

Farklı Restrüksiyon Enzimleriyle Kesilen *Cryptosporidium parvum* Genomik DNA'sının Green Fluorescent Protein Reporter (GFP) Vektörüne Transformasyonu

Zeynep KOLÖREN *  Sadık DİNÇER **

* Ordu Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 52200 Ordu - TÜRKİYE

** Çukurova Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 01330 Adana - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2009-763

Özet

Bu çalışmada farklı restrüksiyon enzimleriyle kesilmiş *Cryptosporidium parvum* genomik DNA'sının Green fluorescent protein reporter (GFP) genlerini taşıyan GFP vektörüne aktarılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, rastgele seçilmiş *C. parvum* genomik DNA'sı restrüksiyon enzimleriyle (NcoI-SpeI; Fat I-XbaI and BspHI- XbaI) kesilmiştir. 750 bp DNA ile 23000 bp lik DNA arasındaki bölge jelden geri kazanılıp, GFP vektörüne transfer edilmiştir. Rekombinant koloniler seçilerek, iki primer kullanılıp baz dizi analizleri yapılmıştır. *C. parvum* genom dizisi hemen hemen tamamlanmış olsa da, bu parazitin, genetik transformasyonu fonksiyonu bilinmeyen genlere sahip olması ve regülatör baz dizisinin açıklanmamasından dolayı henüz gerçekleştirilmemiştir. Bu çalışmanın gelecekte yapılacak *C. parvum* gen transformasyonunun ön çalışmasını oluşturması ve gen manüplasyon çalışmalarına katkı sağlaması anlamında önemli olduğu düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: *Cryptosporidium parvum*, Green fluorescent protein, Gen klonlama, Real-time PCR

Transformation of Digested Genomic DNA of *Cryptosporidium parvum* with Different Restriction Enzymes to Green Fluorescent Protein Reporter (GFP) Vector

Summary

The focus of this study is to develop methods for transformation of random genomic fragment of *Cryptosporidium parvum* DNA with GFP vector. We propose to insert upstream and downstream intergenic regions from *C. parvum* genes into plasmid carrying the green fluorescent protein reporter. For this objective, random genomic fragment of *C. parvum* DNA was digested NcoI-SpeI; Fat I-XbaI and BspHI- XbaI, and fragments between 750 and 23000 bp were gel purified and cloned into a GFP plasmid vector. Colonies were randomly selected and subjected to automated sequencing by using one or two primers flanking the cloning site. Even though sequence of the *C. parvum* genome very nearly was completed, genetic transformation is needed to translate genomic sequence the function of unknown genes and identifying regulatory sequences. We described here the preliminary study which form the basis of future for *C. parvum* gen transformation and to construct gene manipulation techniques.


Keywords: *Cryptosporidium parvum*, Green fluorescent protein, Gene cloning, Real-time PCR

GİRİŞ

Cryptosporidium parvum apikompleksan bir protozoan olup immun yetersizliği olan kişilerde ve AIDS'li hastalarda şiddetli semptomlara neden olmaktadır. Kriptosporidiyoz gelişmekte olan ülkelerde özellikle çocuklarda kesintisiz ishallerle seyreden yaygın bir parazitizmdir ¹.

Diğer enterik koksidiolar gibi *Cryptosporidium*'da tek konakçı içerisinde yaşam döngüsünü tamamlar. Diğer koksidiyalardan ayıran özellikleri, antimikrobiyal ajanlara dayanıklılığının bulunması, otoenfeksiyon kabiliyetine sahip olmasıdır. *C. parvum* ookistleri enfekteli insan ve

 İletişim (Correspondence)

 +90 452 2345010

 zeynep.koloren@yahoo.com

buz ağılardan büyük bir şekilde yayılır. Bulaşma fekal-oral, direk veya indirek kontamine olmuş su ve yiyeceklerden olur. İzolatına bağlı olarak 10 taneden az sayıda ookist enfeksiyon etkeni olabilir. Ookistler bilinen dezenfektanlara karşı oldukça fazla bir rezistansa sahiptir ².

C. parvum'un kompleks yaşam döngüsü ve oluşturduğu enfeksiyona karşı etkili bir ilaç tedavisinin bulunmaması, bu organizmanın gen transfeksiyonu üzerine ilginin artmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte *Eimeria tenella* parazitinin DNA temelli transient ve stabil transformasyonu, *C. parvum* ile benzer yaşam döngüsüne sahip olmasından dolayı bu parazit için yeni yolların açılmasına nedendir ³.

Bu çalışma ile rastgele seçilmiş *C. parvum* genlerinin reporter protein GFP'yi taşıyan vektöre aktarılması üzerine ön bir çalışma yapılarak, gelecekte yapılacak *C. parvum* gen manüplasyon ve transformasyon çalışmalarına katkı sağlanması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

GFP vektör: Bu çalışmada kullanılan plazmid, Geneart firması tarafından (www.geneart.com), sentetik oligonukleotidler kullanılarak hazırlandı. Bu fragment KpnI ve SacI restriksiyon bölgeleri kullanılarak pPCR-Script vektörüne klonlanmıştır. Bu plazmidin dizaynında *E. coli* K12 XL 10-GOLD (dam+ dcm+)'dan yararlanıldı.

***Cryptosporidium parvum* ookistleri:** Iowa suşuna ait ookistler Amerika Birleşik Devletleri, Tufts Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Biyomedikal Bölümü Enfeksiyon Hastalıkları Laboratuvarından temin edildi.

Metot

***C. parvum* ookistlerinden DNA izolasyonu:** Ookistler sodyum hipokloritle ⁴ muamele edildikten sonra Eksistasyon Metodu ⁵ modifiye edilerek uygulandı. 10⁸ ookist/ml; %10 sodyum hipokloritle karıştırılıp 7 dakika buz üzerinde bekletildi. Ookistler 3 kez PBS (fosfat taponu) ile 4000 × g de 5 dakika 4°C'de yıkandı. Eksistasyon için kullanılacak solüsyon ookist çöktelisinin üzerine ilave edildi. Eksistasyon solüsyonu 0.015 g taurocholik asit (TA- Sigma T9034) + 900 µl 1xPBS'ten oluşmaktadır. Yüzeysel sterilizasyon sonucunda elde edilen 100 µl'lik ookist çöktelisi üzerine TA/PBS eklenip 37°C'de 1 saat su banyosunda bekletildi. Eksiste olmayan ookistler 37°C'de -80°C'de 3 kez sırasıyla 10'ar dakika bekletildi. DNA izolasyon kiti (Puregene/ Katalog no: D-5000A) kullanılıp DNA izole edildi. DNA'nın konsantrasyonu, DNA-dipstick kit (Invitrogen 45-0066) kullanılarak tespit edildi.

***C. parvum* Genomik DNA:** *C. parvum* genomik DNA'sı farklı kombinasyonlarda primerler (S1-N1, S2-N2, S3-N3, S4-N4, S5-N5) kullanılarak Real-time PCR cihazında (40 döngü 95°C, 4 sec; 28°C, 5 sec; 72°C, 20 sec; Melting curve: one cycles of 95°C, 2 sec, 50°C, 15 sec; 95°C, 0 sec,) çoğaltıldı. Primerler aşağıda tanımlanan baz dizileri şeklinde dizayn edildi.

| | |
|----------------------------|---------------------------|
| S1: 5'- GCC ACT AGT NN -3' | N3 5'- ATA CCA TGG NN -3' |
| N1: 5'- CAC CCA TGG NN -3' | S4 5'- GCG ACT AGT NN -3' |
| S2: 5'- TCC ACT AGT NN -3' | N4 5'- TGG CCA TGG NN -3' |
| N2: 5'- CTG CCA TGG NN -3' | S5 5'- GGA ACT AGT NN -3' |
| S3: 5'- CCA ACT AGT NN -3' | N5 5'- TAG CCA TGG NN -3' |

Çoğaltılmış PCR ürünleri purifikasyon kiti kullanılarak (kat no: 28104- MinElute PCR purification kit) enzim ve diğer artıklar uzaklaştırılarak tamamen saf hale getirildi. Saf haldeki DNA, NcoI-SpeI, Fat I-XbaI ve BspHI- XbaI restrüksiyon enzimleri ile kesildi ve tekrar Qiaquick PCR purification kit ile muamele edildi. Purifiye edilmiş ürün GFP vektörüne ligasyon işlemiyle yerleştirildi. Rekombinant haldeki plazmid Subcloning Efficiency DH5α Kompetent (kat no: 18265-017) hücrelerine aktarıldı. Daha sonra Ampisilin (100 mg/ml) içeren LB agar besi yerlerine ekimi yapıldı.

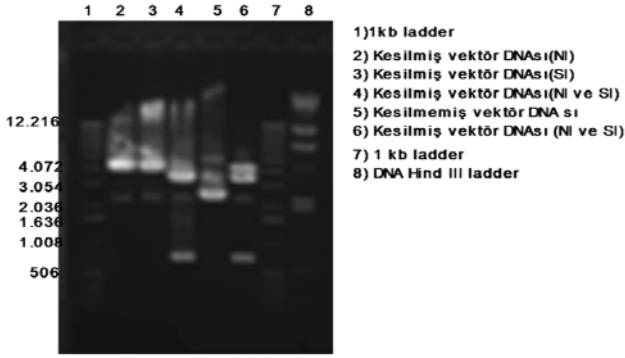
Rekombinant kolonilerin seçimi: LB agar besi yeri içeren plaklardan rastgele koloniler seçilip Real-time PCR (Amplification: Fourty cycles of 95°C, 2 sec; 60°C, 5 sec; 72°C, 30 sec; Melting curve: one cycles of 95°C, 1 sec, 65°C, 15 sec; 95°C, 0 sec) cihazında 'CpF 5'CAAATAACCGTCTACAG3' ve CpR 5'TGTTGTGCGTTAATCA3' primerleri kullanılarak 915-bç'lik *C. parvum* genomik DNA fragmenti agaroz jelde elde edildi.

Baz dizi analizi: Agaroz jelde rekombinant olduğu tespit edilen koloniler LB broth besiyerinde çoğaltılıp plazmid izolasyonu (Qiagen plasmid minikits) yapıldı. DNA örnekleri Tufts Üniversitesi'ne gönderilerek (Sequencher version 4.1.4) dizi analizleri yapıldı.

BULGULAR

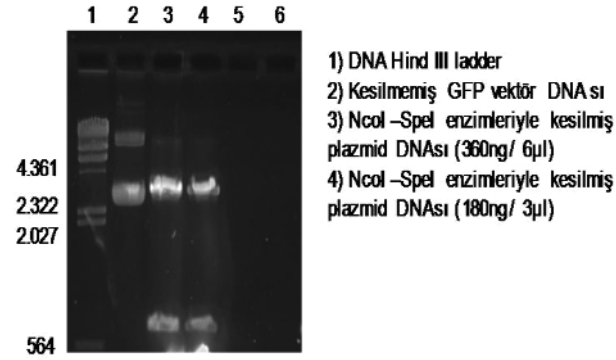
GFP plazmidi *Şekil 1*'de gösterildiği gibi SpeI, NcoI enzimleriyle ayrı ayrı ve birde her iki enzim kullanılarak kesilmiştir. Bunun için 0.4 µl SpeI (10.000 units/ml); 0.4 µl NcoI (10.000 units/ml) enzimleri in 10.0 µl final volüm olacak şekilde ayarlandı.

Kesilmemiş vektör DNA sının miktarı (*Şekil 1*'de 6. Kuyucukta) çok fazla olduğu için kullanılan enzim miktarı arttırılarak [0.8 µl (10.000 units/ml)] *Şekil 2*'deki agaroz jel elde edildi.



Şekil 1. NcoI ve SpeI enzimleriyle kesilmiş GFP vektör DNA'sının agaroz jel görüntüsü

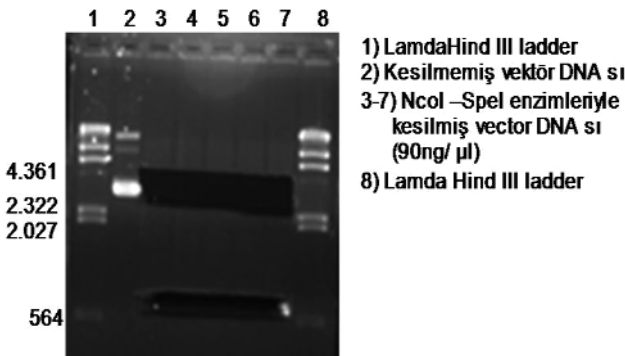
Fig 1. Agorose gel analysis of digested Crypto-construct GFP vector with NcoI and SpeI



Şekil 2. NcoI ve SpeI enzimleriyle kesilmiş GFP vektör DNA'sının agaroz jel görüntüsü

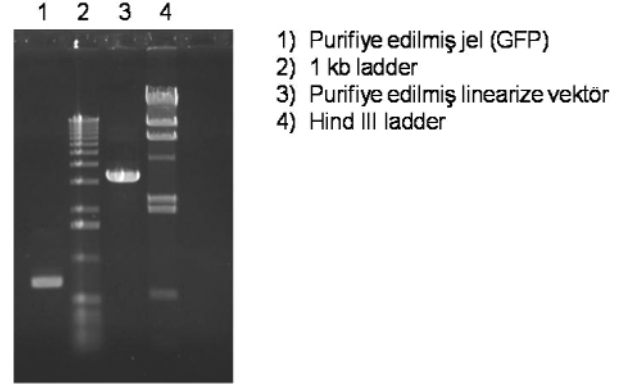
Fig 2. Agorose gel analysis of digested Crypto-construct GFP vector with NcoI and SpeI (0.8 µl 10.000 units/ml)

Vektör DNA'sının tamamen kesildiği koşullar belirlendikten sonra (Şekil 2), aynı koşullar kullanılarak daha yoğun konsantrasyondaki vektör DNA'sı (60 ng/µl 100 µl final volümde) NcoI ve SpeI enzimleriyle kesilmiştir. Elde edilen 700 bç'lik GFP ve 3260 bç'lik linearize edilmiş vektörü taşıyan kısım UV altında kesilmiş ve gelden purifiye edilerek tekrar kazanıldı (Şekil 3 ve 4).



Şekil 3. GFP ve linearize edilmiş vector kısmının agaroz jelden kesilerek ayrılması

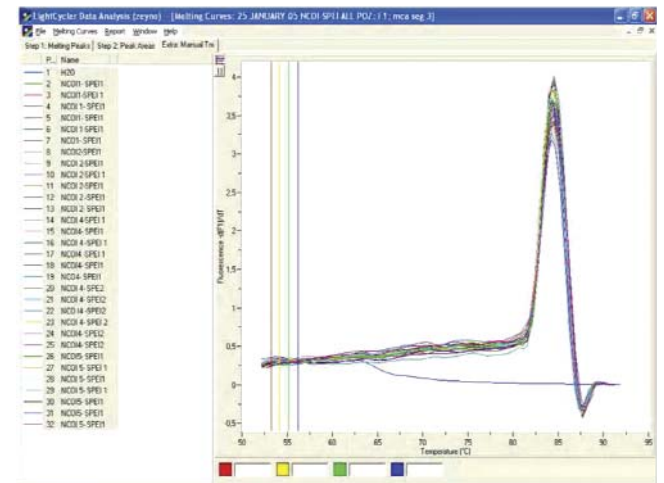
Fig 3. Agorose gel analysis of separated and cut fragment of linearized vector and GFP



Şekil 4. Gelden geri kazanılan GFP ve linearize edilmiş vektör kısımlarının agaroz jele yüklenmesi

Fig 4. Agorose gel analysis of purified GFP and linearized vector from gel

C. parvum genomik DNA'sı S1 ve N2, S2 ve N2, S3 ve N3, S4 ve N4, S5 ve N5 primerleri kullanılarak Real-time PCR cihazında çoğaltıldı (Şekil 5). Çoğaltılan *C. parvum* genomik DNA NcoI ve SpeI enzimleri kullanılarak kesildi (Şekil 6).

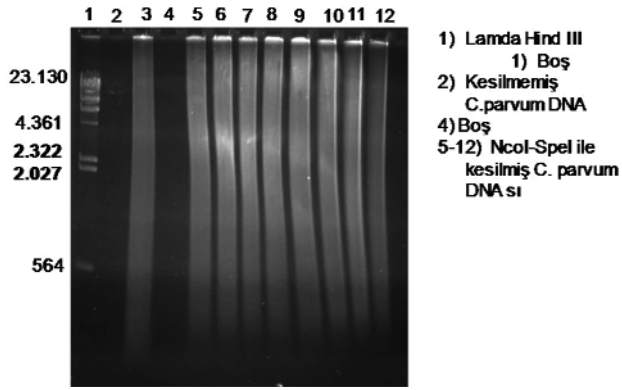


Şekil 5. *C. parvum* genomik DNA'sını Real-time PCR ile çoğaltılması

Fig 5. Melting curve of random genomic fragments of *C. parvum* DNA in real time PCR

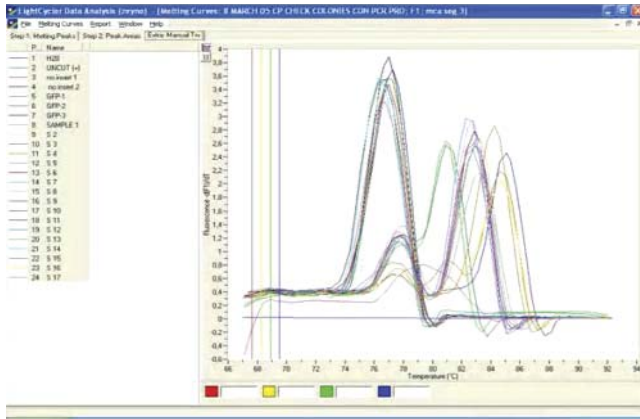
Jelden geri kazanılan *C. parvum* Genomik DNA'sı ve GFP vektör DNA'sı ligasyona maruz bırakılıp, Subcloning Efficiency DH5α kompetent hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildikten sonra rekombinant koloniler Real-time PCR cihazında kontrol edilip (Şekil 7) agaroz jelde (Şekil 8) gösterildi.

Rastgele amplifiye edilen *C. parvum* genomik DNA'sı FatI-XbaI and BspHI- XbaI enzimleriyle kesilmiş (Şekil 9), jelden purifiye edilip GFP vektörüne transformasyonu gerçekleştirildikten sonra seçilen koloniler Real-time PCR cihazında kontrol edildi (Şekil 10 ve 11).



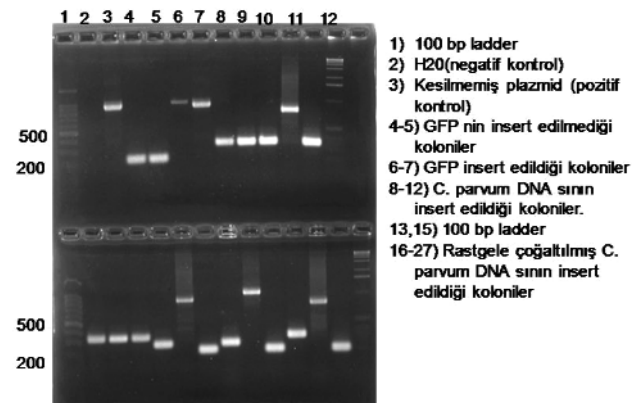
Şekil 6. Çoğaltılan *C. parvum* genomik DNA'sının NcoI ve SpeI ile kesilmesi

Fig 6. Agarose gel analysis of digested randomly amplified *C. parvum* DNA with NcoI and SpeI



Şekil 7. Seçilmiş rekombinant kolonilerin Melting Curve Analizi

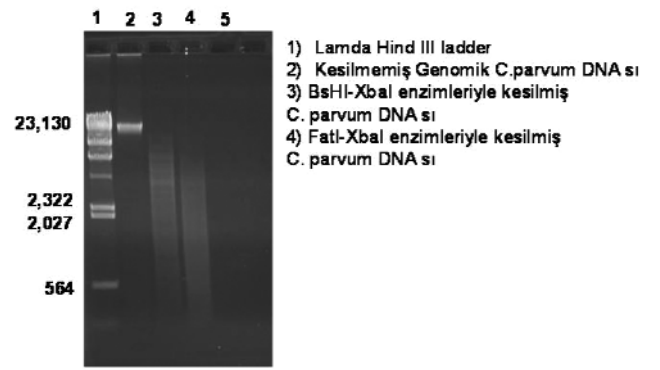
Fig 7. Melting Curve Analysis of randomly selected colonies



Şekil 8. Melting Curve Analizinin agaroz jelde görüntüsü

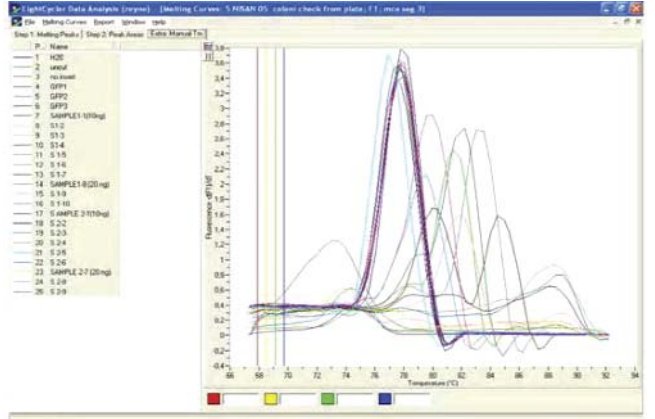
Fig 8. Agarose gel analysis of randomly selected colonies

Cp forward and reverse primerleri 915 bp vektör gen bölgesinden dizayn edilip, vektör dizaynı 5' UTR+GFP +3'UTR şeklindedir. Linearize edilmiş vektör uzunluğunu (5' UTR+3'UTR) temsil eden ampikon yani primerlerin



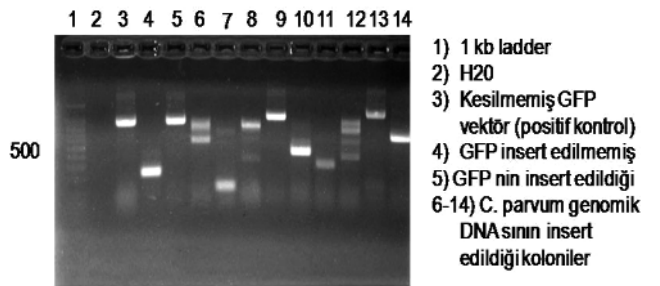
Şekil 9. Çoğaltılan *C. parvum* genomik DNA'sının BspHI- XbaI, FatI-XbaI ile kesilmesi

Fig 9. Agarose gel analysis of digested *C. parvum* DNA with BspHI-XbaI and FatI-XbaI



Şekil 10. Seçilmiş rekombinant kolonilerin Melting Curve Analizi

Fig 10. Melting Curve Analysis of randomly selected colonies



Şekil 11. Melting curve analizinin agaroz jelde görüntüsü

Fig 11. Agarose gel analysis of randomly selected colonies

çoğaltacağı gen bölgesi 215 bp olarak belirlenmiştir. GFP kısmı ise 710 bp olup, dizayn edilen primerlerin bu bölgeyi çoğaltması hedeflendi. *Şekil 8*'de gösterildiği gibi, ikinci kuyucuk negatif kontrol olup herhangi bir band gözlenmemiştir. Üçüncü kuyucuk pozitif kontrol olup hiç kesilmemiş vektör DNA'sının (925 bp) yüklendiği kuyucuğu oluşturmuştur. Dört ve 5. kuyucuklar da pozitif kuyucuklar olup GFP'nin ligasyona dahil edilmediği kuyucuğu

cuklardır (sadece linearize edilmiş vektör-215 bç); 6 ve 7. kuyucuklar da yine pozitif kontroller olup ligasyon işleminin çalışıp çalışmadığını bize göstermiştir (925 bç- GFP nin katıldığı ligasyon). Sekiz-27 kuyucuğa kadar olan kısımda seçilmiş rekombinat kolonilerin incelendiği kuyucukları (bilinmeyen örnek) oluşturdu.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışma ile farklı restrüksiyon enzimleriyle kesilen *C. parvum* genomik DNA'sının GFP (*Aequoria victoria'* dan elde edilen) repoter proteinini taşıyan vektöre transformasyonu gerçekleştirildi.

Apicomplexan grubu parazitlerinden *Plasmodium berghei*, *P. falciparum*, *P. knowlesi* türleri için stabil transformasyon gerçekleştirildi. Bu gen anlatım tekniğiyle parazit protein fonksiyonlarının anlaşılmasında önemli başarılar elde edilmiştir. Bu çalışmayla bakteriyel CAT geninin *P. falciparum'*a stabil transformasyonu gerçekleştirilmiştir ⁶.

Malaria parazitlerinin genetik manüplasyon çalışmaları bu grup parazitlerin aşı ve ilaç endüstrisindeki gelişmelerine olanak sağlamıştır. İlaç dirençliliğini kodlayan geni (dihidrofolat redüktaz timidilat sentez-DHFR-TS) taşıyan vektör ile Malaria parazitlerinin stabil transformasyonları gerçekleştirildi ⁷.

Bu çalışmada kullanılan üç farklı enzim kombinasyonu ile kesilen *C. parvum* genomik DNA'sının ligasyonu ve transformasyonu açısından önemli bir fark gözlenmedi. Elde edilen rekombinat kolonilerin her üç farklı kombinasyon için de benzer sayılar gösterdiği saptandı.

Bu çalışma, antartik fosfataz enzimi kullanılarak ve ayrıca bu enzim kullanılmadan linearize edilmiş plazmid DNA'sı ve GFP kısmı purifiye edildiğinde, bu enzim kullanıldıktan sonra yapılan ligasyon işleminin gerçekleştiğini bize göstermiştir. Enzim sayesinde linearize edilmiş plazmid DNA'sı ve GFP DNA'sındaki 5' fosfat grupları uzaklaştırılmıştır.

Bu işlemden sonra elde edilen linearize edilmiş plazmid DNA'sı ve GFP, *C. parvum* genomik DNA'sı ile ayrı ayrı birleştirilirken, deneyin sağlaması olarak (pozitif kontrol) linearize edilmiş plazmid DNA'sı ve GFP de kendi aralarında ligasyona maruz bırakılmıştır. Rekombinat koloniler seçilip Real-time PCR cihazında incelenmiştir (*Şekil 7* ve *Şekil 8*).

Elde edilen bandlara bakılarak, seçilmiş kolonilerden sadece 11, 20, 23 ve 26. kuyucukların rekombinant koloniler olduğu gözlenmiştir.

Aynı deneyler Fat I-XbaI and BspHI- XbaI enzimleri

için yapıldığında (*Şekil 8, 9, 10*) rekombinant koloniler sadece 8, 10, 12 ve 14. kuyucuklarda gözlenmiştir.

Bu rekombinant kolonilerin (11, 20, 23 ve 26.; 8, 10, 12 ve 14.) doğruluğunu tespit etmek için baz dizi analizleri Tufts Üniversitesinde yapıldı. Gelen sonuçlar CryptoDB and NCBI blast kullanılarak değerlendirildi, elde edilen rekombinat baz dizilerinin AAEE01000006, AAEE01000015, AAEE01000001 kodlarıyla ifade edilen *Cryptosporidium* gen bölgeleriyle benzerlik gösterdiği tespit edildi.

C. parvum genomu sekiz kromozoma sahiptir. Parazitin genomik baz dizileri, parazitin büyüme aşaması, hastalık oluşturma mekanizması, virulansı ve direnç sistemi gibi özelliklerini kodlamış olsa da, bu verilere dayanarak henüz parazitin oluşturduğu hastalığa karşı etkili bir tedavi yöntemi belirlenememiştir ⁸.

Genetik transformasyon bir çok genetik manüplasyon çalışmalarının temelini oluşturmaktadır. Genetik manüplasyon çalışmalarının ilaç endüstrisinin temelini oluşturduğu düşünüldüğünde *C. parvum'*un gen transformasyonu ile oluşturduğu hastalığın tedavisi için gerekli çözümlerin de sağlanacağı düşünülmelidir.

Diğer apikompleksan protozoolarla ilgili genetik manüplasyon çalışmaları *C. parvum'*un transformasyonu için aynı derecede etkili olmamıştır.

*T. gondii'*nin genetik klonlama çalışması yapılarak bu parazitin cDNA kütüphanesi oluşturulmuştur. *T. gondii'*nin genetik klonlama çalışmasının diğer apicomplexan parazitlerin gen klonlama çalışmalarında model olacağı düşünülmektedir ⁹.

*Plasmodium falciparum'*un gen manüplasyon çalışmaları için önemli olan piggyBac transpozisyon sistemi gerçekleştirilmiştir ¹⁰.

Gen manüplasyon çalışmaları genlerin identifikasyonunda ve fonksiyonlarının tanımlanmasında son derece önemlidir. Bu parazitin transformasyonu gerçekleştiğinde birçok bilinmeyen biyokimyasal mekanizmasına ve henüz kesin olmayan ilaç tedavisine çözümler bulunması muhtemeldir. Bu noktada bu çalışma, gelecekte yapılacak *C. parvum* gen transformasyonu çalışmaları için ön aşamayı oluşturması anlamında öneme sahiptir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada *C. parvum* ookistlerini ve gerekli teknik yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Giovanni Widmer (Tufts Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biomedikal Bölümü, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Boston/MA, ABD) ve ekibine teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. **Saygı G:** Temel Tıbbi Parazitoloji. 2. Baskı. s. 94-95, Es-Form Ofset Ltd. Şti, Sivas, 2002.
2. **Tzipori S, Ward H:** Cryptosporidiosis: Biology, pathogenesis and disease. *Microb Infect*, 4, 1047-1058, 2002.
3. **Wei Li, Nan Zhang, Xiaoying Liang, Jianhua Li, Pengtao Gong, Xinyou Yu, Guangpeng Ma, Ryan UM, Xichen Z:** Transient transfection of *Cryptosporidium parvum* using green fluorescent protein (GFP) as a marker. *Mol Biochem Parasitol*, 168 (2): 143-148.
4. **Yu Jae-Ran, Sung-Don Choi, Young-Wook Kim:** *In vitro* infection of *Cryptosporidium parvum* to four different cell lines. *Korean J Parasitol*, 38, 59-64, 2000.
5. **Robertson LJ, Campbell AT, Smith HV:** *In vitro* excystation of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitol*, 106, 13-19, 1993.
6. **Crabb BS, Triglia JG, Waterkeyn JG, Cowman AF:** Stable transgene expression in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 90,131-144, 1997.
7. **Van Dijk MR, Waters AP, Janse CJ:** Stable Transfection of Malaria Parasite Blood Stages. *Science*, 268, 1358-1362, 1995.
8. **Chen L, Xian ming, Keithly JS, Paya CV, Russo LA, Nicholas F:** Cryptosporidiosis. *NEJM*, 346, 1723-1731, 2002.
9. **Boris S, Michael WW, Catherine L, Michael NG, Banoo M, John ML, Chang L, Mitchell SA:** Genetic complementation in apicomplexan parasites. *PNAS*, 99, 6304-6309, 2002.
10. **Bharath B, Douglas AS, Malcolm JF, John HA:** High-efficiency transformation of *Plasmodium falciparum* by the lepidopteran transposable element piggyBac. *PNAS*, 102, 16391-16396, 2005.