

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

“QUORUM SENSİNG”İN *ESCHERİCİA COLI*’DE ANTİMİKROBİYAL  
DİRENCİNDEN SORUMLU MUTASYONLARIN OLUŞUMUNDAKİ ROLÜNÜN  
ARAŞTIRILMASI

Aslımur Gülnaz ÖZTÜRK

Danışman Öğretim Üyesi  
Yrd. Doç. Dr. Evren Doruk ENGİN

ANKARA

2014

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Aslınur Gülnaz ÖZTÜRK

## ONAY SAYFASI

**Yrd. Doç. Dr. Evren Doruk ENGİN** danışmanlığında, Aslınur Gülnaz ÖZTÜRK tarafından hazırlanan bu çalışma, / /2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'** nda **yüksek lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU      İmza :

Üye : Doç. Dr. Demet Cansaran DUMAN      İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. E. Doruk ENGİN      İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Ankara Üniversitesi – Biyoteknoloji Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

### “QUORUM SENSING”İN *ESCHERICHIA COLI*’DE ANTİMİKROBİYAL DİRENCİNDEN SORUMLU MUTASYONLARIN OLUŞUMUNDAKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Aslınur Gülnaz ÖZTÜRK

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Evren Doruk ENGİN

Bakterilerde antibiyotik direnci hem tıbbi açıdan ciddi bir sorun teşkil etmekte, hem de biyoteknoloji alanında dikkatleri üzerine çekmektedir. Bakteriler antibiyotiklere antibiyotiğin kimyasal yapısını bozacak enzimler üreterek, hücreye giren antibiyotikleri hücre dışına çıkararak ve stratejik nokta mutasyonları oluşturup antimikrobiyallerin işleyiş mekanizmalarını engelleyerek direnebilmektedir. Günümüzde kullanılan antibiyotikler bakteriyel enfeksiyonların tedavilerinde yeterli olamamakta ve bakterilerin çoklu ilaç direnci geliştirmelerine neden olmaktadır. Bu nedenle bakterilerin antibiyotik direncini sınırlandırabilmek için biyoteknoloji alanında alternatif yöntemler düşünülmektedir. “Quorum sensing”, bakteri hücrelerinin hücreye nüfuz edebilen otoindükleyici (Oİ) adlı küçük sinyal molekülleriyle gerçekleştirdikleri iletişim mekanizmasıdır. Bu mekanizmanın bakterilerin popülasyon yoğunluğu, biyofilm oluşturma ve çeşitli sekonder metabolitler oluşturma gibi aktivitelerinin düzenlenmesinde rol aldığı bilinmektedir. Bakterilerin antimikrobiyal direnç geliştirmesi, gerekli mutasyonları geçirebilecek bakterinin kendi metabolik aktivitelerini azaltarak dış dünyayla alışverişini sınırlayıp antimikrobiyallerin zararlı etkilerinden korunaklı hale gelmesiyle mümkün olmaktadır. Bu tez kapsamında, *Escherichia coli*’de “quorum sensing” mekanizmasının antimikrobiyal stresi altındaki bakteride dirençli fenotipe geçişteki etkisi, *E. coli* suşlarından “quorum sensing” molekülü S-adenozil homosistein (SAH) üretebilen JM109 ve SAH üretemeyen DH5α *AluxS* kullanılarak incelenmiştir. JM109 ve DH5α *AluxS* suşları Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) testi ile artan değerlerde siprofloksasine maruz bırakılıp *gyrA* ve *parC* genlerinde nokta mutasyonların oluşumu tetiklenerek incelenmiştir. JM109 suşunun antimikrobiyal stresi altında daha hızlı nokta mutasyonu yapabildiği gözlemi üzerine “quorum sensing” mekanizmasının antimikrobiyal direnci kazanımındaki rolü, otoindükleyici-2 (Oİ-2) ifadenmesi ve düzenlenmesinden sorumlu *luxS*’in DH5α *AluxS* suşuna klonlamayla komplementasyon yapılarak bu izogenik mutantın antimikrobiyal stresi altında dirençli fenotipe geçiş davranışı incelenmiştir. Oluşturulan mutant suşların Oİ-2 üretebilme kapasitesi *Photobacterium phosphoreum* suşundaki biyoluminesansın baz alındığı biyolojik tayin yöntemiyle de gösterilmiştir. *luxS* komplementasyonu sonucu mutant DH5α’nın kontrol suşlara göre yüksek dozda siprofloksasin maruziyetinde daha fazla koloni oluşturmaya, “quorum sensing”in bakterilerde antimikrobiyal stres altında persistan fenotipe geçişte önemli rol oynadığını fizyolojik olarak göstermiştir.

2014, 88 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Quorum sensing, otoindükleyici 2, antibiyotik direnci.

## ABSTRACT

Ankara University – Biotechnology Institute

Master's Thesis

### INVESTIGATION OF THE ROLE OF QUORUM SENSING IN THE DEVELOPMENT OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE MUTATIONS IN *ESCHERICHIA COLI*

Aslınur Gülnaz ÖZTÜRK

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Evren Doruk ENGİN

Antibiotic resistance in bacteria is a serious problem in medical area that biotechnology is focusing on lately. Bacteria can show resistance against antimicrobials by secreting enzymes that can destroy the chemical structure of the antibiotics, exporting the antibiotics from the cell before they reach the active sites and generating point mutations in certain genes. Antibiotics that are used widely nowadays are found to be inefficient in the treatment of bacterial infections and also causing certain bacteria to develop multi drug resistance. Therefore it is crucial to develop alternative methods in the biotechnology field in order to control the antibiotic resistance in bacteria. Quorum sensing is a communication mechanism in bacteria that is carried out with small diffusible signal molecules. This mechanism that takes advantage of these molecules with low molecular weight is known to regulate many metabolic activities such as bacterial population density, biofilm formation and production of many secondary metabolites. In this thesis, the role of quorum sensing in inducing the persistent phenotype that can develop antimicrobial resistance in *Escherichia coli* was investigated by using JM109 that can express autoinducer (AI) molecule S-adenosyl homocysteine (SAH) and DH5 $\alpha$  DH5 $\alpha$  which is defective of *luxS* gene. JM109 and DH5 $\alpha$  DH5 $\alpha$   $\Delta luxS$  strains were exposed to ciprofloxacin via Minimum Inhibitory Concentration (MIC) test and mutations in *gyrA* and *parC* genes were induced. The ability of JM109 strain to develop these mutations quicker than DH5 $\alpha$  DH5 $\alpha$   $\Delta luxS$  strain JM109 led us to a conclusion that quorum sensing had a regulatory role on the emergence of persistent strains that can develop antibiotic resistance quickly. Therefore, we cloned *luxS* gene which is responsible of expression and the regulation of AI-2 molecule to DH5 $\alpha$  DH5 $\alpha$   $\Delta luxS$  strain and observed its transition from ordinary phenotype to persistent phenotype that can develop corresponding mutations quickly under antimicrobial pressure by exposing this isogenic mutant to ciprofloxacin antibiotic. Moreover, mutant strains were cultured in Luria Bertaini (LB) medium and their supernatants were investigated to detect the presence of AI molecules by *Photobacterium phosphoreum* bioluminescence. The ability of the mutant DH5 $\alpha$  to produce more colonies under high ciprofloxacin concentration indicates that quorum sensing has an important regulatory role in *E. coli* during the transition to persistent phenotype under antimicrobial stress.

2014, 88 pages

**Key Words:** Quorum sensing, autoinducer 2, antibiotic resistance.

## TEŞEKKÜR

Bana yüksek lisans yapmam için bir şans verip mikrobiyolojiye adım atmamı sağlayan ve beni en iyi şekilde yetiştiren, akademik dünyaya giriş yapmama önayak olup bana her türlü desteği sağlayan, bana her zaman sabırla ve mizahla yaklaşan, onun öğrencisi olmaktan dolayı kendimi şanslı hissettiğim, hakkını asla ödeyemeyeceğim değerli hocam Yrd. Doç. Evren Doruk ENGİN'e,

Benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen ve yol gösterici olan değerli hocam Prof. Dr. Ali ERGÜL'e,

Sadece yüksek lisans sırasında değil, yıllar boyu her zaman yanımda olup sevincimi artırıp üzüntümü azaltan mükemmel dostlarım Deniz UĞURLU ve Hikmet Taner TEKER'e,

Laboratuvarda çalışmaya başladığım ilk günden beri beni kanatları altına alan ve bana çok şey öğreten Dr. Beycan AYHAN'a,

Biyoteknoloji Enstitüsü bünyesinde benim gibi yüksek lisans yapan başta grup arkadaşlarım olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarına ve enstitümüzün değerli çalışanlarına,

Bir evladın sahip olabileceğin en mükemmel aile üyeleri olan, benden hiçbir desteği esirgemeyen ve bana inanan, beni her daim sevgiye boğan, fedakarlık timsali sevgili babam Prof. Dr. Mustafa Kemal YALINKILIÇ'a, sevgili annem Sema YALINKILIÇ'a, biricik kardeşim Halil YALINKILIÇ'a ve dünyanın en mükemmel köpeği Tarçın'a,

Bana ikinci bir aile olup her zaman yanımda olan, desteklerini eksik etmeyen Galip ÖZTÜRK'e, Nimet ÖZTÜRK'e, Buket ÖZTÜRK'e ve Elifnur ÖZTÜRK'e,

Ve, teşekkür etmeye asla sayfaların yetmeyeceği, beni maceradan maceralara sürükleyip her daim gülümseten biricik eşim İbrahim Kutay ÖZTÜRK'e teşekkürü borç bilirim.

Aslınur Gülnaz ÖZTÜRK

Ankara 2014

## İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN.....	ii
ONAY SAYFASI.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
SİMGELER DİZİNİ.....	xii
1 GİRİŞ.....	1
2 KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1 Eschericia coli'de Antibiyotik Direnç Mekanizmaları.....	4
2.1.1 Antimikrobiyaller ve Etki Mekanizmaları.....	4
2.1.2 Direnç Mekanizması Olarak Antibiyotik Parçalayıcı Enzimler.....	11
2.1.3 Direnç Mekanizması Olarak Dışarı Akış Pompaları.....	13
2.1.4 Direnç Mekanizması Olarak Stratejik Mutasyonlar.....	16
2.1.5 Escherichia coli'de Çoklu İlaç Direnci.....	17
2.1.6 Eschericia coli'de “Quorum Sensing”.....	19
2.1.7 Klonlama Vektörleri ve Bu Vektörlerin Seçimi.....	25
2.1.8 Kopya sayısı ve Antibiyotik Direnç Kasedi.....	26
3 AMAÇ VE GEREKÇE.....	27
4 MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
4.1 Escherichia coli Kültürlerinin Hazırlanması ve Stoklanması.....	29
4.2 Öldürücü Düzeyin Altında Siprofloksasin Maruziyeti ile Kinolon Dirençli gyrA ve parC Mutantlarının Seçimi.....	31
4.2.1 Minimum İnhibitör Konsantrasyon Deneyi.....	31
4.2.2 gyrA ve parC Dizi Analizi.....	32
4.3 Nükeik Asit İzolasyonu, Saflaştırması ve Spektrofometrik Ölçüm.....	34
4.4 Agaroz Jel Elektroforez.....	37
4.5 Klonlama ve Transformasyon.....	39
4.5.1 luxS Komplementasyonu.....	40
4.5.2 Escherichia coli DH5 $\alpha$ Hücrelerinin Plazmit DNA'sı ile Transformasyonu.....	44
4.6 JM109, DH5 $\alpha$ $\Delta$ luxS, DH5 $\alpha$ pACYC184/luxS+ ve DH5 $\alpha$ pACYC184 Suşlarının Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi.....	46
4.7 Biyoışım (Biyoluminesans) Ölçümü.....	47
4.8 Siprofloksasin Maruziyetinde Sağ Kalan Hücre Sayısı Belirlenmesi.....	48
5 ARAŞTIRMA BULGULARI.....	49
5.1 luxS Geni Klonlaması ve Doğrulaması.....	49
5.2 Buyyon Mikrodilüsyon Deneyiyle Escherichia coli JM109 ve DH5 $\alpha$ Suşlarının Siprofloksasin Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	52
5.3 gyrA ve parC Dizi Analizleri.....	53
5.4 JM109 ile DH5 $\alpha$ $\Delta$ luxS Suşlarının ve DH5 $\alpha$ pACYC184/luxS+ ile DH5 $\alpha$ pACYC184 Mutantlarının Çoğalma Hızı Tespiti.....	61
5.5 Biyoışım (Biyoluminesans) Ölçümü.....	62
5.6 Kısa Süreli Siprofloksasin Maruziyeti Sonrası Üreyebilir Durumdaki Hücre Sayısı Belirlenmesi.....	63
6 TARTIŞMA VE SONUÇ.....	64
7 KAYNAKLAR.....	72
EK 1 – Tez deneylerinde kullanılan kimyasal malzemeler.....	82
EK 2 – Tez deneylerinde kullanılan enzimler ve kitler.....	85
EK 3 – Tez deneylerinde kullanılan laboratuvar cihaz ve gereçleri.....	86

EK 4 – JM109 ve DH5 $\alpha$ $\Delta$ luxS ve K12 suşlarının subletal dozda siprofloksasin maruziyeti sonrası sekans analizleri.....	88
8 ÖZGEÇMİŞ.....	90
9 TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....	91



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Yaygın olarak kullanılan Makrolid ve Linkozamidlerin moleküler yapıları <sup>21</sup> .....	7
Şekil 2. 2. Oksazolidinon antibiyotiklerinden linezolid moleküler yapısı <sup>13</sup> .....	8
Şekil 2. 3. Tetrasiklin molekül yapısı <sup>36</sup> .....	10
Şekil 2. 4. Beta laktamaz enziminin beta laktam halkasını parçalayıp antibiyotiği etkisiz hale getirmesi reaksiyonu <sup>13</sup> .....	11
Şekil 2. 5. <i>Escherichia coli</i> 'de RND dışarı akış pompası <sup>42</sup> .....	14
Şekil 2. 6. Bakteride çoklu ilaç direncinin belirlenmesinde kullanılan antibiyotik sınıfları.....	18
Şekil 2. 7. Açıl homoserin lakton moleküler yapısı.....	20
Şekil 2. 8. <i>Vibrio fishceri</i> LuxIR tipi “quorum sensing” mekanizmasının şematik anlatımı.....	20
Şekil 2. 9. <i>Escherichia coli</i> 'de “quorum sensing” mekanizması.....	22
Şekil 2. 10. Doğada bulunan ve laboratuarlarda kullanılan <i>Escherichia coli</i> suşlarının ve yakın akrabalık gösteren <i>Shigella</i> türlerinin lsr operonlarında bulunan ve bulunmayan “quorum sensing” genleri <sup>73</sup> .....	23
Şekil 4. 1. Lambda DNA/HindIII moleküler markör.....	38
Şekil 5. 1. 1, 2, 3 <i>luxS</i> amplifiye ürünleri. %2'lik TBE Agaroz jel.....	49
Şekil 5. 2. 1, 2, 3 pACYC184Δtet amplifiye ürünleri. %0,8'lik TAE Agaroz jel.....	50
Şekil 5. 3. HindIII kesimi sonrası birbirinden ayrılan <i>luxS</i> ve pACYC184Δtet plazmitlerinin görüntüsü. %2'lik TAE Agaroz jel.....	51
Şekil 5. 4. JM109, DH5α Δ <i>luxS</i> ve K12 suşlarının mutant seçimi deneyi boyunca subletal doz siprofloksasin konsantrasyon değerlerinin basamaklı olarak yükselmesi.....	52
Şekil 5. 6. 1., 2., 3. ve 4, kuyular sırasıyla subletal dozda siprofloksasin maruziyeti sonrası <i>gyrA</i> dizisi çoğaltılan JM109, DH5α Δ <i>luxS</i> , BL21 ve K12 suşlarını, 5., 6., 7. ve 8. kuyular sırasıyla subletal dozda siprofloksasin maruziyeti sonrası <i>parC</i> dizisi çoğaltılan JM109, DH5α Δ <i>luxS</i> , BL21 ve K12 suşlarının dizi analizi için saflaştırma sonrası bantlarını göstermektedir. %2'lik TBE Agaroz jel.....	53
Şekil 5. 7. BLAST algoritması kullanılarak yapılan JM109 suşunun subletal doz siprofloksasin ile mutant seçimi deneyi sonrası çoğaltılan <i>gyrA</i> dizisi ve aynı suşun test öncesi <i>gyrA</i> dizi hizalaması.....	54
Şekil 5. 8. BLAST algoritması kullanılarak yapılan DH5α Δ <i>luxS</i> suşunu subletal doz siprofloksasin ile mutant seçimi deneyi sonrası çoğaltılan <i>gyrA</i> dizisi ve aynı suşun test öncesi <i>gyrA</i> dizi hizalaması.....	55
Şekil 5. 9. BLAST algoritması kullanılarak yapılan K12 suşunu subletal doz siprofloksasin ile mutant seçimi deneyi sonrası çoğaltılan <i>gyrA</i> dizisi ve aynı suşun test öncesi <i>gyrA</i> dizi hizalaması.....	56
Şekil 5. 13. JM109, DH5α Δ <i>luxS</i> , DH5α pACYC184/ <i>luxS</i> <sup>+</sup> ve DH5α pACYC184 suşlarının gece boyu inokülasyon sonrası oluşturdukları biyokütlenin 600 nm dalgaboyunda spektrofotometrik yöntem ile bulanıklık ölçümü ile saptanması.....	58
Şekil 5. 14. <i>Escherichia coli</i> DH5α pACYC184/ <i>luxS</i> <sup>+</sup> ve DH5α pACYC184 kültür üst fazı organik özütlüğünün <i>Escherichia coli</i> DH5α Δ <i>luxS</i> hücrelerine göre <i>Photobacterium phosphoreum</i> hücrelerinde indüklediği biyoışıma oranları.....	59
Şekil 5. 15. JM109, DH5α Δ <i>luxS</i> , DH5α pACYC184/ <i>luxS</i> <sup>+</sup> ve DH5α pACYC184 suşlarının 4 µg/ml siprofloksasin varlığında oluşturdukları koloni sayıları.....	60

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Biyoteknolojide sıklıkla kullanılan bazı plazmitler, replikasyon orijinleri ve kopya sayıları.....	26
Çizelge 4. 1. LB katı besiyeri.....	29
Çizelge 4. 2. LB buyyon besiyeri.....	30
Çizelge 4. 3. %30 Gliserollü LB buyyon besiyeri.....	30
Çizelge 4. 5. SOC buyyon besiyeri.....	31
Çizelge 4. 6. DTCS PCR protokolü.....	33
Çizelge 4. 7. <i>gyrA</i> ve <i>parC</i> ileri ve geri primerler.....	33
Çizelge 4. 8. DTCS çöktürme süspansiyonu.....	33
Çizelge 4. 9. Alkalen lizis I çözeltisinin içeriği.....	35
Çizelge 4. 10. Alkalen lizis II çözeltisinin içeriği.....	35
Çizelge 4. 11. Alkalen lizis III çözeltisinin içeriği.....	35
Çizelge 4. 12. Guanidin bazlı saflaştırma tamponu.....	36
Çizelge 4. 13. 5X TBE tampon içeriği.....	38
Çizelge 4. 14. 50X TAE tampon içeriği.....	38
Çizelge 4. 15. <i>luxS</i> komplementasyon, vektör çoğaltma ve kontrol primerlerinin dizileri ve bağlanma sıcaklıkları.....	41
Çizelge 4. 16. PCR Protokolü. H <sub>2</sub> O ve PCR Tamponu dışındaki malzemeler optimizasyon gereği değişik konsantrasyonlarda kullanılmıştır.....	42
Çizelge 4. 17. PCR Sıcaklık döngüsü.....	42
Çizelge 4. 18. Restriksiyon Enzim ile kesim reaksiyonu. Tez çalışmasında HindIII kesim enzimi kullanılmıştır. DNA olarak vektör ve <i>luxS</i> dizileri ayrı ayrı reaksiyonlar halinde kurulup kesim yapılmıştır.....	42
Çizelge 4. 19. Karides alkalen fosfataz ile vektörün defosforilasyon reaksiyonu.....	43
Çizelge 4. 20. Ligasyon Reaksiyonu. PACYC184Δtet vektörünün ve amplifiye <i>luxS</i> dizisinin molariteleri $\mu\text{g DNA} \times \text{pmol}/660\text{pg} \times 106\text{pg}/1\mu\text{g} \times 1/\text{N} = \text{pmol DNA}$ formülüne göre hesaplanmıştır. N nükleotid sayısıdır ve 660pg/pmol bir nükleotid çiftinin ortalama ağırlığıdır.....	43
Çizelge 4. 21. TSS İçeriği.....	44
Çizelge 4. 22. SOC Buyyon besiyeri içeriği.....	45
Çizelge 5. 1. <i>gyrA</i> ve <i>parC</i> genlerinin M109, DH5α <i>AluxS</i> ve K12 suşları için subletal doz siprofloksasin ile mutant seçimi deneyi sonrası dizi hizalamasında bulunan baz mutasyonları ve delesyonlar.....	57

## SİMGELER DİZİNİ

-f	İleri primer
-r	Geri primer
A	Adenin
ADP	Adenozin difosfat
APS	Amonyum persülfat
ATP	Adenozin trifosfat
ATPaz	ATP parçalayıcı enzim
bç	Baz çifti
C	Sitozin
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
cDNA	Komplementer DNA
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNaz	DNA parçalayıcı enzim
dNTP	Deoksiribonükleotit
DTCS	Dye Terminator Cycle Sequencing
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
G	Guanin
g	Gram
H <sub>2</sub> O	Su
KCl	Potasyum klorür
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potasyum fosfat
l	Litre
LB	Luria Bertani besiyeri (Luria's Broth)
M	Molarite
mg	Miligram
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
MgSO <sub>4</sub>	Magnezyum sülfat
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı RNA
N	Normalite
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sodyum fosfat
NaCl	Sodyum klorür
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NaOH	Sodyum hidroksit
°C	Santigrad derece
OD	Optik yoğunluk (density)
PBS	Fosfat tamponlayıcı tuz (buffered saline)
PCR / PZT	Polimeraz zincirleme (chain) tepkimesi (reaction)
PEG	Polietilenglikol
pH	Hidrojenin gücü-asitlik (Power of hydrogen)

pmol	Pikomol
RNA	Ribonükleik asit
RNaz	RNA parçalayıcı enzim
s	Saniye
SAP	Karides (shrimp) alkalın fosfataz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SOC	Katabolit baskılayıcı SOB
T	Timin
TAE	Tris-Asetik asit-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borik asit- EDTA
TEMED	Tetrametiletilediamin
TSS	Transformasyon çözeltisi
U/u	Ünite
UV	Ultraviyole
V	Volt
%	Yüzde
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
G	Göreceli santrifüj kuvveti / ivmesi
[x]	X konsantrasyonu

# 1 GİRİŞ

Bakterilerde antibiyotik direnci hem tıbbi açıdan ciddi bir sorun teşkil etmekte, hem de biyoteknoloji alanında son zamanlarda dikkatleri üzerine çekmektedir. Bakteriler antibiyotiklere karşı antibiyotiğin kimyasal yapısını bozacak enzimler üreterek, hücreye giren antibiyotikleri henüz aktif bölgelere ulaşmadan hücre dışına çıkararak ve stratejik noktalarda mutasyonlar oluşturup antimikrobiaların işleyiş mekanizmalarının önüne geçerek gerçekleştirebilmektedir<sup>1</sup>. Günümüzde kullanılan çeşitli antibiyotikler bakteri kaynaklı enfeksiyonların tedavilerinde yeterli olamamakta ve bu bakterilerin çoklu ilaç direnci geliştirmelerine neden olmaktadır<sup>2</sup>. Hatta kısa bir süre içinde günümüzde kullanılmakta olan antimikrobiaların birçok mikroorganizmaya karşı etkisiz kalacağı ve antimikrobialarda bilinen grupları türevlendirme yönteminin işlevsiz bir yöntem haline geleceği düşünülmektedir<sup>3</sup>. Bu nedenle bakterilerde antibiyotik direncini kontrol altına alabilmek için biyoteknolojik alanda alternatif yöntemler düşünülmektedir.

Bakteriler “quorum sensing” adı verilen haberleşme mekanizması sayesinde popülasyon yoğunluğu ve etraftaki diğer organizmaların varlığına göre belirli gen ifadelerini düzenlemekte, çoğalma, antimikrobiyal oluşturma, sporlanma, biyofilm oluşturma gibi yaşamsal faaliyetlerini denetlemekte ve en iyi şekilde hayatta kalabilmeye çalışmaktadır<sup>4-6</sup>. Önemli yaşamsal faaliyetlerin bu mekanizma tarafından kontrol ediliyor oluşu “quorum sensing” mekanizmasının bakterilerde antibiyotik direncini kontrol edebiliyor olacağı fikrini oluşturmuştur<sup>4</sup>. Bu noktadan yola çıkılarak “quorum sensing” mekanizmasının kontrolüyle bakteride antibiyotik direnci kontrolünün de sağlanabileceği düşünülmüştür.

Genel olarak “quorum sensing” mekanizmasının çalışma prensibi otoindükleyici adlı düşük ağırlıklı moleküllerin salgılanması, bu moleküllerin aktif veya pasif şekilde bakteriyel hücre dışına salgılanması ve böylece hücre dışı ortamda otoindükleyici moleküllerin belirli bir konsantrasyona erişmesi ve bu moleküllerin belirli reseptörlere bağlanıp çeşitli yollarla harekete geçirmesi silsilesiyle açıklanabilir<sup>5,7,8</sup>. Gram negatif bakterilerin “quorum sensing” yolağında ağırlıklı olarak kullanılan otoindükleyiciler molekül acyl homoserine lactone (AHL) adlı moleküllerdir ve homoserine lactone'a bağlanmış 4-18 karbonlu acyl zincirli yapıdadır. *Escherichia coli*'nin “quorum sensing” mekanizmasında kullanılan otoindükleyici ise furanozil borat diester adlı otoindükleyici iki moleküldür<sup>6</sup>. *E. coli*'de üretilen otoindükleyici 2 molekülü *luxS* tarafından kodlanır ve hücre dışına salgılanır, hücre dışında belli bir eşik konsantrasyona ulaşan OI-2 molekülü bakteriyel

periplazmik protein LsrB'ye bağlanır, alıcı hücreler tarafından algılandıktan sonra hücre içine alınıp lsrK enzimi tarafından fosforile edilir, fosforile OI-2 lsr operonunun negatif regülatörü olan LsrR'yi baskılayarak lsr operonunu harekete geçirir<sup>8,9</sup>. Lsr operonu üzerinde bulunan genler ABC taşıyıcı proteinlerini harekete geçirip OI-2 moleküllerinin hücre içine alınmasını sürekli hale getirir ve hücre içinde OI-2 moleküllerinin gerekli işlemlerden geçirilmesini sağlar, modifiye edilen otoindükleyici 2 molekülü çeşitli genlerin çalışmasını tetikleyerek veya bazı genlerin çalışmalarını durdurarak aktivite gösterir<sup>5,7,10</sup>.

“Quorum sensing” mekanizmasının bloke edilmesi “quorum quenching” olarak bilinmektedir, ve bakterilerde virülans faktörü oluşumunun “quorum sensing” aracılı bir durum olması ve “quorum sensing” mekanizmasının modülasyonu yoluyla mikroorganizmayı öldürmek yerine virülans göstermesinin engellenmesi klasik antimikrobiyal tedavilerine iyi bir alternatif olabilir<sup>11</sup>. “Quorum sensing” mekanizmasının kontrol altına alınması için çeşitli yöntemler geliştirilmesi ve bu yöntemlerle bakteride antibiyotik direnci kontrolü biyoteknolojik açıdan büyük önem taşımaktadır. Bu yöntemle bakteri çoğalma kinetiklerinden bağımsız olarak virülans fenotipinin ortaya çıkışının engellenip uzun vadede bakteriyel enfeksiyonların tedavi maliyetlerini ve sürelerini azaltmak hedeflenmektedir.

“Quorum sensing” yoluyla bakterilerde birçok hayatsal faaliyetin kontrolünün gerçekleştirilebileceği literatürde gösterilmiş olsa da “quorum sensing” ve antibiyotik etkisinin ilişkilendirildiği deneysel çalışmalar yeterince bulunmamaktadır<sup>10,11</sup>. Literatürde şimdiye kadar yapılan çalışmalar “quorum sensing” mekanizmasının çeşitli bakterilerde derinlemesine araştırılması ve bu mekanizmanın ne gibi yaşamsal faaliyetleri kontrol ettiğinin ortaya çıkarılması üzerine olmuştur, fakat “quorum sensing” mekanizmasının, seçici baskı altındaki bakteride oluşan mutasyonlar üzerindeki rolü ile ilgili çalışmalar bulunmamaktadır. Bu anlamda, “quorum sensing”in bakteride antimikrobiyal seçici baskısı altında bulunmanın mutasyon hızında etkili olduğunun tespiti aynı zamanda bu mekanizmanın bakterideki antimikrobiyal direncinde büyük rol oynadığının göstergesi olacaktır. Bu nedenle bu çalışmanın bakteriyel antibiyotik direnç kontrolüne farklı bir bakış açısı getireceği düşünülmektedir.

Patojenik bakterilerle mücadelenin klasik antibiyotiklerle daha fazla devam edemeyeceği artık anlaşılmıştır, bu nedenle antimikrobiyallere alternatif seçeneklerin geliştirilmesi ve bakteriyel

enfeksiyonların tedavilerinde bir an önce kullanılabilir hale getirilmesi gerekmektedir. Bu kapsamda bakterileri, antimikrobiyalere karşı gösterdikleri kadar hızlı bir şekilde direnç gösteremeyecekleri yöntemlerle alt etmek gerekmektedir, bunun için gelecekte patojenik bakterilerle savaşta “quorum quenching” yöntemlerinden yararlanılması oldukça umut verici olacaktır<sup>7</sup>. Quorum sensing mekanizmasının bakteri virülansını büyük ölçüde kontrol ettiği bilinmektedir, bu nedenle “quorum sensing” mekanizması için çeşitli inhibitörler geliştirilmesi biyofilm oluşumunda, bakteri çoğalma hızında ve dolayısıyla virülans kontrolünde oldukça etkili olacaktır<sup>5,10</sup>.

## 2 KURAMSAL TEMELLER

### 2.1 *Eschericia coli*'de Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

#### 2.1.1 Antimikrobiyaller ve Etki Mekanizmaları

Antibiyotik, diğler adıyla antibakteriyel ilk olarak 1942 yılında "bakterilerin veya başka mikroorganizmaların üremelerini ve metabolik aktivitelerini durdurabilen mikrobiyal kökenli kimyasal madde" olarak tanımlanmıştır<sup>12</sup>. Hastalık kaynağı bakterileri öldürmek veya üremelerini engellemek için üretilen veya elde edilen antibiyotikler penisilin ve sülfonamidin hayatımıza girdiğı 1940'lı yıllardan beri yaygın bir şekilde kullanılmakta ve geliştirilmektedir<sup>12,13</sup>. Günümüzdeki antibiyotiklerin bir kısmı doğal olarak elde edilirken bir kısmı kimyasal reaksiyonlar sonucu elde edilmektedir<sup>13,14</sup>. Antibiyotiklerin en genel sınıflandırılması bakterisidaller ve bakteriyostatikler olarak yapılmaktadır<sup>13,15</sup>. Bakterisidal antibiyotikler bakterileri öldürmek için kullanılır ve temizlik ve laboratuarlarda kullanılan dezenfektan ve antiseptik gibi maddeler de bakterisidal olarak bilinirler<sup>15</sup>. Buna karşılık bakteriyostatikler bakterileri öldürmeyip sadece çoğalmalarına engel olurlar<sup>15</sup>. Bu iki sınıf altında antibiyotiklerin gruplandırılması etki mekanizmalarına, kimyasal yapılarına veya aktivite spektrumuna göre yapılmaktadır<sup>13</sup>.

**Aminoglikozidler:** Aminoglikozidler modifiye amino grubu içeren şeker molekülleridir<sup>13</sup>. Yaygın olarak kullanılan aminoglikozidler arasında amikasin, kanamisin, paromomisin, streptomisin, neomisin, gentamisin gibi antibiyotikler bulunmaktadır<sup>13</sup>. Aminoglikozidlerin bakterilerin protein sentez mekanizmasını 30S bakteriyel ribozoma tersinmez şekilde bağlanarak sekteye uğrattığı bilinmekle birlikte bakterinin transkripsiyon ve translasyon mekanizmalarına müdahale ettiği, ayrıca bakteri hücre duvarının stabilitesini bozduğu gösterilmiştir<sup>13,16</sup>. Aminoglikozidler kullanılan dozaja göre bakterisidal veya bakteriyostatik olarak rol oynamaktadır<sup>16</sup>.

**Ansamisinler:** Ansamisinler antimikrobiyal özellik gösteren sekonder metabolitlerdir ve bazı bakteriyofajlara karşı da antiviral özellik gösterdiği bilinmektedir<sup>17</sup>. Yaygın olarak kullanılan ansamisinler streptovarisin ve rifamisinlerdir<sup>17</sup>. Ansamisinlerin bakteriyel RNA polimeraza bağlanma eğilimlerinin büyük oluşu bakteriyel DNA sentezini olumsuz etkilemektedir, fakat bu bağlanmanın RNA sentezinin başlangıcından önce gerçekleşmesi gerekmektedir çünkü ansamisinler



başlamış RNA sentezine engel olamazlar<sup>17,18</sup>. Ansamisinler lepra ve tüberküloz hastalıklarının tedavilerinde kullanılmaktadır<sup>18</sup>.

**Karbapenemler:** Karbapenemler geniş spektrumlu etkiye sahip olan beta laktam antibiyotiklerdir ve birçok bakteriyel kaynaklı hastalığın tedavisinde son çare antibiyotik olarak kullanılmaktadır<sup>19</sup>. Beta laktam antibiyotikleri yapılarında beta laktam halkası içeren moleküler yapı gösterirler<sup>13</sup>. Karbapenemler bakterinin hücre duvarı sentez mekanizmasını engelleyerek bakteri çoğalmasına müdahale eder<sup>19</sup>. Yaygın olarak kullanılan karbapenemler imipenem, meropenem, doripenem ve biapenem gibi antibiyotiklerdir<sup>13,19</sup>.

**Sefalosporinler:** Sefalosporinler de Karbapenemler gibi beta laktam antibiyotikleridir ve beta laktam antibiyotiklerinin bakteri hücre duvarı sentezini engelleyen mekanizmasıyla çalışan bakterisidal antibiyotiklerdir<sup>13</sup>. Yaygın olarak kullanılan Sefalosporinler ceclor, cefoxidin, cephamicin ve cefoxitin antibiyotikleridir<sup>13</sup>.

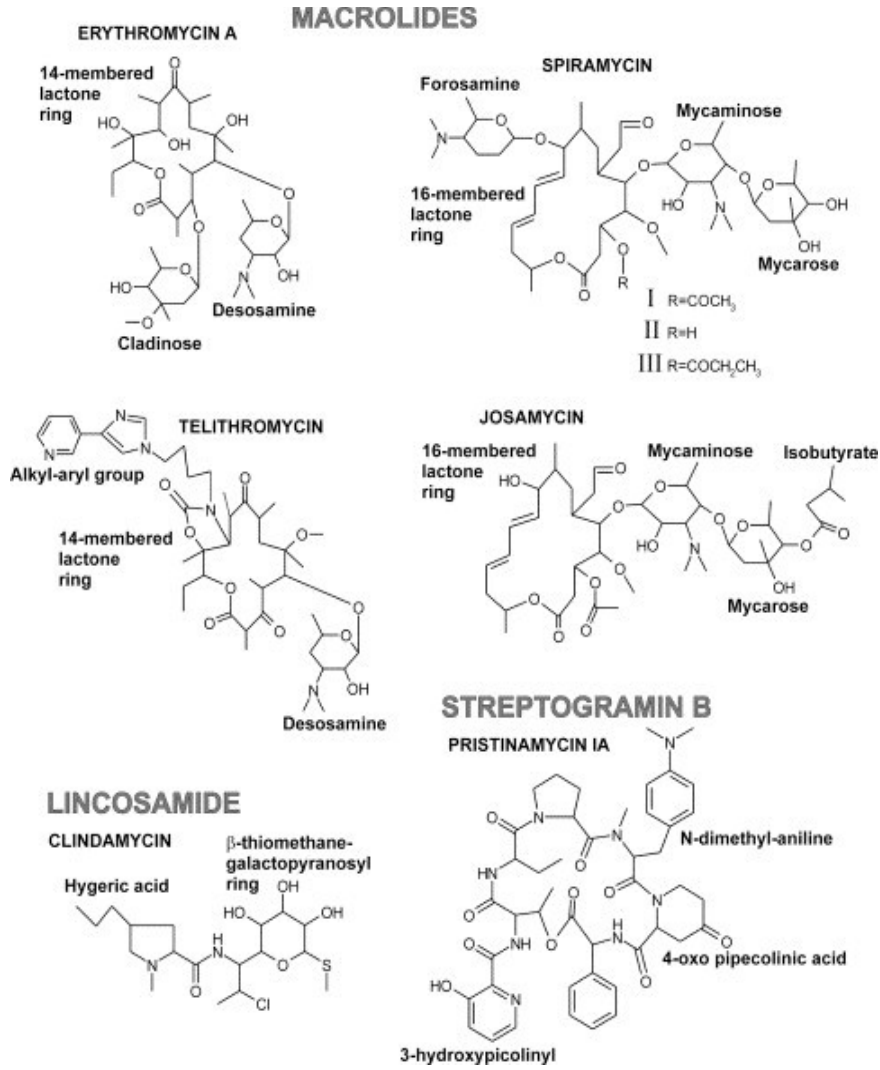
**Glikopeptidler:** Glikopeptid antibiyotikler genelde Gram pozitif bakterilere etki eden, sekonder metabolit ürünü ribozomal olmayan peptidlerdir<sup>13,20</sup>. Yaygın olarak kullanılan glikopeptid antibiyotikler vancomycin, telavancin, decaplanin ve bleomycin antibiyotikleridir<sup>20</sup>. Glikopeptid antibiyotikler bakteriyel hücre duvarı sentezini peptidoglikan üretimini engelleyerek durdurur<sup>20</sup>. Glikopeptid antibiyotikler toksik yan etkilerinden dolayı sadece beta laktam hassasiyeti gösteren veya enfeksiyonun tehlikeli boyutlara ulaştığı hastalarda kullanılmaktadır<sup>13,20</sup>.

**Linkozamidler:** Linkozamidler bakterinin büyük ribozom alt ünitesine bağlanıp peptidil transfer reaksiyonuna engel olup protein sentezini durdurarak etki eden bakteriyostatik antibiyotiklerdir<sup>21</sup>. Linkozamidler bakteriyel ribozomdan yapısal olarak farklı olduğu için insan ribozomuna bağlanamaz, bu nedenle insanda protein sentezi mekanizması linkozamidlerden zarar görmeden devam eder<sup>13,21</sup>. Linkozamidlere direnç gösteren bakteriler ribozomlarının 23S alt ünitelerindeki bağlanma bölgelerinde metilasyon modifikasyonuna sahip olup linkozamid antibiyotiklerinin bağlanmalarını engelleyebilmekte, böylece zarar görmeden konakta gelişebilmektedir<sup>21</sup>.

**Lipopeptidler:** Lipopeptid antibiyotikler bakteriler tarafından üretilen peptide bağlı lipid

molekülleridir ve genellikle Gram pozitif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılır<sup>13,22</sup>. Bakterisidal lipopeptid antibiyotikler bakterilerin hücre zarında depolarizasyona neden olup hücre zarının potansiyelini kaybetmesine, ve sonuç olarak bakteri metabolizmasının zarar görüp ölmesine neden olmaktadır<sup>13,22</sup>. Yaygın olarak kullanılan lipopeptid antibiyotikler surfactin, daptomycin ve caspofungin antibiyotikleridir<sup>22</sup>.

**Makrolidler:** Makrolid antibiyotiklerin moleküler yapısı makrolid halkalarına eklenmiş bir veya daha fazla deoksi şekerinden oluşur ve Gram pozitif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılır<sup>21</sup>. Yaygın olarak kullanılan makrolid antibiyotikler erythromycin, spiramycin, telothromycin ve josamycin antibiyotikleridir<sup>13,21</sup>. Makrolid antibiyotikler peptidil transferazı inhibe ederek ve ribozomal translokasyonu engelleyerek bakteriyel protein sentez mekanizmasının çalışmasını engellerler<sup>21</sup>.



**Şekil 2. 1.** Yaygın olarak kullanılan Makrolid ve Linkozamidlerin moleküler yapıları<sup>21</sup>.

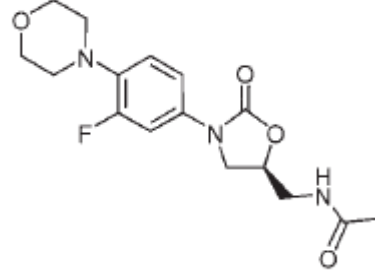
**Monobaktamlar:** Monobaktamlar beta laktam antibiyotik sınıfında olup Gram negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavilerinde kullanılmaktadır<sup>13,23</sup>. Yaygın olarak kullanılan monobaktam antibiyotikler aztreonam, tigemonam, tabtoxin ve nocardicin A antibiyotikleridir<sup>23</sup>.

**Nitrofuranlar:** Nitrofuranlar genel olarak kronik idrar yolu enfeksiyonunun ve tüberkülozun tedavisinde kullanılan sentetik antibiyotiklerdir ve bakteride DNA ve RNA sentezinde görev alan enzimleri inhibe ederek etki eder<sup>24,25</sup>. Yaygın olarak kullanılan nitrofuran antibiyotikler furalozidone, nitrofuratonin, nifurquinazol ve nifurzide antibiyotikleridir<sup>24</sup>.

**Oksazolidinonlar:** Oksazolidinonlar Gram pozitif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların

tedavilerinde kullanılan sentetik antibiyotiklerdir<sup>13,26</sup>. Oksazolidinon antibiyotikleri bakterilerde N-formylmethionyl-tRNA'nın ribozoma bağlanmasını engelleyerek protein sentezi inhibitörü olarak görev yapar<sup>26</sup>. Yaygın olarak kullanılan oksazolidinonlar linezolid, cycloserine, torezolid ve posizolid antibiyotikleridir<sup>13,26</sup>.

linezolid



**Şekil 2. 2.** Oksazolidinon antibiyotiklerinden linezolid moleküler yapısı<sup>13</sup>.

**Penisilinler:** Penisilinler *Penicillium fungi*'den türetilmiş olan beta laktam antibiyotikleridir ve Gram pozitif bakterilerin neden olduğu frengi gibi ölümcül hastalıkların tedavisinde kullanılmış olan tarihsel öneme sahip bir antibakteriyeldir<sup>13,27,28</sup>. Yaygın olarak kullanılan penisilinler penisilin G, procaine penisilin, penisilin V ve benzathine penisilin antibiyotikleridir<sup>28</sup>. Diğer beta laktam antibiyotikleri gibi penisilin de bakteriyel hücre duvarı sentezini inhibe eden bir etki mekanizması mevcuttur<sup>13</sup>. Penisilin beta laktam halkası DD transpeptidaz enzimine bağlanıp, bu enzim tarafından katalizlenen hücre duvarı monomerlerinin çapraz bağlanma işlemini, dolayısıyla yeni hücre duvarı oluşturmasını engeller<sup>29</sup>. Hücre bölünmesi sırasında mevcut hücre duvarı hidrolize olmaya devam ederken yeni hücre duvarı oluşmaması bakterinin ozmotik basınç dolayısıyla parçalanıp ölümüne neden olur<sup>29</sup>.

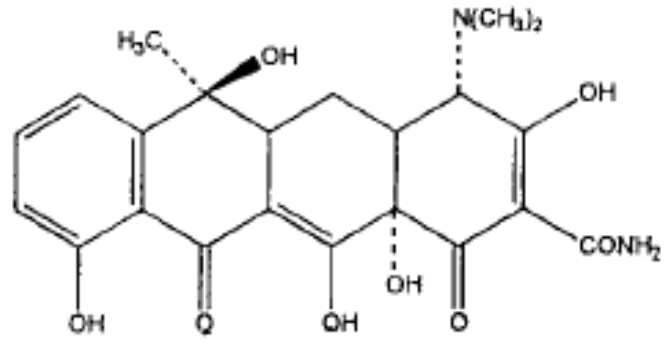
**Polipeptid Antibiyotikler:** Polipeptid antibiyotikler protein olmayan polipeptid zincirler içeren moleküler yapılara sahip, klasik antibiyotiklerden farklı etki mekanizmalarına sahip yeni nesil antibiyotiklerdir<sup>30,31</sup>. Yaygın olarak kullanılan polipeptid antibiyotikler bacitracin, actinomycin, polymyxin B ve colistin antibiyotikleridir<sup>13</sup>. Polipeptid antibiyotikler pozitif yüke sahiptirler ve negatif yüklü bakteri hücre zarı yüzeyindeki iki katmanlı fosfolipid yapıyla etkileşerek hücre zarının bütünlüğünü ve geçirgenliğini bozarlar<sup>31</sup>. Polipeptid antibiyotikler memeli hücre zarındaki fosfolipid yapısının zwitterionik yük durumundan dolayı memeli hücre zarına entegre olamaz<sup>31</sup>. Polipeptid antibiyotikler bakteri hücre zarıyla etkileşime girebilmek için spesifik bir reseptöre

ihtiyaç duymadıklarından dolayı bakterinin mutasyon yoluyla hücre zarı yüzeyi reseptörlerinde modifikasyonlar oluşturup antibiyotik direnci kazanması mümkün olmamaktadır<sup>30,31</sup>.

**Kinolonlar:** Kinolonlar antibiyotik direnci kazanmış olan bakterilerin neden olduğu zatürre gibi ağır enfeksiyonların tedavilerinde kullanılan geniş spektrumlu sentetik antibiyotiklerdir<sup>32</sup>. Yaygın olarak kullanılan kinolonlar ciprofloxacın, nalidixic acid, ofloxacın, norfloxacın, levofloxacın ve enoxacin antibiyotikleridir<sup>32</sup>. Kinolonlar, bakterideki rolü DNA replikasyon sırasında oluşan replikasyon çatalı nedeniyle gerilen çift sarmal yapısındaki pozitif döngüleri negatif döngülere çevirerek zincirlerin gerilmesine engel olmak olan olan topoizomeraz II ve hücre bölünmesi sırasında plazmit replikasyonu aşamasında eski ve yeni oluşturulmuş plazmitlerin birbirinden ayrılmasını mümkün kılıp hücrenin bölünmesine olanak sağlayan topoizomeraz IV enzimlerini inhibe ederek bakteriyel DNA'da kırıklar oluşmasına, dolayısıyla bakterinin ölümüne neden olurlar<sup>32,33</sup>. Bakteriler kinolon abtibiyotiklerine karşı çok hızlı bir şekilde direnç kazanabilmektedir, bunun nedeninin kinolonların acil durumlar dışında ve yanlış dozlarda kullanımı olduğu düşünülmektedir<sup>33,34</sup>.

**Sülfonamidler:** Sülfonamid antibiyotikler sülfonamid fonksiyonel grubu içeren sentetik antibiyotiklerdir ve bakteride folat sentez yolağında görev alan ve sadece bakteride sentezlenen dihidropteroat sentaz enziminin rekabetçi inhibitörüdür<sup>13,35</sup>. Dışarıdan alınamaması dolayısıyla folat üretimi olmadığı sürece bakteri hayatta kalamamaktadır<sup>35</sup>. Yaygın olarak kullanılan sülfonamid antibiyotikler sulfamethoxazole, sulfadiazine, sulfadoxine ve sulfisomidine antibiyotikleridir<sup>35</sup>.

**Tetrasiklinler:** Tetrasiklinler bel soğukluğu, şarbon ve tularemi gibi hastalıkların tedavilerinde kullanılan geniş spektrumlu sentetik antibiyotiklerdir<sup>13,36</sup>. Tetrasiklin antibiyotikler bakteride protein sentezini inhibe edecek şekilde aminoaçil tRNA'nın mRNA ve ribozom kompleksine bağlanmasını engeller<sup>13,15,32</sup>. Yaygın olarak kullanılan tetrasiklinler chlortetracycline, doxycycline, demeclocycline ve minocycline antibiyotikleridir<sup>36</sup>.

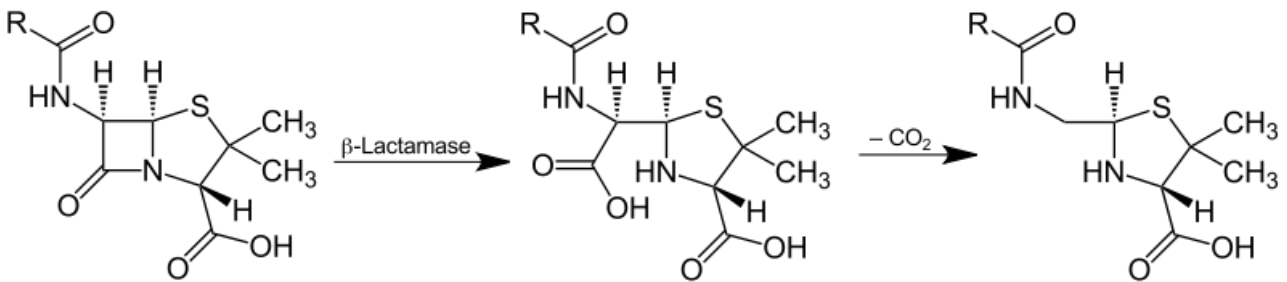


Şekil 2. 3. Tetrasiklin molekül yapısı<sup>36</sup>.

## 2.1.2 Direnç Mekanizması Olarak Antibiyotik Parçalayıcı Enzimler

Ortamlarına antibiyotik verildiğinde bakteriler çeşitli şekilde direniş göstererek hayatta kalmaya çalışır. Bu direniş yöntemlerinden biri verilen antibiyotiğin kimyasal yapısını bozacak enzimler üretmektir.

*Escherichia coli* tarafından üretilen ve beta laktam antibiyotiklerin kimyasal yapılarındaki beta laktam halkasını kırarak antibiyotik özelliklerini kaybetmelerine neden olan beta laktamaz enzimleri antibiyotiklere karşı enzimatik direnişe örnektir<sup>37</sup>. İlk olarak keşfedilen beta laktamaz *E. coli* tarafından üretilen ve hücre dışına salgılanan penisilinaz enzimidir ve sadece penisiline etki edebilen yapıdadır<sup>13,37</sup>.



**Şekil 2. 4.** Beta laktamaz enziminin beta laktam halkasını parçalayıp antibiyotiği etkisiz hale getirmesi reaksiyonu<sup>13</sup>.

*E. coli*'nin ürettiği beta laktamazlar genel olarak plazmitlerdeki TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 genleri tarafından kodlanır ve kodlandıkları genlere göre sınıflandırılırlar<sup>38</sup>.

TEM-1 beta laktamazlar Gram negatif bakterilerce, en çok *E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae* tarafından üretilir ve bu organizmaların ampisiline karşı direnç göstermelerini sağlar<sup>39</sup>. SHV-1 beta laktamazlar genel olarak *Klebsiella pneumoniae* tarafından üretilir ve ampisilin direncinin sorumlusudur<sup>39</sup>. CTX-M beta laktamazlar TEM-1 ve SHV-1 beta laktamazlardan farklı olarak patojenik *Kluyvera* türlerinden kazanılmış genlerin sonucu olarak üretilirler ve sefalosporin türü antibiyotiklere karşı direnç sağlarlar<sup>13,40</sup>.

Gittikçe artan beta laktam antibiyotik direnci bakteriyel enfeksiyonların beta laktam antibiyotiklerle

tedavilerini zorlaştırmaktadır, bu nedenle bu antibiyotiklerle birlikte beta laktamaz inhibitörler de tedavi sürecinde kullanılmakta ve tedaviyi daha etkin kılmaktadır<sup>37</sup>. Clavulanic asit ve Sulbactam gibi maddeler beta laktamaz inhibitörlerine örnektir. Fakat bakterinin Genişletilmiş Spektrumlu Beta Laktamazlar üretmesi sonucu hem antibiyotikler hem de beta laktamaz inhibitörleri bir derece etkisiz kalmaktadır<sup>37,39,40</sup>. Genişletilmiş Spektrumlu Beta Laktamazlar TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 genlerindeki mutasyonların üretilen beta laktamazlardaki aktif bölge amino asitlerin konfigürasyonlarını değiştirmesi sonucu ortaya çıkar, ayrıca söz konusu plazmitler başka antibiyotiklere karşı da direnç genleri taşımaları nedeniyle Genişletilmiş Spektrumlu Beta Laktamaz üretebilen bakterilerin neden olduğu hastalıkları tedavi etmek oldukça zordur<sup>37</sup>.

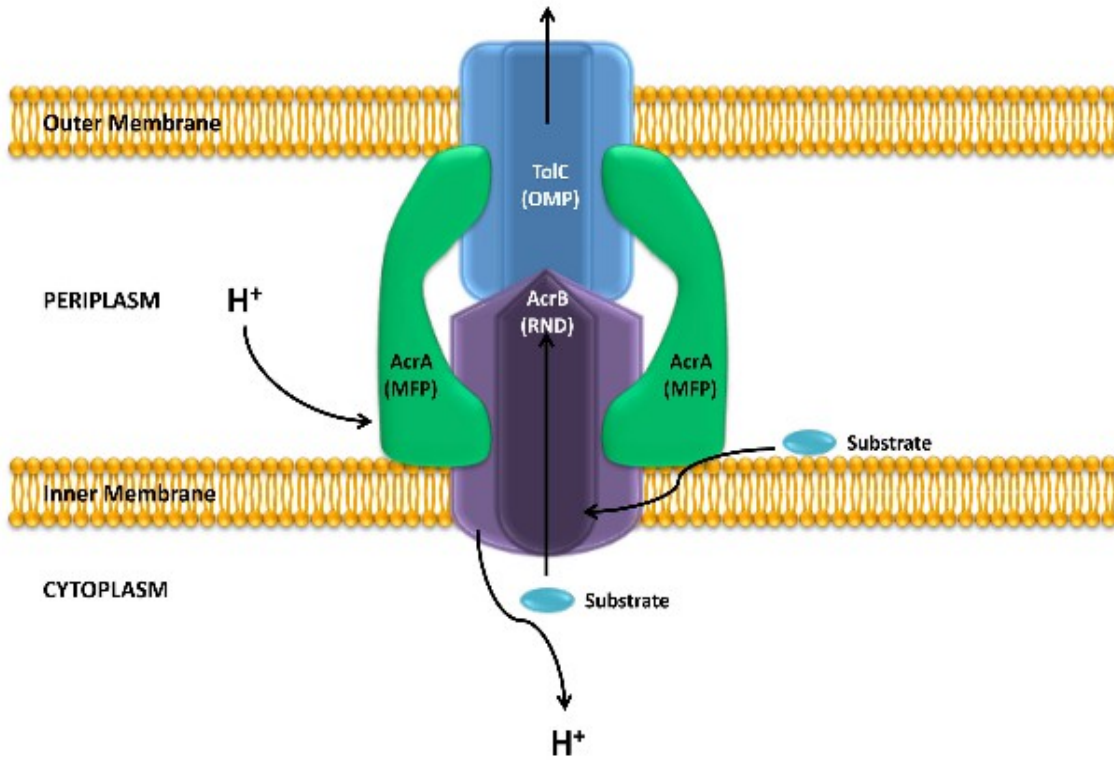


### 2.1.3 Direnç Mekanizması Olarak Dışarı Akış Pompaları

Bakterilerin antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç mekanizmalarından bir diğeri hücreye giren antibiyotikleri henüz aktif bölgelere ulaşmadan hücre dışına çıkarmaktır<sup>41</sup>.

Dışarı akış pompaları her organizmanın hücre zarında bulunmakta olup enerji harcayarak veya elektrokimyasal potansiyel farkından yararlanarak aktif taşıma yaparlar. Bakteriyel dışarı akış pompaları kullanılan enerji türüne ve aminoasit dizisi farklılığına göre beş kategoriye ayrılmıştır<sup>42</sup>.

Major Facilitator Superfamily (MFS) dışarı akış pompaları bakteri, arkeler ve ökaryotlarda bulunan, hem hücre içi hem de hücre dışı taşıma sağlayan hücre zarı proteinleridir<sup>42</sup>. MFS dışarı akış pompaları hücre içine ve dışına basit şeker, amino asit, ilaç, Krebs döngüsü metabolitleri ve birçok organik ve inorganik materyal taşınmasını sağlar<sup>42,43</sup>. ATP Binding Casette (ABC) taşıyıcı pompası Adenozin Trifosfat (ATP) enerjisinden yararlanarak çalışır ve hücre içine ve dışına metabolik ürün, ilaç, lipit ve sterol taşırlar<sup>43</sup>. Small Multidrug Resistance (SMR) protein ailesi bakteride ilaç ve metabolit taşımaktan sorumludurlar ve birçok homologu bulunmaktadır<sup>44</sup>. Resistance-nodulation-cell division superfamily (RND) dışarı akış pompaları Gram negatif bakterilerde antibiyotik direnciyle en çok ilişkilendirilmiş dışarı akış pompalarıdır ve ayrıca “quorum sensing” mekanizmasında görev alan ürünlerin de taşınmasından sorumludur<sup>42</sup>.



**Şekil 2 5.** *Escherichia coli*'de RND dışarı akış pompası<sup>42</sup>.

Çoklu Antimikrobiyal Çıkarma protein ailesi dışarı akış pompaları (ÇAÇ) hücreden ilaç ve sodyum taşınmasında görev alır ve bakteride, arkelerde ve ökaryotlarda bulunurlar<sup>42</sup>.

Dışarı akış pompa proteinlerinin normal düzeyden daha fazla ifade edilmesi bakteriyeye birçok ilaç, kimyasal, boya ve dezenfektan maddeye karşı koruma sağlar<sup>45</sup>. Dışarı akış pompaları antimikrobiyal ajanları bakteri hücresinin dışına atıp bakteriyeye hayatta kalmak için daha uzun süre tanınmasını sağlarken, bu sırada mutasyon içeren dışarı akış pompa genlerinin bulunduğu plazmidi içeren bakterilerin ortamda birikip çoğunluk sağlamasını, ve böylece avantajlı popülasyonun öne çıkmasını sağlar<sup>41</sup>. Dışarı akış pompa genlerinde mutasyon bulunan *E. coli* suşlarının yabancı tip *E. coli* suşlarına göre 1000 kat daha hızlı florokinolon antibiyotik direnci geliştirdiği gösterilmiştir<sup>45</sup>. Şimdiye kadar *E. coli*'de tanımlanmış olan dışarı akış pompa proteinlerinden en önemlileri AcrAB-TolC, AcrEF-TolC, EmrB ve EmrD proteinleridir<sup>45</sup>. Bakteriyel dışarı akış pompa proteinleri her türlü antimikrobiyal ajanı hücre dışına atabilecek özellikte olduğu gibi sadece bazı antimikrobiyal ajanları hücre dışına atabilecek özellikte de olabilir<sup>41,43</sup>. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda *E. coli*'deki AcrAB pompa proteinlerinin birçok ilaç, boya ve kimyasalı hücre dışına etkili bir şekilde atabildiği gösterilmiştir, fakat AcrAB-TolC pompa protein kompleksinde mutasyon bulunan *E.*

*coli*'nin, özellikle eritromisin ve klaritromisine karşı aşırı hassasiyet göstermiş, fakat telitromisin antimikrobiyaline hassasiyet göstermemiştir<sup>41,43</sup>. Yine *E. coli*'de bulunan ve Major Facilitator protein ailesine ait olan EmrAB pompa proteininin nalidiksik asit ve tiolaksomisin gibi birçok yabancı maddeyi hücre dışına atabildiği gösterilmiştir<sup>43</sup>.

Bakteriyel dışarı akış pompalarının bakteri kaynaklı enfeksiyonların tedavilerinin önüne geçmemesi amacıyla çeşitli çözümler geliştirilmiştir. Bunlardan biri dışarı akış pompalarını ekarte edecek kimyasal yapıda antibiyotikler tasarlamaktır, böylece hücre içine alınan antibiyotik dışarı atılamayacak ve aktif bölgeye ulaşabilecektir<sup>46</sup>. İkinci olarak ilgili dışarı akış proteinlerinin ifade seviyelerini düşürecek stratejiler geliştirilebilir, çünkü bilindiği üzere dışarı akış pompa protein ifade seviyeleri o bakterinin belli antimikrobiyal ajanlara hassaslığını belirlemektedir<sup>46</sup>. Son olarak dışarı akış pompalarını inhibe etmek amacıyla hücre zarındaki elektrokimyasal potansiyeli düzensiz hale getirecek carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) gibi kimyasallar kullanılması söz konusu olabilir<sup>46</sup>. Görülmektedir ki bakterinin antimikrobiyal direnci geliştirmesinde dışarı akış pompa proteinlerinin rolü büyüktür.

#### 2.1.4 Direnç Mekanizması Olarak Stratejik Mutasyonlar

Antibiyotik parçalayıcı enzimler ve dışarı akış pompalarının dışında bakterinin antimikrobiyallerle savaşması için hala birkaç çözümü mevcuttur. Bu çözümler stratejik noktalarda mutasyonların oluşturulup antimikrobiyallerin işleyiş mekanizmalarının önüne geçilmesi şeklindedir.

Gram pozitif ve negatif bakteri kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde kullanılan bakteriyostatik kloramfenikol, bakteriyel ribozomda 50S ribozomal alt ünitesine geri dönüşümsüz olarak bağlanıp peptidil transferaz enziminin aktivitesini inhibe ederek, yeni üretilecek olan proteinde peptid bağlarının oluşumunu engelleyecek şekilde çalışır<sup>13,47</sup>. *Escherichia coli*'de 50S ribozomal alt ünitesindeki mutasyon kloramfenikol aktivitesini engelleyerek bakteride protein sentezinin devam etmesini sağlar<sup>13</sup>. Bu konformasyonel değişiklik ribozomal genlerin toplandığı bölgedeki *strA*'daki mutasyondan kaynaklanmaktadır<sup>48</sup>.

Florokinolonlar bakteride tip II topoizomeraz olan DNA giraz aktivitesini engelleyerek aktivite gösteren geniş spektrumlu antibiyotiklerdir<sup>49</sup>. *E. coli* DNA giraz enzimidaki antibiyotik bağlanma bölgelerinde değişiklikler yaparak florokinolonun enzime bağlanmasını engelleyerek aktivitesini yok eder<sup>50,51</sup>. DNA giraz enzimidaki aktif bölge konformasyon değişiklikleri bu enzimin iki alt ünitesini kodlayan *gyrA* ve *gyrB* genlerindeki nokta mutasyonlarından kaynaklanmaktadır<sup>49</sup>. Tip IV topoizomeraz enzimi ve tip II topoizomeraz enzimi homoloji göstermektedir, özellikle florokinolon bağlanma bölgelerinde büyük ölçüde homoloji görülmektedir<sup>52</sup>. Bu homolog bölgeler florokinolonun tip IV topoizomeraz enzimine de etki edebileceği düşüncesini ortaya çıkarmış ve bu düşünce son yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır. *E. coli*'de tip IV topoizomeraz enziminin iki alt ünitesini kodlayan *parC* ve *parE* genlerindeki nokta mutasyonlar bu enzimdeki florokinolon bağlanma bölgelerinde konformasyon değişikliklerine neden olup bakteriyi florokinolon antibiyotiklerine dirençli hale getirmektedir<sup>13,52,53</sup>. Bu ve bunun gibi mutasyonlar bakterileri çeşitli antibiyotiklere karşı dirençli hale getirmektedir.

### 2.1.5 *Escherichia coli*'de Çoklu İlaç Direnci

Çoklu ilaç direnci (Multiple Drug Resistance) bir organizmanın *in vitro* ortamda birden fazla ilaca veya antimikrobijale dayanıklılık gösterebilme yeteneğidir<sup>54</sup>. Çoklu ilaç direnci gösterebilen organizmalar bakteri, virüs, parazit veya fungus olabilir, bakteriler arasında da özellikle ESKAPE adı verilen grup (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*) çoklu ilaç direnci göstermesiyle bilinmektedir<sup>55</sup>. İlaçlara karşı daha az geçirgen hücre duvarı, antimikrobijallerin enzimatik olarak inaktivasyonu, dışarı akış pompalarıyla antimikrobijallerin hücre dışına atılması, antimikrobijal stresine cevap olarak oluşan mutasyonlar ve antimikrobijallerin hedef bağlanma bölgelerinin konformasyonel olarak değişikliğe uğratılması çoklu ilaç direnci gösterebilen bakterilerin bir veya daha fazlasına sahip olduğu özelliklerdir<sup>40,43,54-56</sup>.

Çoklu ilaç direnci dışında, bazı bakteriler Ekstrem ilaç direnci gösterebilirler. Ekstrem ilaç direnci gösteren bakteriler neredeyse tüm antimikrobijal ajanlara dayanıklılık gösterirler ve toplum sağlığı açısından çok tehlikeli olarak değerlendirilirler<sup>54</sup>. Bir bakteri türünün çoklu ilaç direnci gösterip göstermediğinin anlaşılması için bilinen antimikrobijal sınıflarından en az birer antibiyotikle *in vitro* ortamda yaşayabilirlik testi yapılması gerekmektedir<sup>54</sup>.

<b>Antimicrobial category</b>	<b>Antimicrobial agent</b>
Aminoglycosides	Gentamicin
Ansamycins	Rifampin/rifampicin
Anti-MRSA cephalosporins	Ceftaroline
Anti-staphylococcal $\beta$ -lactams (or cephamycins)	Oxacillin (or cefoxitin) <sup>2</sup>
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin
	Moxifloxacin
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulphamethoxazole
Fucidanes	Fusidic acid
Glycopeptides	Vancomycin
	Teicoplanin
	Telavancin
Glycylcyclines	Tigecycline
Lincosamides	Clindamycin
Lipopeptides	Daptomycin
Macrolides	Erythromycin
Oxazolidinones	Linezolid
Phenicols	Chloramphenicol
Phosphonic acids	Fosfomicin
Streptogramins	Quinupristin-dalfopristin
Tetracyclines	Tetracycline
	Doxycycline
	Minocycline

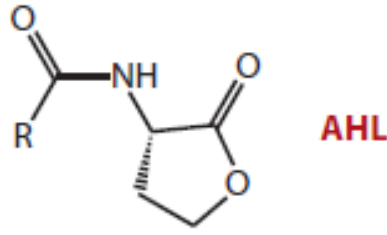
**Şekil 2. 6.** Bakteride çoklu ilaç direncinin belirlenmesinde kullanılan antibiyotik sınıfları

### 2.1.6 *Eschericia coli*'de “Quorum Sensing”

Bakterilerin bireysel olarak yaşamsal faaliyetlerine karar verdikleri düşüncesi hücreler arası iletişimin derinlemesine araştırılmasıyla geçerliliğini kaybetmiş, tür içi ve türler arası iletişim yolları keşfedildikçe “Quorum sensing” mekanizmasının araştırılması önem kazanmıştır<sup>57,58</sup>. “Quorum sensing” mekanizması birçok bakteri türünün yaşamsal faaliyetlerini ortamdaki hücre yoğunluğuna göre düzenlemesini sağlayan sinyal yolları silsilesini ifade eder<sup>59-61</sup>. “Quorum sensing” mekanizması, bakteri popülasyonunun kendisince veya etrafında bulunan başka bakteri popülasyonlarınca aktif veya pasif olarak salgılanan sinyal moleküllerinin ortamda belli bir konsantrasyona ulaştıktan sonra bakterideki çeşitli genlerin ifadelerini etkileyerek, etkilenen bakterilerin senkronize bir şekilde tepki vermesi şeklinde özetlenebilir<sup>62</sup>. “Quorum sensing” mekanizması ilk olarak 1970 yılında deniz bakterileri olan gram negatif *Vibrio fischeri* ve *Vibrio harveyi* türlerinde, söz konusu bakterilerin biyoluminesans özelliklerinin bakteri popülasyonu yoğunluğuna bağlı olduğu gözlemlendiğinde keşfedilmiştir<sup>63,64</sup>. Doğal habitatı *Euprymna scolopes* olan *V. fischeri* bu mürekkep balığı türünün ışımaya yapabilen organında yaşayıp zengin besin ortamı sağlandığında hücre popülasyonunu artırmaktadır. Üretilip ortama salınan otoindükleyici molekül konsantrasyonunun yüksekliği nedeniyle *V. fischeri*'de biyoluminesansan sorumlu lüsiferaz operonu çalışmakta, bakteri ışımaya gerçekleştirmekte ve bu da mürekkep balığının avcılarının ondan uzak kalmasını sağlamakta, av-avcı ilişkisinde ona üstünlük sağlamaktadır<sup>62,64,65</sup>. Bu çalışmadan itibaren yapılan araştırmalar, “quorum sensing” mekanizmasının bakterilerde biyofilm oluşturma, virülans özellik gösterme, antibiyotik dirençliliği, fiziksel hareketlerin yönlendirilmesi ve antibiyotik oluşturma gibi özelliklerinde yol aldığı yönünde bulgular ortaya koymaktadır<sup>62,65</sup>.

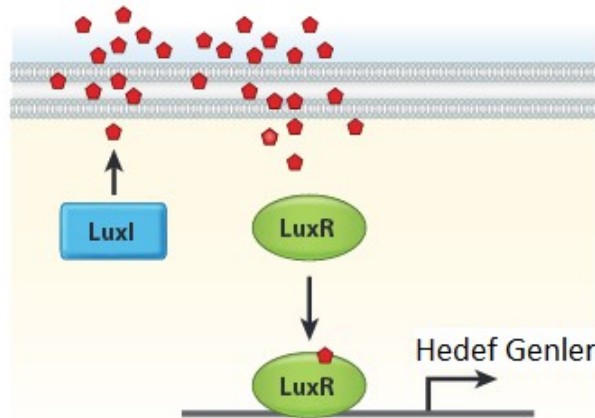
Bakterilerde “quorum sensing” mekanizması, bakteride üretilip ortama bırakılan sinyal moleküllerinin (indükleyici) belirli bir eşik konsantrasyona ulaştıktan sonra bakteri hücrelerindeki özel reseptörler tarafından algılanıp, reseptörlerin çeşitli sinyal yollarını harekete geçirmesi sonucu indükleyici sentezinden sorumlu genler dahil belirli genlerin ifade düzeylerinin değişmesi şeklinde işlemektedir<sup>60,66,67</sup>. Bakterinin popülasyon yoğunluğu Düşük Hücre Konsantrasyonu (DHK) ve Yüksek Hücre Konsantrasyonu (YHK) olmak üzere “quorum sensing” mekanizması tarafından algılanıp, bu konsantrasyon farklılığına göre bakterinin popülasyona uygun sosyal faaliyetler gerçekleştirmesini veya bireysel olarak yaşamsal faaliyetlerine yönelmesini düzenler<sup>64,68,69</sup>.

“Quorum sensing” mekanizmasında rol alan moleküller otoindükleyici moleküller olarak adlandırılır ve oligopeptidler, furanozil borat diesterler, N-açil homoserin laktonlar ve metil dodekanoik asitler sinyal moleküller otoindükleyicilere örnek olarak verilebilir<sup>70,71</sup>. Günümüzde en çok çalışılmış “quorum sensing” sinyal molekülleri N-açil homoserin laktonlardır (AHL) ve bu moleküller 70'ten fazla gram negatif bakteri türünde üretilmektedir<sup>70,72</sup>. Gram negatif bakterilerin “quorum sensing” yolağında ağırlıklı olarak kullanılan AHL molekülü ve homoserin laktona bağlanmış 4-18 karbonlu açil zincirli yapıdadır.



Şekil 2. 7. Açil homoserin lakton moleküler yapısı.

AHL molekülleri türler arası “quorum sensing” mekanizmasında görev alabileceği gibi sadece tek bir türe özel moleküller de olabilirler<sup>73</sup>. “Quorum sensing” mekanizması *luxIR*, *lasIR*, *rhlIR*, *traIR* ve *esalR* homolog genlerle birçok farklı gram pozitif ve negatif bakterilerde fonksiyon görmektedir<sup>58</sup>. *V. fishceri* deniz bakterisinde tanımlanmış “quorum sensing” mekanizması LuxIR tipi olarak belirlenmiştir<sup>74</sup>.

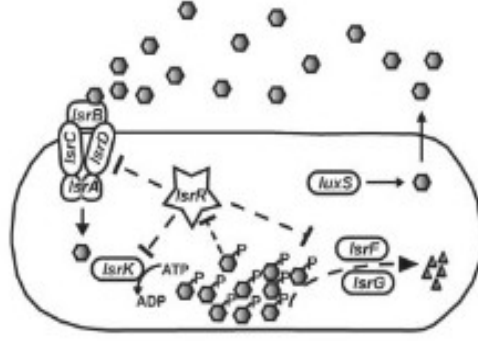


Şekil 2. 8. *Vibrio fishceri* LuxIR tipi “quorum sensing” mekanizmasının şematik anlatımı.



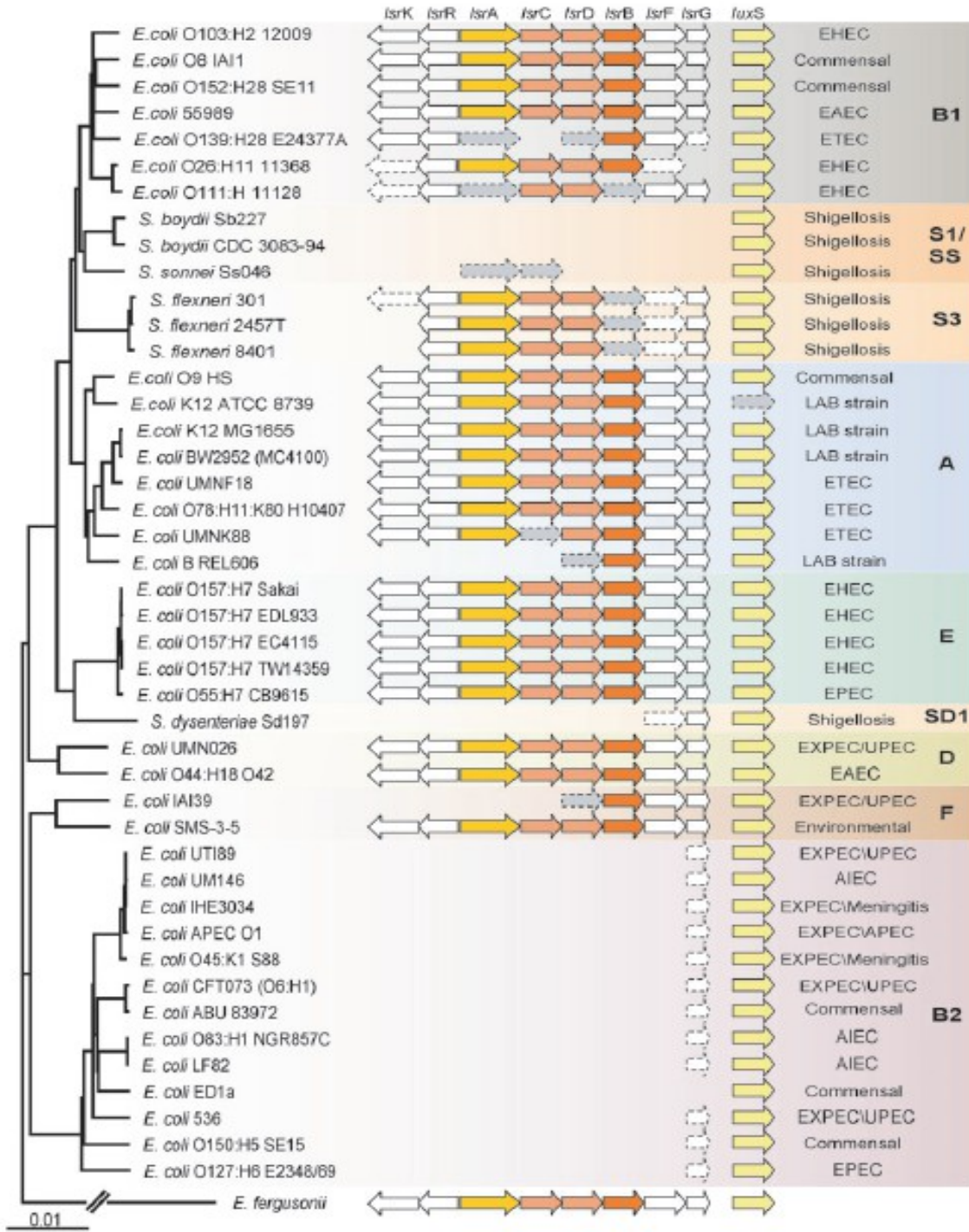
LuxI enzimi tarafından sentezi gerçekleştirilen otoindükleyici molekül N-3 homoserin lakton hücre dışına salgılandıktan sonra ortamda bakteri popülasyonu büyüdükçe belirli bir eşik konsantrasyona ulaşır. Eşik konsantrasyona ulaşan otoindükleyici N-3 homoserin lakton sitoplazmit reseptör olan LuxR tarafından algılanır. LuxR proteini aynı zamanda biyoluminesans gerçekleştiren lusiferaz operonunun transkripsiyonel aktivatörü olarak görev yapmaktadır ve bu reseptör ligandına bağlı olmadığı durumlarda kararsız olup degradasyona uğramaktadır. Ligandı olan N-3 homoserin laktona bağlandığı zaman LuxR proteini bu molekülle bir kompleks oluşturur ve bu kompleks bahsi geçen lusiferaz operonu üzerinde belirli bir dizi bölgesini tanıyarak bu operonu aktifleştirici görev görür. LuxR ve N-3 homoserin lakton kompleksi aynı zamanda LuxI ifadesini aktifleştirici özellikte olduğu için LuxIR mekanizması pozitif geri besleme mantığıyla çalışıp ortamdaki otoindükleyici molekül konsantrasyonunu daha çok artırıcı işlev görmektedir. Bu fonksiyonuyla “quorum sensing” mekanizması bakterileri DHK sisteminden YHK sistemine geçirici özellik taşımaktadır. Bu durum bakterilerin YHK ortamında yaşamsal faaliyetlerini daha senkronize bir şekilde yürütmelerini sağlamaktadır<sup>60,64,69,74-76</sup>.

*V. fischeri* bakterisinde tanımlanan “quorum sensing” mekanizması birçok gram negatif bakteride de homolog genlerle tanımlanmıştır. *E. coli*'de üretilen otoindükleyici molekül Autoinducer-2 (AI-2), *V. fischeri* organizmasındaki *luxR*'in homologue olan *luxS* tarafından kodlanır ve hücre dışına salgılanır<sup>64,73,77</sup>. Hücre dışında belli bir eşik konsantrasyona ulaşan Oİ-2 molekülü bakteriyel periplazmik protein LsrB'ye bağlanır, alıcı hücreler tarafından algılandıktan sonra hücre içine alınıp lsrK enzimi tarafından fosforile edilir, fosforile Oİ-2 lsr operonunun negatif regülatörü olan LsrR'yi baskılayarak lsr operonunu harekete geçirir<sup>73</sup>. Lsr operonu üzerinde bulunan genler ABC taşıyıcı proteinlerini harekete geçirip Oİ-2 moleküllerinin hücre içine alınmasını sürekli hale getirir ve hücre içinde Oİ-2 moleküllerinin gerekli işlemlerden geçirilmesini sağlar<sup>73,78</sup>. Daha sonra sentezlenen LsrG ve LsrF proteinleri fosforile haldeki Oİ-2 moleküllerinin gerekli işlemlerden geçirilmesini sağlar.



**Şekil 2. 9.** *Escherichia coli*'de “quorum sensing” mekanizması.

Çoğu *E. coli* suşu *Isr* operonunu taşımakla birlikte operonun tüm genlerini taşımayabilmektedir<sup>73</sup>.



Şekil 2. 10. Doğada bulunan ve laboratuarlarda kullanılan *Escherichia coli* suşlarının ve yakın akrabalık gösteren *Shigella* türlerinin *Isr* operonlarında bulunan ve bulunmayan “quorum sensing” genleri<sup>73</sup>.

Tüm canlıların birbirleriyle ve çevreleriyle belirli bir seviyede iletişim kurabildikleri bilinmektedir ve bu iletişim yeteneği bahsi geçen canlıların sosyal olarak daha uygun kararlar vermelerini, daha güçlü toplumsal bağlar oluşturmalarını ve evrimsel olarak daha avantajlı duruma gelmelerini sağlamaktadır<sup>79</sup>. Bakterilerin belirli bir çoğunluğa ulaştıktan sonra bu sosyalliğin algılanması “quorum sensing” mekanizmasının harekete geçmesine ve bakterilerin toplumsal bir davranış biçimi göstermesine neden olmaktadır<sup>79</sup>. *Candida albicans* farnesol adlı otoindükleyici molekülün rol aldığı “quorum sensing” mekanizmasına sahip bir fungus olup, filamentöz gelişim ve maya gelişimi arasında geçiş yapabilen patojen bir mikroorganizmadır<sup>80</sup>. *C. albicans* tarafından üretilip salgılanan farnesol otoindükleyici molekülünün kültür ortamında hücre popülasyonunun belirli bir konsantrasyonu aşması sonrası bu mikroorganizmanın maya formundan miçelli forma geçişini engellediği ve biyofilm oluşumu sürecini etkilediği gözlemlenmiştir<sup>79-81</sup>. Biyofilm oluşumu kolonize olmayı ve yüzeye tutunmayı gerektiren karmaşık bir sistemdir ve bu oluşum birçok bakteride olduğu gibi *C. albicans* mikroorganizmasında da patojenite seviyesini belirleyici rol oynamaktadır<sup>61,82</sup>. Henüz “quorum sensing” mekanizmasının biyofilm oluşumu ve farklı formlara geçiş sürecini moleküler düzeyde nasıl düzenlediği bilinmemektedir.

### 2.1.7 Klonlama Vektörleri ve Bu Vektörlerin Seçimi

Gen geri kazanımı ve inaktivasyonu ve rekombinant proteini üretimi gibi deneylerde kullanılan klonlama vektörlerinin belirli özellikleri taşımaları beklenmektedir. Moleküler biyoloji alanında kullanılan klonlama vektörleri bakteriyofajlar, plazmitler, kozmidler, bakteri kökenli yapay kromozomlar, insan kökenli yapay kromozomlar, maya kökenli yapay kromozomlar ve hatta parazitlerdir<sup>83,84</sup>. Klonlama vektörlerinin çeşitli restriksiyon enzim kesim dizileri içeren çoklu klonlama bölgesi, seçicilik sağlayan bir veya birden fazla antibiyotik direnç kasedi, yabancı DNA parçasının ifade regülasyonunu sağlaması için promotor bölgesi ve kendini ve içinde bulundurduğu yabancı DNA dizisini çoğaltabilme yeteneğini bulundurmaları beklenmektedir<sup>84</sup>.

### 2.1.8 Kopya sayısı ve Antibiyotik Direnç Kasedi

Yürütülen deneyin özelliğine göre kullanılan plazmitin üreteceği kopya sayısı oldukça önemlidir. Plazmitin kopya sayısı ifade edilmesi istenen genin seviyesini belirleyici niteliktedir ve genelde çoğu plazmit yüksek kopya sayısı üretebilmektedir<sup>85</sup>. Aşağıdaki çizelgede yaygın olarak kullanılan plazmitler, replikasyon orijinleri ve üretebildikleri kopya sayıları verilmiştir:

**Çizelge 2. 1.** Biyoteknolojide sıklıkla kullanılan bazı plazmitler, replikasyon orijinleri ve kopya sayıları

Plazmit	Replikasyon Orijini	Kopya Sayısı	Sınıflandırması
pUC	pMB1	500-700	Yüksek kopya sayısı
pBR322	pMB1	15-20	Düşük kopya sayısı
pACYC	p15A	10-12	Düşük kopya sayısı
pTZ	pMB1	>1000	Yüksek kopya sayısı
pSC101	pSC101	yaklaşık 5	Son derece düşük kopya sayısı
pWE15	CoIE1	10-20	Düşük kopya sayısı

Çizelge 2.1'de görüldüğü üzere plazmitlerin sahip olduğu replikasyon orijini çeşidi ve oluşturabildikleri kopya sayısı çeşitlilik göstermektedir. Plazmitlerin üretebildikleri kopya sayısı çeşitli mekanizmalarla kontrol edilmektedir ve kontrolde görev alan genlerdeki mutasyonlar plazmitlerin oluşturduğu kopya sayısını da etkilemektedir<sup>84,86</sup>. CoIE1 replikasyon orijinine sahip olan plazmitlerin oluşturdukları kopya sayılarının düşük olduğu bilinmektedir, fakat CoIE1 replikasyon orijinine sahip olan pUC'ların bazı çeşitlerinin yüksek kopya sayısı oluşturduğu gözlenmiştir<sup>87</sup>. Bu durumun RNA polimeraz II enziminindeki bir nokta mutasyonundan kaynaklandığı saptanmıştır, bu mutasyon RNA polimeraz II molekülünün RNA polimeraz I molekülüne inhibisyonunu zor kılmakta ve plazmitin normalde oluşturacağından çok daha fazla kopya sayısı oluşturmasına neden olmaktadır<sup>87,88</sup>.

### 3 AMAÇ VE GEREKÇE

Memelilerin iç bağırsağında yaşayan ve patojenik olan ve olmayan çeşitleri bulunan basil, gram negatif, fakültatif anaerob bir bakteri olan *Escherichia coli*, günümüzde biyoteknoloji alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. *E.coli* suşlarının büyük bir kısmı insan sağlığına zararlı olmasa da bir kısmı patojenik özellik göstermekte ve insanda çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Patojen *E.coli* suşlarının insanda neden olduğu hastalıklar genelde antibiyotik ile tedavi edilmektedir, fakat suşların antibiyotiklere karşı geliştirdiği direnç, tedavi süresini ve maliyetini artırmakta, bazen de tedavi başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Yanlış dozda antibiyotik kullanımı, ihtiyaç dışı antibiyotik kullanımı, tedavi için doğru antibiyotikerin kullanılmaması gibi bilinçsiz yaklaşımlar patojenik bakterileri öldürmek yerine onların çoklu antimikrobiyal direnci kazanmalarına neden olmaktadır. *E. coli* türünün antimikrobiyallere karşı geliştirdikleri direnç mekanizmalarının çoğu bilinmekle birlikte, yine de tüm bu mekanizmaları alt edebilecek bir antimikrobiyal geliştirilememiştir. Rasyonel antimikrobiyal kullanım kurallarının disiplinli bir şekilde uygulanmaması, sorunu daha da derinleştirmektedir. Buna karşın, ilaç endüstrisi, uzun zamandır yüksek maliyetler nedeni ile tamamen yeni antimikrobiyal kemoterapi hedeflerini araştırmak yerine, bilinen hedefler üzerinde etkili ana kimyasal yapıların farmakodinamik ve bazen de farmakokinetik özelliklerini iyileştiren türevlerin sentezine yönelmiştir. Bu yaklaşım, direnç gelişimi sorununu ertelese de ortadan kaldırmamaktadır.

*E. coli* ve birçok bakteri türünün, birbiriyle haberleşmek için kullandığı düşünülen “quorum sensing” mekanizmasının aydınlatılmasıyla bu mekanizmanın bakteri virülansı ile ilişkisi olabileceği akıllara gelmiş ve çeşitli araştırmalarda “quorum sensing” mekanizmasının biyofilm oluşumu, bakteri çoğalma kinetiği ve virülans faktörlerinin ifadenmesi gibi önemli fenotipleri kontrol ettiği gösterilmiştir. Çoklu antimikrobiyal direncine sahip patojen bakteriler tarafından oluşturulan enfeksiyonların tedavisinde konvansiyonel antimikrobiyallerin yetersiz kalmaya başlaması yeni yaklaşımların geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu yaklaşımlardan biri de “Quorum sensing” mekanizmasının bloke edilmesi “quorum quenching” olarak bilinmektedir, ve quenching yoluyla bakteri virülansının azaltılması veya tamamen yok edilmesi klasik antibiyotik tedavileriyle kıyaslandığında çok daha iyi bir alternatif olabilir. Bu kapsamda bakterileri, antimikrobiyallere karşı gösterdikleri kadar hızlı bir şekilde direnç gösteremeyecekleri yöntemlerle alt etmek gerekmektedir, bunun için gelecekte patojenik bakterilerle savaşta “quorum quenching” yöntemlerinden yararlanılması oldukça umut verici olacaktır.

Tez kapsamında, *E. coli*'de otoindükleyici iki aracılı “quorum sensing”in bakterisidal bir antimikrobiyal olan siprofloksasine maruziyeti stresinde bakteri hücrelerini metabolik olarak inaktif, antimikrobiyal etkisinden korunmuş, persistan duruma girmesindeki rolü araştırılmıştır. Bu amaçla, Oİ-2 üretebilen *E. coli* JM109 suşu yanısıra, feromon sentezleyemeyen *E. coli* DH5α ile bu çalışmada oluşturulmuş S-ribozilhomosisteinaz komplementasyonu yapılmış *E. coli* DH5α pACYC184/*luxS*<sup>+</sup> suşu ve kontrol amaçlı oluşturulmuş izogenik mutant *E. coli* DH5α pACYC184 suşu kullanılmıştır. Çalışmanın ilk kısmında, subletal dozda siprofloksasine maruziyet ile Oİ-2 sentezleyebilen ve sentezleyemeyen hücreler, bu antimikrobiyale basamaklı olarak direnç gelişimi yönünden karşılaştırılmıştır. Çalışmanın ikinci bölümünde ise, Oİ-2 aracılı “quorum sensing” yapabilme yeteneğinin, öldürücü dozun üzerinde siprofloksasine kısa süreli maruziyet stresinde, persistan duruma geçiş ve sağ kala birey sayısına etkisi araştırılmıştır.



## 4 MATERYAL VE YÖNTEM

### 4.1 *Escherichia coli* Kültürlerinin Hazırlanması ve Stoklanması

*Escherichia coli* bakterilerinin çoğaltılması aseptik teknikler kullanılarak katı veya sıvı besiyerlerine yapılmıştır. -80°C sıcaklıkta daha önceden stoklanmış olan JM109, DH5a  $\Delta luxS$  ve K12 suşlarının çoğaltılması için bu suş stoklarından katı LB besiyerine ekim yapılmış ve 37°C sıcaklıkta gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

Çoğaltılan her suş daha sonra stoklanmak üzere %30 gliserol içeren LB besiyerine aktarılmıştır. Katı besiyerinden stoklanacak suşlar besiyerinden steril öze yardımıyla toplanarak 1.5 ml hacmindeki mikrosantrifüj tüplerinde 400 µl %30 gliserol içeren LB buyyon içinde süspansiyon edilerek -80°C sıcaklığa kaldırılmıştır. Sıvı besiyerinden stoklanacak suşlar için ise, üremiş kültürden alınan 1 ml bakteri süspansiyonu 10.000 x g ivme ile 5 dk santrifüj edilmiş, üstteki besiyeri uzaklaştırılarak bakteri pelletine 400 µl %30 gliserol içeren LB besiyeri eklenmiştir. Pelletin homojen şekilde süspansiyon edilmesinden sonra stok kültür -80°C sıcaklıkta saklanmıştır. Kullanılan besiyerlerinin içeriği aşağıdaki çizelgelerde verilmiştir (Çizelgeler 4.1, 4.2 ve 4.3)

**Çizelge 4. 1. LB katı besiyeri**

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
Tripton	10 g/l
Maya Özütü	5 g/l
NaCl	0.5 g/l
Agar	15 g/l
NaOH	0.001 N
H <sub>2</sub> O	

**Çizelge 4. 2. LB buyyon besiyeri**

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
Tripton	10 g/l
Maya Özütü	5 g/l
NaCl	0.5 g/l
NaOH	0.001 N
H <sub>2</sub> O	

**Çizelge 4. 3. %30 Gliserollü LB buyyon besiyeri**

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
Tripton	10 g/l
Maya Özütü	5 g/l
NaCl	0.5 g/l
NaOH	0.001 N
Gliserol	%30
H <sub>2</sub> O	

## 4.2 Öldürücü Düzeyin Altında Siprofloksasin Maruziyeti ile Kinolon Dirençli *gyrA* ve *parC* Mutantlarının Seçimi

### 4.2.1 Minimum İnhibitör Konsantrasyon Deneyi

Minimum inhibitör konsantrasyon deneyi 96 kuyucuklu mikropalakalarda mikrodilüsyon biçiminde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan *Escherichia coli* JM109, DH5α *ΔluxS* ve K12 suşlarının, bir gecelik kültürlerinden SOC buyyona ekim yapılmıştır. Kültürler 0.5 Mc Farland bulanıklığına ulaştığında mikropalaka kuyucukları, 0.023 – 12 µg/ml arasında iki kat artan son konsantrasyonlarda siprofloksasin içerecek şekilde inokülasyon gerçekleştirilmiştir. İnokülasyon sonrası 37 °C sıcaklıkta inkübe edilen mikropalakalar, 24 ve 48. saatlerde kontrol edilerek her bir suş için üremenin gerçekleştiği en yüksek siprofloksasin konsantrasyonu içeren kuyucuklardan alınan bakteriler, SOC buyyona aktararak 0.5 Mc Farland bulanıklığında yeni bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu bakteri süspansiyonları bir sonraki mikrodilüsyon deneyinin inokulumu olarak kullanılmıştır. Her bir MİK deneyi sonunda, çalışmada kullanılan suşların subletal dozda siprofloksasin değerleri gözlenmiş, takip eden deneyde siprofloksasin konsantrasyonları yeniden düzenlenerek basamaklı olarak yukarı çekilmiştir. Buna göre onuncu deneyde kullanılan siprofloksasin konsantrasyonları 0.160 – 96 µg/ml arasında değişen iki kat dilüsyonlar olarak ayarlanmıştır.

**Çizelge 4. 5. SOC buyyon besiyeri**

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
Tripton	20 g/l
Maya Özütü	5 g/l
NaCl	0.5 g/l
NaOH	0.001 N
Gliserol	%30
KCl	0.003 M
Glukoz	0.02 M
MgCl <sub>2</sub>	0.01 M
MgSO <sub>4</sub>	0.01 M
H <sub>2</sub> O	

#### 4.2.2 *gyrA* ve *parC* Dizi Analizi

Öldürücü düzeyin altındaki siprofloksasin maruziyetinin çalışmaya alınan *E. coli* suşlarında neden olduğu kinolon direncinden sorumlu *gyrA* ve *parC* mutasyonlarının belirlenmesi için ilgili lokusların DNA dizi analizi yapılmıştır. Bu amaçla, 5. ve 10. basamak subletal doz siprofloksasin maruzitesi sonrası elde edilen bakteri hücrelerinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Söz konusu genlerin genomik DNA'dan PCR ile çoğaltılmasının ardından ürünler silika matrisli kolonlar kullanılarak saflaştırılmıştır. Çoğaltma ürünlerinin özgülüğü agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiş, ürünlerin nicelendirilmesi ve saflık kontrolü ise spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılmış çoğaltma ürünlerinin dizi analizi Sanger yöntemi ile yapılmıştır. Buna göre dizileme tepkimesi florofor işaretli dideoksinükleotid trifosfat (ddNTP) terminatörler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dizileme ürünlerinin ürüne katılmamış florofor işaretli ddNTP'lerden temizlenmesi için etanol asetik asit çöktürmesinden yararlanılmıştır.

Etanol asetik asit çöktürmesi işleminin tümü buz üstünde yapılmıştır. DTCS PCR sonrası 1.5 ml hacminde steril tüplerde bulunan eldeki dizi ürünlerinin tümüne DTCS çöktürme süspansiyonu eklenmiş, üzerine -20°C sıcaklıkta saklanmış olan %70 etanol eklendikten hemen sonra 18.000 x g ivme ile +4°C sıcaklıkta 45dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış, pellet 200 µl %70 soğuk etanolle iki kere yıkamadan geçirilmiştir. Yıkama sonrası pellet buz üstünde kurumaya bırakılmış, kuruyan pellet 40 µl deiyonize formamid ile süspanse edilmiştir.

Daha sonra örnekler kapiller jel elektroforezi ile analiz edilmiştir. (Beckman Coulter CEQ™ 8000 Genetic Analysis System) cihazında dizi analizinden geçirilmiştir. Spektrofotometrik ölçüm ve guanidin saflaştırma protokolleri **Nükeik Asit İzolasyonu, Saflaştırması ve Spektrofotometrik Ölçüm** başlığında, *gyrA* ve *parC* için kurulan PCR çizelgeleri **luxS Komplemantasyonu** başlığında verilmiştir. DTCS PCR çizelgesi, *gyrA* ve *parC* primerleri ve DTCS çöktürme reaksiyonu çizelgesi aşağıda verilmiştir.

**Çizelge 4. 6. DTCS PCR protokolü.**

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
DTCS Quick Start Mix	1x
DNA	30fmol
Primer	1600fmol
H <sub>2</sub> O	

**Çizelge 4. 7. *gyrA* ve *parC* ileri ve geri primerler**

Primer	Primer Dizisi	Bağlanma Sıcaklığı (°C)
WP <sub>gyrA</sub>	5'-GACCTTGCGAGAGAAATTACAC-3'	59.82
C <sub>gyrA</sub>	5'-GATGTTGGTTGCCATACCTACG-3'	61.82
WP <sub>parC</sub>	5'-CGGAAAACGCCTACTTAAACTA-3'	58.90
C <sub>parC</sub>	5'-GTGCCGTTAAGCAAAAATGT-3'	57.57

**Çizelge 4. 8. DTCS çöktürme süspansiyonu**

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
Sodyum asetat pH 4.6	70,60mM
Glikojen	0,24 mg/ml
Na <sub>2</sub> - EDTA	2,35mM
Dizi Örneği	%17,70
%70 Etanol (-20°C)	%67,10
H <sub>2</sub> O	

### 4.3 Nükleik Asit İzolasyonu, Saflaştırması ve Spektrofotometrik Ölçüm

Tez çalışmasında DNA ve plazmit izolasyonları mini(küçük) ve midi(orta) ölçekte alkalin lizis yöntemiyle yapılmış olup izolasyon sonrası elde edilen nükleik asitlerin konsantrasyonu ve kalitesi, spektrofotometrik yöntemler ve agaroz jel elektroforezi yöntemleri ile belirlenmiştir.

Nükleik asit izolasyonu yapılmak istenen bakteriden aseptik koşullarda tek koloni seçilerek LB buyyon besiyerine ekim yapılmıştır. Hazırlanan ekim 37°C sıcaklıkta en az dört saat, mümkünse tüm gece steril cam erlenmeyer içinde çalkalanarak inkübasyona bırakılmıştır. Uygun bulanıklığa gelen kültür 50 ml hacminde konik tabanlı tüpe alınarak 4 °C sıcaklıkta 10 dk boyunca 2500 x g ivme ile santrifüj edilerek besiyerinin bakteriden ayrılması sağlanmış, besiyeri fazı bakteri kalıntısından uzaklaştırılmıştır. Bakteri kalıntısının üzerine soğuk alkalin lizis I solüsyonundan eklenerek vortekslenmiş, süspansiyon 1.5 ml hacminde steril, DNaz ve RNaz enzimlerinden arındırılmış mikrosantrifüjtüpe aktarılmıştır. Süspansiyonun üzerine taze hazırlanan alkalin lizis II solüsyonu ilave edilmiş ve tüpün kapağı kapatılarak süspansiyon birkaç kere nazikçe çalkalanmıştır. Tüp içeriğine bu sefer soğuk alkalin lizis III solüsyonu eklenip yine nazikçe çalkalandıktan sonra süspansiyon buz üstünde üç ile 5 dk arası inkübasyona bırakılıp, sonrasında 4 °C sıcaklıkta 13.000 x g ivme ile 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan üst faz yeni mikrosantrifüj tüpüne aktarılıp, eşit hacimde fenol:klorofom:izoamilalkol eklenmiş ve süspansiyon vortekslenmiştir. Süspansiyon daha sonra 13.000 x g ivme ile dört derece sıcaklıkta iki dk boyunca santrifüj edilmiş, oluşan fazlardan üst faz yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve üzerine %100 izopropil alkol eklenmiştir. Alkol eklemesi sonrası örnek gece boyu -20°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası örnek 13.000 x g ivme ile dört derecede 5 dk boyunca santrifüj edilmiş, tüpün altında beyaz pelet oluşumu gözlenmiştir. Süpernatant kısmı uzaklaştırılıp pelet üzerine %70 etanol eklenmiş ve 13.000 x g ivme ile dört derecede iki dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak pelet oda sıcaklığında tüp kapakları açık kalacak şekilde 30-60 dk arası kurutulmaya bırakılmıştır. Peletin kuruyup saydamlaştığı gözlemlendiğinde peletin üzerine 50-100 µl arası 20 µg/ml konsantrasyonda RNaz içeren steril suda süspanse edilmiş ve elde edilen plazmidin kalitesi ve niceliği agaroz jel elektroforezi ve spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir. Deney sırasında kullanılan alkalin lizis I, II ve III solüsyonlarının içeriği aşağıdaki çizelgelerde verilmiştir.

**Çizelge 4. 9. Alkalen lizis I çözeltisinin içeriği**

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
Tris-Cl (pH 8.0)	25mM
Glukoz	50mM
EDTA (pH 8.0)	10mM

**Çizelge 4. 10. Alkalen lizis II çözeltisinin içeriği**

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
NaOH	0.2N
SDS	%1

**Çizelge 4. 11. Alkalen lizis III çözeltisinin içeriği**

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
Glasiyel Asetik Asit	11.5 ml
5M Potasyum Asetat	60 ml
H <sub>2</sub> O	28.5 ml

Moleküler klonlama işlemleri sırasında elde edilen kesim ve çoğaltma ürünü gibi sonraki basamaklar için safsızlıklar içeren nükleik asit örnekleri silika matrisli santrifüj kolonları kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu amaçla saflaştırılacak nükleik asit örneğine son konsantrasyonu 4M'dan az olmayacak şekilde guanidin eklenmiştir. Çözeltinin pH'sı, 3M sodyum asetat pH 5.0 kullanılarak DNA'nın silikaya etkin bağlanmasının gerçekleştiği düzeylere getirilmiştir. DNA guanidin süspansiyon silika kolondan geçirilmiş, ardından tuz giderimi için iki kez saf 2-propanol ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Yıkama sonrası 2-propanol silika matrisden uzaklaştırılmıştır. Elüsyon işlemi DNaz ve RNaz'lardan arı su ile 50 µl hacimde gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4. 12. Guanidin bazlı saflaştırma tamponu**

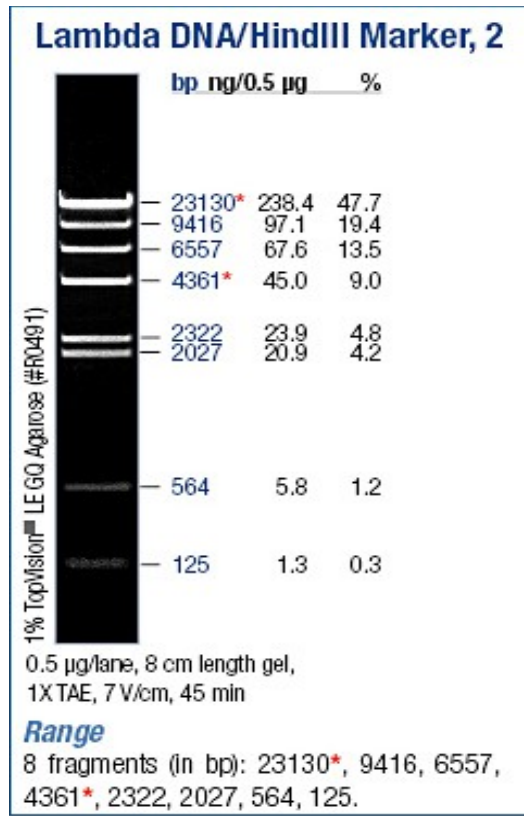
Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	50mM
GuSCN	4.3M
Sodyum Asetat pH 5.2	21.5mM
Bromtimol Mavisi	0.2x
H <sub>2</sub> O	

İzolasyonu tamamlanan nükeik asitlerin kalite ve nicelikleri agaroz jel elektroforezi ve spektrofotometrik yöntemlerle tayin edilmiştir. NanoDrop ile spektrofotometrik ölçümler, örneklerin gerekli dilüsyonları yapılarak 260nm dalgaboyunda gösterdikleri absorbans değerleri dikkate alınmış, nükleik asidin kalitesine ise 260/280 ve 260/230 oranlarına bakılarak karar verilmiştir. 260/280 oranı nükleik asidin protein ile kontaminasyonunu gösterirken, 260/230 oranı nükeik asidin tiosiyanat veya başka organik maddelerce kontamine olup olmadığını göstermektedir.



#### 4.4 Agaroz Jel Elektroforez

Moleküler klonlama deneylerin sırasında elde edilen PCR ürünleri, kesim ürünleri ve izole edilmiş nükleik asit örneklerinin kalite ve nicelik kontrolleri agaroz jel elektroforeziyle ve spektrofotometrik ölçümlerle tayin edilmiştir. Boyutlarının kısa olduğu bilinen PCR ürünleri için (200bp-1000bp) yüksek konsantrasyonlu, PCR ürünü olmayıp sadece izole edilmiş nükleik asitler için (5000bp-10000bp) düşük konsantrasyonlu agaroz jel hazırlanmıştır. Agaroz jel hazırlamak için 5x konsantrasyonda Tris borik Asit-EDTA (TBE) ve 50x konsantrasyonda Tris Asetik Asit-EDTA(TAE) tamponları hazırlanmış ve kullanım öncesi 1x'e distile su ile seyreltilmiştir. PCR ürünleri için TBE bazlı agaroz jel kullanılırken geri kalan nükleik asitler için TAE bazlı agaroz jel kullanılmıştır. Düşük konsantrasyonlu agaroz jel için TAE tamponunda %0.8 konsantrasyonda agaroz ısıtılarak süspanse edilmiş ve jel kasetine dökülüp oda sıcaklığında polimerleşmeye bırakılmıştır. Yüksek konsantrasyonlu agaroz jel için aynı işlem TBE tamponunda ve %2'lik agaroz konsantrasyonunda yapılmıştır. Jeller polimerleştikten sonra yürütme tankına yerleştirilmiş, üzeri jelin hazırlandığı aynı tampon ile kaplanmıştır. 6x yükleme tamponu eşit hacimde karıştırılan nükleik asitler jel kuyucuklarına yüklenmiş, nükleik asit boyut ölçüsü olarak HindIII restriksiyon enzimi ile kesilmiş lambda DNA markörü örneklerin yanına yüklenmiştir. Düşük konsantrasyonlu agaroz jeller 60-70V'de yürütülürken yüksek konsantrasyonlu jeller 90-120V'de yürütülmüş, yükleme boyası jelin bitişine ulaşmadan yürütme işlemi durdurulmuştur. Jellerin boyanıp görüntülenmesi için eser miktarda toz etidiyum bromür içeren TBE tamponu hazırlanmış ve jeller 20-30dk aralığında bu tamponunda bekletilmiştir. Boyanma sonrası jeller 302 nm dalgaboyu ile eksite edilerek görüntülenmiştir (VersaDoc) görüntüleme cihazında UV ışığına 30-50 s maruz bırakılarak görüntülenmiştir. Kullanılan TBE ve TAE tamponlarının içerikleri ve lambda DNA/HindIII moleküler markör bant uzunlukları aşağıdaki çizelgelerde verilmiştir.



Şekil 4. 1. Lambda DNA/HindIII moleküler markör.

Çizelge 4. 13. 5X TBE tampon içeriği

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
Borik Asit	27.5 g
Tris Baz	54 g
EDTA 500mM pH 8.0	20 ml
H <sub>2</sub> O	

Çizelge 4. 14. 50X TAE tampon içeriği

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
Glasiyal Asetik Asit	54.1 ml
Tris Baz	242 g
EDTA 500mM pH 8.0	100 ml
H <sub>2</sub> O	

## 4.5 Klonlama ve Transformasyon

Tez kapsamında, *Escherichia coli*'de otoindükleyici – 2 üretiminin, antimikrobiyal stresine maruz kalan bakteri hücrelerinin sağ kalımına etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, söz konusu lokusta nokta mutasyon nedeni ile  $\Delta luxS$  genotipe sahip *E. coli* DH5 $\alpha$  hücreleri pACYC184/*luxS* düşük kopya sayılı plazmidi ile komplemente edilmiştir.

#### 4.5.1 *luxS* Komplementasyonu

Nokta mutasyonu sonucu *luxS* defektif olan DH5α *ΔluxS* suşa *luxS* komplementasyonu amacıyla yapılan deneylerde öncelikle *E. coli* K12 hücrelerinden izole edilmiş kromozomal DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı PCR ile *luxS*, NCBI Genbank NC\_000913 numaralı kayıttaki dizilere uygun olarak kendi doğal promotör dizisini ve HindIII restriksiyon enzim kesim dizilerini de içerecek şekilde *luxSF-luxSR* primerleriyle çoğaltılmıştır.

S-ribozilhomosistein liyaz enzimini kodlayan *luxS*'in *E. coli* DH5α hücrelerine aktarılmasında pACYC184 omurgası kullanılmıştır. Bu plazmit, p15A replikasyon başlangıç noktası ile seçici belirteç olarak tetrasiklin ve kloramfenikol direnç kasetlerini içermektedir. Tetrasiklin direnç kaseti, membrana bağlı bir dışaakiş kanalı kodladığından hücre için otoindükleyici ve siprofloksasin konsantrasyonları üzerinde öngörülemeyen etkilerde bulunma olasılığı nedeni ile bu çalışmada kullanılmamıştır. Plazmit omurgası, tetrasiklin direnç kasetinin hiç bir kısmını kodlamayacak şekilde PCR ile çoğaltılarak moleküler klonlamada kullanılmıştır. Plazmit ve *luxS* çoğaltma ürünlerinin HindIII enzimi ile 37 °C sıcaklıkta bir saat sindirilmesinin ardından plazmit omurgası, ligasyon sırasında kendi üzerine kapanmasının önlenmesi amacı ile karides alkalen fosfatı ile muamele edilmiştir. Alkalin fosfatın ısı ile inaktive edilmesinin ardından kesim ürünlerinin özgülüğünün belirlenmesi ve nicelendirilmesi için agaroz jel elektroforezi ve spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir. Buna göre sindirilmiş ürünler, 1:3, 1:6 ve 1:10 plazmit : *luxS* molar oranlarında ligasyon tepkimesine eklenmiştir.

Ligasyon reaksiyonu 22°C sıcaklıkta bir saat ve ardından 65°C sıcaklıkta 10dk boyunca gerçekleşmiştir. Ligasyon sonucu pACYC184 vektörüne yerleştirildiği düşünülen *luxS* dizisinin varlığını doğrulamak için hem plazmitten hem de *luxS* dizisinden komplementer diziler içeren primerler tasarlanmış (p184CF-p184CR), PCR ile plazmite yerleşen genin varlığı kanıtlanmıştır. Tüm primer tasarım işlemleri PearlPrimer ve CLC Sequence Viewer programlarında yapılmıştır. Hazırlanan *luxS* dizisi içeren vektörler DH5α *ΔluxS* suşuna transformasyon yöntemiyle aktarılmıştır. Transformasyonun başarılı olup olmadığı pACYC184 vektörünün bulundurduğu kloramfenikolden yararlanılarak seçici katı LB besiyeri kullanılarak anlaşılmıştır. *luxS* promotör bölgesinin klonlamaya dahil edilmesinin nedeni bu genin ürününün promotör üzerinde etki yaparak geri besleme mekanizması oluşturması ve genin ifade miktarını düzenliyor olmasıdır. Genin

plazmite yerleşme yönünün gen ifadesine etkisi olmadığı için genin her iki ucunda farklı restriksiyon enzim kesim bölgesi olması yerine tek bir enzim (HindIII) kesim bölgesi kullanımı tercih edilmiştir. pACYC184 vektöründen kloramfenikol antibiyotik direnç kasedi yerine tetrasiklin antibiyotik direnç kasedinin çıkarılmasına, bakteri hücrenin tetrasikline karşı gösterdiği direnç mekanizması nedeniyle karar verilmiştir. *Escherichia coli*'nin tetrasikline karşı direnç mekanizması hücre zarındaki ve duvarındaki pompa proteinlerinin hücreye giren antibiyotiği dışarı atması üzerine kuruludur, ve bu mekanizmanın ileriki deneyleri etkileme ihtimaline karşı tetrasiklin antibiyotik direnç kasedi saf dışı bırakılmış ve bakteri hücrenin antibiyotik varlığı karşısında pompa proteinlerinin ifadesini artırmasının önüne geçilmeye çalışılmıştır. HindIII kesim enzimi ile kesim sonrası vektörün karides alkalin fosfataz ile defosforilize edilmesi vektörün kesilen uçlarından kendi üstüne tekrar kapanmasını engellemek ve *luxS* dizisini problemsiz olarak kabul etmesi amacıyla yapılmıştır. Karides alkalin fosfataz vektörün HindIII ile kesilmiş uçlarında oluşan fosfat monoesterleri uzaklaştırarak vektörün kendi üstüne ligasyon ile kapanmasını önlemek için yaygın olarak klonlama deneylerinde kullanılmaktadır.

Kullanılan primerler, kurulan restriksiyon ve saflaştırma reaksiyon çizelgeleri, hazırlanan PCR protokol çizelgesi, sıcaklık ve konsantrasyon optimizasyon aralıkları ve PCR döngüsünün sıcaklık ve zamanlamaları aşağıda verilmiştir.

**Çizelge 4. 15. *luxS* komplementasyon, vektör çoğaltma ve kontrol primerlerinin dizileri ve bağlanma sıcaklıkları**

Primer	Primer Dizisi	Bağlanma Sıcaklığı (°C)
<i>luxSF</i>	5'-ATCAAGCTTATACTCAGACTCGCCTGGGA-3'	62.44
<i>luxSR</i>	5'- ATCAAGCTTAAGCTTCTAGATGTGCAGTTCCTGCA AC-3'	62.01
p184tetF	5'-ACTGCGTTAGCAATTTAACTGTGA-3'	61.80
p184tetR	5'-ATCAAGCTTACCTCGCTAACGGATTCACC-3'	62.44

**Çizelge 4. 16. PCR Protokolü. H<sub>2</sub>O ve PCR Tamponu dışındaki malzemeler optimizasyon gereği değişik konsantrasyonlarda kullanılmıştır**

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
H <sub>2</sub> O	
10 x PCR Tamponu*	1X
MgCl <sub>2</sub>	1,5mM
dNTP	0,75mM
İleri Primer	0,6mM
Geri Primer	0,6mM
Taq DNA Polimeraz	0,1U/μl
Kalıp DNA	0,575μg/μl

\*100 mM Tris-Cl pH8.3 (25 °C), 500 mM KCl, %0.01 jelatin.

**Çizelge 4. 17. PCR Sıcaklık döngüsü.**

İşlem	Sıcaklık(°C)	Süre(s)	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	94	120	1
Denatürasyon	94	15	39
Bağlanma	a*	b*	
Uzama	72	60	
Son uzama	72	300	1

\* Bağlanma sıcaklığı ve uzama süresi kullanılan primer çifti ve kalıp DNA'nın bazçift uzunluğuna göre optimize edilmiştir.

**Çizelge 4. 18. Restriksiyon Enzim ile kesim reaksiyonu. Tez çalışmasında HindIII kesim enzimi kullanılmıştır. DNA olarak vektör ve *luxS* dizileri ayrı ayrı reaksiyonlar halinde kurulup kesim yapılmıştır.**

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
HindIII Kesim Enzimi	10 Ünite
10 x NEB2 Tamponu*	1 x
BSA	100 μg/ml
DNA	0,3-5 μg/μl
H <sub>2</sub> O	

\* 50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, pH 7.9 (25°C)

**Çizelge 4. 19. Karides alkalen fosfataz ile vektörün defosforilasyon reaksiyonu.**

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
SAP enzimi	4 Ünite
SAP Tamponu (10x)*	1 x
DNA	200 µg/ml
H <sub>2</sub> O	

\* 50 mM potasyum asetat, 20 mM Tris-asetat, 10 mM magnezyum asetat, 100 µg/ml BSA, pH 7.9 (25°C)

**Çizelge 4. 20. Ligasyon Reaksiyonu. PACYC184Δtet vektörünün ve amplifiye *luxS* dizisinin molariteleri  $\mu\text{g DNA} \times \text{pmol} / 660 \text{pg} \times 10^6 \text{pg} / 1 \mu\text{g} \times 1 / \text{N} = \text{pmol DNA}$  formülüne göre hesaplanmıştır. N nükleotid sayısıdır ve 660pg/pmol bir nükleotid çiftinin ortalama ağırlığıdır**

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
T4 Ligaz enzimi	0,5 Ünite
T4 Ligaz tamponu (10x)*	1x
PACYC184Δtet	0,05pmol
Amplifiye <i>luxS</i>	0,2pmol
H <sub>2</sub> O	

\*50mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ATP, 10mM DTT, pH 7.5 (25°C)

#### 4.5.2 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ Hücrelerinin Plazmit DNA'sı ile Transformasyonu

Oluşturulan vektörlerin bakterilere transformasyonu için PEG 6000, DMSO ve çift değerlikli iyonlar ile ısı şoku uygulanmasına dayanan transformasyon protokolünden yararlanılmıştır<sup>89</sup>.

Buyyon içinde üretilmiş bir gecelik *E. coli* DH5 $\alpha$  kültürü, 50 ml LB buyyon içerisinde 100 kat dilüe edilerek 37 °C sıcaklıkta çalkalanarak inkübe edilmiştir. Hücre yoğunluğu, bulanıklık ölçümleri ile takip edilmiş, 600 nm dalgaboyunda 0.5 – 0.6 absorbans ünitesi bulanıklığa ulaşmış kültürler kompetan hale getirilmek üzere 580 x g ivmesi 10 dakikada 4 °C sıcaklıkta pellet haline getirilmiştir. Hücre pelleti, 500  $\mu$ l TSS içerisinde süspanse edilmiştir. Buz üzerinde 30 dk inkübasyonun ardından en fazla 5  $\mu$ l ligasyon ürünü 100  $\mu$ l TSS kompetan hücre süspansiyonu ile 10 ml hacmindeki cam tüplerde karıştırılmıştır. Kompetan hücreler plazmit DNA'sı ile 60 dk buz üzerinde inkübasyonun ardından 42 °C sıcaklıkta 90 sn ısı şokuna maruz bırakılmıştır. Kültürler, 900  $\mu$ l SOC buyyon eklenerek 60 dk 37 °C sıcaklıkta çalkalanarak inkübasyonun ardından 50  $\mu$ g/ml kloramfenikol içeren LB agar plaklarına ekilmiştir.

**Çizelge 4. 21. TSS İçeriği**

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
PEG-6000	%10
MgCl <sub>2</sub>	10mM
MgSO <sub>4</sub>	10mM
DMSO	%5
LB Buyyon Besiyeri	



**Çizelge 4. 22. SOC Buyyon besiyeri içeriği**

Malzeme	Çalışan Konsantrason
Maya Özütü	5g/l
Tripton	20g/l
NaCl	0,5g/l
NaOH	0,001N
Glukoz	20mM
KCl	3mM
MgCl <sub>2</sub>	10mM
MgSO <sub>4</sub>	10mM
H <sub>2</sub> O	

#### 4.6 JM109, DH5 $\alpha$ $\Delta luxS$ , DH5 $\alpha$ pACYC184/ $luxS^+$ ve DH5 $\alpha$ pACYC184 Suşlarının Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi

JM109, DH5 $\alpha$   $\Delta luxS$ , DH5 $\alpha$  pACYC184/ $luxS^+$  ve DH5 $\alpha$  pACYC184 suşlarının üreme eğrilerinin saptanması amacıyla her bir bakteri suşunun, %1 glukoz ve 1mM borik asit içeren LB buyyonda 37°C sıcaklıkta çalkalayıcıda bir gecelik kültürleri üretimiştir. Bir gecelik başlangıç kültürlerinin 600 nm dalgaboyunda bulanıklık ölçümleri yapılmış, üreme eğrisinin kaydedileceği kültürler, taze %1 glukoz ve 1 mM borik asitli LB buyyonda 0.02 absorbans ünitesi bulanıklık elde edilecek şekilde başlangıç kültürlerden uygun miktarda hücrenin aktarılması ile inoküle edilmiştir. İnokülasyonun ardından kültürler, 37 °C sıcaklıkta çalkalayıcı güzerinde inkübe edilmeye başlanmıştır. Sigmoidal üreme eğrisinin durağan fazına girilene kadar her saat başı bulanıklık ölçümü yapılmıştır. Son bulanıklık ölçümü ertesi gün gerçekleştirilmiştir.

#### 4.7 Biyoışıma (Biyolüminesans) Ölçümü

Bakteri kültür süpernatantlarında OI-2 moleküllerinin saptanması için biyoışıma özelliğine sahip *Photobacterium phosphoreum* izolatu kullanılmıştır. <sup>63</sup>.

Üreme eğrisi deneyinde her suştan toplanmış olan süpernatantlardaki OI-2 molekölü varlığını kanıtlamak amacıyla, %3 deniz tuzlu LB agar besiyerinde bir gece 22 °C sıcaklıkta üretilmiş olan *Photobacterium phosphoreum* kolonilerinden %3 deniz tuzu içinde bulanık süspansyon hazırlanmıştır. OI-2 üretimi için test edilecek *E. coli* kültür üst fazından 89 µl ile 10 µl %30 deniz tuzu ve bulanık *P. phosphoreum* kültür süspansiyonundan 96 kuyucuklu mikropkaka üzerinde 1 µl karıştırılmıştır. *P. phosphoreum* ışması 10 s pozlama süresi boyunca sayısal kamera yardımı ile kaydedilmiştir. Elde edilen görüntülerdeki ışmanın nicelendirilmesi ImageJ yazılımı yardımı ile gerçekleştirilmiştir.

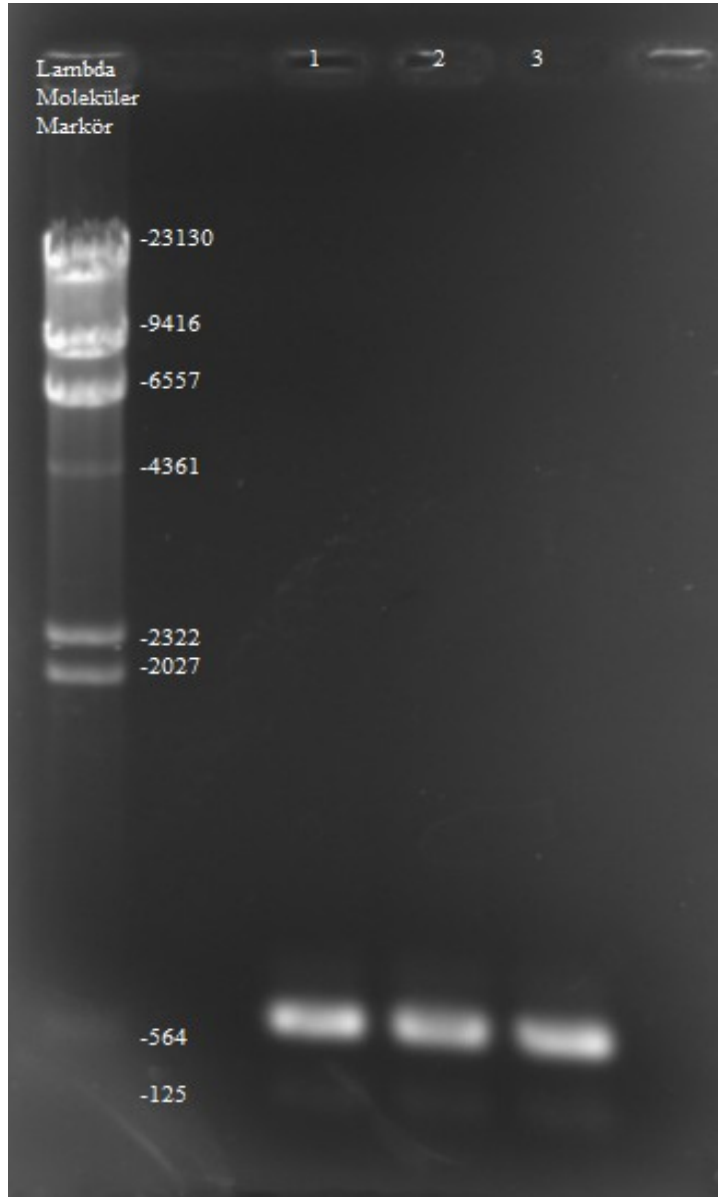
#### 4.8 Siprofloksasin Maruziyetinde Sağ Kalan Hücre Sayısı Belirlenmesi

Çalışmaya alınan JM109, DH5α *ΔluxS*, DH5α pACYC184/*luxS*<sup>+</sup> ve DH5α pACYC184 suşları 90 dakika boyunca ölçülen MİK düzeylerinin dört katı konsantrasyonda siprofloksasine maruz bırakılmış,inkübasyon süresinin sonunda her bir kültürde antimikrobiyal etkisine karşı direnme fenotipi (persistans) göstererek üreme yeteneğini kaybetmeyen bakteri sayısı belirlenmiştir. Dört suş 50ug/ml borik asit ve 10 mg/ml glikoz içeren 10ml sıvı LB besiyerinde yaklaşık bir saat boyunca 35°C'de çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Çalkalayıcı üzerinde 35 °C sıcaklıkta inkübe edilen kültürlerin bulanıklıkları takip edilerek 0.2 absorbans birimine ulaştığında 4 µg/ml konsantrasyonda siprofloksasin eklenmiştir. Aynı inkübasyon koşullarında antimikrobiyal etkisine 90 dk boyunca maruz bırakılan kültürlerin sürenin sonunda 10 ve 100 kat dilüsyonları antibiyotiksiz LB agara ekilmiştir. Bir gece 35 °C sıcaklıkta inkükbe edilen katı besiyerlerinde koloni sayımı gerçekleştirilerek her bir suş için mikrolitredeki koloni oluşturan ünite sayısı belirlenmiştir.

## 5 ARAŞTIRMA BULGULARI

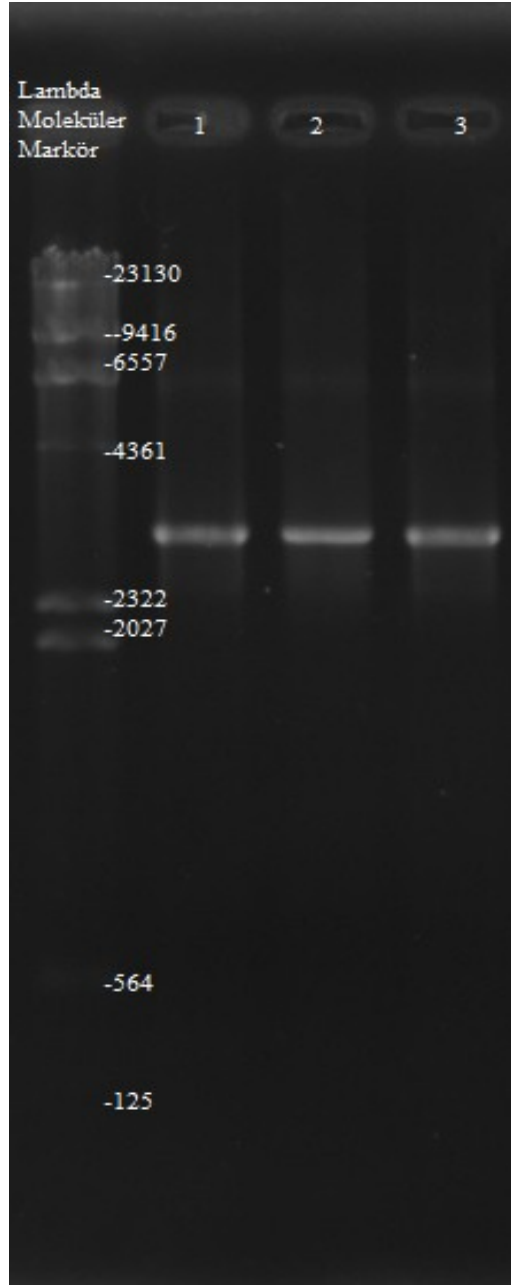
### 5.1 *luxS* Geni Klonlaması ve Doğrulaması

Söz konusu lokusta bulundurduğu nokta mutasyon nedeni ile fonksiyonel *luxS* ürünü S-ribozilhomositeinaz ifadelendiremeyen DH5a  $\Delta luxS$  suşuna fonksiyonel *luxS* genini aktarmak için K12 suşu genomu kalıp olarak kullanılarak promotor bölgesi ve *luxS* kodlayan dizisi her iki uçta HindIII restriksiyon enzim kesim motifi içerecek şekilde çoğaltılmıştır (Şekil 5. 1.)



Şekil 5.1. 1, 2, 3 *luxS* amplifiye ürünleri. %2'lik TBE Agaroz jel.

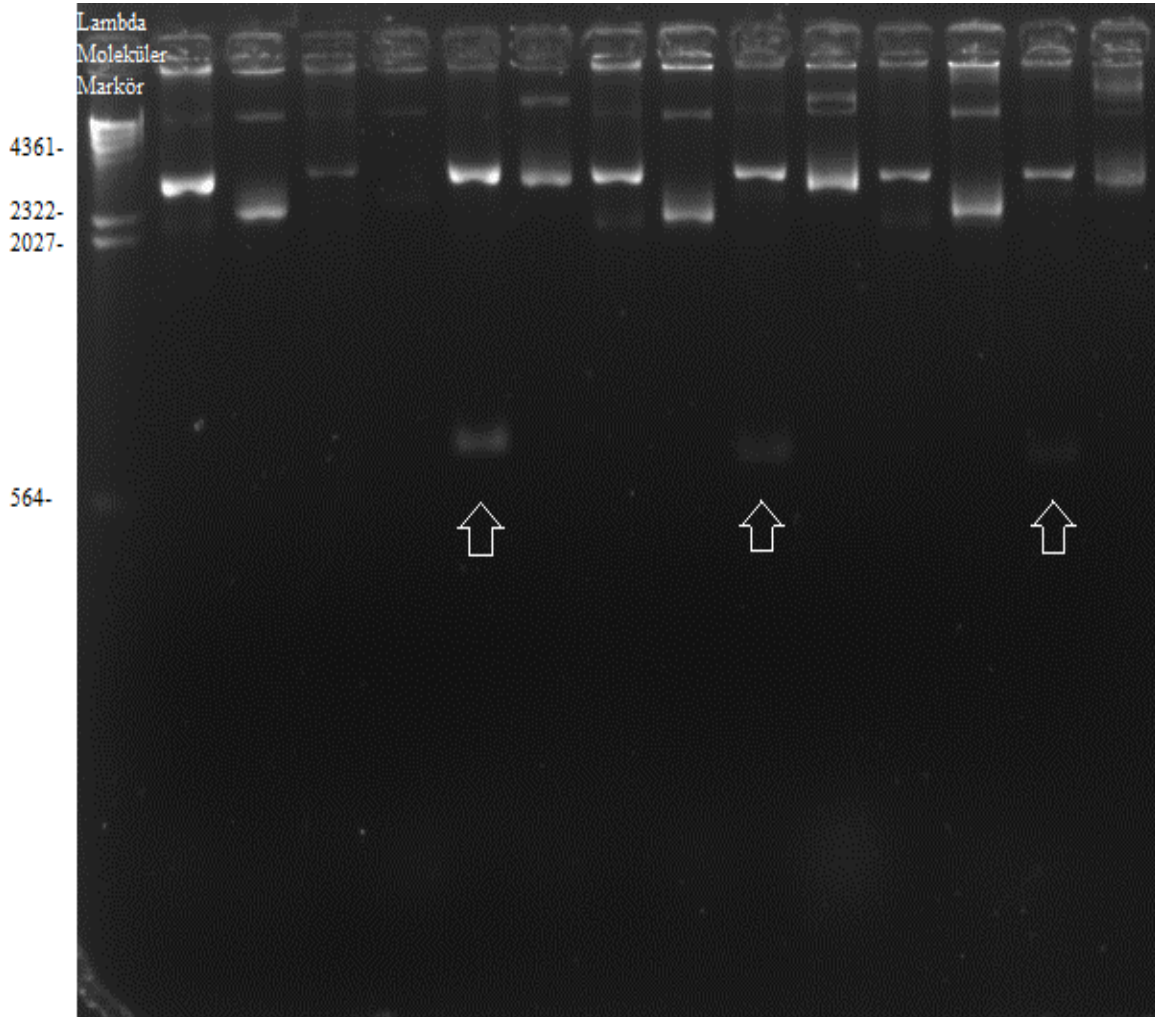
Çoğaltılan *luxS*'iyerleştirmek amacıyla pACYC184 vektörü, tetrasiklin direnç kasedini dışarıda bırakan şekilde ve uçlarında HindIII kesim bölgesi içerecek şekilde çoğaltılmıştır. Normalde 4245bp'lik bant hizasında görülmesi gereken plazmidten 1190bp'lik tetrasiklin kaseti çıkarıldığı için elde kalan dizi yaklaşık 3000bp'lik bant hizasında görülmektedir (Şekil 5. 2.).



**Şekil 5.2.** 1, 2, 3 pACYC184 $\Delta$ tet amplifiye ürünleri. %0,8'lik TAE Agaroz jel.

Seçici LB plakalarda üreyen kolonilere plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra, plazmitler HindIII restriksiyon enzimiyle sindirilmiştir. Reaksiyon sonucu jel görüntülerinde *luxS* kendi promotor dizisiyle birlikte pACYC184 $\Delta$ tet'ten ayrılmış, pACYC184 $\Delta$ tet 3055bp'lik bir bant oluştururken *luxS* yaklaşık 450bp'lik bant oluşturmuştur. İki diziyeye de ait bantın görüldüğü plazmitlere sahip

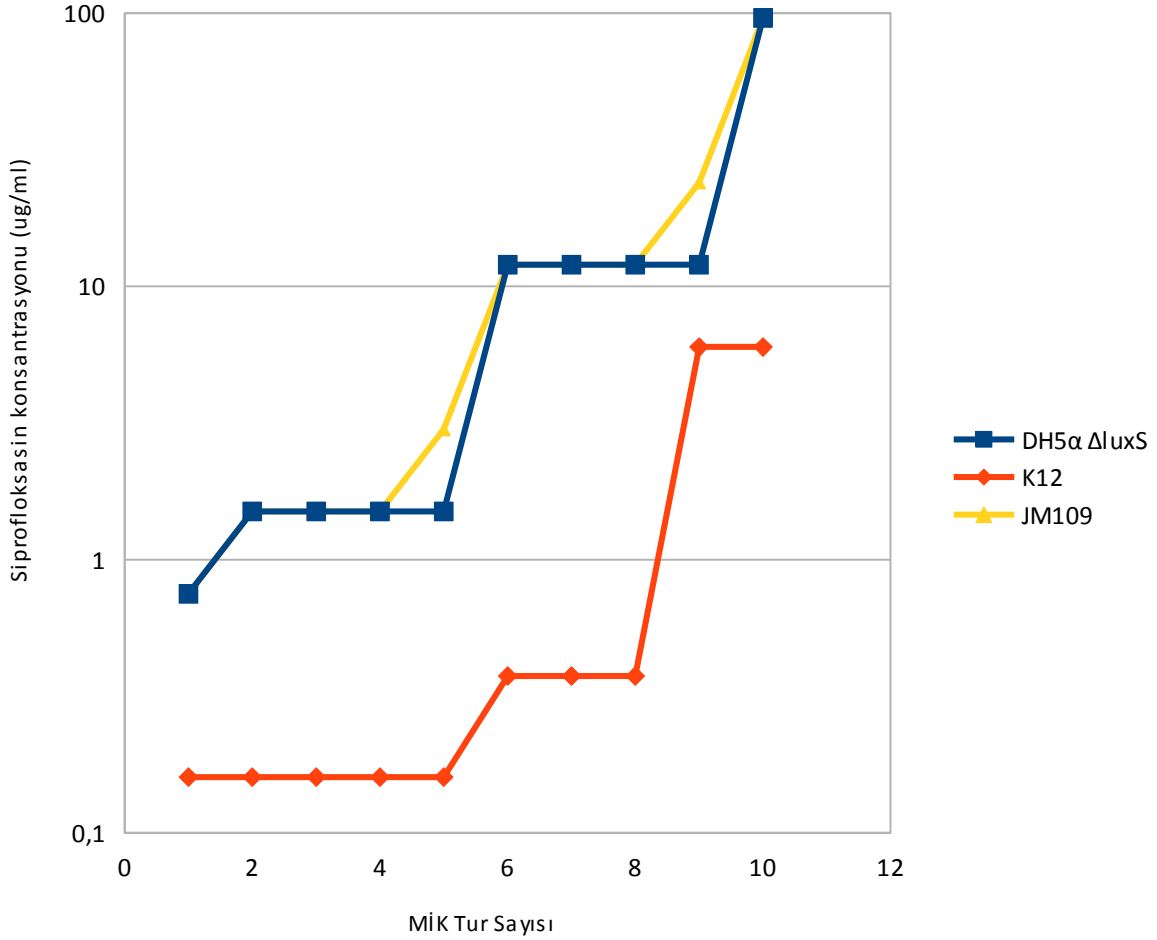
kolonilerle deneyere devam edilmiştir (Şekil 5. 3.).



Şekil 5. 3. HindIII kesimi sonrası birbirinden ayrılan *luxS* ve pACYC184 $\Delta$ tet plazmitlerinin görüntüsü. %2'lik TAE Agaroz jel.

## 5.2 Buyyon Mikrodilüsyon Deneyiyle *Escherichia coli* JM109 ve DH5 $\alpha$ Suşlarının Siprofloksasin Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Subletal konsantrasyonda siprofloksasin maruziyet ile basamaklı olarak dirençli mutantların, deney boyunca ve sonunda JM109, DH5 $\alpha$   $\Delta luxS$  ve K12 suşlarının siprofloksasine karşı duyarlılıkları antibiyotik konsantrasyonu olarak kaydedilmiştir (Şekil 5. 4.).

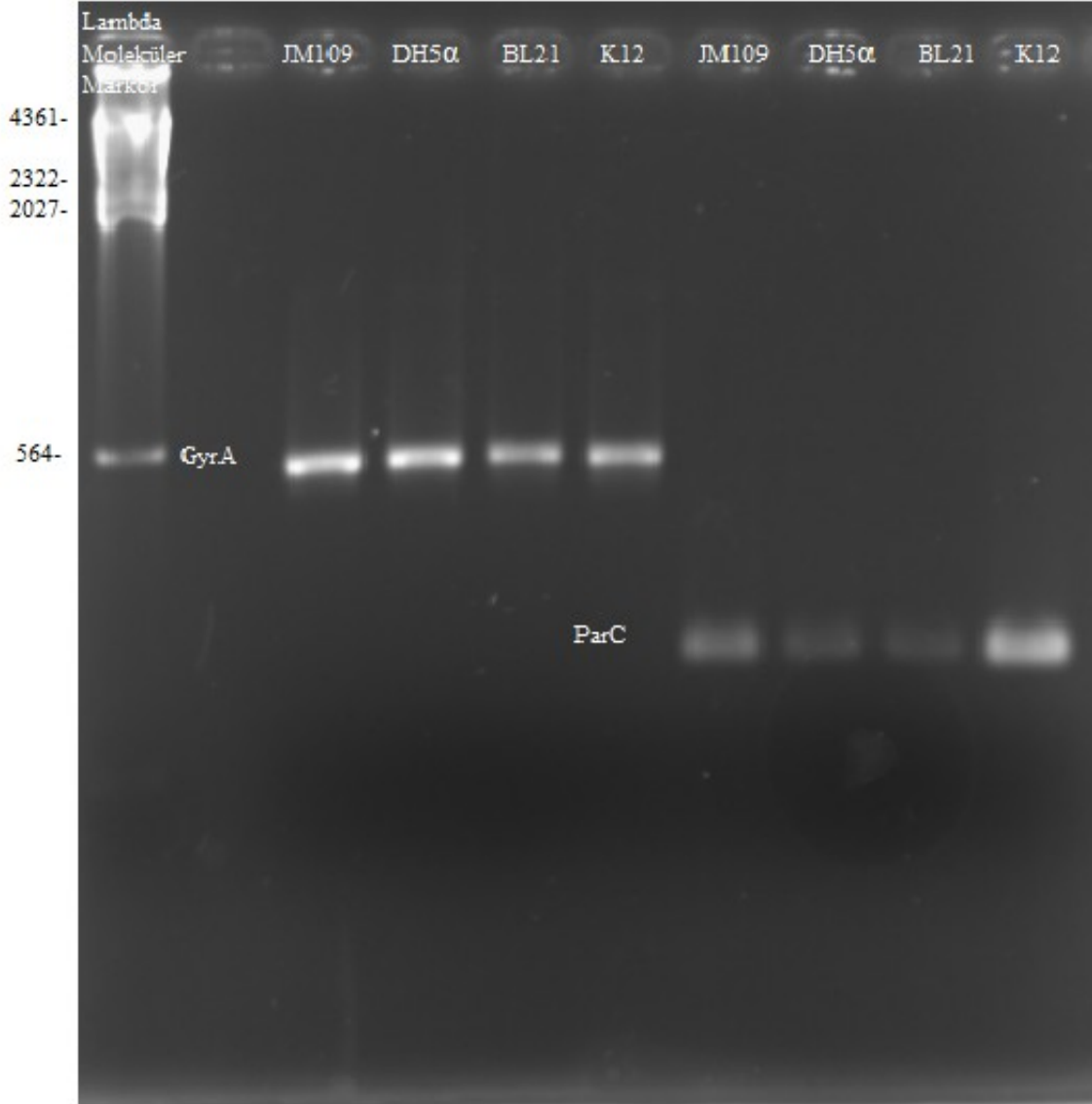


Şekil 5. 4. JM109, DH5 $\alpha$   $\Delta luxS$  ve K12 suşlarının mutant seçimi deneyi boyunca subletal doz siprofloksasin konsantrasyon değerlerinin basamaklı olarak yükselmesi.



### 5.3 *gyrA* ve *parC* Dizi Analizleri

JM109, DH5 $\alpha$  *luxS* ve K12 suşlarının MİK deneyi öncesi ve sonrası *gyrA*'da 83. ve 87. kodonlarında ve *parC*'de 80. ve 84. kodonlarında nokta mutasyonları tespit etmek amacıyla dizi analizi gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 5. 6.** 1., 2., 3. ve 4. kuyular sırasıyla subletal dozda siprofloksasin maruziyeti sonrası *gyrA* dizisi çoğaltılan JM109, DH5 $\alpha$  *luxS*, BL21 ve K12 suşlarını, 5., 6., 7. ve 8. kuyular sırasıyla subletal dozda siprofloksasin maruziyeti sonrası *parC* dizisi çoğaltılan JM109, DH5 $\alpha$  *luxS*, BL21 ve K12 suşlarının dizi analizi için saflaştırma sonrası bantlarını göstermektedir. %2'lik TBE Agaroz jel.

Dizileme sonrası subletal dozda siprofloksasin maruziyetinde seçilen mutant JM109, DH5 $\alpha$  *luxS*

ve K12 suşlarının *gyrA* dizi analizleri BLAST algoritması kullanılarak gerçekleştirilmiştir. E. coli'de *gyrA* 83. kodonu Serin (Ser) amino asidini, 87. kodonu Aspartik asit (Asp) amino asidini kodlamakta, *parC* 80. kodonu Serin (Ser), 84. kodonu Glutamik asit (Glu) amino asitlerini kodlamaktadır. JM109 ve DH5α *AluxS* suşlarının *gyrA* dizisindenokta baz mutasyonları, K12 suşunun *gyrA* dizisinde kodon delesyonu gözlemlenmiştir.

Sequence ID: lc|177103 Length: 498 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 496 [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
911 bits(493)	0.0	495/496(99%)	0/496(0%)	Plus/Plus
Query 42	GGAAGAGCTGAAGAGCTCCTATCTGGATTATGCGATGTCGGTCATTGTTGGCCGTGCGCT	101		
Sbjct 1	GGAAGAGCTGAAGAGCTCCTATCTGGATTATGCGATGTCGGTCATTGTTGGCCGTGCGCT	60		
Query 102	GCCAGATGTCGAGATGGCCTGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACGT	161		
Sbjct 61	GCCAGATGTCGAGATGGCCTGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACGT	120		
Query 162	ACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTGCGTTGGTGACGTAAT	221		
Sbjct 121	ACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTGCGTTGGTGACGTAAT	180		
Query 222	CGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTCGGCGGTCTATGACACGATCGTCCGCATGGCGCA	281		
Sbjct 181	CGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTCGGCGGTCTATAACACGATCGTCCGCATGGCGCA	240		
Query 282	GCCATTCTCGCTGCGTTATATGCTGGTAGACGGTCAGGGTAACTTCGGTTCTATCGACGG	341		
Sbjct 241	GCCATTCTCGCTGCGTTATATGCTGGTAGACGGTCAGGGTAACTTCGGTTCTATCGACGG	300		
Query 342	CGACTCTGCGGCGGCAATGCGTTATACGGAAATCCGTCTGGCGAAAATTGCCCATGAACT	401		
Sbjct 301	CGACTCTGCGGCGGCAATGCGTTATACGGAAATCCGTCTGGCGAAAATTGCCCATGAACT	360		
Query 402	GATGGCCGATCTCGAAAAAGAGACGGTCGATTCGTTGATAACTATGACGGCACGGAAAA	461		
Sbjct 361	GATGGCCGATCTCGAAAAAGAGACGGTCGATTCGTTGATAACTATGACGGCACGGAAAA	420		
Query 462	AATTCGGACGTCATGCCAACCAAAATTCCTAACCTGCTGGTGAACGGTCTTCCGGTAT	521		
Sbjct 421	AATTCGGACGTCATGCCAACCAAAATTCCTAACCTGCTGGTGAACGGTCTTCCGGTAT	480		
Query 522	CGCCGTAGGTATGGCA	537		
Sbjct 481	CGCCGTAGGTATGGCA	496		

**Şekil 5. 7.** BLAST algoritması kullanılarak yapılan JM109 suşunun subletal doz siprofloksasin ile mutant seçimi deneyi sonrası çoğaltılan *gyrA* dizisi ve aynı suşun test öncesi *gyrA* dizi hizalaması.

Sequence ID: lc|18747 Length: 481 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 481 [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
878 bits(475)	0.0	479/481(99%)	0/481(0%)	Plus/Plus
Query 57	CTCCTATCTGGATTATGCGATGTCGGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGTCGGAGA	116		
Sbjct 1	CTCCTATCTGGATTATGCGATGTCGGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGTCGGAGA	60		
Query 117	TGGCCTGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACGTAAGGCAATGACTG	176		
Sbjct 61	TGGCCTGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACGTAAGGCAATGACTG	120		
Query 177	GAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCC	236		
Sbjct 121	GAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCC	180		
Query 237	CCATGGTGACTCGGCGGTCTATGACACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGTGCG	296		
Sbjct 181	CCATGGTGACTCGGCGGTCTATGACACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGTGCG	240		
Query 297	TTATATGCTGGTAGACGGTCAGGGTAACTTCGGTTCTATCGACGGCGACTCTGCGGCGGC	356		
Sbjct 241	TTATATGCTGGTAGACGGTCAGGGTAACTTCGGTTCTATCGACGGCGACTCTGCGGCGGC	300		
Query 357	AATGCGTTATACGGAAATCCGTCTGGCGAAAATTGCCCATGAACTGATGGCCGATCTCGA	416		
Sbjct 301	AATGCGTTATACGGAAATCCGTCTGGCGAAAATTGCCCATGAACTGATGGCCGATCTCGA	360		
Query 417	AAAAGAGACGGTCGATTCGTTGATAACTATGACGGCACGGAAAAAATCCGGACGTCAT	476		
Sbjct 361	AAAAGAGACGGTCGATTCGTTGATAACTATGACGGCACGGAAAAAATCCGGACGTCAT	420		

**Şekil 5. 8.** BLAST algoritması kullanılarak yapılan DH5 $\alpha$  *AhuxS* suşunu subletal doz siprofloksasin ile mutant seçimi deneyi sonrası çoğaltılan *gyrA* dizisi ve aynı suşun test öncesi *gyrA* dizi hizalaması.

Sequence ID: lc|27075 Length: 498 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 498 [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
905 bits(490)	0.0	498/501(99%)	3/501(0%)	Plus/Plus
Query 40	GAGGAAGAGCTGAAGAGCTCCTATCTGGATTATGCGATGTCGGTCATTGTTGGCCGTGCG	99		
Sbjct 1	GAGGAAGAGCTGAAGAGCTCCTATCTGGATTATGCGATGTCGGTCATTGTTGGCCGTGCG	60		
Query 100	CTGCCAGATGTCGAGATGGCCTGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAAC	159		
Sbjct 61	CTGCCAGATGTCGAGATGGCCTGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAAC	120		
Query 160	GTACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTA	219		
Sbjct 121	GTACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTA	180		
Query 220	ATCGGTAAATACCATCCCCATGGTACTCGGCGGTCTATGACACGATCGTCCGCATGGCG	279		
Sbjct 181	ATCGGTAAATACCATCCCCATGGTACTCGGCGGTCTATGACACGATCGTCCGCATGGCG	237		
Query 280	CAGCCATTCTCGCTGCGTTATATGCTGGTAGACGGTCAGGGTAACTTCGGTTCTATCGAC	339		
Sbjct 238	CAGCCATTCTCGCTGCGTTATATGCTGGTAGACGGTCAGGGTAACTTCGGTTCTATCGAC	297		
Query 340	GGCGACTCTGCGGCGGCAATGCGTTATACGAAATCCGTCTGGCGAAAATGCCCATGAA	399		
Sbjct 298	GGCGACTCTGCGGCGGCAATGCGTTATACGAAATCCGTCTGGCGAAAATGCCCATGAA	357		
Query 400	CTGATGGCCGATCTCGAAAAAGAGACGGTCGATTTTCGTTGATAACTATGACGGCACGGAA	459		
Sbjct 358	CTGATGGCCGATCTCGAAAAAGAGACGGTCGATTTTCGTTGATAACTATGACGGCACGGAA	417		
Query 460	AAAATTCGGGACGTCATGCCAACCAAAATTCCTAACCTGCTGGTGAACGGTTCTTCCGGT	519		
Sbjct 418	AAAATTCGGGACGTCATGCCAACCAAAATTCCTAACCTGCTGGTGAACGGTTCTTCCGGT	477		
Query 520	ATCGCCGTAGGTATGGCAACC	540		
Sbjct 478	ATCGCCGTAGGTATGGCAACC	498		

Şekil 5. 9. BLAST algoritması kullanılarak yapılan K12 suşunu subletal doz siprofloksasin ile mutant seçimi deneyi sonrası çoğaltılan *gyrA* dizisi ve aynı suşun test öncesi *gyrA* dizi hizalaması.

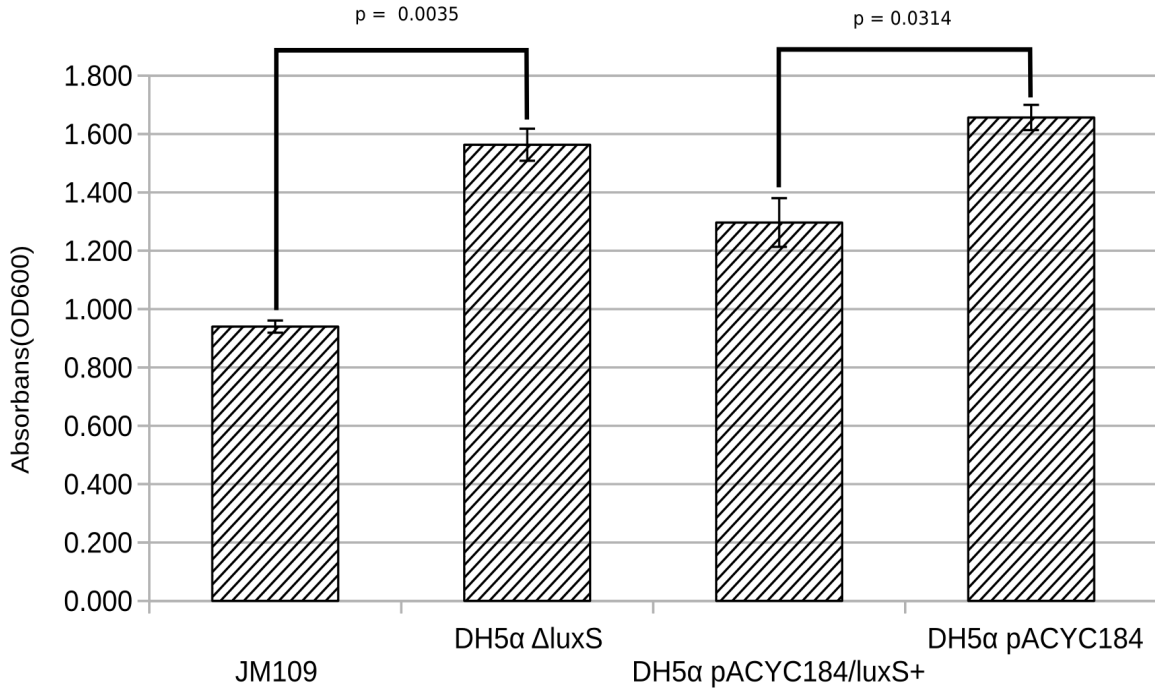
Dizileme sonrası subletal dozda siprofloksasin maruziyetinde seçilen mutant JM109, DH5α *AlexS* ve K12 suşlarının *parC* dizi analizleri BLAST algoritması kullanılarak gerçekleştirilmiştir. JM109, DH5α *AlexS* ve K12 suşlarının *parC* dizisinde nokta baz mutasyonları gözlemlenmiştir. Dizi hizalaması sonucunda M109, DH5α *AlexS* ve K12 suşlarında ortaya çıkan baz mutasyonları ve delesyonlar aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 5. 1.).

	<b>GyrA 83. kodon</b>	<b>GyrA 87. kodon</b>	<b>GyrA diğ er kkodonlar</b>
<b>JM109</b> (recA-, luxS+)		GAC->AAC (Aspartik Asit->Asparajin)	
<b>DH5alfa</b> (recA-, luxS-)		GAC->AAC (Aspartik Asit->Asparajin)	TCT->TAT (Serin->Tirozin)
<b>K12</b> (recA+, luxS+)	TCG-> -- (Serin delesyonu)		
	<b>ParC 80. kodon</b>	<b>ParC 84. kodon</b>	<b>ParC diğ er kodonlar</b>
<b>JM109</b> (recA-, luxS+)		GAA->GAG(Glutamik asit->Glutamik asit)	
<b>DH5alfa</b> (recA-, luxS-)		GAA->GAG(Glutamik asit->Glutamik asit)	
<b>K12</b> (recA+, luxS+)		GAA->GAG(Glutamik asit->Glutamik asit)	

**Çizelge 5. 1.** *gyrA* ve *parC* genlerinin M109, DH5α *ΔluxS* ve K12 suşları için subletal doz siprofloksasin ile mutant seçimi deneyi sonrası dizi hizalamasında bulunan baz mutasyonları ve delesyonlar.

#### 5.4 JM109 ile DH5α $\Delta luxS$ Suşlarının ve DH5α pACYC184/ $luxS^+$ ile DH5α pACYC184 Mutantlarının Çoğalma Hızı Tespiti

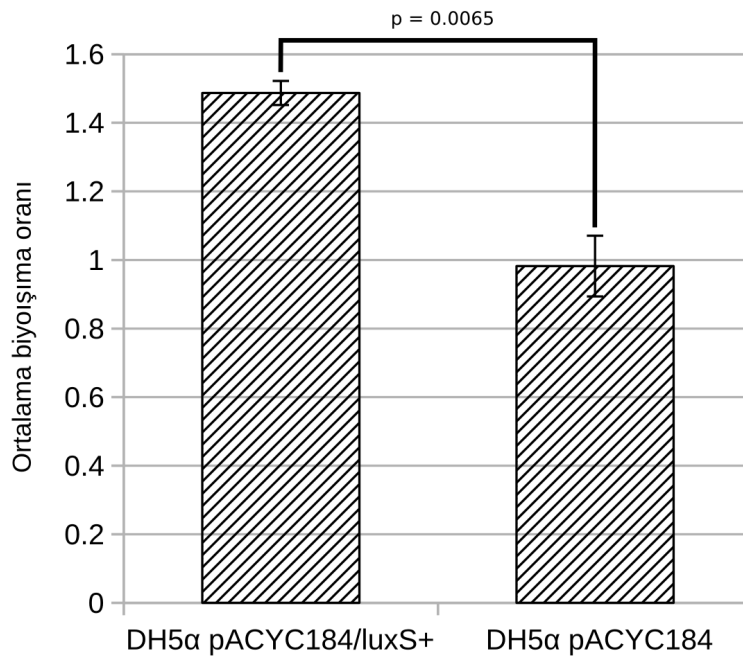
JM109, DH5α  $\Delta luxS$ , DH5α pACYC184/ $luxS^+$  ve DH5α pACYC184 suşlarının gece boyu çoğalarak oluşturdukları biyokütlenin spektrofotometrik ölçümle saptanan ortalama bulanıklık değerleri Şekil 5.13'te verilmiştir. Fonksiyonel S-ribozilhomosisteinaz enzimine sahip olmayan ve otoindükleyici – 2 üretimi yapamayan *E. coli* DH5α  $\Delta luxS$  suşunun  $1.5633 \pm 0.0549$  absorbans ünitesi bulanıklığa kadar üreyerek, kendisi gibi *E. coli* K12'den türetilmiş bir suş olan, ancak otoindükleyici – 2 üreterek  $0.9400 \pm 0.0208$  absorbans ünitesi bulanıklığa kadar üreme gösteren *E. coli* JM109'dan daha yüksek hücre yoğunluklarında plato fazına girdiği saptanmıştır ( $p = 0.0035$ ). Benzer şekilde, bir gecelik kültürde *E. coli* DH5α suşunun pACYC184/ $luxS$  plazmit vektörü ile transforme edilmesi ile oluşturulan otoindükleyici – 2 üretebilir izogenik mutant suşun  $1.2967 \pm 0.0835$  absorbans ünitesi bulanıklıkta üreyerek,  $1.6567 \pm 0.0433$  absorbans ünitesi bulanıklığa ulaşan pACYC184/ $\Delta tetR$  kontrol transformantından daha düşük bulanıklıkta plato fazına ulaştığı belirlenmiştir ( $p = 0.0314$ ) (Şekil 5.13).



**Şekil 5. 13.** JM109, DH5α  $\Delta luxS$ , DH5α pACYC184/ $luxS^+$  ve DH5α pACYC184 suşlarının gece boyu inokülasyon sonrası oluşturdukları biyokütlenin 600 nm dalgaboyunda spektrofotometrik yöntem ile bulanıklık ölçümü ile saptanması.

## 5.5 Biyoışma (Biyolüminesans) Ölçümü

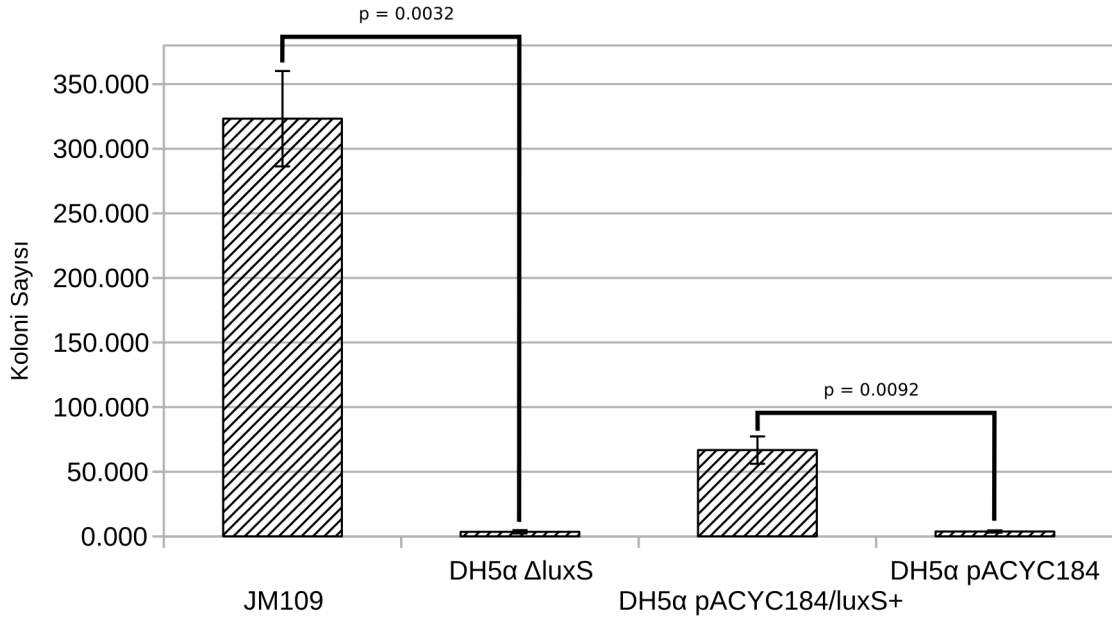
*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  pACYC184/*luxS*<sup>+</sup> ve DH5 $\alpha$  pACYC184 suşlarının kültür üst fazı etil asetat özütlerinin, bulanık kültürden seyreltilen *Photobacterium phosphoreum* hücrelerinde indükledikleri biyoışma yoğunlukları ölçülüp *E. coli* DH5 $\alpha$   $\Delta$ *luxS* üst faz özütlerinin biyoışması ile oranlandığında, DH5 $\alpha$  pACYC184/*luxS*<sup>+</sup> kültürlerinin DH5 $\alpha$   $\Delta$ *luxS* kültürlerine göre  $1.4867 \pm 0.0351$  kat daha fazla biyoışmaya yol açtığı gözlenmiştir ( $p = 0.0065$ ). Bununla birlikte DH5 $\alpha$  pACYC184 kültürleri ise DH5 $\alpha$   $\Delta$ *luxS* hücreler ile yaklaşık aynı şiddette ( $0.9822 \pm 0.0886$  kat) biyoışma indüklediği saptanmıştır (Şekil 5.14).



**Şekil 5. 14.** *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  pACYC184/*luxS*<sup>+</sup> ve DH5 $\alpha$  pACYC184 kültür üst fazı organik özütlerinin *Escherichia coli* DH5 $\alpha$   $\Delta$ *luxS* hücrelerine göre *Photobacterium phosphoreum* hücrelerinde indüklediği biyoışma oranları.

## 5.6 Kısa Süreli Siprofloksasin Maruziyeti Sonrası Üreyebilir Durumdaki Hücre Sayısı Belirlenmesi

Çalışmaya alınan suşların siprofloksasin maruziyeti ardından üreyebilme yeteneğini koruyan hücre sayıları incelendiğinde *E. coli* JM109 kültürlerinin ortalama  $323.2500 \pm 36.9290$  koloni oluşturan ünite ile,  $3.5000 \pm 1.2580$  cfu oluşturabilen *DH5 $\alpha$ / $\Delta$ luxS* hücrelerine göre daha yüksek sağ kalıma sahip olduğu belirlenmiştir ( $p = 0.0032$ ). Benzer şekilde, *E. coli* *DH5 $\alpha$  pACYC184/luxS<sup>+</sup>* ile *DH5 $\alpha$  pACYC184* kültürleri karşılaştırıldığında, bir gecelik kültür plaklarında sırası ile  $66.7500 \pm 10.5860$  ve  $3.7500 \pm 0.8540$  cfu oluşturdukları, siprofloksasin maruziyeti sonrası *pACYC184/ $\Delta$ tetR* kontrol hücrelerine göre daha fazla sayıda *DH5 $\alpha$  pACYC184/luxS<sup>+</sup>* hücresinin hayatta kaldığı saptanmıştır ( $p = 0.0092$ ). Otoindükleyici – 2 üretimi yapamayan *E. coli* *DH5 $\alpha$ / $\Delta$ luxS* ve *DH5 $\alpha$  pACYC184* kültürleri karşılaştırıldığında ise antibiyotik maruziyeti sonrası üreme yeteneğini koruyan hücre sayısının benzer düzeyde olduğu gözlenmiştir ( $p = 0.8755$ ) (Şekil 5.15).



**Şekil 5. 15.** JM109, *DH5 $\alpha$   $\Delta$ luxS*, *DH5 $\alpha$  pACYC184/luxS<sup>+</sup>* ve *DH5 $\alpha$  pACYC184* suşlarının 4  $\mu$ g/ml siprofloksasin varlığında oluşturdukları koloni sayıları.



## 6 TARTIŞMA VE SONUÇ

Bakterilerde “quorum sensing”, birçok hayatsal faaliyeti kontrol eden, bakterinin popülasyon yoğunluğuna göre biyofilm oluşturma, stres koşullarıyla mücadele etme, virülans özellik gösterme ve bu tez çalışmasında üzerinde durulduğu gibi antibiyotiklere karşı direnme fenotipine geçmede etkili olan, çoklu gen ifadesi değişikliklerinin gözlemlendiği karmaşık bir sistemdir<sup>60,61,64,90</sup>. Antibiyotiklerin bilinçsiz kullanımı, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* ve *Pseudomonas aeruginosa* başta olmak üzere birçok bakterinin antibiyotiklere karşı direnç kazanmasına neden olmakta ve enfeksiyonlara karşı insanları çaresiz bırakmaktadır<sup>13,91-93</sup>. Günümüzde kullanılan konvansiyonel antimikrobiyaller, mümkün olan en yüksek terapötik indeksi sağlamak üzere, seçici toksisite yönünden en avantajlı metabolik yolları hedeflemektedir. Bakteri hücre duvarı sentezi, protein sentezi, RNA sentezi ve DNA replikasyonu antimikrobiyallerin en önemli hedeflerini oluşturmaktadır. Antimikrobiyallerin bakteriler üzerinde oluşturduğu seçici baskı dirençli mutantların oluşumu ve seçilmesi için gerekli koşulları hazırlamakta, bu mutasyonların bakteri topluluklarında yatay ve dikey olarak aktarılması nedeni ile antimikrobiyal direnç önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmektedir<sup>43,54,91,94</sup>. Rasyonel antimikrobiyal kullanım kurallarının disiplinli bir şekilde uygulanmaması, sorunu daha da derinleştirmektedir. Buna karşın, ilaç endüstrisi, uzun zamandır yüksek maliyetler nedeni ile tamamen yeni antimikrobiyal kemoterapi hedeflerini araştırmak yerine, bilinen hedefler üzerinde etkili ana kimyasal yapıların farmakodinamik ve bazen de farmakokinetik özelliklerini iyileştiren türevlerin sentezine yönelmiştir<sup>13,31</sup>. Oysa ki, kimyasal olarak türevlendirilmiş ilaçlara karşı direnç gelişimi ya beklenenden hızlı gerçekleşmekte, ya da kimi bakteri türleri belirli bir ana grupta yer alan kimyasal türev antimikrobiyallerin tümüne – o madde hiç sentezlenmemiş olsa bile – çapraz direnç gösterebilmektedir. Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde, elde var olan ilaç grupları ve türevlerini “tüketmemek” için rasyonel klinik kullanımın yanı sıra, sistem biyolojisi perspektifinin yardımı ile rasyonel ilaç tasarımı da büyük önem kazanacaktır. Bakteriyel enfeksiyon hastalıklarının patogeneğinde, istilacı bakterilerin virülans faktörlerini ifadelendirerek patojen hale geçmesi, bunun sonucu olarak, salgılanan enzim ve toksinler ile doku hasarı, dokularda ya da prostetik yüzeylerde biyofilm oluşumu gibi mekanizmalar rol oynamaktadır<sup>30,59,91</sup>. Mikrobiyal virülans faktörlerinin ifadelenmesinde “quorum sensing”in rolü bir çok yazar tarafından vurgulanmaktadır<sup>59,60,79,95</sup>. Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde antimikrobiyal kemoterapiyi ve bağışıklık sistemini destekleyici olarak “quorum sensing” modülatörü ilaçların kullanılması ile “antipatojenik” etki oluşturulması önerilmektedir<sup>58,70,96</sup>. Buna göre bakteriyel hücrelerin üremesinin durdurulması ya da öldürülmesinden çok, virülans faktörü ifadelenmesinin ortadan kaldırılması ve patojenitesinin azaltılması ya da ortadan kaldırılması

hedeflenmektedir<sup>58,59,70,96,97</sup>.

Bu tez çalışmasında, *Escherichia coli* JM109 ve DH5α *AluxS* suşları kullanılarak bu bakteride otoindükleyici-2 sentezleyebilme kabiliyetinin, bakterisidal antimikrobiyallerden siprofloksasin ile karşılaşma sırasında hayatta kalabilmek için “direnme” fenotipine geçişteki rolü araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasının ilk kısmında, otoindükleyici – 2 üretebilen *Escheichia coli* K12 ve JM109 suşları ile otoindükleyici – 2 üretme yeteneği bulunmayan *E. coli* DH5α suşunda, öldürücü dozun altında siprofloksasin maruziyeti ile kinolon dirençli mutantların seçimi gerçekleştirilmiştir. Bu deney düzeneğinde, çalışmaya alınan suşlardaki MİK düzeylerindeki artışların *gyrA* ve *parC*'de gerçekleşen mutasyonlar ile paralellik gösterdiği, *gyrA83* ve *gyrA87* ile *parC80* ve *parC84* kodonlarındaki mutasyonlar ile uyumlu olarak dört basamakta en yüksek seviyeye çıktığı gözlenmiştir. Florokinolon sınıfından bir antibiyotik olan siprofloksasin, *E. coli*'de tip II topoizomeraz olan ve nükleik asit sentezi sırasında iki nükleik asit zincirinin birbirinden ayrılmasında görev alan DNA giraz enziminin aktif bölgelerine bağlanarak nükleik asit sentezi yolağını engelleyip bakterinin ölümüne sebebiyet vermektedir<sup>98</sup>. Siprofloksasin maruziyeti, *E. coli* kültürlerinde bu antibiyotiğe karşı dirençli bireylerin seçilmesine neden olmaktadır. Dirençli klinik izolatlarda yapılan incelemelerde siprofloksasine karşı direnç gelişiminin DNA giraz enzimidaki aktif bölgelerde yapısal değişiklikler oluşturarak antibiyotiğin bu enzime bağlanmasını engelleyip, nükleik asit sentez yolağının engelsiz bir şekilde çalışmasını sağlamaktadır<sup>33,49,51</sup>. DNA giraz enzimidaki yapısal değişiklikler bu enzimin iki alt ünitesini kodlayan *gyrA* ve *gyrB* genlerindeki nokta mutasyonlarından kaynaklandığı bilinmektedir<sup>33,50,53</sup>. *E. coli*'de ayrıca tip IV topoizomeraz enziminin iki alt ünitesini kodlayan *parC* ve *parE* genlerindeki nokta mutasyonlar da, bu enzimidaki florokinolon bağlanma bölgelerinde yapısal değişikliklerine neden olup bakteriyi siprofloksasin dahil birçok florokinolon sınıfı antimikrobiyale karşı dirençli hale getirmektedir<sup>50,99</sup>. Bu mutasyonların görülme sıklıkları incelendiğinde *gyrA* 83 ve 87. kodon, *parC* 80 ve 84. kodonlarda amino asit değişikliğine yol açan mutasyonlar daha sıklıkla görülmektedir<sup>33,50,52,53,100</sup>. Bakterilerde belirli antibiyotik direnç mutasyonların oluşturulması, dolayısıyla mutasyon frekansı, bakterinin çoğunluğuyla doğru orantılı olarak seyretmektedir<sup>101,102</sup>. Antibiyotik direnç genlerinin mutasyon frekansı, popülasyon büyüklüğü dışında antibiyotiğin bakteriyi öldürme hızına, mutasyon oluşacak dizinin etrafındaki stabil olmayan dizilerin varlığına, antibiyotiğin hedef aldığı mekanizmaları düzenleyen gen sayısına, çoktan oluşmuş antibiyotik direnç mutasyonlarına, antibiyotik direnci sağlayacak genlerin çeşitliliğine ve bakterinin o anda etkilendiği başka stres etkenlerine bağlı olarak

değişiklik göstermektedir<sup>50,102-105</sup>. Bu çalışmada gerçekleştirilen öldürücü dozun altında antimikrobiyale maruziyet ile dirençli mutasyonların seçilmesi deney düzeneğinde, antimikrobiyal MİK düzeylerinin saptanması için kullanılan standart inokulum olan 10<sup>5</sup> cfu/ml yerine 1000 kat daha yoğun bir inokulum kullanılmıştır. Ayrıca, OI-2 üretebilen ve üretemeyen suşların test edildiği bu deney düzeneğinde, “quorum sensing”in etkisinin belirginleşmesi amacı ile besi yeri olarak %1 glukoz içeren SOC buyyon kullanılmıştır. Bu çalışmada, test edilen tüm suşlarda siprofloksasin MİK değerlerinin basamaklı şekilde arttığı, otoindükleyici-2 sentezleyebilen *E. coli* JM109 suşunun, DH5α *ΔluxS* suşundan bir tur önce bir üst MİK basamağına çıktığı gözlenmiştir. Bu bulgudan yola çıkarak, stres altındaki bakteri topluluklarında “quorum sensing”in persistan duruma geçişte rol oynayarak uzun dönem adaptasyona zemin hazırladığı düşünülmüştür. Bu hipotezi sınamak amacı ile *E. coli* DH5α *ΔluxS* suşunun *luxS*<sup>+</sup> izogenik mutantı oluşturulmuş, otoindükleyici-2 sentezleme yeteneğine sahip bu mutantın oluşturduğu bakteri topluluğunun üreme eğrisi, otoindükleyici-2 üretim yeteneği ve siprofloksasin maruziyeti stresinde sağ kalma oranı, *E. coli* DH5α *ΔluxS* ve *E. coli* JM109 suşları ile karşılaştırılmıştır.

*E. coli* JM109, DH5α *ΔluxS*, DH5α pACYC184/*luxS*<sup>+</sup> ve DH5α pACYC184 suşlarının üreme eğrileri, biyokütlenin spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlenmiş, her bir suşun plato fazında ulaştığı en yüksek bulanıklık düzeyi saptanmıştır. “Quorum sensing”, aynı tür içinde ya da türler arasında sinyal aktarımını sağlayan bir iletişim ağı oluşturmakta, bireylerin gen ekspresyonlarını etkileyerek yüksek ve düşük yoğunluktaki bakteri topluluklarının fizyolojik davranışlarını şekillendirmektedir. *E. coli*'de besin maddelerinin kısıtlılığı ve starvasyona giriş ile birlikte RpoS aracılı olarak durağan fazda enerji metabolizmasının, DNA replikasyonunun başlatılmasının, virülans genlerinin ifadelendirilmesinin regülasyonu “quorum sensing” kontrolü altında olduğu, OI-2 sentezleyemeyen *ΔluxS* bakterilerin vahşi tipten daha yüksek hücre yoğunluklarında plato fazına ulaştıkları bildirilmektedir<sup>76,106</sup>. Bu çalışmada da, *E. coli* JM109, DH5α *ΔluxS*, DH5α pACYC184/*luxS*<sup>+</sup> ve DH5α pACYC184'ün benzer logaritmik faz üreme eğrilerine sahip olduğu, ancak *ΔluxS* suşların, OI-2 sentezleyenlerin durağan faza ulaştıkları noktadan sonra da bir süre üremeye devam ettikleri ve daha yüksek hücre yoğunluklarına ulaştıkları gözlenmiştir. Bir çok bakteri türünde starvasyon ve “quorum sensing” sinyallerinin birbirini modüle ettiği, “quorum sensing”in bakteri hücresi fizyolojisinin durağan faza hazırlanmasında rol oynadığı öne sürülmüştür<sup>107</sup>. Popülasyon yoğunluğunun belirleyici olduğu bu geri besleme mekanizması, bakteri topluluğunun, duruma uygun bir stres yanıtı oluşturmasında önemli olabilir. Otoindükleyici – 2 üretemeyen *E. coli* DH5α *ΔluxS* suşuna fonksiyonel S-ribozilhomosisteinaz enzim geninin

aktarıldığını doğrulamak amacı ile OI – 2 varlığında biyoışımaya yanıtı veren deniz bakterilerinden olan *Photobacterium phosphoreum*'un laboratuvarımızda izole ettiğimiz bir suşu belirteç hücre olarak kullanılmıştır.

Bu çalışmada elde edilmiş olan *E. coli* DH5 $\alpha$  pACYC184/*luxS*<sup>+</sup> suşunun fonksiyonel durumda S-ribozilhomosisteinaz geni içerdiği ve bunu hücre yoğunluğuna bağlı ifadelendirebildiği *P. phosphoreum* biyoışımaya deneyi ile gösterilmiştir. Plazmid vektör ile birlikte aktarılmış olan kloramfenikol asetil transferaz geninin deney düzeneğine etkisinin ihmal edilebilir düzeyde olduğu, yine bu çalışmada elde edilmiş olan *E. coli* DH5 $\alpha$  pACYC184 *AtetR* kontrol mutantının biyoışımaya deneyinde *E. coli* DH5 $\alpha$  *luxS*'e benzer düzeyde ışımaya neden olduğunun gösterilmesi ile doğrulanmıştır. Bu çalışmada, *E. coli* JM109 suşu ise kendisi gibi *E. coli* K12 genetik altyapısına sahip DH5 $\alpha$  ve bundan türetilen izogenik mutantlardan farklı metabolik özelliklere sahip olduğu gözlenmiştir. Biyoışımaya deneyinde, eşdeğer hücre yoğunluğuna sahip *E. coli* JM109 ve DH5 $\alpha$  kültürlerinden karşılaştırılabilir sonuçlar alınamamasının yanı sıra, çalışmaya dahil edilen her dört suşun kültür üst fazlarından etil asetat özütlemesi ile saflaştırılan metabolitler, C18 ters faz kolon kullanılarak yüksek basınçlı kromatografi ile analiz edildiğinde ise *E. coli* JM109 suşunun daha geniş bir çeşitlilikte indolik bileşikler oluşturabildiği belirlenmiştir. *E. coli* K12 ana suşundan kaynaklanan JM109 ve DH5 $\alpha$  arasındaki en belirgin farklardan biri JM109'un OI – 2 sentezleyebilme yeteneğidir<sup>66,108,109</sup>. S-ribozilhomosisteinaz geni kodlayan bölgesinde bir nokta mutasyon nedeni ile fonksiyonel enzim ve OI – 2 sentezleyebilme yeteneğini kaybetmiş olan *E. coli* DH5 $\alpha$  suşuna Plazmid vektör yardımı ile *luxS* komplementasyonu yapılsa bile metabolik profillerdeki bu farklılığın giderilememesi, “OI – 2 eksik” yaşam tarzına adaptasyonun sonucu olabilir. İki önemli endüstriyel *E. coli* rekombinant protein üretim konağı olan K12 ve B suşlarının taslak genom projeleri bulunmaktadır (National Center for Biotechnology Information nükleotid veritabanı *Escherichia coli* K-12 substr. MG1655: NC\_000913; *Escherichia coli* B REL606: NC\_012967). Bu suşların fizyolojik özellikleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir<sup>110</sup>. Ancak, bu çalışmada elde edilen bulgular, “quorum sensing” gibi bakterinin tüm fizyolojisi üzerinde merkezi öneme sahip süreçlerde gerçekleşen değişimlerin – örneğin, OI-2 üretememek – bakterinin tüm metabolizmasında bir adaptasyon sürecini tetikleyebileceği, kaybedilen özellik tekrar yerine konsa bile adaptif sürecin tamamı ile geri döndürülemeyeceğini düşündürmektedir.<sup>62,111–114</sup>.

Devamında, JM109, DH5 $\alpha$  *luxS*, DH5 $\alpha$  pACYC184/*luxS*<sup>+</sup> ve DH5 $\alpha$  pACYC184 suşlarının MİK testinde tespit edilen siprofloksasinin belirli konsantrasyonu varlığında fenotip değişimi ve hayatta

kalma oranları gözlemlenmiştir. *luxS* komplementasyonu yapılan DH5α pACYC184/*luxS*<sup>+</sup> mutant suşun kontrol DH5α Δ*luxS* suşuna göre siprofloksasin varlığında çok daha fazla koloni oluşturup dirençli fenotipe geçebildiği gözlemlenmiştir. DH5α pACYC184/*luxS*<sup>+</sup> mutant suşun JM109 suşuna göre siprofloksasin varlığında daha az koloni oluşturabildiği gözlemlenmiştir. DH5α Δ*luxS* ve DH5α pACYC184 suşunun oluşturduğu koloni sayıları karşılaştırdığında tutarlılık gösterdiği görülmektedir. DH5α pACYC184/*luxS*<sup>+</sup> suşunun *luxS* bulunduran JM109 suşuna göre daha az koloni oluşturması DH5α Δ*luxS* suşuna transforme edilen vektörün neden olduğu ve protein ifadesini etkileyen bir metabolik yük kaynaklı stres yanıtı sebebiyle gözlemlenmiş olabilir. Sperandino ve ark. tarafından yapılan çalışmada *E. coli* O157:H7 suşunun *luxS*'i çıkarılmış mutantında mutant olmayan suşa göre yaklaşık 400 farklı geninde transkripsiyonel fark gözlemlenmiş, ifadesi değişen genlerin arasında virülans ve kimya göçümünü kontrol eden önemli genlerin de bulunduğu gösterilmiştir<sup>115</sup>. Buna benzer bir çalışma DeLisa ve ark. tarafından *luxS* negatif mutant *E. coli* W3310 suşu üzerinde yapılmış ve 242 genin mutant olmayan suşa göre ifade farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir<sup>116</sup>. Wang ve ark. tarafından *E. coli* K12 suşu kullanılarak yapılan *luxS* negatif mutantın transkriptom analizinde sadece 40 tane genin mutant olmayan suşa göre farklılık gösterdiği gözlemlenmiş, fakat bu genlerin önemli metabolik genler olduğu vurgulanmıştır<sup>117,118</sup>. Haigh ve ark. sadece tek bir *E. coli* suşu yerine 3 farklı suş (*E. coli* E2348/69, *E. coli* Sakai, *E. coli* NCTC12900) üzerinde, farklı yöntemlerle oluşturdukları *luxS* mutasyonlarının sonucunda yaptıkları proteomik analizi sonucu *luxS* mutasyonunun bakteride ciddi şekilde strese neden olduğunu, mutant her suşta ifade artışı gösteren ve bakterinin uzun süren açlık durumlarında veya amino asit yetmezliğinde ifadesi artan bir stres proteini olan membrane-associated stringent starvation protein A ve ifade düşüşü gösteren ve bakteride asit dirençliliği sağlayan glutamat dekarboksilaz enzimiyle göstermişlerdir<sup>119</sup>. Görülmektedir ki *luxS*'in çalışmaz duruma gelmesi bakteride metabolik stres yaratıp protein üretimi, virülans, kimya göçümü gibi önemli hayatsal faaliyetleri etkileyebilmektedir<sup>57,61,64,77,120</sup>. Bu nedenle DH5α pACYC184/*luxS*<sup>+</sup> suşunun JM109 suşuna göre antibiyotik varlığında daha az koloni oluşturmasının, DH5α pACYC184/*luxS*<sup>+</sup> suşundaki *luxS* mutasyonundan kaynaklı metabolik stres nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

Hücreler arası sinyal iletimi mekanizmalarının, bakteri hücrelerinin besin kısıtlılığı, hücresel hasar ya da abiyotik streslere metabolik olarak yanıt verebilmesinde önemli role sahip olduğu bildirilmektedir<sup>121</sup>. Ekolojik perspektiften bakıldığında, antibiyotikler, kısıtlı kaynaklar için yarışmanın yoğun şekilde yaşandığı mikroorganizma topluluklarında sosyal yaşamın vazgeçilmez

bir parçasıdır<sup>122</sup>. Bu moleküller, hedef mikroorganizmada, zehirledikleri metabolik yollara göre stres yanıtlarının oluşmasına neden olmaktadır. Genel stres yanıtı, hücre kılıfı stres yanıtı, toksin antitoksin sistemleri, oksidatif stres yanıtı, nitrozatif yanıt ve “stringent” starvasyon yanıtı sayesinde bakteri hücrelerinin metabolik olarak durağan bir faza geçmesi ile antimikrobiyal ile “zehirlenerek” durdurulmuş ya da bozulmuş olan metabolik yolağa ya da yollara gereksinimin en aza indirilmesi, bakteri hücrelerinin antimikrobiyal etkisine duyarsız, persistan duruma geçmeleri ile sonuçlanmaktadır<sup>123</sup>. Daha da önemlisi, SOS yanıtının tetiklenmesi ile hata oranı yüksek DNA'ya bağımlı DNA polimerazların replikasyonda ve tamirde kullanılması, bakteri topluluğunun mutasyon hızını artırarak söz konusu stres koşullarına adaptasyonu daha iyi mutamların seçilmesi için zemin hazırlamaktadır<sup>121,123</sup>. Bu çalışmada, *E. coli* hücrelerinde stres yanıtını tetiklemek için klinik olarak bakterisidal etkili olduğu bilinen siprofloksasinin kullanılmış, “quorum sensing” yapabilmeyen, bu stres koşulunda persistan (direnme durumunda) hücre oluşturarak siprofloksasinin öldürücü etkisinden kurtulma ve üreme yeteneğini kaybetmeden çıkabilmeye etkisi araştırılmıştır. Öldürücü düzeyin üzerinde siprofloksasine kısa süreli maruziyet sonrasında sağ kalımın oluşan koloni sayısı ile değerlendirildiği deney düzeneğinde OI – 2 sentezleyebilen *E. coli* JM109 hücrelerinin, bu feromonu sentezleyemeyen *E. coli* DH5 $\alpha$   $\Delta$ luxS hücrelerinden yaklaşık 100 kat daha fazla koloni oluşturduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, OI – 2 sentez yeteneği komplemente edilen *E. coli* DH5 $\alpha$  pACYC184/luxS<sup>+</sup> suşunun da feromon sentezleyemeyen izogenik mutant *E. coli* DH5 $\alpha$  pACYC184 hücrelerinden yaklaşık 18 kat yüksek sağ kalım oranına sahip olduğu saptanmıştır. *E. coli* K12 ana suşundan kaynaklanmaları nedeni ile çok benzer genetik arka plana sahip olan JM109 hücrelerinin, DH5 $\alpha$  hücrelerine göre siprofloksasin maruziyeti stresinde daha çok persistan birey oluşturarak hayatta kalıyor olması bu iki suşun kültürlerinde saptanan metabolit profilindeki farklılıklara bağlı olabilir. Sperandino ve ark. tarafından yapılan çalışmada *E. coli* O157:H7 suşunun luxS geni çıkarılmış mutantında mutant olmayan suşa göre yaklaşık 400 farklı geninde transkripsiyonel fark gözlemlenmiş, ifadesi değişen genlerin arasında virülans ve kimya göçümünü kontrol eden önemli genlerin de bulunduğu gösterilmiştir<sup>115</sup>. Buna benzer bir çalışma DeLisa ve ark. tarafından luxS negatif mutant *E. coli* W3310 suşu üzerinde yapılmış ve 242 genin mutant olmayan suşa göre ifade farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir<sup>116</sup>. Wang ve ark. tarafından *E. coli* K12 suşu kullanılarak yapılan luxS negatif mutantın transkriptom analizinde sadece 40 tane genin mutant olmayan suşa göre farklılık gösterdiği gözlemlenmiş, fakat bu genlerin önemli metabolik genler olduğu vurgulanmıştır<sup>117,118</sup>. *E. coli* kültürlerinde indolün, lipid membranların elektrofizyolojik özelliklerini etkileyerek hücre döngüsü ve bölünmesi üzerinde etkili olduğu, yüksek indol düzeylerinin ise metabolik olarak inaktif persistan hücre oluşumunu tetiklediği bildirilmiştir<sup>124,125</sup>. Bu çalışmada *E. coli* JM109 kültür üst fazlarından organik özütleme ile

saflaştırılmış ve HPLC ile ayrıştırılarak analiz edilmiş olan indolik bileşiklerin çeşitliliğinin kütle spektrometrisi ile doğrulanması gerekmektedir. Bununla birlikte, Haigh ve ark. sadece tek bir *E. coli* suşu yerine 3 farklı suş (*E. coli* E2348/69, *E. coli* Sakai, *E. coli* NCTC12900) üzerinde, farklı yöntemlerle oluşturdukları *luxS* mutasyonlarının sonucunda yaptıkları proteomik analizi sonucu *luxS* mutasyonunun bakteride ciddi şekilde strese neden olduğunu, mutant her suşta ifade artışı gösteren ve bakterinin uzun süren açlık durumlarında veya amino asit yetmezliğinde ifadesi artan bir stres proteini olan membrane-associated stringent starvation protein A ile göstermişlerdir<sup>119</sup>. Görülmektedir ki, *luxS* geninin çalışmaz duruma gelmesi bakteride birçok metabolik yolda etkilenmeye neden olmakta ve bakteride metabolik stres yaratıp protein üretimi, virülans, kimya göçümü gibi önemli hayatsal faaliyetleri etkileyebilmektedir<sup>57,61,64,77,120</sup>. S-ribozilhomosisteinazı kodlayan *luxS* lokusunda bir nokta mutasyon nedeni ile Oİ – 2 üretimi olmayan *E. coli* DH5 $\alpha$  suşunun, pasajlar boyunca “feromonosuz yaşam tarzı”na uyum sağlamak üzere bir çok ikincil mutasyon geçirmiş olabileceği ve tek başına *luxS* komplementasyonunun metabolik profili *E. coli* JM109 suşuna yaklaştırmasının mümkün olmayabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle DH5 $\alpha$  pACYC184/*luxS*<sup>+</sup>suşunun *luxS* genini bulduran JM109 suşuna göre antibiyotik varlığında daha az koloni oluşturmasının, DH5 $\alpha$  pACYC184/*luxS*<sup>+</sup>suşundaki *luxS* mutasyonundan kaynaklı metabolik stres nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, çalışmada bu suşa *luxS* komplementasyonunu gerçekleştirmek için kullanılan düşük kopya sayılı pACYC184 plazmid vektörü, p15A replikasyon başlangıç bölgesi buldurması nedeniyle 15 kopya/hücre sayısında bulunmaktadır<sup>126</sup>. Fizyolojik koşullarda *E. coli* genomunda tek kopya bulunması gereken *luxS*'in, bu çalışmada oluşturulan *E. coli* DH5 $\alpha$  pACYC184/*luxS*<sup>+</sup> hücrelerinde 15 kopya/hücre olarak bulunması, deney tasarımını fizyolojik durumdan uzaklaştırıyor olabilir.

*E. coli* DH5 $\alpha$  pACYC184  $\Delta$ *tetR* ile *E. coli* DH5 $\alpha$  kültürlerinde antimikrobiyal maruziyet deneyinde gözlenen koloni sayılarının hemen hemen aynı olması, pACYC184 ve bakteri hücresinde ifadelendirdiği kloramfenikol asetil transferaz enziminin deney sistemini etkilemediğini göstermektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında, *E. coli* kültürlerinde otoindükleyici – 2 aracılı “quorum sensing”in, siprofloksasin maruziyeti stresi karşısında bakteri hücrelerinin metabolik olarak inaktif persistan duruma geçmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Öldürücü nitelikte bir etkiden üreme yeteneğini kaybetmeden çıkan koloni bireylerinin neye göre seçildiğinin belirlenmesi sürecin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması ile mümkün olacaktır. Hücre yoğunluğunun algılanması

ile persistan duruma geçiş arasındaki ilişkinin anlaşılması, “quorum sensing” üzerine etkili yeni bir adjuvan ilaç sınıfının ortaya çıkmasını ve antimikrobiyal kemoterapide sıklıkla karşılaşılan klinik direnç gelişimi sorununun çözümüne katkıda bulunacaktır.



## 7 KAYNAKLAR

1. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(1):142-201.
2. Lee PS, Lee KH. *Escherichia coli*—a model system that benefits from and contributes to the evolution of proteomics. *Biotechnol Bioeng*. 2003;84(7):801–814. doi:10.1002/bit.10848.
3. Ishii S, Sadowsky MJ. *Escherichia coli* in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health. *Microbes Environ*. 2008;23(2):101-108.
4. Brzuszkiewicz E, Thürmer A, Schuldes J, et al. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Arch Microbiol*. 2011;193(12):883-891. doi:10.1007/s00203-011-0725-6.
5. Lukjancenko O, Wassenaar TM, Ussery DW. Comparison of 61 Sequenced *Escherichia coli* Genomes. *Microb Ecol*. 2010;60(4):708-720. doi:10.1007/s00248-010-9717-3.
6. Orskov I, Orskov F, Jann B, Jann K. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev*. 1977;41(3):667-710.
7. Huang C-J, Lin H, Yang X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2012;39(3):383-399. doi:10.1007/s10295-011-1082-9.
8. Matte A, Jia Z, Sunita S, Sivaraman J, Cygler M. Insights into the biology of *Escherichia coli* through structural proteomics. *J Struct Funct Genomics*. 2007;8(2-3):45-55. doi:10.1007/s10969-007-9019-2.
9. Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, et al. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. 1997;277(5331):1453-1462. doi:10.1126/science.277.5331.1453.
10. Lawrence JG, Ochman H. Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(16):9413-9417.
11. Russo E. Special Report: The birth of biotechnology. *Nature*. 2003;421(6921):456-457. doi:10.1038/nj6921-456a.
12. Waksman SA. What Is an Antibiotic or an Antibiotic Substance? *Mycologia*. 1947;39(5):565-569. doi:10.2307/3755196.
13. Von Nussbaum F, Brands M, Hinzen B, Weigand S, Häbich D. Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry—Exodus or Revival? *Angew Chem Int Ed*. 2006;45(31):5072–5129. doi:10.1002/anie.200600350.
14. Slama TG, Amin A, Brunton SA, et al. A clinician’s guide to the appropriate and accurate use of antibiotics: the Council for Appropriate and Rational Antibiotic Therapy (CARAT) criteria. *Am J Med*. 2005;118(7, Supplement):1-6. doi:10.1016/j.amjmed.2005.05.007.
15. Pankey GA, Sabath LD. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. *Clin Infect Dis*.

2004;38(6):864-870. doi:10.1086/381972.

16. Shakil S, Khan R, Zarrilli R, Khan AU. Aminoglycosides versus bacteria – a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *J Biomed Sci.* 2008;15(1):5-14. doi:10.1007/s11373-007-9194-y.
17. Floss HG, Yu T-W, Arakawa K. The biosynthesis of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA), the precursor of mC7N units in ansamycin and mitomycin antibiotics: a review. *J Antibiot (Tokyo).* 2011;64(1):35-44. doi:10.1038/ja.2010.139.
18. Calvori C, Frontali L, Leoni L, Tecce G. Effect of Rifamycin on Protein Synthesis. *Nature.* 1965;207(4995):417-418. doi:10.1038/207417a0.
19. Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol.* 2000;3(5):489-495. doi:10.1016/S1369-5274(00)00128-4.
20. Van Bambeke F. Glycopeptides and glycodepsipeptides in clinical development: a comparative review of their antibacterial spectrum, pharmacokinetics and clinical efficacy. *Curr Opin Investig Drugs Lond Engl* 2000. 2006;7(8):740-749.
21. Tenson T, Lovmar M, Ehrenberg M. The Mechanism of Action of Macrolides, Lincosamides and Streptogramin B Reveals the Nascent Peptide Exit Path in the Ribosome. *J Mol Biol.* 2003;330(5):1005-1014. doi:10.1016/S0022-2836(03)00662-4.
22. Steenbergen JN, Alder J, Thorne GM, Tally FP. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(3):283-288. doi:10.1093/jac/dkh546.
23. Fuchs PC, Jones RN, Barry AL. In vitro antimicrobial activity of tigemonam, a new orally administered monobactam. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988;32(3):346-349. doi:10.1128/AAC.32.3.346.
24. Sargin G, Elbek O, Balantekin C, Meteoglu İ, Culhacı N. Acute Respiratory Distress Syndrome and Hepatotoxicity Associated with Single Dose Nitrofurantoin Use. *Case Rep Pulmonol.* 2012;2012:1-3. doi:10.1155/2012/465389.
25. Rakesh, Bruhn D, Madhura DB, et al. Antitubercular nitrofurans isoxazolines with improved pharmacokinetic properties. *Bioorg Med Chem.* 2012;20(20):6063-6072. doi:10.1016/j.bmc.2012.08.023.
26. Shinabarger D. Mechanism of action of the oxazolidinone antibacterial agents. *Expert Opin Investig Drugs.* 1999;8(8):1195-1202. doi:10.1517/13543784.8.8.1195.
27. Garrod LP. Relative Antibacterial Activity of Three Penicillins. *BMJ.* 1960;1(5172):527-529. doi:10.1136/bmj.1.5172.527.
28. Garrod LP. The Relative Antibacterial Activity of Four Penicillins. *BMJ.* 1960;2(5214):1695-1696. doi:10.1136/bmj.2.5214.1695.
29. Schofield CJ, Baldwin JE, Byford MF, et al. Proteins of the penicillin biosynthesis pathway. *Curr Opin Struct Biol.* 1997;7(6):857-864. doi:10.1016/S0959-440X(97)80158-3.

30. Axelsen PH. A Chaotic Pore Model of Polypeptide Antibiotic Action. *Biophys J*. 2008;94(5):1549-1550. doi:10.1529/biophysj.107.124792.
31. Kang S-J, Kim D-H, Mishig-Ochir T, Lee B-J. Antimicrobial peptides: Their physicochemical properties and therapeutic application. *Arch Pharm Res*. 2012;35(3):409-413. doi:10.1007/s12272-012-0302-9.
32. Chopra I, Hesse L, O'Neill A j. Exploiting current understanding of antibiotic action for discovery of new drugs. *J Appl Microbiol*. 2002;92:4S–15S. doi:10.1046/j.1365-2672.92.5s1.13.x.
33. Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(2):337-341.
34. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis*. 2006;6(10):629-640. doi:10.1016/S1473-3099(06)70599-0.
35. Sköld O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist Updat*. 2000;3(3):155-160. doi:10.1054/drup.2000.0146.
36. Chopra I, Roberts M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001;65(2):232-260. doi:10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001.
37. Overdeest I. Extended-Spectrum B-Lactamase Genes of Escherichia coli in Chicken Meat and Humans, the Netherlands. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(7):1216-1222. doi:10.3201/eid1707.110209.
38. Emery CL, Weymouth LA. Detection and clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases in a tertiary-care medical center. *J Clin Microbiol*. 1997;35(8):2061-2067.
39. Shanthi M, Sekar U. Extended spectrum beta lactamase producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *J Assoc Physicians India*. 2010;58 Suppl:41-44.
40. Kawada DY, Greenwood DD, O'Grady PF. Response of escherichia coli to beta-lactam antibiotics: Effect of the concomitant presence of staphylococci exhibiting inducible beta-lactamase activity. *Infection*. 1980;8(2):81-85. doi:10.1007/BF01639152.
41. Piddock LJV. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(2):382-402. doi:10.1128/CMR.19.2.382-402.2006.
42. Alvarez-Ortega C, Olivares J, Martinez JL. RND multidrug efflux pumps: what are they good for? *Front Microbiol*. 2013;4. doi:10.3389/fmicb.2013.00007.
43. Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J Bacteriol*. 1996;178(20):5853-5859.
44. Bay DC, Rommens KL, Turner RJ. Small multidrug resistance proteins: a multidrug transporter family that continues to grow. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778(9):1814-1838. doi:10.1016/j.bbamem.2007.08.015.

45. Webber MA, Piddock LJV. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51(1):9-11. doi:10.1093/jac/dkg050.
46. Van Bambeke F, Pagès J-M, Lee VJ. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. *Recent Patents Anti-Infect Drug Disc.* 2006;1(2):157-175.
47. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control.* 2006;34(5, Supplement):S3-S10. doi:10.1016/j.ajic.2006.05.219.
48. Baughman GA, Fahnestock SR. Chloramphenicol resistance mutation in *Escherichia coli* which maps in the major ribosomal protein gene cluster. *J Bacteriol.* 1979;137(3):1315-1323.
49. Ito H, Yoshida H, Bogaki-Shonai M, Niga T, Hattori H, Nakamura S. Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase *gyrA* and *gyrB* genes of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(9):2014-2023.
50. Sáenz Y, Zarazaga M, Briñas L, Ruiz-Larrea F, Torres C. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51(4):1001-1005. doi:10.1093/jac/dkg168.
51. Li X-Z. Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms. *Int J Antimicrob Agents.* 2005;25(6):453-463. doi:10.1016/j.ijantimicag.2005.04.002.
52. Vila J, Ruiz J, Goñi P, De Anta MT. Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(2):491-493.
53. Shigemura K, Tanaka K, Yamamichi F, Shirakawa T, Miyake H, Fujisawa M. Does mutation in *gyrA* and/or *parC* or efflux pump expression play the main role in fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* urinary tract infections?: A statistical analysis study. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;40(6):516-520. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.07.019.
54. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268–281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
55. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013;11(3):297-308. doi:10.1586/eri.13.12.
56. Komp Lindgren P, Karlsson Å, Hughes D. Mutation Rate and Evolution of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Patients with Urinary Tract Infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(10):3222-3232. doi:10.1128/AAC.47.10.3222-3232.2003.
57. Atkinson S, Williams P. Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J R Soc Interface.* 2009. doi:10.1098/rsif.2009.0203.
58. Hong K-W, Koh C-L, Sam C-K, Yin W-F, Chan K-G. Quorum quenching revisited--from signal decays to signalling confusion. *Sensors.* 2012;12(4):4661-4696. doi:10.3390/s120404661.
59. Bhardwaj AK, Vinothkumar K, Rajpara N. Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive

- alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance. *Recent Patents Anti-Infect Drug Disc.* 2013;8(1):68-83.
60. Mangwani N, Dash HR, Chauhan A, Das S. Bacterial quorum sensing: functional features and potential applications in biotechnology. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2012;22(4):215-227. doi:10.1159/000341847.
  61. Rutherford ST, Bassler BL. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(11). doi:10.1101/cshperspect.a012427.
  62. Li Z, Nair SK. Quorum sensing: how bacteria can coordinate activity and synchronize their response to external signals? *Protein Sci Publ Protein Soc.* 2012;21(10):1403-1417. doi:10.1002/pro.2132.
  63. Nealson KH, Platt T, Hastings JW. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol.* 1970;104(1):313-322.
  64. Ng W-L, Bassler BL. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annu Rev Genet.* 2009;43(1):197-222. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134304.
  65. Xu L, Li H, Vuong C, et al. Role of the luxS Quorum-Sensing System in Biofilm Formation and Virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 2006;74(1):488-496. doi:10.1128/IAI.74.1.488-496.2006.
  66. Decho AW, Visscher PT, Ferry J, et al. Autoinducers extracted from microbial mats reveal a surprising diversity of N-acylhomoserine lactones (AHLs) and abundance changes that may relate to diel pH. *Environ Microbiol.* 2009;11(2):409-420. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01780.x.
  67. Hardie KR, Cooksley C, Green AD, Winzer K. Autoinducer 2 activity in *Escherichia coli* culture supernatants can be actively reduced despite maintenance of an active synthase, LuxS. *Microbiology.* 2003;149(3):715-728. doi:10.1099/mic.0.25853-0.
  68. Tavío MM, Aquili VD, Fàbrega A, Vila J, Poveda JB. Overexpression of the quorum-sensing regulator *sdiA* and *soxS* is involved in low-level multidrug resistance induced in *Escherichia coli* AG100 by haloperidol, diazepam and NaCl. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39(1):91-93. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.08.008.
  69. Yang Q, Han Y, Zhang X-H. Detection of quorum sensing signal molecules in the family Vibrionaceae. *J Appl Microbiol.* 2011;110(6):1438-1448. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.04998.x.
  70. Kalia VC. Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnol Adv.* 2013;31(2):224-245. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.10.004.
  71. Zhu P, Li M. Recent progresses on AI-2 bacterial quorum sensing inhibitors. *Curr Med Chem.* 2012;19(2):174-186.
  72. Ren D, Bedzyk LA, Ye RW, Thomas SM, Wood TK. Stationary-Phase Quorum-Sensing Signals Affect Autoinducer-2 and Gene Expression in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(4):2038-2043. doi:10.1128/AEM.70.4.2038-2043.2004.

73. Brito PH, Rocha EPC, Xavier KB, Gordo I. Natural Genome Diversity of AI-2 Quorum Sensing in *Escherichia coli*: Conserved Signal Production but Labile Signal Reception. *Genome Biol Evol.* 2013;5(1):16-30. doi:10.1093/gbe/evs122.
74. Valiente E, Bruhn JB, Nielsen KF, et al. *Vibrio vulnificus* produces quorum sensing signals of the AHL-class. *FEMS Microbiol Ecol.* 2009;69(1):16–26. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00691.x.
75. Ni N, Choudhary G, Peng H, et al. Inhibition of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by boronic acids. *Chem Biol Drug Des.* 2009;74(1):51-56. doi:10.1111/j.1747-0285.2009.00834.x.
76. Yang S, Lopez CR, Zechiedrich EL. Quorum sensing and multidrug transporters in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(7):2386-2391. doi:10.1073/pnas.0502890102.
77. Rumbaugh KP, Diggle SP, Watters CM, Ross-Gillespie A, Griffin AS, West SA. Quorum Sensing and the Social Evolution of Bacterial Virulence. *Curr Biol.* 2009;19(4):341-345. doi:10.1016/j.cub.2009.01.050.
78. Tavío MM, Aquili VD, Poveda JB, Antunes NT, Sánchez-Céspedes J, Vila J. Quorum-sensing regulator *sdiA* and *marA* overexpression is involved in in vitro-selected multidrug resistance of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(6):1178-1186. doi:10.1093/jac/dkq112.
79. Jiménez Amador H, Casan Clarà P. Bacterial communication and human communication: what can we learn from quorum sensing? *Arch Bronconeumol.* 2012;48(9):305-307. doi:10.1016/j.arbres.2012.02.011.
80. Zadik Y, Burnstein S, Derazne E, Sandler V, Ianculovici C, Halperin T. Colonization of *Candida*: prevalence among tongue-pierced and non-pierced immunocompetent adults. *Oral Dis.* 2010;16(2):172–175. doi:10.1111/j.1601-0825.2009.01618.x.
81. Weber K, Sohr R, Schulz B, Fleischhacker M, Ruhnke M. Secretion of E,E-Farnesol and Biofilm Formation in Eight Different *Candida* Species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(5):1859-1861. doi:10.1128/AAC.01646-07.
82. Kagan S, Jabbour A, Sionov E, et al. Anti-*Candida albicans* biofilm effect of novel heterocyclic compounds. *J Antimicrob Chemother.* 2013. doi:10.1093/jac/dkt365.
83. Kim J-H, Kononenko A, Erliandri I, et al. Human artificial chromosome (HAC) vector with a conditional centromere for correction of genetic deficiencies in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(50):20048-20053. doi:10.1073/pnas.1114483108.
84. Yazynin SA, Deyev SM, Jucovic M, Hartley RW. A plasmid vector with positive selection and directional cloning based on a conditionally lethal gene. *Gene.* 1996;169(1):131-132.
85. Friehs K. Plasmid copy number and plasmid stability. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2004;86:47-82.
86. Lin-Chao S, Chen WT, Wong TT. High copy number of the pUC plasmid results from a *Rom/Rop*-suppressible point mutation in RNA II. *Mol Microbiol.* 1992;6(22):3385-3393.
87. Kahn M, Kolter R, Thomas C, et al. Plasmid cloning vehicles derived from plasmids ColE1, F,

- R6K, and RK2. *Methods Enzymol.* 1979;68:268-280.
88. Del Solar G, Espinosa M. Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Mol Microbiol.* 2000;37(3):492-500.
  89. Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(7):2172-2175.
  90. Larson E. Community Factors in the Development of Antibiotic Resistance. *Annu Rev Public Health.* 2007;28(1):435-447. doi:10.1146/annurev.publhealth.28.021406.144020.
  91. Zhang Q, Lambert G, Liao D, et al. Acceleration of emergence of bacterial antibiotic resistance in connected microenvironments. *Science.* 2011;333(6050):1764-1767. doi:10.1126/science.1208747.
  92. Morita Y, Sobel ML, Poole K. Antibiotic inducibility of the MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the antibiotic-inducible PA5471 gene product. *J Bacteriol.* 2006;188(5):1847-1855. doi:10.1128/JB.188.5.1847-1855.2006.
  93. Harrison F. Bacterial cooperation in the wild and in the clinic: are pathogen social behaviours relevant outside the laboratory? *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* 2013;35(2):108-112. doi:10.1002/bies.201200154.
  94. Žgur-Bertok D. DNA Damage Repair and Bacterial Pathogens. *PLoS Pathog.* 2013;9(11):e1003711. doi:10.1371/journal.ppat.1003711.
  95. LaSarre B, Federle MJ. Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2013;77(1):73-111. doi:10.1128/MMBR.00046-12.
  96. Kapadnis PB, Hall E, Ramstedt M, Galloway WRJD, Welch M, Spring DR. Towards quorum-quenching catalytic antibodies. *Chem Commun Camb Engl.* 2009;(5):538-540. doi:10.1039/b819819e.
  97. Roy V, Adams BL, Bentley WE. Developing next generation antimicrobials by intercepting AI-2 mediated quorum sensing. *Enzyme Microb Technol.* 2011;49(2):113-123. doi:10.1016/j.enzmictec.2011.06.001.
  98. *Floroquinolones - Mechanism of Action and Resistance.*; 2012. Available at: [http://www.youtube.com/watch?v=pHvWCXVdhJA&feature=youtube\\_gdata\\_player](http://www.youtube.com/watch?v=pHvWCXVdhJA&feature=youtube_gdata_player). Accessed February 21, 2013.
  99. Fu Y, Zhang W, Wang H, et al. Specific patterns of *gyrA* mutations determine the resistance difference to ciprofloxacin and levofloxacin in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *BMC Infect Dis.* 2013;13(1):8. doi:10.1186/1471-2334-13-8.
  100. Olofsson SK, Marcusson LL, Strömbäck A, Hughes D, Cars O. Dose-related selection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(4):795-801. doi:10.1093/jac/dkm265.
  101. Oliver A. High Frequency of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Lung Infection. *Science.* 2000;288(5469):1251-1253. doi:10.1126/science.288.5469.1251.

102. Martínez JL, Baquero F. Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(7):1771-1777. doi:10.1128/AAC.44.7.1771-1777.2000.
103. Luria SE, Delbrück M. Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics.* 1943;28(6):491-511.
104. Whittam TS, Reid SD, Selander RK. Mutators and long-term molecular evolution of pathogenic *Escherichia coli* O157:H7. *Emerg Infect Dis.* 1998;4(4):615-617. doi:10.3201/eid0404.980411.
105. Martínez JL, Alonso A, Gómez-Gómez JM, Baquero F. Quinolone resistance by mutations in chromosomal gyrase genes. Just the tip of the iceberg? *J Antimicrob Chemother.* 1998;42(6):683-688. doi:10.1093/jac/42.6.683.
106. Hengge R. The two-component network and the general stress sigma factor RpoS (sigma S) in *Escherichia coli*. *Adv Exp Med Biol.* 2008;631:40-53. doi:10.1007/978-0-387-78885-2\_4.
107. Lazazzera BA. Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. *Curr Opin Microbiol.* 2000;3(2):177-182. doi:10.1016/S1369-5274(00)00072-2.
108. Li M, Villaruz AE, Vadyvaloo V, Sturdevant DE, Otto M. AI-2-dependent gene regulation in *Staphylococcus epidermidis*. *BMC Microbiol.* 2008;8(1):4. doi:10.1186/1471-2180-8-4.
109. Roy V, Meyer MT, Smith JAI, et al. AI-2 analogs and antibiotics: a synergistic approach to reduce bacterial biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97(6):2627-2638. doi:10.1007/s00253-012-4404-6.
110. Marisch K, Bayer K, Scharl T, et al. A Comparative Analysis of Industrial *Escherichia coli* K-12 and B Strains in High-Glucose Batch Cultivations on Process-, Transcriptome- and Proteome Level. *PLoS ONE.* 2013;8(8):e70516. doi:10.1371/journal.pone.0070516.
111. Lukjancenko O, Wassenaar TM, Ussery DW. Comparison of 61 Sequenced *Escherichia coli* Genomes. *Microb Ecol.* 2010;60(4):708-720. doi:10.1007/s00248-010-9717-3.
112. BACTERIAL BIOLUMINESCENCE. Available at: <http://www.photobiology.info/Lin.html>. Accessed August 21, 2014.
113. Strehler BL, Cormier MJ. Factors affecting the luminescence of cell-free extracts of the luminous bacterium, *Achromobacter fischeri*. *Arch Biochem Biophys.* 1953;47(1):16-33. doi:10.1016/0003-9861(53)90434-2.
114. Nagata S, Zhou X. Analyses of Factors to Affect the Bioassay System Using Luminescent Bacterium *Vibrio fischeri*. *J Health Sci.* 2006;52(1):9-16. doi:10.1248/jhs.52.9.
115. Sperandio V, Torres AG, Girón JA, Kaper JB. Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol.* 2001;183(17):5187-5197.
116. DeLisa MP, Wu CF, Wang L, Valdes JJ, Bentley WE. DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2001;183(18):5239-5247.



117. Wang L, Li J, March JC, Valdes JJ, Bentley WE. luxS-dependent gene regulation in Escherichia coli K-12 revealed by genomic expression profiling. *J Bacteriol.* 2005;187(24):8350-8360. doi:10.1128/JB.187.24.8350-8360.2005.
118. Wang Q, He Z, Hu Y, et al. luxS mutant regulation: quorum sensing impairment or methylation disorder? *Sensors.* 2012;12(5):6155-6175. doi:10.3390/s120506176.
119. Haigh R, Kumar B, Sandrini S, Freestone P. Mutation design and strain background influence the phenotype of Escherichia coli luxS mutants. *Mol Microbiol.* 2013;88(5):951-969. doi:10.1111/mmi.12237.
120. Li Y-H, Tian X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors.* 2012;12(3):2519-2538. doi:10.3390/s120302519.
121. Cornforth DM, Foster KR. Competition sensing: the social side of bacterial stress responses. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(4):285-293. doi:10.1038/nrmicro2977.
122. Cordero OX, Wildschutte H, Kirkup B, et al. Ecological Populations of Bacteria Act as Socially Cohesive Units of Antibiotic Production and Resistance. *Science.* 2012;337(6099):1228-1231. doi:10.1126/science.1219385.
123. Poole K. Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.* 2012;20(5):227-234. doi:10.1016/j.tim.2012.02.004.
124. Chimere C, Field CM, Piñero-Fernandez S, Keyser UF, Summers DK. Indole prevents Escherichia coli cell division by modulating membrane potential. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 2012;1818(7):1590-1594. doi:10.1016/j.bbamem.2012.02.022.
125. Vega NM, Allison KR, Khalil AS, Collins JJ. Signaling-Mediated Bacterial Persister Formation. *Nat Chem Biol.* 2012;8(5):431-433. doi:10.1038/nchembio.915.
126. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* CSHL Press; 2001.

## EKLER

EK 1 – Tez deneylerinde kullanılan kimyasal malzemeler

EK 2 – Tez deneylerinde kullanılan enzimler ve kitler

EK 3 – Tez deneylerinde kullanılan laboratuvar cihaz ve gereçleri

EK 4 – JM109 ve DH5 $\alpha$   $\Delta luxS$  ve K12 suşlarının subletal dozda siprofloksasin maruziyeti sonrası sekans analizleri

**EK 1 – Tez deneylerinde kullanılan kimyasal malzemeler**

<b>Malzemenin Adı</b>	<b>Markası</b>	<b>Katalog Numarası</b>	<b>Kullanım Amacı</b>
Agar (bakteriyel)	Bioshop	#AGR001.1	Besiyeri hazırlanması
Agaroz	Bioshop	#AGA001.500	Jel Elektroforezi
Borik Asit	Bioshop	#BOR001.1	Tampon hazırlama
Brom fenol mavisi (BPB)	Bioshop	#BRO777.25	Tampon hazırlama
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Bioshop	#DMS555.500	Transformasyon
EDTA	Bioshop	#EDT001.1	Tampon hazırlama
Etidyum bromür	Bioshop	#ETB333.5	Jel Elektroforezi
Etanol	Tekkim	TK.200655.025 00	Genel kullanım
Etanol	JT Baker	8462	Genel kullanım
Etanol (masa alkolü)			Temizlik
Fenol kloroform izoamil alkol	Amresco	K169-400ML	DNA İzolasyonu
Glasiyal asetik asit	Riedel	27225	Tampon hazırlama
Glasiyal asetik asit	Tekkim	TK.010030.025 00	Tampon hazırlama
Glasiyal asetik asit	Bioshop	#ACE222.1	Tampon hazırlama
Gliserol	Bioshop	#GLY002.1	Tampon hazırlama
Glisin	Bioshop	#GLN001.1	Tampon hazırlama
Glisin USP/BP	Kimetsan	#KIM- GLN/01CP/120 518	Tampon hazırlama
Guanidyum (guanidine thiocyanate)	Fluka	50980	DNA İzolasyonu / Saflaştırma
Guanidyum (guanidine thiocyanate)	Sigma	#G9277	DNA İzolasyonu / Saflaştırma
İsopropanol	Tekkim	TK.090250.025 00	Genel kullanım
İsopropanol	Fisher	#UN1219	Genel kullanım
Kanamisin	Vetap		Antibiyotik
Luria Bertani besiyesi (LB)	Bioshop	#LBL405.1	Besiyeri hazırlama

Broth)			
Maya özütü (granüle)	Merck	1.03753.0500	Besiyeri hazırlama
Maya özütü (toz)	Bioshop	#YEX401.1	Besiyeri hazırlama
Magnezyum klorür (MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)	Acros	#413415000	Besiyeri / Tampon hazırlama
Magnezyum sülfat (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	Merck	1.05882.2500	Besiyeri / Tampon hazırlama
Magnezyum sülfat (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	Acros	#213115000	Besiyeri / Tampon hazırlama
Sodyum klorür (NaCl)	Fischer Scientific	BP358-1	Besiyeri / Tampon hazırlama
Sodyum klorür (NaCl)	Amresco	x190-1KG	Besiyeri / Tampon hazırlama
Sodyum asetat (NaOAC)	Riedel	25022	DNA İzolasyonu
Sodyum hidroksit (NaOH)	Riedel	06203	Besiyeri / Tampon hazırlama
Sodyum hidroksit (NaOH)	Fischer Scientific	BP359-500	Besiyeri / Tampon hazırlama
PBS			Genel kullanım
Polietilen glikol (PEG) 6000	Bioshop	#PEG600.1	Transformasyon
Pepton (bakteriyolojik)	Conda Pronadisa	1616.00	Besiyeri hazırlama
Pepton (bakteriyolojik)	Bioshop	#YEX401.1	Besiyeri hazırlama
Potasyum asetat	Fischer Scientific	#P/3760/60	Tampon hazırlama
Potasyum klorür	Merck	1.04936.1000	Besiyeri / Tampon hazırlama
Potasyum fosfat	Acros	#215470010	Tampon hazırlama
ProteinazK			Protein izolasyonu
SDS (sodyum dodesil sülfat)	Bioshop	#SDS001.100	Tampon hazırlama
Trizma Baz	Sigma	T1503-1KG	Tampon hazırlama
Tris hidroklorür	Bioshop	#TRS002.500	Tampon hazırlama

Tripton	Conda Pronadisa	1612.00	Besiyeri hazırlama
---------	--------------------	---------	--------------------

***EK 2 – Tez deneylerinde kullanılan enzimler ve kitler***

Wizard® PCR Preps DNA Purification system	Promega	#A2180	Saflaştırma
Taq polymerase	Sibenzyme	#E341	PCR/PZT
Shrimp Alkaline Phosphatase	Promega	#M820B	Defosforilasyon
EcoRI Restriction Endonuclease	New England BioLabs (NEB)	#R0101S	Restriksiyon endonükleaz kesimi
T4 DNA Ligase	Fermentas	#EL0014	Ligasyon
HindIII Restriction Endonuclease	New England BioLabs (NEB)	#R0104S	Ters transkripsiyon
DTCS Quick Start Mix	Beckman Coulter	#608120	Dizi Analizi

**EK 3 – Tez deneylerinde kullanılan laboratuvar cihaz ve gereçleri**

<b>Kullanılan Cihaz</b>	<b>Markası</b>	<b>Katalog Numarası</b>
Çalkalamalı İnkübatör	SheaLab	SL
Buz Makinesi	Scotsman	AF80
Soğutmalı Santrifüj (KÜÇÜK)	Thermo	IEC MICROCL 17R Centrifuge
Soğutmalı Santrifüj (ORTA)	Sigma	3K30
Soğutmalı Santrifüj (BÜYÜK)	Beckman Coulter	Allegra X-15R Centrifuge
Dizileme Cihazı	Beckman Coulter	CEQ™ 8000 Genetic Analysis System
Orbital Shaker	FinePCR	SH30
Shaker (JEL)	Heidolph	Unimax 1010
Thermal Cycler (BIOMETRA)	Biometra	Thermocycler
Thermal Cycler (BIORAD)	BioRad	DNA Engine Gradient Cycler
Spektrofotometre	BioRad	
Nanodrop	NanoDrop	ND-1000
Versadoc Görüntüleme Sistemi	BioRad	VersaDoc Imaging System
HPLC cihazı	Agilent Technologies	G1321A
Agaroz Elektroforez	Thermo	owl
İnkübatör	Binder	
İki Yana Çalkalamalı Shaker	Daigger Rocker	
Ph Metre	Hanna instruments HI221	
Ph Metre Kağıdı	Sigma	P-4661
Ph Metre Kağıdı	Merck	1.09535.0001
Su Cihazı	Millipore	ELIX + MilliQ (Gradient)
Su Banyosu	Lab Line	Aquabath
Kuru Isı Bloğu	MS Major Science Dry Bath Incubator	
Otoklav	ALP	
Vorteks	Labnet	VX100

Pastör Fırını	Memmert	
Tartı	Shimadzu	AX200 / BX320H
Magnetik Karıştırıcı	Cimarec	



**EK 4 – JM109 ve DH5α AluxS ve K12 suşlarının subletal dozda siprofloksasin maruziyeti sonrası sekans analizleri**

**1. JM109 gyrA**

GGAAGAGCTGAAGAGCTCCTATCTGGATTATGCGATGTCGGTCATTGTTGGCCGTGCGCT  
GCCAGATGTCCGAGATGGCCTGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG  
TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTGCGTTGGTGACGTA  
ATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTCGGCGGTCTATAACACGATCGTCCGCATGGCG  
CAGCCATTCTCGCTGCGTTATATGCTGGTAGACGGTCAGGGTAACTTCGGTTCTATCGAC  
GGCGACTCTGCGGCGGCAATGCGTTATACGGAAATCCGTCTGGCGAAAATTGCCCATGA  
ACTGATGGCCGATCTCGAAAAAGAGACGGTTCGATTTTCGTTGATAACTATGACGGCACGG  
AAAAAATTCCGGACGTCATGCCAACCAAAATTCCTAACCTGCTGGTGAACGGTTCTTCC  
GGTATCGCCGTAGGTATGGCACC

**2. DH5α AluxS gyrA**

CTCCTATCTGGATTATGCGATGTCGGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGTCCGAGA  
TGGCCTGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACGTAAGTACTAGGCAATGACT  
GGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTGCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATC  
CCCATGGTGACTCGGCGGTCTATAACACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGC  
GTTATATGCTGGTAGACGGTCAGGGTAACTTCGGTTCTATCGACGGCGACTCTGCGGCGG  
CAATGCGTTATACGGAAATCCGTCTGGCGAAAATTGCCCATGAACTGATGGCCGATCTCG  
AAAAAGAGACGGTTCGATTTTCGTTGATAACTATGACGGCACGGAAAAAATTCCGGACGTC  
ATGCCAACCAAAATTCCTAACCTGCTGGTGAACGGTTATTCCGGTATCGCCGTAGGTATG  
GCA

**3. K12 gyrA**

GAGGAAGAGCTGAAGAGCTCCTATCTGGATTATGCGATGTCGGTCATTGTTGGCCGTGC  
GCTGCCAGATGTCCGAGATGGCCTGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGA  
ACGTAAGTACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTGCGTTGGTGAC  
GTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACGCGGTCTATGACACGATCGTCCGCATGGCG  
CAGCCATTCTCGCTGCGTTATATGCTGGTAGACGGTCAGGGTAACTTCGGTTCTATCGAC  
GGCGACTCTGCGGCGGCAATGCGTTATACGGAAATCCGTCTGGCGAAAATTGCCCATGA  
ACTGATGGCCGATCTCGAAAAAGAGACGGTTCGATTTTCGTTGATAACTATGACGGCACGG  
AAAAAATTCCGGACGTCATGCCAACCAAAATTCCTAACCTGCTGGTGAACGGTTCTTCC  
GGTATCGCCGTAGGTATGGCAACC

**4. JM109 parC**

CCGTTTATTGGTGATGGTCTGAAACCTGTTTCAGCGCCGCATTGTGTATGCGATGTCTGAA  
CTGGGCCTGAATGCCAGCGCAAATTTAAAAAATCGGCCCGTACCGTCCGGTGACGTA  
GGGTAAATACCATCCGCACGGCGATAGCGCCTGTTATGAGGCGATGGTCCTGA

**5. DH5 $\alpha$   $\Delta$ luxS *parC***

CTGATCATGGACCGTGCAGTTGCCGTTTATTGGTGATGGTCTGAAACCTGTTTCAGCGCCG  
CATTGTGTATGCGATGTCTGAACTGGGCCTGAATGCCAGCGCCAAATTTAAAAAATCGGC  
CCGTACCGTCGGTGACGTACTGGGTAAATAACCATCCGCACGGCGATAGCGCCTGTTATGA  
GGCGATGGTCCT

**6. K12 *parC***

TGGACCGTGCGTTGCCGTTTATTGGTGATGGTCTGAAACCTGTTTCAGCGCCGCGCATTGTGT  
ATGCGATGTCTGAACTGGGCCTGAATGCCAGCGCCAAATTTAAAAAATCGGCCCGTACC  
GTCGGTGACGTACTGGGTAAATAACCATCCGCACGGCGATAGCGCCTGTTATGAGGCGATG  
GTCCTGATGGA

## 8 ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Aslınur Gülnaz YALINKILIÇ

**Doğum Yeri:** Trabzon

**Doğum Tarihi:** 17/01/1988

**Medeni Hali:** Evli

**Yabancı Dili:** İngilizce, Japonca

### **Eğitim Durumu**

**Lise:** Cemal Şaşmaz Özel Fen Lisesi, 2006

**Lisans:** Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik, 2011

# PRODUCTION OF ACTIVE HUMAN INTERFERON ALPHA IN *Escherichia coli* CELLS

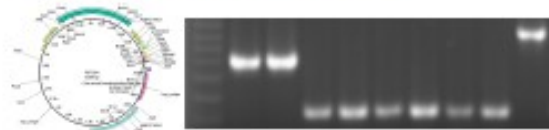
Ceren Can, Pelin Koçcak, Aslınur Yalınkılıç, Doruk Engin



## introduction

Interferons are a class of glycoproteins that take place in the first line of defence against microbes. Interferon alpha (IFN- $\alpha$ ) is a family of at least 23 different cytokines with antiviral, antiproliferative, antiproliferative activities. This cytokine mainly originates from monocytes/macrophages, lymphoblastoid cells, fibroblasts in the context of microbial infections. Along with somatostatin and insulin, recombinant IFN- $\alpha$  is one of the first available therapeutic peptide and mainly employed in cancer chemotherapy and in the treatment of chronic hepatitis B and C. The market share of IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IFN- $\beta$  is expected to increase as new therapeutic indications are investigated and explored.

## cloning of IFN- $\alpha$ CDS



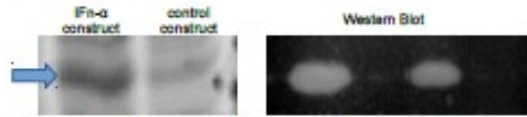
**DNA purification**  
DNA purification was performed from buffy coat separated from 5 ml of blood by using phenol chloroform protocol.

**Cloning of human IFN- $\alpha$  CDS in bacterial expression vector**  
We have designed oligonucleotide primers according to the Genbank record N03\_020154. As IFN- $\alpha$  coding sequence does not have any introns we have directly amplified mature peptide sequence segment from purified DNA. Both plasmid vector pET28a and IFN- $\alpha$  amplification product was double digested with EcoRI and SalI restriction endonucleases. After ligation of the digested insert and vector, transformation of *Escherichia coli* JM100 cells with this circularized DNA was performed by using PEG6K – DMSO protocol. Transformants were selected on Luria Bertani agar plates supplemented with kanamycin. After overnight incubation, colony PCR was performed to determine the bacterial colonies that held the plasmids with cloned insert. The selected colonies were confirmed to have correctly positioned insert by using Sanger DNA sequencing.

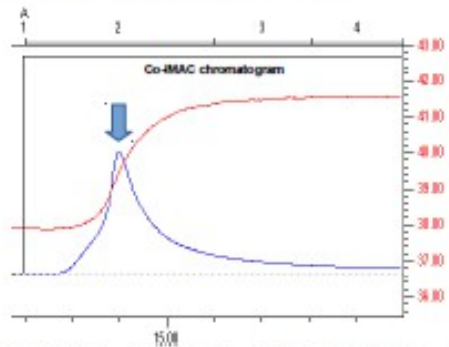


**REFERENCES**  
Schneider K, Harding KJ, Rowan T, Harris DA. Interferon gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004;76(2):183-93.  
Yoon S, Hwang H, Nguyen NT, Choi K, Kwon M, Hwang SH. Expression and biological activity of two recombinant polypeptides related to subunit 1 of the interferon receptor. *Journal of Medical and Biological Research*. 2000;33(7):771-6.  
Lubellin J, Rivish CA, Jassir C, Paulson M, Riggs P, Berlow M, Shultz, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microb Cell Fact*. 2012; May 9;11:58.  
Vogel SN, Friedman RM, Hagan MM. Measurement of antiviral activity induced by interferon alpha, beta, and gamma. *Cell Probs Immunol*. 2001;Chapter 5:144-53.  
Kim CK, Jung JH, Yim JH, Yoon SK, Jung SK. Monitoring the Antiviral Effect of Alpha Interferon on Individual Cells. *J Virol*. 2007; Aug 15;81(16):8874-80.  
Rasochova P, Pichler M, Wang X, Yan M, Doung PH, Park Y, Hillen C, et al. Alpha Interferon Induces Long Lasting Cell Activation of JAK/STAT Signaling in the Mouse Liver through Induction of LRP10/10P43. *Mol Cell Biol*. 2009; Sep 1;29(17):4847-61.

## expression & purification

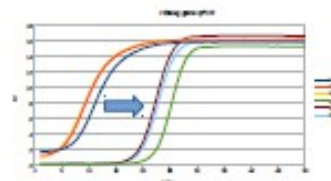


Preliminary expression studies revealed 24,795 kDa protein band which was later confirmed to be IFN- $\alpha$  product by staining with anti-His6 antibodies



The pellet from 250 ml scale culture was lysed and purified with cobalt chelation column (Figure 3). Single step elution was performed to prevent the expansion of the fraction volume. Imidazole was removed by using Sephadex G25 group separating column.

## activity testing



IFN- $\alpha$  and GFP treated Hep3G culture supernatants were collected. HBsAg gene was amplified and  $\Delta\Delta Ct$  values were calculated for IFN- $\alpha$  treated group. There was 3.22  $\rightarrow$  0.43 fold decrease in HBsAg gene copy in interferon treated cells.