

**BAZI GRAM NEGATİF BAKTERİLERDE
KONTAKT BAĞIMLI İNHİBİSYON MEKANİZMASININ
ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF
CONTACT-DEPENDENT INHIBITION (CDI)
MECHANISM IN SOME GRAM NEGATIVE BACTERIA**

MUHAMMED HASAN AKYIL

PROF. DR NİLÜFER CİHANGİR

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2021

Sevgili eşim Ayşe AKYIL

ve

Oğlum Etka Selim AKYIL'a...

ÖZET

Bazı Gram Negatif Bakterilerde Kontakt Bağımlı İnhibisyon Mekanizmasının Araştırılması

Muhammed Hasan AKYIL

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR

Haziran 2021, 60 sayfa

Mikroorganizmaların birbirleriyle olan etkileşimlerini incelemek, mikroorganizmaları daha iyi tanıma fırsatını ayrıca onlarla nasıl mücadele edeceğimizin ipuçlarını bulmamızı sağlamaktadır. Antibiyotiğin keşfi, biyofilm oluşumları ve quorum sensing gibi mekanizmalar bu etkileşimlerin araştırılması sonucu ortaya çıkmıştır. Mikroorganizmaların geliştirdikleri direnç mekanizmaları, mikroorganizmalara karşı mücadelemizde mevcut yöntemlerin etkisini azaltmakta bu da yeni mekanizmaların araştırılmasını zorunlu kılmaktadır. CDI (Kontakt Bağımlı İnhibisyon) mekanizması özellikle tür içi rekabette bakterilerin birbirlerini inhibe ettikleri bir mekanizma olarak karşımıza çıkmaktadır. CDI mekanizmasına sahip olan bakteriler kendi türü içinde CDI mekanizmasına sahip olmayan bakterilerin reseptörlerine bağlanarak onların içersine toksin salmakta ve bu toksin hedef bakteride bakteriyostatik bir etki göstermektedir. Bu bağlamda sunulan tez çalışmasının amacı *Protues* ve

Salmonella türlerinin CDI mekanizmalarının aydınlatılmasıdır. Bu tez çalışmasında hem Amerikan Kültür Koleksiyonuna ait hem de kendi izolatlarımız olan çeşitli *Proteus* ve *Salmonella* türleriyle çalışılmıştır. NCBI'da ASM226535v1 numaralı kayıtlı *Proteus mirabilis* suşuna ait RefSeq: WP_094959879.1 numaralı proteinin CdiB, WP_094959878.1 numaralı proteinin CdiA ve WP_063108584.1 numaralı proteinin ise CdiI proteini olabileceği saptanmıştır. *Proteus mirabilis* ATCC® 43071 suşundan homolog rekombinasyon yöntemiyle CDI negatif olan *Proteus mirabilis* ATCC® 43071 Δ cdi BAI :: amp^R mutant suşu elde edilmiş ve bu suşa ait kontakt bağımlı inhibisyon mekanizması çeşitli parametrelerle aydınlatılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Proteus*, *Salmonella*, Kontakt bağımlı inhibisyon

ABSTRACT

INVESTIGATION OF CONTACT-DEPENDENT INHIBITION MECHANISM IN SOME GRAM NEGATIVE BACTERIA

Muhammed Hasan AKYIL

Doctor of Philosophy, Department of BIOLOGY

Supervisor: Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR

JUNE 2021, 60 pages

Examining the interactions of microorganisms with each other provides us with the opportunity to get to know microorganisms better and find clues on how to deal with them. The discovery of antibiotics, biofilm formation and mechanisms such as quorum sensing emerged as a result of investigating these interactions. Due to the resistance mechanisms developed by microorganisms, the effect of existing methods decreases in our fight against microorganisms, and this makes it necessary to investigate new mechanisms. CDI (Contact Dependent Growth Inhibition) mechanism emerges as a mechanism by which bacteria inhibit each other, especially in competition within the species. After bacteria with CDI mechanism bind to the receptors of bacteria that do not have the CDI mechanism, they release toxins into them, and this toxin causes a bacteriostatic effect in the target bacteria. In this context, the aim of the presented thesis is to elucidate the CDI mechanisms of *Proteus* and *Salmonella* species. In this thesis, various *Proteus* and *Salmonella* species, both from the American Cultural Collection and

our own isolates, were studied. It was determined that the RefSeq: WP_094959879.1 protein belonging to the *Proteus mirabilis* strain registered in NCBI with the number ASM226535v1 could be CdiB, the protein numbered WP_094959878.1 could be CdiA and the protein numbered WP_063108584.1 could be the CdiI protein. CDI negative *Proteus mirabilis* ATCC® 43071 Δ cdi BAI :: ampR mutant strain was obtained from *Proteus mirabilis* ATCC® 43071 strain by homologous recombination method and the contact-dependent inhibition mechanism of this strain was elucidated with various parameters.

Keywords: *Proteus*, *Salmonella*, Contact Dependent Growth Inhibition

TEŞEKKÜR

Lisans ve lisansüstü eğitimim boyunca bilgisini, desteğini ve sevgisini esirgemeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Nilüfer Cihangir'e,

Engin bilgi birikimleri ve destekleri ile her zaman yanımda olan Biyoteknoloji Anabilim Dalı üyeleri değerli hocalarım, Prof. Dr. Nilüfer Aksöz, Prof. Dr. Işıl Seyis Bilkay, Dr.Öğr. Üyesi Neslihan İdil, Dr. Doruk Aracagök, Dr. Sinem Diken Gür, Dr. Hande Avcıoğlu, Dr. Sezen Bilen Özyürek, Dr. Gülcan Özbakır, Dr. Kübra Erkan Türkmen ve Dr. Gözde Koşarsoy Ağçeli'ye,

Tez izleme komitesinde yönlendirmeleriyle bu çalışmada çok büyük desteği bulunan değerli hocam Prof. Dr. Aysun Ergene'ye,

Tez ve diğer çalışmalarım boyunca Floresan proteinlerinin görüntülenmesinde yardımcı olan Dr.Öğr.Üyesi Egemen Foto ve Dr.Öğr.Üyesi Fatma Zilifdar Foto'ya, plazmit seçiminde yardımcı olan Dr. Tuğçe Karaduman'a, bakteri izolasyon aşamasında yardımcı olan Selcan Genç'e,

Manevi destekleri ve bilgileri ile bana her zaman destek olan arkadaşlarım; Melike Zeynep Sayın, Cansu Sevim, Özgecan Erdem, Mehmet Kürşat Şahin, Tuğçe Dağ, Tuğçe Erdoğan, Meriç Birben'e

Tez deneyleri kapsamında yardımcı olan öğrencilerim; Duygu Seren Özyılmaz, Ebru Kavak, Engin Güner, Naciye Avşar, Açelya Dalkılıç'a,

Tez süresi boyunca maddi desteğinden ötürü Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Biricik Annem ile Babama,

En büyük destekçim ve her daim kahrımı çeken sevgili hayat arkadaşım Ayşe Akyıl'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Mikroorganizmalar Arası Etkileşim.....	2
2.2. Tip V sekresyon sistemi	3
2.2.1. Tip V sekresyon sistemi ve CDI (Kontak Bağımlı inhibisyon) mekanizması	4
2.3. CDI (Kontak Bağımlı inhibisyon) mekanizması.....	5
2.4. Bakteriler Arası Temasa Dayalı Sinyalleşme.....	9
2.5. CDI tipleri	10
2.6. Enterobakteriler	11
2.6.1. <i>Proteus</i>	13
2.6.2. <i>Salmonella</i>	14
2.6.3. <i>Proteus</i> ve <i>Salmonella</i> teşhisinde kullanılan besiyerleri.....	15
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	16
3.1. Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar ve Plazmitler.....	16
3.1.1. ATCC Suşlar	16
3.1.2. Yabanıl Suşlar	17
3.1.3. Plazmitler	18
3.2. CDI ⁺ ve CDI ⁻ Mikroorganizmaların Belirlenmesi	20
3.2.1. CDI Gen Bölgelerinin Taranması İn-Silico analizi.....	20
3.2.2. Muhtemel CDI gen bölgesinin diğer bakteri gruplarıyla kıyaslanması	20
3.3. CDI ⁻ mutant suşların oluşturulması.....	21

3.3.1. AmpR geninin ekstraksiyonu.....	21
3.3.2. <i>Proteus mirabilis</i> Δcdi B A I oluşturulması	22
3.4. CDI etkisinin gözlemlenmesi	24
3.4.1. Kalitatif Analiz	25
3.4.2. Kantitatif Analiz	25
3.5. CDI mekanizmasını etkileyen faktörler	26
3.5.1. Reaksiyon ortamının inkübasyon süresi	26
3.5.2. CDI ⁺ ve CDI ⁻ suşların oranı	27
3.5.3. Üreme ortamı inkübasyon süresi	27
3.5.4. Reaksiyon ortamının sıcaklığı	28
3.6. Diğer suşların oluşturulan CDI ⁻ (<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 43071 Δcdi BAI :: amp ^R) suşuna etkisinin saptanması	28
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	30
4.1. Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar ve Plazmitler	30
4.1.2. Yabancı Suşlar	30
4.1.3. Plazmitler	31
4.2. CDI ⁺ ve CDI ⁻ Mikroorganizmaların Belirlenmesi.....	31
4.2.1. CDI Gen Bölgelerinin Taranması İn-Silico analiz	31
4.2.2. Muhtemel CDI gen bölgesinin diğer bakteri gruplarıyla kıyaslanması.....	32
4.3. CDI ⁻ mutant suşların oluşturulması	34
4.3.1. Amp ^R geninin ekstraksiyonu	34
4.3.2. <i>Proteus mirabilis</i> Δcdi B A I oluşturulması	35
4.4. CDI etkisinin gözlemlenmesi	37
4.4.1. Kalitatif Analiz	38
4.4.2. Kantitatif Analiz	39
4.5. CDI mekanizmasını etkileyen faktörler	42
4.5.1. Reaksiyon ortamının inkübasyon süresi	42
4.5.2. CDI ⁺ ve CDI ⁻ suşların oranı	43
4.5.3. Üreme ortamı inkübasyon süresi	46
4.5.4. Reaksiyon ortamının sıcaklığı	47
4.6. Diğer suşların oluşturulan CDI ⁻ (<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 43071 Δcdi BAI :: amp ^R) suşa etkisinin saptanması	49

5. YORUM.....	53
6. KAYNAKLAR.....	56
EKLER	61
EK 1 – ASM226535v1 <i>Proteus mirabilis</i> CDI protein kümesi amino asit sekansı fasta formatı.....	61
EK 2 – Anketler.....	63
EK 3 – Etik Kurul İzin Belgesi	64
EK 4 - Tezden Türetilmiş Yayınlar	65
EK 5 - Tezden Türetilmiş Bildiriler	66
EK 6 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	67
ÖZGEÇMİŞ	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 : Tip V Sekresyon sisteminin alt grupları [21]	4
Şekil 2.2: CDI ⁺ ve CDI ⁻ suş oranlarının inhibisyona etkisi[2]	6
Şekil 2.3: CdiA yüzey topolojisi modeli ve toksin salınımı[34].....	7
Şekil 2.4: CDI ⁺ bakterilerin diğer bakterilere etkisi; [40].....	8
Şekil 2.5: CdiA'nın Elektron kriyotomografisinde görüntüsü [34].....	9
Şekil 2.6 : <i>Enterobacteriaceae</i> familyası üyelerinin arasındaki ilişki [56]	11
Şekil 2.7: <i>Proteus mirabilis</i> 'in yayılma hareketi[63]	14
Şekil 2.8: <i>Salmonella enteridis</i> suşunun SS agar ve XLD agar üzerinde görüntüsü [72]	15
Şekil 3.1 : Yeşil ve Kırmızı floresan protein içeren plazmitler	18
Şekil 3.2 : pBbB5k-GFP ve pBbA5k-RFP plazmitlerinin haritaları	19
Şekil 4.1 : Ekstrakte edilen pBbB5k-GFP ve pBbA5k-RFP plazmitlerinin jel elektroforez sonucu görüntüleri	31
Şekil 4.2 : ASM226535v1 <i>Proteus mirabilis</i> suşuna ait cdi genleri ile ilişkili olduğu düşünülen WP_094959879.1, WP_094959878.1 ve WP_063108584.1 proteinlerinin grafik görüntüsü	32
Şekil 4.3 : Ekstrakte edilen Amp ^R geninin Jel Elektroforezde görüntüsü.....	34
Şekil 4.4 : <i>Proteus mirabilis</i> Δcdi BAI'nın LB Amp ^R besiyerinde boncuk ekim görüntüsü	35
Şekil 4.5 : Mutant suşlardan ekstrakte edilen Amp ^R geninin Jel Elektroforezde görüntüsü	37
Şekil 4.6 : Kırmızı ve yeşil floresan proteini içeren plazmitlerin; CDI ⁻ ve CDI ⁺ suşlara aktarılmasının ardından UV ışık altında görüntüleri	38
Şekil 4.7 : CDI ⁻ ve CDI ⁺ suşlara birbirlerine etkisinin kalitatif olarak analzi.....	39
Şekil 4.8 : CDI ⁺ suşların CDI ⁻ suşlarla etkileşimi sonucu yüzdelik değişim	41
Şekil 4.9 : Reaksiyon ortamı inkübasyon süresinin CDI ⁺ ve CDI ⁻ suşların bakteri sayısına etkisi.....	43
Şekil 4.10 : CDI ⁺ / CDI ⁻ suşların oranının CDI mekanizmasına etkisi	45
Şekil 4.11 : CDI ⁻ / CDI ⁺ suşların oranının CDI mekanizmasına etkisi	45

Şekil 4.12 : Reaksiyon ortamı sıcaklığının CDI ⁺ ve CDI ⁻ suşların bakteri sayısına etkisi	49
Şekil 4.13 :16S rRNA analizine göre <i>Proteus</i> türlerinin filogenetik ağacı[77]	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 : <i>Enterobacteriaceae</i> familyası üyelerini tanımlamada kullanılan yöntemler.[58].....	12
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan ATCC suşlar	16
Çizelge 4.1. İzole edilen P1, P2 ve S1 mikroorganizmalarının seçici besiyerlerinde oluşturdukları koloniler ve bazı biyokimyasal testleri.....	30
Çizelge 4.2. CDI ⁺ suşların CDI ⁻ suşlara etkisinin floresan spektrofotometresinde ölçülen değerleri	40
Çizelge 4.3. Reaksiyon ortamı inkübasyon süresinin, CDI mekanizmasına etkisi.....	42
Çizelge 4.4. CDI ⁺ ve CDI ⁻ suşların oranının CDI mekanizmasına etkisi	44
Çizelge 4.5. Üreme ortamı inkübasyon süresinin CDI mekanizmasına etkisi.....	46
Çizelge 4.6. Reaksiyon ortamının sıcaklığının CDI mekanizmasına etkisi.....	48
Çizelge 4.7. CDI ⁻ <i>Proteus</i> suşuna etkili diğer suşlar	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Santigrat Derece
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mL	Mililitre

Kısaltmalar

CDI	Kontak Bağımlı İnhibisyon
XLD Agar	Ksiloz Lizin Deoksikolat Agar
HE Agar	Hektoen Enterik Agar
SS Agar	Salmonella Shigella Agar
TSI	Üçlü şeker demir

1. GİRİŞ

Mikroorganizmaların birbirleriyle ilişkisi, birbirlerine karşı sergiledikleri stratejileri 20. yüzyılın başlarından beri mikrobiyal hastalıklara karşı mücadelede ışık tutmuştur. Antibiyotiklerin keşfi ile bu mücadelede çok büyük bir adım atılmıştır. Mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı direnç kazanmaları, bilinçsiz antibiyotik kullanımıyla hız kazanmıştır ve çoğu görüşe göre bakterilerin direnç kazanma yetilerinden ötürü önümüzde insanoğlunu bekleyen bir küresel kriz bulunmaktadır [1]. Bu durum mikroorganizmalarla mücadelede yeni arayışlar getirmektedir.

CDI (Kontakt bağımlı İnhibisyon) mekanizması özellikle tür içi rekabette bakterilerin birbirlerini inhibe ettikleri bir mekanizma olarak karşımıza çıkmaktadır. CDI mekanizmasına sahip olan bakteriler kendi türü içinde CDI mekanizmasına sahip olmayan bakterilerin reseptörlerine bağlanarak onların içersine toksin salmakta ve bu toksin hedef bakteride bakteriyostatik bir etki göstermektedir. Kontakt bağımlı inhibisyon mekanizması çok enteresan bir şekilde farklı türlerden ziyade sadece tür içi inhibisyona neden olmaktadır. Fakat CDI özellikle spesifik olarak bir bakteri türünü inhibe etmesi geniş spekturumlu antibiyotiklere kıyasla bakterilere karşı olan bu mücadelemizde olumlu karşılanmaktadır. Bununla birlikte Cdi toksininin, bakteriyosinler gibi salınmaması ve hedef hücrenin içersine doğrudan bırakılması da olumlu özelliklerindedir. CDI mekanizmasının bakterilere karşı kullanılmasıyla, tıpkı probiyotikler gibi bakteriyoterapi kapsamına girmesi beklenmektedir.

2005 yılında Aoki ve arkadaşları tarafından *E.coli*'de keşfedilen bu mekanizmanın çoğunlukla Gram negatif bakterilerde bulunduğu düşünülmekteydi[2]. *E.coli*, *Pseudomonas*, *Acinetobacte*, *Burkholderia* ve *Enterobacter* gibi bazı Gram negatif bakterilerde CDI mekanizmasının ve CDI genlerinin keşfi gerçekleştirilmiştir[3][4][5]. *Protues* ve *Salmonella* türlerinin CDI mekanizmasına sahip olduğu düşünülse de henüz bu türlerde CDI ile ilgili çalışmalar yapılmamıştır.

Bu çalışmada *Protues* ve *Salmonella* türlerinin CDI mekanizmalarının aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu bağlamda, hem ATCC suşlar hem de kendi izolatlarımız kullanılmış İn-Slico analizler gerçekleştirilmiştir. *Proteus mirabilis* suşuna ait Cdi genleri rapor edilmiştir. Bununla yanısıra CDI mekanizmasını etkileyen faktörler incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikroorganizmalar Arası Etkileşim

Mikroorganizmalar aynı ortamda bulunan diğer mikroorganizma gruplarına karşı besin kaynakları kullanabilmek ve kendilerine alan oluşturabilmek için sürekli rekabet içindedirler[6]. Günümüze kadar yapılan pek çok çalışma sonucu, mikroorganizmaların sahip oldukları aktif mekanizmalar sayesinde diğer mikroorganizmaların kolonileşmesini engelleyebileceği veya öldürebileceği ortaya çıkmıştır[7]. Mikroorganizmalar antimikrobiyal metabolit, enzim veya toksin üreterek, siderefor salınımı yaparak, diğer mikroorganizma türlerine karşı rekabette üstünlük kazanmaktadırlar. Bunun yanı sıra biyofilm oluşturabilme özellikleri ve birbirleri ile iletişim sağlamalarına yarayan Quorum Sensing (Çoğunluğu algılama) mekanizması da bu rekabette mikroorganizmalara avantaj sağlamaktadır [8][9].

Mikroorganizmaların rekabeti iki grupta toplanabilir: Var olan kaynakların tüketilmesine dayalı sömürücü rekabet (Pasif rekabet) veya organizmaların birbirlerine direk zarar verdiği aktif rekabet. Sömürücü rekabette mikroorganizma sınırlı kaynağın rakibine ulaşmasını engelleme yoluna gitmektedir. Bu, besin alımının artması veya besinleri toplayan moleküllerin hücre dışına salgılanması yoluyla gerçekleşir. Örneğin, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Escherichia coli*, oksijen mevcut olduğunda metabolik olarak fermentasyondan solunuma geçebilir, bu da yüksek üreme oranları ancak düşük verim oluşturarak besin maddelerini rakiplerinden daha hızlı elde etmelerine olanak tanır. Besinleri toplayan moleküllerin hücre dışına salgılanmasına en iyi örnek proteaz enzimi ve sidereforlardır. Mikroorganizmaların özellikle besin rekabetinde en çok kullandıkları enzimlerin başında proteaz enzimi gelmektedir. Dış ortama salınan proteaz enziminin görevi elastin, fibrin ve kollejen gibi proteinlerin sindirimini gerçekleştirmek bu sayede hücre içine alınımını sağlamaktır. Bu mekanizma sayesinde mikroorganizma üremesinin hızlaması için gerekli nütrientleri sağlamaktadır[10]. *P.aeruginosa* siderefor salınımını çevredeki demir moleküllerini bağlamak için gerçekleştirir. Piyoverdin adı verilen *P.aeruginosa* 'daki bu küçük moleküller bakteri için gerekli demiri bağlayarak bakteriye rekabette üstünlük kazandırmaktadırlar[11][12].

Mikroorganizmalar oluşturdukları biyofilm sayesinde diğer mikroorganizmaların kendilerine tehdit oluşturan moleküllerinden korunmaktadır. Ayrıca adhezyon

kabiliyetleri, adhezyon kabiliyeti daha az olan mikroorganizmaları karşı besin rekabetinde üstünlük sağlamaktadır[13]. Buna karşılık mikroorganizmaların antiadhezyon engelleyici biyosidal özelliği olmayan polisakkaritler ürettiği de bilinmektedir [14].

Mikroorganizmalar tarafından üretilen antimikrobiyal moleküller, mikroorganizmalar arasındaki rekabette çok önemli bir yer tutmaktadır [7]. Bu antimikrobiyal maddeleri bakteriyosinler, peptitler ve toksinler oluşturmaktadır[15][16].

Hücre dışına salınan bileşikler vasıtasıyla gerçekleşen etkileşime en iyi örneklerden birisi de Quorum Sensing mekanizmasıdır. Sinyal molekülü konsantrasyonu belirli bir eşik değere ulaştığında çeşitli grup davranışlarını tetikleyebilmektedir[17]. Aynı şekilde rekabet içinde buldukları mikroorganizmaların birbirleriyle haberleşmesini kesmek için de çeşitli metabolitler üretmektedirler. Quorum quenching adı verilen bu olayda rakip mikroorganizmalar tarafından üretilen açıl-homoserin laktonları (AHLs) inhibe edilmesiyle gerçekleşmektedir [18].

Mikroorganizmalar arasındaki etkileşim, hücre dışına salınımı gerçekleştirilen bileşikler vasıtasıyla olabildiği gibi mikroorganizmaların birbirleriyle temasları ile de gerçekleşmektedir[17].

Mikroorganizmaların birbirleriyle teması ile gerçekleştirilen etkileşim Tip III, Tip IV, Tip V ve Tip VI sekresyon sistemleri vasıtasıyla oluşmaktadır[19].

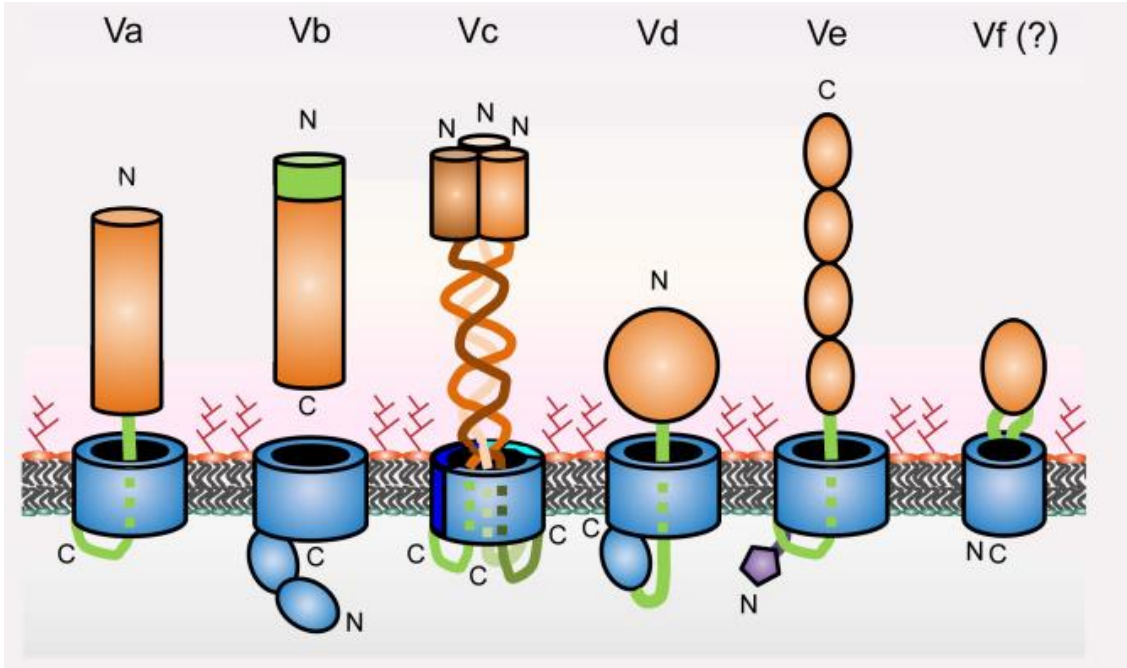
Mikrobiyal rekabeti daha net bir şekilde anlamak, mikroorganizmaların davranışını daha iyi anlamamızı ve endüstriyel, çevresel ve tıbbi amaçlar için mikrobiyal toplulukları kontrol edip, manipüle edebilmemizi sağlayacaktır[20].

2.2. Tip V sekresyon sistemi

Bakteriler; iletişim, virulans faktörleri, yüzeylere yapışma, kendi dışındaki bakterilerin inhibisyonu veya besin kazanımı amacı ile hücre dışına protein salgırlarlar. Gram negatif bakterilerde 9 ayrı sekresyon sistemi tanımlanmıştır[21].

2.2.1. Tip V sekresyon sistemi ve CDI (Kontak Bağımlı inhibisyon) mekanizması

Tip V salgılama sisteminin proteinlerine genellikle ototransportörler (ATs) denir. Tip V salgılama sistemi, zarı β -barrel translokator alanına sahip sadece bir polipeptid zincirinden ve bir hücre dışı efektör bölgesinden oluşur. Ayrıca proteinlerin yapısına bağlı olarak Tip V sekresyon sistemleri alt gruplara ayrılmaktadır (Şekil 2.2.). Tip Va sekresyon sistemine *Escherichia coli*'de proteaz sekresyonu [22], Tip Vc sekresyon sistemine *Yersinia enterocolitica*'da adhesyon proteini [23], Tip Vd sekresyon sistemine *Fusobacterium nucleatum*'da lipaz sekresyonu [24], Tip Ve sekresyon sistemine ise yine *Escherichia coli*'de adezyon proteinleri [25] örnek olarak verilebilir.

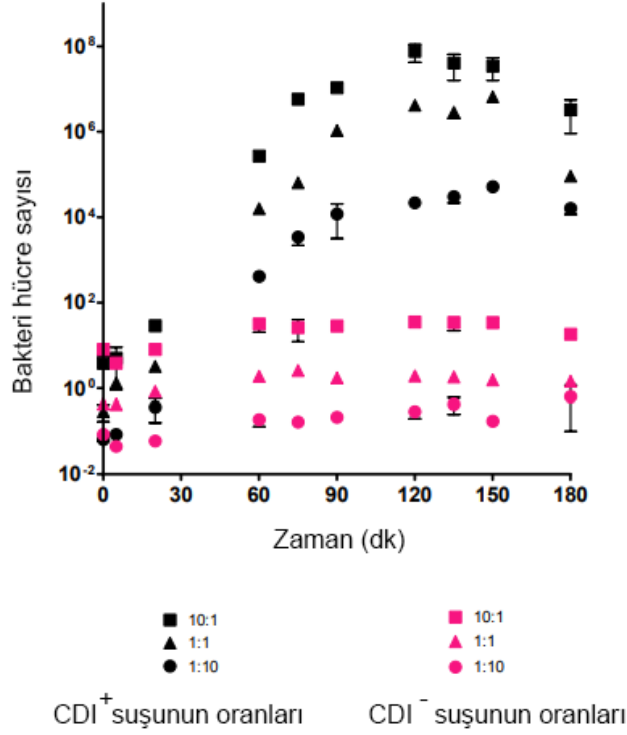


Şekil 2.1 : Tip V Sekresyon sisteminin alt grupları [21]

Tip Vb sekresyon sistemi aynı zamanda Two-Partner Secretion olarak adlandırılan ikili-ortaklı sekresyon sistemidir. Kontak Bağımlı İnhibisyon (CDI) mekanizması Tip Vb sekresyon sisteminin en önemli örneklerindedir[26] [27].

2.3. CDI (Kontak Bağımlı inhibisyon) mekanizması

Aoki ve arkadaşları yaptıkları çalışmada yabancıl tip *Escherichia coli* EC93 izolatlarının, *E. coli* K-12 izolatlarının sıvı besiyerinde üremelerini inhibe ettiklerini saptamışlardır[28]. Bu inhibisyon ekstraselüler bir antibakteriyal toksin ile değil; *E. coli* EC93 suşunun, *E. coli* K-12 suşuna direk temas etmesiyle gerçekleşmektedir[29]. Yapılan çalışmalarından ardından inhibisyona sebep olan cdiBAI gen kümesi izole edilmiş ve bu mekanizma “Contact Dependent Growth Inhibition (CDI)” olarak adlandırılmıştır[2]. Bu iki bakteri birbirine temas ettiğinde EC93 suşundan K-12 suşuna aktarılan toksinin K-12’de bu bakteriyostatik etkiyi yaptığı saptanmıştır. Söz konusu toksinin Aoki ve arkadaşlarının daha sonradan CDI adını verdikleri bir protein grubu vasıtasıyla gerçekleştiği saptanmıştır. Bu CDI protein grubunun yine aynı isimde bir gen kümesi tarafından regüle edildiği ve CDIA, CDIB ve CDII olmak üzere üç ayrı protein ile kontak bağımlı inhibisyonun gerçekleştiği saptanmıştır. CdiBAI gen kümesi, birbiriyle ilişkisi olan cdiA, cdiB ve cdiI olmak üzere üç farklı genin ekspresyonunu kontrol etmektedir. cdiA geninin ekspresyonu sonucu oluşan CDIA proteinin *E.coli* K-12 suşunda inhibisyona sebep olduğu ve bu inhibisyonu sadece *E.coli* EC93 suşu logertikmik fazda meydana getirebildiğini saptanmıştır[2]. Aoki ve arkadaşları cdiA⁺B⁺ *E.coli* suşunu kloramfenikol ile muamele ettiklerinde inhibisyonun gerçekleşmediğini dolayısıyla mekanizmanın çalışabilmesi için protein sentezinin de gerekli olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca inhibitör bakteriler ile hedef bakterileri farklı oranla aynı ortama eklendiğinde aynı etkiyi saptamışlardır. CDI⁺ suşlar 1/10 oranında eklendiğinde bile ortamdaki sayıları 10⁸ kat arttığı ama CDI⁻ suşların sayısının değişmediğini ortaya koymuşlardır[2].

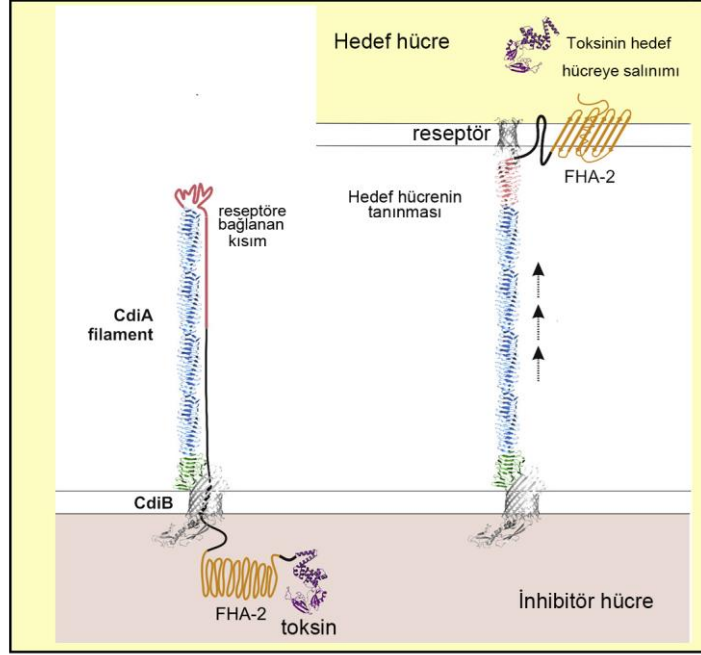


Şekil 2.2: CDI+ ve CDI- suş oranlarının inhibisyona etkisi[2]

Ayrıca bu inhibitör etkinin bir kolisin olup olmadığını anlamak amacıyla EC93'ün üreme eğrisinde, logaritmik fazına kolisin inhibitör arttırıcısı olan mitomisin C eklendiğinde EC93'ün inhibisyon etkisini kaybettiği saptanmıştır. *E.coli EC93* ile *E.coli K-12* suşları arasındaki bu etkileşimin kontak bağımlı bir inhibisyon olup olmadığını anlamak için 0,4-µm büyüklüğünde membran filtre kullanmış ve inhibisyon gözlenmemiştir. Bütün bu deney sonuçlarında Aoki ve arkadaşları *cdiAB* genlerinin kontrolünde kontak bağımlı bir inhibisyon olduğu ortaya konulmuştur. [2].

Kontak bağımlı inhibisyon mekanizmasını *cdiBAI* gen kümesi regüle ederken bu genlerin ekspresyonundan oluşan CdiB ve CdiA proteinleri inhibisyonda etkin rol oynamaktadır. CdiI proteini ise otoimmün görevini üstlenmektedir[30]. CdiB proteini dış membran üzerinde bir por oluşturarak CdiA proteinin sekresyonundan sorumludur. CdiB ve CdiA proteinleri tıpkı diğer ikili partner sekresyon sistemlerine benzemektedir[31]. CdiA proteini amin terminali CdiB proteinine tutunurken karboksil terminali dışa doğru bakmaktadır. Karboksil terminali CdiA-CT olarak tanımlanan bölge hedef hücre ile bağlantı kurulduktan sonra CdiA proteininden kırılarak hedef hücrenin içerisine girmekte ve inhibisyona sebep olmaktadır[30]. CdiA-CT bölgesi VENN (Valin- Glütamik asit-

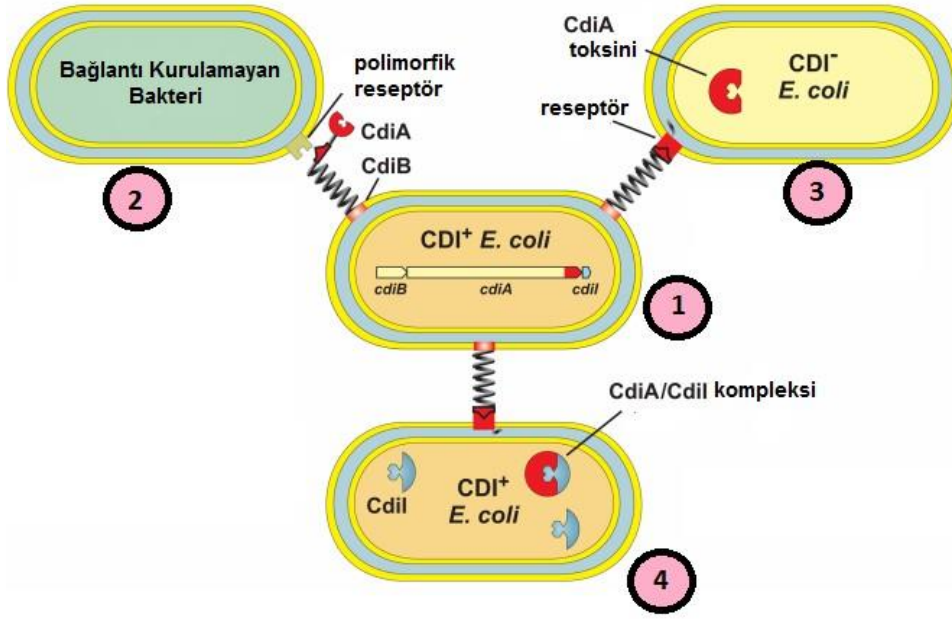
Glütamik asit- Asparajin) amino asitlerinden oluşan bir motiften sonra türe özgü olarak farklılaşmaktadır[32][33]. CdiA aynı zamanda hedef hücrenin reseptörünü tanıyan ve ona bağlanan bölgeyi de barındırmaktadır [34].



Şekil 2.3: CdiA yüzey topolojisi modeli ve toksin salınımı[34]

Hedef bakteri hücresi içerisine giren CdiA-CT hedef hücrede, protein motif gücü dağıtma, DNA'yı degrade etme ve tRNA'yı etkileme gibi çeşitli yollarla inhibisyona sebep olmaktadır[35][36][37][38]. CdiI proteini ise CDI⁺ bakterileri otoimmuniteden koruma görevini üstlenmektedir. CdiI proteinleri CdiA-CT toksinini bloke ederek bakterileri kendi kendilerini inhibe etmelerinden korumaktadır[32].

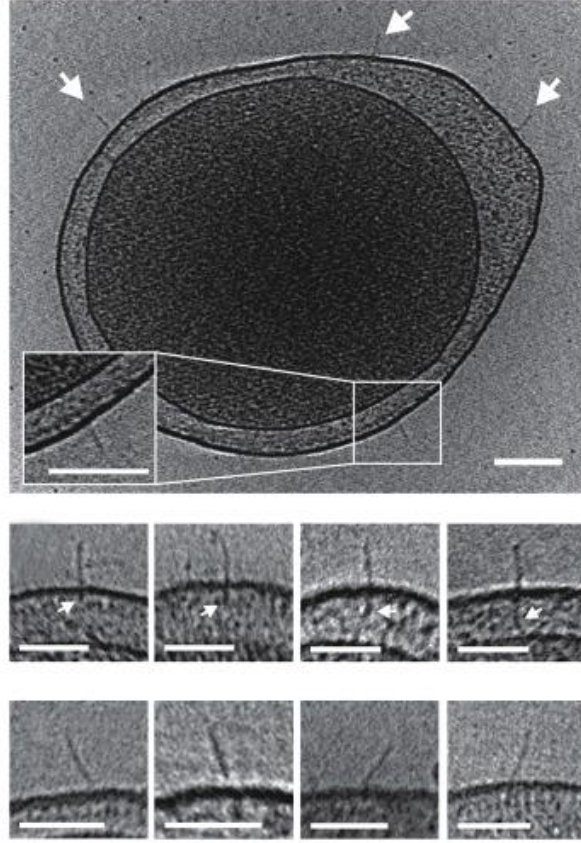
CDI⁺ bakteriler aynı tür içerisindeki CDI⁻ bakterileri inhibe etmektedir. Aynı tür içerisindeki CDI⁺ diğer bakterilere immunité proteinine sahip oldukları için inhibisyon etkisi göstermemektedir. Farklı türden bir bakteriye ise herhangi bir reseptörel bağlanma söz konusu olmamaktadır. Dolayısıyla CDI mekanizması sadece aynı türün içerisindeki bakteriler arasında gerçekleşen bir mekanizmadır [39].



Şekil 2.4: CDI⁺ bakterilerin diğer bakterilere etkisi; [40]

Yapılan çalışmalarda CdiA benzeri proteinlerin çeşitli bakteri türlerinde biyofilm oluşumunda etkili olduğu saptanmıştır; *Erwinia chrysanthemii*, *Xylella fastidiosa*, *N. meningitidis*, *Xanthomonas axonopodis*, *B. thailandensis*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*. [41][42][43][44]. Ayrıca Ruhe ve arkadaşları yaptıkları çalışmada CdiA'nın reseptörlerden bağımsız olarak hücreler arası adhezyon oluşturduğunu saptamışlardır. Reseptör mutant suşlarda CdiA-CdiA etkileşimlerinin bu adhezyona sebebiyet verdiklerini ileri sürmüşlerdir [44].

CDI bakteriden uzanan bir çubuk görünümünde olmaktadır. Bu yüzden CDI için "Çubuk üzerindeki toksin" benzetmesi yapılmaktadır[45]. Ruhe ve arkadaşları Elektron kriyotomografisiyle çektikleri görüntüde CdiA proteininin hücre yüzeyinden yaklaşık 33 nm uzunluğunda olduğunu göstermişlerdir (Şekil 2.6) [34].



Şekil 2.5: CdiA'nın Elektron kriyotomografisinde görüntüsü [34]

Özetle; Kontak bağımlı inhibisyon mekanizması bakterilerin tür içi rekabette birbirlerini inhibe etmek amacıyla kullandıkları aynı zamanda aynı türe ait bakterilerin birbirleriyle haberleşme sağladıkları bir mekanizma olarak karşımıza çıkmaktadır[46].

2.4. Bakteriler Arası Temasa Dayalı Sinyalleşme

Quorum Sensing ile bakterilerin çoğunluklarını algılayıp, gen ifadelerinde değişiklikler meydana getirdikleri bilinmektedir[47]. Yapılan son çalışmalarda Quorum sensing mekanizmasından ayrı olarak bakterilerin birbirlerine temas ederek de gen ifadelerinde değişiklikler oluşturduğu saptanmıştır. Garcia ve arkadaşları *Burkholderia* ile yaptıkları çalışmalarda CDI mekanizmasının biyofilm oluşumunda etkin rol oynadığını saptarken,

bu oluşumun sadece bakteri hücrelerinin birbirlerine yapışması ile gerçekleşmediğini de göstermişlerdir. Biyofilmin oluşması için aktif toksin alanlarının da değişiminin gerekli olduğunu saptanmıştır. Bu gözlem birbirlerine kontak olarak bağlanan bakteri hücrelerinin kendi aralarında sinyal gönderme fonksiyonuna sahip olduğunu göstermektedir [48].

Cotter ve meslektaşlarının son çalışmaları; toksinin, biyofilm ile ilgili varsayılan bir transkripsiyonel regülatörün gen ekspresyonundaki değişikliklerle ilişkili olduğunu ortaya koymuştur[46]. Jones ve arkadaşları tarafından CdiACT-CdiIE264 kompleksinin DNA'ya bağlandığı saptanmış ve buna bağlı olarak toksin bağışıklığı protein kompleksinin gen ekspresyonunu düzenlemek için bir transkripsiyon faktörü olarak hareket edebileceği ileri sürülmüştür [49]. Ayrıca pek çok çalışmada CDI mekanizmasının tRNA'yı parçaladığı belirtilmiştir[39][50][51].

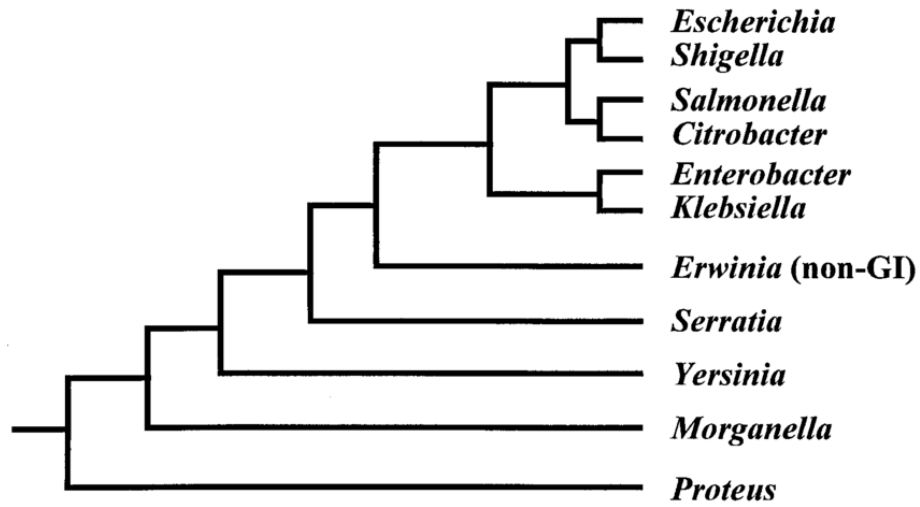
2.5. CDI tipleri

CDI mekanizmasının ilk olarak *E.coli* ile keşfedilmesinin ardından, diğer birçok bakteride de CDI mekanizmasının varlığı saptanmaya çalışılmıştır [28]. Ortaya çıkan tabloda, temelde birbirinin aynısı olup yapısal bazı farklılıklarından dolayı CDI iki ayrı tip olarak değerlendirilmeye başlanmıştır. Bu farklılıkların ilk olarak *Burkholderia*'da keşfedilmesinden dolayı, CDI tipleri; *E.coli* tipi ve *Burkholderia* tipi olmak üzere iki ana grupta toplanmıştır[30][36].

CDI gen kümesi *E.coli*'de cdiBAI şeklinde sıralanırken *Burkholderia* cinsinde cdiAIB şeklinde sıralanmaktadır. CDIA-CT kısmının başlangıcı *e.coli*'de VENN peptid motifinden oluşurken, *Burkholderia*'da bu motif genellikle (Q/E)LYN peptid motifinden oluşmaktadır[50].

2.6. Enterobakteriler

İlk defa 1937 de Rahn tarafından tanımlanan Enterobakteriler; Gammaproteobacteria sınıfı ve Enterobacterales takımı içerisinde dâhil olan geniş bir bakteri ailesidir [52]. Enterobakteriler, memelilerin barsaklarında kolaylıkla kolonize olabilmektedirler. Sağlıklı bireylerin barsak ortamında genelde düşük seviyededirler. Mikrobiyotaya iki durumda hakim olmaktadır: bebek bağırsağında veya yetişkin bağırsağının disbiyozu sırasında [53][54]. Memeli bağırsaklarında en sık görülen Enterobacteriaceae türlerinden biri *Escherichia coli*'dir. Bununla birlikte, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* ve *Proteus* gibi diğer cinslerden türler hem sağlıklı bebeklerden hem de yetişkinlerden sıklıkla izole edilebilir. Son dönemlerde *Proteus* cinsi, Morganellaceae familyasına altında sınıflandırılmaktadır ve Enterobacteriaceae ile birlikte Enterobacterales takımını oluşturmaktadır[55].



Şekil 2.6 : *Enterobacteriaceae* familyası üyelerinin arasındaki ilişki [56]

Enterobakteriler ailesine mensup bakteriler Gram negatif ve genelde küçük basil şeklinde olup, fakültatif anaerobdurlar. Genelde spor oluşturmazlar. Flagellaları sayesinde hareketlidirler. Enterik bakterilerin ortak özellikleri şu şekilde sıralanabilir; ortalama büyüklükleri 6 µm civarında, Mac Conkey agarda iyi üreyebilmektedirler, Glikoz fermantasyonundan asit ve baz üretebilmektedirler, katalaz pozitif, oksidaz

negatifirler.[57]. *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Proteus* ve *Shigella* bu aileye ait en çok bilinen bakteri cinsleridir[52].

Bakteri türleri	TDA	VP	ONPG	Indol	Sitrat
<i>Escherichia coli</i>	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
<i>Citrobacter spp</i>	(-)	(-)	(+)	Değişken	(+)
<i>Shigella spp.</i>	(-)	(-)	(-) <i>S.sonei</i> hariç	(+)	(-)
<i>Salmonella enterica</i>	(-)	(-)	(-) <i>S.arizonae</i> hariç	(-)	(+) <i>S. typhi</i> hariç
<i>Yersinia spp.</i>	(-)	(-)	Değişken	Değişken	(-)
<i>Enterobacter spp</i>	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)
<i>Klebsiella spp.</i>	(-)	(+)	(+)	(-) <i>K.oxytoca</i> hariç	(+)
<i>Serratia spp.</i>	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)
<i>Proteus spp</i>	(+)	(-)	(-)	(-) <i>P.vulgaris</i> hariç	Değişken
<i>Morganella morganii</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
<i>Providencia spp.</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)

Çizelge 2.1 : *Enterobacteriaceae* familyası üyelerini tanımlamada kullanılan yöntemler.[58]

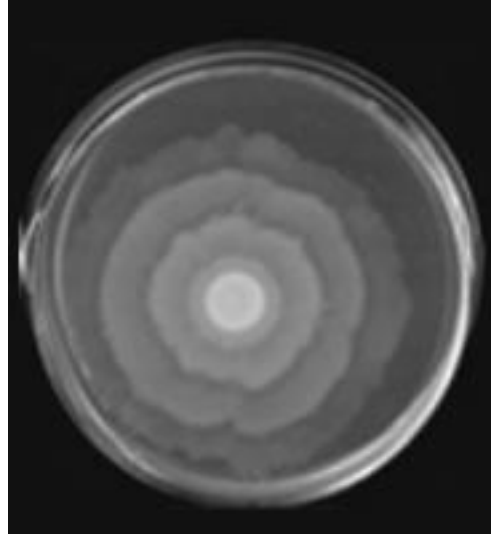
2.6.1. *Proteus*

Proteus cinsine ait bakteriler Enterobakterilerin genel özelliklerini taşımasının yanında, süzülme (swarming) özelliği ile diğer üyelerden ayrılmaktadır[59]. *Proteus* biyokimyasal testleri; oksidaz negatif, katalaz pozitif, indole ve Voges Proskauer negatif, metil red ve sitrat testleri pozitif, H₂S üretimi ve üreaz testi de pozitif sonuç vermektedir. *Proteus* cinsine ait bakteriler topraktan, durgun sulardan, memelilerin bağırsak yolundan ve dolayısıyla kanalizasyonlardan izole edilebilmektedir[60].

Proteus cinsine ait bakteriler, idrar yolları enfeksiyonu, menenjit, organ apseleri, yeni doğan bebeklerde kordon enfeksiyonu gibi çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır [61]. Bunlara ek olarak, *P. mirabilis* enfeksiyonları idrar taşlarının (ürolitiazis) oluşumuna neden olabilmektedir[62].

2.6.1.1. *Proteus mirabilis*

İlk olarak 1885 yılında çürütülmüş etten izole edilen *P. mirabilis*, Enterobacteriaceae familyasına ait gram-negatif, hareketli, fakültatif anaerobik bir basildir. Diğer *Proteus* türleri gibi topraktan, durgun sudan, memelilerin bağırsak yolundan ve bunun sonucunda da kanalizasyondan izole edilebilir[60]. *P. mirabilis* dimorfiktir, yani iki farklı morfolojiye sahiptir ve bu özelliği bağışıklık sisteminden kaçmasını kolaylaştırır. *P. mirabilis*, idrar yolu enfeksiyonunu kolaylaştıran önemli virülans faktörlerine sahiptir. Bu faktörlerden biri, *P. mirabilis*'in swarm (yayılma) kabiliyetidir, yani flagella sayesinde yüzey boyunca hareket edebilir. Yayılma kabiliyetinin yanında güçlü bir üreaza sahip olması özellikle idrar yolu enfeksiyonunda etkili olmasının sebepleri arasında gösterilmektedir[63].



Şekil 2.7: *Proteus mirabilis*'in yayılma hareketi[63]

P. mirabilis'in diğer virulans faktörleri ise ürettikleri toksin, Quorum sensing mekanizması, adhezyon ve immün sistemden kaçabilme kabiliyetleridir[64]. Epitel yüzeylere bağlanabilme yeteneği özellikle idrar yolu enfeksiyonlarında büyük önem arz etmektedir. Genomik analizler *P. mirabilis*'in 17 potansiyel fimbriyal adhezyona sahip olduğunu göstermektedir. *P. mirabilis* hemolizin toksini üretmektedir ki bu toksin konakçı hücre membranında por açarak zarara yol açmaktadır. Bu toksin idrar yolunda piyelonefrite neden olmaktadır. Proteus toksik Aglutinin, böbrek ve mesane hücrelerini parçalama kabiliyetine sahiptir[65]. *P. mirabilis* ürettiği ZapA sayesinde konakçı hücrede birincil ve ikincil immün yanıtlardan kaçabilmektedir. ZapA immunoglobulin A1 (IgA1), IgA2 ve IgG zincirlerini kırarak bu işlemi gerçekleştirmektedir[66]. *P. mirabilis* ayrıca oluşturduğu biyofilm sayesinde çoğu zararlı dış etkenlerden korunabilmektedir[67].

2.6.2. *Salmonella*

Salmonella cinsine ait bakteriler de *Proteus* cinsi bakteriler gibi Enterobakterlerin genel özelliklerini taşır. Bu grubun içerisindeki bakteriler oksidaz negatif, katalaz pozitif, indole ve Voges Proskauer negatif, metil red ve sitrat testleri pozitif ve üreaz negatif sonuç vermektedir. Bunun yanı sıra H₂S üretmektedirler[68]. *Salmonella* suşlarının sebep

olduğu bir gıda zehirlenmesi olan Salmonellozun iki klinik belirtisi bulunmaktadır: Tifo ateşi ve gastroenterit. *Salmonella enterica serovars Typhi* ve *Paratyphi A, B ve C* tifo ve tifo benzeri ateşlerden sorumludur. Bu patojenler yalnızca insanları enfekte eder ve fekal-oral yolla kontamine gıda ve suyla veya kişiden kişiye yayılma yoluyla bulaşır. Bu sistemik hastalık, her yıl dünya çapında tahmini 20 milyon vakaya ve 200.000 ölüme yol açmaktadır. Tifo ateşi, bakterilerin karaciğeri, dalağı ve kemik iliğini kolonize ettiği sistemik bir enfeksiyonla karakterizedir. Vakalar genellikle halsizlik, baş ağrısı, ateş, miyalji ve küçük üst solunum semptomlarından önce kısa bir mide bulantısı ve ishal nöbeti bildirir. Komplikasyonlar, bakterinin safra kesesinde kalıcı olabileceği nüksetme veya kronik taşıyıcılıkla sonuçlanan kalıcı enfeksiyonu içerir[58].

2.6.3. *Proteus* ve *Salmonella* teşhisinde kullanılan besiyerleri

Proteus ve *Salmonella* cinsine ait bakterileri diğer Enterobakterilerden ayırmak için XLD (Ksiloz Lizin Deoksikolat) Agar, HE (Hektoen enterik) Agar, SS (Salmonella Shigella) Agar, TSI (Üçlü şeker demir) Agar kullanılmaktadır. Her iki gruba ait bakteriler H₂S üretiminden kaynaklı SS Agar, HE Agar ve XLD Agarda siyah koloni oluşturmaktadırlar. Ayrıca SS Agarda pembe olan besiyeri ile XLD'de kırmızı olan besiyeri sarı renge dönmektedir. TSI agar da ise agarın orta kısmında siyah bir bölge oluşurken besiyerinin dip kısmında sarı besiyerinin üst kısmında ise kırmızı renk oluşmaktadır. [69][70][71].



Şekil 2.8: *Salmonella enteridis* suşunun SS agar ve XLD agar üzerinde görüntüsü [72]

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar ve Plazmitler

Bu çalışmamızda, hem ATCC suşlar hem de kendi izolatlarımız olan *Proteus* ve *Salmonella* türlerine ait suşlar kullanılmıştır.

3.1.1. ATCC Suşlar

Özellikle in-silico çalışmalar için kullanacağımız çizelge 3.1'de belirtilen *Proteus* ve *Salmonella* türlerine ait ATCC suşlar Hemakim adlı firmadan sağlanmıştır.

Proteus Suşları	
1	<i>Proteus hauseri</i> ATCC® 13315
2	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 25933
3	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 29245
4	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 33583
5	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 35659
6	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 43071
7	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 7002
8	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC® 33420
9	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC® 49132
10	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC® 6380
11	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC® 6896
12	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC® 8427
Salmonella Suşları	
13	<i>Salmonella bongori</i> ATCC® 43975
14	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Arizonae</i> ATCC® 13314
15	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> serovar <i>abaetetuba</i> ATCC® 35640
16	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> serovar <i>anatum</i> ATCC® 9270
17	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> serovar <i>enteritidis</i> ATCC® 13076

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan ATCC suşlar

Temin edilen bu ATCC suşlar öncelikle LB agar besiyerine, ardından kontrol amaçlı SS agar ve XLD agar besiyerlerine inoküle edilmiştir. Her hangi bir kontaminasyon ihtimaline karşı 15 gün arayla kültürlerin pasajı gerçekleştirilmiş ve ayrıca uzun süreli muhafaza için % 20'lik gliserollü besiyerine inokülasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Yabancı Suşlar

Yabancı tip suşlarda CDI mekanizmasının bulunup bulunmadığını araştırmak amacıyla, *Proteus* ve *Salmonella* türlerine ait yabancı tip suş izolasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.1.2.1. Yabancı Suşların İzolasyonları

Enterik bakterileri grubuna ait *Proteus* ve *Salmonella* suşlarının izolasyonu için Beytepe Kampüsü bölgesinden toprak, atık su ve gaita örneklerinden izolasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Alınan örnekler ayrı ayrı serum fizyolojik çözelti içersine aktarılmış ve 37 °C'de 150 rpm hızda 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Her bir serum fizyolojiktan 100'er µl alınarak çeşitli besiyerlerine inokülasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda Nütrient agar genel besiyeri olarak, SS agar, HE agar ve XLD agar seçici ayırt edici besiyerleri olarak kullanılmıştır.

SS agar, HE agar ve XLD agar üzerinde siyah ve gri koloniler veya swarming hareketi gözlenen petrilerdeki bakteriler, *Salmonella* veya *Proteus* türleri olabileceği için pozitif olarak işaretlendi. Daha sonra bu suşlara biyokimyasal testler uygulandı.

3.1.2.2. Yabancı Suşların Biyokimyasal Testleri ve Adlandırılması

Proteus veya *Salmonella* olduğu tahmin edilen suşlara Oksidaz, Katalaz, İndole, Metil red ve Sitrat testleri uygulanmıştır, ayrıca kontrol amaçlı TSI agara inokülasyonları da gerçekleştirilmiştir. Oksidaz negatif, Katalaz pozitif, İndole ve Voges Proskauer negatif, Metil red ve Sitrat testleri pozitif olan suşlar muhtemel *Proteus* ve *Salmonella* olarak

işaretlenmiştir. Üreaz testi pozitif olanlar *Proteus* negatif olanlar ise *Salmonella* olarak işaretlenmiştir.

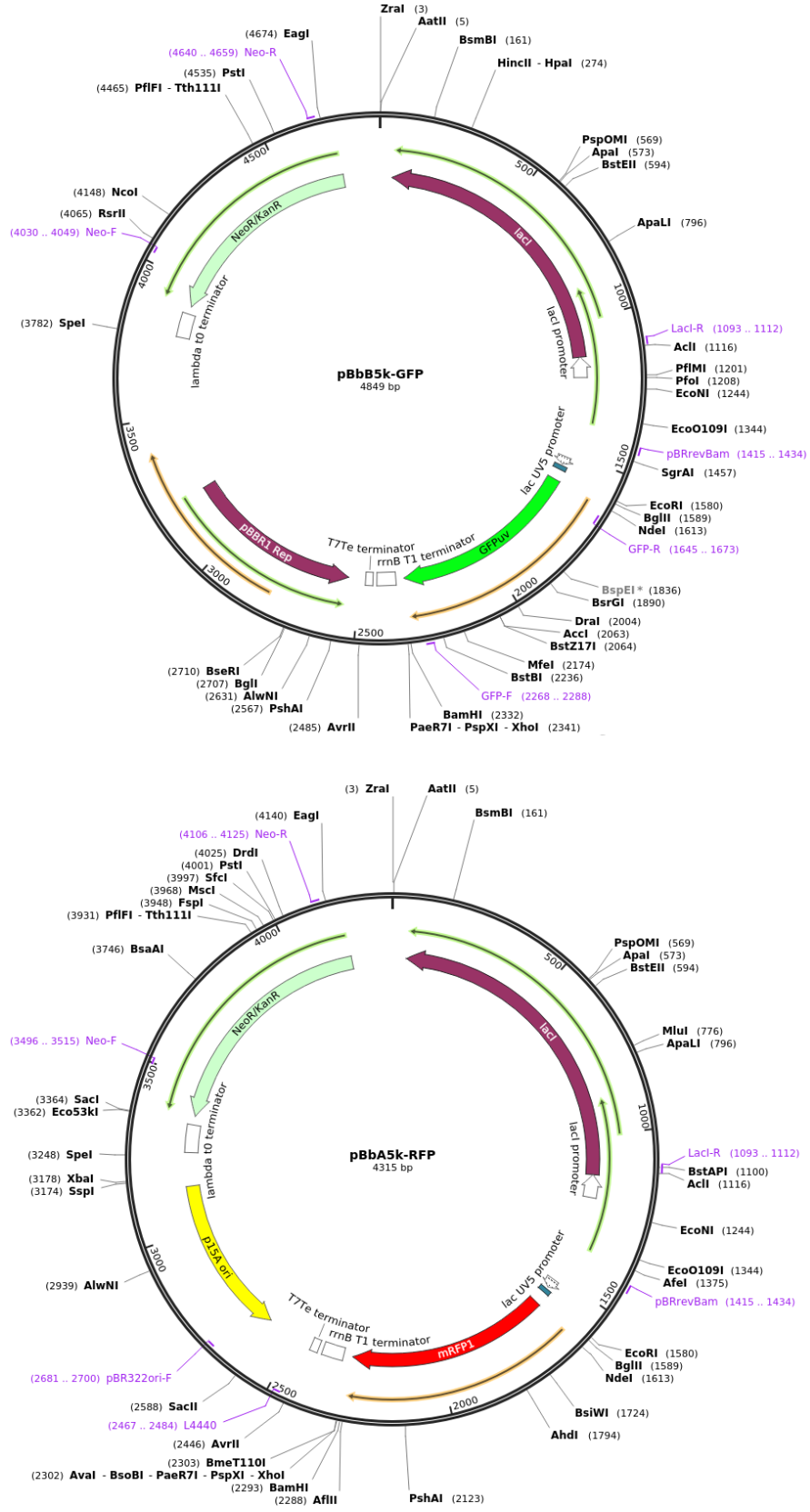
3.1.3. Plazmitler

CDI mekanizmasının etkisinin gözlemlenebilmesi için CDI pozitif ve negatif suşlara floresan proteini içeren plazmitler eklenmiştir. Bu çalışmada kullanılan yeşil floresan proteini içeren pBbB5k-GFP ve kırmızı floresan proteini içeren pBbA5k-RFP plazmitleri Addgene tarafından temin edilmiştir.



Şekil 3.1 : Yeşil ve Kırmızı floresan protein içeren plazmitler

Plazmitler belirlenirken promotör olarak lac UV5 promotörü içeren plazmitler tercih edilmiştir. Böylelikle besiyerine IPTC (İzopropil- β -D-tiyogalaktopiranozit) eklenmesiyle promotörler, floresan proteini kodlayan bölgeyi aktif hale getirmekte ve floresan proteini üretimi gerçekleşmektedir. Ayrıca plazmitlerin aktarılması sırasında her iki plazmit için de selektif besiyerlerinin aynı olması için Kanamisin (Kan) direnç genine sahip pBbB5k-GFP ve pBbA5k-RFP plazmitleri tercih edilmiştir. Plazmitler *E.coli* DH5alpha suşu ile temin edilmiş olup, bu suşlardan plazmit ekstraksiyonu Macherey-Nagel marka hazır kitler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2 : pBbB5k-GFP ve pBbA5k-RFP plazmitlerinin haritaları

Öncelikle *E.coli DH5 alpha* suşları 50 µg/mL kanamisin antibiyotiği ve 5 µg/mL IPTC içeren LB agar besiyerine inoküle edilmiştir. 37 °C’de 24 saat inkübasyonun ardından petriyerler incelenmiş ve UV ışık altında pBbB5k-GFP plazmitini içeren suşların yeşil renkte, pBbA5k-RFP plazmitini içeren suşların kırmızı renkte olduğu gözlemlenmiştir. Ardından Plazmit ekstraksiyon işlemini gerçekleştirmek üzere her iki suş LB (50 µg/mL Kan + 5 µg/mL IPTC) sıvı besiyerlerine inoküle edilmiş ve 24 saat 37 °C ‘de, 150 rpm hızda inkübasyona bırakılmıştır. Ekstraksiyon için hazır kit prosedürü gerçekleştirilmiş ve ekstraktlar jel elektroforezinde yürütülmüştür.

3.2. CDI⁺ ve CDI⁻ Mikroorganizmaların Belirlenmesi

Proteus ve *Salmonella* ATCC suşlarının CDI mekanizmasına sahip olup olmadıklarının taranması amacıyla önce in-silico çalışmalar gerçekleştirilmiştir. *E.coli* ve *Burkholderia* gibi CDI genine sahip model organizmalarla kıyaslanması gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. CDI Gen Bölgelerinin Taranması İn-Silico analizi

Bahsedildiği üzere CDI mekanizmasına sahip bakterilerde iki ayrı CDI modeline rastlanılmıştır. Bu bağlamda *Proteus* ve *Salmonella* türlerine ait ATCC suşlarda VENN ve NX(E/Q)LYN protein motifleri taranmıştır.

3.2.2. Muhtemel CDI gen bölgesinin diğer bakteri gruplarıyla kıyaslanması

İn-Silico analiz sonucu bulunan gen bölgeleri ile literatürde belirtilen diğer mikroorganizmaların gen bölgelerinin kıyaslanması gerçekleştirilmiştir.

3.3. CDI⁻ mutant suşların oluşturulması

CDI mekanizmasıyla ilişkili olabileceği tahmin edilen gen kümesinin tespit edilmesinin ardından, diğer suşlarda da benzer yapıların olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden CDI⁻ suşlar aramaktansa cdi gen kümesinin silinmesiyle CDI⁻ mutant suşlar elde edip, çalışmanın bundan sonraki kısmında CDI⁺ olarak belirlenen suşlarda bulunan cdi geninin homolog rekombinasyon yöntemiyle çıkarılıp yerine ampisilin direnç geninin (Amp^R) eklenmesiyle, Δcdi BAI mutant suşlar elde edilmiştir.

3.3.1. Amp^R geninin ekstraksiyonu

Bu aşamadan sonra sadece *Proteus mirabilis* suşlarıyla devam edilmiştir. Bunun için Addgene firmasından temin ettiğimiz pBbB7a-GFP plazmitine ait Amp^R genini ekstrakte etmek için primer dizayn edilmiştir. Bu primerler homolog rekombinasyonda kullanılacağı için tasarlanırlarken primerlerin ön kısmına Cdi geninyle yer değişiminin gerçekleşmesini sağlayacak dizilimler eklenmiştir. Bu amaçla ilk olarak belirlenen primerler ;

Forvard (F1) : TATGAGTAAACTTGGTCTGA

Revers (R1) : GTGGCACTTTTCGGGGAA

Daha sonra *Proteus mirabilis* suşunda belirlenen cdi gen bölgesinin primerleri dizayn edilmiştir.

Forvard (F2): ATACCACAGATCGCAAGTAATCATATGCA

Revers (R2) :TATCTCTGTCCCCTTATTGGCTGATCCCGTAG

Nihai primerler bu iki primerin birleştirilmesi ile elde edilmiştir.

Forward:

ATACCACAGATCGCAAGTAATCATATGCATTATGAGTAAACTTGGTCTGA

Revers:

TATCTCTGTCCCCTTATTGGCTGATCCCGTAGGTGGCACTTTTCGGGGAA

Belirlenen bu primerler ile pBbB7a-GFP plazmitine ait plazmit DNA'sından Amp^R geni polimer zincir reaksiyonlarıyla çoğaltılmıştır. Kesilip çoğaltılan Amp^R geni önünde ve arkasında bulunan diziler sayesinde hedeflenen gen bölgesi ile değişimi amaçlanmaktadır.

3.3.2. *Proteus mirabilis* Δcdi B A I oluşturulması

Çizelge 3.1 de verilen 7 adet *Proteus mirabilis*' suşlarının tamamından Δcdi B A I oluşturmak istediğimiz için bu aşamada tüm suşlar bu prosese tabi tutulmuştur.

3.3.2.1. *Proteus mirabilis*'in Kompetent hale getirilmesi

Amp^R geninin *Proteus mirabilis* suşlarına aktarılması için öncelikle bu suşlar kompetent hale getirilmiştir. Kompetent hale getirilme işlemi için ilgili protokoller revize edilerek gerçekleştirilmiştir[73].

- 0,5 ml LB besiyerine kompetent hücre haline getirilmek istenilen bakteri inoküle edilmiştir.
- Ardından 37 °C 150 rpm de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.
- Buradan 250 µl alınıp ve 25 ml LB besiyerine inoküle edilmiştir.
- 2,5 saat inkübasyon (37 °C de 150 rpm)gerçekleştirilmiştir.
- 5 dk 4000 rpm de 4 °C de 3 defa santrifüj edilip, İlk iki seferde süpernatant dökülüp üstüne ilave 25 ml 1M CaCl₂ çözeltisi ilave edilmiştir. Son santrifüj işleminden sonra üstüne 2ml 1M CaCl₂ + %20 Gliserol çözeltisi ilave edilmiştir.

3.3.2.2. Kompetent hale getirilmiş suşlara aktarımın gerçekleştirilmesi

Amp^R geninin *Proteus mirabilis* suşlarına akatırımın gerçekleştirilmesi bu sayede bu geni ile *Proteus* suşlarında bulunan cdi BAI geninin homolog rekombinasyonla yer değiştirmesi amaçlanmaktadır. Aktarım işlemi ilgili protokoller revize edilerek gerçekleştirilmiştir[73].

- 1 µg Amp^R genini, 100 µl kompetent hücreye ilave edilip, 30 dakika inkübasyon bırakılmıştır. Bu inkübasyon işlemi buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.
- Isı şoku sağlamak için bu karışım 45 saniye 42°C’de su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır.
- Su banyosundan çıkarılıp 1-2 dk buzda inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
- 250 µl SOC besiyerine inoküle edilmiştir.
- 37°C’de 1 saat 150 rpm de inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
- LB agar besiyerine(Ampisilinli) 50 µl boncuk ekim gerçekleştirilmiştir.
- 37 °C gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.
- Petrilerin kontrolü gerçekleştirilmiştir. Ampisilin içeren bu petrilerde üreyen bakteriler CDI (Δcdi BAI) olarak belirlenmişlerdir.

3.3.2.3. CDI⁻ (*Proteus mirabilis* Δcdi BAI) suşların kontrolünün gerçekleştirilmesi

Elde ettiğimiz mutant suşun kontrolünün gerçekleştirilmesi amacıyla belirlediğimiz Cdi geni yerine amp^R geni içerip içermediği incelenmiştir. Bunun için bakterinin DNA’sı ekstrakte edilip bu DNA örneğinde ilgili gen taranmıştır.

Tarama işleminde; amp^R geni taranacağı için beklenen uzunluk 800 baz çiftlik bir bölge olması ön görülmektedir. Pozitif kontrol olarak *Proteus mirabilis* suşu kullanılmıştır.

Kontrol için amp^R genini ekstrakte için tasarlanan primerler tekrar kullanılmıştır;

Forward (F1) : TATGAGTAAACTTGGTCTGA

Revers (R1) : GTGGCACTTTTCGGGGAA

3.4. CDI etkisinin gözlemlenmesi

CDI etkisinin gözlemlenmesi amacıyla CDI⁺ suşlara yeşil floresan proteini içeren pBbB5k-GFP plazmiti, CDI⁻ suşlara ise kırmızı floresan proteini içeren pBbA5k-RFP plazmiti aktarılmıştır. Her iki plazmitin de aktarılması işlemi ilgili protokoller revize edilerek gerçekleştirilmiştir[73]. Öncelikle CDI⁺ ve CDI⁻ suşlar kompetent hale getirilmiştir;

- 0,5 ml LB besiyerine kompetent hücre haline getirilmek istenilen bakteri inoküle edilmiştir.
- Ardından 37 °C 150 rpm de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.
- Buradan 250 µl alınıp ve 25 ml LB besiyerine inoküle edilmiştir.
- 2,5 saat inkübasyon (37 °C de 150 rpm)gerçekleştirilmiştir.
- 5 dk 4000 rpm de 4 °C de 3 defa santrifüj edilip, İlk iki seferde süpernatant dökülüp üstüne ilave 25 ml 1M CaCl₂ çözeltisi ilave edilmiştir. Son santrifüj işleminden sonra üstüne 2ml 1M CaCl₂ + %20 Gliserol çözeltisi ilave edilmiştir.

Ardından aktarım işlemi gerçekleştirilmiştir,

- 1µg plazmit, 100 µl kompetent hücreye ilave edilip, 30 dakika inkübasyon bırakılmıştır.Bu inkübasyon işlemi buz üzerine gerçekleştirilmiştir.
- Isı şoku sağlamak için bu karışım 45 saniye 42°C’de su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır.
- Su banyosundan çıkarılıp 1-2 dk buzda inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
- 250 µl SOC besiyerine inoküle edilmiştir.
- 37°C’de 1 saat 150 rpm de inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

- %10'luk IPTG içeren Kanamisinli LB agar besiyerine 50 µl boncuk ekim gerçekleştirilmiştir.
- 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.
- Petrilerin kontrolü gerçekleştirilmiştir. Kanamisin içeren bu petrilerde üreyen bakterilere plazmit aktarımı gerçekleşmiş olarak not edilmiştir. Ayrıca UV ışık altında kırmızı floresan proteini içeren suşlarda kırmızı renk, yeşil floresan proteini içeren suşlarda yeşil renk gözlemlenmesi taranmıştır.

Ayrıca çalışmanın ilerleyen safhalarında CDI'nin etkisinin suşlara etkisini gözlemek amacıyla çizelge 3.1.'de verilen bütün suşlara ve kendi izolatlarımız olan P1, P2 ve S2'ye de, hem kırmızı hem de yeşil floresan proteini içeren plazmitler ayrı ayrı aktarılmıştır.

3.4.1. Kalitatif Analiz

CDI⁺ *Proteus* suşların CDI⁻ *Proteus* suşlarına etkisini olup olmadığını gözlemek için öncelikle Kalitatif analiz gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda her iki suş 100 ml'lik LB broth besiyerine inokülasyonları gerçekleştirilmiş ve 12 saat 37 °C de 150 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra her iki örnekten 100 µl alınarak, 100 ml'lik LB broth besiyeri içerisinde karıştırılmıştır. 1'er saat arayla örnekler alınıp, Kan^R'li besiyerlerine aktarılmıştır. 24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından besiyerleri incelenmiştir.

3.4.2. Kantitatif Analiz

CDI⁺ *Proteus* suşların CDI⁻ *Proteus* suşlarına etkisini ölçmek amacıyla Kantitatif analiz gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda her iki suş 100 ml'lik LB broth besiyerine inokülasyonları gerçekleştirilmiş ve 12 saat 37 °C de 150 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra her iki örnekten 100 µl alınarak, 100 ml'lik LB broth besiyerlerinin içerisinde karıştırılmıştır. Daha sonradan 37 °C'de 150 rpm'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından örnekler Floresan

Spektrofotometresinde incelenmiştir. Kör olarak herhangi bir floresan proteini içermeyen LB sıvı kültürde üretilmiş *Proteus mirabilis* 43071 suşu kullanılmıştır.

Floresan spektrofotometresinde kırmızı ve yeşil floresan proteinlerinin maksimum uyarım ve maksimum emisyon değerleri farklı olduğu için her iki protein için maksimum uyarım ve maksimum emisyon değerleri ayrı ayrı ayarlanarak tek seferde ölçülmüştür. Yani bir reaksiyon tüpünün içinde yeşil floresan proteinlerini ölçümleri belirli bir dalga boyunda ölçülürken kırmızı floresan proteini için farklı dalga boyunda ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Literatür taramalarının ardından yeşil floresan proteininin ölçümleri için ayarlanan maksimum uyarım değeri 488 nm, maksimum emisyon değeri 507 nm, kırmızı floresan proteininin ölçümleri için ayarlanan maksimum uyarılma değeri 584 nm maksimum emisyon değeri 607 nm olarak belirlenmiştir[74][75].

3.5. CDI mekanizmasını etkileyen faktörler

Bu aşamada Kontak Bağımlı İnhibisyon mekanizmasını etkileyen faktör incelenmiştir. Bu bağlamda CDI^+ ve CDI^- suşların oranı, üreme ortamı inkübasyon süresi, reaksiyon ortamı inkübasyon süresi ve reaksiyon ortamı sıcaklığı incelenmiştir.

3.5.1. Reaksiyon ortamının inkübasyon süresi

CDI^+ ve CDI^- suşların reaksiyon ortamında geçirdiği inkübasyon süresinin etkisini gözlemlemek amacıyla her iki suş ayrı üreme ortamlarında 37 °C'de 150 rpm'de 12 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından her iki ortamdan 100'er µl alınarak reaksiyon ortamına aktarılmıştır. Reaksiyon ortamından 1'er saat arayla alınan örnekler floresan spektrofotometresiyle ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Yeşil floresan proteini için maksimum uyarım değeri 488 nm, maksimum emisyon değeri 507 nm, kırmızı floresan proteini için maksimum uyarılma değeri 584 nm maksimum emisyon değeri 607 nm olarak ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.5.2. CDI⁺ ve CDI⁻ suşların oranı

Bu aşamada CDI⁺ ve CDI⁻ suşların farklı oranlarda reaksiyon ortamında olmaları durumunda CDI mekanizmasının nasıl etkileneceğini saptamak amaçlanmıştır. Bu bağlamda ayrı ayrı üreme ortamlarında üretilen CDI⁺ ve CDI⁻ suşlar farklı oranlar denenerek aynı reaksiyon ortamına eklenmiştir. Üreme ortamlarında 12 saat 37 °C’de 150 rpm’de üretildikten sonra kültürlerden reaksiyon ortamına 1/2, 1/3/, 1/4 ve 1/5 oranlarında ekleme yapılmıştır. Reaksiyon ortamında 3 saat inkübasyonun ardından ölçümler gerçekleştirilmiştir. Hem CDI⁺ suşların hem de CDI⁻ suşların oranlarının fazla olması durumu ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Her bir örnek için 2 adet ölçüm gerçekleştirilmiştir, birincisi CDI⁺ ve CDI⁻ suşların reaksiyon ortamına alınmadan önce, ikincisi suşların reaksiyon ortamına aktarımından sonra 3. saatte gerçekleştirilmiştir. Yeşil floresan proteini için maksimum uyarım değeri 488 nm, maksimum emisyon değeri 507 nm, kırmızı floresan proteini için maksimum uyarılma değeri 584 nm maksimum emisyon değeri 607 nm olarak ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.5.3. Üreme ortamı inkübasyon süresi

Yapılan çalışmalarda CDI mekanizmasının etkisinin sadece logaritmik fazda olduğu rapor edildiğinden[2], bu parametrenin etkisinin gözlemlenmesi amaçlanmıştır. Üreme ortamında üretilen CDI⁺ suşlardan; 2., 12., ve 36. saatlerde 100’er µl alınarak reaksiyon ortamına eklenmiştir. Reaksiyon ortamında CDI⁺ ve CDI⁻ suşların birlikte inkübasyon aşamasından sonra floresan spektrofotometresinde ölçümler gerçekleştirilmiştir. Yeşil floresan proteini için maksimum uyarım değeri 488 nm, maksimum emisyon değeri 507 nm, kırmızı floresan proteini için maksimum uyarılma değeri 584 nm maksimum emisyon değeri 607 nm olarak ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.5.4. Reaksiyon ortamının sıcaklığı

Reaksiyon ortamının sıcaklığının CDI mekanizmasına etkisini gözlemlemek amacıyla her iki suş ayrı üreme ortamlarında 37 °C'de 150 rpm'de 12 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından her iki ortamdaki 100'er µl alınarak reaksiyon ortamına aktarılmıştır. Reaksiyon ortamının sıcaklığı 30, 37 ve 45 °C olmak üzere 3 ayrı değerde ayarlanarak ölçümler gerçekleştirilmiştir. Yeşil floresan proteini için maksimum uyarım değeri 488 nm, maksimum emisyon değeri 507 nm, kırmızı floresan proteini için maksimum uyarılma değeri 584 nm maksimum emisyon değeri 607 nm olarak ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.6. Diğer suşların oluşturulan CDI⁻ (*Proteus mirabilis* ATCC® 43071 Δcdi BAI :: amp^R) suşuna etkisinin saptanması

Bu aşamada tablo 3.1. de verilen ATCC suşlarının ve bu çalışma kapsamında izole edilen P1, P2 ve S1 suşlarının CDI⁻ hale getirilen *Proteus mirabilis* suşuna (*Proteus mirabilis* ATCC® 43071 Δcdi BAI :: amp^R) etkisini araştırmak amaçlanmıştır. Bahsi geçen suşların CDI mekanizmasını kullanarak meydana getirebilecekleri inhibisyonu gözlemlemek amacıyla bölüm 3.4.1.'de bahsedildiği gibi bu suşlara hem yeşil hem de kırmızı floresan proteini içeren plazmitler aktarılmıştır.

Belirlediğimiz bu suşların CDI⁻ *Proteus* suşlarına etkisini ölçmek amacıyla; (her suş için ayrı ayrı olmak üzere) 100 ml'lik LB broth besiyerine inokülasyonları gerçekleştirilmiş ve 12 saat 37 °C de 150 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra her iki örnekten 100 'er µl alınarak, 100 ml'lik LB broth besiyerlerinin içersinde karıştırılmıştır. Daha sonradan 37 °C'de 150 rpm'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından örnekler Floresan Spektrofotometresinde incelenmiştir. Kör olarak LB sıvı kültürde üretilmiş herhangi bir floresan proteini içermeyen suşların orijinal hali kullanılmıştır. Yeşil floresan proteini için maksimum uyarım değeri 488 nm, maksimum emisyon değeri 507 nm, kırmızı floresan proteini için maksimum uyarılma değeri 584 nm maksimum emisyon değeri 607 nm olarak ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Oluşturulan *Proteus mirabilis* suşu (*Proteus mirabilis* ATCC® 43071 Δ cdi BAI :: amp^R) CDI⁻ bir suőtur. Dolayısıyla bu çalışmada kullandığımız diğer suşlardan CDI⁻ bir suş varsa bunu tespit etmemiz sadece oluşturulan bu suőla mümkün olmayacağından izelge 3.1. de bahsedilen tüm suşlarla ve bu çalışma kapsamında izole edilen P1, P2 ve S1 izolatlarla, CDI⁺ olan *Proteus mirabilis* ATCC® 43071 etkileşimi incelenmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar ve Plazmitler

4.1.2. Yabani Suşlar

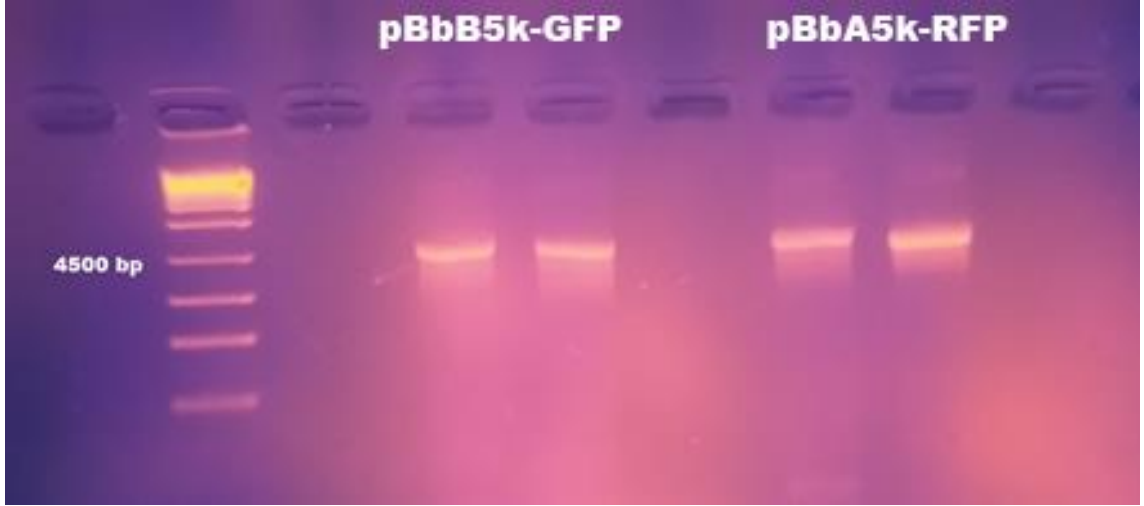
Beytepe bölgesinden alınan toprak, atık su ve gaita örneklerinden 32 adet izolattan 2 tanesinin muhtemel *Proteus*, 1 tanesinin de muhtemel *Salmonella* olduğu belirlenmiş ve bundan sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere P1, P2 ve S1 olarak adlandırmışlardır. İzolatların seçici besiyerlerinde oluşturdukları koloniler ve biyokimyasal testleri Çizelge 4.1’de belirtilmiştir.

	XLD Agar	SS Agar	Hektoen Agar	Metil Red	Sitrat	İndol	H ₂ S üretimi
P1	Besiyeri kırmızı-gri koloniler gri-siyah	Besiyeri sarı, kolonilerin ortası siyah	Besiyeri yeşil kolonilerin orta bölgesi siyah	+	+	-	+
P2	Besiyeri kırmızı gri, koloniler gri-siyah	Besiyeri sarı, kolonilerin ortası siyah	Besiyeri yeşil kolonilerin orta bölgesi siyah	+	+	-	+
S1	Besiyeri kırmızı koloniler siyah	Besiyeri sarı koloniler siyah	Besiyeri yeşil koloniler siyah	+	+	-	+

Çizelge 4.1. İzole edilen P1, P2 ve S1 mikroorganizmalarının seçici besiyerlerinde oluşturdukları koloniler ve bazı biyokimyasal testleri

4.1.3. Plazmitler

E.coli DH5alpha içersinde temin edilen pBbB5k-GFP ve pBbA5k-RFP plazmitleri ekstraksiyon sonucu Jel elektorforezinde yürütülmüş ve yaklaşık 4500 baz çifti büyüklüğünde fragmentler tespit edilmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1 : Ekstrakte edilen pBbB5k-GFP ve pBbA5k-RFP plazmitlerinin jel elektroforez sonucu görüntüleri

4.2. CDI⁺ ve CDI⁻ Mikroorganizmaların Belirlenmesi

4.2.1. CDI Gen Bölgelerinin Taranması İn-Silico analiz

Çizelge 3.1'de *Proteus* ve *Salmonella* suşlarında; *E.coli* ve *Burkholderia* suşlarında CdiA-CT gen bölgesinde bulunan VENN ve QLYN benzeri protein motiflerini kodlayan genler taranmış bu taranma sonucu *Proteus mirabilis* suşunda cdi geni olabileceği tahmin edilen gen bölgesi tesbit edilmiştir.

NCBI'da ASM226535v1 numaralı kayıtlı *Proteus mirabilis* suşuna ait RefSeq: WP_094959879.1 numaralı proteinin CdiB, WP_094959878.1 numaralı proteinin CdiA ve WP_063108584.1 numaralı proteinin ise CdiI proteini olabileceği saptanmıştır. NCBI'da kayıtlı RefSeq numarası GCF_014605875.1 olan *E.coli* suşunun blastlanması ile

elde edilen bu sonuçlarda VENN motifi tespit edilmiştir. Tesbit edilen protein kümesinin amino asit sekansı fasta formatında ek-1 de verilmiştir.



Şekil 4.2 : ASM226535v1 Proteus mirabilis suşuna ait cdi genleri ile ilişkili olduğu düşünülen WP_094959879.1, WP_094959878.1 ve WP_063108584.1 proteinlerinin grafik görüntüsü

4.2.2. Muhtemel CDI gen bölgesinin diğer bakteri gruplarıyla kıyaslanması

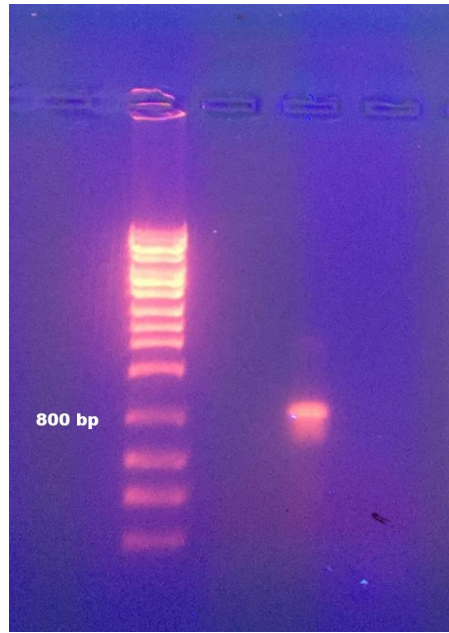
Proteus mirabilis suşuna ait CDI mekanizması ile ilişkili olduğu düşünülen genler, *E.coli* GCF_014605875.1 RefSeq numaralı suşun cdi genleri ile blastlanmış ve *Proteus mirabilis* suşuna ait CdiB proteini olduğu düşünülen protein *E.coli* CdiB proteinini ile %29 benzerlik göstermiştir. Bunun yanı sıra *E.coli* CdiB proteini 588 amino asitten oluşurken, Proteusa ait belirlenen proteinin 575 amino asitten oluşması ve yaklaşık benzer büyüklükte olması yine bu proteinin Cdi B proteini olma ihtimalini artırmaktadır. Bu iki proteinin yapısal benzerlikleri göz önünde bulundurulduğunda, her iki proteinin de yapısal özelliklerinden hemolizin aktivasyon/ sekresyon proteini olduğu bilinmektedir. Buna göre *Proteus mirabilis* suşuna ait CdiA proteini olduğu düşünülen protein *E.coli*

CdiA proteinini ile %33 benzerlik göstermiştir. Bunun yanı sıra *E.coli* CdiA proteini 3312 amino asitten oluşurken, *Proteus*'a ait belirlenen proteinin 3619 amino asitten oluşması ve her iki proteinin yaklaşık büyüklükte olduğu belirlenmiştir. Yapısal olarak ise *Proteus*'a ait proteinin tıpkı *E.coli*'ye ait CdiA proteini gibi tekrar eden FHA beta – helikal yapıların olduğu ve bu proteinin Tip V sekresyon sistemine bağlı olduğu tespit edilmiştir. CdiB ve CdiA gibi her iki proteinin ardı ardına gelmesi ve bu proteinleri kodlayan genlerin bir gen kümesi oluşturması bu iki proteinin CDI ile ilişkili olduğu kanısını güçlendirmiştir. Yine *Proteus*'a ait WP_094959878.1 RefSeq numaralı proteinin (CdiA) karbon terminalinde VENN amino asitlerinden oluşan bir motif içerdiği de gözlemlenmiştir. CdiI proteinlerinin kıyaslamasında organizmalar türe özgü bir immün sisteme sahip olduğu için benzerlik oranının yüksek olması beklenmemektedir. Yapılan blastlama sonucu anlamlı bir benzerlik çıkmamıştır. Fakat boyutlarının yine birbirlerine yaklaşık olması ve hemen diğer proteinleri kodlayan genlerin arkasından gelmesi olumlu olarak değerlendirilmiştir. *Proteus*'a ait WP_063108584.1 proteini 101 amino asitten oluşurken *E.coli*'ye ait CdiI (AAZ57199.1) proteini 79 amino asitten oluşmaktadır. CdiA proteinin karboksil terminali CdiA-CT'de bulunan VENN motifinden sonra gelen amino asit dizilimi CDI mekanizmasında asıl toksin kısmını oluşturduğu bilinmektedir. *Proteus mirabilis* suşuna ait Cdi geni olarak tahmin edilen bölgede VENN motifinden sonra gelen toksin kodlayan dizilim ile *E.coli*'ye ait aynı bölge kıyaslandığında toksin kısımlarının bir benzerlik içermediği saptanmıştır. Hatta *E.coli* suşuna ait VENN motifiyle başlayan toksinin genelde 169 baz çiftinden oluştuğu görülürken *Proteus* 'a ait belirlediğimiz bu gende VENN motifi ile başlayan toksinin 306 baz çiftinden oluştuğu saptanmıştır. Literatürde hem toksin kısmının hem de immünite kısmının türe özgü olduğundan bahsedilmektedir. Dolayısıyla çalışmamızın bundan sonraki kısmında WP_094959879.1 proteinini kodlayan geni ile başlayan gen kümesi; Cdi gen kümesi olarak ele alınmıştır.

4.3. CDI⁻ mutant suşların oluşturulması

4.3.1. Amp^R geninin ekstraksiyonu

Ekstrakte edilen Amp^R geni Jel elektroforezde yürütülmüş ve beklenildiği gibi yaklaşık 800 baz çifti büyüklüğünde fragmentler saptanmıştır (Şekil 4.3.). Burada Cdi geni ile yer değiştirmek istediğimiz genin Amp^R geni olmasının 2 temel nedeni mevcuttur. Öncelikle Cdi geni ile homolog rekombinasyon sonucu yer değiştirdikten sonra marker görevi üstlenmesi. Yani Amp^R'li besiyerinde bakteriye selektif bir özellik kazandırmasıdır. Bunun dışında CDI etkisini gözlemleyebilmek için Proteus suşuna aktaracağımız floresan proteini içeren plazmitlerin Kan^R geni içermesidir. Böylelikle Plazmit aktarım sonuçlarının etkilenmemesi için iki ayrı antibiyotiğe dirençli bir mutant suş elde edilmiş olacaktır.

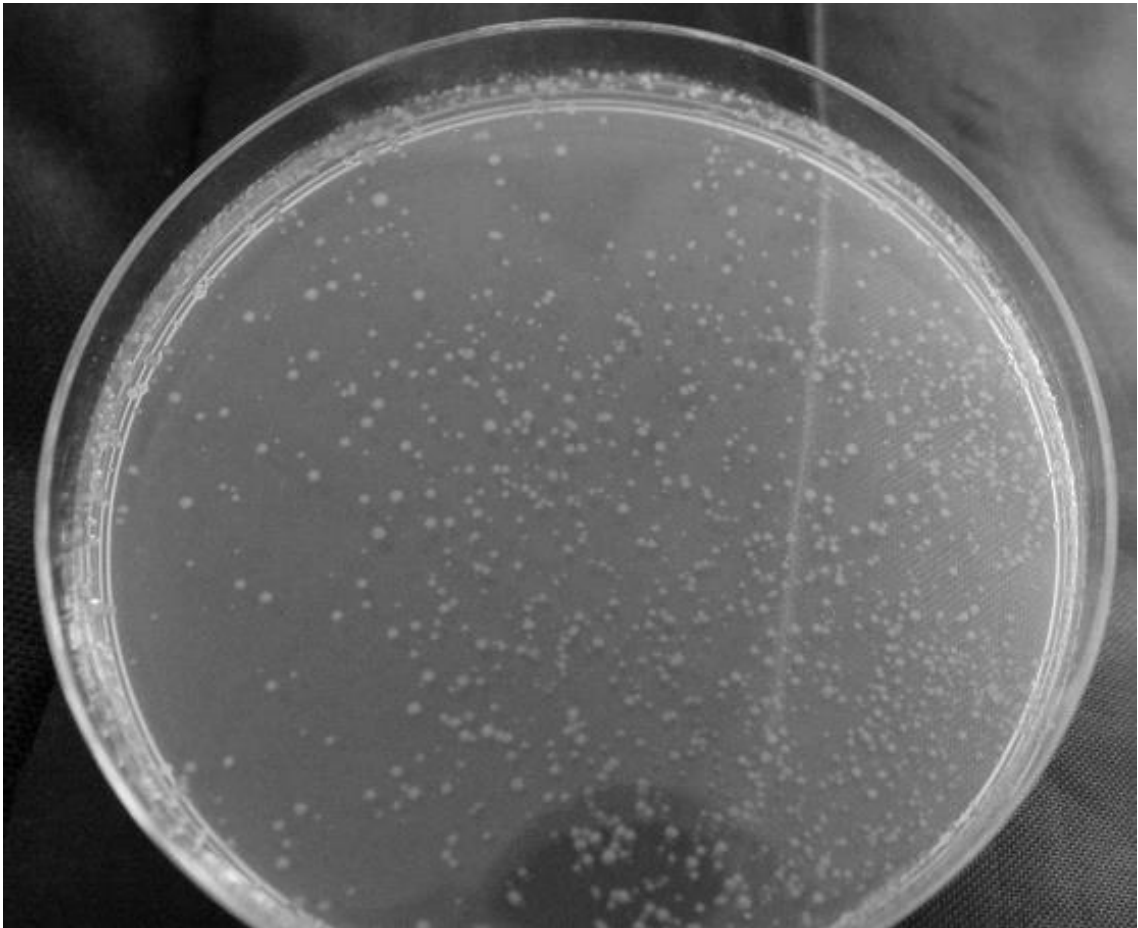


Şekil 4.3 : Ekstrakte edilen Amp^R geninin Jel Elektroforezde görüntüsü

4.3.2. *Proteus mirabilis* Δ cdi B A I oluşturulması

Proteus mirabilis Δ cdi B A I mutant suş elde edilmesi aşamasında aktarımın gerçekleştirilmesi için *Proteus* suşlarının kompetent hale getirilmesinin aktarım verimini artırdığı saptanmıştır. n işleme tabi tutulan *Proteus* suşlarının; kompetent hale getirilmeyen suşlara nazaran, aktarmak istediğimiz DNA fragmentlerini alma yetileirinin daha çok yükseldiği saptanmıştır.

Cdi geni ile yer değiştirme yetisi kazandıracak primerler eklenen Amp^R geninden oluşan DNA fragmentlerinin aktarımın ardından LB agar besiyerine(Ampisilinli) boncuk ekim gerçekleştirilmiştir. 37 C’de 24 saat inkübasyonun ardından besiyeri üzerinde üreme gözlemlenmiştir(Şekil 4.4).

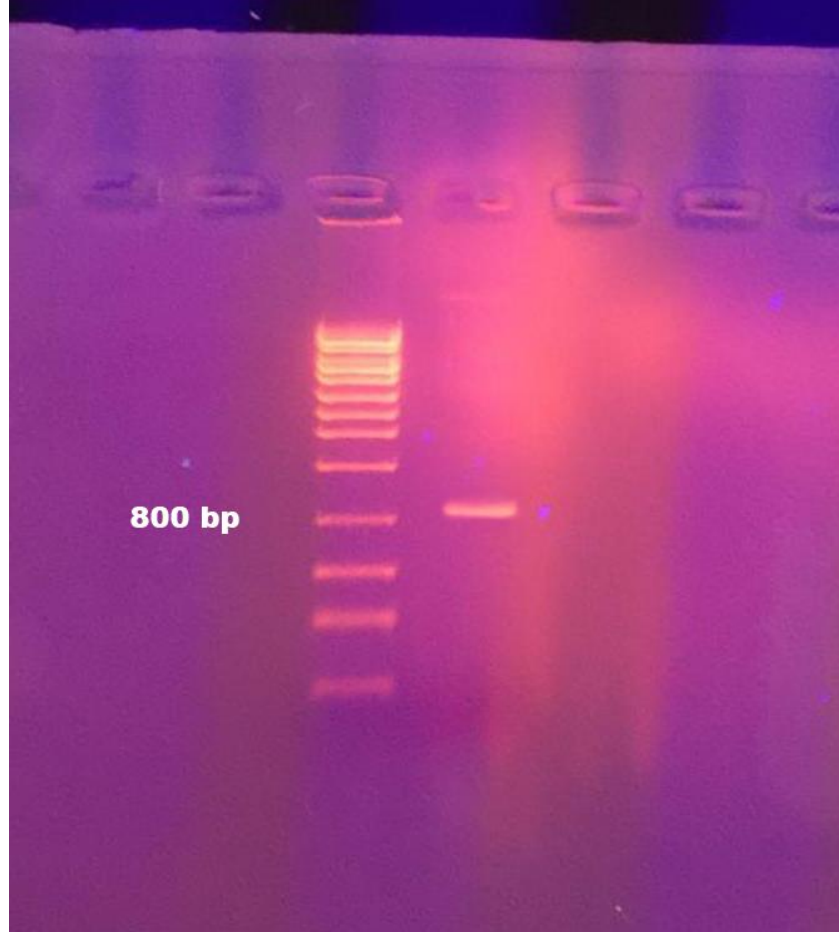


Şekil 4.4 : *Proteus mirabilis* Δ cdi BAI’nın LB Amp^R besiyerinde boncuk ekim görüntüsü

Aktarım gerçekleştirilirken kompetent hücre miktarının azalması (100 µl'den daha az) ve aktarılan Amp^R genin miktarının artmasının (1 µg'dan daha fazla) aktarım olasılığını düşürdüğü gözlemlenmiştir. Kompetent hücreler her ne kadar -20C°'de saklanılsada, tekrar tekrar kullanılmasının yine aktarım ihtimalini düşürdüğü saptanmıştır. Literatüre bakıldığında bakteriyal gen transformasyonunda aktarılan gen miktarının transformasyonu etkileyen en önemli etkenlerden biri olduğu vurgulanmış ve 1 µg'a kadar gen miktarı arttıkça transformasyon oranının arttığı, 1 µg'dan sonra transformasyon oranının azaldığı ileri sürülmüştür[76].

Aktarımın ve homolog rekombinasyonun gerçekleşmesi durumunda *Proteus mirabilis* suşunun Cdi gen kümesi yerine amp^R geni yerleşmiş olacağından ampisilin içeren LB agar besiyerinde üremesi beklenmektedir. Ampisilinli LB agar besiyerinde üreyen suşlardan kontrol amaçlı gen taraması yapılmıştır. Ampisilinli LB agar besiyerinde üreyen suşlardan ekstrakte edilen bakteriyel genom DNA'sında (F1) ve (R1) primerleri ile yapılan tarama sonucu yaklaşık 800 baz çifti uzunluğunda fragmentler saptanmıştır (Şekil 4.5). Öte yandan *Proteus mirabilis*'in ATCC suşlarından yapılan DNA ekstraksiyelerinde böyle bir fragmente rastlanmamıştır.

Çizelge 3.1'de verilen 7 adet *Proteus mirabilis* suşunun her birine aktarım gerçekleştirilmiş en verimli sonuç elde ettiğimiz *Proteus mirabilis* ATCC® 43071 suşu model organizma olarak bu aşamadan sonraki çalışmalarda kullanılmıştır.



Şekil 4.5 : Mutant suşlardan ekstrakte edilen Amp^R geninin Jel Elektrofrezde görüntüsü

Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında, *Proteus mirabilis* ATCC® 43071 suşundan CDI⁺ olarak, bu suşun Cdi genini çıkarıp yerine amp^R genini eklediğimiz suşundan ise (*Proteus mirabilis* ATCC® 43071 Δcdi BAI :: amp^R) CDI⁻ olarak bahsedilecektir.

4.4. CDI etkisinin gözlemlenmesi

CDI etkisinin gözlemlenmesi amacıyla CDI⁺ suşlara yeşil floresan proteini içeren pBbB5k-GFP plazmiti, CDI⁻ suşlara ise kırmızı floresan proteini içeren pBbA5k-RFP plazmiti aktarılmıştır. Plazmit aktarım işleminden sonra yeşil floresan proteini içeren CDI⁺ suşlar UV ışık altında yeşil renkli gözlemlenirken, kırmızı floresan proteini içeren CDI⁻ suşlar UV ışık altında kırmızı renkli gözlemlenmiştir(Şekil 4.6.). Ayrıca çizelge

3.1.'de verilen ve kendi izolatlarımız olan P1,P2 ve S1 suşlarına da hem kırmızı hem yeşil floresan proteini içeren plazmitlerin aktarılması başarıyla gerçekleştirilmiştir.



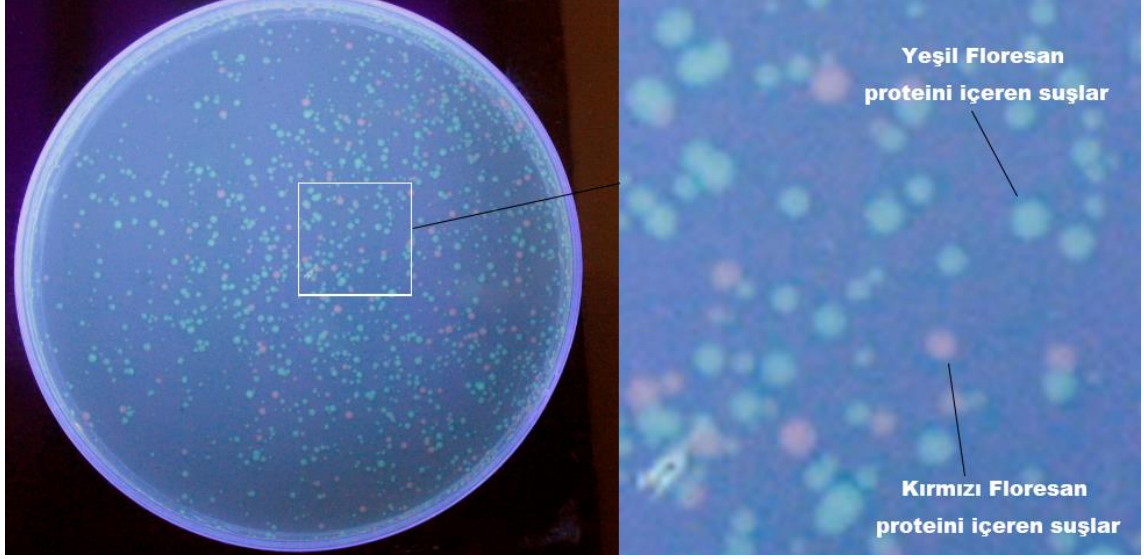
Şekil 4.6 : Kırmızı ve yeşil floresan proteini içeren plazmitlerin; CDI^- ve CDI^+ suşlara aktarılmasının ardından UV ışık altında görüntüleri

Floresan proteini içeren plazmitlerin aktarılması sayesinde dış görüntü olarak birbirlerinin aynısı iki suşun ayırt edilmesi sağlanmıştır.

4.4.1. Kalitatif Analiz

CDI^+ Proteus suşların CDI^- Proteus suşlarına etkisini olup olmadığını gözlemlemek için öncelikle Kalitatif analiz gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda her iki suşun 100 ml'lik LB broth besiyerine inokülasyonları gerçekleştirilmiş ve 12 saat 37 °C de 150 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra her iki örnekten 100 µl alınarak, 100 ml'lik LB broth besiyeri içersinde karıştırılmıştır. 1'er saat arayla örnekler alınıp, Kan^R'li besiyerlerine

aktarılmıştır. 24 saat 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından besiyerleri UV ışık altında incelenmiştir.



Şekil 4.7 : CDI⁻ ve CDI⁺ suşlara birbirlerine etkisinin kalitatif olarak analizi

Kalitatif analiz floresan proteinlerinin de yardımıyla CDI etkisinin olup olmadığını gözlemlemek amacıyla yapılmıştır. Petriler incelendiğinde yeşil floresan proteinine sahip CDI⁺ suşların sayıca CDI⁻ suşlardan fazla olduğu saptanmıştır. CDI etkisinin nümerik olarak ifade edilebilmesi için floresan spektrofotometresiyle ölçümler yapılarak kalitatif analiz gerçekleştirilmiştir.

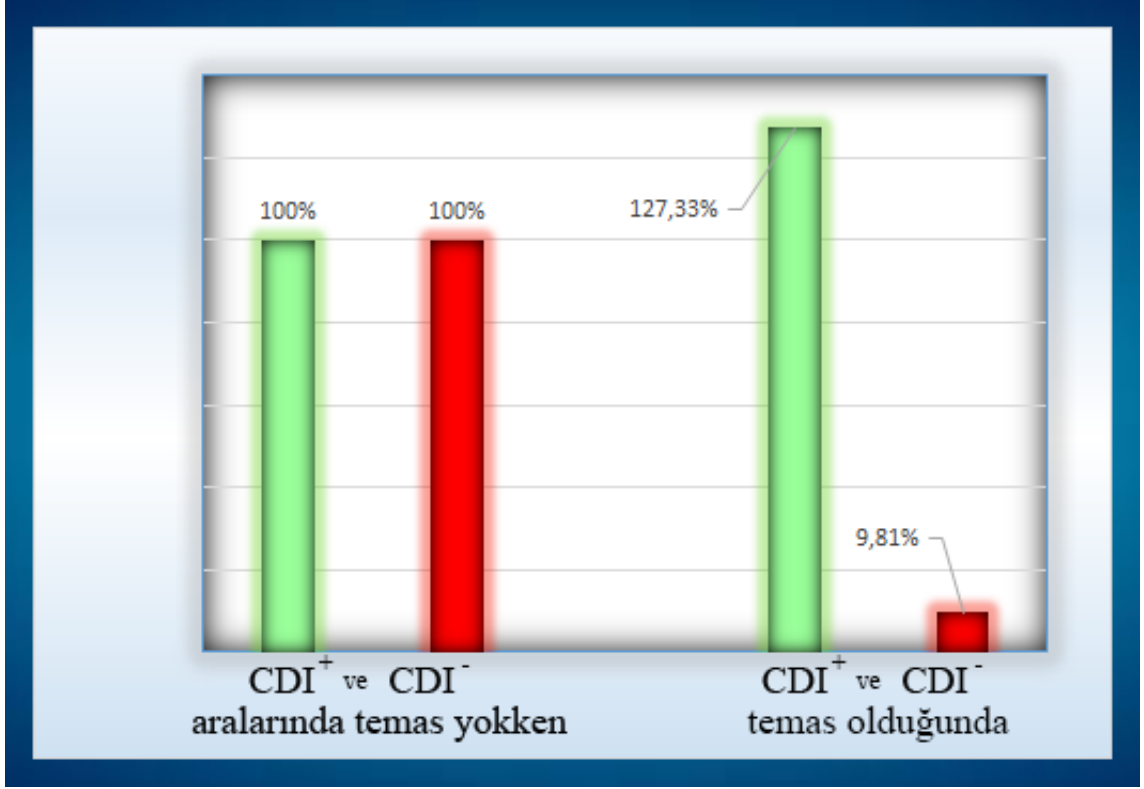
4.4.2. Kalitatif Analiz

Bölüm 3.4.2 ‘de belirtilen deney düzeneği ayarlanmış ve 3 ayrı paralel ile sonuçlar elde edilmiştir. Çizelge 4.2. ‘de maksimum uyarım ve maksimum emisyonunda okunan değerler verilmiştir.

		EX488,0_EM507,0	EX584,0_EM607,0
Kör	T1	50,747	-0,062
	T2	51,781	0,053
	T3	54,053	0,277
	ORT	52,194	0,089
CDI⁺	T1	268,305	31,868
	T2	272,950	26,074
	T3	269,340	30,450
	ORT	270,198	29,464
CDI⁻	T1	93,033	1384,105
	T2	92,536	1371,840
	T3	91,407	1382,400
	ORT	92,325	1379,448
CDI⁺ & CDI⁻	T1	342,731	136,540
	T2	346,979	138,242
	T3	342,466	131,289
	ORT	344,059	135,357

Çizelge 4.2. CDI⁺ suşların CDI⁻ suşlara etkisinin floresan spektrofotometresinde ölçülen değerleri

Floresan spektrofotometresinde elde edilen sonuçlar, CDI⁺ suşlar ile CDI⁻ negatif suşların aynı ortama tabi tutulduklarında ayrı ayrı oldukları ortama nazaran sayılarında değişiklikler meydana geldiğini göstermektedir. CDI⁺ suşların sayısında bir azalma gözlemlenmezken CDI⁻ suşlarda belirgin derecede azalma göze çarpmaktadır. CDI⁺ ve CDI⁻ suşlar birlikte aynı ortamda iken yeşil floresan spektrum değerlerinde meydana gelen artış ise CDI⁻ suşlarda bulunan kırmızı floresan proteininden kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.8 : CDI⁺ suşların CDI⁻ suşlarla etkileşimi sonucu yüzdelik değişim

CDI⁺ suşlar CDI⁻ suşları tamamen ortadan kaldırmamakta bakteristatik etki göstererek üremelerini ve sayılarını artırımlarını engellediği ön görülmektedir.

Aoki ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada CDI⁻ suşların sayısı değişmezken CDI⁺ suşlarda artışın belirli bir seviyeye kadar aritmetik olarak arttığını göstermişlerdir. Bu artışın reaksiyon ortamının ilk saatlerinde gerçekleştiğini 1. saatten sonra ise stabil hal aldığı saptamışlardır. Bu çalışmada reaksiyon ortamının 3. saati ölçüldüğünden bulduğumuz sonuçların literatüre uygun olduğu gözlemlenmiştir. Bu aşamadan sonra CDI mekanizmasını etkileyen faktörlerin (suşların oranı inkübasyon süreleri ve reaksiyon ortamının sıcaklığı) etkisi araştırılmıştır.

4.5. CDI mekanizmasını etkileyen faktörler

CDI mekanizmasını etkileyen faktörleri incelediğimizde bazı faktörlerin mekanizmayı pozitif yönde tetiklediği bazı faktörlerin de CDI mekanizmasını engellediği saptanmıştır.

CDI mekanizmasının daha iyi anlaşılmasında bu faktörlerin etkisinin irdelenmesinin gerekli olduğu kanısına ulaşılmıştır.

4.5.1. Reaksiyon ortamının inkübasyon süresi

CDI⁺ suşlarla CDI⁻ suşların bir araya koyuldukları reaksiyon ortamında CDI⁺ suşların CDI⁻ suşlara ne zaman etkileşime geçtiklerini saptanması amacıyla bu aşama gerçekleştirilmiştir. Floresan spektrofotometresinde yaptığımız ölçümler sonucu reaksiyon ortamına ilk konuldukları andan itibaren CDI⁺ suşların etkisi açıkça görülmektedir (Çizelge 4.3.) .

Reaksiyon ortamı inkübasyon süresi	EX488,0_EM507,0	EX584,0_EM607,0
0.dk	123,52	135,256
60. dk	224,353	140,52
120. dk	344,059	135,357
180. dk	352,697	129,057
240. dk	348,257	130,639

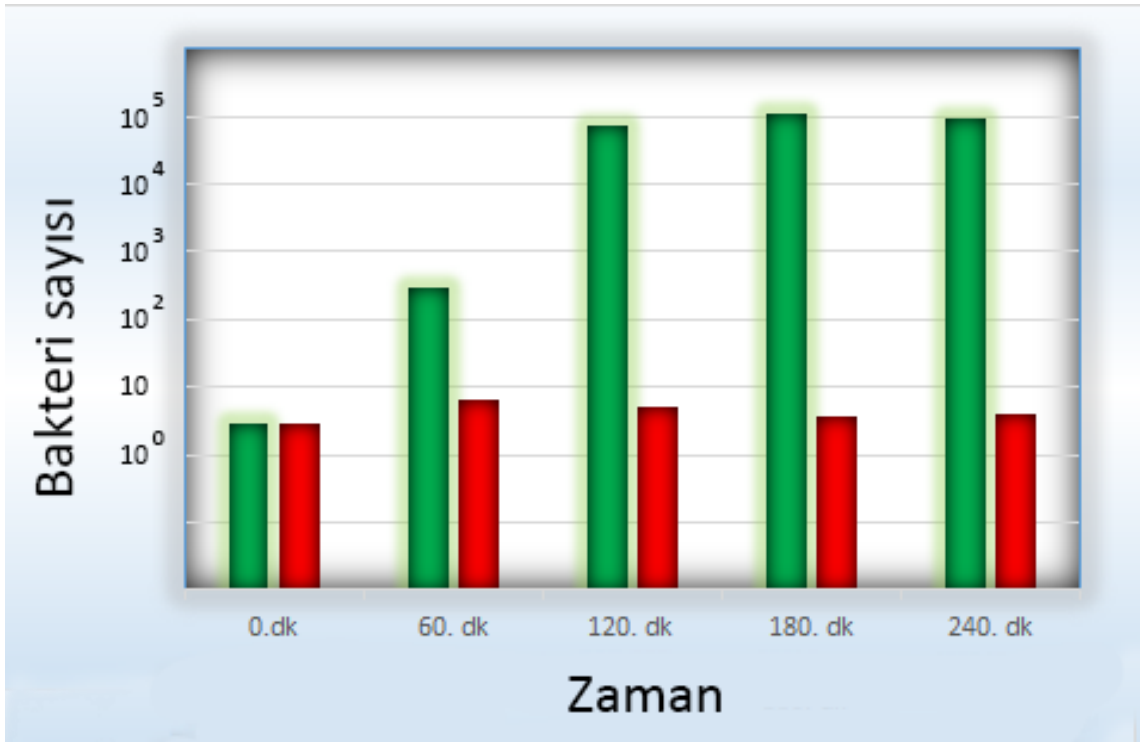
Çizelge 4.3. Reaksiyon ortamı inkübasyon süresinin, CDI mekanizmasına etkisi

Yapılan ölçümler incelendiğinde 120. dakikaya kadar CDI⁺ suşların sayısında belirgin bir artış gözlemlenirken CDI⁻ suşların baskılandığı ve sayılarının belirli bir oranda devam ettiği gözlemlenmiştir. 120. dakikadan sonra CDI⁺ suşların artışı yavaşlamış 180. dakikada maksimum seviyeye ulaştıktan sonra sabit bir değerde devam etmiştir.

Reaksiyon ortamında meydana gelen bu etkileşimi bakteri sayısı açısından değerlendirebilmek amacıyla reaksiyon tüplerindeki bakteriyel solüsyon 10⁴ oranında

sulandırılmış ve LB agara (+IPTG, +Kan) inokülasyonları gerçekleştirilmiş 24 saat 37 °C’de inkübasyonun ardından bakteri sayımları gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.9.’da açıkça görüldüğü gibi CDI^+ suşların CDI^- suşlara bakteriyostatik bir etki gerçekleştirdiği gözlemlenmektedir. 120.dakikadan sonra CDI^+ suşların sayısındaki artışın yavaşlamasının besiyerinde bakteriyel kültür yoğunluğuna ulaşılmasından ötürü olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.9 : Reaksiyon ortamı inkübasyon süresinin CDI^+ ve CDI^- suşların bakteri sayısına etkisi

180.dakikada maksimum değerlere ulaşıldığından bundan sonraki aşamalarda reaksiyon ortamı inkübasyon süresi 3 saat olarak ele alınmıştır.

4.5.2. CDI^+ ve CDI^- suşların oranı

Bölüm 3.5.2.’de belirtildiği üzere; bu aşamada CDI^+ ve CDI^- suşların oranlarının, CDI mekanizmasına etkisini gözlemlemek amaçlanmıştır. Maksimum etki 180. dakikada

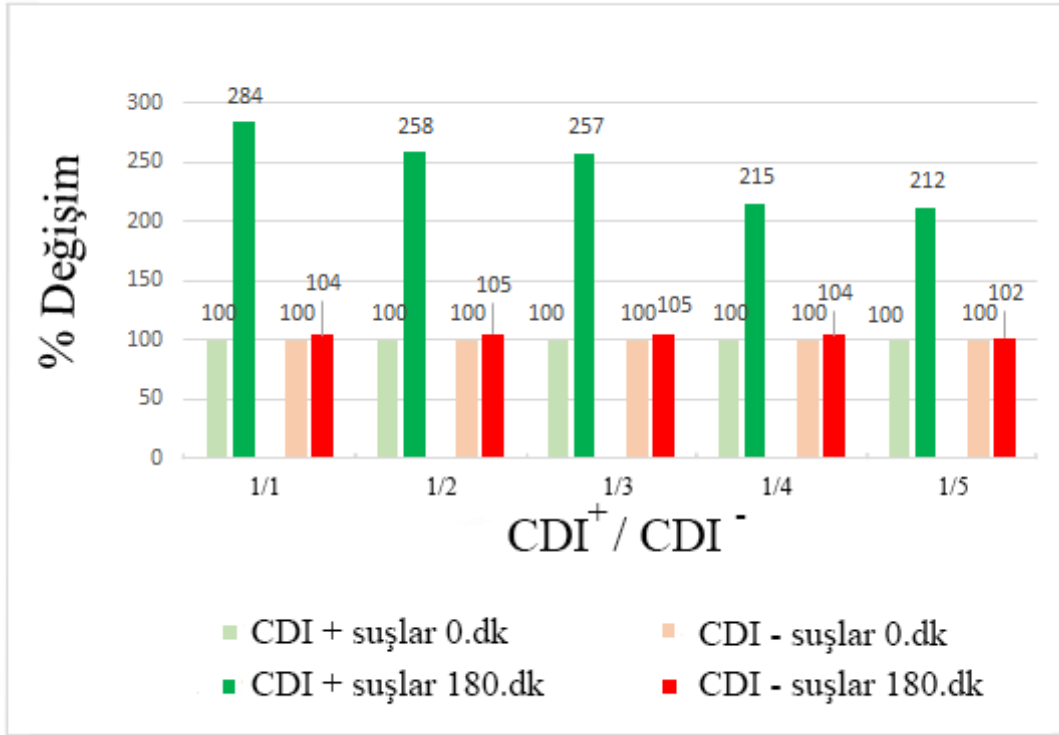
gözlemlendiği için; prosesi de gözlemlemek amacıyla ölçümler hem 0. dakikada hem de 180. dakikada gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.4.)

CDI ⁺ /CDI ⁻	0.dk		180. dk	
	EX488,0_EM507,0	EX584,0_EM607,0	EX488,0_EM507,1	EX584,0_EM607,1
1/1	123,520	135,256	350,523	140,252
1/2	133,778	168,698	345,658	177,528
1/3	142,255	224,369	365,522	235,693
1/4	160,523	287,565	345,455	298,560
1/5	162,532	354,789	344,086	360,215
2/1	522,367	145,088	802,323	150,236
3/1	700,008	142,669	1052,315	155,425
4/1	869,445	155,501	1394,451	166,656
5/1	1109,357	167,758	1845,233	176,580

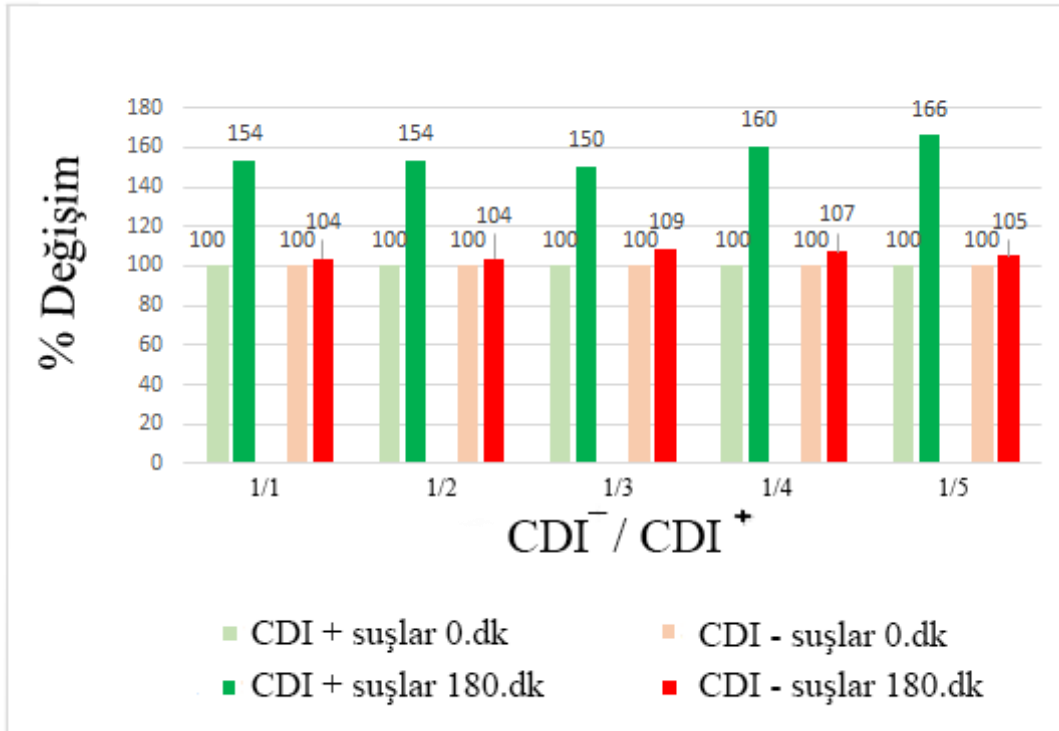
Çizelge 4.4. CDI⁺ ve CDI⁻ suşların oranının CDI mekanizmasına etkisi

CDI⁻ suşlarının oranı 5 kata kadar artılmasına karşın CDI⁺ suşların etkisinin beklenildiği gibi devam ettiği gözlemlenmiştir. CDI⁺ suşların oranı artırıldığında da CDI⁻ suşların üremelerini inhibe ettikleri ve bakteriyostatik bir etki gösterdikleri saptanmıştır.

Bu etkileşimin bölüm 4.5.1.'deki gibi bakteri sayısı açısından değerlendirebilmek amacıyla reaksiyon tüplerindeki bakteriyel solüsyon 10⁴ oranında sulandırılmış ve LB agar (+IPTG, +Kan) besiyerine inokülasyonları gerçekleştirilmiştir. 24 saat inkübasyonun ardından bakterilerin sayımları gerçekleştirilmiş ve yüzde olarak hesaplamalar yapılmıştır (Şekil 4.10. ve Şekil 4.11.).



Şekil 4.10 : CDI⁺ / CDI⁻ suşların oranının CDI mekanizmasına etkisi



Şekil 4.11 : CDI⁻ / CDI⁺ suşların oranının CDI mekanizmasına etkisi

CDI⁺ ve CDI⁻ suşların oranı değişse de CDI mekanizmasının bundan etkilenmediği saptanmıştır. CDI⁺ suşların oransal olarak daha az oldukları durumda da daha fazla oldukları durumda da CDI⁻ suşları inhibe edebildikleri gözlemlenmiştir. Aoki ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bu oran 1/10 seviyelerine kadar denenmiş ve etkileşimin yine de gerçekleştiği gözlemlenmiştir[2]. Aoki ve arkadaşları CDI suşların sayısının hiç değişmediğini CDI⁺ suşların sayısında ise belirgin artışların gözlemlendiğini rapor etmişlerdir[2].

Aoki ve arkadaşlarının 2011 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada yaptıkları “Çubuk üzerindeki toksin” benzetmesinde olduğu gibi CDI⁺ suşların CDI⁻ suşları inhibe edebilmesi için bu çubuk görünümü uzantıların CDI reseptörlerine bağlanmasının yeterli olduğu bilinmektedir. O yüzden reaksiyon ortamında karşılaşılabildikleri müddetçe CDI⁺ ve CDI⁻ suşlarının oranının bu mekanizma için önemli olmadığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç ise CDI merkezli tedavi yöntemleri geliştirilmesinde pozitif olarak değerlendirilmektedir. Çünkü az miktarda CDI⁺ suşun bile etkili olabileceği saptanmıştır.

4.5.3. Üreme ortamı inkübasyon süresi

Literatürde CDI mekanizmasının etkili olabilmesi için protein sentezinin de gerçekleşmesi gerektiğinden bahsedilmektedir. Özellikle CDI'nin logaritmik fazda etkili olduğu rapor edilmiştir [2]. Bu aşamada üreme ortamında üretilen CDI⁺ ve CDI⁻ suşların reaksiyon ortamına alındığında üreme ortamındaki inkübasyon sürelerinin inhibisyona ne derece etkili olduğu araştırılmıştır. Bölüm 3.5.3'de bahsedildiği gibi deney düzeneği hazırlanmış ve ölçümler gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.5.)

Üreme ortamı inkübasyon süresi	EX488,0_EM507,0	EX584,0_EM607,0
2. saat	335,35	1235,654
12. saat	344,059	135,357
36. saat	325,693	1379,586

Çizelge 4.5. Üreme ortamı inkübasyon süresinin CDI mekanizmasına etkisi

Suşların üreme ortamında inkübasyon süreleri farklı olsa da reaksiyon ortamında her biri 3'er saat inkübasyona bırakılmıştır. İlk aşamada üreme ortamında 2 saat inkübe edilen suşların daha sonra reaksiyon ortamına aktarıldıklarında, her iki suşun da üremelerinde bir engelle karşılaşmadığı gözlemlenmiştir. 36 saat inkübe edilen suşlar da benzer şekilde reaksiyon ortamına aktarıldıklarında her iki suşun yine üremelerini inhibe eden bir etken olmadığı saptanmıştır. 12 saat inkübe edilen suşlarda ise CDI⁺ suşun CDI⁻ suşun üremesini inhibe gözlemlenmiştir.

Elde edilen bu sonuçların ışığında CDI mekanizmasının etkili olabilmesi için; CdiB proteinin porlarda bir bariyer görevi üstlenmesi, CdiA proteinin bir çubuk gibi hücre dışına uzanması gerekmektedir ki bunların da gerçekleşebilmesi için bakteri üreme eğrisinde logaritmik fazda olması gerekmektedir. Henüz lag fazında proteinlerin de tam sentezlenmesi gerçekleşmediği için CDI etkisiz kalmaktadır. Durgunluk fazında ise muhtemelen CDI etkisiz hale geldiği düşünülmektedir. Çizelge 4.5.'de de görüldüğü üzere logaritmik faza kadar üretilip reaksiyon ortamına aktarılan suşlarda CDI etkisini gözlemlenmek mümkün olmaktadır. Şekil 2.5.'de Ruhe ve arkadaşlarının CdiA'nın Elektron kriyotomografisinde görüntüsü elde ettikleri çalışmada görüntünün bakterinin logaritmik fazdayken elde edildiği rapor edilmiştir. Özetle; CDI mekanizmasının bakterinin logaritmik fazda etkili olan proteinler tarafından gerçekleştiği sonucuna ulaşılmaktadır.

4.5.4. Reaksiyon ortamının sıcaklığı

Bölüm 3.4.5'de belirtildiği gibi deney düzeneği ayarlanıp ölçümler gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon ortam sıcaklığının etkisinin belirlenmesinde 3 farklı sıcaklık belirlenmiştir. Belirlenen bu sıcaklıklar bakterinin üremesi için gerekli optimum sıcaklıktan ayrı olarak 2 farklı sıcaklık değeri (30 °C - 45 °C) denenmiştir. Bu doğrultuda Cdi proteinlerinden herhangi biri oluşurken bu sıcaklıklardan etkilenip etkilenmeyeceğini ve dolayısıyla CDI etkisinin sıcaklıkla ne ölçüde değiştiğini gözlemlenmiştir (Çizelge 4.6.).

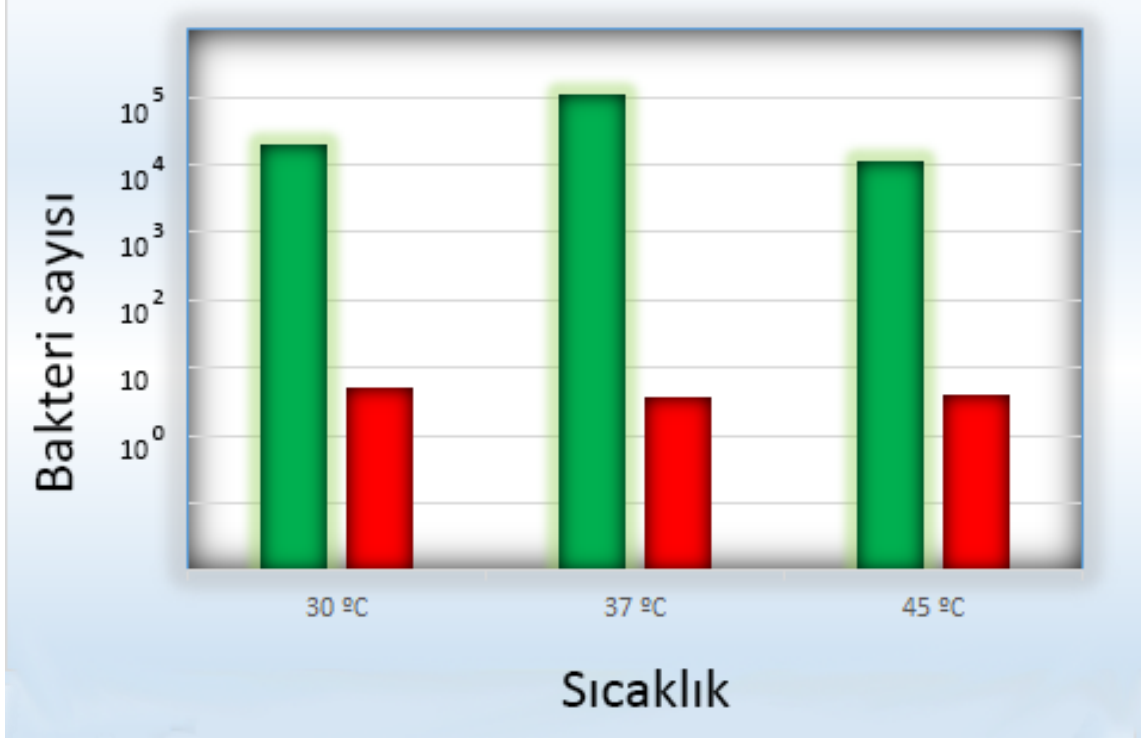
Ölçümler kıyaslandığında; normal reaksiyon sıcaklığı olan 37 °C’de yeşil ve kırmızı floresan proteinlerinin verdiği emisyon ve uyarılma değerlerine yakın değerler saptanmıştır. 30 °C ve 45 °C meydana gelen küçük düşüşlerin CDI mekanizmasından ayrı bakterinin üremesi için koşulların tam uygun olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Reaksiyon ortamının sıcaklığı	EX488,0_EM507,0	EX584,0_EM607,0
30 °C	315,363	135,698
37 °C	352,697	129,057
45 °C	302,852	130,639

Çizelge 4.6. Reaksiyon ortamının sıcaklığının CDI mekanizmasına etkisi

Reaksiyon ortamında meydana gelen bu etkileşimi bakteri sayısı açısından değerlendirebilmek amacıyla reaksiyon tüplerindeki bakteriyel solüsyon 10^4 oranında sulandırılmış ve LB agara (+IPTG, +Kan) inokülasyonları gerçekleştirilmiş 24 saat 37 °C inkübasyonun ardından bakteri sayımları gerçekleştirilmiştir(Şekil 4.12).

Çalışmamızın başında *Proteus mirabilis* suşunda yapılan İn-Slico analizlerde WP_094959878.1 numaralı proteinin CdiA olarak ön görülmüştü. Bu proteinin yapısı incelediğinde hemaglutininin tekrarlı bir yapıdan oluştuğu gözlemlenmiştir. Özellikle çok sayıda filamentous haemagglutinin beta-helikal terkarlı yapıdan oluştuğu bu yapısında sıcaklığa belirli bir düzeye kadar dayanabildiği düşünülmektedir.



Şekil 4.12 : Reaksiyon ortamı sıcaklığının CDI⁺ ve CDI⁻ suşların bakteri sayısına etkisi

Sıcaklığa bağlı bakteri sayısında küçük değişiklikler olsa da bu değişikliklerin CDI kaynaklı olmadığı düşünülmektedir.

4.6. Diğer suşların oluşturulan CDI⁻ (*Proteus mirabilis* ATCC® 43071 Δcdi BAI :: amp^R) suşa etkisinin saptanması

Her ne kadar CDI⁺ *Proteus* suşlarının oluşturulan CDI⁻ *proteus* suşlarına etkisi saptanmış olsa da; bu aşamada, çalışma kapsamında izole edilen izolatlar ile temin edilen diğer ATCC suşların da kontak bağımlı inhibisyondan ne derece etkilendiğini saptamak amaçlanmıştır. Bölüm 3.6'da bahsedildiği gibi, temin edilen bütün ATCC suşlara (Çizelge 3.1. Salmonella suşları dahil) ayrıca kendi izolatlarımıza hem yeşil hem de kırmızı floresan proteini içeren plazmitler aktarılmıştır. Ayrı ayrı üretim ortamlarında inkübe edilen suşlar reaksiyon ortamına aktarılıp ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Ölçümler değerlendirildiğinde; bazı suşların oluşturulan *Proteus mirabilis* ATCC® 43071 Δcdi BAI :: amp^R suşunun üremesini inhibe ettiği ve bu suşa bakteriyostatik bir etki gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.7.)

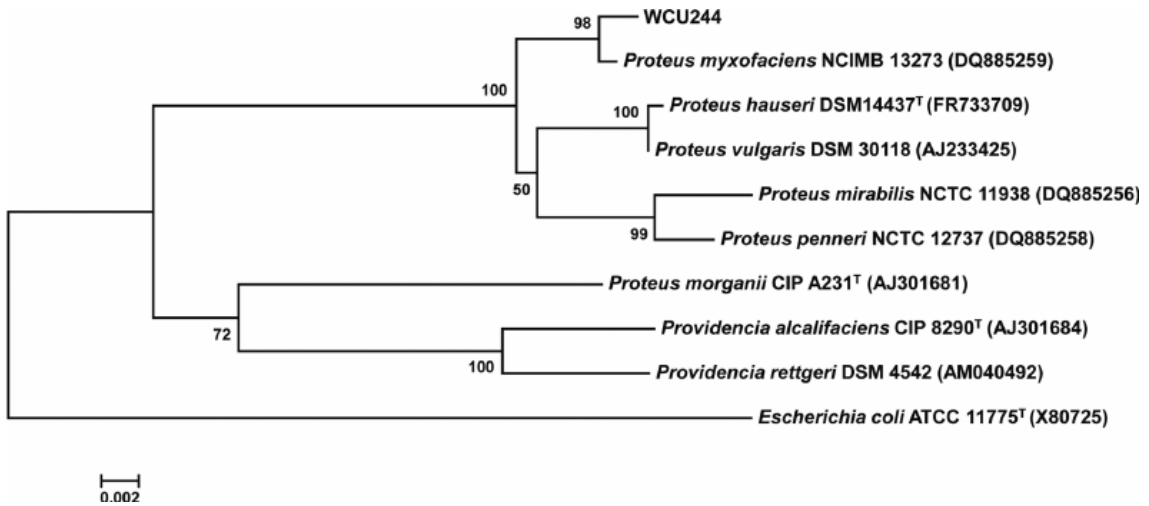
<i>Proteus</i> Suşları		<i>Salmonella</i> Suşları	
<i>Proteus hauseri</i> ATCC® 13315	-	<i>Salmonella bongori</i> ATCC® 43975	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 25933	+	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Arizonae</i> ATCC® 13314	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 29245	+	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> serovar <i>abaetetuba</i> ATCC® 35640	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 33583	+	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> serovar <i>anatum</i> ATCC® 9270	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 35659	+	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> serovar <i>enteritidis</i> ATCC® 13076	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 7002	+	<i>s1</i>	-
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC® 33420	-		
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC® 49132	-		
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC® 6380	-		
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC® 6896	-		
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC® 8427	-		
<i>p1</i>	-		
<i>p2</i>	+		

Çizelge 4.7. CDI *Proteus* suşuna etkili diğer suşlar

ATCC suşlardan hiç bir *Salmonella* suşunun oluşturulan CDI *Proteus mirabilis* ATCC® 43071 Δcdi BAI :: amp^R) suşuna etki etmediği gözlemlenmiştir. Aynı zamanda S1 suşunun da ATCC suşlar gibi bir etki etmediği saptanmıştır. CDI'nın özellikle tür içi rekabette etkili bir mekanizma olduğu bilinmektedir. *Salmonella* suşlarının hiç bir etki

göstermemesinin nedeni CDI mekanizmaları olsa bile CDI⁻ *Proteus* suşunda bu mekanizmaya ait olan CdiA-CT'nin bağlanacak bir reseptör bulamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.7. incelendiğinde *Proteus mirabilis* ATCC suşların hepsinin CDI suşa etki ettiği görülmektedir. Öte yandan *Proteus hauseri* ve *Proteus vulgaris* suşlarının ise *Salmonella* suşları gibi bir etki etmediği gözlemlenmiştir. *Proteus* suşlarının 16S rRNA bazlı filogenetik ağacı göz önünde bulundurulduğunda elde edilen sonuçların makul olduğu düşünülmektedir (Şekil 4.13.). *Proteus hauseri* ve *Proteus vulgaris* birbirlerine daha yakın akraba iken *Proteus mirabilis* bu ikisine göre uzak akraba kalmaktadır.



Şekil 4.13 :16S rRNA analizine göre *Proteus* türlerinin filogenetik ağacı[77]

P1 ve P2 olarak adlandırılan kendi izolatlarımızdan ise CDI suşa karşı P1 herhangi bir inhibisyon etkisi göstermezken, P2 tıpkı diğer *Proteus mirabilis* suşları gibi CDI⁻ *Proteus* suşuna bakteriyostatik bir etki göstermiştir. Bu sonuç izole ettiğimiz P2'nin bir CDI mekanizmasına sahip olabileceği ayrıca *Proteus mirabilis* suşuna da yakın akraba olabileceği kanısını oluşturmuştur.

İzole edilen P1 suşu içinse iki ihtimal söz konusudur. P1 suşu; *Salmonella* ve etki göstermeyen diğer *Proteus* suşları gibi *Proteus mirabilis*'e uzak akraba olabilir. Bu yüzden CDI mekanizmasına sahip olup olmadığı hakkında net bir fikir yürütülemez.

İkinci ihtimalle P1 suşunun *Proteus mirabilis* suşuna yakın bir akraba ilişkisi olsa da CDI negatif olduğu için bir etki göstermemesidir. İşte bu ikinci durumdan ötürü son olarak CDI⁺ *Proteus mirabilis* ATCC® 43071 suş ile P1 suşunun etkileşimi incelenmiştir. Bölüm 3.6. da bahsedildiği şekilde ölçümler gerçekleştirilmiş fakat her iki suşda da bir inhibisyon gözlemlenmemiştir.

5. YORUM

CDI (Kontak bağımlı İnhibisyon) mekanizması özellikle tür içi rekabette bakterilerin birbirlerini inhibe ettikleri bir mekanizma olarak karşımıza çıkmaktadır. CDI mekanizmasına sahip olan bakterilerin kendi türü içinde CDI mekanizmasına sahip olmayan bakterilerin reseptörlerine bağlanarak onların içerisine toksin salmakta ve bu toksin bakteride bakteriyostatik bir etki göstermektedir.

CDI toksinin herhangi bir bakteriyosinden farkı ortama salınmamasıdır. CDI mekanizması sayesinde spesifik olarak hedef hücreye bağlanma ve toksinin bu hücrenin içerisine aktarılması söz konusudur. Özellikle geniş spektrumlu antibiyotik kullanım sonucu normal floranın da etkilenmesine karşın CDI toksini ve CDI mekanizması bizzat hedef hücreyi inhibe etmeyi mümkün kılmaktadır. CDI mekanizmasında CdiA proteini karşı reseptöre bağlanmakta ve CdiA-CT kısmı hedef hücreye aktarılmaktadır. Her ne kadar *Proteus* suşu bir başka *Proteus* suşunu inhibe etse de özellikle gen manipülasyonlarıyla; CdiA proteininde gerçekleştirilecek değişimlerle, patojen olmayan bir *E.coli* suşu ile patojen bir *Proteus* suşunu inhibe etmek olası görülmektedir. CDI mekanizması tür içi rekabette cdi geni olmayan türlere karşı bakteriye bir avantaj sağlamaktadır. Ama her iki türde de cdi geni varsa ürettikleri CdiI proteini nedeniyle birbirlerine etkilememektedirler. Daha önce bahsedildiği gibi CdiI proteini CdiA-CT spesifik olarak etki göstermektedir. Yani *E.coli*'ye ait CdiA-CT'ye karşı *Proteus*'un CdiI proteini herhangi bir koruma sağlamamaktadır. Dolayısıyla *Proteus* suşunun CdiA-CT ve CdiI proteinlerini kodlayan genini; *E.coli* ait CdiA-CT ve CdiI proteinlerini kodlayan genlerle değiştirerek mutant suşlar oluşturmak ve CDI pozitif de olsa *Proteus* suşlarını inhibe etmek mümkün olmaktadır.

CDI mekanizması; bakterilerin hem tür içi haberleşmelerini sağlaması (Quorum Sensing sistemine benzer), hem de biyofilm oluşturabilme yetilerini artırabilmesi yönüyle dikkat çekmektedir. CDI mekanizmasının önümüzdeki yıllarda daha da aydınlatılmasıyla birlikte bakterilerle mücadelede önemli bir rol oynayacağı öngörülmektedir.

Yapılan bu tez çalışması kapsamında yapılan çalışmalar ve literatüre olan katkısı maddeler halinde sıralanacak olursa:

- Contact Dependent Growth Inhibition olarak adlandırılan CDI terimi, Kontak Bağımlı İnhibisyon olarak Türkçeye çevrilerek literatüre kazandırılmıştır.
- Çizelge 3.1. de verilen Amerikan Kültür Koleksiyonuna ait *Proteus* ve *Salmonella* suşları temin edilmiş ve bu suşlar daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonuna eklenmiştir.
- İki farklı *Proteus* ve bir *Salmonella* suşu bu çalışma kapsamında izole edilmiş ve diğer ATCC suşlar gibi Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonuna eklenmiştir.
- Yeşil floresan proteini içeren pBbB5k-GFP ve kırmızı floresan proteini içeren pBbA5k-RFP plazmitleri Addgene firması tarafından temin edilmiş ve sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere stoklanmıştır.
- Çalışma kapsamında Amp^R genini ekstrakte ettiğimiz pBbB7a-GFP plazmiti de Addgene firması tarafından temin edilmiş ve sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere stoklanmıştır.
- NCBI'da ASM226535v1 numaralı kayıtlı *Proteus mirabilis* suşuna ait RefSeq: WP_094959879.1 numaralı proteinin CdiB, WP_094959878.1 numaralı proteinin CdiA ve WP_063108584.1 numaralı proteinin ise CdiI proteini olabileceği saptanmıştır.
- İlk defa *Proteus* türünde CDI gen kümesinin ve CDI mekanizmasının varlığı saptanmıştır.
- Homolog rekombinasyon yöntemiyle *Proteus mirabilis* ATCC® 43071 suşundan CDI negatif olan *Proteus mirabilis* ATCC® 43071 Δcdi BAI :: amp^R mutant suşu elde edilmiştir. Bu suş ihtiyaç halinde kullanılması için Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonuna eklenmiştir.
- CDI pozitif *Proteus mirabilis* ATCC® 43071 suşuyla, bu çalışma kapsamında oluşturulan CDI negatif *Proteus mirabilis* ATCC® 43071 Δcdi BAI :: amp^R suşunun etkileşimi saptanmıştır.
- CDI mekanizmasını etkileyen -inkübasyon süresi, reaksiyon süresi, reaksiyon sıcaklığı ve CDI pozitif ile CDI negatif suşların oranı- gibi faktörlerin etkisi incelenmiştir.

- *Proteus mirabilis* suşuna ait CDI mekanizmasının çalışma prensibi içerisinde optimum koşulları belirlenmiştir.
- Çizelge 3.1 de verilen ATCC suşlarla CDI negatif *Proteus mirabilis* ATCC® 43071 Δ cdi BAI :: amp^R suşunun etkileşimi saptanmıştır.

6. KAYNAKLAR

- [1] W. Wang, M.I. Arshad, M. Khurshid, M.H. Rasool, M.A. Nisar, M.A. Aslam, M.U. Qamar, *Infect. Drug Resist.* (2018) 1645–1658.
- [2] S.K. Aoki, R. Pamma, A.D. Hernday, J.E. Bickham, B. a Braaten, D. a Low, *Science* 309 (2005) 1245–1248.
- [3] E. De Gregorio, R. Zarrilli, P.P. Di Nocera, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–12.
- [4] J.L.E. Willett, G.C. Gucinski, J.P. Fatherree, D.A. Low, C.S. Hayes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) 11341–11346.
- [5] C. Mercy, B. Ize, S.P. Salcedo, S. de Bentzmann, S. Bigot, *PLoS One* 11 (2016) e0147435.
- [6] G. Swan, *Sewanee Rev.* 123 (2015) 75–88.
- [7] M.E. Hibbing, C. Fuqua, M.R. Parsek, S.B. Peterson, *Nat. Rev. Microbiol.* (2010).
- [8] R. Mumford, V.P. Friman, *Evol. Appl.* (2017).
- [9] O. Rendueles, J.-M. Ghigo, *Microbiol. Spectr.* (2015).
- [10] S.P. Diggle, A.S. Griffin, G.S. Campbell, S.A. West, *Nature* 450 (2007) 411–414.
- [11] B. SIRIKEN, V. ÖZ, *Gıda ve Yem Bilim. Teknol. Derg.* 52 (2017) 42–52.
- [12] Ashleigh S. Griffin, Stuart A. West, Angus Buckling, *Nature* 430 (2004) 1021–1024.
- [13] J. Schluter, C.D. Nadell, B.L. Bassler, K.R. Foster, *ISME J.* 9 (2015) 139–149.
- [14] O. Rendueles, L. Travier, P. Latour-lambert, *MBio* 2 (2011) 1–12.
- [15] M.A. Riley, D.M. Gordon, *Trends Microbiol.* 7 (1999) 129–133.
- [16] L. Chao, B.R. Levin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78 (1981) 6324–6328.
- [17] J.M. Yarwood, P.M. Schlievert, *J. Clin. Invest.* (2003).
- [18] S.E.A. Christiaen, G. Brackman, H.J. Nelis, T. Coenye, *J. Microbiol. Methods* 87 (2011) 213–219.
- [19] C.S. Hayes, S.K. Aoki, D.A. Low, *Annu. Rev. Genet.* (2010).
- [20] M. Ghoul, S. Mitri, *Trends Microbiol.* 24 (2016) 833–845.

- [21] I. Meuskens, A. Saragliadis, J.C. Leo, D. Linke, *Front. Microbiol.* (2019).
- [22] G. Roman-Hernandez, J.H. Peterson, H.D. Bernstein, *Elife* (2014).
- [23] T. Trunk, H. S. Khalil, J. C. Leo, *AIMS Microbiol.* (2018).
- [24] M.A. Casasanta, C.C. Yoo, H.B. Smith, A.J. Duncan, K. Cochrane, A.C. Varano, E. Allen-Vercoe, D.J. Slade, *J. Biol. Chem.* (2017).
- [25] B. Kenny, R. DeVinney, M. Stein, D.J. Reinscheid, E.A. Frey, B.B. Finlay, *Cell* (1997).
- [26] J. Guérin, S. Bigot, R. Schneider, S.K. Buchanan, F. Jacob-Dubuisson, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7 (2017) 1–23.
- [27] M. Roussin, S. Rabarioelina, L. Cluzeau, J. Cayron, C. Lesterlin, S.P. Salcedo, S. Bigot, *Front. Microbiol.* (2019).
- [28] S.K. Aoki, R. Pamma, A.D. Hernday, J.E. Bickham, B.A. Braaten, D.A. Low, *Science* (80-.). (2005).
- [29] Z.C. Ruhe, D.A. Low, C.S. Hayes, *Trends Microbiol.* (2013).
- [30] C.S. Hayes, S. Koskiniemi, Z.C. Ruhe, S.J. Poole, D.A. Low, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* (2014).
- [31] A. V. Kajava, N. Cheng, R. Cleaver, M. Kessel, M.N. Simon, E. Willery, F. Jacob-Dubuisson, C. Locht, A.C. Steven, *Mol. Microbiol.* 42 (2001) 279–292.
- [32] S.J. Poole, E.J. Diner, S.K. Aoki, B.A. Braaten, C. t’Kint de Roodenbeke, D.A. Low, C.S. Hayes, *PLoS Genet.* 7 (2011).
- [33] S.K. Aoki, J.S. Webb, B.A. Braaten, D.A. Low, *J. Bacteriol.* (2009).
- [34] Z.C. Ruhe, P. Subramanian, K. Song, J.Y. Nguyen, T.A. Stevens, D.A. Low, G.J. Jensen, C.S. Hayes, *Cell* (2018).
- [35] S.K. Aoki, E.J. Diner, C.T.K. De Roodenbeke, B.R. Burgess, S.J. Poole, B.A. Braaten, A.M. Jones, J.S. Webb, C.S. Hayes, P.A. Cotter, D.A. Low, *Nature* (2010).
- [36] K. Nikolakakis, S. Amber, J.S. Wilbur, E.J. Diner, S.K. Aoki, S.J. Poole, A. Tuanyok, P.S. Keim, S. Peacock, C.S. Hayes, D.A. Low, *Mol. Microbiol.* 84 (2012) 516–529.

- [37] S.K. Aoki, J.S. Webb, B.A. Braaten, D.A. Low, *J. Bacteriol.* 191 (2009) 1777–1786.
- [38] E.J. Diner, C.M. Beck, J.S. Webb, D.A. Low, C.S. Hayes, *Genes Dev.* 26 (2012) 515–525.
- [39] R.P. Morse, K.C. Nikolakakis, J.L.E. Willett, E. Gerrick, D.A. Low, C.S. Hayes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 21480–21485.
- [40] Z.C. Ruhe, D.A. Low, C.S. Hayes, *Trends Microbiol.* 21 (2013) 230–237.
- [41] C.M. Rojas, J.H. Ham, W.L. Deng, J.J. Doyle, A. Collmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 13142–13147.
- [42] M.R. Guilhabert, B.C. Kirkpatrick, *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18 (2005) 856–868.
- [43] R.B. Neil, M.A. Apicella, *Infect. Immun.* 77 (2009) 2285–2293.
- [44] Z.C. Ruhe, L. Townsley, A.B. Wallace, A. King, M.W. Van Der, D.A. Low, F.H. Yildiz, C.S. Hayes, 98 (2016) 175–192.
- [45] S.K. Aoki, S.J. Poole, C.S. Hayes, D.A. Low, *Virulence* 2 (2011) 356–9.
- [46] E.C. Garcia, A.I. Perault, S.A. Marlatt, P.A. Cotter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) 8296–8301.
- [47] M.B. Miller, B.L. Bassler, (2001).
- [48] E.C. Garcia, M.S. Anderson, H.J. A., *Mol Microbiol* 23 (2014) 1–7.
- [49] A.M. Jones, D.A. Low, C.S. Hayes, S. Barbara, E. Program, S. Barbara, *Emerg Top Life Sci.* 1 (2018) 75–83.
- [50] K. Nikolakakis, S. Amber, J.S. Wilbur, *Mol Microbiol.* 23 (2008) 1–7.
- [51] P.M. Johnson, G.C. Gucinski, F. Garza-Sánchez, T. Wong, L.W. Hung, C.S. Hayes, C.W. Goulding, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 19387–19400.
- [52] W.B. Whitman, *Bergey’s Manuel of Systematic Bacteriology: The Firmicutes*, 2009.
- [53] E.J. De Muinck, P. Trosvik, *Nat. Commun.* 9 (2018) 1–8.
- [54] T. Zuo, S.C. Ng, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 1–13.

- [55] M. Adeolu, S. Alnajar, S. Naushad, R.S. Gupta, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66 (2016) 5575–5599.
- [56] B.P. McNamara, A.J. Wolfe, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 1813–1818.
- [57] J.J. Farmer, M.K. Farmer, B. Holmes, *Topley Wilson’s Microbiol. Microb. Infect.* (2010).
- [58] C. Jenkins, R.J. Rentenaar, L. Landraud, S. Brisse, *Infect. Dis. (Auckl)*. (2017) 1565-1578.e2.
- [59] A. Rózalski, Z. Sidorczyk, K. Kotełko, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (1997).
- [60] J.J. Wenner, L.F. Rettger, *J. Bacteriol.* (1919).
- [61] H. Bozkurt, H. Güdücüo, M.G. Kurto, H. Körkoca, İ. Hakk, 12 (2005) 145–148.
- [62] J.N. Schaffer, M.M. Pearson, *Urin. Tract Infect. Mol. Pathog. Clin. Manag.* 3 (2016) 383–433.
- [63] C.E. Armbruster, S.A. Hodges, H.L.T. Mobley, *J. Bacteriol.* (2013).
- [64] U. Zafar, M.K. Taj, I. Nawaz, A. Hussain, *Int. J. Biosci.* 14 (2019) 443–450.
- [65] P. Alamuri, H.L.T. Mobley, *Mol. Microbiol.* 68 (2008) 997–1017.
- [66] K.E. Walker, S. Moghaddame-Jafari, C.V. Lockatell, D. Johnson, R. Belas, *Mol. Microbiol.* 32 (1999) 825–836.
- [67] S.M. Soto, *Adv. Biol.* 2014 (2014) 1–13.
- [68] N. Antilles, PhD Thesis (2014) 173.
- [69] S. Cui, J. Zheng, J. Meng, *J. Food Saf.* (2006).
- [70] W.B. CHERRY, P.L. LENTZ, L.A. BARNES, *Am. J. Public Health Nations. Health* (1946).
- [71] B.D. Firehammer, *J. Clin. Microbiol.* 25 (1987) 1312–1313.
- [72] B.K. Meteab, A.A.A. Abed, *Al-Qadisiyah J. Vet. Med. Sci.* 17 (2018) 75–80.
- [73] A. Froger, J.E. Hall, *J. Vis. Exp.* (2007) 2007.
- [74] B.J. Bevis, B.S. Glick, *Nat. Biotechnol.* 20 (2002) 83–87.
- [75] P.J. Cranfill, B.R. Sell, M.A. Baird, J.R. Allen, Z. Lavagnino, H.M. De Gruiter, G.J. Kremers, M.W. Davidson, A. Ustione, D.W. Piston, *Nat. Methods* 13 (2016)

557–562.

- [76] K. Yasui, Y. Kano, K. Tanaka, K. Watanabe, M. Shimizu-Kadota, H. Yoshikawa, T. Suzuki, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 2–8.
- [77] M. Khalilian, M.R. Zolfaghari, M. Soleimani, *Iran. J. Microbiol.* 7 (2015) 94–102.