bu kolonilerden NA'a ekim yapıldıktan sonra Microgen markalı biyokimyasal identifikasyon kiti kullanılarak biyokimyasal testler yapıldı. Test sonucuna göre elde edilen bulgular Çizelge 3.1'de verildi.

Çizelge 3.1. MICROGEN GN ID A paneli kullanılarak yapılan biyokimyasal testler ve sonuçları.

Reaksiyon	Sonucu
Lizin	Pozitif
Ornitin	Pozitif
H ₂ S	Pozitif
Glukoz	Pozitif
Mannitol	Pozitif
Ksiloz	Pozitif
ONPG	Negatif
İndol	Negatif
Üreaz	Negatif
Voges proskauer	Negatif
Sitrat	Pozitif
Triptofan deaminaz	Negatif

Ayrıca TSI besiyeri kullanılarak suşlar glukoz pozitif, laktoz negatif ve sükroz negatif bulundu. MacConkey Agar yardımıyla da laktozun fermente edilemediği doğrulandı.

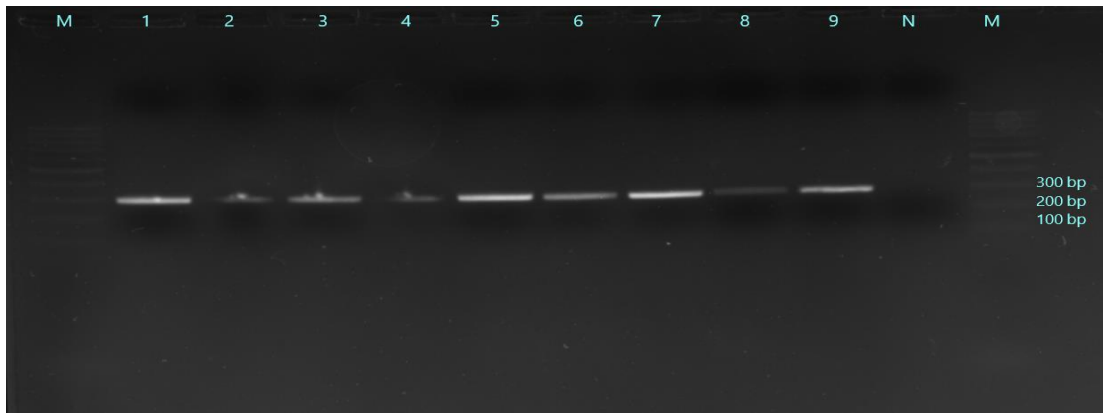
Biyokimyasal testlerden sonra antiserumlar kullanılarak Kauffmann-White Şemasına göre O (somatik) antijenleri “1, 4 ve 12” olarak doğrulandı. H (flagellar) antijenlerinden ise faz 1 antijeni olarak “i”, faz 2 antijeni olarak ise “1 ve 2” doğrulanarak serotiplendirme işlemi tamamlandı.

3.1.2. Antibiyotik Direnç Profiline Göre Suş Seçimi Bulguları

Serotiplendirilmesi yapıp *S. Typhimurium* olarak doğrulanan 12 adet suşa antibiyogram yapıldı. Tez çalışmasında pRedET (amp) ve FRT-PGK-gb2-neo-FRT template DNA kullanıldığı için ampisilin ve kanamisin her ikisine birden duyarlı olan suşlar tespit edildi. Bu şartı sağlayan 9 adet suş çalışmanın devamında kullanıldı.

3.1.3. *aroA* Geni Varlığına Göre Suş Seçimi Bulguları

Bu çalışmada ampisilin ve kanamisine duyarlı olan *S. Typhimurium* suşlarında *aroA* gen varlığını tespit edebilmek adına konvansiyonel PCR işlemi yapıldı. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonrasında görüntülenmesiyle tüm örnekler *aroA* geni (297 bp) yönünden pozitif bulundu (Şekil 3.1).



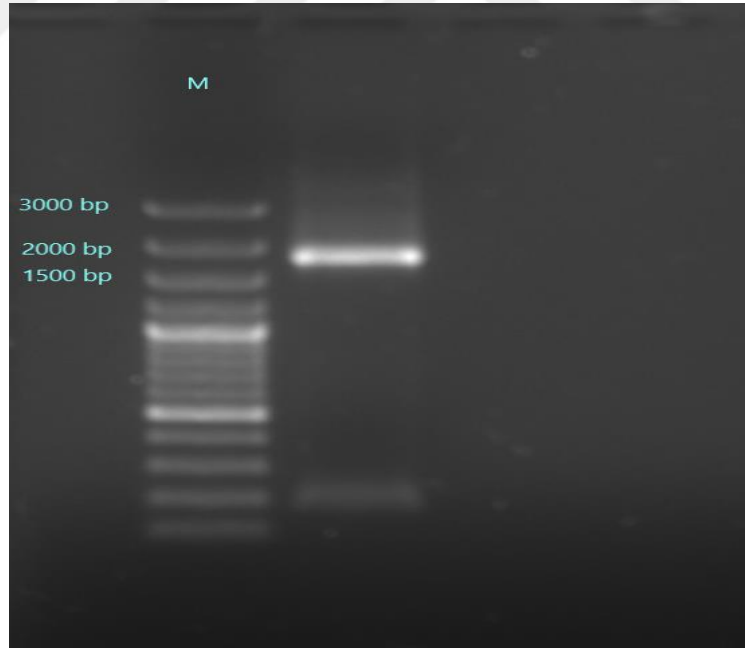
Şekil 3.1. *S. Typhimurium* suşlarının taşıdığı *aroA* genlerine ait PCR ürünlerinin (297 bp) jel elektroforez görüntüsü (M: DNA ladder, N: Negatif kontrol).

aroA geni pozitif bulunan 9 adet *S. Typhimurium* suşundan birisi rastgele seçilerek çalışmada kullanılmasına karar verildi.

3.2. *S. Typhimurium* Suşunda *aroA* Gen Delesyonunun Gerçekleştirilerek Mutant Suşun Elde Edilmesi (RED/ ET Rekombinasyonu) Bulguları

3.2.1. Homoloji Kolları ile Çevrili Fonksiyonel Bir Kasetin PCR Tekniği ile Oluşturulmasına Ait Bulgular

Görüntüleme cihazında incelenen FRT-PGK-gb2-neo-FRT kaseti için PCR ürününün boyutu 1737 bp olarak tespit edildi (Şekil 3.2). Böylece yapılan işlemin başarılı olduğu sonucuna ulaşıldı.



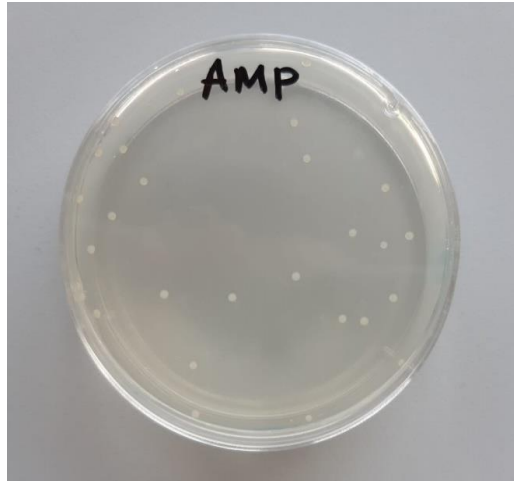
Şekil 3.2. FRT-PGK-gb2-neo-FRT kaseti için PCR ürününün boyutunun (1737 bp) jel elektroforez görüntüsü (M: DNA ladder).

3.2.2. Red/ET Ekspresyon Plazmidi pRedET (amp) ile Transformasyon Bulguları

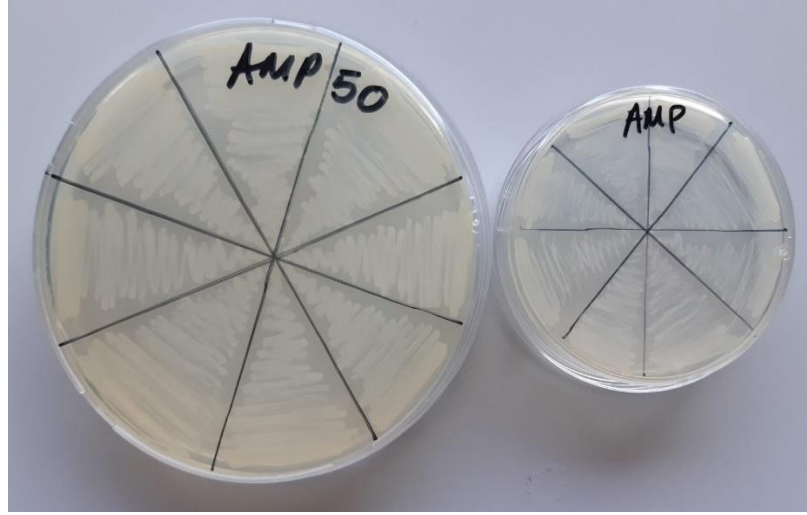
Transformasyon aşaması için antibiyotiksiz LB brot't'a inoküle edilen taze kültürün çalkalayıcı inkübatörde 37°C'de yaklaşık 3 saat kalmasından sonra McFarland dansitometre ile ölçülen bulanıklığının 0,35 olduğu tespit edildi. Buna göre inkübatörden alınarak buz içerisinde soğutuldu. Ardından devam eden santrifüj aşamalarının süreleri ve yıkama sayıları ise oluşan pelet miktarına göre ayarlandı.

Elektroporasyon aşamasından önce elektrokompotent hücrelerin bulunduğu eppendorflardan biri alınıp NA'a kontrol amaçlı yapılan ekim sonucu üreme tespit edildi. Buna göre bu aşamaya kadar hücrelere zarar verilmediği sonucuna ulaşıldı.

Bütün adımlar tamamlanıp en son 50 µg/ml ampisilin içeren LB agarda ekimi yapıp 30°C'de inkübasyonu sağlandıktan sonra ertesi gün besiyerinde kolonilerin olduğu görüldü (Şekil 3.3). Bu koloniler alınarak pasajlamaları yapıldı (Şekil 3.4). Ampisiline duyarlı olan bakteri süşunun besiyerinde üremesiyle süşun pRedET (amp)'ye sahip olduğu ve transformasyon işleminin başarılı olduğu tespit edildi.



Şekil 3.3. Transformasyon aşaması sonrasında pRedET (amp) içeren *S. Typhimurium* süşunun 50 µg/ml ampisilinli LB agarda üremesi.



Şekil 3.4. Transformasyon sonrasında oluşan kolonilerin ampisilinli LB agarda pasajlanması.

Saha suşunun ve pRedET (amp) içeren suşun ampisinli LB agarda karşılaştırılması Şekil 3.5'te gösterildiği gibidir. Buna göre pRedET (amp) içeren suş ampisinli LB agarda ürerken, saha suşunun üremediği görüldü.



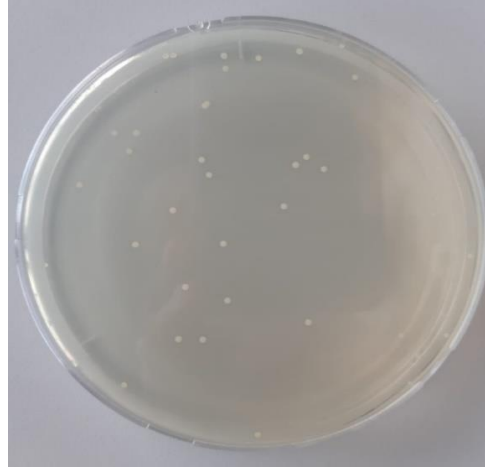
Şekil 3.5. Saha suşunun ve pRedET (amp) içeren suşun ampisinli LB agarda karşılaştırılması.

3.2.3. FRT-PGK-gb2-neo-FRT Kasetinin pRedET (amp) İçeren S. Typhimurium Suşuna Transformasyonu Bulguları

Ampisilinli LB broth içerisine konulan taze kültür ve L-arabinoz sonrasında çalkalamalı olarak inkübasyona bırakılan numunenin McFarland dansitometre ile yaklaşık 3 saatin sonunda bulanıklığı 0,39 olarak ölçüldü ve inkübatörden alınarak buza gömüldü. Transformasyon aşamasında olduğu gibi santrifüj işlemesinde oluşan pelet miktarına göre yıkama işlemi ayarlandı.

Elektroporasyon işleminden önce eppendorflara alınan elektrokompotent hücrelerden birinin NA'a yapılan ekimi değerlendirildi. Buna göre besiyeri kontrol edildiğinde üreme olduğu görüldü ve böylece bu aşamaya kadar yapılan işlemlerde suşlara zarar verilmediği sonucuna varıldı.

Elektroporasyon aşamasından sonra en son kanamisinli LB agara ekim yapılp ertesi gün incelendiğinde kolonilerin ürediği tespit edildi (şekil 3.6).



şekil 3.6. Rekombinasyon aşaması sonrasında S. Typhimurium suşunun 50 µg/ml kanamisinli LB agarda üremesi.

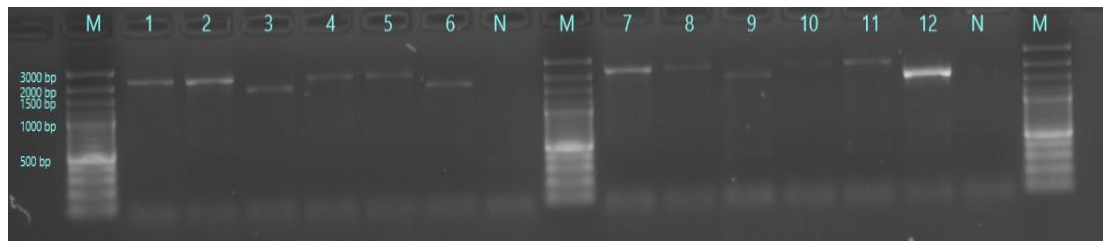
3.2.4. Rekombinasyon İşleminin PCR Testi ile Doğrulanmasına Ait Bulgular

Rekombinasyon işleminin başarılı olduğundan emin olabilmek için PCR'dan faydalanıldı. Bunun için de *aroA* gen varlığını tespit etmek için ST-*aroA*-F ve ST-*aroA*-R primerleri (297 bp) ile saha suşu ve mutant suşlar incelendi. Jel elektroforezi görüntülerine göre saha suşlarında *aroA* geni bulunurken, mutant suşlarda bulunmadığı belirlendi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Saha suşu ve mutant suşların *aroA* gen varlığına ait jel elektroforezi görüntüsü (M: DNA ladder; 1, 2, 3 ve 4 numaralı örnekler saha suşu (297 bp); 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 numaralı örnekler mutant suşlar ve N: Negatif kontrol).

Saha tipi suşla mutant suşun ayrımını yapabilmek için konfirmasyon primerleri de kullanıldı. Elektroforez işlemi sonrasında görüntülenmeleri ile mutant suşun 2165 bp, saha suşunun ise 1712 bp büyüklüğünde sonuç verdikleri tespit edildi (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Saha suşu ve mutant suşların PCR ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü (M: DNA ladder; 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 ve 11 numaralı örnekler mutant suş (2165 bp); 3, 6, 9 ve 12 numaralı örnekler saha suşu (1712 bp) ve N: Negatif kontrol).

3.2.5. Mutant *S. Typhimurium* Suşundan pRedET (amp)’in Çıkarılması Bulguları

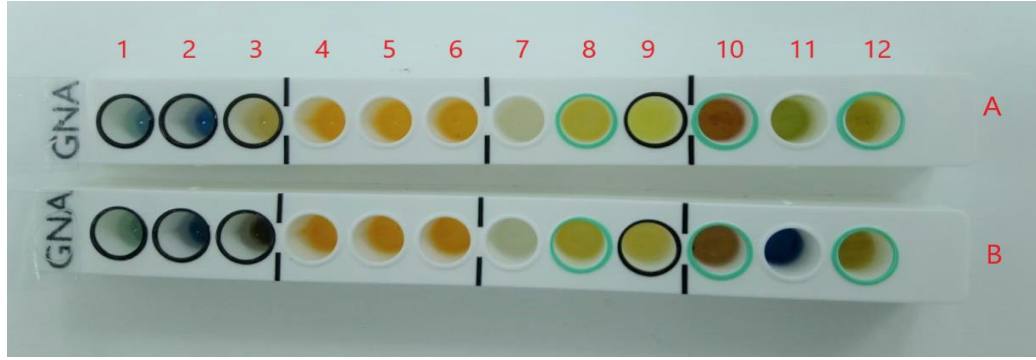
Saha suşunda bulunmayan fakat mutant suшта bulunan ve ampisiline karşı dirençliliğe neden olan pRedET’in çıkarılması amacıyla kontrollü olarak pasajlama işlemleri gerçekleştirildi. 42°C’de ve kanamisinli besiyerinde yapılan 5. pasaj sonrasında koloniler alınarak ampisilinli besiyerine geçildi. En son ampisinli besiyerinde üreme olmamasıyla ilgili plazmidin çıkarıldığı sonucuna varıldı.

3.2.6. Mutant *S. Typhimurium* suşunun Fenotipik Karakterizasyon Bulguları

Mutant suşun biyokimyasal özelliklerine, koloni morfolojisine, hareket özelliklerine ve antibiyotik direnç profillerine ait bulgular analiz edildi. Ek olarak mutant suş ISO6579’a uygun olarak yapılan serotiplendirme işlemleri sonucunda saha suşunda olduğu gibi O (somatik) antijenleri “1, 4 ve 12” ve H (flagellar) faz 1 antijeni “i”, faz 2 antijeni ise “1 ve 2” olarak tespit edildi.

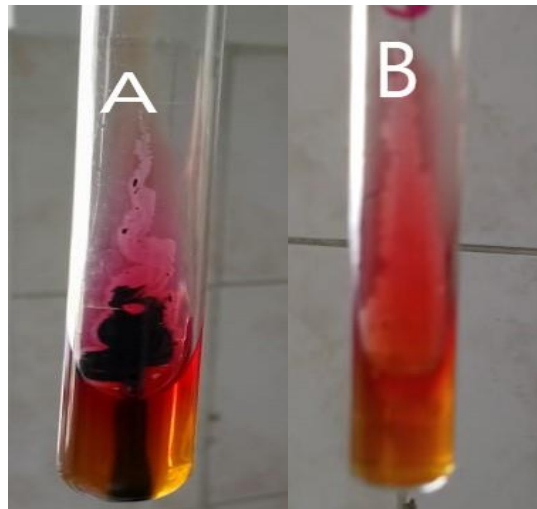
3.2.6.1. Mutant Suşun Biyokimyasal Özellikleri ve Koloni Morfolojisi Bulguları

Biyokimyasal identifikasyon kiti kullanılarak yapılan testlerde saha suşundan farklı olarak mutant suшта H₂S ve sitrat reaksiyonları negatif bulundu (Şekil 3.9) Kitte bulunan diğer testlerin sonuçları ise saha suşuyla aynı olup, lizin, ornitin, glukoz, mannitol, ksiloz pozitif; ONPG, indol, üreaz, voges proskauer ve triptofan deaminaz negatif bulundu.

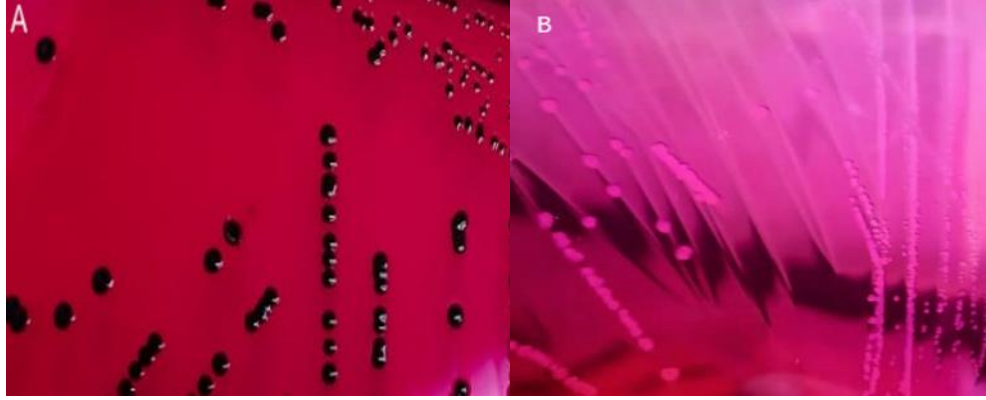


Şekil 3.9. Microgen markalı biyokimyasal identifikasyon kitinin A paneli kullanılarak yapılan biyokimyasal testler (A: Mutant suş; B: Saha suşu; 1: Lizin; 2: Ornitin; 3: H₂S; 4: Glukoz; 5: Mannitol; 6: Ksiloz; 7: ONPG; 8: İndol; 9: Üreaz; 10: Voges proskauer; 11: Sitrata; 12: Tryptofan deaminaz).

TSI besiyerine yapılan ekimlerde ise mutant suşta H₂S oluşumu gözlenmedi (Şekil 3.10). Ayrıca saha suşundan farklı olarak XLD agarda şeffaf renkli parlak fakat siyah merkezli olmayan kolonilerin oluşumu görüldü (Şekil 3.11). Ek olarak MacConkey Agarda ve O/F besiyerinde saha suşundan farklı bir üreme gözlenmedi. MacConkey agara yapılan ekimlerde laktoz negatif koloniler, O/F besiyerine yapılan ekimlerde ise fermentatif oldukları sonuçlarına ulaşıldı. Kanlı agar ve Nutrient agar gibi genel besiyerlerine yapılan ekimler sonucunda morfolojik olarak mutant suşun saha suşuna göre daha büyük ve parlak renkli ve farklı formdaki kolonileri tespit edildi. Kanlı agarda hemoliz özelliği ise saha suşunda olduğu gibi mutant suşta da gözlemlendi.



Şekil 3.10. Saha suşunun ve mutant suşun TSI besiyerinde görüntüsü (A: Saha suşu; B: Mutant suş).



Şekil 3.11. Saha suşunun ve mutant suşun XLD agarda görüntüsü (A: Saha suşu; B: Mutant suş).

3.2.6.2. Mutant Suşun Hareket Özellikleri Bulguları

TSB besiyerine yapılan ekimler sonucu saha suşu ve mutant suşun hareket özelliklerinde morfolojik olarak bir farklılık tespit edilmedi. 24 saat sonunda yapılan gözlemler sonucunda her iki suşun da hareketli olduğu gözlemlendi.

3.2.6.3. Mutant Suşun Antibiyotik Direnç Profili Bulguları

Mutant suş ve saha suşunun antibiyogram sonrasında oluşan zon değerleri ölçülerek karşılaştırıldı (Çizelge 3.2). Buna göre, saha suşunda amoksisilin klavulanik asite karşı dirençlilik, mutant suшта ise duyarlılık saptandı. Ayrıca, mutant suшта ampisilin, tetrasiklin, kloramfenikol, gentamisin, streptomisin, siprofloksasin, sefotaksim, trimetoprim-sülfametoksazol, trimetoprim, nalidiksik asit, amoksisilin, amoksisilin klavulanik asit, meropenem, imipenem, enrofloksasin, oksitetrasiklin ve polimiksin B'ye karşı saha suşuna göre artan duyarlılık gözlemlendi.

Çizelge 3.2. Saha suşu ve mutant suşun antibiyotik zon çaplarının karşılaştırılması.

Antibiyotik Disk adı	Saha suşunda ölçülen antibiyotik zon çapı	Mutant suşta ölçülen antibiyotik zon çapı
Ampisilin	19	24
Kanamisin	20	0
Tetrasiklin	20	26
Kloramfenikol	29	32
Neomisin	16	0
Gentamisin	19	21
Streptomisin	12	16
Siprofloksasin	30	35
Sefotaksim	27	29
Trimetoprim-Sülfametoksazol	31	38
Trimetoprim	28	34
Nalidiksik asit	24	30
Amoksisilin	24	26
Amoksisilin klavulanik asit	10	18
Meropenem	23	25
İmipenem	32	36
Enrofloksasin	32	34
Oksitetrasiklin	26	28
Polimiksin B	15	19

4. TARTIŞMA

İnsanlarda *Salmonella* enfeksiyonunun en önemli bulaş kaynakları kümes hayvanları ve yumurtalardır (Park ve ark., 2014). Konakçı spesifik olmayan *Salmonella*'lar kanatlılara kolonize olmakla birlikte hastalığa neden olmaz (Tan ve ark., 1997). *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* ise insan enfeksiyonları ile ilişkili *Salmonella* serovarları arasında öne çıkan iki tanesini temsil eder (Park ve ark., 2014). Ticari kanatlılarda artan aşı kullanımı ile *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* ilişkili halk sağlığı sorunları nedeniyle, bu serovarlar çoğu *Salmonella* aşısının hedefi olmaktadır (Foley ve ark., 2011).

Salmonella aşıları, kümes hayvanlarında *Salmonella* taşıma oranını azaltmada önem arz eden bir uygulamadır (Tan ve ark., 1997). *S. Typhimurium*'un canlı attenüe suşları, mukozal immünizasyon oluşturmak amacıyla canlı rekombinant aşılardan üretilmesi için çok yönlü bir organizmadır (Husseiny ve Hensel, 2008). Bakterilerde mutasyon oluşturmak için Lambda Red rekombinasyon sistemi oldukça uygun ve popüler bir yaklaşım haline gelmiştir. Bu sistem, çeşitli Gram negatif bakteri türlerinde kullanım için uyarlanmıştır (Quick ve ark., 2010). Ayrıca Faj λ Red rekombinasyon yöntemi, bir delesyon yöntemi olarak *S. enterica*'daki gen rekombinasyonları için de tasarlanmıştır (Husseiny ve Hensel, 2008).

Lambda red rekombinasyon yönteminde çeşitli plazmidler kullanılmıştır. Datsenko ve Wanner (2010), *E. coli*'deki kromozomal genleri bozmak için geliştirdikleri yöntemlerinde pKD3, pKD4, pKD13 gibi template plazmidler kullanarak birtakım kromozomal gen mutasyonları oluşturmuşlardır. Lambda red rekombinasyonu ekspresyon plazmidlerinden pKD46'nın büyük oranda rekombinasyona olanak sağladığı anlaşıncaya pKD20'nin yerine bu plazmidi kullanmaya karar vermişlerdir. Quick ve ark. (2010), bu yöntemde kullanım için trimetoprim veya spektinomisin/streptomisine direnci kodlayan PCR ürünleri üretmede kullanılabilecek template plazmidlerin mevcudiyetini rapor etmişlerdir. Bu

tez çalışmasında ise Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion kitinden temin edilen Red/ET ekspresyon plazmidi (pRedET) ve FRT-PGK-gb2-neo-FRT template DNA kullanıldı. pRedET, ısıya duyarlı bir plazmid olan pSC101'nin bir türevidir. pSC101 tarafından kodlanan *RepA* proteini, plazmid DNA replikasyonu için gereklidir (Miller ve ark., 1995). Bu bulgulara göre lambda red rekombinasyon yönteminde çeşitli template plazmidler ve ekspresyon plazmidleri kullanılarak başarılı sonuçlar elde edilebileceği sonucu çıkarılabilir.

aroA geninde mutasyon oluşturmak için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Alderton ve ark. (1991) ve Hoiseth ve Stocker (1981), Tn10 adlı bir transpozon kullanarak *S. Typhimurium* suşlarında *aroA* geninin mutasyonunu sağlamışlardır. Saxena ve ark. (2015), *S. Typhimurium*'da Tn10 ile oluşturdukları gen mutasyonunda Tn10'un sadece ilgili gende (*aroA*) mutasyon oluşturmadığını ayrıca kromozomda başka rekombinasyon olaylarını da indüklediğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada ise, transpozon insersiyonu yapılmadan lambda red yöntemiyle gen delesyonu sağlanmıştır. PCR ile yapılan doğrulama işlemleri sonucunda ise rekombinasyonda başarılı olduğu ispatlanmıştır. Bu iki yöntem karşılaştırıldığında Tn10 transpozonunun kromozomda istenmeyen rekombinasyonlar oluşturması nedeniyle lambda red yönteminin daha tercih edilebilir bir yöntem olduğu düşünülmektedir.

Rekombinasyon aşamasında lamda red genlerinin ekspresyonu için farklı sıcaklıklarda inkübasyon önerilmiştir. Sharan ve ark (2009), rekombinasyon genlerinin düşük sıcaklıklarda (30°C-34°C) eksprese edilemeyeceğini ve bakteri kültür sıcaklığının 15 dakika boyunca 42°C'ye çıkarıldığında, rekombinasyon genlerinin yüksek seviyelerde eksprese edileceğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde Murphy ve Campellone (2003), elektroporasyon aşamasından önce hücreleri önce 30°C'de ardından 42°C'de 15 dakika inkübe etmişlerdir. Gen delesyon kiti ise, önce 30°C'de, daha sonra da rekombinasyon için gerekli proteinlerin eksprese edildiği 37°C'de yaklaşık 1 saat kadar hücrelerin inkübasyonunu önermiştir. Yapılan bu çalışma kiten uyarlanmış olup başarılı sonuç elde edildi. Fakat diğer yöntemlerde benzer şekilde olumlu yanıt alınabileceği düşünülmektedir.

Elektroporasyon işleminde *S. Typhimurium* için farklı akım şiddetleriyle başarılı sonuç elde edilebilir. Sawitzke ve ark. (2007), *E. coli* ve *Salmonella* için önerilen standart koşulları gözeterek Bio-Rad markalı elektroporator ile 0,1 cm elektroporasyon küvetlerini kullanıp, 1,8 kV'lık akım uygulamışlardır. Bu çalışmada ise aynı marka elektroporasyon cihazı ve yine aynı boyuttaki küvetler kullanıldı. Fakat kitte yazıldığı gibi 1,35 kV akım uygulandı ve elektroporasyon işleminden başarılı sonuç elde edildi. Bu bulgulara göre uygulanan her iki akımın da tercih edilebilir olduğu sonucu çıkarılabilir.

Hücreler elektroporasyon işleminden sonra hassastır ve ekim yapmadan önce LB broth'da bir inkübasyon süresi gerekir (Sharan ve ark., 2009). Sawitzke ve ark. (2007), elektroporasyondan sonra hücrelere LB broth eklendikten sonra, minimum olarak 30 dakikalık bir inkübasyonun gerekli olduğunu, ancak üretilen rekombinantların tipi ve rekombinantları tanımlamak için kullanılan yöntemle bağlı farklı inkübasyon sıcaklık seçenekleri bulunduğunu belirtmişlerdir. Yine antibiyotige dirençli kaset kullanıldığında yeterli ekspresyon için 2-3 saatlik büyümenin gerekli olduğunu ifade etmişlerdir. Yapılan tez çalışmasında ise yaklaşık 4 saat süreyle SOC besiyerinde inkübasyon sağlandı. Rekombinasyon işleminin başarı ile sonuçlanması farklı inkübasyon sürelerinin uygulanabileceğini göstermektedir.

LB broth ve SOC besiyeri transformasyon aşamalarında yaygın olarak kullanılırlar. Murphy (2016), yüksek tuz konsantrasyonları içeren LB brothun elektroporasyondan sonra hücrelerin hayatta kalması için zararlı olabileceğini belirtmiştir. Sun ve ark. (2009), glikoz ve zengin besin kaynağı olan SOC besiyerinin transformasyon verimliliğinde artış sağladığını belirtmişlerdir. Verilen bu bilgilere göre Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion kitinde belirtilenin aksine, bu çalışmada da elektropore edilmiş hücreler için SOC kullanıldı ve olumlu yanıt alındı. Buna göre LB broth yerine SOC besiyeri kullanılınca da başarılı sonuç elde edilebileceği sonucu çıkarılabilir.

Antibiyotik konsantrasyonu bakteri seleksiyonunda oldukça önemli olmaktadır. Kullanılan gen delesyon kitine göre, çalışma konsantrasyonları olarak ampisilin 50 µg/ml, kanamisin ise 15 µg/ml olarak ayarlanması gerektiği belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında ampisilin konsantrasyonunda bir değişiklik yapılmazken, kanamisin çalışma konsantrasyonunun 50 µg/ml olarak değiştirilmesine karar verildi. Ülkeler ve hatta suşlar arası değişebilecek antibiyotik duyarlılık özellikleri göz önünde bulundurulduğunda rekombinasyon işlemleri sonrasında uygun konsantrasyonlu kanamisinli LB agara yapılan ekimlerde mutant olmayan kolonilerin üremesinin önüne geçilebilir.

Gen delesyonları bakterilerin çeşitli biyokimyasal özelliklerini etkileyebilir. Cooper ve ark. (1994b), *S. Enteritidis* suşunda *aroA* gen delesyonu yapıldıktan sonra oluşan rekombinant suşun XLD agarda H₂S oluşturmadağını bu yüzden de siyah merkezli olmayan saydam kolonilerin varlığını bildirmişlerdir. Bu durumun ise *aroA* gen delesyonuyla yakından ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Aynı şekilde Cooper ve ark. (1994a), TSI besiyerinde *aroA* mutantlarının H₂S üretememesinin sebebinin *aroA* gen delesyonu olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan tez çalışmasında da XLD agar ve TSI besiyerine yapılan ekimler sonucunda saha suşunda H₂S oluşumu gözlenirken, rekombinant suşta gözlenmemesiyle bu bulguların doğruluğu ispatlanmıştır.

aroA delesyonu hücre içi piruvat birikimine neden olur (Felgner ve ark., 2016). Tez çalışmasında saha suşundan farklı olarak H₂S dışında sitrat testi de negatif bulundu. Bu durumun piruvat dehidrogenaz enzim sisteminin oluşturulan mutasyondan etkilenmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ancak *aroA* gen delesyonu ve sitrat ilişkisi hakkında daha fazla araştırma yapılması fayda sağlayacaktır.

Mutant suşlar ile saha suşlarının koloni morfolojisinde farklılıklar olabilir. Sawitzke ark. (2007), selektif olmayan besiyerlerinde rekombinant suşları koloni morfolojisi ve bakteri üreme süresindeki değişikliklerin gözlenmesiyle saptamanın

mümkün olduğunu belirtmişlerdir. Tez çalışmasında ise rekombinant suşun kolonileri saha suşuna göre daha büyük, daha parlak ve farklı bir formda üremiş, ayrıca XLD agarda siyah merkezli olmayan şeffaf kolonilerin varlığı tespit edilmiştir. Bu bulgular Sawitzke ve ark. (2007)'ın gözlemi ile benzerlik göstermektedir.

aroA genindeki mutasyonlar bakterinin hareket özelliğinde farklı etkilere sebep olabilir. Sebkova ve ark. (2008), *aro* mutantlarının, aromatik amino asitleri sentezlemedeki yetersizlikleri nedeniyle hem konak içinde çoğalamadıklarını hem de sitoplazmik membran, dış zar veya periplazmik boşluk işlevinde de kusurlu olabileceğini, ayrıca bu mutantların, muhtemelen ubikinon ve menakinonların yetersiz üretimi nedeniyle hareket özelliğinde de kusurlar olabileceğini ifade etmişlerdir. Felgner ve ark. (2016), hücre zarı bütünlüğünün *Salmonella*'nın hareketliliğini etkilediğini buna göre ise *aroA* geninde delesyon yapılan suşlarda saha suşuna göre hareketin azaldığını ve *aroA* delesyonuyla beraber, sınıf III flagellar genlerin (örn. *fliC* ve *fliB*) ekspresyonunda azalmanın hareketi etkileyebileceğini belirtmişlerdir. Fakat flagellar genlerin ekspresyonunun, *S. Typhimurium aroA* mutant suşları SF102 ve SF101'de farklı şekilde düzenlendiğini de ifade etmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise saha suşu ve rekombinant suş arasında hareket özelliği bakımından herhangi bir farklılık tespit edilemedi. Fakat farklı *S. Typhimurium* suşlarında farklı mekanizmaların olabileceği ve konu hakkında ilave çalışmaların yapılması gerektiği düşünüldü.

aroA gen delesyonu yapılan mutant suşlar saha suşuna göre antibiyotiklere karşı daha duyarlı olabilirler. Felgner ve ark. (2016) ve Sebkova ve ark. (2008), değiştirilmiş gliserofosfolipidler ve ubikinon sentezinin bozukluklarının, dış zarın stabilitesine etki edebileceğini ifade etmişlerdir. Buna göre Felgner ve ark. (2016), *aroA* gen delesyonundan sonra suşta ampisiline karşı duyarlılığın artmasını dış zarın stabilitesinin bozulmasıyla ilişkilendirmişlerdir. Benzer şekilde Müştak ve Yardımcı (2019), *aroA* delesyonu yaptıkları *S. Infantis* suşunda ampisiline karşı duyarlılığın arttığını belirtmişlerdir. Yapılan bu tez çalışmasında da ampisiline karşı duyarlılığın artması ise bu bulguları destekler niteliktedir. Bunun dışında aynı nedenle ampisilinden ayrı olarak kullanılan penisilin grubu antibiyotiklerden amoksisiline

karşı duyarlılığı artarken, amoksisilin klavulonik asite ise dirençli durumdan duyarlı hale geldi. Ayrıca denenen üçüncü nesil sefalosporinlerden sefotaksime; diğer beta laktam antibiyotiklerden imipenem ve meropenem; aminoglikozidlerden streptomisin ve gentamisine; tetrasiklinlerden tetrasiklin ve oksitetrasikline; birinci kuşak kinolonlardan nalidiksik asite; ikinci kuşak kinolonlardan enrofloksasin ve siprofloksasine; fenikollerden kloramfenikole; sülfanamidlerden trimetoprim ve trimetoprim-sülfametoksazole ve polimiksinlerden polimiksin B antibiyotiklerine karşı daha duyarlı hale geldi. Polimiksinler, Gram-negatif bakterilerin dış zarının lipopolisakkariti (LPS) ile etkileşime girer ve dış zarda geçirgenlik değişikliklerine yol açan yıkıcı bir etki yapar (Zavascki ve ark, 2007). Bu bilgiye göre bu tez çalışmasında polimiksin B'ye karşı duyarlılığın artmasının *aroA* gen delesyonundan sonra dış zar stabilitesinin bozulmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tüm dünyada artan *S. Typhimurium* kaynaklı halk sağlığı sorunları yüzünden önemli bir rezervuar kaynağı olarak kabul edilen kanatlı hayvanlar oldukça önem kazanmaktadır. Aşılama, hastalığı önlemede en başarılı yöntemlerden biri olduğundan kanatlı hayvanların aşılınması bu anlamda oldukça faydalı olacaktır. Bu amaçla bu tez çalışmasında Türkiye’de ilk olmak üzere, *S. Typhimurium* etkenine yönelik lambda red rekombinasyon yöntemiyle *aroA* gen delesyonu yapılarak kanatlı hayvanlara yönelik aşı adayları suşlar oluşturuldu. Mutant aşı adayları suşlar birçok yönden incelendi ve saha suşundan farklı olan özellikleri değerlendirilerek yorumlandı.

Bu tez çalışması Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion kitinde belirtilen yöntem modifiye edilerek gerçekleştirildi. Buna göre, kitte önerilen adımlardan farklı olarak, hem optimizasyon amacıyla yapılan deneme sonuçlarına hem de çeşitli literatür bilgilerine göre değişiklikler yapıldı. Çalışmalar sonucunda, mutant suşun biyokimyasal testlerde H₂S oluşturmadığı ve sitrat negatif olduğu, genel besiyerlerinde standart ve saha suşlarına göre daha farklı koloni morfolojisine sahip olduğu ve yapılan antibiyogram testleri sonucu kullanılan birçok antibiyotiğe karşı daha da duyarlı hale geldiği belirlendi.

S. Typhimurium suşlarında *aroA* gen delesyonunun bakteri üzerinde açıklanmamış birçok etkileri olduğu göz önünde bulundurulduğunda bu konuda daha fazla çalışma yapılmasının yararlı olacağı sonucuna ulaşıldı.

Çalışma sonucunda oluşturulan mutant *S. Typhimurium* suşu örnek alınarak bu suшта başka genlere yönelik ve yine bu mutant suşu örnek alınarak ülkemizden izole edilen diğer hayvan hastalık etkenlerine yönelik olmak üzere lambda red rekombinasyon tekniği kullanılarak gen delesyonları yapıp mutant aşı adayları suşların oluşturulması önerilmektedir.

ÖZET

Kanatlı Hayvanlarda Potansiyel Aşı Adayı *Salmonella* Typhimurium Mutant Suşunun Geliştirilmesi

Enterobacteriaceae familyasının genel özelliklerini taşıyan *Salmonella* etkenleri özellikle kanatlı hayvanlarda neden oldukları hastalık ve verim düşüklüğü sebebiyle tüm dünyada oldukça önem kazanmaktadır. Artan halk sağlığı endişesi nedeniyle, *Salmonella*'nın gıda kaynaklı bulaşmasının önlenmesi, kanatlı hayvancılık sektörü için en önemli konuların başında gelmektedir. Özellikle *Salmonella* Typhimurium gibi non tifoidal zoonotik etkenlere yönelik koruma ve kontrol programlarının geliştirilmesi insan ve hayvan sağlığı için kritik bir rol oynamaktadır. Günümüzde aşı ile profilaktik korunma bulaşıcı hastalıklara karşı en etkili önlemlerden biri olduğundan, uygun aşılarda geliştirilmesi oldukça faydalı olacaktır. Kümes hayvanlarının aşılama, *Salmonella* kontrol programının bir parçası olarak, kanatlı sürülerinde *S. Typhimurium* prevalansının azaltılmasında önemli bir yoldur. Böylece gıda kaynaklı *Salmonella* enfeksiyonları azalacak ve gıdaların güvenli üretimi sağlanabilecektir.

Gen işlevinin gösterilmesi ve aşı üretimi amacıyla bazı genlerin delesyonları sağlanmıştır. Gen delesyon yöntemlerinden biri olan lambda red rekombinasyon yöntemi ise bu amacı gerçekleştirebilmek üzere çeşitli çalışmalarda uygulanmıştır. Bu çalışmada, kanatlı hayvan orijinli *S. Typhimurium* suşları seçilmiş ve bu suşlara Türkiye’de ilk kez lambda red yöntemiyle *aroA* gen delesyonu yapılarak mutant aşı adayları suşları geliştirilmesi sağlanmıştır. Geliştirilen mutant aşı adayları suşları saha suşlarıyla biyokimyasal özellikleri, koloni morfolojisi ve antibiyotik direnç profilleri gibi yönleriyle karşılaştırılarak incelenmiştir. Buna göre mutant suşları saha suşlarına göre H₂S oluşumu ve sitrat testi negatif bulunmuş, koloni morfolojisinde farklılıklar gözlemlenmiş ve kullanılan birçok antibiyotiğe karşı da duyarlılığın arttığı tespit edilmiştir.

Lambda red rekombinasyon yöntemiyle mutant aşı adayları suşları oluşturulduğu bu çalışma *S. Typhimurium* üzerinde başka genlere yönelik yapılabilecek delesyonlarda yol gösterici olacaktır.

Anahtar Sözcükler: Aşı, Kanatlı, Lambda Red, Mutant, *S. Typhimurium*.

SUMMARY

Development of Potential Vaccine Candidate *Salmonella* Typhimurium Mutant Strain in Poultry

Salmonella agents, which have the general characteristics of the *Enterobacteriaceae* family, are gaining importance all over the world due to the diseases and the low productivity they cause particularly in poultry. Due to the increasing public health concern, the prevention of foodborne transmission of *Salmonella* is one of the most important issues for the poultry industry. The development of protection and control programs for non-typhoidal zoonotic agents, especially *Salmonella* Typhimurium, plays a critical role for human and animal health. Since prophylactic protection with vaccines is one of the most effective measures against infectious diseases today, it will be very beneficial to develop appropriate vaccines. Poultry vaccination, as part of a *Salmonella* control program, is an important way to reduce the prevalence of *S. Typhimurium* in poultry flocks. Thus, foodborne *Salmonella* infections will decrease and safe production of food will be ensured.

Deletions of some genes have been provided for the purpose of demonstrating gene function and producing vaccines. Lambda red recombination method, which is one of the gene deletion methods, has been applied in various studies to achieve this goal. In this study, *S. Typhimurium* strains of poultry origin were selected and *aroA* gene deletion was performed on these strains for the first time in Turkey using lambda red method, and mutant vaccine candidate strain was developed. The developed mutant vaccine candidate strain was compared with the field strain in terms of biochemical properties, colony morphology and antibiotic resistance profiles. Accordingly, H₂S formation and the results of citrate test were found to be negative in mutant strains, colony morphology of mutant strains and that of wild type strains were observed to be different, and there was an increased sensitivity to many tested antibiotics in mutant strains compared to wild type strains.

This study, in which mutant vaccine candidate strain was created using lambda red recombination method, will lead the deletions that can be made for other genes on *S. Typhimurium*.

Keywords: Lamda Red, Mutant, Poultry, *S. Typhimurium*, Vaccine.

KAYNAKLAR

AFSHARI A, BARATPOUR A, KHANZADE S, JAMSHIDI A (2018). *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium identification in poultry carcasses. *Iran J Microbiol*, **10**: 45.

AKAN M (2008). Kanatlılarda *Salmonella* infeksiyonları ve kontrolünde temel prensipler. *Mektup Ankara*, **6**: 3-5.

AKBAR S, SCHECHTER LM, LOSTROH CP, LEE CA (2003). AraC/XylS family members, HilD and HilC, directly activate virulence gene expression independently of HilA in *Salmonella* Typhimurium. *Mol Microbiol*, **47**: 715-728.

ALDERTON MR, FAHEY KJ, COLOE PJ (1991). Humoral responses and salmonellosis protection in chickens given a vitamin-dependent *Salmonella* typhimurium mutant. *Avian dis*, **35**: 435-442.

ALMEIDA F, SERIBELLI AA, MEDEIROS MIC, DOS PRAZERES RODRIGUES D, DE MELLOVARANI A, LUO Y, FALCÃO J P (2018). Phylogenetic and antimicrobial resistance gene analysis of *Salmonella* Typhimurium strains isolated in Brazil by whole genome sequencing. *PloS One*, **13**: e0201882.

ANGRAND PO, DAIGLE N, VAN DER HOEVEN F, SCHÖLER HR, STEWART AF (1999). Simplified generation of targeting constructs using ET recombination. *Nucleic Acids Res*, **27**: e16-i.

AZARİ AA, SALEHİ TZ, FASAEİ BN, ALEBOUYEH M (2015). Gene disruption in *Salmonella* Typhimurium by modified λ Red disruption system. *Iran J Vet Res*, **16**: 301.

BALASUBRAMANIAN R, IM J, LEE JS, JEON HJ, MOGENI OD, KIM JH, RAKOTOZANDRINDRAINNY R, BAKER S, MARKS F (2019). The global burden and epidemiology of invasive non-typhoidal *Salmonella* infections. *Hum Vaccin Immunother*, **15**: 1421-1426.

BANDA MM, LÓPEZ C, MANZO R, RICO-PÉREZ G, GARCIA P, ROSALES-REYES R, BUSTAMANTE VH (2018). HilD and PhoP independently regulate the expression of grhD1, a novel gene required for *Salmonella* Typhimurium invasion of host cells. *Sci Rep*, **8**: 4841.

BARROW PA (2007). *Salmonella* infections: immune and non-immune protection with vaccines. *Avian Pathol*, **36**: 1-13.

BAUDIN A, OZIER-KALOGEROPOULOS O, DENOUEL A, LACROUTE F, CULLIN C (1993). A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **21**: 3329.

BEAMISH L, GREENWOOD R, PETTY K, PRESTON E (2004). Successful application of the λ -red recombinase system to inactivate lacI in *Escherichia coli* C29, BW25993 and MG1655. *J Exp Microbiol Immunol*, **12**: 94-99.

BRENNER FW, VILLAR RG, ANGULO FJ, TAUXE R, SWAMINATHAN B (2000). Salmonella nomenclature. *J Clinl Microbiol*, **38**: 2465-2467.

COOPER GL, VENABLES LM, WOODWARD MJ, HORMAECHE CE (1994a). Invasiveness and persistence of *Salmonella* enteritidis, *Salmonella* typhimurium, and a genetically defined *S. enteritidis* aroA strain in young chickens. *Infect Immun*, **62**: 4739-4746.

COOPER GL, VENABLES LM, WOODWARD MJ, HORMAECHE CE (1994b). Vaccination of chickens with strain CVL30, a genetically defined *Salmonella enteritidis* aroA live oral vaccine candidate. *Infect Immun*, **62**: 4747-4754.

DAR MA, AHMAD SM, BHAT SA, AHMED R, URWAT U, MUMTAZ PT, GANAI N (2017). *Salmonella* Typhimurium in poultry: a review. *Worlds Poult Sci J*, **73**: 345-354.

DAR MA, AHMED R, URWAT U, AHMAD SM, DAR PA, KUSHOO ZA, SHABIR N (2018). Expression kinetics of natural resistance associated macrophage protein (NRAMP) genes in *Salmonella* Typhimurium-infected chicken. *BMC Vet Res*, **14**: 1-11.

DATSENKO KA, WANNER BL (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci*, **97**: 6640-6645.

DATTA S, COSTANTINO N, ZHOU X (2008). Identification and analysis of recombineering functions from Gram-negative and Gram-positive bacteria and their phages. *Proc Natl Acad Sci*, **105**: 1626-1631.

DEKKER JP, FRANK KM (2015). Salmonella, Shigella, and Yersinia. *Clin Lab Med*, **35**: 225-246.

DESIN TS, KÖSTER W, POTTER AA (2013). *Salmonella* vaccines in poultry: past, present and future. *Expert Rev Vaccines*, **12**: 87-96.

DÓREA FC, COLE DJ, HOFACRE C, ZAMPERINI K, MATHIS D, DOYLE MP, MAURER JJ (2010). Effect of Salmonella vaccination of breeder chickens on contamination of broiler chicken carcasses in integrated poultry operations. *Appl Environ Microbiol*, **76**: 7820-7825.

DOS SANTOS AM, FERRARI RG, CONTE-JUNIOR CA (2018). Virulence factors in *Salmonella* Typhimurium: the sagacity of a bacterium. *Curr Microbiol*, **76**: 762-773.

FÀBREGA A, VILA J (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev*, **26**: 308-341.

FELGNER S, FRAHM M, KOCIJANCIC D, ROHDE M, ECKWEILER D, BIELECKA A, BUENO E, CAVA F, ABRAHAM WR, CURTISS R, HÄUSSLER S, ERHARDT M, WEISS S (2016). *aroA*-deficient *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is more than a metabolically attenuated mutant. *MBio*, **7**: e01220-16.

FOLEY SL, NAYAK R, HANNING IB, JOHNSON TJ, HAN J, RICKE SC (2011). Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. *Appl Environ Microbiol*, **77**: 4273-4279.

GAYET R, BIOLEY G, ROCHEREAU N, PAUL S, CORTHÉSY B (2017). Vaccination against *Salmonella* infection: the mucosal way. *Microbiol Mol Biol Rev*, **81**: e00007-17.

GORDON MA (2011). Invasive Non-typhoidal *Salmonella* Disease—epidemiology, pathogenesis and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis*, **24**: 484.

HE M, YANG ZY, NIE YF, WANG J, XU P (2001). A new type of class I bacterial 5-enopyruvylshikimate-3-phosphate synthase mutants with enhanced tolerance to glyphosate. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Gen Subj*, **1568**: 1-6.

HEGAZY WAH, HENSEL M. (2012). *Salmonella enterica* as a vaccine carrier. *Future Microbiol*, **7**: 111-127.

HELM RA, PORWOLLIK S, STANLEY AE, MALOY S, McCLELLAND M, RABSCH W, EISENSTARK A (2004). Pigeon-associated strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage type DT2 have genomic rearrangements at rRNA operons. *Infect Immun*, **72**: 7338-7341.

HERRERO-FRESNO A, WALLRODT I, LEEKITCHAROENPHON P, OLSEN JE, AARESTRUP FM, HENDRIKSEN RS (2014). The role of the st313-td gene in virulence of *Salmonella* Typhimurium ST313. *PLoS One*, **9**: e84566.

HERRMANN KM, WEAVER LM (1999). The shikimate pathway. *Annu Rev Plant Biol*, **50**: 473-503.

HILLYAR CR (2012). Genetic recombination in bacteriophage lambda. *Biosci Horiz: Int J Stud Res*, **5**.

HOISETH SK, STOCKER BAD (1981). Aromatic-dependent *Salmonella* typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature*, **291**: 238-239.

HOWARD AJ, CHOUSALKAR KK, McWHORTER AR (2018). In vitro and in vivo efficacy of a live attenuated *Salmonella* Typhimurium vaccine at preventing intestinal colonization in chicks. *Zoonoses Public Health*, **65**: 736-741.

HUSSEINY MI, HENSEL M (2008). Construction of highly attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium live vectors for delivering heterologous antigens by chromosomal integration. *Microbiol Res*, **163**: 605-615.

ISSENHUTH-JEANJEAN S, ROGENTIN P, MIKOLEIT M, GUIBOURDENCHE M, DE PINNA E, NAIR S, WEILL FX (2014). Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme. *Res Microbiol*, **165**: 526-530.

JAJERE SM (2019). A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Vet World*, **12**: 504.

KAPPERUD G, LASSEN J, HASSELTVEDT V (1998). *Salmonella* infections in Norway: descriptive epidemiology and a case-control study. *Epidemiol Infect*, **121**: 569-577.

KARLINSEY JE (2007). λ -Red genetic engineering in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Methods Enzymol*, **421**: 199-209.

LaROCK DL, CHAUDHARY A, MILLER SI (2015). *Salmonellae* interactions with host processes. *Nat Rev Microbiol*, **13**: 191-205.

LESIC B, RAHME LG (2008). Use of the lambda Red recombinase system to rapidly generate mutants in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Mol Biol*, **9**: 1-9.

LIU F, CAO Y (2018). Expression of a bacterial *aroA* gene confers tolerance to glyphosate in tobacco plants. *Turk J Biol*, **42**: 187-194.

LUO Y, KONG Q, YANG J, MITRA A, GOLDEN G, WANDA SY, CURTISS IIIR (2012). Comparative genome analysis of the high pathogenicity *Salmonella* Typhimurium strain UK-1. *Plos One*, **7**: e40645.

MALCOVA M, KARASOVA D, RYCHLIK I (2009). *aroA* and *aroD* mutations influence biofilm formation in *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiol Lett*, **291**: 44-49.

MASTROENI P, CHABALGOITY JA, DUNSTAN SJ, MASKELL DJ, DOUGAN G (2001). *Salmonella*: immune responses and vaccines. *Vet J*, **161**: 132-164.

McARTHUR JD, WEST NP, COLE JN, JUNGNTZ H, GUZMAN CA, CHIN J, LEHRBACH PR, DJORDJEVIC SP, WALKER MJ (2003). An aromatic amino acid auxotrophic mutant of *Bordetella bronchiseptica* is attenuated and immunogenic in a mouse model of infection. *FEMS Microbiol Lett*, **221**: 7-16.

McKELVIE ND, KHAN SA, KARAVOLOS MH, BULMER DM, LEE JJ, DeMARCO R, MASKELL DJ, ZAVALA F, HORMAECHE CE, ANJAM KHAN CM (2008). Genetic detoxification of an *aroA* *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strain does not compromise protection against virulent *Salmonella* and enhances the immune responses towards a protective malarial antigen. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **52**: 237-246.

MILLER CA, INGMER H, COHEN SN (1995). Boundaries of the pSC101 minimal replicon are conditional. *J Bacteriol*, **177**: 4865-4871.

MIR R, JALLU S, SINGH TP (2015). The shikimate pathway: review of amino acid sequence, function and three-dimensional structures of the enzymes. *Crit Rev Microbiol*, **41**: 172-189.

MOMBARG M, BOUZOUBAA K, ANDREWS S, VANIMISETTI H B, RODENBERG J, KARACA K (2014). Safety and efficacy of an *aroA*-deleted live vaccine against avian colibacillosis in a multicentre field trial in broilers in Morocco. *Avian Pathol*, **43**: 276-281.

MOSBERG JA, LAJOIE MJ, CHURCH GM (2010). Lambda red recombineering in *Escherichia coli* occurs through a fully single-stranded intermediate. *Genetics*, **186**: 791-799.

MURPHY KC (1998). Use of bacteriophage λ recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **180**: 2063.

MURPHY KC (2016). λ recombination and recombineering. *EcoSal Plus*, **7**(1).

MURPHY KC, CAMPELLONE KG (2003). Lambda Red-mediated recombinogenic engineering of enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli*. *BMC Mol Biol*, **4**: 1-12.

MUYRERS JP, ZHANG Y, TESTA G, STEWART AF (1999). Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Res*, **27**: 1555-1557.

MÜŞTAK İB, YARDIMCI H (2019). Construction and in vitro characterisation of *aroA* defective (*aroA* Δ) mutant *Salmonella* Infantis. *Arch Microbiol*, **201**: 1277-1284.

NAGARAJAN AG, BALASUNDARAM SV, JANICE J, KARNAM G, ESWARAPPA SM, CHAKRAVORTTY D (2009). SopB of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is a potential DNA vaccine candidate in conjugation with live attenuated bacteria. *Vaccine*, **27**: 2804-2811.

PARK SH, AYDIN M, KHATIWARA A, DOLAN MC, GILMORE D F, BOULDIN JL, AHN S, RICKE SC (2014). Current and emerging technologies for rapid detection and characterization of *Salmonella* in poultry and poultry products. *Food Microbiol*, **38**: 250-262.

PESINGI PK, KUMAWAT M, BEHERA P, DIXIT SK, AGARWAL RK, GOSWAMI TK, MAHAWAR M (2017). Protein-l-isoaspartyl methyltransferase (PIMT) is required for survival of *Salmonella* Typhimurium at 42 C and contributes to the virulence in poultry. *Front Microbiol*, **8**: 361.

PRAJAPAT MK, SAINI S (2012). Interplay between Fur and HNS in controlling virulence gene expression in *Salmonella* Typhimurium. *Comput Biol Med*, **42**: 1133-1140.

PRIESTMAN MA, FUNKE T, SINGH IM, CRUPPER SS, SCHÖNBRUNN E (2005). 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Staphylococcus aureus* is insensitive to glyphosate. *FEBS Lett*, **579**: 728-732.

PROROGA YTR, MANCUSI A, PERUZY MF, CARULLO MR, MONTONE AMI, FULGIONE A, CAPUANO F (2019). Characterization of *Salmonella* Typhimurium and its monophasic variant 1, 4,[5], 12: i:-isolated from different sources. *Folia Microbiol*, **64**: 711-718.

QUICK LN, SHAH A, WILSON JW (2010). A series of vectors with alternative antibiotic resistance markers for use in lambda Red recombination. *J Microbiol Biotechnol*, **20**: 666-669.

SAADE F, PETROVSKY N (2012). Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert Rev of Vaccines*, **11**: 189-209.

SÁNCHEZ-VARGAS FM, ABU-EL-HAJJA MA, GÓMEZ-DUARTE OG (2011). Salmonella infections: an update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Med Infect Dis*, **9**: 263-277.

SAWITZKE JA, THOMASON LC, COSTANTINO N, BUBUNENKO M, DATTA S, COURT DL (2007). Recombineering: in vivo genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica*, and beyond. *Methods Enzymol*, **421**: 171-199.

SAXENA M, SMOOKER PM, COLOE P (2015). Induction of crossover by introduction of aro554: Tn10 into Salmonella chromosome. *Front Biosci (Elite Ed)*, **7**: 423-433.

SEBKOVÁ A, KARASOVÁ D, CRHANOVÁ M, BUDINSKÁ E, RYCHLIK I (2008). aro mutations in *Salmonella enterica* cause defects in cell wall and outer membrane integrity. *J Bacteriol*, **190**: 3155-3160.

SHARAN SK, THOMASON LC, KUZNETSOV SG, COURT DL (2009). Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. *Nat Protoc*, **4**: 206-223.

SONGER JG, POST KW (2012). *Salmonella* Cinsi. In: Veteriner Hekimlik Mikrobiyolojisi Hayvan Hastalığı Etkeni Olan Bakteriler Ve Mantarlar, Çeviri Ed: Anğ Ö, Özgür NY. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi, Bölüm 16.

SPRINGER S, LINDNER T, AHRENS M, WOITOW G, PRANDINI F, SELBITZ HJ (2011). Duration of immunity induced in chickens by an attenuated live *Salmonella enteritidis* vaccine and an inactivated *Salmonella enteritidis*/typhimurium vaccine. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, **124**: 89-93.

SUN QY, DING LW, HE LL, SUN YB, SHAO JL, LUO M, XU ZF (2009). Culture of *Escherichia coli* in SOC medium improves the cloning efficiency of toxic protein genes. *Anal Biochem*, **394**: 144-146.

STALKER DM, HIATT WR, COMAI L (1985). A single amino acid substitution in the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase confers resistance to the herbicide glyphosate. *J Biol Chem*, **260**: 4724-4728.

SU L, CHIU C (2007). Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Med J*, **30**: 210.

SUEZ J, PORWOLLIK S, DAGAN A, MARZEL A, SCHORR YI, DESAI P, GAL-MOR O (2013). Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal *Salmonella* accounted for invasive disease in humans. *PLoS One*, **8**: e58449.

SUN YC, CHEN YC, TIAN ZX, LI FM, WANG XY, ZHANG J, XIAO ZL, LIN M, GILMARTIN N, DOWLING DN, WANG YP (2005). Novel *AroA* with high tolerance to glyphosate, encoded by a gene of *Pseudomonas putida* 4G-1 isolated from an extremely polluted environment in China. *Appl Environ Microbiol*, **71**: 4771-4776.

TAN S, GYLES CL, WILKIE BN (1997). Evaluation of an *aroA* mutant *Salmonella* typhimurium vaccine in chickens using modified semisolid Rappaport Vassiliadis medium to monitor faecal shedding. *Vet Microbiol*, **54**: 247-254.

THOMASON LC, COSTANTINO N, SHAW DV, COURT DL (2007). Multicopy plasmid modification with phage λ Red recombineering. *Plasmid*, **58**: 148-158.

TOYOTA-HANATANI Y, KYOUMOTO Y, BABA E, EKAWA T, OHTA H, TANI H, SASAI K (2009). Importance of subunit vaccine antigen of major Fli C antigenic site of *Salmonella enteritidis* II: a challenge trial. *Vaccine*, **27**: 1680-1684.

UZZAU S, FIGUEROA-BOSSI N, RUBINO S, BOSSI L (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Nat Acad Sci*, **98**: 15264-15269.

VALENTINE PJ, DEVORE BP, HEFFRON F (1998). Identification of three highly attenuated *Salmonella* Typhimurium mutants that are more immunogenic and protective in mice than a prototypical *aroA* mutant. *Infect Immun*, **66**: 3378-3383.

VIVAS J, RIAÑO J, CARRACEDO B, RAZQUIN BE, LÓPEZ-FIERRO P, NAHARRO G, VILLENA AJ (2004). The auxotrophic *aroA* mutant of *Aeromonas hydrophila* as a live attenuated vaccine against *A. salmonicida* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol*, **16**: 193-206.

WOLFENDEN RE, LAYTON SL, WOLFENDEN AD, KHATIWARA A, GAONAR-AMIREZ G, PUMFORD NR, HARGIS BM (2010). Development and evaluation of candidate recombinant *Salmonella*-vectored *Salmonella* vaccines. *Poult Sci*, **89**: 2370-2379.

YI SY, CUI Y, ZHAO Y, LIU ZD, LIN YJ, ZHOU F (2016). A novel naturally occurring Class I 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate synthase from *Janibacter* sp. confers high glyphosate tolerance to rice. *Sci Rep*, **6**: 1-11.

YU D, ELLIS HM, LEE EC, JENKINS, NA, COPELAND NG (2000). An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Nat Acad Sci*, **97**: 5978-5983.

ZAVASCKI AP, GOLDANI LZ, LI J, NATION RL (2007). Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother*, **60**: 1206-1215.

ZHANG Y, BUCHHOLZ F, MUYRERS JP, STEWART AF (1998). A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet*, **20**: 123-128.

ZHAO X, DAI Q, ZHU D, LIU M, CHEN S, SUN K, JIA R (2017). Recombinant attenuated *Salmonella* Typhimurium with heterologous expression of the *Salmonella* Choleraesuis O-polysaccharide: high immunogenicity and protection. *Sci Rep*, **7**: 7127.

ZHI Y, LIN SM, JANG AY, AHN KB, JI HJ, GUO HC, SEO HS (2019). Effective mucosal live attenuated *Salmonella* vaccine by deleting phosphotransferase system component genes *ptsI* and *crr*. *J Microbiol*, **57**: 64-73.