

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
(MRSA)'DAN ELDE EDİLEN FAJİN KARAKTERİZASYONU VE
FAJ KOMPONENTLERİNİ KULLANARAK İN VİTRO
REKOMBİNANT FAJ GELİŞTİRİLMESİ**

Dr. Özlem ULUSAN

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet KIYAN**

**ANKARA
2017**

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
(MRSA)'DAN ELDE EDİLEN FAJİN KARAKTERİZASYONU VE
FAJ KOMPONENTLERİNİ KULLANARAK İN VİTRO
REKOMBİNANT FAJ GELİŞTİRİLMESİ**

Dr. Özlem ULUSAN

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet KIYAN**

**ANKARA
2017**

KABUL VE ONAY

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

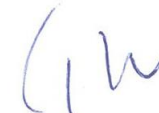
I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	: Özlem ULUSAN	Sınav tarihi: 01 / 11 / 2017
Anabilim/Bilim Dalı	: Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	
Tez Danışmanı	: Prof. Dr. Mehmet KIYAN	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)'dan Elde Edilen Fajın Karakterizasyonu ve Faj Komponentlerini Kullanarak İn vitro Rekombinant Faj Geliştirilmesi	
Tezin Niteliği:	
☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi	☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçınıcı tez sınavı olduğu:	
☒ 1	☐

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak	
☒ Kabulüne	
☐ Reddine	
☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
☒ Oy birliği	☐ Oy çokluğu
ile karar verilmiştir.	

IV. AÇIKLAMALAR


Jüri Başkanı
Prof. Dr. Mehmet KIYAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim/Bilim Dalı


Jüri Üyesi
Prof. Dr. Fikret ŞAHİN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim/Bilim Dalı


Jüri Üyesi
Prof. Dr. Jülide Sedef GÖÇMEN
TOBB ETÜ Üniversitesi

ÖNSÖZ

S.aureus ciddi sonuçlar doğurabilecek hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olan önemli bir patojen mikroorganizmadır. İlk keşfedilen antibiyotik olan penisilinden, son keşfedilen antibiyotik olan linezolid kadar birçok antimikrobiyale karşı direnç geliştirme potansiyeli mevcuttur. Bilinen bütün antibiyotiklere dirençli suşların ortaya çıkması araştırmacıları tekrardan faj tedavisine ve fajların zengin dünyasına yönlendirmiştir. Bu tezde yeni lizojenik bir bakteriyofaj tanımlanmış, gen ve protein haritası ortaya konmuştur. Böylece fajlara ait genomik veri bankasına katkıda bulunulduğu gibi genetik rekombinasyonlar yapılarak tedavi amacıyla kullanılabilecek yeni fajların oluşturulmasını sağlayacak lizojenik bir faj ortaya konmuştur.

Uzmanlık eğitimim boyunca benden her türlü konuda destek, anlayış ve bilgisini esirgemeyen değerli sorumlu hocam ve Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mehmet Kıyan'a,

Tez çalışmam sırasında bana yol gösterici olan ve laboratuvarından istediğim şekilde faydalanmamı sağlayan, çalışma azmi ve yenilikçi fikirlerini örnek aldığım Prof. Dr. Fikret Şahin'e,

Kendisinden çok şey öğrendiğim ve laboratuvar çalışmalarım sırasında bana destek olan Dr. Buse Türegün Atasoy'a,

Anabilim Dalımızın diğer öğretim üyeleri Prof. Dr. Aydın Karaarslan, Prof. Dr. Murat Özsan, Prof. Dr. Devran Gerçeker, Prof. Dr. Murat Aksoy, Prof. Dr. Alper Tekeli, Prof. Dr. İştâ Dolapçı, Prof. Dr. Zeynep Ceren Karahan, Doç. Dr. Gülay Aral Akarsu, Doç. Dr. Ebru Us ve Doç. Dr. Ebru Evren'e,

Asistanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan büyük zevk aldığım asistan arkadaşlarıma; özellikle Dr. Zeynep Sezgi Erdal ve Dr. Büşra Betül Özmen Çapın'a,

Hayat boyunca hep desteklerini arkamda hissettiğim, bugünlere gelmemde büyük emekleri olan çok değerli annem Yeter Ulusan ve babam Ali Ahmet Ulusan'a

Hayatımın her anında yanımda olan değerli dostlarıma teşekkür etmeyi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1.Stafilokoklar Hakkındaki Genel Bilgiler	4
2.2.Stafilokokların Yapısal Özellikleri	5
2.2.1.Kapsül ve Slime Tabakası	5
2.2.2.Peptidoglikan ve İlgili Enzimler.....	5
2.2.3.Teikoik asit ve Lipoteikoik asit	6
2.2.4.Yüzey Adezyon Proteinleri	6
2.2.5.Sitoplazmik Membran	6
2.3. Patogenez ve İmmünite.....	7
2.3.1.Stafilokokal Toksinler	7
2.3.1.1. Sitolitik Toksinler	7
2.3.1.2. Eksfoliyatif Toksinler	8
2.3.1.3. Enterotoksin	8
2.3.1.4. Toksik Şok Sendromu Toksini-I.....	8
2.3.1.5. Stafilokokal Enzimler	9
2.4. Epidemiyoloji.....	9
2.5. Bakteriyofajlar.....	10
2.5.1. Bakteriyofajların Tarihçesi	14
2.5.2. Bakteriyofajların Sınıflandırılması.....	15
2.5.3. Bakteriyofaj Aracılı Gen Aktarımı(Transdüksiyon ve Lizojeni	19
2.5.3.1. Generalize Transdüksiyon	19
2.5.3.2. Özelleşmiş Transdüksiyon.....	20
2.5.4. <i>S.aureus</i> Fajlarının Morfolojik Özellikleri.....	21

2.5.5. <i>S.aureus</i> Fajlarının Genomik Özellikleri	22
2.5.6. Bakteriyofajların <i>S.aureus</i> Patogenezindeki Rolü	25
2.5.7. Faj Aracılı Virulans Faktörleri	26
2.5.7.1. Faj Aracılı Virülans Faktörlerinin Taşınması-SaPIS	
Patojenite Adacıkları.....	26
2.5.8. Faj Tedavisi	27
2.5.9. Fajların Diğer Kullanım Alanları.....	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. <i>S.aureus</i> Suşu	35
3.2. Gereçler.....	35
3.2.1. Besiyerleri	35
3.2.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler	35
3.2.3. Sarf Malzemeleri	36
3.2.4. Araçlar.....	36
3.2.5. <i>S.aureus</i> Suşlarının Üretilmesinde Kullanılan Besiyerleri.....	37
3.3. <i>S.aureus</i> Suşunun Üretilmesi	41
3.4. Lizojenik Fajların İndüklenmesi ve İzolasyonu	41
3.5. Lizojenik Fajlardan DNA Ekstraksiyonu	42
3.6. Lizojenik Faj DNA'larının Konsantre Edilmesi ve Temizlenmesi	42
3.7. Lizojenik Faj DNA'sının <i>Hind III</i> ile Kesilmesi.....	43
3.8. Kesilen Lizojenik Faj DNA'larının Elektroforezi.....	44
3.9. Faj DNA Parçalarının Jelden Ekstrakte Edilmesi	44
3.10. İnsertlerin pBluescript SK (pBSK) İçerisine Klonlanması	45
3.11. pBSK İçerisine Klonlanmış İnsertlerin Transformasyonu	46
3.12. Plazmid Ekstraksiyonu (Alkalın lizis yöntemi)	48
3.13. Plazmidlerin <i>Hind III</i> Restriksiyon Enzimi İle Kesilerek	
Doğru Klonlama Olan Plazmidlerin Seçilmesi	49
3.14. Büyük Volümlerde Plazmid Ekstraksiyonu (Large Prep Yöntemi)	49
4. BULGULAR.....	52
5. TARTIŞMA.....	66
5.1. Fajın Morfolojik Özellikleri.....	67
5.2. Faj Genomunun Özellikleri.....	68

5.3. <i>Caudovirales</i> Sınıfı Fajların Özellikleri	74
6. SONUÇ	80
ÖZET	81
SUMMARY	83
KAYNAKLAR	85



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µl:mikrolitre

µm:mikrometre

⁰C: santigrat derece

BHB: Beyin kalp sıvısı

CRF: Coagülase reacting factor

Da: Dalton

dH₂O: Distile su

ddH₂O: Çift distile su

DNA: Deoksiribonükleik asit

dk: Dakika

dsRNA: Çift iplikli ribonükleik asit

EDTA: Etilendiamin tetra asetik asit

ETA: Eksfoliyatif toksin A

ETB: Eksfoliyatif toksin B

g: Gram

kbp: Kilobaz çifti

KNS: Koagülaz negatif stafilokok

KOAc: Potasyum asetat

LB: Luria broth

Lt: Litre

M: Molar

ml: Mililitre

MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*

nm: Nanometre

PBP: Penisilin bağlayan protein

PBP2a: Penisilin bağlayan protein 2a

pBSK: pBlueScriptSK

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

PEG: Polietilen glikol

PVL: Panton valentin lökositini

RFLP: Restriction Fragment Length Polimorfism
RNA: Ribonükleik asit
rpm: Rounds per minute
sak: Stafilokinaz
SaPIs: *Staphylococcus aureus* Patojenite Adacıkları
SCC: Stafilokokal kaset kromozomu
SDS: Sodyum dodesil sülfat
SiO₂: Silisyum dioksit
Spa: Staphylococcal protein a
ssDNA: Tek iplikli deoksiribonükleik asit
ssRNA: Tek iplikli ribonükleik asit
TAE: Tris asetik asit etilendiamin tetra asetik asit
TSST-1: Toksik şok sendromu toksini 1
UV: Ultraviyole
VRSA: Vankomisine dirençli *Staphylococcus aureus*

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.MRSA suşlarından elde edilen 43 lizojenik fajın RFLP paterni	3
Şekil 2.1.Litik ve lizojenik fajların yaşam siklusu	13
Şekil 2.2.Bazı fajların elektron mikroskopik görüntüsü	17
Şekil 2.3.Kuyruklu faj ailelerinin şematik görüntüsü	18
Şekil 2.4.Generalize transdüksiyon	20
Şekil 2.5.Özelleşmiş transdüksiyon	21
Şekil 2.6.Farklı faj ailelerine ait stafilokoksik fajların şematik görünümü ve serogruplara göre değişen morfolojik yapısı	22
Şekil 2.7. <i>Siphoviridae</i> , <i>Podoviridae</i> ve <i>Miyoviridae</i> ailelerine ait olan fajların gen haritası	25
Şekil 2.8.Faj display tekniği	34
Şekil 3.1. pBSK plazmidine ait şematik görüntü.....	46
Şekil 3.2.Mavi-beyaz tarama testinde kullanılabilecek bir örnek plazmid	47
Şekil 4.1.Faj ekstraksiyonu sonucunda elde edilen faj DNA'sı	52
Şekil 4.2. <i>Hind III</i> ile kesilmiş faj DNA'sı	53
Şekil 4.3.Jelden ekstrakte edilen insertlere ait fotoğraf	54
Şekil 4.4.Miniprep sonuçları	55
Şekil 4.5.Minipreplerin kesimleri	56
Şekil 4.6.Sekans analizi için gönderilen klonlanmış plazmidler	57
Şekil 4.7.İnsert 4'e ait sekans analizi sonucu	58
Şekil 4.8.Sırasıyla insert 3, 2 ve 1'in sekans analizi sonuçları.....	60
Şekil 5.1.MRSA ϕ sml lizojenik bakteriyofajındaki ORF'leri ve kodladıkları proteinleri gösteren şematik görüntü	72
Şekil 5.2. <i>Podoviridae</i> ailesindeki fajlarda gen haritası.....	73
Şekil 5.3. MRSA ϕ sml lizojenik bakteriyofajının farklı restriksiyon enzimleri ile kesim noktaları	74

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Bakteriyofajların antibiyotiklerle karşılaştırılması	28
Tablo 3.1. Sekans analizi için kullanılan primerler	51
Tablo 5.1. MRSA ϕ sml lizojenik bakteriyofajına ait genom özellikleri.....	69
Tablo 5.2. MRSA ϕ sml lizojenik bakteriyofajına ait ORF'lerin özellikleri	70



1.GİRİŞ

Staphylococcus aureus hastane veya toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olabilen ve oldukça ciddi sonuçlar doğurabilen önemli bir patojen mikroorganizmadır (Franklin ve Lowy, 1998). Hastane kökenli *S. aureus* kan dolaşımı, cilt, yumuşak doku ve alt solunum yolu kaynaklı enfeksiyonlara neden olabileceği gibi santral venöz kateter aracılı bakteriyemi, ventilatör ilişkili pnömoni, endokardit ve osteomyelit etkeni olabilir. Ayrıca besin zehirlenmelerine, stafilokokal haşlanmış deri sendromuna, toksik şok sendromuna yol açabilmektedir. Hospitalize hastalarda enfeksiyon baskılanmış bağışıklık sistemine bağlı olarak kateter ve enjeksiyon gibi invaziv işlemler sonucunda gelişmektedir. *S.aureus* antimikrobiyal ilaçlara direnç geliştirebilme potansiyeli yüksek olan bir mikroorganizmadır. En eski antibiyotiklerden olan penisilinden, en yeni antibiyotiklerden olan linezolid kadar kazanılmış direnci mevcuttur (Tsiotras ve ark., 2001; Pillai ve ark., 2002). Çoklu ilaç dirençli *S.aureus* stafilokokal enfeksiyonların tedavisinde büyük zorluklar yaşanmasına neden olmaktadır.

Metisilin 1960 yılında keşfedilmiştir ve bundan sadece bir yıl sonra Metisilin dirençli *S.aureus* (MRSA) salgınlar yapmaya başlamış, hem hastanelerde hem toplumda hızla yayılmıştır (Barber, 1961). Yapılan bir araştırmaya göre Amerika Birleşik Devletleri'nde yoğun bakım ünitelerindeki MRSA prevalansı %60'lara ulaşmıştır (NNIS report, 2004) ve bunların 90.000 tanesi MRSA'ya bağlı invaziv enfeksiyonlardır.

Metisilin direncinden *mecA* ve daha nadiren *mecC* geni tarafından kodlanan Penisilin Bağlayan Protein 2a (PBP2a) sorumludur. Bu genin varlığında bakteriler metisilin ve diğer beta laktam antibiyotiklerin varlığında üreyebilir. *MecA* geni stafilokokal kaset kromozomu (SCC) üzerinde yer alan mobil bir genetik elemandır. Günümüze kadar 11 tane farklı SCCmec tanımlanmıştır (Oliveira ve ark., 2001). MRSA yayılımı stafilokokal kaset kromozomu üzerinde yer alan *mecA* genlerinin horizontal transferi yoluyla gerçekleşmektedir.

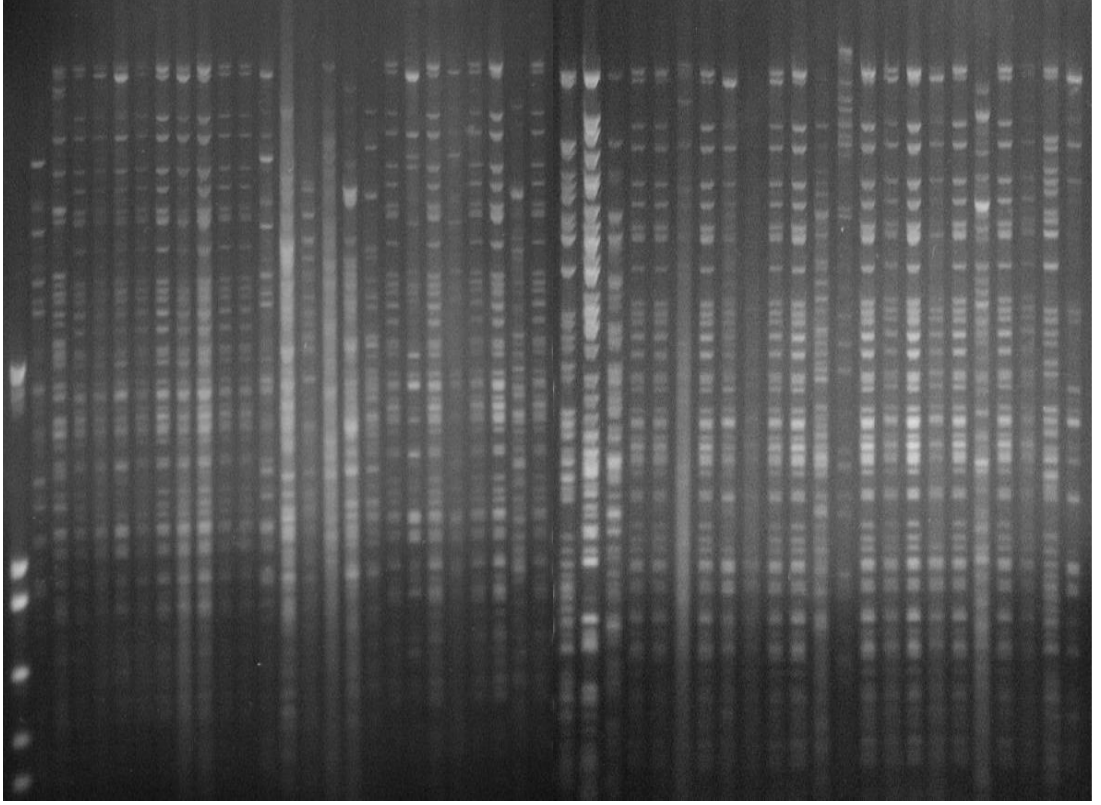
MRSA'lar tedavilerinde kullanılan vankomisine direnç kazanmaya başlamıştır. Vankomisin dirençli *S. aureus* (VRSA) kaynaklı ilk hastane enfeksiyonu transfer edilebilen VanA genine bağlı olarak 2002 yılında Amerika'da görülmüştür (Weigwl ve ark., 2003). Bundan sonra VRSA'nın etken olduğu klinik enfeksiyonlar birçok ülkede yaygın olarak görülmeye başlanmıştır (Palazzo ve ark., 2005; Tiwori ve San, 2006).

Mevcut olan bütün antimikrobiyallere dirençli *S.aureus* suşlarının ortaya çıkması buna karşın yeni antibiyotik geliştirilememesi araştırmacıları antibiyotiklerin keşfi ile popülerliğini kaybetmiş olan faj tedavisine yönlendirmiştir (Hsiesh ve ark., 2011).

Bu amaçla 1950 yıllarına kadar kullanılan fajlar temel olarak bakterinin direkt olarak ölmesini sağlayan litik özelliği olan fajlardır. Bu terapi yönteminin bakterilerin ani ölümüne bağlı olarak endotoksik şok gibi istenmeyen etkileri olduğu bilinmektedir. Rekombinant teknolojinin gelişimi bakteri ölümünü kontrollü olarak sağlayabilecek gen materyalleri bulunduran lizojenik rekombinant fajların oluşturulması fikrini ortaya çıkarmıştır. Bunun için manüplasyonu kolay küçük boylarda fajlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Şahin ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada MRSA suşlarından elde edilen fajlara Restriction Fragment Length Polimorfism (RFLP) yapılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde bir MRSA suşunda diğer fajlardan çok daha küçük boyutta lizojenik bir bakteriyofaj tesbit edilmiş ve MRSA ϕ sml (small) olarak adlandırılmıştır. RFLP'ye ait jelin görüntüsü şekil 1.1'de verilmiştir.

Bu çalışmada MRSA ϕ sml lizojenik bakteriyofajının genom haritasının çıkarılması, fajlara ilişkin bilgi bankasına katkıda bulunulması ve genom haritası kullanılarak faj tedavisinde kullanılabilecek lizojenik rekombinant fajların oluşturulma potansiyelini araştırmak amacıyla elde edilen fajın tanımlanması amaçlanmıştır.



Şekil 1.1. MRSA suşlarından elde edilen 43 lizojenik fajın RFLP paterni

1.1000 bp marker, 2.MRSA ϕ sml lizojenik bakteriyofajının *Hinf III* ile kesilmiş RFLP paterni, 3-43.Diğer MRSA suşlarından elde edilen lizojenik fajların *Hinf III* ile kesilmiş RFLP paterni-Djursun Karasartova 1055427 nolu tezinden alınmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Stafilokoklar Hakkında Genel Bilgiler

Stafilokoklar morfolojik olarak üzüm salkımına benzeyen gram pozitif mikroorganizmalardır. Ancak klinik örneklerdeki mikroorganizmalar tekli, ikili veya kısa zincirler halinde bulunabilirler. Fakültatif anaerop mikroorganizmalardır, 18-40°C aralığında ve %10'luk NaCl varlığında üreyebilirler. Dezenfektanlara ve antimikrobiyal ilaçlara karşı dirençlidirler (Topçu ve ark., 2017).

Stafilokok cinsi içinde 49 adet tür, 27 alt tür bulunmaktadır. Bu bakteriler cilt ve müköz membranların florasında bulunurlar. *S.aureus* burun boşluğunda, *S.capitis* sebase bezlerin bol bulunduğu yerlerde (alın bölgesi gibi), *S.haemolyticus* ve *S.hominis* koltuk altı gibi apokrin glandların olduğu alanlarda bulunmaktadır. Stafilokokların neden olduğu hastalıklar basit enfeksiyonlardan hayatı tehdit eden enfeksiyonlara kadar uzanan geniş bir yelpazede seyretmektedir. Cilt, yumuşak doku, üriner sistem veya kemik tutulumu yapabilirler. İnsanlarda en sık enfeksiyona neden olan türler; *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.lugdunensis*, *S.saprophyticus*'tur. Bunlardan en virülan olanı ve en iyi bilineni *S.aureus*'tur. Özellikle MRSA'lar hem hastane hem de toplum kaynaklı ciddi seyirli enfeksiyonlara neden olmaktadır (Murray ve ark.,2016).

S.aureus kolonileri altın sarısı renğinde karetonoid pigment oluşturan mikroorganizmalardır ve tür adı buradan gelmektedir. Aynı zamanda koagülaz enzimi üreten türler arasında ilk sıradadır ve bu enzimin tayini tanısal amaçlı kullanılmaktadır. Tek koloni *S.aureus* plazma içerisinde çözündüğü zaman, koagülaz enzimi bir serum faktörüne bağlanır ve bu kompleks tarafından fibrinojen fibrine dönüştürülür. Bu işlem sonucunda pıhtı oluşumu görülmektedir. Diğer birçok tür koagülaz enzimi üretmez ve Koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) olarak tanımlanırlar. Bu ayrımı yapmak oldukça kullanışlıdır. Çünkü KNS'ler daha az virülandır ve genellikle fırsatçı enfeksiyonlara neden olurlar (Murray ve ark., 2016; Tille PM, 2014 ve Topçu ve ark., 2017).

2.2.Stafilokokların Yapısal Özellikleri

2.2.1.Kapsül ve Slime Tabakası

Çoğu stafilokokun hücre duvar yapısının dışında bir polisakkarit kapsül bulunur. *S.aureus*'un 11 adet kapsüler serotipi bulunmaktadır. Serotip 1 ve 2'nin çok kalın kapsülleri bulunmaktadır, mukoid koloni oluşumuna neden olurlar ve nadiren insanlarda enfeksiyon etkeni olarak görülürler. Serotip 5 ve 8 insanlarda hastalığa neden olan başlıca türlerdir. Kapsül polimorfonükleer lökositlerin fagositozunu önleyerek virülansa katkıda bulunmaktadır. Proteinlerden, küçük peptitlerden ve monosakkaritlerden oluşan ve suda çözünebilir özellikteki biyofilm yapısı stafilokoklarda bulunmaktadır. Bu yapı bakterinin kateterlere, şantlara, protezlere tutunmasını kolaylaştırmakta; özellikle KNS'lerin etken olarak görüldüğü fırsatçı enfeksiyonlara zemin hazırlamaktadır (Murray ve ark., 2016; Tille PM, 2014).

2.2.2.Peptidoglikan Yapı ve İlişkili Enzimler

Gram pozitif bakterilerin hücre duvar yapısı oldukça önemlidir, çünkü birçok antibiyotiğin hedefi hücre duvar yapısında yer almaktadır. Hücre duvar ağırlığının yarısını peptidoglikanlar oluşturmaktadır. Peptidoglikan tabaka N-asetil muramik asit ve N-asetil glikozaminden meydana gelen bir glikan zincirinden oluşmuştur. N-asetil muramik asitlere peptid köprüleriyle bağlanan oligopeptid yan zincirler vardır. Gram pozitiflerin hücre duvarı çok sayıda çapraz bağ içeren rijid yapıdadır ve gram negatif bakterilerin hücre duvarından çok daha kalın bir yapıya sahiptir. Hücre duvar yapısının sentezinden sorumlu olan enzimlere penisilin bağlayan proteinler (PBP) denmektedir. Çünkü bu enzimler penisilin ve diğer beta laktam antibiyotiklerin hedefidir (Murray ve ark., 2016).

S.aureus hücre duvarında bulunan peptidoglikan, endotoksin benzeri özellik göstermektedir. Monositlerden IL-1 salınımını, kompleman aktivasyonunu, opsonik antikorların üretimim indüklemektedir. Makrofajlardaki toll-like reseptörlerle

etkileşime girerek fagositik hücrelerden proinflamatuvar sitokinlerin salınımını uyarmaktadır (Topçu ve ark., 2017).

2.2.3.Teikoik Asit ve Lipoteikoik Asit

Teikoik asit hücre duvarının diğer önemli bileşenidir. Teikoik asit türe spesifik olup, peptidoglikan tabaka veya sitoplazmik membrandaki lipitlere bağlanan fosfat polimerlerinden oluşur. Teikoik asitler zayıf immünojen olmalarına rağmen, peptidoglikana bağlandıklarında spesifik bir antikor cevabı oluştururlar. Teikoik asite karşı antikor oluşumu *S.aureus* enfeksiyonları için önceki zamanlarda tanısal olarak kullanılmış olmasına karşılık, son zamanlarda duyarlılığı düşük olduğu için terk edilmiştir (Murray ve ark., 2016).

Mukozal hücrelere yapışma ve kompleman aktivasyonunda rol oynamaktadır (Topçu ve ark., 2017)

2.2.4.Yüzey Adezyon Proteinleri

Fibronektin, fibrinojen, elastin, kollojen gibi matriks proteinlerine tutunan adezyon proteinlerine sahiptir. Stafilokokal protein A (Spa) IgG1, G2 ve G4'ün Fc reseptörlerine tutunmaktadır. Fibronektin binding protein A adından da anlaşılacağı üzere fibronektine bağlanmakla birlikte, *S.aureus* yüzey protein A'nın rolü bilinmemektedir (Murray ve ark., 2016).

2.2.5.Sitoplazmik Membran

Sitoplazmik membran protein, yağ ve karbonhidratlardan oluşan ve hücre için osmotik bir bariyer olarak rol alan bir yapıdır. Aynı zamanda bakterinin biyosentez ve solunumla ilgili enzimlerini bulundurmaktadır (Murray ve ark., 2016).

2.3.Patogenez ve İmmünite

2.3.1.Stafilokokal Toksinler

S. aureus beş tane önemli sitolitik veya membran hasarına yol açan toksin [alfa, beta, gama, delta ve Panton Valentin lökositini (PVL)], iki tane eksfoliyatif toksin (ETA ve ETB), sayısız enterotoksin (A'dan E'ye kadar, G'den X'e kadar toksinler) ve toksik şok sendromu toksini 1 (TSST-1) içermektedir. Sitolitik toksinler hemolizin olarak bilinmektedir. Bu yanlış bir tanımlamadır. Çünkü PVL eritrositleri parçalayamamaktadır. Alfa, beta, gama ve delta toksinlerin ise tek işlevi eritrositlerin parçalanması değildir (Murray ve ark.,2016).

Sitotoksinler nötrofilleri parçalayarak içlerindeki lizozomal enzimleri açığa çıkarabilirler. PVL nekrotizan cilt ve akciğer enfeksiyonlarına neden olabilmektedir. ETA, enterotoksinler ve TSST-1 süperantijen niteliğindeki toksinlerdir (Murray ve ark.,2016).

2.3.1.1.Sitolitik toksinler

Alfa toksin hem kromozom hem de plazmid üzerinde kodlanabilen 33.000 Da büyüklüğünde bir peptid yapıdır. Eritrosit, lökosit, hepatosit ve trombositlerde parçalanmaya neden olurken, kan damarlarındaki düz kas hücrelerine de zarar vermektedir (Murray ve ark., 2016).

Beta toksin diğer adıyla sfingomiyelinaz C, 35.000 Da büyüklüğünde ısı değişken bir peptittir. Eritrosit, fibroblast, lökosit ve makrofajlar üzerinde toksik etki gösterir. Duyarlı hücrelerdeki membran fosfolipitlerine etki eder ve hücre türlerine bağlı değişken etki göstermektedir. Özellikle düşük sıcaklıklarda etki göstermesi sebebiyle diğer hemolizine göre etkinliği daha azdır (Murray ve ark., 2016).

Delta toksin tüm *S.aureus* türleri tarafından üretilen, 30.000 Da büyüklüğünde bir polipeptittir. Etkinliği geniştir; eritrositleri, birçok memeli hücrelerini ve hücre içi

komponentleri lize edebilmektedir(Murray ve ark.,2016).

Gamma toksin ve PVL iki komponent içeren toksinlerdir. Her iki toksin de nötrofil ve makrofajları parçalayabilir. Ancak PVL hemolitik özellik göstermez (Werthein ve ark., 2005). PVL toplum kaynaklı nekrotizan akciğer enfeksiyonlarına ve bulaşıcı cilt enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Labandeira-Rey ve ark., 2007).

2.3.1.2.Eksfoliyatif toksinler

Stafilokokal haşlanmış deri sendromu eksfoliyatif toksin tarafından oluşturulan bir eksfoliyatif dermatit sendromudur. ETA ve ETB olmak üzere iki tane toksin vardır. *S.aureus* türlerinin %5'inden azı eksfoliyatif toksin oluşturmaktadır. ETA faj tarafından oluşturulan ısı kararlı bir toksin iken, ETB plazmid tarafından kodlanan ısı değişken bir toksindir. Bu toksinler derinin stratum granulosum tabakasındaki desmosomlarda yer alan desmoglein 1'i parçalayan serin proteazlardır. Stafilokokal haşlanmış deri sendromu genellikle küçük çocuklar ve genç erişkinlerde görülür (Murray ve ark.,2016; Topçu ve ark., 2017).

2.3.1.3.Enterotoksin

Çok sayıda stafilokokal enterotoksin bulunmaktadır. Enterotoksin A besin zehirlenmelerinden sorumlu iken, enterotoksin C ve D kontamine sütlerde bulunur, enterotoksin B yenidoğanlarda psödömembranöz enterokolit gelişimine neden olmaktadır. 100°C'ye otuz dakika dayanabilen, gastrik ve jejunal enzimlerin hidrolizine dirençli toksinlerdir. *S.aureus*'ların %30-50'si tarafından oluşturulurlar ve süperantijen niteliğinde toksinlerdir (Murray ve ark.,2016).

2.3.1.4. TSST-1

TSST-1 ısıya ve proteolize dirençli, 22.000 Da büyüklüğünde kromozom tarafından kodlanan, süperantijen niteliğinde bir toksindir. Sıklıkla menstrüasyonla ilgili toksik şok sendromuna neden olmaktadır. Vagina veya yara yerlerindeki mukozal

bariyerlere penetre olmakta ve bu nedenle sınırlı bir alanda kalmasına rağmen hipovolemik şok veya çoklu organ yetmezliği gibi sistemik etkilere yol açmaktadır, aynı hastalık *Streptococcus pyogenes* tarafından da oluşturulabilmektedir (Murray ve ark.,2016).

2.3.1.5.Stafilokokal Enzimler

Stafilokoklarda bağlı ve serbest olmak üzere iki tane koagülaz enzimi vardır. Hücre duvarında bulunan bağlı koagülaz enzimi doğrudan fibrinojeni fibrine dönüştürüp pıhtı oluşumuna yol açar. Bağlı koagülaz enzimini saptamak amacıyla lamda koagülaz testi yapılmaktadır. Serbest koagülaz enzimi hücre içinde bir coagulase reacting factor (CRF)'e bağlanarak stafilotrombin oluşturur. Oluşan bu yapı da fibrinojeni fibrine dönüştürür ve pıhtı oluşumu meydana gelir. Serbest koagülaz enzimi saptamak amacıyla tüpte koagülaz testine başvurulmaktadır. Koagülaz enzimi sayesinde stafilokok abselerinin etrafında oluşan fibrin, bakterinin fagositozdan korunmasına yardımcı olmaktadır. *S.lugdunensis* ve *S. schleiferi* lamda koagülaz testi pozitif olan mikroorganizmalardır. *S.aureus*'tan ayırt edebilmek için tüpte koagülaz testine başvurulmalıdır (Murray ve ark.,2016; Topçu ve ark., 2017).

Stafilokoklar daha birçok enzim üretmektedir. Bunlardan bazıları hiyalüronidaz, lipaz, nükleaz ve fibrinolizindir (Murray ve ark., 2016).

2.4.Epidemiyoloji

Stafilokoklar doğada oldukça yaygın olarak bulunmaktadır. Vücudun nemli katlantı bölgelerinde *S.aureus* geçici olarak kolonize olmaktadır. Göbekte, ciltte ve neonatallerin perianal bölgesinde *S.aureus* kolonizasyonu görülmektedir. Normal sağlıklı yetişkinlerin %15'inde *S.aureus* ile nazofarenks kolonizasyonu vardır. Bu oran hastanede yatanlarda, sağlık personelinde, ekzematöz cilt lezyonları olanlarda, tekrarlayan intravenöz girişim yapılanlarda daha fazladır (Murray ve ark.,2016).

Özellikle burun delikleri *S.aureus* kolonizasyonunun yaygın olarak görüldüğü yerlerdir. Kişilerin %20-30'unda *S.aureus* ile devamlı kolonizasyon varken, %30'unda geçici kolonizasyon görülmektedir (Murray ve ark.,2016). Kolonizasyon immün sistem baskılandığı anda enfeksiyon gelişimine yol açabilen potansiyel bir kaynak olarak rol oynamaktadır (Kluytmans ve ark., 1997). Stafilocokal enfeksiyonlara neden olan izolatların sıklıkla hastaların floralarında kommensal olarak bulunan suşlar olduğu gösterilmiştir (Tille PM, 2014).

Stafilocoklar dezenfektanlara, yüksek sıcaklıklara, antiseptik maddelere duyarlı iken, kuruluğa karşı oldukça dirençlidir. Duyarlı kişiye doğrudan temasla bulaşabileceği gibi kontamine malzemeler aracılığıyla da bulaş olabilir (Murray ve ark.,2016).

1980'lerden itibaren hastanede yatan kişilerde MRSA enfeksiyonları yayılmaya başlamış ve bu durum tedaviyi tamamen değiştirmiştir. Önceleri MRSA'ya bağlı toplum kaynaklı enfeksiyonlar çok fazla görülmüyorken, 2003 yılından itibaren toplum kaynaklı akciğer ve cilt enfeksiyon etkenleri arasında saptanmaya başlanmıştır. Günümüzde toplum kaynaklı suşlarla hastane enfeksiyonları görülebilmekte ve bu durum hastane kontrol politikalarını güçleştirmektedir (Murray ve ark.,2016).

2.5.Bakteriyofajlar

Virüsler ışık mikroskopu altında görülemeyen ve ince porselen filtrelerden dahi geçebilen oldukça küçük mikroorganizmalardır. Hayvanları, bitkileri, böcekleri ve bakterileri enfekte edebilme kapasitesine sahiptirler. Sadece deoksiribonükleik asit (DNA) veya ribonükleik asit (RNA)'ten oluşan genomik yapıları, kapsit adı verilen stabil bir protein örtü ile kaplanmaktadır. Bazı virüslerde ilave olarak karbonhidrat, lipit ve ilave proteinlerden oluşan yapılar da bulunmaktadır. Sadece kapsit ile çevrili olanlara “zarfsız” veya “çıplak” virüs denmektedir. Protein kapsitin etrafında konak hücre membranından ayrılırken kazanılan lipit yapıda zarf olan virüslere ise “zarflı”virüsler adı verilmektedir (Kurtboke, 2012).

Her virüs canlı organizmalardaki konak hücre adı verilen belli hücre tiplerini enfekte etme özelliğine sahiptir. Birçok hastalığın nedeni virüslerin neden olduğu hücre parçalanmasıdır. Yeteri kadar hücre öldüğünde kişilerde semptomlar meydana gelmeye başlamaktadır. Ancak konak hücre savunma mekanizmalarına rağmen çoğalmaya devam eden virüs latent enfeksiyon şeklinde seyredebileceği gibi kronik enfeksiyon şeklinde olabilir. Latent enfeksiyona neden olan virüsler (*Herpesviridae* gibi) hücre içinde latent olarak kalırlar ve hastanın immün sistemi baskılandığı zaman reaktif olarak ataklara sebep olurlar (Shors ve ark., 2008).

Virüslerin hücre dışında ve hücre içinde olmak üzere iki adet yaşam fazı vardır. Hücre dışında bulunan zor koşullara uzun süre dayanabilen durağan formlarına “virion” adı verilmektedir. Replikasyon ve protein sentezi için gerekli enzimlerden yoksun oldukları için hücre dışında tek başlarına çoğalamazlar. Hücre yüzeylerinde kendileri için spesifik reseptörleri bulunduran konak hücreleri enfekte edebilirler. Bu reseptörler biyokimyasal ve metabolik yollarda görevli yüzey molekülleridir. Bağlanma gerçekleştikten sonra virüsün hücre içine girmesi ikinci aşamayı oluşturmaktadır. Hem zarflı hem zarfsız virüsler endositoz mekanizmalarını kullanarak hücre içine girerler (Lopez ve Arias, 2010). Sonrasında endositik vakuoller replikasyonun gerçekleşebileceği en ideal yer olan perinükleer bölgeye göç ederler ve viral partikülü replikasyonun gerçekleşeceği yerde bırakırlar (Kurtboke, 2012).

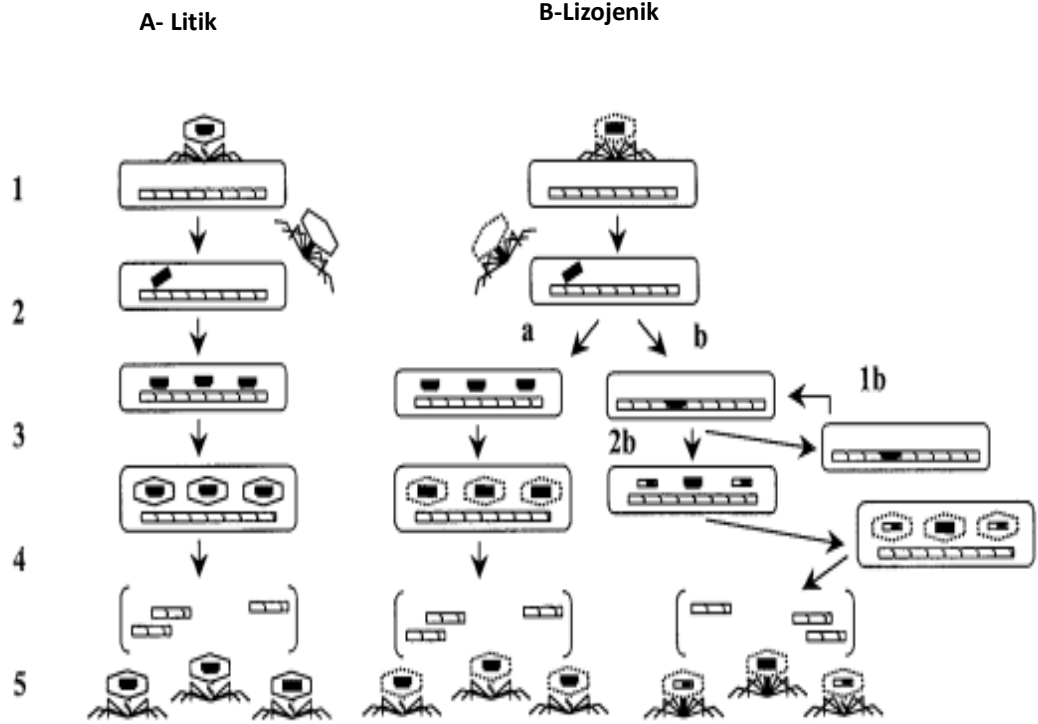
Virüslerin morfolojik olarak görülebilmesi ancak elektron mikroskopunun keşfinden sonra mümkün olmuştur. İlk çalışmalar virüslerin büyüklük ve şekle göre sınıflandırılabilceğini söylemiştir. En küçük virüsler 20 nm boyutlarındayken, en büyük virüsler 500 nm civarındadır (Kurtboke, 2012).

Bakterileri enfekte eden ve bakteri kaynaklarını kullanan virüslere “bakteri yiyen” anlamına gelen bakteriyofaj adı verilmiştir. Bakteriyofajlar, canlı konakları olan bakteriler gibi doğada oldukça yaygın olarak bulunurlar ve aslında yiyecekler ile düzenli olarak tüketilmektedir. Bunun bir sonucu olarak yeryüzünde en sık bulunan canlı grubunu oluşturmaktadırlar. Dünyada 10^{32} bakteriyofaj olduğu tahmin

edilmektedir (Wommack ve Collwell, 2000). Yapılan araştırmalara göre deniz suyunun her ml'sinde yaklaşık 10 milyon virüs olduğu görülmüştür (Breitbart, 2012). Aynı şekilde orman topraklarının her gramında 10^8 - 10^9 faj olduğu saptanmıştır (Williamson ve ark., 2003). Bakteriyofajlara hemen hemen her ekosistemde rastlanabilmektedir. Sahra   l  gibi çok sıcak iklimlerde bulunabildiği gibi, kutup i leri gibi çok soğuk iklimlerde de bulunabilmektedir (Breitbart ve ark., 2004).

Fajlar; konak özgüllüğü, faj morfolojisi, serolojisi, fiziksel ve kimyasal ajanlara duyarlılık ve fajın bulunduğu  evre koşulları gibi birçok sınıflamaya tabi tutulabilmektedir (Abeles ve ark., 1984). Bütün bakteri türlerinin (Cyanobacteria, Archeobacteria ve Mycoplasma da dahil olmak üzere) fajlara duyarlı oldukları bilinmektedir. Bakteri genomlarına sekans analizi yapılması sonucunda bakteriyofajların bakteri genomunun çeşitliliğinde ve patogenezinde oldukça önemli roller oynadıkları görülmüştür. şu ana kadar izole edilen ve sekans analizi yapılarak genom haritası ortaya konan fajların faj popülasyonunun oldukça küçük bir kısmı olduğu gösterilmiştir (Kurtboke, 2012).

Bakteriyofajlar litik (virülan) ve lizojenik (temperate) olmak üzere ikiye ayrılırlar (Sulakvelidze ve ark.,2001b). Litik fajlar kendine özel bakteri konağını enfekte eder, uygun replikasyon basamakları gerçekleştikten sonra konakçının ölümüne neden olur ve komşu konakları enfekte etmek üzere progeni fajlar ortama yayılır. Temperate fajlar ise ya litik fajlar gibi hücrenin parçalanması sonucu serbest kalır ya da konak hücre genomuna entegre olarak uygun bir uyarı gelene kadar orada kalır. Bu durum bakteriyel genlerin farklı bakteri konakları arasında horizontal olarak transferine olanak sağlamaktadır. Litik ve lizojenik fajların yaşam d ng ş  şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1:Litik ve lizojenik fajların yaşam siklusu-Sulakvelidze ve ark.,2001b'den alınmıştır.

A)Litik fajın yaşam döğüsü: 1-Tutunma 2-Faj DNA'sının hücre içine girmesi
3-Hücrede replikasyon ve protein sentezinin engellenmesi 4-Viral genomun replikasyonu ve kapsit oluşumu 5-Konakçı lizisi sonucu progeni virüslerin etrafa saçılması

B)Lizojenik fajın yaşam döğüsü: a-Döngü aynı litik fajda olduğu gibidir. b-Faj genomu konak hücre genomuna entegre olur. 1b-Replikaşyon entegre olmuş faj DNA'sıyla birlikte kuşaklar boyunca aynı şekilde gerçekleşebilir. 2b-Spontan olarak veya radyasyon veya karsinojen gibi indükleyen bir etkenin varlığında faj DNA'sı konakçı DNA'sından ayrılır. Konak hücre parçalanır ve progeni virüsler etrafa yayılır. Faj DNA'sı ayrılırken beraberinde konak hücre DNA'sından bir parça alabilir.

2.5.1.Bakteriyofajların Tarihçesi

Bakteriyofajların tarihçesinde önce hangi araştırmacı tarafından bulunduğuna dair uzun tartışmalar vardır. İngiliz bir bakteriyolog olan Ernest Hankin (1865-1939) 1896 yılında Hindistan'daki Ganj ve Jumna Nehirlerinden *Vibrio cholerae*'ya karşı antibakteriyel etki gösteren ve ince porselen filtrelerden süzülerek geçebilen bir madde tanımlamıştır (Hankin,1896). Bu tanımlanan maddenin kolera epidemilerini önlediği görülmüştür.

İki yıl sonra Rus bir bakteriyolog olan Gamaleya tarafından *Bacillus subtilis*'e karşı benzer bir madde tanımlanmıştır (Samsigynia ve Boni, 1984). Birkaç araştırmacı tarafından benzer sonuçlar elde edilmiş ve böylece bakteriyofaj olgusu oluşmaya başlamıştır. Hankin'in gözleminden 20 yıl sonrasında Londra'daki Brown Enstitüsü'nün yöneticisi olan Frederick Twort (1877-1950) tarafından filtre edilen maddenin bir virüs olabileceği hipotezi ortaya atılmıştır (Twort, 1915). Bulgularını yayınlamıştır, ancak I. Dünya Savaşı'nın başlamasıyla maddi kaynak yetersizliği nedeniyle çalışmalar kesintiye uğramıştır.

Bakteriyofajlar iki yıl sonrasında Fransız-Kanadalı bir mikrobiyolog olan Felix d'Herelle (1873-1949) tarafından resmi olarak tanımlanmıştır. Felix d'Herelle tarafından bakteriyofajların bulunuşu 1915 yılında Paris'teki Fransız Birliklerinde ciddi hemorajik dizanteri görülmesiyle mümkün olmuştur. D'Herelle dışkı örneklerini toplamış, bunları filtrelerden geçirdikten sonra Shigella ile karıştırmış, inkübe etmiş ve sonrasında bir kısmını deney hayvanlarına verirken, kalan kısmını da besiyeri plaklarına ekmiştir. Ertesi gün besiyeri plaklarını değerlendirdiğinde küçük boşluklar olduğunu fark etmiştir ve bu bulgularını bir toplantıda sunmuştur.

Bakterileri enfekte edebilen, parçalayabilen ve filtrelerden geçebilen bu maddenin virüs yapısında olduğundan emindir ve bu virüslere bakteri yiyen anlamına gelen bakteriyofaj (bacteria-phagein) adını vermiştir. Tartışmalar olmasına rağmen sonunda bakteriyofaj olgusunun Twort ve Felix d'Herelle tarafından bulunduğu konusunda uzlaşmaya varılmıştır.

1923 yılında Gürcistan Tiflis'te açılan Eliava Üniversitesi'nde bakteriyofaj tedavisi ile ilgili çalışmalar başlamıştır ve sonrasında birçok araştırmacı fajların kullanım alanları ile ilgili çalışmalar yapmıştır.

Penisilinin keşfinden yaklaşık on yıl öncesinde Felix d'Herelle ve Gürcistanlı bilim adamları tarafından bir enstitü kurulmuş ve burada fajların tedavide kullanım yerleri ile ilgili araştırmalar yürütülmüştür. Ancak fajların biyolojisi ve moleküler özellikleri ile ilgili bilgi eksikliği olması nedeniyle klinik olarak birtakım sıkıntılar yaşanmış, 1930'lu yıllarda tedavide büyük başarılar sağlayan antibiyotiklerin keşfedilmesiyle araştırmalar geri planda kalmıştır. Antibiyotiklerin kullanıma girmesinden yıllar sonra direnç problemini gündeme gelmiş, özellikle *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterococcus faecalis*, MRSA, *Acinetobacter baumannii* (Coelho ve ark., 2004) ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi mikroorganizmaların tedavisinde büyük zorluklar yaşanmaya başlamıştır. Bakterilerin direnç kazanma süresi, yeni antibiyotiklerin sentez edilmesi için geçen süreden daha kısadır. Bu nedenle bakteriyel hastalıkların tedavisinde yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Fajların sadece kendi için özel reseptörü taşıyan hücrelerde lizise yol açması dolayısıyla yan etkilerinin sınırlı olması ve bakterilerin antibiyotiklere karşı geliştirdiği direnç mekanizmalarından etkilenmemesi nedeniyle kullanımının uygun olduğu yönünde görüşler mevcuttur (Kurtboke, 2012).

2.5.2.Bakteriyofajların Sınıflandırılması

Bakteriyofajlar konak tercihi, virüs morfolojisi, kuyruk ve zarf gibi aksesuar özelliklerine göre sınıflandırılabilirler. Bakteriyofajların en güncel sınıflaması 2006 yılında Ackermann tarafından yapılmıştır. Sınıflandırma esas olarak faj morfolojisi ve nükleik asit özellikleri üzerine kurulmuştur. Fajların büyük çoğunluğu çift iplikli DNA (dsDNA) içermektedir. Ancak az da olsa tek iplikli DNA (ssDNA), tek (ssRNA) veya çift (dsRNA) iplikli RNA içeren bakteriyofajlar bulunmaktadır. Morfolojik olarak birkaç grup faj bulunmaktadır: Filamentöz fajlar, kuyruksuz ikozohedral fajlar, kuyruklu fajlar, lipid içeren zarfa sahip fajlar gibi. Fajlar

yeryüzünde en yaygın olarak bulunan canlı grubunu oluşturmaktadırlar (Kurtboke, 2012).

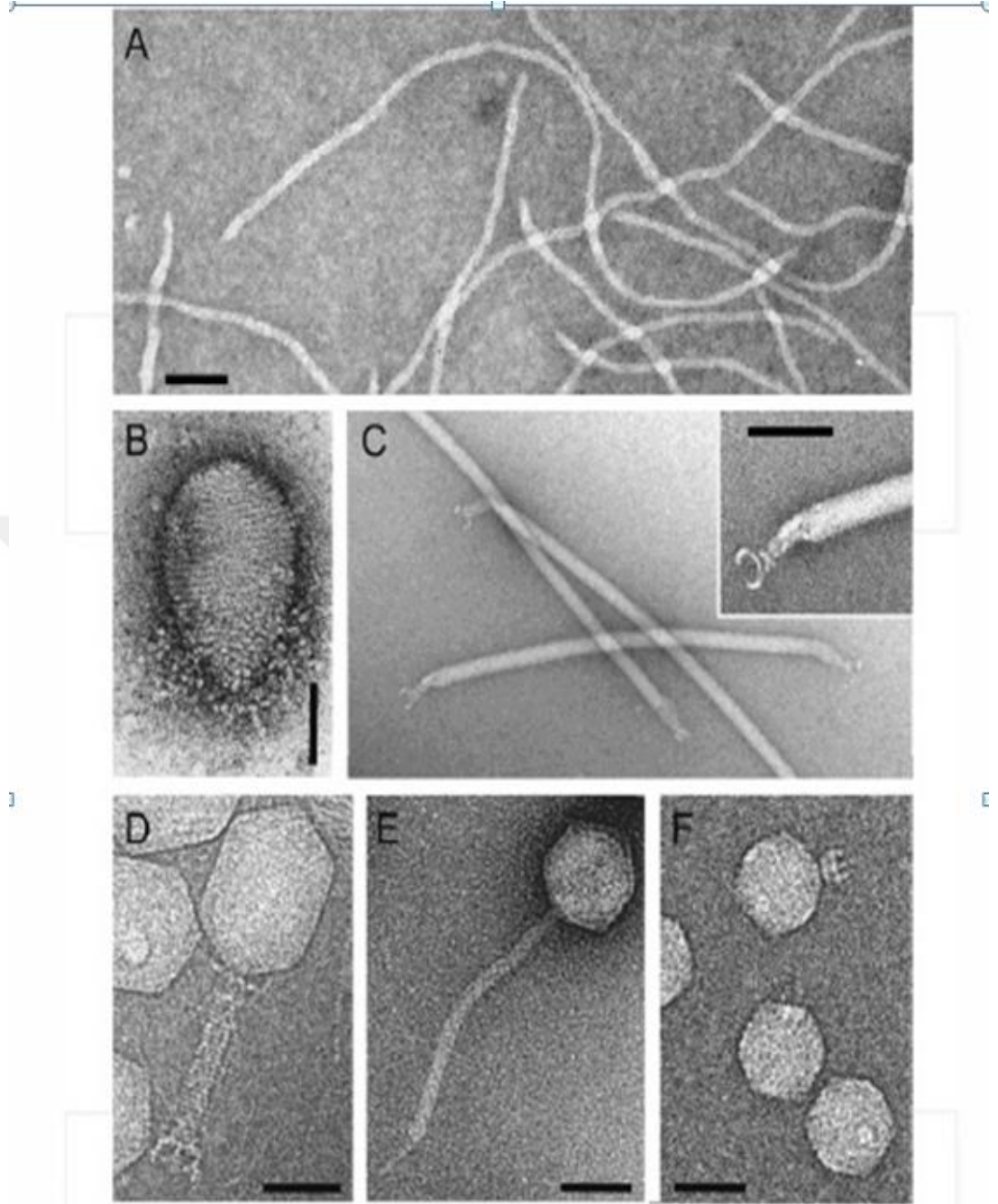
Şu ana kadar elektron mikroskop görüntülemesi yapılmış 5500'den fazla bakteriyofaj bulunmaktadır (Ackermann, 2007). Pleomorfik ve filamentöz fajlar yaklaşık 190 tanedir. Bu sayı toplam fajların %3.6'sını oluşturmaktadır ve 10 tane alt aileye ayrılmaktadır (Ackermann, 2004). Bu fajların özellikleri farklı kökenlerden geldiğini gösterecek şekilde birbirlerinden oldukça farklıdır. Pleomorfik fajlar üç alt aileye ayrılmaktadır. Bu ailelerin isimleri ve karakteristik özellikleri şu şekildedir (Kurtboke,2012):

- **Plasmaviridae:** Lipoprotein zarf ve dsDNA yapısında genom içeren, nükleoprotein granül olarak isimlendirilen faj ailesi.
- **Fusseloviridae:** Bir tarafında kısa dikensi çıkıntıları olan limon şeklinde kapsit ve dsDNA yapısında genom içeren faj ailesi.
- **Guttavirus:** Damla şekline benzeyen faj ailesi.

Helikal veya filamentöz organizasyona sahip fajlar bulunmaktadır (Kurtboke 2012).

- **Inoviridae:** Değişken uzunluklarda, katı veya esnek kuyruğa sahip ve ssDNA yapısında genom içeren faj ailesi. Partikül uzunluğuna, kapsit yapısına ve DNA içeriğine göre alt ailelere ayrılabilir.
- **Lipothrixviridae:** Lipoprotein yapıda zarf içeren çomak şekline sahip faj ailesi.
- **Rudiviridae:** Zarfı olmayan, düz, sert çomak şeklinde, tütün mozaik virüslerine çok benzeyen faj ailesi.

Pleomorfik, helikal veya filamentöz ile kuyruklu bakteriyofajların elektron mikroskoptaki görüntüleri şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2: Bazı bakteriyofajlara ait elektron mikroskopi görüntüleri-Ackermann 2007

A-Inoviridae

B-Guttaviridae

C-Lipothrixviridae

D-Miyoviridae

E-Siphoviridae

F-Podoviridae

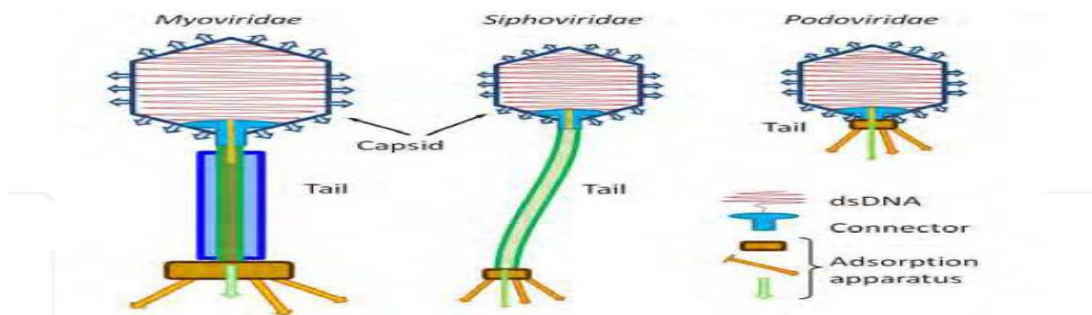
Diğer bir grup faj ikozohedral simetrlili kapsit yapısına sahip olan fajlardır. Bazı ikozohedral simetrlili kapsit yapısına sahip olan fajlar şu şekildedir (Kurtboke, 2012):

- **Leviviridae:** Küçük kapsitlerde paketlenen ssRNA genomik yapısına sahip olan ve enterovirüslere benzeyen faj ailesi.
- **Corticoviridae:** Üç adet dsRNA ve RNA polimeraz içeren faj ailesi.
- **Microviridae:** Tek sirküler ssDNA içeren faj ailesi.
- **Cystoviridae:** dsDNA yapısında genom içeren, dışta proteinlerden ve içte lipit tabakasından meydana gelen özel bir kapsit yapısına sahip olan faj ailesi (Huiskonen ark.,2004).
- **Tectiviridae:** Kapsiti çevreleyen ve tepe kısmında çıkıntılar içeren lipoprotein yapıda bir zarfı olan ve dsDNA yapısında genom içeren faj ailesi.

Kuyruklu fajlar *Caudovirales* ailesi içinde yer alırlar. Bilinen tüm fajların %96'sını oluşturmaktadırlar. Kuyruklu fajlar faj popülasyonunun en büyük grubunu oluşturduğu için çevresel kaynaklardan en sık izole edilebilen ve üzerlerinde en fazla araştırma yapılan faj grubunu oluşturmaktadır. Kuyruklu faj ailelerine ait şematik görüntü şekil 2.3'te verilmiştir.

Üç aileye ayrılmaktadırlar (Kurtboke, 2012):

- **Miyoviridae:** Kuyruklu fajların %25'ini oluşturan, kuyruk kısmı kasılabilen ve bir kılıf ile merkez borucuktan oluşan faj ailesi.
- **Siphoviridae:** Uzun, kasılamayan kuyruğa sahip olan faj ailesi olup tüm kuyruklu fajların %61'ini oluşturur.
- **Podoviridae:** Kısa kuyruğa sahip olan ve tüm kuyruklu fajların %14'ünü oluşturan faj ailesi.



Şekil 2.3: Kuyruklu faj ailelerinin şematik görüntüsü

2.5.3. Bakteriyofaj Aracılı Gen aktarımı (Transdüksiyon ve Lizojeni)

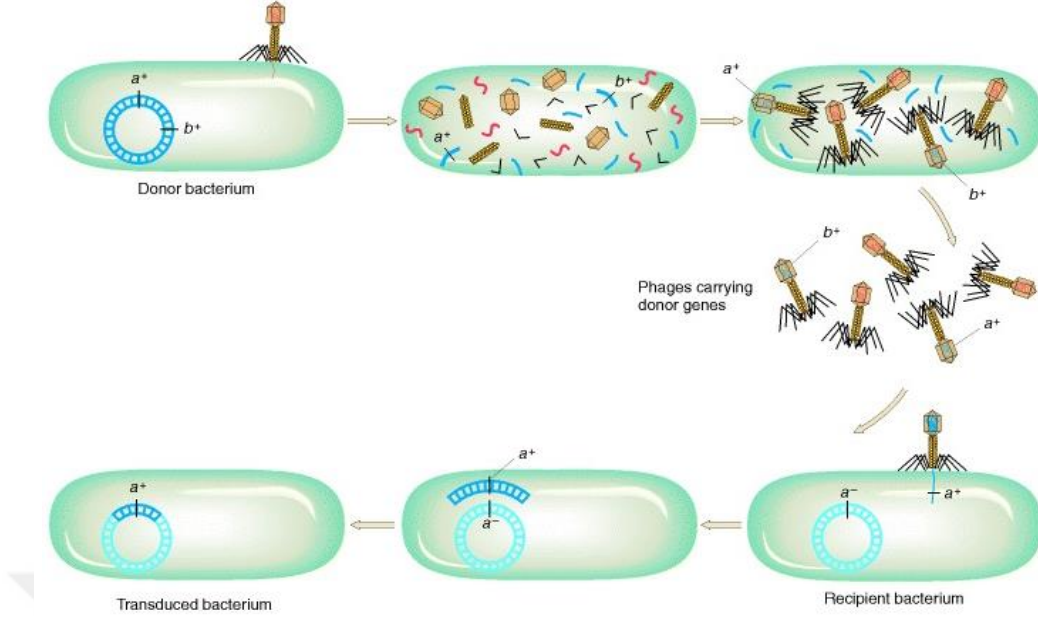
Bazı fajlar genetik elemanları hareket ettirebilme; bir bakteriden diğer bakteriye transdüksiyon adı verilen bir mekanizmayla aktarabilme yeteneğine sahiptir. Transdüksiyon aracılı gen aktarımı 1951 yılında Joshua Lederberg ve Norton Zinder tarafından keşfedilmiştir. Bu araştırma için iki mutant *Salmonella thyphimurium* suşu kullanılmıştır. (Bir tanesi fenilalanin, tirozin ve triptofan:-, diğeri metiyonin ve histidin:-) Bu bakteriler besiyeri ortamına ayrı ayrı konulduğunda hiç vahşi tip bakteri görülmemiştir; ancak birlikte konulduklarında 10^5 bakterinin içinde bir bakterinin vahşi tipte olduğu saptanmıştır.

Sonrasında aynı deney konjugasyon için gereken hücre temasını engelleyebilmek için U şeklinde, kolları birbirinden filtre ile ayrılan bir tüple gerçekleştirilmiş ve aynı sonuç alınmıştır. Por deliklerinin boyutları değiştirilerek karşılaştırmalı deneyler yapılmış ve bu olaya neden olan yapının *Salmonella*'nın P22 olarak isimlendirilen temperate fajıyla aynı boyutta olduğunu saptanmıştır. Sonuç olarak Lederberg ve Zinder konjugasyondan farklı yeni bir gen aktarım yolu keşfetmişler ve bunu transdüksiyon olarak isimlendirmişlerdir.

Transdüksiyon hem lizojenik hem de litik fajlarda görülebilen bir gen aktarım yöntemidir. Generalize ve özelleşmiş olmak üzere iki farklı türü bulunmaktadır. Generalize transdüksiyonda bakteri kromozomunun herhangi bir yerindeki genler aktarılabılırken, özelleşmiş transdüksiyonda bakteri kromozomunun belirli bir noktasındaki genler aktarılabilmektedir.

2.5.3.1.Generalize transdüksiyon

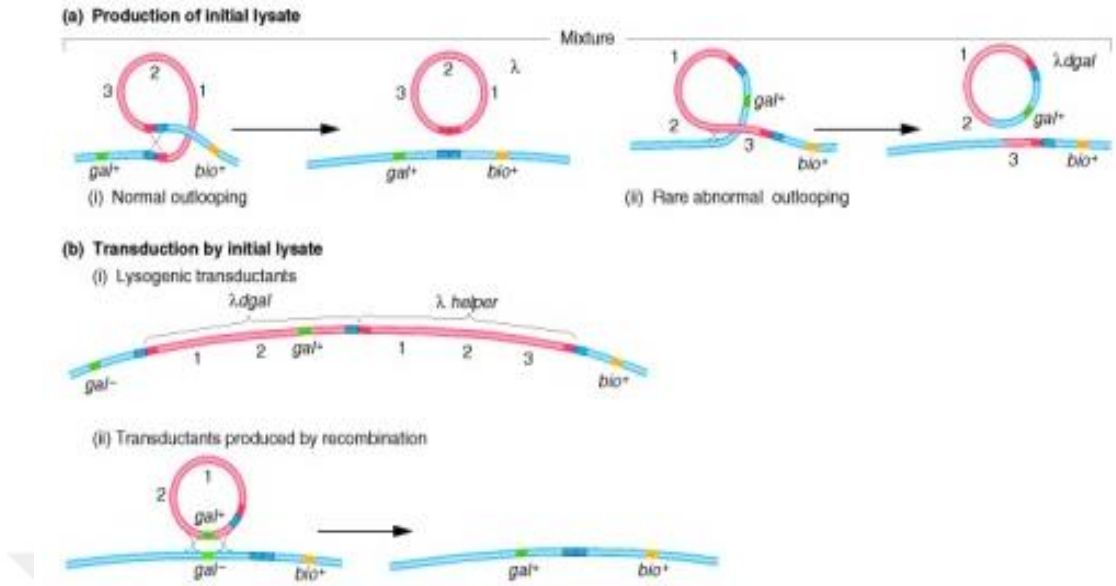
Litik fajlar bakteri hücrelerini parçalayıp ortama salındıklarında bakteri kromozomu da küçük parçalara bölünmektedir. Ortamda bulunan bazı kapsitler faj genomu yerine ortamda bulunan bakteri DNA'larını içine alabilmekte ve yeni bir hücreyi enfekte ettikleri zaman bakteri DNA'sıyla birleşebilmekte veya plazmid gibi ayrı olarak kalabilmektedir. Generalize transdüksiyon Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4: Generalize transdüksiyon-Griffiths AJF ve ark.,2000'den alınmıştır.

2.5.3.2.Özelleşmiş transdüksiyon

Özelleşmiş transdüksiyon kromozomdaki belirli bölgelerin aktarılabildiği özel bir transdüksiyon şeklidir. Örnek olarak lambda profajı verilebilir. Lambda konak hücre kromozomunda daima $-gal$ ve $-bio$ bölgeleri arasına entegre olmakta ve sadece bu genleri diğer konaklara aktarabilmektedir (Griffiths ve ark.,2000) Lambda profajı özel bir enzim sistemiyle kromozomun belli bir bölgesine tutunmaktadır. Ultraviyole ışığı vs. gibi indükleyici bir ajanla uyarıldığı zaman yuvarlak lambda kromozomu oluşturmak üzere hep aynı noktadan ayrılmaktadır. Nadiren faj genomu bakteri kromozomundan ayrılırken yanında bakteriye ait genler gelebilmektedir. Bu genler fajın bakteri kromozomuna entegre olduğu yerin hemen yanındaki $-gal$ ve $-bio$ genleridir (Griffiths ve ark.,2000) Lambda fajı genomu bakteri kromozomuna ait genlerle birlikte boş bir kapsitin içine yerleşebilmekte ve diğer bakterileri enfekte ettiği zaman genleri onlara aktarabilmektedir. Şekil 2.5'te özelleşmiş transdüksiyon verilmiştir.



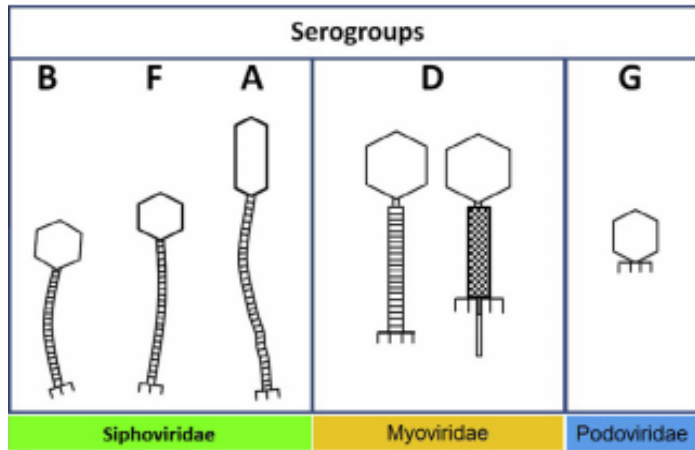
Şekil 2.5: Özelleşmiş transdüksiyon-Griffiths AJF ve ark., 2000’den alınmıştır.

2.5.4. *Staphylococcus aureus* Fajlarının Morfolojik Özellikleri

Yapılan ilk çalışmalarda fajlar poliklonal antiserumlarla karşılaştırılmıştır ve nötralizasyona göre gruplara ayrılmıştır. Buna göre incelenen 39 faj altı serogruba ayrılmıştır (Rountry ve ark., 1949). Daha fazla faj ve serum ile aynı çalışma tekrarlandığında fajların A’dan H’ye ve J’den L’ye kadar 11 serogruba ayrıldığı gösterilmiştir (Rippon ve ark., 1952). Serogrup E, J ve K’nın koagülaz negatif stafilokoklara spesifik olduğu ve *S.aureus*’a karşı virülan olmadığı gösterilmiştir. *S.aureus*’u enfekte eden lizojenik fajların çoğunlukla serogrup A, B ve F’de yer aldığı gösterilmiştir.

Sonrasında elektron mikroskopunun keşfi ile fajlara morfolojik temelli sınıflama yapılmış ve bu sınıflamaya göre fajların büyük çoğunluğu gibi *S.aureus* fajlarının da *Caudovirales* takımının *Siphoviridae* ailesi içinde yer aldığı gösterilmiştir (Brussow ve ark., 2004). Çoğunlukla çift iplikli DNA genomu içeren ve profaj olarak bakteri kromozomuna entegre olan lizojenik fajlardır. Ackermann tarafından yapılan morfolojik sınıflandırmaya göre *Siphoviridae* ailesi içinde bulunan stafilokokal fajlar

ikozohedral simetrlili kapsit yapısına ve kasılamayan bir kuyruğa sahiptirler. Kapsit yapısına ve kuyruk uzunluğunun 200 nm'den uzun ya da kısa oluşuna göre 2.1,2.2.1. ve 2.2.2 gibi gruplara ayrılmaktadırlar. Bu gruplar kabaca sırayla B, A ve F'ye karşılık gelmektedirler. Serogrup B ve F'deki fajlar izometrik yapıda kapsite sahipken, serogrup A'dakiler uzamış farklı bir kapsit yapısına sahiptir. Serogrup B'de bulunan fajların kuyruğu 200 nm'den kısa iken, serogrup A ve F'deki fajların kuyruğu 200 nm'den uzundur.(Şekil 2.6) Fajların küçük bir grubu *Caudovirales* takımı içerisinde bulunan *Podoviridae* ve *Miyoviridae* ailelerine aittir. *Podoviridae* ailesinde yer alan fajlar, SAP-2 fajı gibi (Son ve ark., 2010) küçük bir ikozohedral simetrlili kapsite ve kısa esnek olmayan ve kasılamayan bir kuyruğa sahiptir. *Miyoviridae* ailesinde bulunan fajlar, faj K'da olduğu gibi uzun kasılabilen bir kuyruğa sahiptir (O'Flaherty ve ark., 2004).



Şekil 2.6: Farklı faj ailelerine ait stafilokoksik fajların şematik görünümü ve serogruplara göre değişen morfolojik yapısı

2.5.5.S.aureus Fajlarının Genomik Özellikleri

Stafilokoklar fajlar açısından oldukça zengindir ve stafilokok fajları üzerine yaygın araştırmalar yapılmıştır. Fajlar ilk zamanlarda klinik *S.aureus* izolatlarını sınıflandırmak için kullanılmıştır (Wenworth, 1963; Rosenblum ve Tyrone, 1964). *S.aureus* genomundaki profajların sayısı oldukça yüksektir. Bu zamana kadar sekans

analizi yapılmış birçok *S.aureus*'un en az bir, genellikle dört adet profajı bulunmuştur (Lindsay 2010).

Pelletier ve arkadaşlarının yaptığı *S.aureus* faj genomlarının karşılaştırmalı incelendiği bir çalışmada genellenebilecek bazı sonuçlar elde edilmiştir (Kwan ve ark., 2005). 27 tane *S.aureus*'a ait faj ve profaj genomu incelenmiştir. Genom büyüklüğü 20 kb'dan 125 kb'a kadar değişen büyüklüklerdedir (Kwan ve ark., 2005). *Mycobacterium* (Pedulla ve ark., 2003) ve *P.aeruginosa* (Kwan ve ark., 2006) fajlarının aksine genom büyüklükleri birbirinden oldukça farklı olabilmektedir. Stafilokok fajları boyutlarına göre üç kategoriye ayrılmaktadır (Son ve ark., 2010):

- Sınıf I: <20 kbp
- Sınıf II: =40 kbp
- Sınıf III: >125 kbp

Aslında genom büyüklüğüne göre yapılan bu sınıflamanın morfolojik özelliklere göre yapılan sınıflamayla bir korelasyonu vardır. *Podoviridae* ailesinde olan virüsler sınıf I kategorisindeki en küçük genoma sahip virüslerken, *Miyoviridae* ailesindeki virüsler en büyük genoma sahiptirler ve sınıf III'te yer alırlar. *Siphoviridae* ailesindeki virüsler orta uzunlukta genom içermektedirler(sınıf II).

Yapılan çalışmalarda görülmüştür ki, *S.aureus* fajları oldukça etkileyici fakat henüz tam olarak keşfedilmemiş bir genetik çeşitlilik kaynağıdır. Pelletier ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada 27 faja ait 2170 proteinin incelenmesinde BLAST programı kullanılarak proteinlerin ancak %35'inin fonksiyonu bulunabilmiştir (Kwan ve ark., 2005).

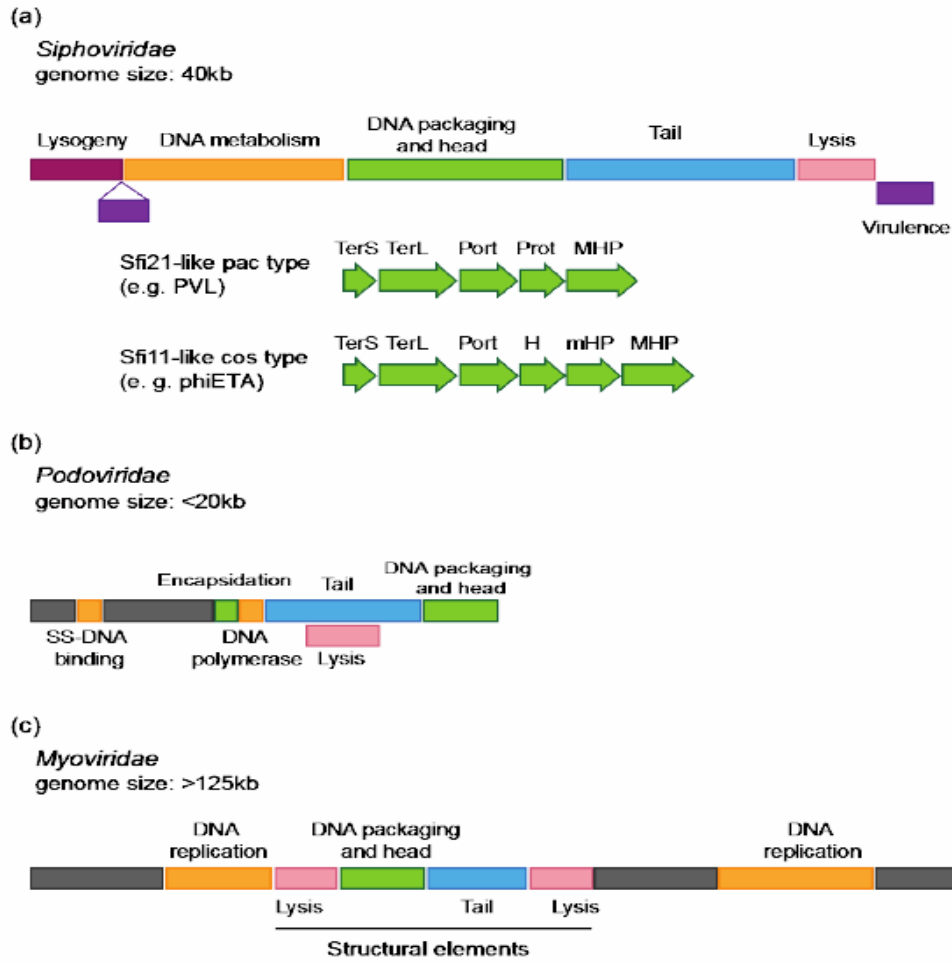
Siphoviridae ailesine ait bakteriyofaj genomlarının incelenmesinde genomik yapının işlevine göre 5 gruba ayrıldığı gösterilmiştir: lizojeni, DNA metabolizması, DNA paketlenmesi ve kapsit yapısı, kuyruk yapısı ve konak hücre lizisi. DNA metabolizması ile ilgili olan genler düzenleme ve replikasyon ile ilgili olmak üzere iki bölüme ayrılmaktadır. Olduğu zaman virülans faktörleri ile ilgili olan genler genellikle konak hücre lizisi ile ilgili genlerden sonra yer almaktadır (Canchaya ve

ark., 2003; Brussow ve ark., 2004). *S.aureus*'un Newman türünde bulunan PhiNM1'i içeren dört bakteriyofajda virölans ile ilgili genler lizojeni ile DNA metabolizması ile ilgili genler arasında yer almaktadır (Bae ve ark.; 2006).

Podoviridae ailesine ait bakteriyofaj genomlarının incelenmesinde *Siphoviridae* ailesinden farklı olduğu görülmüştür (Vybiral ve ark., 2003; Kwan ve ark., 2005 ve Son ve ark., 2010). Belirgin ayrımları daha küçük olmalarıdır. DNA paketlenmesi, kapsit yapısı, kuyruk yapısı ve lizojeni ile ilgili genlere ilaveten fonksiyonu ortaya konamamış genler de içermektedirler. *Siphoviridae* ailesinin aksine gen kategorileri birbirinden belirgin olarak ayrılmamıştır, çoğu zaman kuyruk ve lizis ile ilgili genler üst üste gelmektedir.

Miyoviridae ailesine ait fajların genomik incelemesinin sonunda *Escherichia coli* T4 fajı ile büyük benzerlik gösterdikleri saptanmıştır (Krisch ve Comeau, 2008).

Genomik yapının arada bilinmeyen fonksiyonda genlerle kesintiye uğrayan replikasyon ve yapı ile ilgili genlerden oluştuğu gösterilmiştir. Stafilokoklarda bulunan *Miyoviridae* ailesine sahip fajların diğer bakteri türlerinde bulunan *Miyoviridae* ailesine ait fajlardan daha çok *Siphoviridae* ailesinde bulunan fajlara benzerlik gösterdiği saptanmıştır. *Siphoviridae*, *Miyoviridae* ve *Podoviridae* ailelerine ait fajların gen haritası şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7: *Siphoviridae*, *Podoviridae* ve *Miyoviridae* ailelerine ait olan fajların gen haritası-Deghorain M ve Van Malderen L, 2002'den alınmıştır.

2.5.6.Bakteriyofajların *S.aureus* Patogenezindeki Rolü

S.aureus'un farklı türler arasında korunmuş genlerden oluşan bir iskeleti ve türler arasında değişiklik gösteren aksesuar genleri bulunmaktadır. Bu aksesuar genler plazmidler, transpozonlar, genom adacıkları, patogene adacıkları ve profajlar üzerinde taşınmaktadır. Aksesuar genom kısmı *S.aureus* genomunun %25'ini oluşturmakta ve bakteriye genetik ve fenotipik olarak uyum yeteneği kazandırmaktadır. *S.aureus*'un en çok dikkat çeken özelliklerinden birisi değişen ortam şartlarına kolay uyum sağlayabilmesi ve zorlu ortam koşullarına direnç

sağlayabilmesidir. Uyum yeteneği ve direncinde bakteriyofajlar oldukça önemli bir rol oynamaktadır.

2.5.7.Faj Aracılı Virülans Faktörleri

Fajlar, bakterinin konağın immün cevabından kaçışını sağlayan çok sayıda virülans faktörü ve toksin sentezinden sorumludur (Malachowa ve Deleo, 2010). Konak doku harabiyetinden sorumlu olan stafilokinaz (Sak) ve birkaç süperantijen (sea, seg, sek, sek2, sep, seq) kodlamaktadır. Süperantijenler besin zehirlenmesi, toksik şok sendromu ve nekrotizan fasiit oluşumuna yol açmaktadır. İki komponentli toksin olan PVL lökositler üzerinde delik oluşumuna yol açarak nekrotizan enfeksiyonlara neden olmaktadır. ETA ise ciddi cilt enfeksiyonlarına neden olmaktadır.

Birkaç istisnai durum haricinde fajlar genellikle tek bir virülans faktörünün sentezinden sorumludur. Virülans faktör genleri horizontal gen transferi ile aktarılabildiğinden bir bakteriyofaja spesifik değildir. Virülans genleri profajın bakteri kromozomuna entegre olduğu “attachment site(att)” bölgelerinde yer almaktadır. Faj aracılı virülans faktörlerinin ekspresyonu faj litik siklusa girmeden hemen önce en fazladır, çünkü bu esnada tüm fajın replikasyonu gerçekleşecektir (Sumbly ve Waldor, 2003). Ancak lizojenik döngü sırasında ekspresyonun saptandığı da olmuştur.

2.5.7.1.Faj aracılı virülans faktörlerinin taşınması: *S.aureus* Patojenite Adacıkları (SaPIs)

S.aureus türlerindeki horizontal transfere birincil olarak bakteriyofajlar aracılık etmektedir. Bakteriyofajlar kromozom aracılı virülans faktör genlerinin generalize transdüksiyonla aktarılmasına neden olur. Ayrıca *S.aureus* patojenite adacıkları olan SaPIs’in taşınmasından sorumludur. SaPIs 14-27 kbp büyüklüğünde olan, bakterilerde ekstrakromozomal olarak bulunan, profajlar gibi represör, integras ve terminaz genlerini taşıyan ancak yapısal proteinleri sentezleyen genleri olmayan yapılardır. TSST-I ve diğer süperantijenlerin sentezini sağlayan genler içerirler.

SaPIs kendi başlarına hareketli değildir, hareket edebilmeleri için bir fajın yardımına gereksinim duymaktadırlar.

2.5.8.Faj Tedavisi

Yarım yüzyıldan fazla bir süredir patojenik bakterilerle oluşan enfeksiyonların tedavisinde antibiyotiklere güvenilmiştir. Ancak antibiyotiklerin klinik, hayvancılık, tarım ve veterinerlik alanlarında yaygın kullanımı sonucunda antibiyotiklere karşı bakteriyel direnç giderek yaygınlaşmış ve antibiyotiklerin etkinliği giderek azalmıştır (Fischetti ve ark., 2008). Günümüzde gelinen durumda bilinen tüm antibiyotiklere dirençli suşlar ortaya çıkmıştır. Son 30 yılda yapılan bütün çalışmalara ve genetik mühendisliği araştırmalarına rağmen yeni antibiyotik bulunamamıştır. Bu durumda antimikrobiyal ajanların yerine bakteriyofaj tedavisinin kullanılma fikri yeniden ortaya çıkmıştır. Bakteriyofajlar sadece bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde değil; balıklarda, kuşlarda, yiyecek endüstrisinde ve biyofilm eradikasyonunda kullanılmaktadır. Fajların antibiyotiklere karşı bazı üstünlükleri bulunmakta ve aslında daha iyi tedavi seçenekleri oldukları düşünülmektedir (Pirissi, 2000). Fajların antibiyotiklerle olan karşılaştırması aşağıda Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1:Bakteriyofajların antibiyotiklerle karşılaştırılması

Bakteriyofajlar	Antibiyotikler
Bakterisidaldır.	Bakteriyostatik olan antibiyotikler vardır.
Üretimi ucuz ve basittir.	Üretimi pahalı ve zordur.
Fajlar akıllı ilaçlardır, enfeksiyonun olduğu yerde yoğunlaşırlar ve çoğalırlar, sonra yok olurlar.	Vücutta metabolize edilerek atılırlar, yarılanma ömürleri vardır.
Bakteriyel konağın olduğu yerde kendiliğinden çoğalır, tekrarlayan dozlara gereksinim yoktur.	Çoğunlukla tekrarlayan dozlarda verilmesi gerekmektedir.
Özgüllükleri son derece yüksektir, etkilerini sadece patojen olan bakteri üzerinde gösterirler. Flora bakterilerine zarar vermezler.	Patojen bakterilerin yanında flora bakterilerini de öldürerek yan etkilerin ortaya çıkmasına neden olurlar.
Bakterilerde direnç oluşumuna neden olmazlar.	Geniş spektrumlu olanların kullanımı sonucunda dirençli bakteriler ortaya çıkmaktadır.
Genellikle yan etki oluşumuna neden olmazlar.	İntestinal bozukluk, ikincil mantar enfeksiyonları ve alerjik reaksiyon gibi çok sayıda yan etki oluşmasına neden olabilirler.
Fajlar yeryüzünde oldukça yaygın olarak bulundukları için faja dirençli bir bakteri ortaya çıktığı zaman yeni bir faj bulmak zor değildir.	Yeni bir antibiyotik bulmak çoğu zaman birkaç yılı bulmaktadır.
Antibiyotiklere alerjisi olan insanlarda faj terapisi oldukça elverişlidir.	Antibiyotiklere alerji gelişmesi durumu tedavide büyük zorluklar yaşanmasına neden olmaktadır.

Bütün bu avantajlara rağmen faj tedavisinin bazı dezavantajları da bulunmaktadır:

1-Fajlar karaciğer, dalak gibi retiküloendoteliyal sistem organları tarafından temizlenebilmektedir. Farelerde seri pasajlar yapılarak retiküloendoteliyal sistem organları tarafından tanınamayan mutant fajlar oluşturulmaya çalışılmalıdır.

2- Özellikle litik fajların tedavide kullanılması ile bakteriler aniden parçalanmakta, çok fazla endotoksinin kana karışması sonucunda endotoksik şok görülebilmektedir.

3-Konak faj etkileşimi olamayacağı için intrasellüler bakterilerin tedavisinde kullanılamamaktadır.

4-Tekrarlayan enfeksiyonlarda fajlara karşı nötralizan antikorların oluşması tedaviyi etkisiz hale getirmektedir. Bu açıdan dikkatli olunması gerekmektedir. Ancak immünsuprese hastada nötralize antikor gelişimi olmayacağı için tedaviden fayda görülebileceği akılda tutulmalıdır.

5-Raf ömürlerinin test edilmesi ve kayıtlarının tutulması gerekmektedir.

6-Kullanılması için deneyimli ve fajları iyi bilen hekimlere gereksinim vardır, herkes tarafından kullanılamamaktadır.

Uzun yıllar boyunca Doğu Avrupa ve eski Sovyet Rusyası'nda fajlar oldukça uzun süre tedavi amacıyla kullanılmış ve kullanımları ile ilgili ciddi komplikasyonlarla karşılaşılmamıştır (Sulakvelidze ve Morris, 2001a). Fajlar doğada oldukça yaygın olarak bulunmaktadır ve insanlar doğumdan itibaren fajlara maruz kalmakta ve fajlar insanların mikroflorasını meydana getirmektedir. İnsanların gastrointestinal sistemlerinde, ciltlerinde, ağızlarında, dental plaklarında bulunmaktadır. Bakteri konaklarına son derece özgüdür, bu nedenle flora bakterilerine zarar vermeden sadece patojen olan bakterileri öldürmeleri nedeniyle yan etkileri yok denecek kadar azdır. Klinik bakış açısı olarak faj tedavisi oldukça güvenli bulunmaktadır. Antibiyotiklere dirençli olan Streptococcus, Escherichia, Staphylococcus, Klebsiella, Serratia, Pseudomonas, Proteus, Salmonella ve Shigella'ya karşı etkili olan fajlar bulunmuştur. Ancak litik fajların kullanım kısıtlılıklarından dolayı günümüzde modifiye faj kullanımı gündeme gelmiştir. Fajlar hakkındaki güvenlik endişeleri ve canlı mikroorganizma üretiyor olma korkusu araştırmacıların daha kontrol edilebilir özellikte olan modifiye faj üretimine yöneltmiştir (Skurnik ve ark., 2007). Faj genomunun doğrudan mutasyonu, fajların rekombinasyonu, fajların invivo olarak

seçilmesi, kimerik faj oluşturulması, yeni özellikleri olan fajların dizayn edilmesi sonucunda faj tedavisinde yaşanılan zorlukların üstesinden gelinebilmiştir (Moradpour ve Ghasemian, 2011).

Felix d’Herelle insanlar üzerindeki ilk faj tedavisi çalışmasını yürütmesine rağmen, insanlar üzerinde yapılan çalışmalar ilk defa Belçika’da Bruynoghe ve Maisin tarafından 1921’de yayınlanmıştır. Yapılan çalışmada altı hastanın cilt üzerindeki srafilokokal fronkl ve karbonkllerine faj enjeksiyonu yapılmış; 48 saatte ağrıda, şişlikte ve ateşte azalma saptanmış ve belirgin klinik yanıt elde edilmiştir. Merabishvili ve arkadaşları 2009 yılında yanık hastalarında *S.aureus* ve *P.aeruginosa* enfeksiyonlarına karşı litik fajlardan oluşan bir kokteyl hazırlamıştır. Bundan sonra da Polonya, Gürcistan ve Rusya başta olmak üzere araştırmalar sürmüş ve faj tedavisi hastalar üzerinde yaygın olarak kullanılmıştır.

Son zamanlarda faj tedavisine karşı direnç gelişimini azaltmak ve fajların etkinlik spektrumunu genişletmek için en az birkaç fajdan oluşan kokteyller hazırlanmaktadır. Kokteyllerde litik fajlar bulunabileceği gibi lizojenik fajlar da bulunabilmektedir. Daha nceki çalışmalarda litik fajların bir anda çok fazla endotoksin salınımına bağlı olarak hastanın klinik durumunu kötüleştirebileceği gösterilmiştir veya lizojenik faj kullanımı ile virülan olmayan mikroorganizmalara virlans genlerinin taşınma ihtimalinden korkulmaktadır. Bu nedenle virlans faktörü taşımayan lizojenik fajlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Fajların enfeksiyonlarda tedavi amaçlı kullanılmasının haricinde başka kullanım alanları da vardır. Virlan bakterilere karşı probiyotik olarak kullanılabilirler. Oral preparat olarak kullanıldığında *Salmonella*, *Shigella* ve *Clostridium difficile* gibi dizanterik bakterilerin yok edilmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda obezite, metabolik sendrom gibi son zamanlarda gastrointestinal mikrobiyotayla ilgili olabileceği düşünülen hastalıkları önlemek için farklı faj kokteylleri hazırlanabileceği üzerine çalışmalar yapılması planlanmaktadır (Abedon ve ark., 2011).

Fajlar tavuk kaynaklı *Campylobacter jejuni* ve *Campylobacter coli* enfeksiyonlarının yayılımını önlemek amacıyla kullanılabilmektedir. *C.jejuni* tavukları çok etkileyen bir bakteri olmamasına karşılık, tavuk eti ile birlikte insana bulaştığı zaman uzun dönemde reaktif artrit, Guillian Barre Sendromu ve postenfeksiyöz irritabl bağırsak sendromu gibi komplikasyonlara yol açabilecek bir patojendir. Bu nedenle tavuklardaki *C. jejuni* miktarını azaltmak insanların enfekte olma riskini düşürecek ve dolaylı olarak probiyotik etki yapmış olacaktır.

2.5.9.Fajların Diğer Kullanım Alanları

Doğada bulunan virüsler prokaryotik hücrelerden memelilere kadar uzanan canlı grubu üzerinde biyolojik bilgi taşınmasını sağlayan gen taşıyıcılarıdır. Geniş bir virüs grubu ilaç dağıtımı için kullanılmaktadır. Ancak adenovirüs, lentivirüs ve retrovirüs gibi virüs ailelerinin tümör süpresör genleri baskılayarak kanser oluşumuna yol açmaları virüslerin yerine daha güvenli olan bakteriyofajların kullanılmasını gündeme getirmiştir. Bütün virüslere nazaran bakteriyofajlar klinik ve klinik olmayan alanlarda geniş kullanım alanı bulmuştur. Gıda sektöründe gıda güvenliğinde, bakteriyel biyofilmlerin yok edilmesinde, atık suların biyolojik olarak algılanmasında, vücutta hedefe yönelik tedavide DNA veya DNA dışı yapıların kargolanıp doğrudan hedef hücreye ulaştırılmasını sağlayan nanotaşıyıcı fonksiyonunda kullanılabilmektedirler. Vücut sıvılarında stabil olmayan formda bulunan DNA ve RNA'nın (10 dakika DNA, 5-60 dakika RNA) transferinde ideal araçlardır. Fazla miktarda nükleik asit taşıma kapasiteleri olması, üretilmeleri ve saflaştırmalarının basit olması nedeniyle son derece avantajlıdır (Karimi ve ark., 2016).

Fajlar hedefleri için son derece özgül olması ve kendilerinin hücreler arası yayılımlarını sınırlama kapasitelerinin olması sayesinde hedefe yönelik tedavide oldukça uygun ajanlardır (Lu ve Koeris, 2011). Fajların bir bütün olarak kullanılmasının ötesinde faj kaynaklı ürünlerin kullanılması son zamanlarda popüler olan uygulamalardandır. Örneğin faj endolizini spesifik hücrelerin peptidoglikan komponentlerini hidrolize eden faj enzimleridir (Entenza ve ark., 2005). Vincent

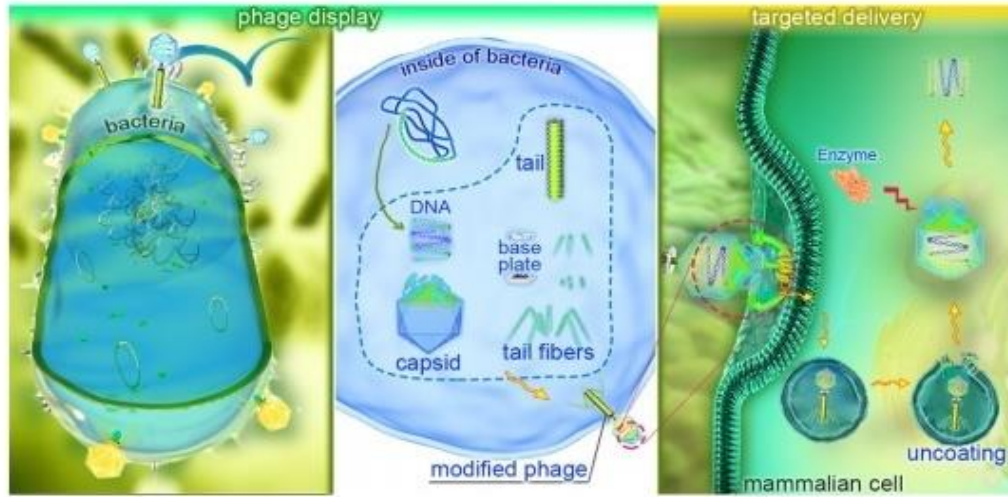
Fichetti 1940 yılında bakteriyofajların endolizinleri üzerine odaklanan ilk araştırmacıdır. Bu enzimler bakterilerin hücre duvarında ölümcül delikler oluşturmaktadır. Fichetti farelerde oluşan birçok gram pozitif patojenik mikroorganizma ile oluşan enfeksiyonların önlenmesinde ve tedavisinde lizinlerin etkin bir şekilde kullanılabileceğini açıklamış ve bu durum insanlardaki enfeksiyonların tedavisi için önemli bir adım niteliğinde olmuştur (Fischetti, 2008).

Klasik bakteriyofaj tedavisi yanında fajların kodladığı endolizinler antibiyotik gibi kullanılabilir. Lizinler bakterilerin hücre duvarındaki dört temel bağa zarar vermektedir. Viral veya bakteriyel insan enfeksiyonlarının hemen hepsi üst veya alt solunum yolları, intestinal, ürogenital veya oküler mukozalardaki stafilokok, streptokok veya pnömokok gibi kolonizan mikroorganizmalar kaynaklı başlamaktadır. Bu nedenle hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda mukozal kolonizasyonu önlemek için faj lizinleri ile çalışmalar yürütülmüştür. Örneğin nazofarengeal *Streptococcus pneumoniae* taşıyıcılığını azaltmak amacıyla (Loeffler ve ark., 2001) ve üst solunum yollarındaki *Streptococcus pyogenes* taşıyıcılığını önlemek (Nelson ve ark., 2001) için iki çalışma yapılmıştır.

Az miktarda faj lizini verildikten iki ile beş saat sonra mukozal kolonizasyonun yok olduğu gözlenmiştir. Grup B streptokoklar neonatal menenjit ve sepsisin oldukça önemli etkenlerindendir. Vaginal ve orofarenks kolonizasyonunu önlemek için bir faj lizini ile vaginal model oluşturulmuştur (Cheng ve ark., 2005). Yapılan bütün bu deneyler göstermiştir ki faj enzimleri kritik önemi olan patojen bakterilerde rezervuarların önlenmesi amacıyla başarıyla kullanılabilir. *Bacillus anthracis* için bir litik enzim bulunmuş ve bu enzimin intravenöz olarak kullanımında basilin kan dolaşımına geçmesini %100 oranında önlediği gösterilmiştir (Schuch ve ark., 2002). *S. pneumoniae*'ye etkili rekombinant bir litik fajla ratlarda yapılan bir deneyde fajların pnömokoksik menenjit tedavisinde son derece etkili olduğu gösterilmiştir (Grandgirard ve ark., 2008).

Vücutta belli bir hedefe ulaştırılmak istenen genler veya ilaçlar çoğu zaman fajların üzerinde belirgin değişiklikler oluşmasına neden olmayacak şekilde fajın yüzeyindeki kılıf proteinlerine bağlanır. Eklenen proteinler spesifik reseptörlere bağlanabilen antikor gibi ligandlar veya büyüme faktörü, ilaç veya metabolitler gibi tedavi edici parçalardır. Memeli hücrelerinin hedefleyen bakteriyofajlarda, hedefe olan afiniteyi artırabilmek için eklenen proteinler katyonik polimerlerle hibridize edilebilmektedir. Hedeflenen kanser hücrelerine sitotoksik genleri güvenli ve kontrollü bir şekilde ulaştırmak mümkün hale gelmiştir ve memelilerde fajların kullanılması ile ilgili sorunların üstesinden gelinebilmiştir (Yata ve ark., 2014). Yapılan in vivo çalışmalarda fajlarla yapılan hedefe yönelik tedavi ile hedefe yönelik olmayan tedaviye göre hem patojen bakterilerin tedavisinde hem de kanser tedavisinde çok daha başarılı sonuçların alındığı gösterilmiştir (Hershey ve Chase, 1952).

Faj “display” tekniği farmakolojide hedef seçimi için oldukça sık kullanılan ve bundan yaklaşık 30 yıl önce tanımlanmış bir tekniktir. İlk defa 1985 yılında kullanılmıştır (Rudolf ve ark.,1998). Bu teknikte fajın yüzey proteinlerinin kodlayan genlerden birinin içerisine rastgele oligonükleotitler yerleştirilmektedir. Bu işlem sonucunda farklı yüzey proteinleri içeren sayısız fajdan oluşan bir kütüphane meydana gelmektedir. Kütüphane üyesi olan fajlar sonrasında hücre kültür plaklarında hedef hücreler ile birlikte uygun sürelerde inkübe edilmekte ve bu sürenin sonunda yıkama yapılarak kuvvetli bağlanmayan fajlar uzaklaştırılmaktadır. Böylece hedef hücreye mükemmel bağlanma özelliği sağlayan DNA sekansları seçilmiş olur (Smith ve ark., 1985; Bakhshinejad ve ark., 2015). Faj display tekniğinin şematik görüntüsü şekil 2.8’de verilmiştir.



Şekil 2.8:Faj “display” tekniği

Örnek olarak Chen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada (Chen ve ark., 2015), karaciğerdeki satellit hücrelerinde insülin like growth factor-2 (IGF-2) reseptörlerine spesifik olarak bağlanabilen ve bu hücelere özel olarak antifibrotik madde verilebilmesine imkan veren peptid-431 bulunmuştur.

Faj “display” tekniğinde hücre yüzeyine antikorlar, özgül peptidler veya reseptörleri seçici proteinler yerleştirilebilir. Antikorların in vivo olarak afinitesini değiştirmek için kullanılabilirler. Aşı geliştirilmesi ve füzyon fajların üretilmesi üzerine çalışma yapılan konular arasındadır.

Fajlar genlerin, ilaçların dağıtılması için hem depolama kapasitelerinin büyük olması hem de hedef özgüllüğünün sağlanabilmesi açısından çok uygun nanotaşıyıcılardır. Fajların hem yüzey yapılarının hem iç yapılarının değiştirilmesi oldukça kolaydır ve yüzeylerine kovalent yapılar eklenerek hedef için oldukça özgül hale getirilebilmektedir. Birtakım polimerler eklenerek raf ömürleri uzatılabilmektedir. Bu konuda yapılan ilk çalışmalarda oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır, ancak vücuttaki dağılım, toksisite ve farklı nanotaşıyıcı tiplerinin immünolojisi üzerine çalışmalar devam etmektedir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.S.aureus Suşu

Klonlanan ve devamında sekans analizi yapılan bakteriyofaj daha önceki bir çalışmada içinde küçük lizojenik bir bakteriyofaj (MRSA ϕ sml) olduğu bulunan ve stoklanan MRSA bakterisidir. Bu çalışmadan sonra suş Mikrobank saklama tüplerinde -20⁰C’de tutulmuştur.

3.2. Gereçler

3.2.1. Besiyerleri

BHB (Plasmatec, M049)

Blood Agar Base (Plasmatec, M028)

Defibrine koyun kanı

LB sıvı ve katı besiyeri

3.2.2.Kimyasal Madde ve Malzemeler

Agaroz (Sigma-Aldrich, A6013)

Ampisilin (Ampicina Flakon, Mustafa Nevzat İlaç, 8699541270106)

Asetik Asit (Sigma-Aldrich, 720225)

Bacto Agar (Biolab, BAA10500)

DNase (New England Biolabs, M0303S)

DNA moleküler belirteci (Lambda Fajı *Hind III* DNA marker)

DNA Purification Kit (GeneJET Gel Extraction Kit, ThermoScientific™,K0692)

EDTA (MERCK, 70156890)

Etanol (TEKKİM, 64-17-5)

Etidyum bromür (APPLICHEM, 1239458)

Glasial asetik asit (Sigma-Aldrich 27225)

Glikoz (MERCK, 148342)

Guanidin tiosiyanat (SERVA, 593840)
Hind III Restriksiyon Enzimi (Thermo Scientific™, ER0505)
IPTG (ThermoFisher Scientific, R1171)
Maya ekstraktı (Yeast extract, SRLCHEM, YI012)
Mitomisin C (Mitem 20 mg, London, 3480006)
NaCl (MERCK, Germany, 1.06404.1000)
NaOH (MERCK, 106482)
PEG-6000 (Sigma-Aldrich, Germany, 81255-2506)
Potasyum asetat (MERCK, 108420)
Proteinaz K (Thermo Scientific™, EO0491)
SDS (Sigma-Aldrich, 862010)
Shrimp Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific™, EF0511)
Silika (Sigma-Aldrich, 112945-52-5)
T4 DNA Ligaz (Thermo Scientific™, EL0011)
Trypton (Tryptone powder, Plasmatec, 5060179821641)
TRIS base (Sigma-Aldrich, T1513)
X-gal (ThermoFisher Scientific, R0941)

3.2.3. Sarf Malzemeleri

Enjektörlü filtre (por çapı 0.2 µm)
20 ml' lik enjektör
Steril 1.5 ml'lik eppendorf
Steril 2 ml'lik eppendorf
Steril filtreli pipet uçları
50 ml'lik flakon tüpler

3.2.4. Araçlar

Buzdolabı (Bosch)
Çalkalayıcı İnkübatör (Biosan Shel Lab)
Derin dondurucu

Elektroforez Tankı (Bio Rad)
Fotoğraf Makinesi (Canon)
Güç Kaynağı (Biometra)
Hassas tartı (Mettler-Toledo)
İnkübatör (Heraeus)
Kuru ısıtıcı blok (HVD Life Sciences)
Otoklav (Nüve Steam Art)
Otomatik Pipetler (Gilson Pipetman)
Santrifüj büyük (Sigma 3-30 KS)
Santrifüj küçük (Eppendorf Centrifuge 548)
Su banyosu (Labormed)
UV transilluminatör (Vilber Lourmat)
Vorteks (Drogan)

3.2.5. *S.aureus* Suşlarının Üretimesinde Kullanılan Besiyerleri

Luria Broth(LB) Katı Besiyeri Hazırlanması

Tripton	4 g
Maya ekstraktı	2 g
NaCl	4 g
Bacto Agar	6 g
dH ₂ O	400 ml

Bütün malzemeler karıştırıldıktan sonra 121⁰ C’de 15 dk otoklavlanmıştır. 40-50⁰C’ye soğutulduktan sonra 200 µl 250 mg/ml ampisilin eklenmiştir. Karıştırıldıktan sonra 100 ml’lik petri plaklarına 20’şer ml paylaştırılmış ve polimerizasyona bırakılmıştır.

LB Sıvı Besiyeri Hazırlanması

Trypton	4 g
Maya ekstraktı	2 g
NaCl	4 g
dH ₂ O	400 ml

Tüm malzemeler karıştırıldıktan sonra 121⁰C’de 15 dk otoklavlanmıştır. Oda ısısında soğumaya bırakıldıktan sonra +4⁰C’de saklanmıştır.

Brain Heart Broth Besiyeri (BHB) Hazırlanması

1. Kuru toz halindeki besiyerinden 37 g tartılmıştır ve 1000 ml distile suda çözülmüştür.
2. 121⁰C’de 15 dk sterilize edilmiştir.
3. Besiyeri soğuduktan sonra +4⁰C’de buzdolabında saklanmıştır.

Kanlı Besiyeri Hazırlanması

1. Kuru toz halindeki besiyerinden 40 g tartılarak 1000 ml distile suda çözündürülmüştür.
2. 121⁰C’de 15 dk’da sterilize edilmiştir.
3. Besiyeri 40-50⁰C’ye kadar soğutulmuştur.
4. 50 ml defibrine koyun kanı, besiyeri üzerine konulmuştur, iyice karıştırdıktan sonra petri kutularına dökülmüştür.
5. Besiyeri katılaştıktan sonra +4⁰C’de buzdolabında saklanmıştır.

Mitomisin CHazırlanması

Mitomisin C	2 mg
Double-distillated H ₂ O (ddH ₂ O)	2 ml

Polietilen Glikol (PEG) Solüsyonu Hazırlanması

1. Steril balonla 50 g PEG sonra da 3 g NaCl tartılmıştır, üzerine toplam volüm 125 ml olacak şekilde distile su konulmuştur.
2. 121°C’de 15 dk sterilize edilmiştir.
3. Solüsyon soğuduktan sonra pH’sı 7.2 olacak şekilde ayarlanmıştır.
4. Oda ısısında saklanmıştır.

DNA Lizis Buffer Hazırlanması

1 M TRİS base (pH 8,0) stok	100 µl
0,5 M Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA) (pH 8,0) stok	100 µl
%10 Sodyum dodesil sülfat (SDS)	60 µl
Proteinaz K	40µl
ddH ₂ O	500 µl

Alkalen Lizis Solüsyonu I (100 ml) Hazırlanması

1 M TRIS (pH 8,0) stok	2.5 ml
0.5 M EDTA (pH 8,0) stok	2 ml
1 M Glikoz	5 ml
ddH ₂ O	90.5 ml

Alkalen Lizis Solüsyonu II (10 ml) Hazırlanması

Taze olarak hazırlanması gereklidir.

ddH ₂ O	8 ml
2 M Sodyum hidroksit (NaOH)	1 ml
%10 SDS	1 ml

Alkalen Lizis Solüsyonu III (100 ml) Hazırlanması

5 M Potasyum Asetat (KOAc) Solüsyonu	60 ml
Glasial asetik asit	11.5 ml
ddH ₂ O	28.5 ml

Guanidin Solüsyonu Hazırlanması:

Guanidin	240 g
ddH ₂ O	180 ml

İkisi karıştırılarak 60°C'de su banyosunda eritildikten sonra üzerine 0.5 M'lik pH'sı 8 olan EDTA'dan 17.6 ml eklenmiştir.

Tris Asetik Asit EDTA (TAE) Buffer (10 X) Stok Solüsyonu Hazırlanması

Tris Base	48.4 g
Glasial asetik asit	11.4 ml
EDTA	3.7 g
Deiyonize su	800 ml

800 ml deiyonize su içerisinde TRIS, glasial asetik asit ve EDTA çözündürüldükten sonra karışım 1 lt'ye tamamlanmıştır. Oda ısısında saklanmış ve kullanım esnasında 1/10 oranında olacak şekilde dilüe edilmiştir.

Silika Solüsyonu

6 g silisyum dioksit (SiO₂) tartılarak 50 ml'lik flakona aktarılmıştır. 50 ml'ye kadar distile su ile tamamlandıktan sonra 24 saat oda ısısında bekletilmiş, sonrasında suyun 43 ml'si dökülerek tekrar 50 ml'ye ddH₂O tamamlanmıştır. Oda ısısında 5 saat bekletildikten sonra 44 ml'si dökülmüştür ve üzerine 40 µl 10 M HCl eklenmiştir.

3.3.S.aureus Suşunun Üretilmesi

1. Çalışmam esnasında stoktan çıkarılan eppendorfun içerisinde bir boncuk alınarak 3 ml BHB sıvı besiyeri içeren tüp içerisine ekilmiş ve 37⁰C'lik etüvde inkübe edilmiştir.
2. 24 saat sonra sıvı besiyerinden %5'lik koyun kanlı agara tek kullanımlık plastik öze ile tek koloni düşürme ekim tekniği kullanılarak ekim yapılmıştır ve agar plakları koloniler oluşuncaya kadar 37⁰C'lik etüvde inkübe edilmiştir.

3.4.Lizojenik Fajların İndüklenmesi ve İzolasyonu

Kaneko ve ark. bulduğu, Şahin F ve ark. tarafından modifiye edilen faj ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır.

- 1.%5'lik koyun kanlı agarda üreyen kolonilerden bir tanesi alınarak 50 ml BHB sıvı besiyerine ekilmiştir.
- 2.37⁰'de 180 rpm'lik çalkalayıcı inkübatörde logaritmik üreme fazına gelinceye kadar üretildikten sonra 20µl Mitomisin C eklenerek sabaha kadar inkübasyona devam edilmiştir.
- 3.Ertesi gün indüklenen bakteriler 50 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılarak 5.000 rpm'de 40 dk çevrilmiştir. Çevirdikten sonra süpernatantı başka bir 50 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- 4.Süpernatantın üzerine 1/10 olarak sulandırılan DNase'dan 10 µl konularak oda ısısında 1 saat inkübe edilmiştir.
5. Süpernatant 0.2 µm'lik filtreden iki defa geçirilmiştir.
6. 40 ml süpernatana 10 ml PEG solüsyonu eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra +4⁰C'de sabaha kadar inkübe edilmiştir.
- 7.Ertesi gün süpernatant ve PEG solüsyonu olan karışım 5.000 rpm'de 1 saat çevrilmiştir.
- 8.Çevirdikten sonra bakteriyofajlar tüpün dibinde pellet olarak çökmüştür ve süpernatant kısmı atılmıştır.

3.5.Lizojenik Fajlardan DNA Ekstraksiyonu

Proteinaz K DNA ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır.

1. Pellet üzerine 500 µl ddH₂O konularak birkaç defa hafif pipetaj yapılmış ve eppendorfa aktarılmıştır.
2. Çözülen pellet üzerine 100 µl 1 M TRİS (pH:8), 100 µl 0.5 M EDTA (pH:8), 60 µl %10'luk SDS ve 40 µl proteinaz K eklenmiş ve 55⁰ C ısıtıcı blokta 4-5 saat inkübe edilmiştir.
3. Üzerine hacminin üç katı kadar guanidin solüsyonu eklenmiştir. Sonrasında 20-50 µl silika eklenerek vorteks yapılmış ve 10 dk kadar çalkalayıcı inkübatörde bekletilmiştir.
4. 6.000 rpm'de 1 dk kadar santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı atılmıştır.
5. Üzerine 1 ml %70'lik etanol eklendikten sonra vorteks yapılarak pellet çözündürülmüştür.
6. 6.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısmı atılarak tekrar 1 ml %70'lik etanol eklenmiştir. Pellet çözündürüldükten sonra 12.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılmış ve süpernatant kısmı atılmıştır.
7. Pellet oda ısısında iyice kurutulduktan sonra üzerine 100 µl ddH₂O eklenmiştir. 37⁰C'lik etüvde 10 dk kadar bekletildikten sonra 12.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılarak süpernatant kısmı alınıp ayrı bir eppendorfa konulmuştur. DNA'yı silikadan ayırabilmek amacıyla bu işlem bir kez daha tekrarlanmıştır.

3.6. Lizojenik Faj DNA'larının Konsantre Edilmesi ve Temizlenmesi

Elde edilen faj DNA'sı Thermo Scientific DNA Purification kiti ile temizlenmiştir.

1. Ekstrakte edilen DNA ile eşit hacimde bağlayıcı solüsyondan eklenip iyice vortekslenmiştir.
2. Kollektör tüpün içine spin kolon yerleştirilerek DNA ve bağlayıcı solüsyon içeren karışım spin kolona aktarılmıştır.

3.12.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Bu işlem iki defa tekrarlanmıştır.

4.Kollektör tüpteki sıvı atılmış ve spin kolon içerisine 700 µl yıkama solüsyonu eklenmiştir. 12.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılarak kollektör tüpteki solüsyon atılmıştır.

5.12.000 rpm'de tekrar 2 dk boş santrifüj yapılmıştır. Sonrasında spin kolon kollektör tüpten çıkarılarak ayrı bir eppendorf içerisine konulmuş ve alkolün kuruması için beklenmiştir.

6.Üzerine 50 µl elüsyon solüsyonu eklenmiştir. 2-3 dk oda ısısında beklendikten sonra 12.000 rpm'de 1 dk çevrilmiştir. Bu işlem 1 defa daha tekrarlandıktan sonra spin kolon çıkarılarak atılmış ve eppendorf içerisinde 50 µl kadar saf DNA kalmıştır.

DNA miktarını değerlendirmek amacıyla %1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. 0.50 gr toz agar tartılmış, üzerine 50 ml 1X TAE buffer eklenmiş ve mikrodalga fırında kaynamadan içindeki tüm agar tozları eriyinceye kadar bekletilmiştir. Sonra oda sıcaklığında 45-50⁰C'ye soğuması için bekletilmiş ve içine %5'lik etidyum bromür çözeltisinden 1.5 µl eklenerek iyice karıştırılmıştır. İnce dişli tarak yerleştirilmiş küçük jel tabağının eğimi su terazisi ile kontrol edildikten sonra jel hava kabarcığı oluşmadan yavaşça içine dökülmüştür. 15 dk jelin donması için beklendikten sonra jel tabağı çıkarılarak uygun boyuttaki elektroforez tankı içerisine yerleştirilmiş ve jelin üzerini örtecek kadar 1X'lik TAE buffer eklenmiştir. Kuyucuğa 5 µl DNA yüklenmiş ve 100 volt elektrik akımı altında 30 dk yürütüldükten sonra Ultraviyole (UV) transilluminatörde DNA miktarı ve saflığı değerlendirilmiştir.

3.7.Lizojenik Faj DNA'sının *Hind III* ile Kesilmesi

1.Elde edilen faj DNA'sından 45 µl alınarak eppendorf tüpüne konulmuştur.

2.Üzerine 40 µl ddH₂O (Toplam hacim 100 µl olacak şekilde hesaplanmıştır) eklenmiştir.

3.10 µl buffer R eklenmiştir.

4.Sonrasında 5 µl *Hind III* enzimi konulmuş, iyice vortekslenmiş ve 37⁰C'de 3-4 saat kadar inkübasyona bırakılmıştır.

3.8.Kesilen Lizojenik Faj DNA'larının Elektroforezi

Restriksiyon enzimi ile kesilen faj DNA'sının görüntülenebilmesi amacıyla %1.5'luk agaroz jel hazırlanmıştır. Bunun için 0.75 g toz agar tartılmış, üzerine 50 ml 1X'lik TAE eklenmiştir. Agar tabağına kalın dişli agar yerleştirildikten sonra jel içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde yavaşça dökülmüştür. 15 dk kadar jelin donması için beklendikten sonra jele yükleme aşamasına geçilmiştir. Kesimin yapıldığı eppendorf içerisine 20 µl loading buffer eklendikten sonra hafif pipetaj yapılarak karışması sağlanmıştır. Herbir kuyucuğa 20 µl yükleme yapılmıştır. Bir kuyucuğa da fajın kesim parçalarının (insert) büyüklüklerini değerlendirebilmek amacıyla 8 µl Lambda DNA/*Hind III* marker yüklenmiştir. 100 V altında 1 saat yürütüldükten sonra UV transilluminatörde görüntülenmiş ve jelin fotoğrafları çekilerek bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

3.9.Faj DNA Parçalarının Jelden Ekstrakte Edilmesi

Hind III marker ile insertlerin boyutları karşılaştırılarak tahmini insert büyüklükleri belirlenmiştir. Bir bistüri yardımıyla fajın dört tane insertü jelden ayrılarak farklı eppendorflar içerisine konulmuştur. Thermo Scientific'in DNA Purification kiti kullanılarak jelden DNA ekstraksiyonu yapılmıştır.

1-Eppendorfların darası alınarak insertler tartım cihazıyla tartılmıştır.

2-1 mg için 1 µl olacak şekilde bağlayıcı solüsyon eklenmiştir.

3-Isıtıcı blokta 60°C'de ara ara vortekslenerek jel tamamen eriyene kadar bekletilmiştir.

4-Kollektör tüpün içerisine bir spin kolon yerleştirilmiş ve eriyen karışım tamamen spin kolon içerisine aktarılmıştır.

5-12.000 rpmde 1 dk santrifüj yapılmış ve bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra kolektör tüp içindeki karışım atılmıştır.

6-Spin kolon içerisine 700 µl yıkama solüsyonu eklenmiştir.

7-12.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldıktan sonra kollektör tüpteki solüsyon atılmıştır. Sonrasında 12.000 rpm'de tekrar 2 dk boş santrifüj yapılmıştır.

8- Spin kolon alınarak başka bir eppendorf içerisine yerleştirilmiş, etanolün kuruması için 5-10 dk beklenmiştir.

9-Kuruduktan sonra spin kolona 50 µl elüsyon bufferı eklenmiş ve oda ısısında birkaç dk beklenmiştir.

10-12000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılmış, sonrasında bu işlem bir kez daha tekrarlanmıştır ve böylece insert DNA'ları saf olarak elde edilmiştir.

3.10. İnsertlerin pBluescript SK (pBSK) İçerisine Klonlanması

Çalışmada kullanılan pBSK plazmidine ait şematik görüntü şekil 3.1'de gösterilmiştir. Boş bir eppendorf içerisine 15 µl pBSK plazmidi, 70 µl ddH₂O, 10 µl buffer R ve 5 µl *Hind III* enzimi eklenmiş, iyice vortekslenmiş ve 37°C'de 3-4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında *Hind III* ile kesilmiş pBSK'nin self ligasyonunu önlemek amacıyla calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP) yapılmıştır:

Eppendorf içerisine 50 µl plazmid DNA'sı, 5 µl fastap buffer, 1 µl fastap enzim eklenmiştir (toplam hacim 56 µl olacak şekilde). İyice vorteksledikten sonra 37°C'lik etüvde 10 dk beklenmiş ve 75°C'ye ayarlanmış ısıtıcı blokta 5 dk inaktivasyon yapılmıştır.

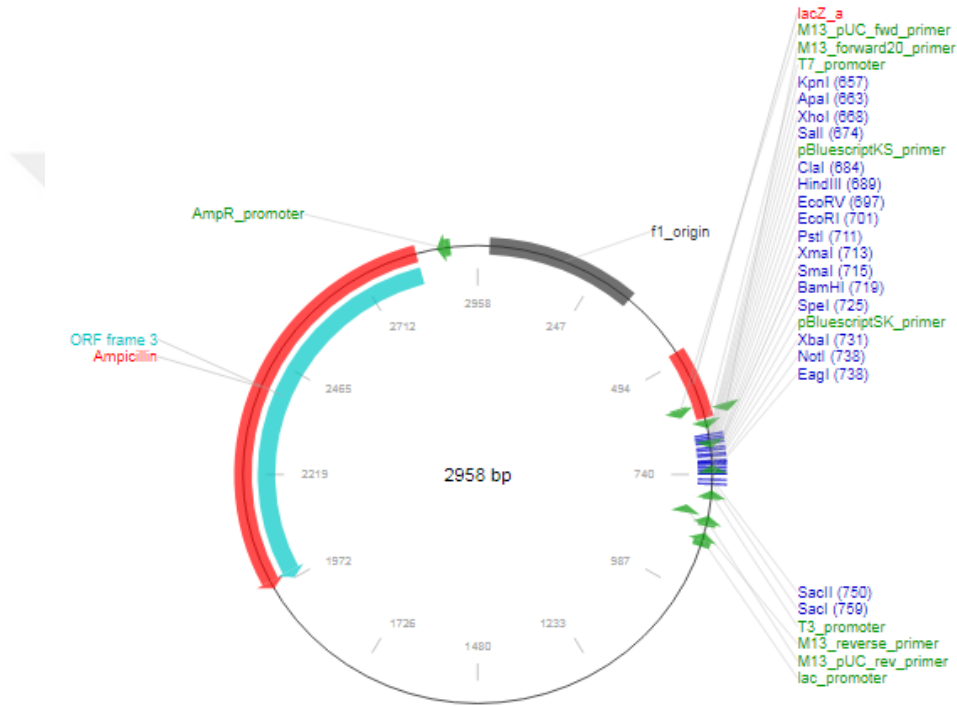
Bu aşamadan sonra ligasyona geçilmiştir. Dört insert için dört ligasyon, bir de ayrı olarak self ligasyon olup olmadığına bakmak amacıyla kontrol ligasyon yapılmıştır.

İnsertlerin ligasyonu:

15 µl insertlerden, 2 µl pBSK (*Hind III* enzimi ile kesilmiş ve CIAP yapılmış), 2 µl ligaz buffer ve 1 µl ligaz enzimi eppendorf içine konulmuş, vorteks yapılmış ve 22°C'de 30 dk beklendikten sonra transformasyon aşamasına geçilmiştir.

Kontrol ligasyon:

15 µl ddH₂O, 2µl pBSK (*Hind III* enzimi ile kesilmiş ve CIAP yapılmış), 2 µl ligaz buffer ve 1 µl ligaz enzimi eklenmiştir. Vorteks yapıldıktan sonra 22⁰C’de 30 dk beklenmiş ve ardından transformasyon işlemine geçilmiştir.



Şekil 3.1: pBSK plazmidine ait şematik görüntü

3.11.pBSK İçerisine Klonlanmış İnsertlerin Transformasyonu

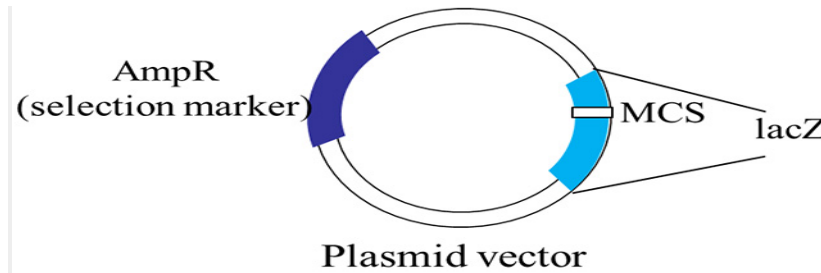
Kompetan DH5α suşu üzerine 4µl pBSK ile ligasyonu yapılmış insertlerden eklenmiştir. Ayrıca bir tüpe de kontrol ligasyonu yapılmış pBSK eklenmiştir. Buz üzerinde 30 dk sonrasında 42⁰C’ye ayarlanmış ısıtıcı blokta 30 sn bekletilmiştir. 2 dk buz üzerinde tutularak üzerine 1000 µl LB sıvı besiyeri eklenmiştir. Çalkalayıcı inkübatörde 37⁰C’de +210 rpm’de bir saat bırakıldıktan sonra bek alevinin yanında ampisilinli LB besiyerlerine ekimi yapılmıştır. Plaklar kurumaya bırakılmış, agar

yüzeyi üstte kalacak şekilde 37⁰C'lik etüve yerleştirildikten sonra 12-18 sa'lik inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda etüvden çıkan plaklardaki kolonilere bakılmış ve klonlama gerçekleşip gerçekleşmediği mavi-beyaz tarama testi ile değerlendirilmiştir. Bu yöntem bakterilerde laktozu glikoz ve galaktoza parçalayan β galaktozidaz enzimi varlığına dayanmaktadır. Normalde kompetan *E.coli* hücreleri β galaktozidaz üretimini sağlayan lacZ operonu içermemektedir. Hücre içine lacZ operonu olan bir plazmid alındığı zaman β galaktozidaz üretimi olmaktadır. Ancak klonlanma bölgesine bir parça eklendiği zaman lacZ operonunun bütünlüğü bozulmakta, bakteri laktozu parçalayacak olan β galaktozidaz enzimini üretememektedir.

Enzim aktivitesini değerlendirmek amacıyla kolonilerin yüzeyine kromojenik bir substrat olan X-gal solüsyonu damlatılmaktadır. Damlatıldıktan sonra plaklar 37⁰C'lik etüvde 30 dk bekletilmektedir. Eğer bakteri β -galaktozidaz enzimi içeriyorsa X-gal 5-bromo-4-chloro-indoxyl'e indirgenir, devamında kendiliğinden 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigoya dönüşür ve koloni mavi renk olur. Dolayısıyla rekombinasyon gerçekleşen yani lacZ operonu içerisine klonlama olan koloniler beyaz renkte kalırken, rekombinasyon olmayan yani klonlama olmayan koloniler mavi renge dönüşecektir.

X-gal solüsyonu içerisinde Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) bulunmaktadır. Metabolize edilemeyen bir galaktoz analogu olan IPTG lacZ operonunun ekspresyonunu indüklemektedir.



Şekil 3.2:Mavi-beyaz tarama testinde kullanılabilecek bir örnek plazmid

Sonraki aşamada beyaz kolonilerden seçilerek plazmid ekstraksiyonu yapılmıştır.

3.12.Plazmid Ekstraksiyonu (Alkalın lizis yöntemi)

1.50 ml'lik sıvı LB besiyeri içerisine 25 µl ampisilin eklendikten sonra karıştırılmış ve sonrasında steril cam tüpler içerisine 2.5'ar ml dağıtılmıştır.

2.Dört ayrı klonlanmış insert içeren ve bir tane kontrol plağından beyaz kolonilerden seçilip, pipet ucu ile alınarak cam tüpler içerisine atılmıştır. Sabaha kadar 37°C ve +210 rpm'de üremeleri için bırakılmıştır.

3. Ertesi gün çıkarılan cam tüplerdeki besiyerleri eppendorf içerisine aktararak plazmid ekstraksiyonu işlemine başlanmıştır.

4.Eppendorflar 5.000 devirde 5 dk santrifüj edilerek bakterilerin pellet olarak çökmesi sağlanmıştır.

5.Eppendorflardaki süpernatant atıldıktan sonra üzerine 100 µl alkalın lizis solüsyon I'den eklenmiş ve hafif pipetaj yapılarak pelletin çözündürülmesi sağlanmıştır.

6.5. aşamadan sonraki işlemler buz üzerinde yapılmıştır. Eppendorflara 200 µl alkalın lizis solüsyon II'den eklenmiş, eppendorf birkaç kere ters düz edildikten sonra buz üzerinde 5 dk bekletilmiştir.

7.150 µl alkalın lizis solüsyon III'den eklendikten sonra birkaç defa ters düz edilerek buz üzerinde 10 dk bekletilmiştir.

8.10 dk dolduktan sonra 15.000 devirde 10 dk santrifüj yapılmış ve devamında süpernatant kısmı ayrı eppendorflara alınmıştır.

9.Eppendorftaki sıvı hacminin üç katı kadar guanidin solüsyonu ve 5 µl silika konulduktan sonra vorteks yapılmış ve 10 dk 37°C'lik etüvde inkübe edilmiştir.

10.5.000 devirde 1 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısmı atılarak üzerine 1 ml %70'lik etanolden eklenmiş, vorteks yapılmış ve 12.000 devirde 1 dk santrifüj yapılmıştır.

11. Süpernatant kısmı atılarak etanolle presipitasyon basamağı tekrarlanmıştır.

12.Pellet etanolün kuruması amacıyla oda ısısında bekletilmiştir.

13.50 µl ddH₂O eklenerek hafifçe pipetaj yapıp pellet çözündürüldükten sonra 12.000 devirde 1 dk santrifüj yapılmıştır.

14.Süpernatant kısmı başka bir eppendorfa alınmış ve silikanın DNA'dan daha iyi ayrılmasını sağlamak amacıyla bu işlem bir kez daha tekrarlanmıştır.

3.13. Plazmidlerin *Hind III* Restriksiyon Enzimi İle Kesilerek Doğru Klonlama Olan Plazmidlerin Seçilmesi

Boş bir eppendorf içerisine 8µl ekstrakte edilen plazmid, 1 µl buffer R ve 1 µl *Hind III* enziminden eklenip, vortekslelendikten sonra 37°C'lik etüvde 2-3 saat bekletilmiştir.

Sonrasında %1.5'luk agaroz jel hazırlanarak kuyucuklara Lambda DNA/ *Hind III* marker ve *Hind III* ile kesilmiş pBSK ile birlikte yükleme yapılmış, 120 volt altında elektroforez tankında yürütülmüş ve UV transilluminatörde izlenmiştir. Lambda DNA/*Hind III* marker ve kesim yapılmış plazmid ile karşılaştırma yapılarak içerisine doğru insert yerleşmiş olan plazmidler seçilmiş ve bunlar tekrar kompetan DH5α suşu içine transforme edilerek çoğaltılması sağlanmış, sonrasında tekrar plazmid ekstraksiyonu yapılmıştır.

3.14. Büyük Volümlerde Plazmid Ekstraksiyonu (Large Prep Yöntemi)

- 1.Balon joje içerisine 50 ml sıvı LB besiyeri konularak üzerine 25 µl ampisilin eklenmiştir. Mavi beyaz tarama yöntemiyle seçilen beyaz kolonilerden her bir insert için birer adet olmak üzere steril pipet ucu ile alınarak balon joje içerisine atılmıştır. Çalkalayıcı inkübatörde 37°C'de sabaha kadar inkübe edilmiştir.
- 2.Ertesi sabah balon jojedeki sıvılar 50 ml'lik flakonlara aktarıldıktan sonra 10.000 devirde 15 dk santrifüj yapılmıştır.
- 3.Süpernatant kısmı atıldıktan sonra pelletin üzerine 1 ml alkalen lizis solüsyon I'den eklenmiştir. Pipetaj yapılarak pellet iyice solüsyon içerisinde çözündürüldükten sonra 2 ml alkalen lizis solüsyon II'den eklenmiş ve birkaç defa flakon ters düz edildikten sonra buz üzerinde 5 dk bırakılmıştır.
4. Üzerine 1.5 ml alkalen lizis solüsyon III'den eklendikten sonra tekrar birkaç defa ters düz edilmiş ve buz üzerinde 10 dk bırakılmıştır.

5.10 dk'lık sürenin sonunda 15.000 devirde 30 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısmı dikkatlice başka bir flakona aktarılmıştır.

6.Üzerine kendi hacminin üç katı kadar guanidin solüsyonu ve 30 µl silika eklenmiş, flakon ters düz edilerek içindekilerin karışması sağlandıktan sonra 37°C'lik etüvde 10 dk inkübasyona bırakılmıştır.

7.6.000 devirde 1 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atılmış, pelletin üzerine 1 ml %70'lik etanol eklenmiş, vorteks yapılmış ve 12.000 devirde 1 dk santrifüj yapılmıştır.

8.Süpernatant kısmı atılarak etanol presipitasyon basamağı bir kez daha tekrar edilmiş ve sonrasında pellet oda ısısında kurumaya bırakılmıştır.

9.Pellet tamamen kuruduktan sonra üzerine 350 µl ddH₂O eklenmiş ve hafifçe pipetaj yapıldıktan sonra 10 dk kadar 37°C'lik etüvde bırakılmıştır.

10.12.000 devirde 1 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısmı başka bir eppendorfa alınmıştır.

11.Silikayı DNA'dan daha iyi ayırmak amacıyla bu basamak bir kez daha tekrarlanmış ve sonunda plazmid saf olarak elde edilmiştir.

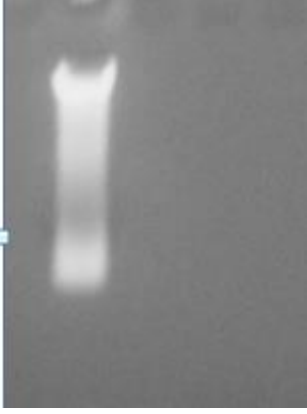
Elde edilen plazmidler Thermo Scientificin DNA Purification kiti kullanılarak temizlendikten sonra dizi analizi işleminin yapılabilmesi için Refgen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Laboratuvarı'na gönderilmiştir. Sekans analizi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) için kullanılan primerler Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1.Sekans analizi için kullanılan primerler

Primer	Sekansı	Kullanım amacı
b1F1	5'-TAT AGC ACA GAC ATA TCA AG-3'	İnsert 1'in 2. Sekans analizi
b1R1	5'-ATC CCT ATT AAA TGC CAA TAG-3'	İnsert 1'in 2. Sekans analizi
B2F1	5'-AAT TAC TAT GCA ACA AGA GTG-3'	İnsert 2'nin 2. Sekans analizi
B2R1	5'-GTG TAC TTT ATA GTT GTT ACA TC-3'	İnsert 2'nin 2. Sekans analizi
B3F1	5'-GAA TAT TCA AGA CAC GAT CAA C-3'	İnsert 3'ün 2. Sekans analizi
B3R1	5'-TGC CGT CAG ATG TAG TCA CAG-3'	İnsert 3'ün 2. Sekans analizi
1-3 F	5'-AGT TTG GCA CCT TAG ATG-3'	İnsert 1'in 3. Sekans analizi
1-3 R	5'-AAA CGC GCT TAT CTG TTC-3'	İnsert 1'in 3. Sekans analizi
1-4 F	5'-ATC CTT GTT CCA AGC CAT G-3'	İnsert 1'in 4.sekans analizi
1-4 R	5'-TCT TTA GCT GGA CTG AAC-3'	İnsert 1'in 4.sekans analizi
I23T-F1	5'-AAA CCG ATG ATA ACG TAG-3'	İnsert 2 ve 3 arası PCR
I23T-R	5'-GCT ATT AAC GTG TAT CAG-3'	İnsert 2 ve 3 arası PCR
I12-F	5'-AAA GCA ACA CAG TGC TAC-3'	İnsert 1 ve 2 arası PCR
I12-R1	5'-GCG ATT GTA AGC TTG ATG-3'	İnsert 1 ve 2 arası PCR
I23-F	5'-AAT TAC AGA TAA GTA GAG-3'	İnsert 2 ve 3 arası PCR
I23-R1	5'-TTT ATA GTG CAT CTA CAG-3'	İnsert 2 ve 3 arası PCR
KF	5'-CGT CTT AAC AAG TTG AAC-3'	PCR pozitif kontrol
KR	5'-TGA CCA TTC TCT GTC ATC-3'	PCR pozitif kontrol

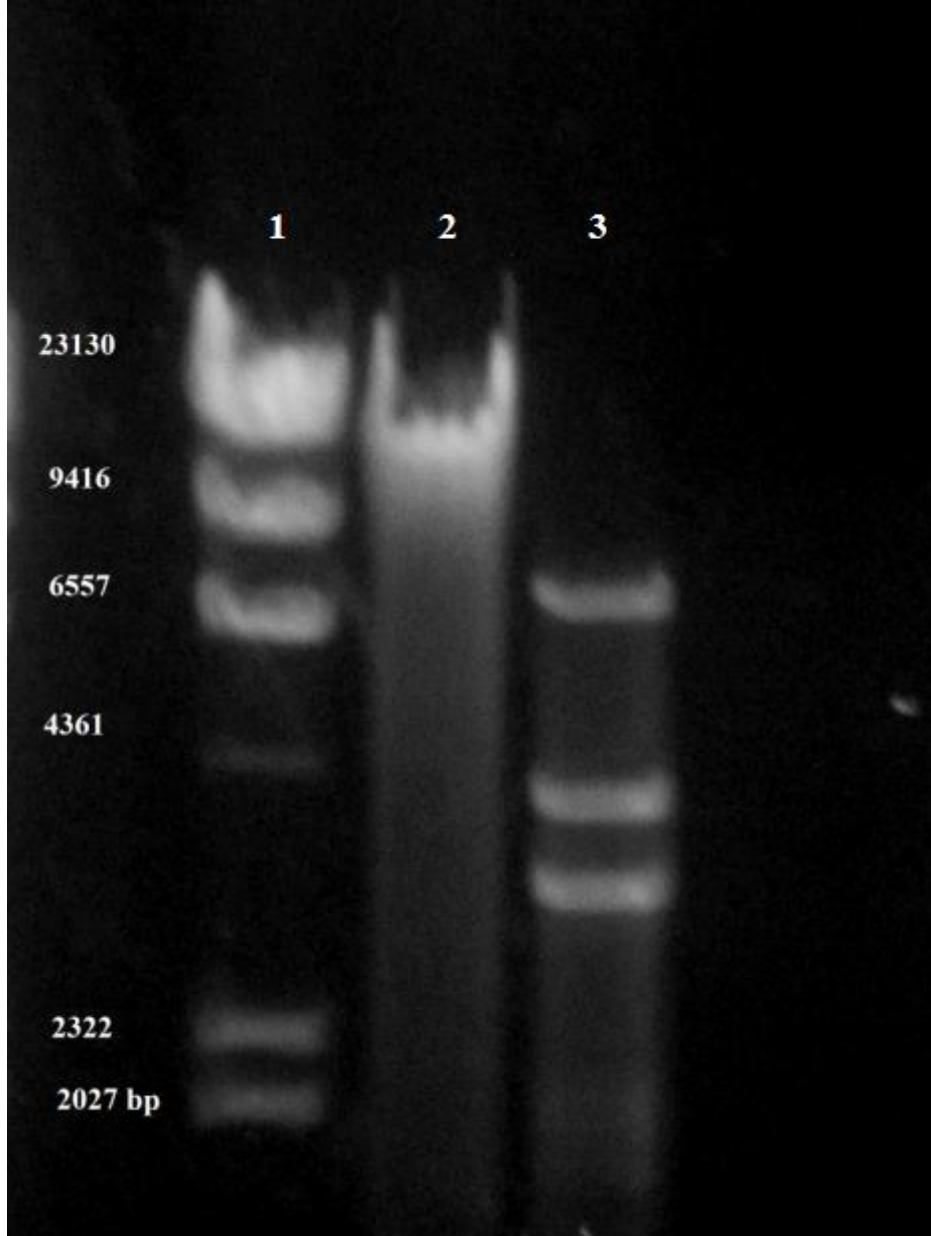
4.BULGULAR

1057 numaralı MRSA suşundan faj ekstraksiyon protokolü uygulanarak faj DNA'sı elde edilmiştir. Faj DNA'sı Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: Faj ekstraksiyonu sonucunda elde edilen faj DNA'sı

Daha sonra faj DNA'sı *Hind III* enzimi ile kesilmiş, kesim sonucunda dört adet insert görüntülenmiştir. İnsertlerin büyüklükleri Lambda DNA/*Hind III* markerdaki bantların büyüklükleri ile karşılaştırılmıştır. İnsertlerin boyut olarak en büyüğü insert 1, en küçüğü insert 4 olarak isimlendirilmiştir (insert1-insert 2-insert 3-insert 4). İnsertlerin büyüklüklerini değerlendirebilmek amacıyla lambda DNA/*Hind III* marker ile birlikte yürütülmüştür. Buna göre değerlendirildiğinde yaklaşık olarak insert 1'in 6.500 bp, insert 2'nin 4.000 bp, insert 3'ün 3.000 bp ve insert 4'ün 2.000 bp olduğu saptanmıştır. Lambda DNA/*Hind III* marker, faj DNA'sı ve *Hind III* ile kesim sonucu oluşan insertlerin yürütüldüğü agaroz jelin fotoğrafı şekil 4.2'de verilmiştir.

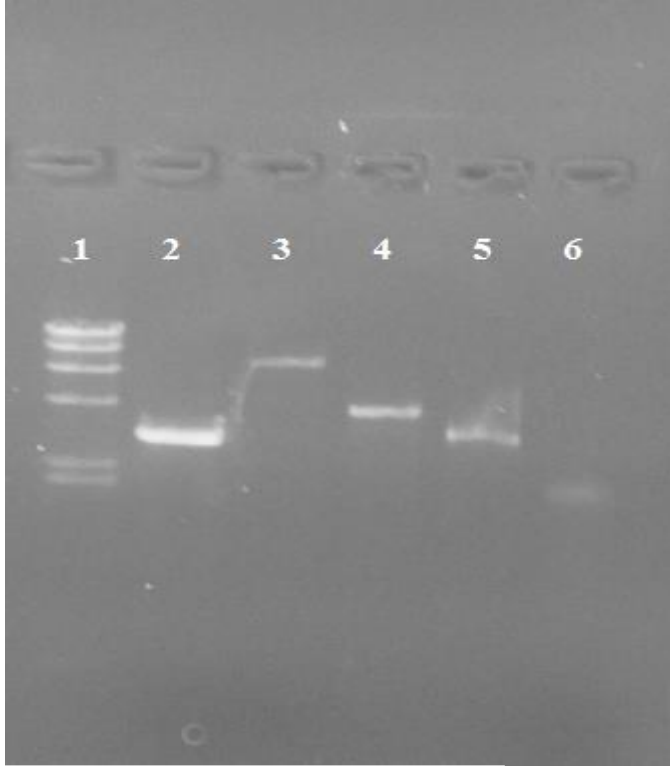


Şekil 4.2:

1-Lambda DNA/*Hind III* marker (bantlar bp olarak büyüklükleri ile birlikte verilmiştir.)

2-Faj DNA'sı

3-*Hind III* ile kesilmiş faj DNA'sı



Şekil 4.3: Jelden ekstrakte edilen insertlere ait fotoğraf

1-Lambda DNA/*Hind III* marker

2-*Hind III* ile kesilmiş pBSK

3-İnsert 1

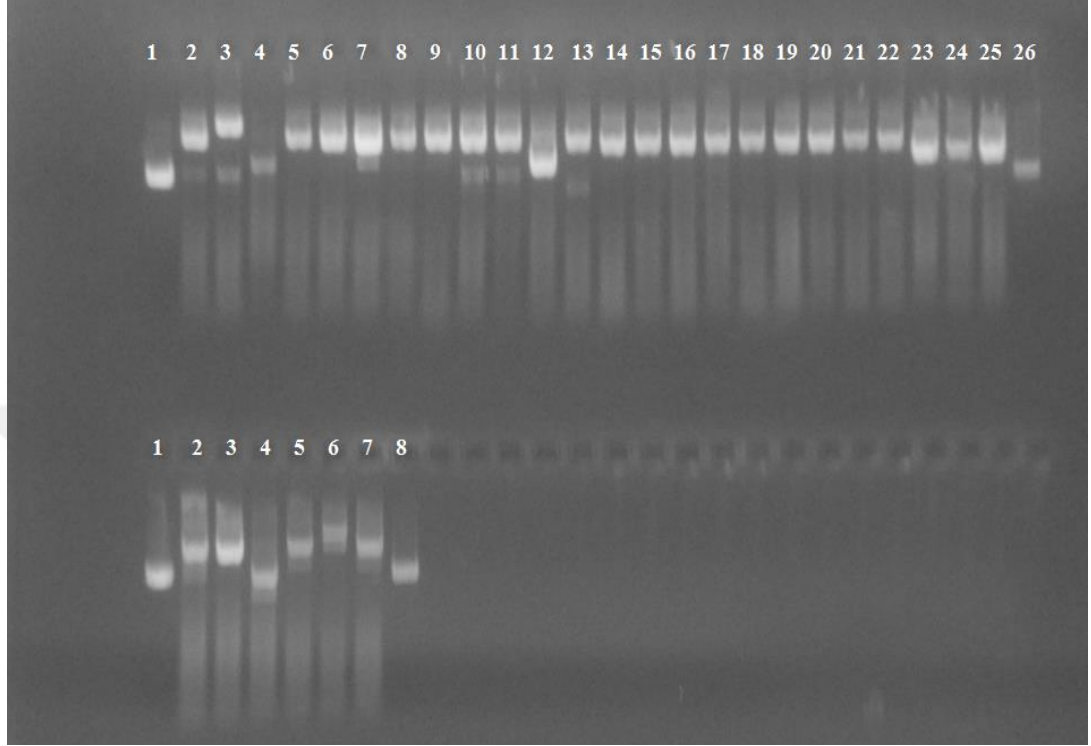
4-İnsert 2

5-İnsert 3

6-İnsert 4

pBSK plazmidi *Hind III* enzimi ile kesilmiş ve CIAP ile kendi kendine ligasyonu önlenerek vektör şeklinde hazırlanmıştır. İnsertler jelden kesilerek ekstrakte edildikten sonra her bir insert bir boş pBSK vektörü içerisine klonlanmıştır. Jelden ekstrakte edilen insertlere ait görüntü şekil 4.3'te verilmiştir. Jelden ekstraksiyon işlemi yapılan insertlerin her biri bir boş pBSK vektörü içerisine klonlandıktan sonra DH5 α suşu içerisine transforme edilmiştir. LB besiyerine ekim yapıldıktan sonra mavi beyaz koloni seçme yöntemi ile içerisine klonlama olan plazmidleri taşıyan koloniler seçilmiş ve bu kolonilerden alkalen lizis yöntemi ile plazmid ekstraksiyonu

yapılmıştır. Alkalen lizis yöntemi sonucunda elde edilen plazmidlere ait görüntü şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4: Alkalen lizis yöntemi sonucunda elde edilen plazmidlere ait görüntü

Üst sıra

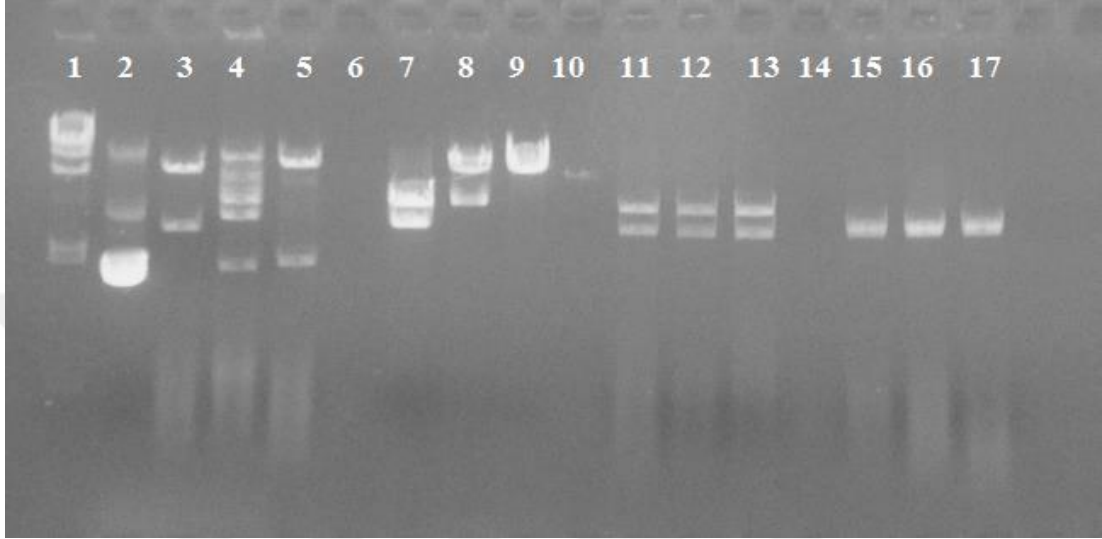
1. *Hind III* ile kesim yapılmış pBSK
- 2- 4. İnsert 1 klonlanmış plazmid
- 5-13. İnsert 2 klonlanmış plazmid
- 14-22.İnsert 3 klonlanmış plazmid
- 23-25. İnsert 4 klonlanmış plazmid
26. *Hind III* ile kesim yapılmış pBSK

Alt sıra

- 1.*Hind III* ile kesim yapılmış pBSK
- 2-7. İnsert 4 klonlanmış plazmidler
- 8.*Hind III* ile kesim yapılmış pBSK

Bu jele ait görüntüye bakılarak pBSK ile boyut karşılaştırmasında 2 tane uygun boyutta insert 1 klonlanmış plazmid, üçer tane de insert 2 ve insert 3 klonlanmış

plazmid seçilmiştir. Takiben bu klonlanmış plazmidlere *Hind III* restriksiyon enzimi ile kesim yapılmış, içerisinde uygun insert taşıyan plazmidler sekans analizine gönderilmiştir. Kesim sonuçlarının yürütüldüğü jele ait görüntü şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5:

1. Lambda DNA/*Hind III* marker

2. pBSK

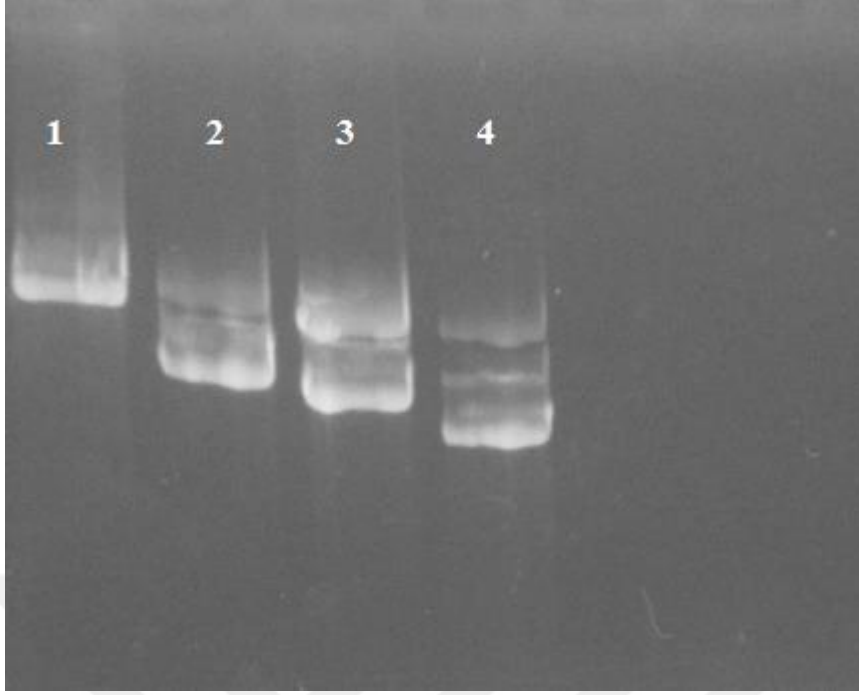
3-5. İnter 1 klonlanmış plazmidin sırasıyla *Hind III*, *Ecor I* ve *BamHI* ile kesimleri

7-9. Başka bir insert 1 taşıyan plazmidin sırasıyla *Hind III*, *Ecor I* ve *BamHI* ile kesimleri

11-13. İnter 2 klonlanan plazmidlerin *Hind III* ile kesimleri

15-17. İnter 3 klonlanan plazmidlerin *Hind III* ile kesimleri

Şekil 4.5'teki iki insert 1 klonlanmış plazmidten birincisi, insert 2 ve 3 klonlanmış plazmidlerden birincileri seçilmiştir. Ayrıca şekil 4.4'teki insert 4 klonlanmış plazmidlerden ilki seçilerek DH5 α suşuna transformasyon yapılmıştır. Ampisilinli besiyerlerine ekim yapıldıktan sonra üreyen kolonilerden alkalen lizis yöntemi ile büyük volümlerde plazmid ekstraksiyonu yapılmıştır. RNaz eklendikten sonra kit ile DNA temizlenmiş ve sekans analizi için RefGen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Laboratuvarı'na gönderilmiştir. Alkalen lizis yöntemi sonucunda gönderilen plazmidler şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6: Sekans analizi için gönderilen klonlanmış plazmidler

1-İnsert 1 klonlanmış pBSK

2-İnsert 2 klonlanmış pBSK

3-İnsert 3 klonlanmış pBSK

4-İnsert 4 klonlanmış pBSK

M13F ve M13R primerleriyle hem “forward” hem “reverse” sekanslama yapılmıştır. Her seferinde 1000 bp’lik sekanslama yapılmıştır. İnsert 4’ün boyutu 2000 bp civarında olduğu için sekans analizi ilk seferde tamamlanmıştır. Gelen sekans sonuçları NCBI BLAST programında eşleştirilmiş, benzerlik gösterdiği genomlar ve genlerin karşılık geldiği proteinler bulunmuştur. İnsert 4’ e ait sekans analizi sonucu şekil 4.7’de verilmiştir.

AAGCTTTAGCGTTATCTGCTTCTATTGCTAGAGGAGAACCTCAAGAGGCTTACAGTAAGAAATATGACCA
TTTAAACGATGAAGTGGAAAAAGAGGTTACTTACACAATCACACCAACTTTTGAAGAGCGTCAGAGATCT
ATTGACCACATACTAAAAGTACATGGTGCGTATATCGATAAAAAAGAAATTACTCAGAAGAATATTGAGA
TTAATATTGGTGAGTACGATGACGAAAGTTAAATTAACTTTAACAAACCATCTAATGTTTTCAACAGAA
ACATATTCGAAATACTAACCAATTACGATAACTTCACTGAAGTACATTACGGTGGAGGTTTCGAGCGGTAA
GTCTCACGGCGTTATACAAAAAGTTGTACTTAAAGCATTGCAAGACTGGAAATATCCTAGGCGTATACTA
TGGCTTAGAAAAGTCCAATCAACAATTAAAGATAGTTTATTTCGAAGATGTCAAAGATTGTTTGATAAACT
TCGGTATTTGGGACATGTGCCTTTTGAATAAGACTGATAACAAAGTTGAATTGCCAAACGGCGCAGTTTT
TTTGTTTAAAGGATTAGATAACCCAGAGAAAAATAAGTCGATAAAAGGCATATCAGACATAGTCATGGAA
GAAGCGTCTGAATTCACACTAAATGATTACACGCAATTAACGTTGCGTTTGAGGGAGCGTAAACACGTGA
ATAAGCAAATATTTTTGATGTTTAAACCCAGTATCTAACTGAATTGGGTTTTATAAGTATTTCTTTGAACA
TGGTGAACCAATGAAAAATGTCATGATTAGACAATCTAGTTATCGAGATAATAAGTTTCTTGATGAAATG
ACACGACAAAACTTAGAGTTGTTAGCAAATCGTAATCCAGCATATTACAAAATTTATGCGTTAGGTGAAT
TTGCTACACTAGACAAATTGGTTTTCCCTAAGTATGAAAAACGTTTAAATAAATAAGATGAGTTAAGACA
TTTACCTTCTTATTTTGGATTGGACTTTGGATACGTTAATGATCCTAGTGCTTTTATACATTCTAAAATA
GATGTAAAGAAAAAGAAGTTATACATCATTGAAGAGTATGTTAAACAAGGTATGCTGAATGATGAAATAG
CTAATGTCTATAAAGCAACTTGGTTATGCTAAAGAAGAAATTACAGCAGATAGTGCAGAACAAAAAAGTAT
AGCTGAATTAAGGAATCTAGGGCTGAAAAGGATTTTACCAACCAAAAAAGGGAAGGGCTCGGTTGTACAA
GGGTTACAATTCTTAATGCAATTTGAAATCATTGTTGATGAACGTTGTTTCAAGACTATTGAAGAGTTTG
ACAACTACACATGGCAAAAGGACAAAGATACAGGTGAATATACCAATGAACCAAGTAGATACATACAATCA
TTGTATCGATTGTTGCGTTATTTCAGTGGAACGATTCTACAGACCGGTTAGAAAACGCACAAATGTCAGT
TCGAAAGTTGACACAATAAAATCTCTAGGATTATAGGAGGGAACAAATGTTAAAAGTAAACGAATTTGAA
ACAGATACAGATCTACGGGGAAACATAAATTACTTATTTAATGATGAAGCCAATGTTGTTTACACATATG
ACGGGACGGAATCCGATTTATTAAAAAACGTTAATGAAGTAAGTAAATACATTGAACATCACATGGATTA
CCAACGACCTAGATTGAAAGTGTTAAGTGATTATTACGAAGGTAAACTAAGAACTTAGTTGAGTTAACA
CGACGCAAGAAGAGTACATGGCAGATAACCGTGTAGCGCATGATTACGCATCTTATATTAGCGATTTTA
TCAACGGCTATTTCTTGGGTAATCCAATTCAATATCAAGATGATGACAAAGATGTATTAGAAGCTATTGA
GGCGTTCAATGATTTAAATGATGTTGAGTCACACAATAGATCTTTAGGATTAGATTTGTCAATTTATGGC
AAAGC

Şekil 4.7: İnsert 4'e ait sekans analizi sonucu

İnsert 4 toplam büyüklüğü 1.966 bp olarak belirlenmiştir. NCBI BLAST programına yerleştirilip karşılık geldiği proteinlere bakıldığında elde edilen sonuçlar şu şekilde bulunmuştur:

- Terminal small subunit
- Phage terminase large subunit
- Phage subunit portal protein

İnsert 2 4.000 bp ve insert 3 3.000 bp olduğu için bu iki insertün sekansları iki seferde tamamlanmıştır. İlk sekans M13F ve M13R primerleriyle yapılmış, gelen sekans sonuçları NCBI BLAST programında eşleştirildikten sonra iç kısımlarından birer primer belirlenerek ikinci kez sekansa gönderilmiştir. İnsert 1 ise 6.500 bp civarında bir büyüklüğe sahip olduğu için üç kez sekans analizine gönderilmiştir. İnsert 3, 2 ve 1'e ait dizi analizi sonuçları insert 3, insert 2 ve devamında insert 1 sıralamasıyla şekil 4.8'te verilmiştir.

Sonrasında dizi sekanslarının NCBI BLAST programı ile karşılık geldiği proteinlere bakılmış ve sonuçlar dizi analizinin devamında verilmiştir.

İnsert 3, 2 ve 1 NCBI BLAST programında yerleştirildikten sonra insert 3 ile 2 arasında 2200 bp ve insert 2 ile 1 arasında 1500 bp'lik diziler bulunduğu ve bu dizilerde aynı genlerin devamlılık gösterdiği görülmüştür. Bunun üzerine İnsert 3 ile 2 arasından iki adet ve insert 2 ile 1 arasından bir adet primer (Primerler tablosu gereç ve yöntemlerde tablo halinde verilmiştir) seçilmiş ve PCR yapılmıştır. PCR sonucuna göre aralarda kalan bölümlerin de faja dahil olduğu görülmüştür. Aşağıdaki şekilde insert 3, 2 ve 1'in aralarda kalan bölümlerle birlikte sonuçları toplu olarak verilmiştir.

CTTTAAATGCAGCCAAAAGAGCGCTAGGTATTCACTCACCTTCACGTGAATTCATGGATGTTGGTATGTA
 TTCAATGTTAGGTTTCGTTAAAGGTATAGATAATCATTCAAGTAAAGTTATCCGTAATGTTTCTAATGTT
 GCAGATAAAGTAGTTGATGCATTTCAACCTACATTAAACGCACCTGACATTTCTAGTATTACAGGAACT
 TAAGTAATTTAGGTGGAAATATAAATGCGCAAGTACAACACACACATTCTATTGAAACATCACCGAACAT
 GAAACTGTTAAAGTTGAATTCGATGTCAATAACGATGCGCTTACTAGTATTGTTAACGGCAGAAATGCT
 AAACGCAATTCTGAGTATTACTTATAAAGGAGGTTACAAATGGACATAGAATTAACAAAAAAGATGGTA
 CTGTAATCAAATTAAGTGAATACGGGTTTATCGTTAACGATATAGTAATTGATAGCATGCAAAATCAACAC
 AAAGTATCAAGACAAAAGAAATATGAACGGTCGTATATTAATGGGGAGCAATTATATCAGTAGAGATATA
 GTTGTTCCTTGTGTTTTGTAAAGTTAAAAATCGTTCAGACATTGCTTATATGCGAGATATGTTGTATTGCT
 TAACGACAGACATAGAACCTATGTATTTGCGAGAAATCAGAAGAAAAGAGAGTTGAATTACAGGTTTAC
 TCAACCACTTCTGATGATTACGTGAAATTAGATAAAAAACAACCTCCCGGATTATGAATATTCAAGACAC
 GATCAACAAATTTATGTAATGGTAAACAGTATAAAGTTATTTTTAACGGAGTTATAAACCTTAACAAA
 AAGGTAATAAAGTTTCTTTTGAACATAAATTCGAAACTACAGAATTACCATACGGTGAAAGTATTGGAAC
 AAGCCTAGAGTTAGAAGAAAACAAAAAGGTTGGATTGTGGTCGTTTGATTTTAATATTGATTGGCATGCA
 GCGGAGACAAAAGAAAGTATACATTTGAAAATTTGAGCAAAAGGTACAGTTTACTATCACGGTAGTGCTC
 CTAACGACCAATTCAACATGTATAAAAAGATAACAATTATTTTAGGCGAAGATACAGAATCGTTGTATG
 GAATTTAACGCATGCTGAAATAATGAAAATCGAAGGGATCAAACTAAAAGCTGGAGACAGAATTGTTTAT
 GATAGCTTCCGAGTTTATAAAAACGGTGTGAAAATAAGCACTGAAACGAACATAGCCCAACCAAAATTTA
 AATACGGAGCTAATAAATTTGAGTTTAAATCAACAGTTCAAAAAGTTGAGTTTGATTTGAAATTTTATTA
 TAAGTAGGTGTGAGAATGACAATAATTGTAAGACCACCTAAAGGTAATGGCGCACCTGTACCAGTAGAAA
 CAACCTTTAGTAAAAAAGTTAACGCTGACGGTGTATTAACCTTTTGATATTCTAGAAAACAAATATACTTA
 TGAAGTTATTAACGCTATAGGGAAAAGATGGATTGTTAGTCATGTCGAAGGTGAAAACGACAAGAAAGAA
 TATGTAATAACTGTCATTGATAGGAAATCAGAAGGCGACAGACAACCTGGTTGAATGTACTGCTAGAGAGA
 TTCCTATAGACAAGTTAATGATTGATAGGATTTATGTTAATGTAACAGGATCTTTTACAGTAGAAAGATA
 TTTTAACATTGTGTTTCAAGGTACTGGAATGCTTTTGAAGTCGAAGGTAAGGTTAAGTCTTCGAAGTTT
 GAAAATGGTGGTGAAGGCGATACAAGGTTAGAAATGTTTAAAAAGGGATTAGAACATTTGCGTTTGAAT
 AAAAAATAACGTATGACAAAAAGAAAGACAGATATAAGTTTGTATTGACGCCTTTTGCAAATCAAAAAGC
 GTCTTATTTTATTTCTGACGAAGTCAACGCCAACGCTATAAACTCGAGGAAGATGCAAGTGATTTCGCC
 ACCTTCATTAGAGGATATGGTAATTATTGAGGAGAAGAAACATTGCAACACGCTGGGCTCGTAATGGAAG
 CTAGAAGTGCATTAGCTGAAATATACGGCGACATCCACGCAGAACCATTTAAAGATGGTAAAGTGACTGA
 CCAAGAACTATGGATAAAGAATTACAATCGAGATTGAAAAAGTCGTTAAACAATCTTTGTCTTTGGAC
 TTTTGGTGTAAAGAGAATCATATCCAGAAGCAGACCCACAACCCGGAGACATAGTACAAATAAAATCTA
 CCAACTAGGTTTGAATGATTTAGTCCGTATAGTACAAGTTAAACGATTAGGGGTATAAACCAATGTAAT
 TGTTAAGCAAGATGTAACGCTTGGTGAGTTTAAATCGAGAACAACGATATATGAAAAAGTTAATACTGCA
 GCTAACTATGTTTCTGGATTAAATGATGTTAACCTTTCTAATCCTAGTAAAGCGGCAGAAAACCTTGAAGT
 CTAAGTAGCGTCAATAGCTAAATCAACACTCGATTTGATGAGTAGAACTGATTTGATTGAAGATAAACA
 ACAGAAAGTGAGTTCTAAGACTGTAACACTACATCAGATGGCACTATCGTTCACGATTTTATAGATAAATCA
 AACATTAAAGATGTAACAAACGATTGGAACGATTGGCGATTCTGTAGCTAGAGGATCACATGCGAAAATA
 ATTTACAGAAATGTTAGGCAAGAAGTTAAAGCTAAACGACCAACCTTGCAAGAGGTGGCGCAACAAT
 GGCAACAGTTCCAATAGGTAAAGAAGCGGTAGAAAAACAGCATTATAGACAAGCAGAGCAAATAAGAGGA
 GACCTAATCATATTACAAGGTACAGATGATGACTGGTTACATGGTTATTGGGCAGGCGTACCGATAGGCA
 CTGATAAAACCGACACTAAAACGTTTTACGGCGCCTTTTGTCTGCAATTGAAGTTATCAGGAAAAATAA
 TCCAGCTTCAAAAAATACTTGTAATGACAGCTACTAGGCAATGCCCTATGAGTGGTACAACGATACGCCGT
 AAAGATACGGACAAAAACAACTAGGGTTAACTTTAGAGGATTATGTCAATGCTCAGATATTGGCTTGTA
 GTGAATTGGATGTACCAGTATATGATGCCATCATACAGATTATTTTAAACCATATAATCCAGCGTTGAG
 AAAATCAAGTATGCCAGACGGATTGCATCCGAACGAGAGGGGTGATGAAGTTATTATGTACGAACTTATT
 AAAAATTATTACAGTTTACGGATAGAAAAGGAGGAAGACATGGATAACAAATTAATTACAGACTTAAG
 TAGAGTTTTGATTACAGATATGTAGATGAAAATGAGTATAATTTCAAGCTTATTTACAGCATGCTGACT
 GATTTTAAATTTCTCTTGAATATCATAGAAATAAAGAGGTATTTGCACATAATGGAGAGCAAATAAAGT
 ATGAACATTTAAATGTTACAAGTAGCGTCTCTGACTTTTTAACATATTTAAACGGTCGATTAGCAACAT
 GGTACTAGGTACATAACGGCGACGGTATCAACGAAGTAAAGACGCGCGTGTGATAATACTGGTTATGAT
 CATAAGACATTGCAAGATCGTTTGTATCATGATTATTCAACACTAGATGCTTTCACTAAAAAGGTTGAGA

AAGCTGTAGATGAACACTATAAAGAATATCGAGCGACAGAATACOGATTGGAACCAAAGAGCAAGAAC
GGAATTCATCAAGATTTATCGCCATATACTAACGCGAGTAATGCAATCATTTTGGGTAGACCTAGAACG
AAAATTATTATATGACGCAAGCTCGTCAGGTAATCATTACATGTTATCTAGATTGAAGCCAAACGGAC
AATTTATTGATAGATTGCTTGTAAAAACGGCGGTCAOGGTACACACAATGCGTATAGATACATTGATGG
AGAATTATGGATTTATTCAGCTGTATTGGAAGTAACAAAAACAACAGTTTGTACGTTTCCAATATAGA
ACTGGAGAAATAACTTATGGTAAATGAAATGCAAGATGTATGCGGAATATATTTAACGACAGATATACGT
CAGCGATTTATAATCCGGTAGAAAAATTAATGATTTTAGACGTGAATATAAACCCACTGAAAGACAACT
TAAGAAATTCGTGTAACTTTGTGAGGTTAGAAGTGCTGACGATATTGATAAAGGTATAGACAAAGTATG
TATCAAATGGATATACCTATGGAATACACTTCAGATACACAACTATGCAAGGTATCACTTATGATGCAG
GTATCTTATATGGTATACAGGTGATTCGAATACAGCCAAACCTAAC TACTTACAAGGTTTGGATATAAA
AACAAAAGAATTGTTATTTAAACGACGTATCGATATTGGCGGTGTGAATAATAACTTTAAAGGAGACTTC
CAAGAAGCTGAGGGTCTAGATATGATTACGATCTAGAAAACAGGACGCAAGCGCTTTAATAGGGGTAA
CTATTGGACCTGGTAAACACAGACATCACTCAATTTATTCATCGCCCAAAGAGGTGTAAACCAATCTTT
AAAAACATGACCTCAAGTATCGATGACTGATTGAGCGGACGTGTTAAACCGTTACCAATACAGAAC
CCAGCATATCTAAGTGATATTACGGAAGTTGGTCATTACTATATCTATAOGCAAGACACACAAAATGCAT
TAGATTTCCCGTTAOCGAAAGCGTTTAGAGATGCAGGTGGTCTTTTGTGTACTGCGTGGACACTATAA
TGGTGCTCTAAGACAAGTACTTACCAGAAATAGCACAGGTAGAAATA TGCTTAAATTCGAACGTGT CATT
GACATTTTCAATAAGAAAAACAACGAGGCA TGGAATTTCTGTCCGCAAAACGCCGTTATTGGGAACATA
TCCCTAAGAGTATTACAAAATATCAGATTAAAAATCGTTGGTTAGATTCTATATCACTACTGAAGA
ATCAAAACGATTTACTGATTTTCTTAAAGACTTTAAAGGTATGCGAGGTGGATATTAGAAGTAAATCG
AATACACCAGGTAAACACAACAAGTATTAGACGTAAATAACTTCCGCTCTGCATCAATTTTAGTTA
GAACTTTGGTACTGGTGGCGTTGGTAAATGGAGTTATTGCAAGGAAAGGTGGTTGAATAATGGTAGTA
GATAATTTTTCGAAAGATGATAACTTAATCGAGTTACAAAACAACATCACAAATATAATCCGTTATTGACA
CAAACATCAGTTTCTATGAATCAGATAGAGGAAGTGGTGTTTAAATTTGCGAGTAACGAATAACAG
ACCGTTATCTATAAGTTCTGAACATGTTAAACATCTATCGTGTAAAAACOGATGATTATAACGTAGAT
AGAGGCGCTTATATTTAGACGAATTAACGATAGTAGACGAATTAATGGGCGTTTGCAGTATGTGATAC
CGAATGAATTTTAAACATTGAGCAAGGTGCATGCTCAGGCATTCTTTACACAAAACGGGAGTAATAA
TGTTGTTGTGTAACGTCAATTTAGCTTCAATATTGAAATGATTTAGTTAGTGGGTGTTGATGGTATAACA
AAGCTTGTTTATATCAATCTATTCAGATACTATCGAAGCTGTGGTAAAGACTTTAAACCAATTAAAGC
AAAATATGGCTGATACACAAACGTTAATAGCAAAAGTGAATGATAGTGCACAAAAGGCATTCAACAAAT
CGAAATCAAGGAAAACGAAGCTATACAAGCTATTACTGCGACGCAAACTAGTGCAACAAGCTGTACA
GCTGAATTCGATAAAATAGTTGATAAAGAGCAAGCGATTTTGAACGTGTTAACGAAGTTGAACAAACAA
TCAATGGGCGTACCTTGTTAAAGGTAAATCAACAACAAATGGCAAAAGTCTAAACTTACTGATGATT
CGGTAAAGCAATTGAATCGTCTGAGCAGTCATAGATAGCGTTTAAAGCGCAATTAACACATCTAGGATT
ATTCATATCACTAGCGCAACAGATGCGCAACATTTAAAGATATAGGCACTTTAGAGACGCTTAAAGAG
ATGGCGTTGATGATGGTTCTGAAGTTTCAGCAACTACGAATCTTTAGGGAAATCAGGCTTGTAGTTGT
TTATGTTGTGATGACAGTACAGCTCGTGTACATGGTATCCAGACGATTCAAAATGATGAGTACACAAA
TATAAAATCGGTGGCAATGGTATCAGTCTATAAAAAAGTTGACGAAGAAATTAACGAAGAAATTTGTG
AAGAAACGGCTAACAAACGCTTAAATCAAGCTAAGCAGTATGTAGATGATAAATTCGGAACAAACGAGCTG
GCAACAACATAAGATGACAGAGGCGAATGGTCAATCAATTCAAGTTAACTTAAATAATGCGCAAGGCGAT
TTGGGATATTTAACTGCTGGTAAATTAATGCAACAAGAGTGCCGATTAAACAGGTAGCGTTGAAAGTT
ATGAGGGTTATTTATCGGTATCGTTAAAGATGATACAAAACAAGCTATTTAACTTCACACCTTATAACTC
TAAAAAGATTTACACAGATCAATCACAAAACGGCAGACTTGAGCAACAGTGAGCAGTTCTAATGAACAT
AAATCAACGGTATTGTTGACGGTGGCGCAATGGTGTAGGTACAACAATCAATCTAACTGAACCGTACA
CAAATATTCTATTGTTGGTAAAGTGGAACTTATCCAGGTGGCGTTATTGAGGGATTGCGACTAACCGC
ATTACCTAACGCGATTCAATTGAGTAAAGCGAATGTAGTTGACTCAGACGGCAACGGTGGCGGTATTAT
GAGTGCTTACTATCCAAAACAAGTAGCACTACTTTAAGAAATAGATAACGATGTGTACTTTGATTTAGGTA
AAACATCAGGTCTGGAGCGAATGCCAACAAAGTTACTATAACTAAAATATGGGGTGGAAATTAATGAAA
ATCACAGTAAACGATAAAAACGAAGTTATCGGATTGTTAATACTGGCGGTTTACGCAATAGTTAGATG
TAGATGATAAATGTGCTATTAAATTTAAAGAAAGATTGAAACCTAGAAAGTTGTTTCTACTAACGG
CGAAATTAATACAATAGCAATTTGAAAAAGAAGACGTACCGAATGCATCAAAACAAAGTGCGTCA
GATTTAAGTGATGAGGAACCTCGCGGAATGGTTGCGAGTATGCAATGCAGGTGGCACAAGTAACGTAT

GTTTGGGGTTACTATAAAAACGAGCAAAATTAAGTGGTACGTAGACAAGGGTTTAATCGATAAAGAAGAAT
 ACGCTTTAATCACTGGAGAAAAATATCCAGAAACAAAAGATGAAAAGTCACAGGTGTAATGCTTGTGGCT
 TTTTAATTTGAATAAAGTGGGTGGCATAATGTTTGGATTACCAAACGACATGAACAAGATTGGCGTTTA
 ACGCGATTAGAAGAAAATGATAAGACTATGTTTGAAAAATTCGACAGAATAGAAGATAGTCTTAGAGCGC
 AAGAAAAGATTATGACAAATAGATAGAAATTTGAAGAATTAAGCGCGACAAGGTAGAAGATGAAAA
 GAATAAAGAAAAGAATGCCAAGAATATTAGAGACATAAAAAATGTGGATTCTAGGTTTGATAGGGACTATC
 TTCAGTACGATTGTCATAGCTTTACTAAGAAGTGTTTTGGTATTTAAAGGAGGTGATTACCATGCTTAA
 AGGGATTTTAGGATATAGCTTTTGGTCGTGTTTCTGGTTTGGTAAATGTAATAACAGTTAAGAGTCAGT
 GCTTCGGCACTGGCTTTTATTTTGATTGAAATGAGGTGCATACATGGGATTACCTAATCCGAAAAATAG
 AAAGCCCAAGCTAGTGAAGTGGTTGAATGGGCGTTATATATCGCTAAAAACAAAAAGCTATTGATGTA
 CCTGGTTCTGGAATGGAGCACAATGCTGGGATTTACCTAATATTTACTCGATAAATATTGGGGATTTA
 GAACATGGGGAAATGCTGATGCTATGGCTCAGAAATCTAATTTATAGAGGTAGAGATTCAAGATAATTAG
 AAATACAAAAGACTTTGTACCACAAACAGGCGACTGGGGTGTGGACTGGTGGTTGGGCAGGTTCATGTG
 AACATTGTAGTAGGGCCATGCACAAAAGACTATTGGTATGGTGTGGATCAAACTGGTATACAAATAATG
 CAACAGGAAGTCCGCCGTATAAAAAACAAACACTCTTATCATGATGGACAGGTGGAGGAGTTAAATATTT
 TGTTAGACCACCATATCATCCGGAGAAAATCTACGCCGGCACTAAACAGAAGATGATAGTGATAAAC
 GAAAAAATATAAAAAAGTTCCAAATTTGAAAGATGTAACTATTAAGTACACTATTTCTAGCCAAAG
 AGGTAAATTATCCAGAATATATTTATCACTTTATAGTGAAGGTAAATCGACGACTCGAAAAACCTAAAGG
 AATAATGATTAGAAACGCACAAAAGATGAGCTCGGTAGAAAGTTTATATAACAGTAGGAAGAAATACAAA
 CAGGATGTAGAATAATCCCACTTTTATGTTGACAGACATAATATTTGGGCACTAGAAAGAGCTGTATTG
 AAGTTCCTAATGAACCTGATTATATAGTTATAGACGTATGTGAAGATTATAGTGGAGTAAAAATGAATT
 TATTTTAAATGAGATTCAAGCAATGGTTGTAGCTGTAGATATGATGGCCAAATATGAGATACTCTAAGT
 ATTGAAAAATTTAAAAGTAGACGACAGCAATTGGCGTTGATGTTGGAACATGTTAATTGGAATATGATTG
 ACAACGGTGTTCCTTAAAGATAAATAAGAAAGCAATTAGAAAAGGCACTTAAATATATTAAAAACAG
 AGAAAAATTTATTAATTCCTAATAACCAACAGTAACAAAATCTAGAATAAAAGTTATGGTAGATAAT
 AAAAAACGCTGATATAGCGAATGTAAAGACTCATCACCAACAGCTAATAATGGCTCGGCATCTAAACAAC
 CGCAGATCATACAGAAACGAGTCTTATACATTCAAACAAGCACTGGATAAACAATGGCAAGAGGTAA
 CCCGAAAAAATCTAATGCTTGGGGTGGGCTAACGCTACACGAGCACAAACGAGTTGAGCAATGAATGTT
 AAACGAATATGGGAAAGCAACACGCAAGTCTACCAATGCTTAATTTAGGCAAGTATCAAGGCGTTTCAG
 TTAGTTGCTTAATAAGATACCTTAAAGGTAAGGGACATTGAATAATCAAGGTAAAGCGTTGCGAGAAGC
 TTGTAAAAAGCACAACTAATGAAATTTATTTAATCGCGCATGCTTTCTTAGAAAGTGGATATGGAACA
 AGTAACCTTCGCTAAACGAAAGATGGAGTATACAACTACTTCGGTATGGCGCTTACGACAACAATCCTA
 ACTACGCAATGACGTTTGCTAGGAAATAAGGTGGACATCTCAGCAAAAGCAATCATGGGCGGTGCTAG
 CTTGTAAGAAAGGATTACATCAACAAAGGGCAGAATACACTGTACAGAATCAGATGGAATCCTAAGAAT
 CCAGCTACGCAACATACGCTACTGCTATAGAGTGGTCCCAACATCAAGCTAGTACAAATCGCTAAGCTAT
 ATAAACAAATCGGCTTAAAGGTATCTATTATAAGAGATAAAATATAAATAAGAGGTGTATAAATGTA
 CAAAAATAAAGATGTTGAAACGAGAATAAAAAATGATGGTGTGACTTAGGTGACATTGGCTGTGATTT
 TACACTGAAGATGAAATACAGCATCTATAAGAATAGGTATCAATGACAAACAAAGTCTGATCTAA
 AAGCGCATGGCTTAACACCTAGATTGCATTGTTTATGGAAGATGGCTCTATATCAAAAAATGAGCCCT
 TATTATCGACGATGTTGTAAAGGGTTCTTACCTACAAGATACCTAAAAAGGTATCAAAACGCTGGT
 TATGTAGCTGTAAAGCTGTTTATAGAGAAAGAAACAAAAATACATGTCGCGAACTTTCTTTCAATA
 TCATTGATAGTGGTATTGAATCTGCTGTAGCAAAAGAAATCGATGTTAATGGTAGATGATGCTATTAC
 GAGAATCTTAAAGATAACGCGACAGATTATTGAGCAAGACTTTAAAGAGAAAAATAGATAAAGATGTC
 ATTTCTTACATCGAAAAGAAATGAAAGTAGATTAAAGGTGCGAAAGGTGATAAAGGCGAACCGGCAAC
 CTGGTGCAAAAGGTGAAGCAGGTAAAAAGGAGAACAAAGCGTACCCGGTAAAAACGGTACTGTAGTATC
 AATCAATCTGACACTAAATGTGGCAAATGTATGGTAAAGATACAAATATCAAAGCAGAACCTGAGTTA
 TTGGACAAAATCAATATCGCAAAATGTTGAAGGGTTAGAGATAAATTGCAAGAGTTGAAAAAACAAAG
 AGGCAACTCTCAAGACTCTAAACGTAACAGATTCAAAAAATGCTGAACTAGTTGATAGCGCGCTGA
 ATCTATGAATACACTAAGAGAAATAGCAGAAGCAATCAAAAACACTCTATTCAGAAAGTGTATTGCAA
 CAGATTGGCTCAAAAGTTAGTACAGAAGATTTGAGAGGTTCAAACAAACATTAACAGTTTGTATGCAG

ATAAAAATCATAGTCATACAACTCAAACAGATTGAAGGATTAGAAAATGCTTTATCAAGAAAATCAGACAT
 AAAATCATAATCATGACGAGAGGTATGTTTGTGCTCTGCTCGAAAAATGATTTGTTGTGCGCTATTA
 TATAGTTGATTTCGCGTAGAGTTGGCTGCCAATTTTAAACCTGTCCTGTCTTTTACTTATATTGATA
 TATATAGTTTCTGGGCTTATGCAATAAAATTAATTTCCACTACTGTACCTTCGATTAAATTTTCCA
 CATTCTTTTAAACATATGTTTCCCAACTTATGAGATTCATAAACGTCATTATGTTTTCAAACAGAT
 TTGGCGGCGAGAAAACATTAAATTTGGGAATGGATTTTATTATAGGCTATCGTATCTTCTAAGTTGTG
 TTTTACCTGTTATTACCTCAACTTGGATTGTTTAAATAGTCCACTGTTATCTTTTACATGCATCGCCA
 TATTACTCCCAAAGCGTTTGATTAAATCCAAGTTCCTAAATCCTTATAGTCCCTCAGTTATCGCTCAAC
 GTTCATTTTATAGTTGAAATCATTAGGAAGTCCCTACCAACATACAGTGATATTCACTACAAATAAGTCC
 TAGAGGTTGTAAGTGGTAAGTATTAAAATTTGCTGATTAAAAATCAGCAAAAAATAAAACCTATTTTC
 CTCGTTTGTTTACCTATAATTGACCTTTAACTCTAAGTTTGTGTTTCGTGATGATTGACCAATCAACCT
 CGTAACAACGATAAATAGTTCGTTCAGTGCCTAAATAAGCCTAATCTAAATAGATGAGTTAATTTAGTTC
 GATCGCGTTAATATCCGCGATAGGAGTGCAATGAATGTCCATAACCGCAATAATGACTGGGTTGCAGTTT
 TCCGCGAGGTCATAGTAGATATCGTGTCTGTATAGTTCCGCGATCTCTATCATCGTTCTTCTGTGTGTC
 CAATGAACCTTTTGTAGAGTTCTGTCAATAAATTCGGGCTTAATTCATGTTTTCGTGGCTTTCTATAC
 TATGTAGTGTGCGCAATGTCTGCGGAGATTGCTACAAACCAAACTGCACTTACTCATAGTAGTACCTCC
 ACCGCTGCTACGTTGTTTAAATGATTTTTCTCAAATATCTTACCAACTTTGAAGACTCCCTTTGT
 TAAATTACGTCTAAATACCATACCTAAAGTCACAAAGCTGATACGGTTAGCAACGACCTTTCAAACAAG
 CCTAATGAGGATTTTCAAATCCGCGTTTCTATAAGGTAAGCGATTGTGAAGCTGCCTAATCGATGAC
 ATATGGTTTATGTGGCTGAAGAAATCGTGTGGACCGCTGTACCAACATAAGCCATCGTTGATGCCACG
 ACCTATAACAGTGCAACGTACCCATTAATCTCGTTGAAATCTAATGTAGTAACATATACTCGTCTTAACC
 GATCCGCCACCGACCTGACTGCCTTAGCTTGTGGGCGGACCCCAACCTTTTCAATGTTCTGCTGTG
 TACGAATACTAAAGGGATACACCAAAATAGGCAGGCTTAAATTTTCACTCTGTCGCGGTGCTAGTCAAGT
 TAGAGGATGTGTTCTGTTGATTTTTCTTGTGCGATTGGTGTGGATTTCGTCACTTTGAATTTAGTAG
 TTTCTACACCAATTTCAAATCTGGATGGATTGCGACCATCATTTGGGATTTCCATATCAATATGTGTTGC
 TCGCTCCTTGTGTTTCCCGCTGACGACTTCGTATAGCAATTGCCTAATCATTACGTGGAAATAGTTCTAA
 TCTTCGCGCGTAACCGGTATCAATGCATAGTCCGTGTGTCAAACCGTTGGAAATCTACTTAGTGTTCAT
 CCAACCGTATGGCGATTAGTTTATCCATTAATTAATAATGCCATAACTTCATACAGTTAGTTACCGGC
 GTCTATTGCGCTGTAAAGATTTTTACTGTTCGTGAAAGGTTCTTACGCGATCTAACAACTTTTAC
 CCCTAATGGTGTGTTGTCTTTATGTAGTCTAACGTGTTACTTAAATGAAGTTGTAGTACGGGAGTATCT
 TCAAGCCAAAATGTGTGACCAAACTGGGTCAATTGAGCGCCAGATAACGCTCTTTGTGCGCAACGTTG
 AATTTCTGATGAAATAGTTGCTCTAATCCCGCATGTACCTACCATTTTATGGCCAAACGGTGACAGAGATT
 ACTCAGTTCCGGAAGTTCATTATGTCAATTTGGTCAACGTTACGTAACCTTGCATTAATTTATACCATGA
 ATGATGTACCTTCTTTCAGATCTAAGTGTTCGCGTGTAGTTGGTTAGTGTCACTCTTTTACCCCGGTA
 AGAATAGAACAGGTCAACCAATAGTCAAGGTTGGAACACCTATAACACTAATATGTCTCACTACAATGT
 TCTACCAGTACAAACCACTCTATATGTACCTCCCGGTTGCAATAATGAACGGATAATCTGTACCTTA
 CCAAGACGGGGTGGATTAGTCTATAATCCACTGAATACCCCTCTTATGTCAATCTTACTGTATCAGTACA
 GATAAATTCGTCCACGCAATGTATGGACGAAAGATAAATGTAAATTTCTATTTACACGATAATAAAATG
 ATCTTGAAAAATTTGTAAGAGAGATTCTAAATTTACATCTATTGTCCGTCCATGATGCCATGAACGGATAA
 AAAAAATACAATATCGATCGGAAGCCGATCAAAAAACAATACTACCAATGTGTACGTAGTTGATAAATG
 TAGATAGGAACAAGTGGGTTCTGACAGTGACCCACAAAAAGAAATGCTATCTCTCGTATCAAAAGTATGA
 TGAGGGGCGATCATATATACTGAAATCGTAAGGGCATATTGTCAAATGCCCAAGAAAAATACAATAAGAA
 TGAAAAATATATCATCTCACTTAACATATCGGGCGCTCTCGGTATATAGACTGACAAACGGGCGTCTCT
 CTGAAGAAAGGAACGGTAGTGAGTATATGTATATAGAACTGTTGTATCTCAGCAATGTGAGATGTGGTG
 GGTATGATCAATGAACCAACCAAAAAACAAGCGGTAATACAAGACAGATGATTGAGTCTAATAAAAA
 TATATAATAAATATATCTGCAACTACATCTCTCTTTTATACTCTATTTATTCTGTATAATTTGTTC
 TGTTAATCACTTAAGATTTCCTGCTATTTCTAAATGAATATAGACTTATATGTGTTAATAACTATTGC
 TACTTTATTTCTTAACGTTTACTTTCTTTATCTTTACATTAACCTATACGTGAACTATTCTAAACCT
 GTTTAACCAATTGAAGTAAATCTTATGTCTTATCTGTTTCAATATTTATATCGCGAAATAAATTTAA
 TATTTATTTCTACAGCCTCTTAATAATTCAAAAACTTCTTTTCCGCTTAAATTTTAAATGCTTTTAC
 TGATAAAACCGGTAATATATCACTTTTCTATGAAATAAACTTAAAAAAATCTCTCCATGTTGAA
 TCACCCATTACTTCGATAGTGATTCTTTCTTATGTTTCAAGTTAATATCAAAACGTGCTTCACTATT

CTTAATATAAACTCTATAGACATCTATOGTAGGTCTTAATAATATCTTTCTATCATGTTTAATAATAA
 ACAGGTATTAACTATCTTAACAATTAACCTATAGTGTTCGAGAATTAATGAACAGTTGGTCAATTA
 CTTGAAATGATAACTATTCTCTCTTTTAGTTCTTAGACTAAAAATCAATCACGTGTTAATTACTTA
 TGTATTATACCAGCTTCCGATGCAACCTAAGCCGATCGAGATGATGATAGTATAACGGATAAAAATCCAC
 TTGATTTTCTTAATATATCGTTGTATTATTTAAACAAATTTTGAGACTCTTCCCGAACTTTTAAAT
 GCTGAAGTAATATCTCAATCTCTTCTCAGACTGACCGAACCCAAAGGAACCTAATATTTTGTCTTTT
 TATAGTTAGTTCAAAAATAAACTTTCAATATGGCCATTTCTAATATGAAACAATTTGATGATAATAGTGC
 TTTTCTTTTCCCTCCATACCTAATACAATGTCTTTTAATAACAGCCTATGTAGTCCAGTTATAACG
 TTTTGTGTTAGACTTCTTTGGAGAGAGAGCCCTTAACTTGTTTCAAACCTAATTTTAAATTTTGGCCC
 TTTATCTTAAATAGGTCTCATATGTTGCTCTTCTAAATTATATTCAATTTCTCTATCAAAATTAATAC
 TTGCGCAAGTAGCTATTTCTATAATAATAGATTCCAAAGTTTAAGTCTAGCTACTACTAAATTTCCGAC
 TCTACATATGAAATTTTGTAAATGGCGTAAAAATAATACTACTGCTTTTACTATAACTGTAACTTGATCT
 ACTTTCTTTAATATATGGACATATGCTCCAACATTCTACTGTTACTTTTAACTTTAAAAATTTCTTC
 ATAATTTCTGTGTCTATTTAGTTGTTATCTTCTGTCTAATAATAAAGTCTTCTCCTAATATTTCCAA
 ACTAAACATATATTCTTTAATCTTTTCTACTAAAAATTTTGCATTTCTTTTCCCTTATAAAACTT
 CTTAAATAATAAAGTAAAAATGTACAAGATTGTATAAATTTACATGATTTTATATGTCATGTTATGTT
 TGCTTTATCTATAATCTCGACTCAAGTCAGGAGGTGATTTCTATAACGATTTATAATACTATATTCT
 ATGATCGGGCTAAATAAACTTACATTTCTGATATCTGTTCGTTTAAATGCAATGAATCAACCATTC
 AAAAAAGAGAAAAATAGTTGTGTCTATTTTAGAACCCTCACTACCATAGAGGAGTTCCATATGACCTT
 GCGGATTTCTTACCTGTCTGCCTATACCAAATACATTTTAAATCTGAATTTATATATATTTATATTAT
 AGATATTCAATACTCTAAATAAATTTGAATTTCTCTTTTATACAAAGTTTAAATTTACTTTTAAAT
 GAAAAATCGCCTTCTAAACTATATTGAGTTGTATATTGAGTTGTGGGAAATCTTCTACTTAAATTTT
 TATACTTTTAAATAAATTTTGGTTGTTTGGTGTGGTGATAATTAATCTCACACCAATAAAATAT
 ATACTTCGATTTTATTGATGTTTACTATGGTAAAACTATGGTAAAACAACATTGTCTTTTATTCC
 TTTTATTTTTCGGTTTGTGGTAATTTAGTTGCAAATAACAGAGTACTTTAAATTTACGTATATTTAA
 AGTGAAGGTACCTAGTAACATTTAGGATTTGCTCAACGAAAGTAAACTGCGATAAGTAGCAGAATTTGAA
 GGAAGAAAGATAAAACCAAGTATAGCCATATATGGTGAAGCATAATAGTGAGCATTGTTTAATAGAGAAT
 TAAATCAATTAACTTTCCCTAAAAATTTTCACTTTTATTAACTTACAGTATTATATCGATTCTAA
 TATAGCGAAATTGCCTTAAAGACAATCTATTATTACTTTTCTTTTGTATTATTTCTCTCAATTGAAAA
 ATACTTACTTGTGCTTTGTTAGCTTGTCTATTTCGTGCAAAATTTATTCAAATAACTCCTATAGCTAGTA
 CATTTAGGACTACTTCATGCACAACCTTCTATATCTACTTACCTAACCTAACCAATCTAGTCGAACCTTCTT
 TCCAATTTAATCATAGATTCAATTAACGTTGATTCTACACAATCTCAATCTATAGCGCTATCAGCGAAT
 ATAAAAATATAGAACATACAAATAGTGACTAAATGAACAGATATCATTAATAAGTTACTATATATCT
 TTACACTAAAAATTTACTGATTTTTCTCATGTTAATAAGATCGTTTGCTTAACTTCTATATCTTATAAGT
 TCAGGATTTCTCGTAATCTCTTACGACCTAAATATGACATCACTAACCCCTATGACGTTTATCACTTC
 AACCAACCATTTGTGCCATTTTCAATGACAGCTACATCCGTAAAGTCTTCGATTTGGTCTCTAATACT
 ACGTAATAATTAAGGACCTCTTAAAGTGGTCTAGTAAATGCACCTCTATGTCTTCCAGCTATACCGTGT
 AAACGATTTATGAAATGATTTTACTACATGGTTGTAAACGGTAAACAGTACCGGTTTATGATTATC
 TATGCTACTAAATTTTCCAGCATGCAATTTGCTCATAACTTGACGCGTTTCTAAATAGTTTACGTC
 GCGTGTACATCAACTACTCAGTCATCAACATCTGTGTTATAACATTGTTCAGCTCATGGTCTGCTAAAT
 CTACTAAAAATAGCTCTTTAGCAATTTGTTAATGTATCTTCATAACACCAATAGCTAACCAATTTTAAAT
 ATATAAAGCAAACTTTACTTTATACCTAAAAATCAAAATTTTACTTATTGTTTATTTCAGCAGAGA
 TAACCGTAAATTATCCCTACCAGAAAATAAAAATGTTTATATGTTATAAACCCTACTAATTAATAATTT
 TAACATTACTAAATAGATATTAGAAAAGTTTGTGTTTTCATTCTACTACCGCATATGCTAACATTC
 GGAACCTGACTAAAAGGTTTTCACATCGGATAAACACTATCATGACCAATTTGAGTTCCATATATGAT
 TCACTCAAAATTTTCTCTCGTTTGGTACTTTCTTCGCTATCCATGAGTTTGTGTTACTTGTAAAA
 CTCGTATACTTTGTGCTTGGAGTGATATTATGCATTAATAGTTGGTCAACCGTTTGGCGCTTTTCTTTT
 TTTCAATTTGCTTATGATAATTTTATAATAATGGTAAGATTAGTAATAGCGTAACAAATAACCATAGTA
 CATAAAAATAGATGTGCGCTATTACACCTACTTGATCTTTTAACTTTTATTTCATCAAAACACAGT
 CGACTATTGTACGGTCTCATACAATTTCCACGGAAATAAAGTTACCTTCTACTTGCTAAGATGTTAGTAG
 TACCTAAGCTAACTTTCCATGTTGATCTCGAAATAAAAGTTGCTAATCGCTGTCTCTACACGTTCCACC

ATCATGGTAATGTGTTGTTCAACAGTTTTTAATAAAAATACTATTACTAGCAAGTAAATGATCTTTTCAT
TTTCTTAATAAACATCGAGTAGCTCAACTTTTTGTATATTATTCTTGCTTTAAAAATTGAAA

Şekil 4.8: Sırasıyla insert 3, 2 ve 1'in sekans analizi sonuçları

İnsert 3, 2 ve 1'in karşılık geldiği proteinler aşağıdaki şekilde sıralanmıştır:

- Putative membran protein
- Phage tail family protein
- Prophage endopeptidase tail family protein
- Putative minor structural protein
- Tail fiber protein
- Hipotetical protein
- Mannosyl-glycoprotein endo-beta-N asetylglucosaminidase
- Hipotetical protein
- Phage tail protein
- Holin
- Autolysin
- N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
- Hipotetical protein
- Hipotetical protein
- Hipotetical protein
- Hipotetical protein
- Hipotetical protein
- General stres protein
- Glycosiltransferase

5.TARTIşMA

S.aureus hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olan, ciddi sonuçlar doğurabilen patojen bir mikroorganizmadır (Franklin ve Lowy, 1998). Bu mikroorganizmanın önemi ölümcül seyreden enfeksiyonlara neden olmasının yanında antimikrobiyal ilaçlara direnç geliştirme potansiyelinden kaynaklanmaktadır. En eski antibiyotiklerden olan penisilinden, son zamanlarda çıkan antibiyotiklerden olan linezolid kadar birçok antimikrobiyale direnç geliştirmiş olması (Tsiotras ve ark., 2001, Pillai ve ark., 2002) araştırıcıları *S. aureus* kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde yeni arayışlara yöneltmiştir. Faj tedavisi bu alternatif yöntemlerin başında gelmektedir.

Antibiyotiklerin keşfinden önce faj tedavisi ile ilgili birçok çalışma yapılmış, ancak 1947 yılında Alexander Fleming tarafından penisilinin keşfedilmesi ile eski popülarlığını kaybetmiştir. Ancak günümüzde bilinen bütün antimikrobiyallere karşı dirençli suşların ortaya çıkması ile birlikte fajlar ve faj tedavisi üzerine tekrar araştırmalar yapılmaya başlanmıştır (Hsiesh ve ark., 2011).

Günümüzde giderek artan sayıda faj ekstrakte edilmekte ve tanımlanmaktadır. Fajlar, bakteriyel enfeksiyonların tedavisi yanında endüstriyel amaçlarla (yiyeceklerin korunması gibi) da kullanılmaktadır. Bu amaçla daha çok litik fajlar kullanılmaktadır. Çünkü lizojenik fajlar bakterilere virölans faktörleri taşıyarak onların patogenezi artırabilmektedir (Lobocka ve ark., 2012). Ancak litik fajlar kullanıldığı zaman bakterilerin parçalanması sonucu açığa çıkan endotoksinler hastalarda birtakım yan etkilere neden olabilmektedir. Bu nedenle virölans faktörü taşımayan modifiye lizojenik fajların kullanımının daha uygun olduğu düşünölmektedir.

Bakteriyofajlar biyosferde en fazla bulunan canlı grubunu oluşturmaktadır. Yeryüzünde 10^{32} adet bakteriyofaj olduğu tahmin edilmektedir (Wommack ve Collwell, 2000). Bakteriyofajlar bakterilerin biyolojisinde, genetik çeşitliliğinde, evrimleşmesinde kritik bir role sahiptir. Bakteriyofajların bakterilere

kazandırdıkları biyokimyasal ve fizyolojik özellikler bakterilerin yeni ortama uyum kazanmasına yardımcı olduğu gibi bakteriyel enfeksiyonların patogeneğinde önemli rol oynayan virölans özelliklerinden de sorumludur. Bakteriyofajların yeryüzündeki protein çeşitliliğinin çok büyük bir kısmını oluşturduğu bilinmesine rağmen şu ana kadar izole edilen ve genomu ortaya konan fajlar, faj popülasyonunun oldukça küçük bir kısmını oluşturmaktadır. Yapılan son araştırmalara göre bakteriyofaj genomundan olduğu tahmin edilen open reading frame (ORF)'lerin %50-75'inin GenBank'ta karşılığı olmadığı görülmüştür (Kwan ve ark.,2005). Dünya üzerindeki faj metagenomlarının araştırıldığı nonparametrik hesaplama tahminlerine göre 2 trilyondan fazla farklı faj aracılı ORF'nin araştırılmayı beklediği düşünülmektedir (Kwan ve ark., 2005).

Bu çalışmada daha öncesinde Şahin F. ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada içinde küçük lizojenik bir bakteriyofaj (MRSA ϕ sml) olduğu bulunan ve stoklanan MRSA bakterisi kullanılmıştır.

Bu suşun ekimi yapılmış, mitomisin C ile faj indüklenmesi ve ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiş, *Hind III* enzimi ile kesildikten sonra oluşan insertler pBlueScriptK plazmidi içerisine klonlanmış ve plazmid ekstraksiyonu yapıldıktan sonra sekans analizine gönderilerek gen ve protein haritası çıkarılmıştır.

5.1.Fajın Morfolojik Özellikleri

Bakteriyofajın kapsit ve kuyruk özelliklerini tanımlamak ve kategorilendirmek için elektron mikroskopu ile bakılmamış; ancak genom özelliklerine göre şu şekilde yorumlanmıştır:

Fajın kuyruk proteinlerini kodlayan genler içermesi nedeniyle kuyruklu faj grubu olan '*Caudovirales*'e ait olduğu saptanmıştır. Genom büyüklüğünün 20.000 bp civarında olması sebebi ile de '*Podoviridae*' ailesinden olabileceği tahmin edilmektedir. '*Podoviridae*' ailesine ait fajların özelliği küçük bir genom ve kısa kasılamayan bir kuyruğa sahip olmalarıdır.

5.2.Faj Genomunun Özellikleri

Sekans sonuçları NCBI BLAST programında incelenmiş; hizalama ve eşleştirme yapıldıktan sonra bulgular ortaya konmuştur.

Faj genomunun büyüklüğü 20.224 bp olarak hesaplanmıştır. NCBI ORF Finder programıyla bakılmış, genomun sadece 'ATG' kodonu ile başlayan 41 tane ORF içerdiği, bu ORF'lerin 17 tanesinin (%41.4) protein kodladığı bulunmuştur. 18 tanesinin (%43.9) NCBI BLAST programında karşılığı bulunamazken, geri kalan 6 tanesi (%14.6) hipotetical protein olarak değerlendirilmiştir. Fajın Guanin+Sitozin içeriği %33.96 olarak hesaplanmıştır. Faj genomunun özellikleri tablo 5.1'de verilmiştir.

Pelletier ve arkadaşlarının 27 adet stafilokoksik faja ait genomları ve proteinleri incelemiş olduğu bir çalışmada (Kwan ve ark., 2005) 2.170 adet ORFe bakılmış, NCBI BLAST programı kullanılarak bunların %35'inin protein karşılığı bulunabilmiş, %44'ünün veri tabandaki genlerin hiçbirisiyle eşleşmesi olmamıştır. Ayrıca Mycobacterium ve diğer bakterilere ait bakteriyofajlarla yapılan başka bir araştırmada da faj genomunda bulunan ORF'lerin %50-75'inin veri bankasındaki genlerle eşleşme göstermediği saptanmıştır (Kwan ve ark., 2005)

Bu sonuçlar fajımızın sonuçlarına oldukça yakındır. Bizim fajımızda da genlerin %43.9'unun veri bankasındaki sonuçlarla eşleşmesi olmamış, %41.4' ünün hangi proteini kodladığı bulunabilmiştir. Protein karşılığı bulunan genlerden üç tanesi sadece 'phage protein' olarak verilmiş, tam olarak ne işe yaradığı belirlenememiştir. Bu nedenle aslında ORF'lerden sadece 14 tanesinin (%31.4) protein karşılığı fonksiyonu ile birlikte ortaya konabilmiştir. MRSA ϕ sml lizojenik bakteriyofajındaki ORF'lerin başlangıç ve bitiş nükleotitleri, bp olarak uzunluğu, hangi iplikçik üzerinde yer aldığı ve genin karşılık geldiği protein tablo 5.2'de ayrıntılı olarak verilmiştir. Faja ait genlerin ve kodladıkları proteinlerin şematik görüntüsü ise şekil 5.1'de verilmiştir.

Bütün bu sonuçlar bize göstermektedir ki, bakteriyofajları daha iyi anlayabilmek ve faj terapisinde, gıda endüstrisinde, aşılama, klonlama çalışmaları vs.de fajlardan daha iyi faydalanabilmek için daha fazla fajın dizilenmesi, genomlarının ve karşılık geldiği proteinlerin bulunması, veri bankasına eklenmesi gerekmektedir. Bu nedenle bizim çalışmamız yeni bir lizojenik bakteriyofaj tanımlaması, genlerinin ve karşılık geldiği proteinlerin ortaya konması, bilinen diğer stafilokok fajlarıyla karşılaştırma yapması bakımından oldukça önemlidir. Veri bankasının zenginleştirilmesi için bu tür çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

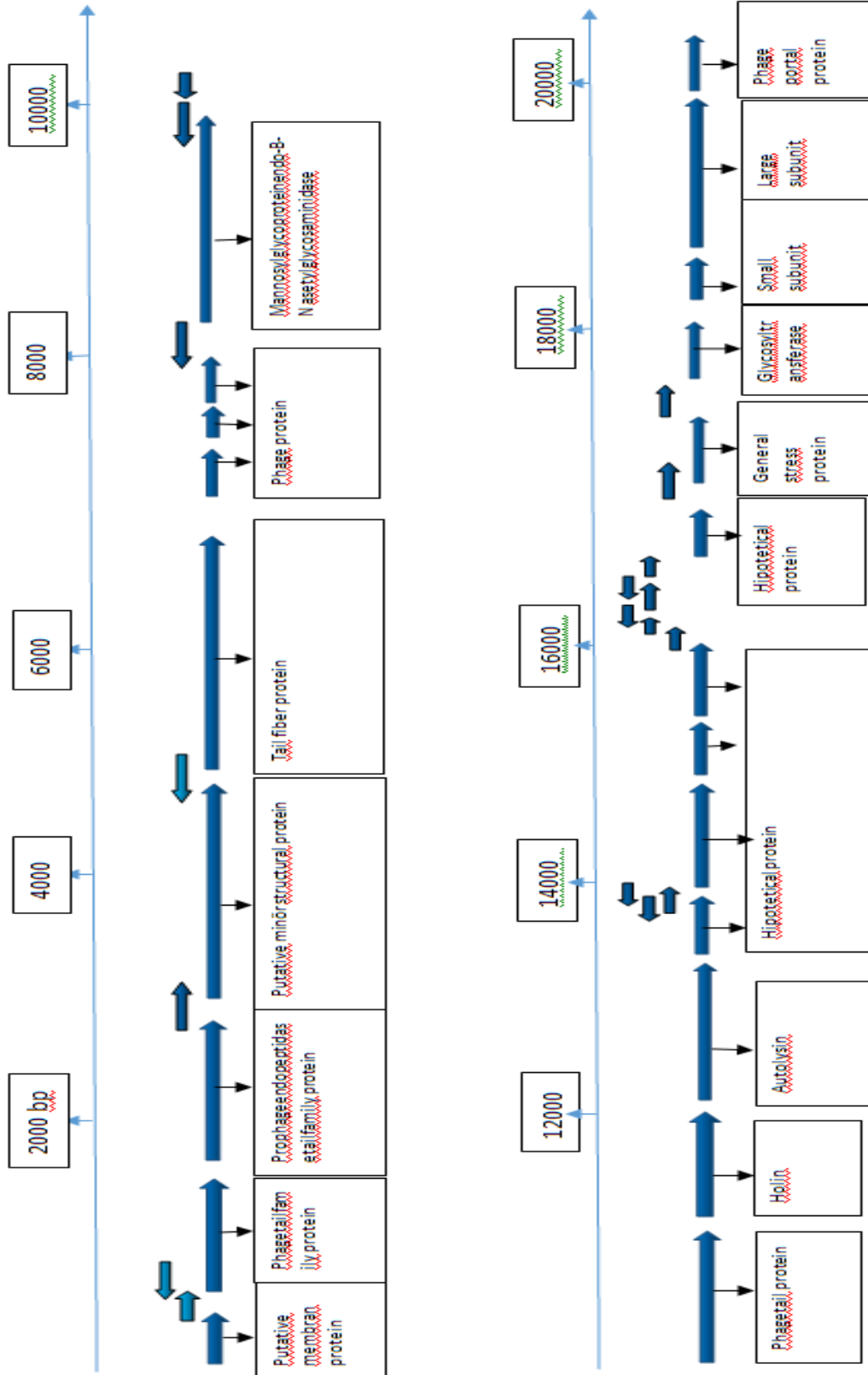
Tablo 5.1: MRSA ϕ sml lizojenik bakteriyofajına ait genom özellikleri

Faj Genomunun Özellikleri	
Özellik	Değer
Genom büyüklüğü	20.224 bp
ORF sayısı	41
En uzun ORF(bp)	1.911 bp
Ortalama ORF uzunluğu(bp)	503
En kısa ORF(bp)	78 bp
Guanin+Sitozin içeriği	%33.96(http://www.endmemo.com/bio/gc.php) programı kullanılarak belirlenmiştir.

Tablo 5.2: MRSA ϕ sml lizojenik bakteriyofajına ait ORF'lerin özellikleri

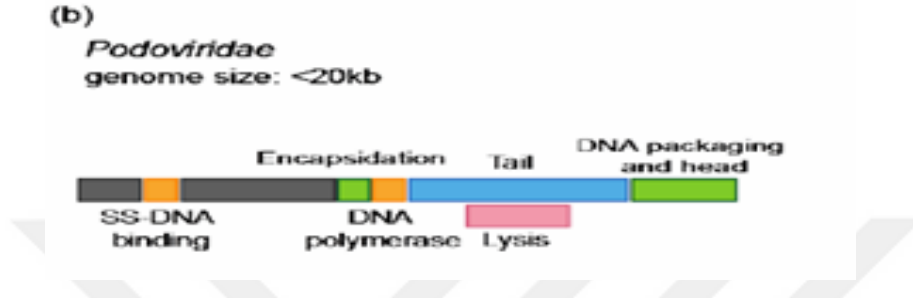
ORF'lerin Özellikleri					
ORF	Başlangıç (bp)	Bitiş (bp)	Uzunluk (bp)	İplikçik (pozitif/negatif)	Fonksiyon
ORF 1	55	378	324	Pozitif	Putative membran protein
ORF 2	305	400	96	Pozitif	-
ORF 3	479	369	111	Negatif	-
ORF 4	391	1338	948	Pozitif	Phage tail family protein
ORF 5	1347	3248	1902	Pozitif	Prophage endopeptidase tail family protein
ORF 6	3055	3270	216	Pozitif	-
ORF 7	3263	5173	1911	Pozitif	Putative minör structural protein
ORF 8	5238	5109	150	Negatif	-
ORF 9	5173	6699	1824	Pozitif	Tail fiber protein
ORF 10	6996	7373	378	Pozitif	Phage protein
ORF 11	7377	7550	174	Pozitif	Phage protein
ORF 12	7588	7433	156	Negatif	-
ORF 13	7589	7888	300	Pozitif	Phage protein
ORF 14	8026	9924	1899	Pozitif	Mannosyl glycoprotein endo-B-N asetyl glycosaminidase
ORF 15	9998	9897	102	Negatif	-
ORF 16	10036	9902	135	Negatif	-
ORF 17	9936	11069	1134	Pozitif	Phage tail protein
ORF 18	11176	11581	396	Pozitif	Hipotetical
ORF 19	11064	11597	438	Pozitif	Holin

ORF 20	12018	13490	1473	Pozitif	Autolysin
ORF 21	13686	13868	183	Pozitif	Hipotetical
ORF 22	13846	13965	120	Pozitif	-
ORF 23	13943	13830	114	Negatif	-
ORF 24	13971	13861	111	Negatif	-
ORF 25	14107	15156	1050	Pozitif	Hipotetical
ORF 26	15071	15436	366	Pozitif	Hipotetical
ORF 27	15433	15948	516	Pozitif	Hipotetical
ORF 28	15999	16115	117	Pozitif	-
ORF 29	16084	16164	81	Pozitif	-
ORF 30	16261	16139	123	Negatif	-
ORF 31	16189	16293	105	Pozitif	-
ORF 32	16397	16290	108	Negatif	-
ORF 33	16330	16407	78	Pozitif	-
ORF 34	16588	16749	162	Pozitif	Hipotetical
ORF 35	16852	17049	198	Pozitif	-
ORF 36	16870	17395	516	Pozitif	General stress protein
ORF 37	17614	17718	105	Pozitif	-
ORF 38	17735	18260	525	Pozitif	Glycosyltransferase
ORF 39	18340	18417	78	Pozitif	Phage terminase small subunit
ORF 40	18424	18767	1344	Pozitif	Phage terminase large subunit
ORF 41	19778	20224	447	Pozitif	Phage portal protein



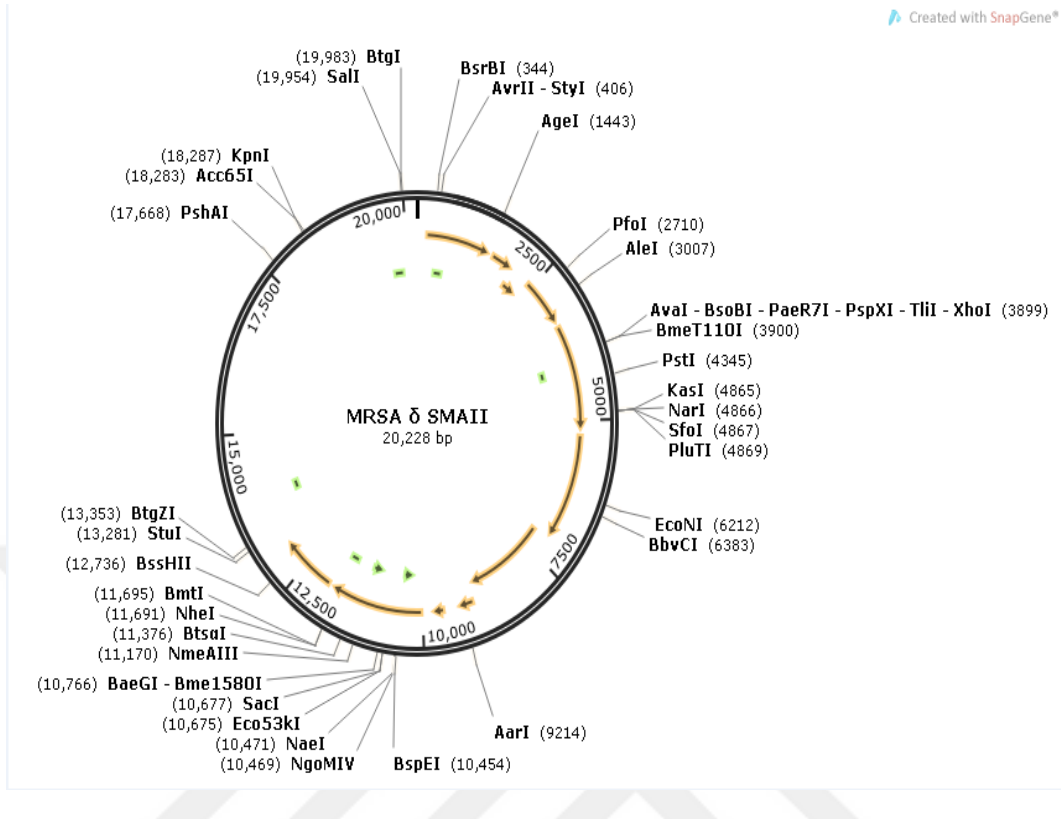
Şekil 5.1:MRSA ϕ sml lizojenik bakteriyofajındaki ORF'leri ve kodladıkları proteinleri gösteren şematik görüntü

Fajdaki genlerin kodladıkları proteinlerin dizilim sırası incelendiğinde ‘*Podoviridae*’ ailesi ile benzerlik gösterdiği görülmektedir. Kuyruk ve lizis proteinlerini kodlayan genler art arda ve üst üste sıralanmakta; bu genleri DNA paketlenmesi ile ilgili genler izlemektedir. *Podoviridae* ailesine ait genlerin sıralaması şekil 5.2’de verilmiştir.



Şekil 5.2: *Podoviridae* ailesindeki fajlarda gen haritası-Deghorain M ve Van Malderen L, 2002’den alınmıştır.

Bakteriyofajın farklı restriksiyon enzimleriyle kesim noktalarına SnapGene programıyla bakılmış ve sonuçlar şekil 5.3 üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 5.3: MRSA φ sml lizojenik bakteriyofajının restriksiyon enzim kesim bölgeleri

5.3.Caudovirales Sınıfı Fajların Özellikleri

Fajımız kuyruklu bir faj olduğu için ‘*Caudovirales*’ sınıfı içindedir. ‘*Caudovirales*’ sınıfı fajlar faj popülasyonunun %96’sını oluşturmaktadır. Ancak virion yapısı, genom organizasyonu ve replikasyon özellikleri ile ilgili çok az sayıda iyi yapılmış çalışma mevcuttur.

Virionun zarf yapısı yoktur. Baş ve kuyruk kısmından oluşmaktadır. Baş kısmı tek bir lineer dsDNA molekülü içeren protein bir kapsit yapısıdır. Kuyruk kısmı duyarlı bakteriyel hücrelere tutunan yüzey reseptörleri içermektedir. Faj kuyruk kısmıyla bakteri hücresine tutunduktan sonra enfekte bakteri içerisine faj DNA’sı kuyruk içinden hareket etmektedir.

Genom büyüklüğü 18-500 kbp arasında değişiklik göstermektedir. DNA içeriği virion yapısının %45-55'ini oluşturmaktadır. Guanin+Sitozin içeriği genom yapısının %27-72'sini oluşturmaktadır. Bazı viral DNA'lar modifiye nükleotitler içermektedir. Bizim fajımızın büyüklüğü 20.224 bp olup; guanin+sitozin içeriği %33.96'dır.

7-49 adet farklı virion yapısal proteini bulunmaktadır. DNA'nın baş yapısı içine paketlenmesi esnasında DNA portal protein boyunca giriş ve ayrılış yapmaktadır. Kontraktil olmayan kuyruklar bir büyük şaft veya tüp proteininden oluşmaktadır. Kontraktil kuyruklarda santral tüpün etrafında silindir oluşturan kılıf proteini olan ikinci büyük bir protein bulunmaktadır. Kuyrukta aynı zamanda her iki uçta çeşitli özel proteinler yer almaktadır. Baş tarafından uzak olan kuyruk tarafına 'tail tip' tutunursa faj '*Siphovirus*' cinsine, 'baseplate' tutunursa faj '*Miyovirus*' cinsine ait olur.

Lineer dsDNA genomu 27-600 arasında gen kodlamaktadır. Büyük operonlar halinde düzenlenmektedir. Tamamlanmış fonksiyonel gen haritaları kuyruklu fajların çok az bir kısmı için vardır.

Yeni yapılmış protein ve replike olmuş DNA'dan virionların oluşması komplekstir. Genellikle baş, kuyruk ve kuyruk fiberleri için farklı yollar içermektedir. 'Prokapsit' veya 'prohead' olarak isimlendirilen protein kılıflar ilk olarak oluşmakta, sonra bu proteinöz kılıf içerisinde DNA paketlenmektedir. Virüslere spesifik olan DNA'nın prokapsitler içinde paketlenmesi için terminase proteini tarafından tanınması gerekir. Sonrasında DNA'nın bir ucu prokapsitteki portal yapıya tutunmakta, DNA baş yapısı içerisine iki 'terminase' ve bir 'portal' proteinden oluşan sistem tarafından atılmaktadır. Baş kısmında bulunan bir 'headful sensing device' DNA tam olarak paketlenildiği zaman algılar ve terminase tarafından paketlenmeyen kısım kesilir. DNA paketlenmesinden sonra 'terminase'lar ayrılır. DNA ile dolu olan baş kısımları sonrasında progeni virüsleri oluşturmak için kuyruk ve kuyruk fiberlerine bağlanır. Progeni virüsler

sonrasında hücre lizisi ile dağılırlar. Hücre lizisi faj aracılı peptidoglikan hidrolazlar aracılığıyla olmaktadır.

‘*Caudovirales*’ sınıfındaki fajların genomları incelendiğinde kodladıkları proteinlerin 6 gruba ayrıldığını görebiliriz:

- 1-Lizojeni ile ilgili genler
- 2-DNA metabolizması ile ilgili genler
- 3-DNA paketlenmesi ve baş yapısı ile ilgili genler
- 4-Kuyruk ile ilgili genler
- 5-Lizis ile ilgili genler
- 6-Varsa virülans ile ilgili genler

MRSA ϕ sml fajında bu kategorilerle ilgili genlerden hangisinin bulunduğu dair sonuçlar aşağıda verilmiştir.

- **Lizojeni ile ilgili genler:** Bizim fajımızda lizojeni ile ilgili protein kodlayan bir gen bulunamamıştır.
- **DNA metabolizması ile ilgili genler:** DNA metabolizması ile ilgili sadece glycosiltransferase proteini bulunmuştur. Glycosiltransferase proteininin nükleotit biyosentezi ile ilgili olduğu bilinmektedir.
- **DNA paketlenmesi ve baş yapısı ile ilgili genler:** Viral genomlar kapsit olarak adlandırılan protein kılıflar içinde bulunur ve korunurlar. Ancak kapsitlerin tek görevi faj genomunu çevresel tehditlerden korumak değildir. Kapsitler özelleşmiş görevleri olan dinamik makromoleküler yapılardır (Moore ve Prevelige, 2002).

Paketlenme enerji bağımlı bir reaksiyon olup birçok komponentten oluşmaktadır. Her bir baz çiftinin kapsit içinde paketlenmesi için bir ATP molekülü gerekmektedir. ATPaz aktivitesi ‘terminase’ yapılarında bulunmaktadır. Çift iplikçikli viral DNA’nın paketlenmeye başlayabilmesi

için terminase proteininin dsDNA ile etkileşime geçmesi gereklidir. Terminase enzimleri small ve large subunitlerden oluşan heterooligomer yapısında moleküllerdir. Terminase small subunitin görevi paketlenmeye başlama bölgesi olan –cos veya –pac bölgelerini tanımak ve nükleoprotein oluşumuna yol açmak için orayı kesecek olan terminase large subuniti hizalamaktır (Aranzazu ve ark.,2014).

Terminase kompleksi DNA'yı paketleme bölgesine dağıtan 'portal protein'lere bağlanmaktadır (Moore ve Prevellige, 2002).

Sonuç olarak DNA'nın kapsit içerisinde paketlenmesinden sorumlu olan protein yapıları 'terminase'lar ve 'portal proteinler'dir.

Bizim fajımızda DNA paketlenmesi ile ilgili genlerden terminase small subunit, phage terminase large subunit, phage portal protein olmak üzere üç tanesi de bulunmuştur. Bu genler lider iplik üzerinde yer almaktadır. En uzun ORF'e sahip olanı -1344 bp ile phage terminase large subunit iken, en kısası -78 bp ile terminase small subunittir.

Putative membran protein ve putative minor structural protein olmak üzere iki protein kapsitle ile ilgili yapısal faj elemanlarıdır. Bu genlerin boyutları ve hangi iplikçik üzerinde yer aldığı tablo 5.2' belirtilmiştir.

- **Kuyruk yapısı ile ilgili genler:** Phage tail family protein, prophage endopeptidase tail family protein, tail fiber protein ve phage tail protein olmak üzere 4 adet gen kuyruk yapısı ile ilgilidir. Bunları kodlayan ORF'lerden en uzun olanı pozitif iplikçik üzerinde yer alan ve 1902 bp büyüklüğünde prophage endopeptidase tail family protein iken, en kısa olanı yine pozitif iplikçik üzerinde yer alan ve 948 bp büyüklüğündeki phage tail family proteindir.

- **Lizis ile ilgili genler:** Mannosyl-glycoprotein endo-B-N asetylglucosaminidase, autolysin, holin genlerinin lizis ile ilişkili olduğu bilinmektedir.
- **Virülans ile ilişkili genler:** Fajın virülansla ilişkili gen içermediği bulunmuştur. Bu nedenle faj hem tedavide hem de rekombinan olarak güvenli bir şekilde kullanılabilir.

Fajın genom büyüklüğünün 20.000 bp civarında olması ve kuyruk ve lizis proteinlerini kodlayan genlerin şekil 5.2’de görüldüğü gibi üst üste gelmesi nedeniyle ‘*Caudovirales*’ ailesinin ‘*Podoviridae*’ sınıfına ait olduğu düşünülmektedir.

Bizim fajımızda mitomisin C ile indüklemeye yoluyla faj ekstraksiyonu yapılmıştır. Yani temperate bir fajdır. Ancak fajda lizojeni ile ilgili gen ve proteine rastlanmamıştır. Veri bankasındaki genlerle eşleşmesi olmayan 18 ORF’den ve fonksiyonu bilinmeyen 6 hipotetik proteinden bazılarının lizojeni ile ilgili proteinler kodlayabileceği düşünülmektedir.

Elde edilen faj 20.224 bp büyüklüğünde bir fajdır. Daha önce de belirtildiği gibi fajların büyük bir kısmı kuyruklu faj olan ‘*Caudovirales*’ ailesine aittir. *Caudovirales* ailesinde genom büyüklüğü 40.000 bp civarında olan ‘*Siphoviridae*’ sınıfı, fajların %61’ini oluşturmaktadır. Bizim fajımız yaklaşık 20.000 bp büyüklüğünde genoma sahip küçük fajlardandır. Fajın küçük olması rekombinant faj elde etmede kolaylık sağlayacaktır. Bu açıdan oldukça önemlidir.

Lizojenik fajların faj terapisinde tercih edilmemesinin en büyük nedeni virülans faktörlerinin lateral gen transferi ile aktarılma ve böylece bakterilerin patogenezi artırma korkusudur. Ancak bizim fajımızda genlerin veri bankasıyla eşleştirilmesi sonucunda virülans faktörüne rastlanılmamış olması nedeniyle faj terapisinde güvenle kullanılabilirliği düşünülmektedir.

Fajda dört adet kuyruk yapısı ile ilgili (phage tail family protein, prophage endopeptidase tail family protein, tail fiber protein ve phage tail protein), üç adet lizis ile ilgili (mannosyl-glycoprotein endo-B-N asetylglycosaminidase, autolysin, holin), üç adet DNA paketlenmesi ile ilgili (phage terminase large subunit, phage terminase small subunit, phage portal protein) ve iki adet kapsit yapısı ile ilgili (putative membran protein ve putative minör structural protein) gen tanımlanmıştır. DNA metabolizması ile ilgili sadece nükleotit biyosentezinden sorumlu olan ‘glycosyltransferase’ proteinine rastlanmıştır. DNA metabolizması ile ilgili normalde replikasyon ve regülasyon olmak üzere iki grup gen alesi bulunmaktadır. Ancak bizim fajda bunlardan bir tanesine rastlanmış olması yine fonksiyonu tanımlanamamış 24 tane ORF’den bazı genlerin DNA metabolizması ile ilgili olabileceğinin düşündürmektedir.

6.SONUÇ

Günümüzde bilinen bütün antimikrobiyallere dirençli bakterilerin ortaya çıkması nedeniyle faj terapisi tekrar gündeme gelmiştir. Bu amaçla daha çok litik fajlar tercih edilmektedir. Ancak litik fajlar ile bakterilerin aniden parçalanması sonucunda kana endotoksinlerin birden karışması istenmeyen sonuçlarla karşılaşılmasına neden olabilecektir. Tezimde küçük yeni bir lizojenik faj ortaya konması, genlerinin ve proteinlerinin tanımlanması nedeniyle oldukça önemli sonuçlar ortaya konmuş, bulgular ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir.

Tanımladığımız faj 20.244 bp büyüklüğünde küçük fajlardandır. Küçük olması rekombinant olarak fajdan yararlanmada avantajlar sağlayacaktır.

41 tane ORF içermesine karşılık, bunların sadece 17 tanesinin fonksiyonu NCBI BLAST programının veri bankasındaki genlerle eşleştirilerek ortaya konabilmiştir. Diğer ORF'lerin fonksiyonlarının aydınlatılması faj, dolayısıyla virus biyolojisinin detaylı anlaşılması için önemlidir.

Fajımızın genomik ve morfolojik özellikleri değerlendirildiğinde '*Caudovirales*' ailesinin '*Podoviridae*' sınıfına ait olduğu belirlenmiştir.

Fajda kuyruk, lizis, DNA paketlenmesi, baş yapısı ile ilgili genler bulunmuştur. Ancak DNA metabolizması ile ilgili sadece bir gene rastlanırken ve lizojeni ile ilgili genlere rastlanamamıştır. Fonksiyonu bulunamayan 24 ORF'de bu iki kategori ile ilgili genler bulunabileceği düşünülmektedir.

ÖZET

Metisiline Dirençli *Staphylococcus Aureus* (MRSA)'dan Elde Edilen Fajın Karakterizasyonu ve Faj Komponentlerini Kullanarak İn Vitro Rekombinant Faj Geliştirilmesi

Staphylococcus aureus hastane veya toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olabilen ve oldukça ciddi sonuçlar doğurabilen önemli bir patojen mikroorganizmadır. Çoklu ilaç dirençli *S.aureus* stafilokokal enfeksiyonların tedavisinde büyük zorluklar yaşanmasına neden olmaktadır. Mevcut olan bütün antimikrobiyallere dirençli *S.aureus* suşlarının ortaya çıkması ancak yeni antibiyotik bulunamaması araştırmacıları antibiyotiklerin keşfi ile popülerliğini kaybetmiş olan faj tedavisine yönlendirmiştir. Bu amaçla 1950 yıllarına kadar kullanılan fajlar temel olarak bakterinin direkt olarak ölmesini sağlayan litik özelliği olan fajlardır. Bu terapi yönteminin bakterilerin ani ölümüne bağlı olarak endotoksik şok gibi istenmeyen etkileri olduğu bilinmektedir. Rekombinant teknolojinin gelişimi içerisinde bakteri ölümünü kontrollü olarak sağlayan gen materyalleri bulunduran lizojenik rekombinant fajların oluşturulması fikrini ortaya çıkarmıştır. Bunun için manüplasyonu kolay küçük boylarda fajlara ihtiyaç duyulmaktadır. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Şahin ve ark.(2013) tarafından yapılan bir çalışmada MRSA suşlarından elde edilen fajlar incelendiğinde bir MRSA suşundan elde edilen, diğer fajlardan çok daha küçük boyutta lizojenik bir bakteriyofaj tesbit edilmiş ve MRSA ϕ sml (small) olarak adlandırılmıştır. Bu çalışmada lizojenik bakteriyofajın genom haritasının çıkarılması, fajlara ilişkin bilgi bankasına katkıda bulunulması ve genom haritası kullanılarak faj tedavisinde kullanılabilecek lizojenik rekombinant fajların oluşturulma potansiyelini araştırmak amacıyla elde edilen fajın tanımlanması amaçlanmıştır.

MRSA ϕ sml bulunduran suşun ekimi yapılmış, mitomisin C ile faj indüklenmesi ve ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiş, *Hind III* enzimi ile kesildikten sonra oluşan insertler pBlueScript K plazmidi içerisine klonlanmış ve plazmid ekstraksiyonu yapıldıktan sonra sekans analizine gönderilerek gen ve protein haritası çıkarılmıştır.

Fajın kuyruk proteinlerini kodlayan genler içermesi nedeniyle kuyruklu faj grubu olan '*Caudovirales*'e ait olduğu saptanmıştır. Genom büyüklüğünün 20.000 bp civarında olması sebebi ile de '*Podoviridae*' ailesinden olabileceği tahmin edilmektedir. '*Podoviridae*' ailesine ait fajların özelliği küçük bir genom ve kısa kasılamayan bir kuyruğa sahip olmalarıdır. Faj genomunun büyüklüğü 20.224 bp olarak hesaplanmıştır. NCBI ORF Finder programıyla bakılmış, genomun sadece 'ATG' kodonu ile başlayan 41 tane ORF içerdiği, bu ORF'lerin 17 tanesinin (%41.4) hangi proteini kodladığı bulunmuştur. 18 tanesinin (%43.9) NCBI BLAST programında karşılığı bulunamazken, geri kalan 6 tanesi (%14.6) hipotetikal protein olarak değerlendirilmiştir. Fajın Guanin+Sitozin içeriği %33.96 olarak hesaplanmıştır.

Yapılan son araştırmalara göre bakteriyofaj genomundan olduğu tahmin edilen open reading framelerin %50-75'inin GenBank'ta karşılığı olmadığı görülmüştür. Bakteriyofajları daha iyi anlayabilmek ve faj terapisinde, gıda endüstrisinde, aşılama, klonlama çalışmaları vs.de fajlardan daha iyi faydalanabilmek için

daha fazla fajın dizilenmesi, genomlarının ve karşılık geldiği proteinlerin bulunması, veri bankasına eklenmesi gerekmektedir. Bu nedenle tezimde manipulasyonu kolay küçük bir lizojenik fajın genlerinin ve proteinlerinin tanımlanması nedeniyle oldukça önemli sonuçlar ortaya konmuş, bulgular ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar sözcükler: Bakteriyofaj, *Hind III*, Mitomisin C, MRSA ϕ sml, Open Reading Frame



SUMMARY

Characterization of Phage Obtained From Methicilline Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Development of In Vitro Recombinant Phage Using Phage Components

Staphylococcus aureus is an important pathogenic microorganism that can cause hospital or community-acquired infections and can have very serious consequences. Multidrug-resistant *S.aureus* causes great difficulty in the treatment of staphylococcal infections. Appearance of *S.aureus* strains that are resistant to all known antibiotics but unavailability of any new antibiotics has led researchers to phage therapy which has lost its popularity with the discovery of antibiotics. Phages used until 1950 for this purpose are basically phages which are lytic features that allow bacteria to die directly. This therapy is known to have undesirable effects such as endotoxic shock due to sudden death of the bacteria. The development of recombinant technology has led to the idea of creating lysogenic recombinant phage containing gene materials that can control bacterial death. For this, small phages are needed for easy manipulation. In Ankara University Medical Faculty Medical Microbiology Department, Şahin et al. (2013) obtained a lysogenic bacteriophage from an MRSA strain that was much smaller than the other phages and named as MRSA ϕ sml (small). In this study, it was aimed to identify the lysogenic bacteriophage genome in order to investigate the potential of creating lysogenic recombinant phages that can be used in the phage treatment and to put forth the genome map and contribute knowledge to phages database.

Phage was induced with Mitomycin C and after that DNA extraction was done. After the digestion with *Hind III* enzyme, the inserts were cloned into plasmid pBluescript K and after plasmid extraction, they were sent to sequence analysis and gene and protein map were plotted.

Because of having genes that coded tail proteins, it has been determined that the phage belongs to *Caudovirales*. It is estimated that it may be from '*Podoviridae*' family because genome size is around 20.000 bp. The characteristics of phages belonging to the '*Podoviridae*' family are that they have a small genome and a short contraction-free tail. The size of the phage genome was calculated to be 20.224 bp. Phage genome has 41 ORFs beginning with the 'ATG' codon. Using NCBI Blast ORF Finder programme, it was found which proteins were coded by the 17 (%41.4) of ORFs but 18(%43.9) of them couldn't been determined. The remaining 6 (14.6%) were considered as hypothetical proteins. Guanine + Cytosine content was calculated as 33.96%.

According to recent studies, 50-75% of the open reading frames estimated to be from the bacteriophage genome were not found in GenBank. To better understand bacteriophages and to better benefit from phages in phage therapy, food industry, vaccination, cloning studies, etc., more phage must be sequenced, genomes and corresponding proteins must be added to the database. For this reason, very important results have been revealed due to the identification of genes and proteins of a small lysogenic phage that are easy to manipulate in the synthesis, and the findings are evaluated in detail.

Key words: Bacteriophage, Mitomycin C, *Hind III*, MRSA ϕ sml, Open Reading Frame



KAYNAKLAR

ABEDON ST, KUHLE SJ, BLASDEL BG, KUTTER EM.(2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* **1**(2):66–85.

ABELES AL, SNYDER KM, CHATTORAJ DK.(1984). P1 plasmid replication: replicon structure. *J Mol Biol* **17**:307–324.

ACKERMANN HW. (2004). Bacteriophage classification. In Bacteriophages. Biology and Applications. *CRC Press* 67–89, USA.

ACKERMANN HW. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology* **152**(2): 227-243.

ARANZAZU G, CAMACHO AG, ALONSO JC. (2014). Functional Analysis of the Terminase Large Subunit, G2P, of Bacillus Subtilis Bacteriophage SPPI. *The Journal of Biological Chemistry* **275**:35311-35319.

BAE T, BABA T, HIRAMATSU K, SCHNEEWIND O. (2006). Prophages of Staphylococcus aureus Newman and their contribution to virulence. *Mol. Microbiol.* **62**:1035–1047.

BAKHSHINEJAD B. (2015). Phage display and targeting peptides: surface functionalization of nanocarriers for delivery of small non-coding RNAs. *Front. Genet* **6**:178.

BARBER M. (1961). Methicillin-resistant staphylococci. *J Clin Pathol* **14**(4):385-393.

BREITBART M, WEGLEY L, LEEDS S, SCHOENFELD T, ROHWER F. (2004). Phage community dynamics in hot springs. *Appl Environ Microbiol* **70**:1633–1640

BREITBART M. (2012). Marine viruses: truth or dare. *Annu Rev Mar Sci* **4**:425–448.

BRUSSOW H; CANCHAYA C, HARDT WD. (2004). Phages and the evolution of bacterial pathogens: From genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* **68**:560–602.

CANCHAYA C, PROUX C, FOURNOUS G, BRUTTIN A, BRUSSOW H. (2003). Prophage Genomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**:238–276.

CHEN Z, JIN W, LIU H, ZHAO, CHENG K. (2015). Discovery of peptide ligands for hepatic stellate cells using phage display, *Mol. Pharm* **12**(6): 2180-2188.

CHENG Q, NELSON D, ZHU S, FİSCHETTI VA. (2005). Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**:111–117.

COELHO J, WOODFORD N, TURTON J, LİVERMORE DM. (2004). Multiresistant Acinetobacter in the UK, pp. how big a threat? *Journal of Hospital Infection* **58**: 167–169.

DEGHORAIN M, MELDEREN VL. (2012). The Staphylococci Phage Family: An overview. *Viruses* **4**:3316-3335.

ENTENZA J, LOEFFLER J, GRANDGİRARD D, FİSCHETTI V, MOREİLLON P. (2005). Therapeutic effects of bacteriophage Cpl-1 lysin against Streptococcus pneumoniae endocarditis in rats. *Antimicrob. Agents Chemother* **49**: 4789-4792.

FRANKLIN D, LOWY MD. (1998). Staphylococcal aureus infections. *N Engl J Med* **339**:520-532.

FİSCHETTI VA. (2008). Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Current Opinion in Microbiology* **11**:393-400.

GRANDGİRARD D, LOEFFLER JM, FİSCHETTI VA, LEİB SL. (2008). Phage lytic enzyme cpl-1 for antibacterial therapy in experimental pneumococcal meningitis. *Journal of Infectious Diseases* **197**: 1519–1522.

GRİFFİTHS AJF, MILLER JH, SUZUKİ DT. (2000). An introduction to genetic analysis. W.H. Freeman and Company, **7**. Baskı, New York.

HANKİN EH. (1896). L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera. *Ann. Inst. Pasteur* **10**:511.

HERSHEY AD, CHASE M. (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol* **36**:39–56.

HSİEH SE, LO HH, CHEN ST, LEE MC, TSENG YH. (2011). Wide host range and strong Lytic Activity of Staphylococcus lytic phage Stau 2. *Appl. Environ. Microb* **77**(3):756–761.

HUİSKONEN JT. KİVELA HM. BAMFORD DH, BUTCHER SJ. (2004). The PM2 virion has a novel organization with an internal membrane and pentameric receptor binding spikes. *Nature Structural & Molecular Biology* **11**(9): 850-856.

KANEKO J, KİMURA T, NARİTA S, TOMİTA T, KAMİO Y. (1998). Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage PVL carrying Pantón-Vallentin leucosidine genes. *Gene* **215**:1055-1067.

KARİMİ M. (2016). *Advanced Drug Delivery Reviews* **106**:45–62.

KLUYTMANS J, VAN BELKUM A, VERBRUGH H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical Microbiology Reviews* **10**(3): 505-520.

KREISWIRTH B, KORNBLUM J, ARBEIT RD, et al. (1993). Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science* **259**:227.

KRISCH HM, COMEAU AM. (2008). The immense journey of bacteriophage T4- from d'Herelle to Delbruck and then to Darwin and beyond. *Res. Microbiol.* **159**:314-332.

KURTBOKE I. (2012). Bacteriophage, InTech, 268, Australia.

KWAN T, LIU J, DUBOW M, GROS P, PELLETIER J. (2005). The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 5174-5179.

KWAN T, LIU J, DUBOW M, GROS P, PELLETIER J. (2006). Comparative genomic analysis of 18 *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. *J. Bacteriol.* **188**: 1184–1187.

LABANDEIRA-REY M, COUZON F, BOISSET S. (2007). *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin Causes Necrotizing Pneumonia. *Science* **315**(5815):1130-1133.

LINDSAY JA. (2010). Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**:98-103.

LOBOCKA M, HEJNOWICZ MS, DABROWSKI K, GOZDEK A, KOSAKOWSKI T, WITKOWSKA MI, VLATOWSKA MI, WEBER-DABROWSKA B, KWIATEK M, PARASION S, GAWOR T, CASOWSKA H, GLOWOCKA A. (2012). Genomics of Staphylococcal Twort-like phages- potential therapeutics of the post-antibiotic era. *Adv Virus Res* **83**:143-216.

LOEFFLER JM, NELSON D, FISCHETTI VA. (2001). Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* **294**:2170–2172.

LOPEZ S, ARIAS C. (2010). How Viruses Hijack Endocytic Machinery. *Nature Education* **3**(9): 16-23.

LU TK, KOERIS S. (2011). The next generation of bacteriophage therapy. *Curr. Opin. Microbiol* **14**:524–531.

MALACHOWA N, DELEO FR. (2010). Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**: 3057–3071.

MOORE SM, PREVELIGE PE. (2002).DNA packaging: A New Class of Molecular Motors. *Current Biology* **12(02)**: 96-98.

MORADPOUR Z, GHASEMIAN A. (2011). Modified phages: Novel antimicrobial agents to combat infectious diseases. *Biotechnology Advances* **29**:732–738.

MURRAY PR, ROSENTHAL KS, PFALLER MA. (2016). Staphylococcus and related Gram positive cocci. In: Medical microbiology. *Elsevier*, 172-182, Philadelphia.

National Nosocomial Infections Surveillance System. (2004).National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* **32**:470-485.

NELSON D, LOOMIS L, FISCHETTI VA. (2001). Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophagelytic enzyme. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**: 4107–4112.

O'FLAHERTY S, COFFEY A, EDWARDS R, MEANEY W, FITZGERALD GF, ROSS RP. (2004). Genome of Staphylococcal Phage K: a New Lineage of Myoviridae Infecting Gram-Positive Bacteria with a Low G+C Content. *J. Bacteriol* **186**: 2862-2871.

OLIVEIRA DC, TOMASZ A, DE LENCASTRE H. (2001). The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated mec elements. *Microb Drug Resist* **7**:349.

PALAZZO IC, ARAUJO ML and DARINI AL. (2005). First report of vancomycin-resistant staphylococci isolated from healthy carriers in Brazil. *J. Clin. Microbiol* **43**:179–185.

PEDULLA ML, FORD ME, HOUTZ JM, KARTHIKEYAN T, WADSWORTH C, LEWIS JA, JACOBS-SERA D, FALBO J, GROSS J, PANNUNZIO NR, BRUCKER W, KUMAR V, KANDASAMY, J, KEENAN L, BARDAROV S, KRIAKOV J, LAWRENCE JG, JACOBS WR, HENDRIX RW, HATFULL GF. (2003). Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. *Cell* **113**: 171-182.

PILLAI SK, SAKOULAS G, WENNERSTEN C, ELIOPOULOS GM, MOELLERING RC JR, FERRARO MJ, GOLD HS. (2002). Linezolid resistance in Staphylococcus aureus: characterization and stability of resistant phenotype. *J Infect Dis* **186(11)**:1603-1607.

- PİRİSİ A. (2000). Phage therapy - advantages over antibiotics? *Lancet* **356**: 1418.
- RİPPON JE. (1952). A new serological division of *Staphylococcus aureus* bacteriophages: group G. *Nature* **170**: 287.
- ROSENBLUM ED, TYRONE S. (1964). Serology, Density, and Morphology of Staphylococcal Phages. *J. Bacteriol.* **88**: 1737-1742.
- ROUNTREE PM. (1949). The serological differentiation of staphylococcal bacteriophages. *J. Gen. Microbiol* **3**: 164-173.
- RUDOLF MP, VOGEL M, KRÍCEK F, RUF C, ZÜRCHER AW, REUSCHEL R, AUER M, MIESCHER S, STADLER BM. (1998). Epitope-specific antibody response to IgE by mimotope immunization, *J. Immunol* **160**: 3315-3321.
- SAHİN F, KARASARTOVA D. (2013). Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying an exfoliative toxin A gene encoding phage isolated from a hospitalized patient in Turkey. *Canadian Journal of Microbiology* **59(4)**: 260-265.
- SAMSYGİNA GA, BONİ EG. (1984). Bacteriophages and phage therapy in pediatric practice. *Pediatrics* **4**: 67-70.
- SCHUCH R, NELSON D, FİSCHETTI VA. (2002). A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature* **418**: 884-889.
- SHORS T. (2008). Understanding Viruses. Jones and Bartlett 11464-11470.
- SKURNİK M, PAJUNEN M, KILJUNEN S. (2007). Biotechnological challenges of phagetherapy. *Biotechnology Letters* **29**: 995-1003.
- SMİTH GP. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**: 1315-1316.
- SON JS, LEE SJ, JUN SY, YOON SJ, KANG SH, PAİK HR, KANG JO, CHOI YJ. (2010). Antibacterial and biofilm removal activity of a podoviridae *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-2 and a derived recombinant cell-wall-degrading enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **86**: 1439-1449.
- SULAKVELİDZE A, MORRİS JG. (2001a). Bacteriophages as therapeutic agents. *Annals of Medicine* **33**: 507-509.
- SULAKVELİDZE A, ALAVİDZE Z, MORRİS JG. (2001b). Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother* **45(3)**: 649-659.

SUMBY P, WALDOR MK. (2003). Transcription of the toxin genes present within the Staphylococcal phage phiSa3ms is intimately linked with the phage's life cycle. *J. Bacteriol.* **185**: 6841-6851.

TİLLE PM. (2014). *Staphylococcus, Micrococcus* and Similar Organisms, Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology, syf:232-246. Elseiver:China.

TİWARİ HK AND SEN MR. (2006). Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. *BMC Infect. Dis.* **6**:156.

TOPÇU AW, SÖYLETİR G VE DOĞANAY M. (2017). Stafilocoklar, Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, syf:1804-1813. Nobel Tıp Kitabevleri: İstanbul.

TSİODRAS S, GOLD HS, SAKOULAS G. (2001). Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **358**:207-208.

TWORT FW. (1915). An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses. *Lancet* 1241.

VYBİRAL D, TAKAC M, LOESSNER M, WITTE A, VON AHSEN U, BLASI U. (2003). Complete nucleotide sequence and molecular characterization of two lytic *Staphylococcus aureus* phages. *FEMS Microbiol. Lett.* **219**: 275-283.

WEİGEL L.M.(2003). Genetic analysis of a high-level vancomycinresistant isolate of *Staphylococcus aureus*, *Science* **302**:1569-1571.

WENTWORTH BB.(1963). Bacteriophage Typing of the Staphylococci. *Bacteriol. Rev.* **27**: 253-272.

WERTHEİM HF, MELLES DC,VOS MC. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet* **5(12)**:751-762.

WILLIAMSON KE, WOMMACK KE, RADOSEVICH M. (2003). Sampling naturalviral communities from soil for culture-independent analyses. *Appl Environ Microbiol* **69**:6628–6633

WOMMACK KE, COLWELL RR. (2000). Virioplankton, pp. viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**:69-114.

YATA T, LEE KY, DHARAKUL T, SONGSİVİLAİ S, BİSMARCK A, MİNTZ PJ, HAJİTOU A. (2014). Hybrid nanomaterial complexes for advanced phage-guided gene delivery. *Mol. Ther.-Nucleic Acids* **3**:e185.