T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Neşe AKIŞ SANSA

Staphylococcus aureus'UN VANKOMİSİN VE METİSİLİNE KARŞI STRES YANITI

(Yüksek Lisans Tezi)

Samet ALBOY

EDİRNE – 2012

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Neşe AKIŞ SANSA

Staphylococcus aureus'UN VANKOMİSİN VE METİSİLİNE KARŞI STRES YANITI

(Yüksek Lisans Tezi)

Samet ALBOY

Destekleyen Kurum: TÜBAP

Tez No: 2011-57

EDİRNE – 2012

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Doç. Dr. Neşe Akış danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Samet Alboy tarafından tez başlığı "*S. aureus*'un Vankomisin Ve Metisiline Karşı Stres Yanıtı" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 16/11/2012 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **"Yüksek Lisans Tezi"** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. H. Murat Tuğrul
JÜRİ BAŞKANI

Doç. Dr. Neşe Akış
ÜYE

Prof. Dr. Figen Kuloğlu
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Tammam Sipahi
Enstitü Müdürü V.

TEŞEKKÜR

Tez projemin tüm aşamalarında, bütün desteğini cömertçe sunan danışman hocam Doç. Dr. Neşe Akış'a sonsuz teşekkürlerimi bildiririm.

Çalışma konusunun belirlenmesine katkı sağlayan bölüm başkanımız Prof. Dr. H. Murat Tuğrul'a; çalışmanın yürütülmesine destek veren Arş. Gör. Dr. Demirhan Güven'e; çalışmanın yazımı aşamasında ve literatür temininde katkılarını eksik etmeyen Prof. Dr. Şaban Çavuşlu hocama teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca ne şartlarda olursa olsun bana hep ilerisini gösteren, tüm olumsuzlukları beraber aştığımız sevgili aileme minnettarlığımı bildiririm.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

STAFİLOKOKLAR VE *Staphylococcus aureus* 3

***Staphylococcus aureus* GENETİĞİ 9**

BAKTERİ STRES BİYOLOJİSİ VE *Staphylococcus aureus*..... 15

***Staphylococcus aureus* ENFEKSİYONLARI VE ANTİBİYOTİK DİRENCİ SORUNU 20**

GEREÇ VE YÖNTEMLER 26

BULGULAR 41

TARTIŞMA 63

SONUÇLAR 67

ÖZET 69

SUMMARY 71

KAYNAKLAR 73

TABLOLAR VE ŞEKİLLER LİSTESİ..... 79

ÖZGEÇMİŞ..... 81

EKLER 82

SİMGE VE KISALTMALAR

ATCC: American Type Culture Collection

BHIB: Brain Hearth Infusion Broth

BSA: Bovine Serum Albumin

CFU: Coloni Forming Unit

EDTA: Etilendiamintetraasetik Asit

GSBL: Genişlemiş spektrumlu ß-laktamaz

McF: Mac Farland

MHB: Mueller Hinton Broth

MİK: Minimum İnhibitor Konsantrasyonu

MRSA: Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*

MSSA: Metisilin Sensitive *Staphylococcus aureus*

PBP: Penisilin Bağlayan Protein

PBS: Phosphate Buffered Saline

Rpm: Devir/dakika

SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Gel Elektroforez

SCVs: Small Colony Variants

SOD: Süperoksit dismutaz

TEMED: Tetrametiletilendiamin

VISA: Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*

VRE: Vancomycin Resistant Enterococci

VRSA: Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*

GİRİŞ VE AMAÇ

Bakteriler yaşam faaliyetlerini sürdürürken çevre hakkında sürekli bilgi toplarlar. Çevresel koşullar değiştiğinde genomlarında hazır bulunan koşula özgü yanıt genleri ile yeni ortama adapte olurlar. Karşılığı genomda bulunmayan bir koşulla karşılaştıklarında adaptasyon genlerini taşıyan gen adalarında bulunan genleri denerler ve ayrıca strese yanıt genlerini ifade ederler. Eski veya yeni koşul bazen bakterinin adaptasyonuyla sonuçlanmayacak nicelik veya nitelikte ortaya çıkar, yaşam faaliyetleri tehlikeye girer. Bu durumda bakteri, kendini tehlikeye karşı koruyacak yanıtı oluşturacak kompleks bir sinyalleşme sürecine girer, stres genlerine paralel mutasyon makinelerini de aktive ederek evrimleşme sürecine başlar. Bu süreçte bakteride adaptasyon, stres, mutasyon ve bunların düzenlenmesi ile ilgili genler yoğun biçimde ifade edilir.

Rakip kolonilerdeki bakterileri etkisizleştirmek için doğada serbest yaşayan bakterilerin ürettikleri veya enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotikler, hedeflenen bakteriler için önemli bir stres kaynağıdır. Duyarlı veya dirençli bakterinin antibiyotik karşısında stres yanıt ürünleri üreterek kendilerini koruyacak seçeneği bulmaya çalışırlar ve ayrıca evrimleşme mekanizmaları ile direnç geliştirmeyi denerler.

Bakteriyi fiziksel koruyan bakteri duvarı ve membran aynı zamanda çevre koşullarını algılayan reseptörleri, yerleşmede kullanılan yapışma moleküllerini, bakteriyel hücre hemostazını sağlayacak kanalları ve virülans toksinlerini barındırır. Stres yanıtı geliştiğinde ifade edilen gen ürünlerinin önemli bir kısmı bakteri duvarı ve membranda görev yaptığı anlaşılmıştır. Bu nedenle bakteriye karşı geliştirilecek drug tasarımında bakteri duvarındaki

bu moleküllerin hedeflenmesi düşünülebilir. Hedefleme, duvar ve membranda yer alan stres yanıt ürünlerinin doğrudan engellenmesi olabileceği gibi, bunların kromozom veya ribozomlardaki gen ve gen ürünleri de olabilir. Hedeflenecek stres ürünlerini belirlemek için bakterinin stres karşısında duvarında değiştirdiği proteom profilini incelemek gerekir (1).

Stres yanıtı alanında yapılan araştırmalarda Gram-pozitif bakteri modeli olarak bugüne kadar *Bacillus subtilis* moleküler düzeyde incelenmiştir. Suşa özgü gen ifadelerinin akraba bakteriler arasında dahi en az %10 değişiklik gösterdiği bilindiğinden, değişik türde Gram-pozitif bakterilerin stres yanıtının *Bacillus subtilis*'inkinden farklı olması beklenir. Çoklu antibiyotik direnci taşıyan ve nazal taşıyıcılık sayesinde nozokomiyal enfeksiyonlara neden *Staphylococcus aureus* önemli bir patojendir. Bakterinin genomu ayrıntılı bilinmektedir, ancak, stres yanıtı ve duvar ifade profil değişimi ile ilgili çalışmalar kısıtlıdır. Bu çalışma, özellikle Trakya bölgesinde enfeksiyon yapan *S. aureus* bakterilerinin antibiyotik stresine maruz kaldığında izlediği ifade değişimini anlamak için tasarlanmıştır. Hipotezimiz, "farklı *S. aureus* suşları vankomisin veya oksasilin stresi karşısında bakteri duvar/membranında farklı profilde stres yanıt ürünleri ifade eder" iddiasıdır (1).

GENEL BİLGİLER

Çalışmanın genel bilgiler bölümü şu başlık ve sıralamalar şeklinde verilmiştir: (a) STAFİLOKOKLAR VE *Staphylococcus aureus* (A/ Sınıflama; B/ Tarihçe; C/ Morfolojik Özellikler ve Moleküler Bakteri Yapısı; Ç/ Bakterinin laboratuvar tanısında kullanılan biyokimyasal özellikleri); (b) *Staphylococcus aureus* GENETİĞİ (A/ Bakteri genomu; B/ Virülans genleri ve regülasyonu; C/ Direnç Genleri; Ç/ ß-laktamaz Üretimi ve ß-laktam Direnci; D/ Bakteri Duvar Modifikasyonları ve Yarı Direnç Durumu); (c) BAKTERİ STRES BİYOLOJİSİ VE *Staphylococcus aureus* (A/ Tolerans; B/ Genel yanıt; C/ Adaptasyon ve çapraz koruma; Ç/ Özel yanıt; D/ Stres yanıtının regülasyonu); (ç) *Staphylococcus aureus* ENFEKSİYONLARI VE ANTİBİYOTİK DİRENCİ SORUNU (A/ *Staphylococcus aureus* Enfeksiyonları; B/ *Staphylococcus aureus*'un Antibiyotik Direnci; C/ *Staphylococcus aureus*'un Hastane Enfeksiyonlarındaki Önemi).

STAFİLOKOKLAR VE *Staphylococcus aureus*

Sınıflama

Bugün mevcut canlılar virosfer dışında bakteriler, arkeler ve ökaryotlar olarak üç domainli sınıflanmıştır. 3,2 milyar yıl önce gezegenimizde muhtemel RNA dünyasından DNA dünyasına geçerken ortaya çıkan ilk DNA canlısının bakteri olması beklenmektedir. Bakterilerin sınıflamasında *Staphylococcus aureus*, sırasıyla, Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae; Staphylococcus altında yer almıştır. Arke ve bakterileri bir

arada prokaryotlar olarak ele alan ve onları biyokimyasal aktiviteleri, dört ana duvar yapısından hangisine dahil oldukları ve fenotipik özelliklerine göre gruplayan Bergey'in Manueli'nde *Staphylococcus aureus,* 21 grup arasında 3. ciltte bulunan 17. grupta *Gram-positive cocci* altında yer almıştır (2,3).

Tarihçe

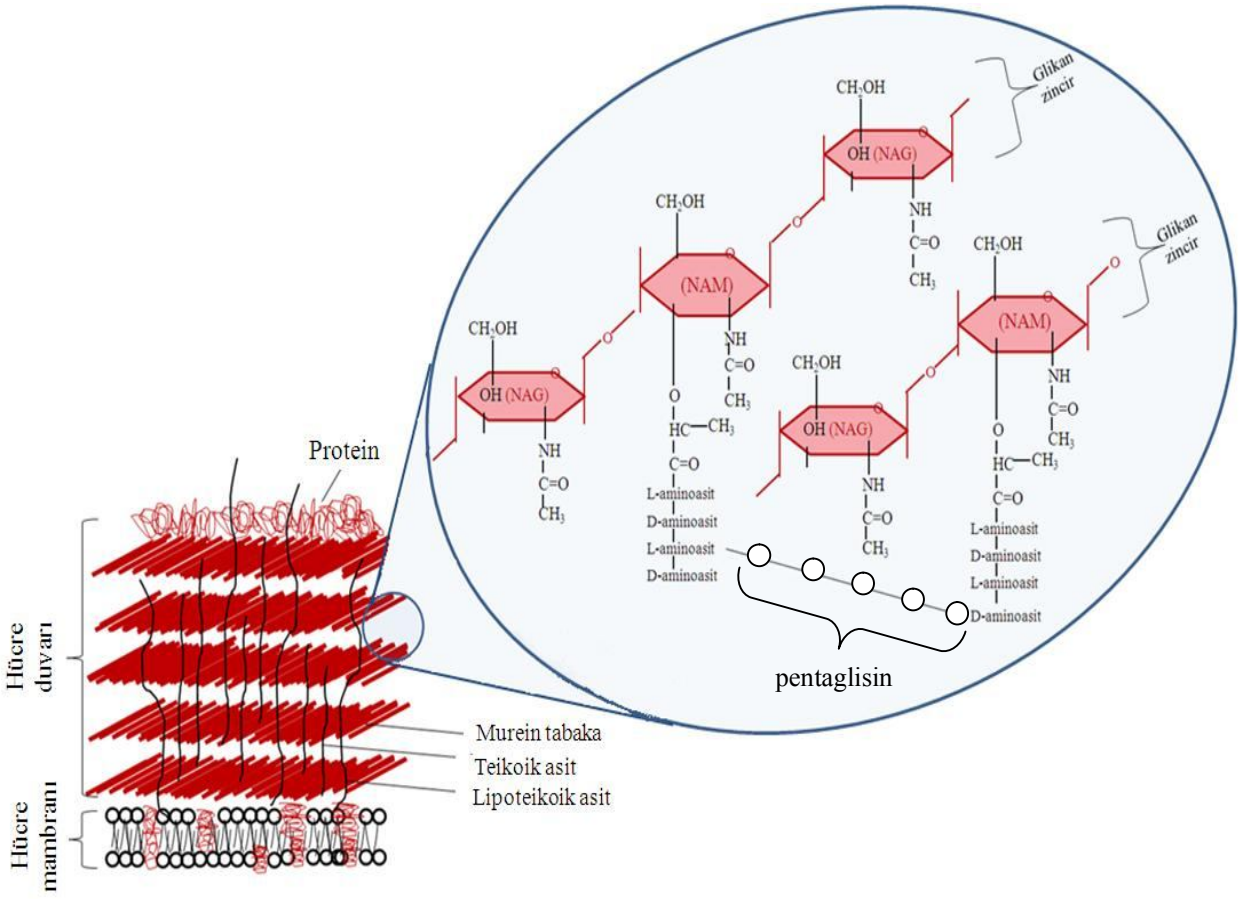
Stafilokokları ilk kez 1878'de Robert Koch tanımladı, 1880'de Pasteur tarafından sıvı besiyerinde üretildi ve 1881'de İskoçyalı cerrah Alexander Ogston, üzüm salkımı benzeri kümelenme eğiliminde olan bu organizmaları, Grekçe "staphyle" (üzüm salkımı) tabirinden türeterek isimlendirdi (4).

Morfolojik Özellikler ve Moleküler Bakteri Yapısı

Stafilokoklar 0,5-1,5 μm çapında hareketsiz koklardır. Çoğu zaman kapsülsüz, bazen az miktarda kapsül oluştururlar. Koloni rengi krem sarı ile altın sarısı arasındadır. Kapsüllü suşlar mukoid koloni oluşturabilirler. Spor oluşturmazlar. *S. aureus*'lar tek, çift ya da çoklu hücreler halinde bulunabilirler. Üç, dört bakteriden oluşan kısa zincirler ya da üzüm salkımı şeklinde yapılar oluşturabilirler. Aşağıda bakterinin duvar/antijenik yapı, virülans özellikleri, fizyolojisi ve üreme özellikleri ayrı başlıklar altında açıklanmıştır (5).

1. Bakteri duvarı ve antijenik özellikleri: Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarı iki ana bileşen peptidoglikan ve teikoik asitlerden oluşur. Bu bileşenlere ek olarak, türlere göre değişen karbohidrat ve proteinler mevcuttur. Ana bileşen mureindir. Bir peptidoglikan olan murein birkaç istisna dışında bütün prokaryotlarda mevcuttur. Murein tabaka birbirine alternatif iki şeker yapısından oluşan düz glikan zincirdir. Bu şeker yapıları N-asetilmuramikasit (NAM)'ın birinci karbonu ile N-asetilglukozamin (NAG)'nin dördüncü karbonu arasında kurulan bağlar ile oluşur (Şekil 1) (6).

S. aureus'un hücre duvarı, ribitol teikoik asit serpiştirilmiş tipik Gram-pozitif peptidoglikan yapıdan oluşur. Peptidoglikan yapıyı geçerek bakteri yüzeyine uzanan ribitol teikoik asit molekülleri nispeten *S. aureus*'a özgüdür ve antijenik yapıdadırlar. Bakteri duvarında, ribitol teikoik asitlerin dışında yüzeyi kaplayan proteinler mevcuttur. Bu proteinler



Şekil 1. Gram-pozitif bakteri duvar yapısı (6)

Duvarda yer alan teikoik asitler şeklin sol tarafında gösterilen duvar katmanlarının arasında yer alır. Şeklin sağ tarafındaki baloncuk, duvar katmanlarının moleküler yapılarını göstermektedir. Glikan zincir NAM ve NAG'lardan oluşur. İki glikan zincir sahip oldukları tetrapeptidlerin arasında kurulan pentaglisin çapraz bağları ile birbirine tutunur.

genel olarak yüzey adezinleri, yani MSCRAMM "microbial surface component reacting with adherence matrix molecules" olarak isimlendirilir. *S. aureus*'un sahip olduğu başlıca yüzey adezinleri "clumping factor", fibronektin bağlayan protein, kollajen bağlayan protein ve Protein A'dır (7,8). Duvar bileşenlerinin işlevleri şöyledir:

a. Peptidoglikan yapı: *S. aureus*'un endotoksin benzeri bir özellik gösteren bakteri duvarı peptidoglikan yapısı monositlerden interlökin-1 salınımını, kompleman aktivasyonunu ve ayrıca opsonik antikorların üretimini indükler. Bunların yanı sıra makrofajlardaki "toll-like" reseptörlerle etkileşime girerek fagositik hücrelerden proinflamatuar sitokinlerin salınımını uyarır (5).

b. Teikoik asitler: *S. aureus*'un duvarında lokalize olup lineer zincirden oluşan ribitol teikoik asitler birbirlerine fosfodiester köprüleriyle bağlıdır ve Stafilokok cinsine özgü

antijenlerdir. N-asetilglukozamin ribitol'ün 4. karbonuna α ya da ß glikozidik bağ ile bağlıdır. Ribitol teikoik asitler kompleman aktivasyonunda rol oynarlar (5,9).

c. Yüzey adezinleri: *S. aureus*'un konak yüzeyine tutunmasını ve konakta kolonize olmasını destekleyen yapılar, yüzey proteinleri olan MSCRAMM'lardır. Bunlardan biri Protein A adezyon işlevinin yanı sıra bakterinin fagositozuna ve opsonizasyonuna da müdahale eder. Diğeri "Clumping factor", *S. aureus*'un fibrinojen ve fibrine yapışmasını sağlayan bir reseptör görevi görür. Bu bağlanma neticesinde *S. aureus* plazmada kümelenmeler oluşturur. Bunların dışında, adezyonla ilişkili *S. aureus*'un fibronektin ve kollojene bağlanan proteinleri mevcuttur (5,7,10).

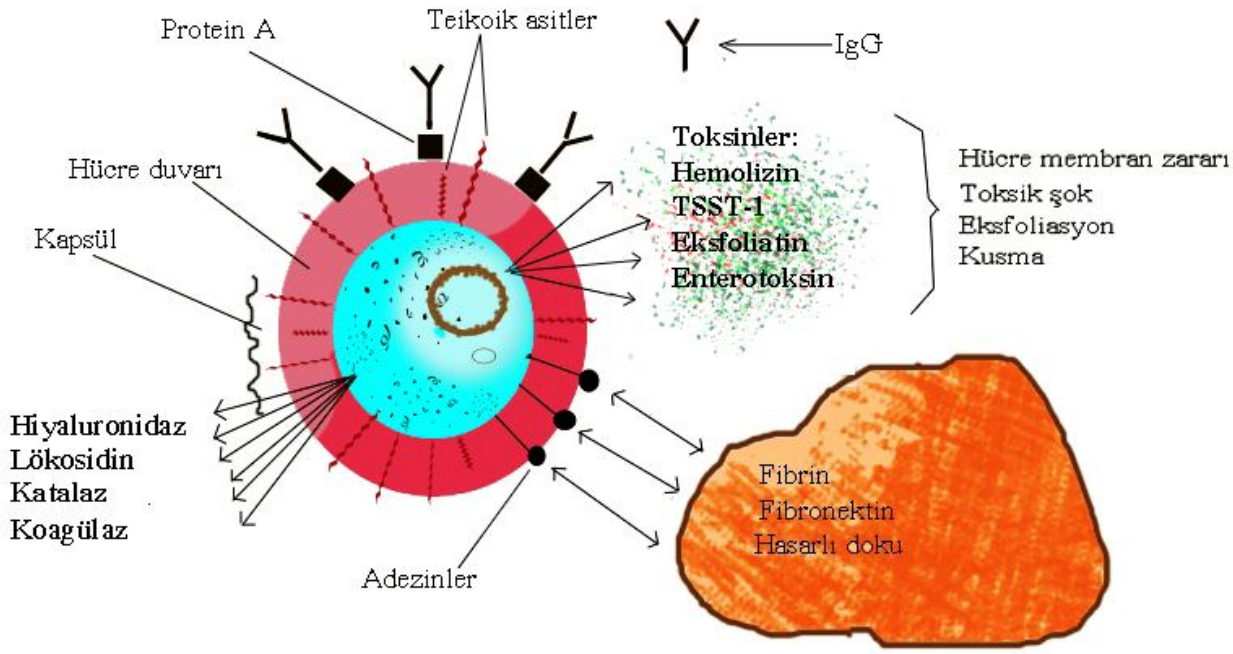
ç. Kapsül yapısı: Bakterinin en dış tabakası olan kapsül yapıları üç farklı içerikten oluşabilir. Bu kapsül yapılarından birincisi glukozaminuronik asit polimerlerinden, bir diğeri ise mannozaminuronik asitten oluşur. Üçüncü grup ise peptidoglikan parçaları bulunduran yapıya sahip olanıdır. Kapsül yapıları bakteriyi fagositozdan korur (5,9).

2. Virülans faktörleri ve antijenik özellikler: *S. aureus*'un hücre dışına salgıladığı enzim ve toksinler çeşitli hastalık tablolarına sebep olur, bakterinin virülansını belirler, bakterinin konak dokuda ilerlemesini, immün sistemden kaçışını ve hayatta kalmasını tesis eder. *S. aureus*'un önemli enzimleri ve toksinleri Şekil 2'de gösterilmiş ve açıklamaları aşağıda verilmiştir (11).

a. Koagülaz: Bakteri dışına salınır veya yüzeye bağlı şekilde bulunur. Protrombin ile oluşturduğu kompleks, fibrin polimerizasyonunu başlatır, bunun sonucunda plazma pıhtılaşır. Koagülaz ayrıca Protein A ve "clumping factor" ile birlikte *S. aureus*'u immünolojik maskeler (5,7).

b. Katalaz: Fagosite edilmiş bakterinin oksijen radikalleriyle öldürülmesini engelleyerek konak savunma mekanizmalarını bozar (5).

c. Hiyalüronidaz: Hücrelerarası matrikste bulunan hiyalüronik asidi parçalar, *S. aureus*'un konak dokusunda yayılmasını kolaylaştırır (5,11).



Şekil 2. *S.aureus*'un moleküler yapıları (12)

Bakteri duvarının iç kımından dışarıya uzanabilen teikoik asitler, duvarın dış yüzeyinde protein A ve diğer adezinler, bazen duvarı tümüyle kaplayan kapsül yapısı; sitoplazmada genetik materyaller yer alır. Bakterinin hiyalüronidaz, lökosidin, katalaz ve koagülaz enzimleri bakteri dışına salınır. Hastalarda hücre membran zararı, toksik şok, eksfoliasyon ve kusmaya yol açan toksinler: hemolizin, TSST-1, eksfoliatin ve enterotoksin bakteri tarafından salgılanır.

ç. Lökosidinler: Panton-Valentine (P-V) maddeleri olarak da bilinirler. İnsan ve tavşan polimorfonüklear lökositleri (PMLs) ve makrofajları için sitotoksik özelliktedirler (9).

d. Hemolizinler: Tümü hemolizden sorumlu bu salgılar hücre membranını etkileyen sitotoksik toksinlerdir. *S. aureus* tarafından dört farklı antijenik tipi salgılanır (α, ß, γ ve δ). Bunlar içerisinde klinik örneklerden en çok izole edilen α-toksin diğer türlere nispeten *S. aureus*'un neredeyse tüm suşları tarafından salgılanır (5,7,9).

e. Toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1): Süperantijen mekanizması sayesinde sitokin salınımını uyaran bu toksin stafilokokal toksik şok sendromunun başlıca sebebidir. Aynı zamanda endotel hücrelerine direkt toksik etki de gösterebilir. Süperantijenler, konvansiyonel antijenlere nispeten birçok T hücre alt gruplarını uyararak, aşırı miktarda sitokin salınımına, hastalarda şok gelişmesine ve ölümlere neden olabilirler (7).

f. Enterotoksinler: *S. aureus*'un salgıladığı bir tür ekzotoksin olan bu ürünler, besin zehirlenmesi vakalarına sebep olur ve septik şok semptomlarına katkıda bulunurlar. Serolojik olarak farklı 15'den fazla enterotoksin türü mevcuttur. Enterotoksinler süperantijendir (5,11).

g. Eksfoliatin: Eksfoliatin, antijenik özellikte bir toksin olup faj grup II *S. aureus* tarafından salgılanır. Eksfoliatin süperantijendir (9).

Bakterinin diğer antijenik özellikleri kapsülü ve adezinleridir. Kapsüllü yapıya sahip *S. aureus*'ların diğerlerine göre daha virülan olduğu yapılan deneylerle gösterilmiştir. Adezinlerinden teikoik asitler, stafilokok cinsine özgü antijenlerdir. Ribitol teikoik asitler mukozal hücrelere yapışmada rol oynarlar. *S. aureus*'un konak yüzeyine tutunmasını ve kolonize olmasını destekleyen, yüzey proteinleri MSCRAMM'lardan Protein A adezyon işlevinin yanı sıra bakterinin fagositozuna ve opsonizasyonuna da müdahale eder. Bu işlem, IgG'nin "antigen-reacting" Fab bölgesini güdümlü olarak dışarıda bırakarak IgG (IgG1, IgG2, IgG4) moleküllerinin Fc bölgesine emsalsiz şekilde bağlanmasıyla yapılır. Bu bağlanma protein A'nın küçük kürelere benzer beş domaini ile (bazı suşlarda dört) gerçekleşir (Şekil 2). Bir diğer MSCRAMM "Clumping factor"dür ve *S. aureus*'un fibrinojen ve fibrine yapışmasını sağlayan bir reseptör görevi görür. Bu bağlanma neticesinde *S. aureus* plazmada kümelenmeler oluşturur. Ayrıca antifagositik etkisi olan "Clumping factor"ün bu işlevi fibrinojenle etkileşimine dayandırılır. Bunların dışında, adezyonla ilişkili *S. aureus*'un fibronektin ve kollojene bağlanan proteinleri mevcuttur (5,7,9-11,13).

3. Bakteri fizyolojisi ve üreme özellikleri: Bakteri en iyi, aerop ortamda ürer. %7,5-10 NaCl içeren basit besiyerlerinde üreyebilir. 18-45°C'de kolaylıkla ürerler. *S. aureus* subsp. *anaerobius* dışında diğer *S. aureus*'lar fakültatif anaeropturlar (7,9).

Bakterinin Laboratuvar Tanısında Kullanılan Biyokimyasal Özellikleri

S. aureus katalaz pozitiftir. Koyun kanlı agar plakta ß-hemoliz yapar (5). Tablo 1'de bu özellikler toplu halde verilmiştir.

Tablo 1. Klinik öneme sahip *Staphylococcus* türlerinin biyokimyasal özellikleri (8)

Türler	Özellikler											
						İfade				Asit üretimi (aerobik)		
	Koloni pigmentasyonu	Anaerobik üreme	Aerobik üreme	Koagülaz test sonucu	"Clumping factor"	Hemolizin	Katalaz	Oksidaz	Novobiosin direnci	Sükroz	Maltoz	α-Laktoz
S. aureus	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
S. epidermidis	-	+	+	-	-	(d)	+	-	-	+	+	d
S. haemolyticus	d	(+)	+	-	-	(+)	+	-	-	+	+	d
S. lugdunensis	d	+	+	-	+	(+)	+	-	-	+	+	+
S. saprophyticus	d	(+)	+	-	-	-	+	-	+	+	+	d

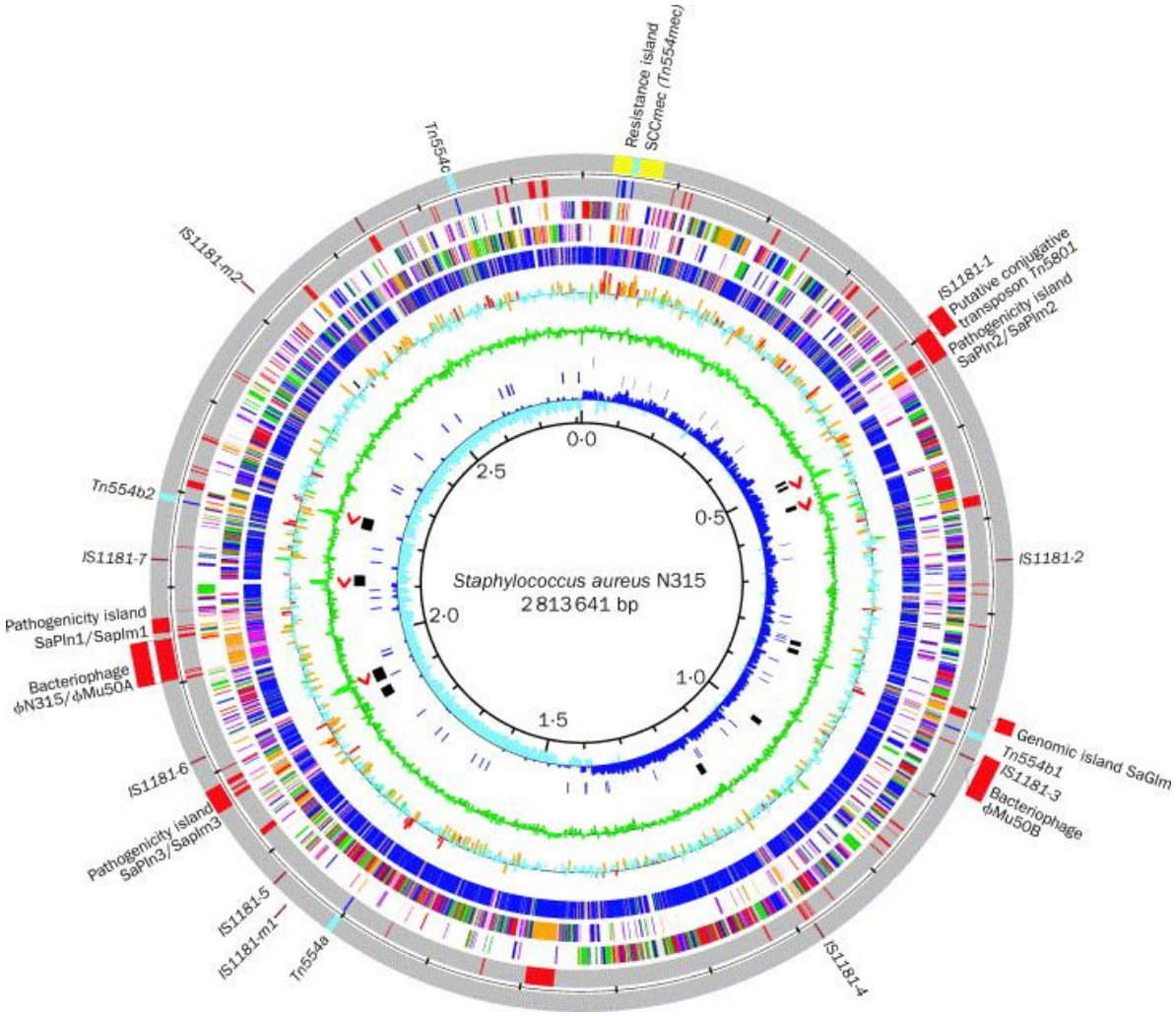
+: %90 veya daha fazla suşlar pozitif**; - :** %90 veya daha fazla suşlar negatif**; d:** suşların %11-89'u pozitif**; parantez:** gecikmiş reaksiyon

Staphylococcus aureus GENETİĞİ

Bakteri Genomu

S. aureus genomu sirküler bir yapıya sahip, ~2,8 Mb nükleotid büyüklüğündedir. Şekil 3'de görüldüğü gibi kromozom üzerindeki ORF bölgeleri ~2595 protein kodlar. Patogenezde rol oynayan genler bu ORF'lerin ~%5,4'ünü oluşturur. Model *S. aureus* N315 suşunda bu oran içinde 39 toksin geni ve patogenezde rol oynayan diğer 100 gen bulunmaktadır. ORF'lerin geri kalan kısmı, bakterinin yaşamını sürdürebilmesi için gerekli genleri, entegre bakteriyofaj (profaj) kopyalarını, transpozonları (Tn) ve *S. aureus*'a özgü "Staphylococcal cassette chromosome *mec*" (SCC*mec*) elementini barındırır. Şekil 3'te *S. aureus* N315'in kromozomunun halkasal sunumu ve Mu50'ye özgü genetik elementler verilmiştir.

S. aureus'un kromozomunda evrimsel süreç boyunca diğer organizmalardan kazanılmış patojenite adaları (PI) bulunur ve bunlar hareketli genetik elementleri taşır. Virülans genleri ve antimikrobiyal direnç genleri dışarıdan *S. aureus*'a lateral genetik transfer ile geçebilir. Bu genler bakteri patojenitesinin ve direnç çeşitliliğinin birincil kaynağıdır**.** Ayrıca bakteri çeşitli plazmidler tarafından enfekte edilmiştir (15,16).



Şekil 3. *S. aureus* N315'in kromozomunun halkasal sunumu ve Mu50'ye özgü genetik elementler (14)

En dış halka= hareketli genetik elementlerin dağılımı (sarı, SCCmec; açık mavi, Tn554; kırmızı, fajlar ve patojenite adaları; kahverengi, IS1181). Dış halkadaki kırmızı kutular=Mu50'ye özgü elementlerin bulunduğu bölgeler. İkinci halka, her 100 ORF'de bir cetvellenmiş. Üçüncü halka= patojenite (kırmızı) ve antibiyotik direnci (mavi) belirleyiciler. Dördüncü ve beşinci halkalar=sırasıyla, artı ve eksi zincirde tahmini protein kodlayan bölgeler. Altıncı halka=BLAST-best hit giriş anahtar kelimeleriyle elde edilen sınıflar, en çok giriş yapılanlar (mavi, Bacillus/Clostridium grubu; yeşil, Firmicutes; pembe, virüsler/insersiyon dizileri/transpozonlar; turuncu, Archaea/eubacteria/eukaryota; beyaz, çok giriş yapılmayanlar ya da ribozomal ve transfer RNA'lar). Yedinci= kodonun üçüncü pozisyonundaki GC içeriği ve her ORF'nin ortak kodon kullanma eğilimi (yeşil, yüksek oranda ifade edilen; kırmızı, değişmez misafir; turuncu, GC3 düzensizliğine dayandırılan muhtemel misafir; mavi, diğerleri). Renkli çubuğun boyutu, her ORF'nin GC3 değerinin ortalamadan sapmasını göstermektedir. Sekizinci halka= GC dağılımının 1 kb'lık pencere büyüklüğü ve 1 kb'lık değişim ilerlemesinin dağılımı. Kırmızı ok=rRNA ve uyumu. Siyah çubuklar=tRNA bölgeleri. Mavi çubuklar= Stafilokokkal tekrar dizi bölgeleri. Dokuzuncu halka= GC düzensizliği (koyu mavi, pozitif değer; açık mavi; negatif değer). Onuncu halka=Mb boyutlu nükleotid pozisyonları. (Şeklin kullanımı için sorumlu yazardan izin alınmıştır).

Virülans Genleri Ve Regülasyonu

Model *S. aureus* N315 suşunun kromozomunda en az 26 süperantijen geni bulunur ve bunlardan 20'si genomun üç PI'sında yer alır. Süperantijenleri kodlayan genler, toksin genlerinin üçte ikisini oluşturur. Virülanstan sorumlu genler PI kümeleri içinde bulunabildiği gibi kromozomun değişik yerlerinde tek gen olarak da yer alabilir. *S. aureus* genom adalarında kodlanan ve diğer stafilokoklarda nadir bulunan enterotoksinler, ekzotoksinler, lökosidinler ve lökotoksinler virülansta önemli faktörlerdir. Birçok stafilokokal virülans faktörü, iki ana global regülatör tarafından düzenlenir; "staphylococcal accessory regulator "(*sar*) ve "accessory gene regulator (*agr*). *Agr* lokusu, kompleks *quorum sensing* sinyal transdüksiyon mekanizmasının yanı sıra virülans determinant ifadesini kontrol eder; bir çok enfeksiyon modeline *agr*'nin katkısı vardır. *Agr* ifadesi, invazyon ve epitel hücrelerinin apoptozunda rol sahibidir. *Agr*'nin disfonksiyonu bakteri virülansını azaltır. Genelde *agr*, doku degradasyon faktörlerini (salgılanan virülans faktörleri) kodlayan genleri aktive ederken, kolonizasyonda önemli olan genleri baskılar. Bunun yanında, *agr* transkripsiyonundaki artış, SarA'nın çalışma mekanizmasına kısmen etki eder.

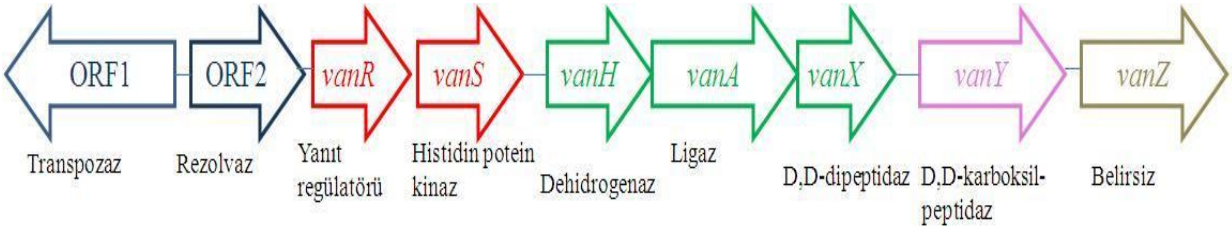
SarA, DNA'ya bağlanan bir proteindir. *Sar* lokusu, üçlü promotor tarafından kontrol edilir ve 14,5 kDa SarA majör regülatör proteinini kodlar. SarA, sadece virülans determinant üretimine katkı sağlamaz, aynı zamanda asit direnci ve ısı şok yanıtında da rol sahibidir. Böylece stres yanıtı ve virülans determinant üretimi regülatör element tarafından birlikte kontrol edilir. *Sar* lokusunun promotor bölgeleri P1, P2 ve P3 sigma faktörler (σ) tarafından regüle edilir. Özellikle eksponansiyel fazda σ^A bağımlı P1 ve P2, ve postekseponansiyel fazda alternatif σ^B bağımlı P3 promotorunun ifadesi maksimum düzeye ulaşır. σ^B, *S.aureus*'da birçok geni regüle eder, virülansıyla ilişkili *coa*, *sarA*, *fnbA*, *clfA*, *sspA*, *hla* ve *seb* genleri gibi. *S. aureus*'un σ^B kodlayan *sigB* operonu dörtlü açık okuma çerçevesinden, bir başka deyişle *rsbU-rsbV-rsbW-sigB* gen kümesinden oluşur.

S. aureus'un *sigB* mutant suşlarıyla yapılan çalışmalarda virülansla ilgili duvar ve ekstrasellüler proteinlerin değişmesi sonucu fenotipik farklılık gözlenmiştir. *sigB* geninde oluşacak bir mutasyon, α-hemolizin ifadesini arttırırken ß-hemolizin ifadesini durdurur. α-hemolizindeki ifade artışı diğer global regülatör *agr* ile artışından bağımsızdır. Çünkü σ^B, *agr*'yi etkilemez. Benzer şekilde aynı mutasyon, fibronektin bağlayan protein ifadesine etki etmezken koagülaz ve "clumping factor" ifadesini arttırır. Mutant *sigB* suşlarında global regülatör *sar* da artış gösterebilir.

Bunların dışında yeni tanımlanan global regülatörler mevcuttur. Bu faktörler, ArlSR, SsrAB, Sae, ve çeşitli Sar-benzeri proteinlerdir. Bu proteinlerden iki bileşenli sistem ArlSR proteini, adezyon ve otolizizde rol oynar. *S. aureus*'un *arlS* mutantında gelişen polisistrene tutunma ve biyofilm oluşturmadaki artışı, bakteri dışı proteolitik aktivitede dramatik düşüş izler. Ayrıca metionin sülfoksit redüktaz (MsrA)'nın *S. aureus*'un virülansında etki sahibi olduğu bildirilmiştir ama rolü tam olarak belli değildir (15-23).

Direnç Genleri

Dirençle ilişkili genler, entegre bakteriyofaj (profaj) kopyalarında bulunduğu gibi, çoğu plazmidlere entegre transpozonlarda (Tn) ve SCC*mec*'de yer alır (12). *MecA* geni taşıyan mobil element SCC*mec*, kromozomal replikasyon orijinine (*ori*C) yakın özgün bağlanma bölgesine (*orfX* genine) sokulur. Bu entegrasyon *S. aureus*'u MRSA'ya çevirip tüm ß-laktam antibiyotiklere dirençli hale getirir. Bu element, bakteriyel kromozoma entegrasyonu ve o bölgeden kusursuz kesilip çıkarılması için gerekli *ccrA* ve *ccrB* gibi iki dizi-spesifik kaset kromozom rekombinazlarını taşır. SCC*mec*'in *S. aureus*'da beş farklı tipi mevcuttur. SCC*mec* tip IV ve V toplumdan kazanılmış MRSA ile ilişkilidir. Vankomisin direnci kodlayan *vanA* operonu Tn*1546* mobil elementi ile taşınır ve Enterokoklardan *S. aureus*'a geçmiştir. Bu element plazmid ya da kromozom üzerinde bulunabilir. Bu operonda üzerinde bulunan ORF1 ve ORF2 ürünleri sırasıyla transpozaz ve rezolvaz proteinleridir ve transpozonun hareketlerinden sorumludur (Şekil 4). Kodlanan VanR ve VanS proteinleri direnç ifadesinin regülasyonunu; VanH ve VanA proteinleri, modifiye peptidoglikan peptid ucu olan D-Laktat sentezini sağlar. VanA proteini ise D-Ala-D-Ala'nın yerine D-Ala-D-Laktat (D-Ala-D-Lak) dipeptidinin geçişini sağlayan bir ligazdır. VanX ve VanY normal dipeptidleri (D-Ala-D-Ala) hidrolize eder. VanZ'nin rolü ise bilinmemektedir (16,23-25).



Şekil 4. Vankomisin direnci kodlayan Tn*1246* molekülü (24)

Transpozonun grafiğinde ORF1'in 5' tarafında regülatör VanR gen ürünü dışında beş farklı ve vankomisinin sebep olacağı reaksiyonları bozan enzimin ORF2 altında yer aldığı görülmektedir.

Önemli genler Tablo 2'de bir arada verilmiştir.

Tablo 2. *S. aureus* suşlarında bulunan direnç ilgili genler (16)

Taşıyıcı element	Gen	Antibiyotik Direnci
Plazmid	*blaZ*	Penisilin
	aacA-aphD	Gentamisin
SCC*mec*	*mecA*	Metisilin
	ermA	Makrolid-linkozamid-streptogramin B
	ant(4')	Tobramisin
	ant(9)	Spektinomisin
	bleO	Bleomisin
Tn*554*	-	Eritromisin, Spektomisin
Tn*5801*	*tetM*	Minosiklin
Tn*1556*	*vanA*	Vankomisin

***S. aureus* direnç genlerinin taşıdığı elementler ilk sütunda görülmektedir. Görüldüğü gibi, direnç genleri hem kromozomda hem de plazmidlerde taşınmaktadır.**

Bunların yanı sıra, son zamanlarda yapılan deneylerde "bakteri hücre duvarı aktif" antibiyotiklere karşı yanıt olarak MsrA homologlarında artış olduğu gösterildi. Yapılan analizlerde *S. aureus*'un *msrA* geni 5' tarafında yer alan üç genle birlikte polisistronik bir mesaj oluşturduğu görüldü. *MsrA*'da oluşturulan bir mutasyon ile de oksidatif stres koşullarına karşı duyarlığında bir artış olduğu ve MsrA'nın oksidatif (H_2O_2) stresi tolere etmesindeki etkinliği gözlendi. Bakteri hücre duvarı aktif antibiyotik stresine karşı *msrA* ile birlikte bakteri hücre duvarı ile ilişkili genlerin de ifade artışı gösterdiği gözlendi. Bu bahsedilen genler, PBP2 kodlayan *pbpB* geni; tahmini PBP1A/1B ile aynı türden protein kodlayan *sgtB* geni; UDP-*N*-asetilglukozamin karboksilvinil transferaz 2 kodlayan *murZ* ve glutamat "racemaz" kodlayan *murI* genidir. Paralel olarak bakteri hücre duvar metabolizmasıyla ilişkili *gltD* geni, ayrıca bir otolizin olan ve metisilin-direnci-ilişkili Fmt'yi kodlayan gende de ifade artışları saptandı. Ayrıca, vankomisin direncinde etkili *vraS* ve divergon expression atteuator *lyt* genlerinde de güçlü artış gözlendi (17,26).

ß-laktamaz Üretimi ve ß-laktam Direnci

ß-laktamaz, *blaZ* geni tarafından kodlanan ve bakteri hücresinin dışına salınan bir enzimdir. ß-laktamaz enzimi, penisilinin ß-laktam halkasını açarak onun bakterideki hedef bölgesine bağlanmasını olanaksız kılar. Ayrıca *blaZ* geninin aşırı aktivasyonu ß-laktamaz dirençli penisilinlere karşı yarı direnç oluşumuna diğer faktörlerin de etkisi ile katkı sağlar. ß-laktamazı kodlayan *blaZ* geni, *S. aureus*'un plazmid DNA'sında bulunur. Penisilin kullanıma

girdiğinden itibaren, ß-laktamaz (penisilinaz) enzimi üretebilen suşların seçilimi sayesinde şuanda neredeyse tüm suşlar penisiline karşı dirençlidir (5,7,27).

ß-laktamaz dirençli ß-laktam grubu antibiyotikler bakteri hücresinin duvar yapımını inhibe eden terapötik ajanlardır. Bakteri hücre duvar inhibisyonunu, duvar oluşumunu katalizleyen PBP'lere bağlanarak oluşturur. Peptidoglikan yapımını katalizleyen PBP proteinleri *S. aureus*'da dört farklı yapıdadır; bunlar PBP1, 85 kDa; PBP2, 81 kDa; PBP3, 75 kDa ve düşük moleküler ağırlıklı PBP4, 45 kDa'dır. Bunlardan PBP2 transpepdidaz özelliğinin yanı sıra transglikozilaz özelliğine de sahiptir. MRSA'ların metisilin direncinin temelini, mevcut PBP'lerden farklı bir yapıya sahip yeni bir PBP'nin üretimi oluşturur. Metisilin direnci gösteren suşlarda, bu dört proteinin yanı sıra PBP2α (PBP2') bulunur. PBP2α duyarlı suşlarda bulunmayan *mecA* geni tarafından kodlanır. *MecA* geni, stafilokokal kaset kromozom *mec* (SCCmec) mobil elementi tarafından taşınır. Metisilin direncinin temelini oluşturan PBP2α, antibiyotik varlığında peptidoglikan oluşmasındaki enzimatik fonksiyonunu sürdürürken aynı zamanda ß-laktam antibiyotikler için bağlanma afinitesini düşürür. MRSA suşları bu enzim sayesinde metisilin, oksasilin, nafsilin, dikloksasilin ve bütün sefaloporinlere dirençlidir (5,7,27-29).

Glikopeptid (vankomisin, teikoplanin gibi) antibiyotikler, ß-laktamlara benzer şekilde bakteride duvar inhibisyonunu murein tabakanın D-alanil-Dalanin rezidülerine bağlanarak sağlar. Bu bağlanma iki şekilde olabilir. Birincisi tamamlanmış ya da oluşum süreci devam eden bakteri hücre duvarının D-alanil-D-alanin rezidülerine; ya da bakteri hücre membranında bulunan ve glikozil transferazın substratı olan murein monomerlerine bağlanmasıdır. Bu bağlanmalar sonucu PBP'ler yeni murein monomerlerini bakteri hücre duvarına ekleyemez ve duvar oluşum süreci tamamen durur. Enterokoklardaki yüksek düzey vankomisin direnci glikopeptid antibiyotiklerin hedef bölgesi olan D-Ala-D-Ala peptidlerindeki değişikliklerden kaynaklanır. Bu değişiklik VanA, B, C, D, E, G ve L tipi olarak görülür. En yaygın olanı ve izole edilen VRSA suşlarında rastlanan VanA tipi direnç, *vanA* operonunun oluşturduğu, alternatif bakteri duvar peptidleri olan D-Ala, D-Lak glikopeptid antibiyotiklerin bağlanmasını engeller. *VanA* operonu, önceden belirtildiği gibi Tn*1546* mobil elementi üzerinde taşınır (24,30).

Bakteri Duvar Modifikasyonları ve Yarı Direnç Durumu

Metisilin direnç mekanizmasına katkı sağlayan ya da *mecA*-negatif suşlarda yarı direnç ("borderline") oluşturan mekanizmalar mevcuttur. Bu durum, antibiyotik stresi sonrası

peptidoglikan kalınlaşması ve bundan sorumlu PBP2; bakteri duvarının atılarak bakterinin L-formuna (protoplast) dönüşmesi; *bla* geni, diğer faktörlerin de etkisiyle ß-laktamaz enziminde görülen normalin üzerinde ifade ile açıklanabilir. Bazı diagnostik karmaşaya yol açan *mecA*-pozitif suşlarda metisiline yarı direnç oluşumu, L-formu oluşturma stratejisi ile; hem *mecA* hem de *blaZ* genlerini bulundurmayan suşlardaki az miktarda görülebilen sefalosporin direnci ise PBP2'deki zayıf penisilin bağlayıcılığı, PBP3'ün olmayışı ya da penisilinle hiç reaksiyona girmemesi ile açıklanabilir (27-29,32).

Yapılan araştırmalar sonucunda VISA suşu oluşumunun bakteri duvar peptidoglikanındaki kalınlaşmadan kaynaklandığı tespit edilmiştir. Peptidoglikandaki miktar artışı sonucu vankomisinin sitoplazmik membrana ulaşması için doğal olarak daha yüksek konsantrasyona ihtiyaç duyulur. Bunun yanında, kalınlaşmış peptidoglikanın dış tabakalarına tutunan vankomisin o bölgeyi bir süre sonra bakteri duvarından koparak parçalar. Bu parçalanma o bölgeden bakteri hücresi içine diğer vankomisin moleküllerinin penetrasyonunu engeller. Bu olgu "clogging phenomenon" olarak isimlendirilir (30).

BAKTERİ STRES BİYOLOJİSİ VE *Staphylococcus aureus*

Mikroorganizmaların çevrelerinde gelişen uygunsuz fiziksel, kimyasal ve biyolojik koşul canlı için stres nedenidir. Bakteriler duvarları ve membranlarındaki algaçlar sitoplazma tarafındaki uçları vasıtasıyla stres faktörünü algılar ve tehdite karşı stres yanıtı geliştirir. Fiziksel stresler, sıcaklık, basınç, elektrik akımı, ultrasonik dalgalar, ışık/radyasyon ve ozmotik şok olabilir. Kimyasal stresler, pH, tuzlar, mikrobiyal metabolitler, oksitleyiciler. Biyolojik stresler, yarışmacı floradaki rakipler, patojenler ve konak savunma sistemleridir (33,34).

Bir stresle ilk defa karşılaşan bir mikroorganizma strese duyarlı olduğundan, membran geçirgenliğinde değişimler, bakteri hücre protein profilinde farklılıklar, ribozom ve nükleik asitlerde oluşan defektler gibi olumsuzluklar ortaya çıkabilir. Mikroorganizmaların, duyarlı olduğu stres faktörüne maruziyeti hücresel yapıları zarara uğratabilir. Yaralanmış bakteri hücreleri kendini iyileştirebilir veya ölür. Stresin düzey ve tipine göre öncelikle iyileşme sağlayacak yanıt proteinleri ifade edilir. Bu proteinler oluşan hasarı onarabilen, yaşamın devamlılığını alteratif yollarla sağlayabilen ve stres ajanlarını elimine edebilen niteliktedir (34). Stres yanıtında izlenen davranışlar şöyle sınıflanabilir:

1. Tolerans: Tolerans, mikroorganizmaların strese karşı yaşayabilme yeteneği olarak tanımlanmaktadır. Mikroorganizmaların stres türlerine karşı tolerans düzeyi farklıdır. Ayrıca bu tolerans düzeyi geçici ya da adaptif şekillerde olabilir. Örneğin, laktik asit bakterilerinin doğal asit toleransı, diğer bakterilere göre çok daha fazla olduğu gibi, sonradan aside adapte edilen bakterilerin asit toleransı zamanla daha da artabilmektedir (34).

2. Genel yanıt: Genel stres yanıtı tek ve çoklu stres faktörleri tarafından uyarılabilir Isı şoku, tuz stresi, etanol, oksijen veya besin kıtlığı vs. gibi çeşitli stres türlerinin uyardığı protein grubu, genel stres proteinleri olarak adlandırılır. Bu proteinlerin adaptif fonksiyonu etraflıca bilinmese de olumsuz koşullar altındaki bakteri hücrelerinin genel korunması için olanak sağlar. σ^B bağımlı genel stres genlerinin çoğu (40'ı aşkın) farklı büyüme inhibisyon koşulları tarafından uyarılır. Stres regülonunun uyarılmasını sağlayan en etkin stres koşulu açlık (oksijen/besin) ile aktive olmuş σ^B dir. σ^B aktivasyonu genellikle üremedeki yavaşlama ya da stasyoner faza geçiş sırasında olur. Gram-pozitif bakterilerde σ^B tarafından kontrol edilen genel stres yanıt sistemi genlerinin Gram-negatif bakterilerdeki kontrolü sağlayan homologu kısmi olarak σ^S ve σ^{32}dir. Bu faktörler tarafından uyarılmış genlerin bakteri hücresini ozmotik ve oksidatif streslere karşı hazırlamak için DNA onarımını ve osmoprotektan alımını sağladığı bildirilmiştir (34-38).

3. Adaptasyon ve Çapraz koruma: Bir strese adapte bakteriler benzer veya farklı streslere karşı da adaptasyon kazanabilirler. Bir strese karşı adaptasyon esnasında, farklı strese karşı da dirençlilik oluşmasına çapraz koruma (cross protection) olarak adlandırılmaktadır. Bu çapraz korumaya, erken dönemlerde maruz kalındığı durumda, rpoS geni tarafından aracılık edilebileceği belirlenmiştir. Örneğin, ısı şokuna maruz bırakılmış bakteriler farklı streslere karşı da daha dirençli hale gelebilmektedir (17,34).

4. Özel Yanıt: Bakteriler kısmen veya tamamen stres faktörüne özgü yanıt da hafızalayabilir ve dirençli hale geçebilir. Konak saldırısına direnç bunlardan biridir. Örneğin *S. aureus* enfeksiyonunda görülen oksidatif strese yanıt bunlardan biridir. Enfeksiyon esnasında lökosit ve makrofajlar bakterinin bulunduğu bölgeye göç eder, bakteriyi içine alır, fagolizozomal membranda bulunan NADPH aracılığıyla oksijenin süperoksit anyonlara (O_2^-) dönüşümü katalizlenir, akabinde hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit ($OONO^-$) ve hipoklorik asit (HOCl) gibi reaktif oksijen türler gelişerek fagolizozom içerisinde bakteri liziz edilmeye çalışılır. Bu oksidantlar, bakterinin duvar, nükleik asit, lipid ve hücresel proteinlerde

zarara neden olur. Zararı algılayan bakteri fagolizozom içerisindeki reaktif oksijen türlerini tanır ve zarardan kaçmak için üç yanıtı eş zamanlı kullanır. Bunlardan biri, süperoksit dismutaz (SOD) üretimidir. SOD *S. aureus*'un yüzeyine tutunur ve bir antioksidan yanıt gelişir. Bu yanıt *S. aureus*'u reaktif oksijen türlerinden %70 oranında korur. *S. aureus*'un hücre duvarında lokalize diğer SOD (SodX) ise ekzojen O_2^-'nin parçalanmasına aracılık eder. Bu esnada SodA inaktive olur ama bu *S. aureus*'un virülansına etki etmez (18,34,39).

Bir diğer yanıt, reaktif H_2O_2'e karşı *S. aureus*'un katalaz üretimidir. *KatA*'nın kodladığı katalaz enzimi bakteri hücresinin dışına salgılanır ve fagositlere yakalanmış *S. aureus*'un hayatta kalmasında oldukça önemli katkı sağlar. Patojenite ile katalaz aktivite düzeyi arasında korelasyon güçlüdür. Virülan türler diğerlerine göre daha fazla katalaz üretir. Üçüncü yanıt, nötrofil ve makrofajların içinde nitrik oksit sentazının (iNOS) uyarılmasıyla salgılanan bakterisidal $OONO^-$'e karşıdır. *S.* aureus'un ürettiği alkil hidroperoksit redüktaz (AhpC) bakteriyi $OONO^-$ 'e karşı koruyabilir. *Salmonella typhimurium*'un ürettiği AhpC'nin bakteriyi bu reaktife karşı koruduğu bildirilmiştir (18,34,39).

Reaktif oksijen türlerine yanıt esnasında anaerop ortama özgü düşük oksijen bakteride ayrıca invazifliği de uyarır, çünkü, aderans ve invazyon faktörlerinin ifadesi çevredeki oksijen konsantrasyonu ile regüle edilmektedir. Bu nedenle yüksek oksijen parsiyel basıncı genellikle invazyonu baskılar (18).

Bakterilerin konakçı hücrelerde ve gastro-intestinal kanalda organik veya inorganik asitlere direnci bir diğer özgül stres yanıtıdır. Asit stresine karşılık DNA'yı tamir eden enzimlerin uyarılması, amino asit katabolizmasının arttırılması, proton efflux pompasının arttırılması ve bakteri membranındaki kompozisyon değişiklikleri önemli yanıt mekanizmalarıdır. Pek çok bakteri sublethal pH'da uyarılan "koruyucu proteinlere" ve düşük pH' larda yaşamı sağlayan asit tolerans yanıtına (Acid Tolerance Response, ATR) sahiptir. *S. aureus*, asitleşen fagolizozom ortamında (pH 2) ölür, ancak, letal olmayan düşük pH'ya maruz kalınırsa DNA hasarına rağmen direnç kazanabilir. *S. aureus*'un asit adaptasyonun *sodA*'nın uyarılmasını sağlaması ve asit stresinin oksidatif strese yanıtı uyarması ilginçtir; *sodA* mutantı ile yapılan deneylerde asit duyarlılığının arttığı görülmüştür. (18,34).

Kronik enfeksiyonlardan izole edilen *S. aureus*'un küçük koloni varyantları (SCVs) geliştirdiği görülmüştür. Bakterinin SCV tipinde polimorfik popülasyon geliştirerek aminoglikozit antibiyotiklere direnç göstermesi bir diğer strese özgül yanıttır. SCVs'nin kendiliğinden artan mutantlarında azalan hemolizin ve koagülaz aktivitesi pigmentasyonu ve

üremeyi azaltır. Bu özellik SCVs'ye konakta yaşama şansı tanır, çünkü, antimikrobiyal ajanlara direnç bakterinin evrimini sağlamaktadır (18).

Bir diğer strese özgül yanıt, demir konsantrasyonu azaldığında bakterilerin konak içinde hala yaşamasını sağlayan stratejidir. Buradaki mekanizma, memeli vücudu demir şelatlayıcı proteinleri olan transferrin ve laktoferrinin antimikrobiyal özelliğine karşı gelişmiştir. *S. aureus*, düşük demir konsantrasyonuna yanıt olarak yüksek afiniteli demir bağlayıcı sideroforlar üretir. Bunlar serbest demiri saklar ve bazıları demiri konak proteinlerinin içinden çıkararak muhafaza eder. *S. aureus*'da üç farklı siderofor tanımlanmıştır; stafiloferrin A, stafiloferrin B ve "aureochelin". Ek olarak, *S. aureus*'un ürettiği ve yeni tanımlanan bir yüzey proteininin de demire bağlanıp demiri transferrinden uzaklaştırdığı bildirilmiş, ancak bunun patogeneze katkıları henüz tam olarak belirlenmemiştir (18).

Bir diğer özgül yanıt kuruluk direncidir. *S. aureus*, pigmentayonu sağlayan genler (*crtM/crtN*) ile sarı-turuncu pigment oluşturur, böylece su tutar ve kendini kuruluktan korur (18).

Ozmotik stres direnç bir diğer stres yanıtı sonucudur. İntestinel lümende ozmolarite plazmanın hemen iki katı yüksekliktedir (0,3 M NaCl'ye eşdeğer). Bu değer doğal akuatik ortamdaki 0,06 M NaCl'den 50 kat yüksektir. Diğer yandan bakteriler, proses edilmiş gıdaların içerisinde bulunan yüksek şeker ve tuz ortamında veya kurutulmuş ürünlerde de ozmotik strese maruz kalırlar. *S. aureus* ozmotik stres yanıtı ile yüksek NaCl konsantrasyonunda yaşayabilir ve çoğalabilir (≥1,7 M). Buradaki mekanizma bakterinin çözülebilen glisin, prolin ve betain üretimiyle sağ kalmasına dayanır. Ayrıca bakteri, duvar peptidoglikanındaki peptidler arası köprüyü kısaltır, böylece değişen turgor basıncına karşı güçlenir. Ozmotik şokun *ahpC* genini uyardığı bilinmektedir ve bu uyarı diğer streslere karşı da çapraz koruma oluşumunu sağlar. Böylesine yüksek ozmolarite ortamında virülans genlerinin baskılandığı bilinmektedir. Muhtemelen konak dışı ortam algılandığından bakteri hücresinin enerji ekonomisi için bu düzenleme gelişmiştir. İlginç bir durum, bakterinin intestinel lümende algıladığı yüksek ozmolarite seviyesi sonucu virülans faktörleri ifadesini arttırmasıdır (18,34,39).

Besin yetersizliği bakteri için ciddi bir strestir ve iki gün içinde popülâsyonun ~%99'unun ölümüne sebep olur. Ancak bu süreçte hayatta kalan az bir popülasyonun evrildiği görülür. Bunlar, özgül stres yanıtı sonucu küçülerek ve bölünme sayısını azaltarak birkaç ay yaşayabilen popülasyondur. Asit ve oksidatif strese karşı da dirençlidirler, litik

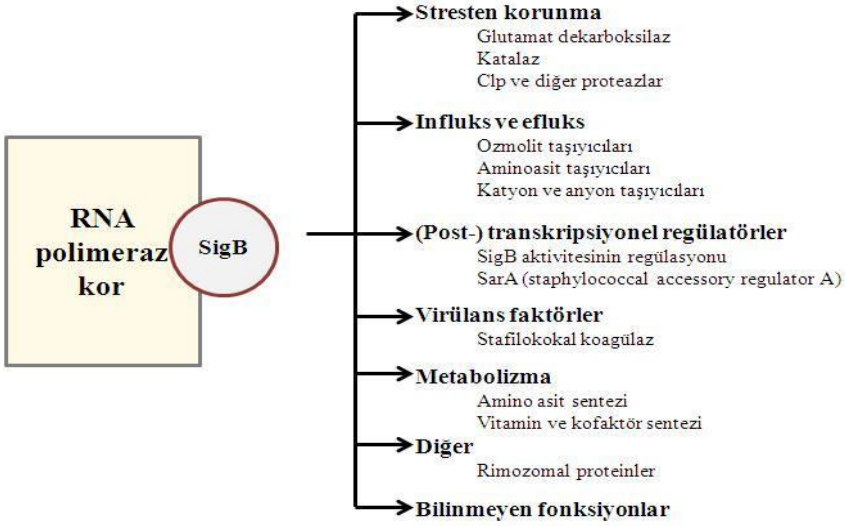
enzimlere karşı koyarlar. Besin yetersizliğinde hayatta kalma durumu, korunma ve bu durumdan kurtulma için *sodA*, hem A sentaz (*ctaA*), bakteriyel tamir SOS yanıt komponenti (*umuC*)'yi içeren protein sentezi ile başarılır, böylece metabolizmada çeşitli değişiklikler olur (18).

Sıcaklık stresine özgül yanıt bakterilerde kompleks biçimde gelişmiştir. Sıcaklık bakteri yapılarında makro moleküler hasar meydana getirmektedir. Yüksek sıcaklık ile uyarılmış stres proteinleri, hasara uğramış proteinleri toplamakta ve bakteri hücresinin bu hasarlı proteinler ile mücadele etmesine yardımcı olmakta (GroEL ve DnaK vb.) veya hasara uğramış proteinlerin miktarını (Lon ve ClpAP vb.) azaltmaktadır. Stres sonucu olarak bazı bakterilerin hücre membranında trans-cis yağ asiti oranı değişebilmekte ve membran akışkanlığı azaltılmaktadır. *S. aureus*'un 4 sınıf ısı şok proteini bulunur. Sınıf I, *dnaK*'yı içerir; Sınıf II, σ^B regülon ile ilişkilidir; Sınıf III, *dnaK*'ya bağlanan CtsR represörünü kodlayan genlerdir; Sınıf IV ise *B. subtilis* ile homoloji oluşturan direnç genlerdir. Enfekte insandan alınan serumda, bakterinin erken uyarılan birçok ısı şok proteinine karşı oluşmuş antikor bulunması, bakteriyel ısı şok proteinlerinin ateşli hastanın invazyonunda önemli olduğunu gösterir (18,34).

Bakteri soğuk stresine de yanıt geliştirir. Bakteri, çift katmanlı fosfolipid membranların akışkanlığını azaltmak üzere membran yağ asiti kompozisyonunda değişikliğe gider. Optimum akışkanlığı sürdürmek için bakteriler, membranlarındaki doymamış yağ asiti miktarını arttırır veya membran yağ asitlerinin uzunluklarını azaltır, böylece düşük sıcaklıklarda akışkanlık artar. Çift zincirli nükleik asit üzerinde soğuğun etkisini stabilize etmek için de DNA ve RNA' ya bağlı proteinlerin sentezini kontrol eder. Bunlar sitoplazma ile uyumlu maddelerin bakteri içine transferi ile yapılır ve bakteri fiziksel değişiklikler oluşturarak yapını değiştirir. Soğuk yanıtında ifade edilen proteinler, Csps (soğuk şoku proteinleri) veya Caps (soğuk şoku alıştırma proteinler) olarak isimlendirilir. Csps hızlı, ama geçici olarak sentezlenir (34).

5. Stres yanıtının regülasyonu: Stres yanıt kompleks bir sinyalleşme ile gelişir. Birçok bakteride transkripsiyona hâkim olan düzenleyiciler sigma faktörlerdir (Şekil 5). Sigma faktörler, gen bölgesine özgü transkripsiyon için spesifik promotor dizilerinin tanımlanmasını sağlayan RNA polimerazın alt üniteleridir. *S. aureus*'un bu güne dek dört farklı sigma faktörü tanımlanmıştır. Bunlardan σ^A bütün bakterilerde korunan birincil sigma faktördür, "house keeping" genlerin ifadesinden sorumludur. σ^B genel stres yanıtında rol

oynayan alternatif sigma faktördür. Büyüme fazı boyunca σ^B düzeyi sabittir; ama olağan dışı pH, ısı şoku, yüksek ozmolarite koşullarında aktive olur. Ancak, besin yetersizliğinde hayatta kalma mekanizmalarında görevli değildir. σ^B mutantları, besin kıtlığında normal asit direnci geliştirmelerine rağmen asit adaptasyon yanıtında zayıf kalır. Ek olarak oksidatif strese azalan direnç gösterir ve ısı şokunu gideremez. σ^B tarafından regüle edilen genler arasında stafiloksantin biyosentetik operon, alkalin şok protein-23 ve termonükleaz bulunur. Tanımlanmış diğer sigma faktörler, σ^H ve σ^S sıradan koşullarda zayıf ifade olurlar, stres yanıtında artarlar (18,40).



Şekil 5. σ^B'nin *S. aureus* genomunda regüle ettiği genler (41)

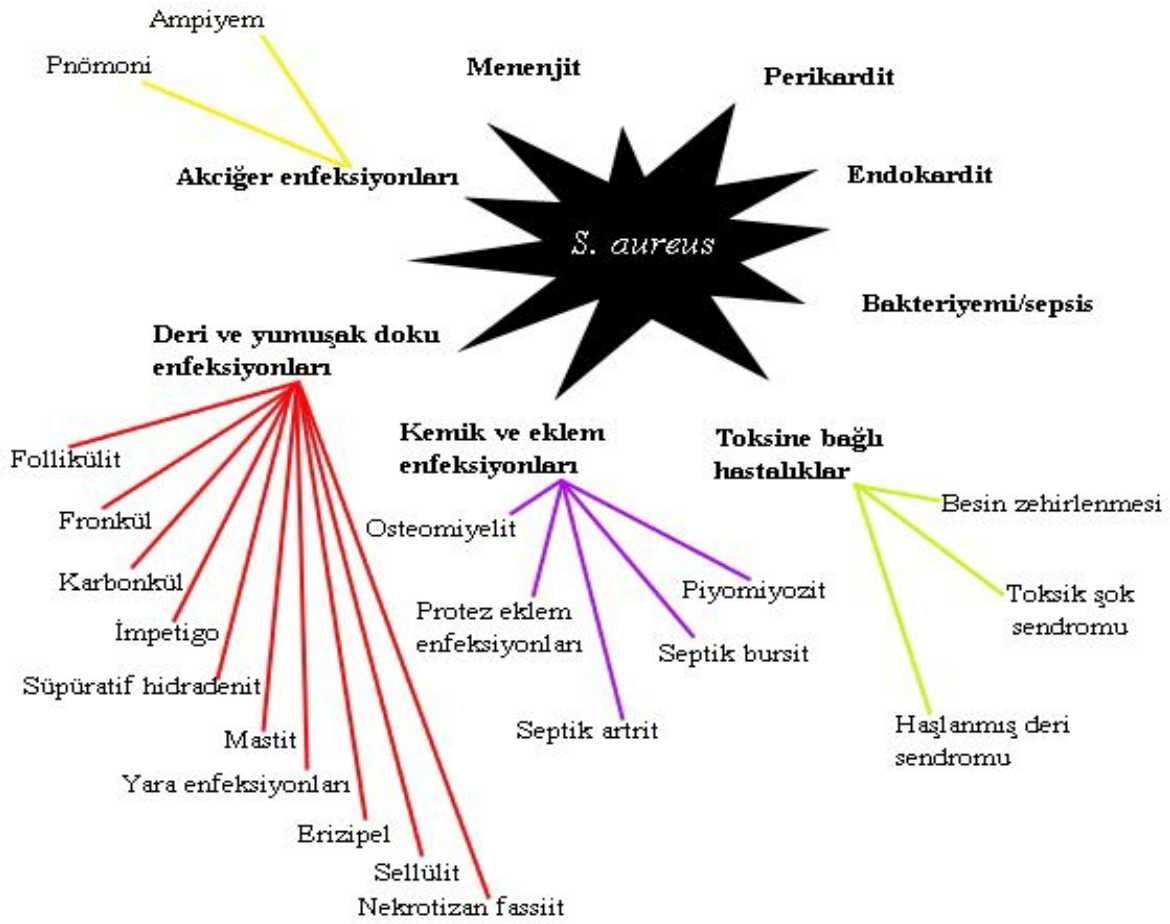
Burada görüldüğü gibi RNA polimerazlara bağlanan σ^B hem stres yanıt regülatörlerinin hem de doğrudan stres yanıt genlerinin transkripsiyon faktörleri ifadesini kontrol eder.

Staphylococcus aureus ENFEKSİYONLARI VE ANTİBİYOTİK DİRENCİ SORUNU

Staphylococcus aureus Enfeksiyonları

S. aureus H. sapiens'de hem direkt invazyonla fizyolojik sistem organlarına fiziksel hasar vermekte, birçok enfeksiyon hatalığının gelişmesine sebep olmakta, hem de toksinleriyle ölümcül semptomlara yol açmaktadır. En sık rastlanan enfeksiyonlar menenjit,

perikardit, endokardit, bakteriyemi, toksine bağlı hastalıklar, kemik ve eklem enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ve akciğer enfeksiyonlarıdır (Şekil 6).



Şekil 6. *S. aureus*'un neden olduğu enfeksiyonlar (5)

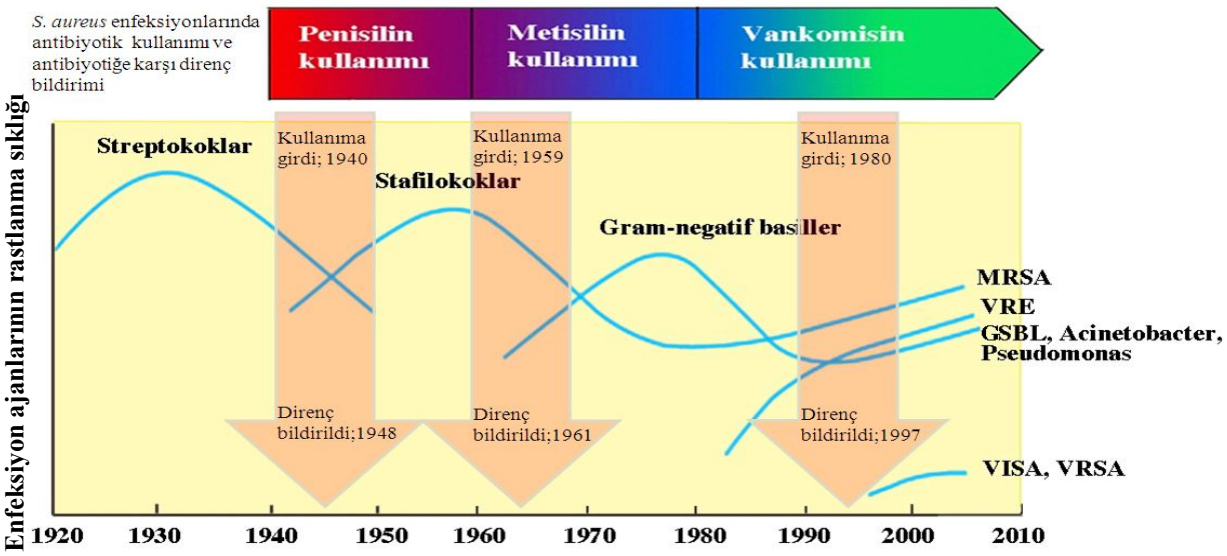
Şekilde görüldüğü gibi *S. aureus* 8 grup enfeksiyona neden olmaktadır.

Staphylococcus aureus'un Antibiyotik Direnci

Tedavide kullanılan antibiyotiklere karşı bakterinin geliştirdiği direnç, hastalıkların tedavisinde başarısızlıklara yol açmaktadır. Özellikle çoklu ilaç direnç varlığı mevcut tedavi seçeneklerinin yetersiz kalmasına ve ilaç sektörünü yeni tedavi seçeneği araştırmalarına yönlendirmektedir. Toplum kaynaklı bu enfeksiyonların yanı sıra ciddi hastane kaynaklı enfeksiyonlara da neden olmaktadır.

Penisilin ilk kez 1940'larda tıp alanında kullanılmaya başlandı. O tarihlerde bütün *S. aureus* suşları penisiline oldukça duyarlıydı ve en çok izole edilen hastalık yapıcı patojen streptokoklardı (Şekil 7). Penisilinin tedavi ajanı olarak kullanılmaya başlanması sonrasında,

bakterilerin antibakteriyel ajanlara direnç geliştirdiği görüldü. 1948'e kadar İngiltere'de hastanelerden izole edilen stafilokokların birçoğunun penisiline dirençli olduğu saptandı ve stafilokoklar en çok izole edilen patojen haline geldiler. Bu durum karşısında 1959 yılında ß-laktamaza dirençli yarı sentetik penisilinlerden metisilin; sonrasında oksasilin ve nafsilin kullanıma girdi. Ancak sadece 2 yıl sonra metisilin dirençli suşların geliştiği saptandı. Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA)'nın izolasyonu ve tanımlanmasından sonra 50 yıl geçmesine rağmen hala tedavi ajanı geliştirmek mümkün olamadı. *S. aureus*'un sahip olduğu birçok özellik günümüzde onun dikkat çeken, başarılı bir insan patojeni olmasını sağladı. Şekil 7'de bakterinin antibiyotik direnç geliştirme süreci gösterilmektedir. (7,42,44).



VISA: Vankomisine yarı dirençli *S. aureus*; **VRSA:** Vakomisin dirençli *S. aureus*; **GSBL:** Genişlemiş spektrumlu ß-laktamaz; **VRE:** Vankomisin dirençli enterokok

Şekil 7. Bazı bakteriler ve *S. aureus*'un kazandığı direnç ve zaman grafiği (Mavi grafik çizgileri 42 nolu kaynağa, Şekil tasarımı yazara aittir)

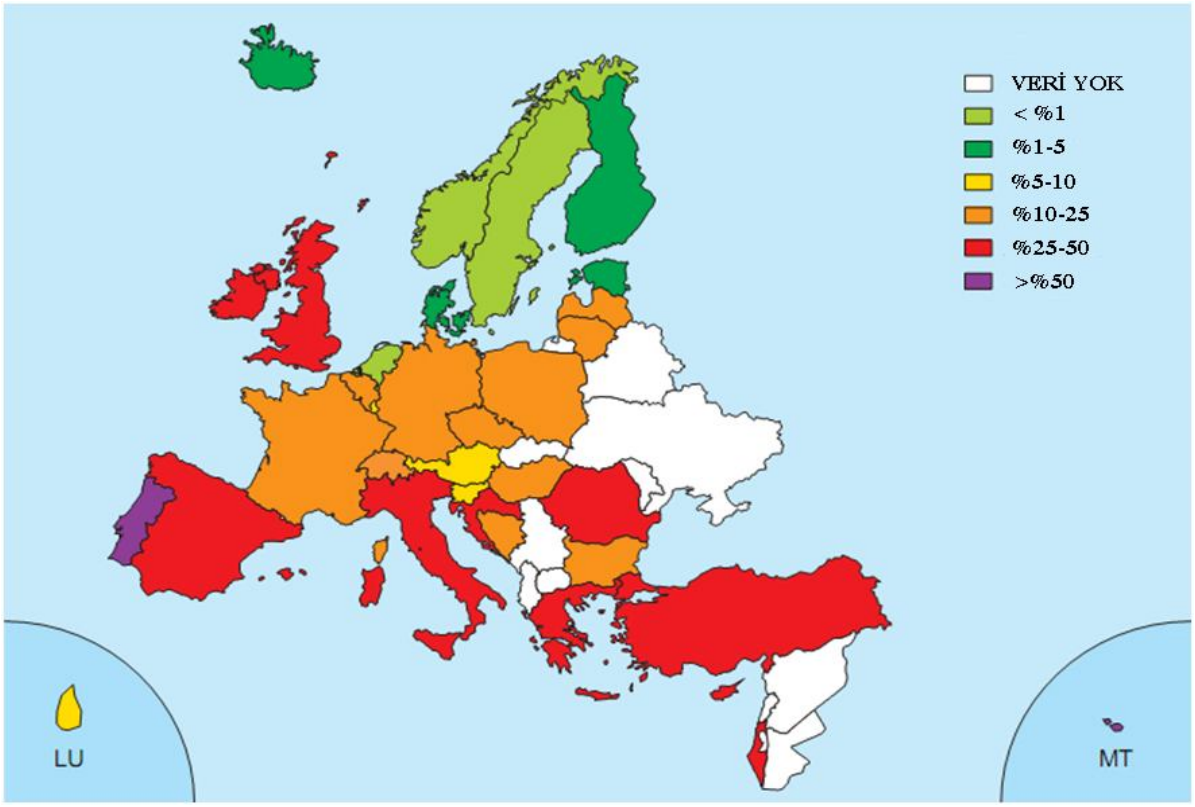
Şekilde penisilin, metisilin ve vankomisin antibiyotiklerine çeşitli organizmaların zaman içerisinde kazandığı direnç görünmektedir. Yukarıdan aşağıya uzanan oklar üzerinde antibiyotiğin kullanıma girdiği yıl ve direnç bildirilen yıl verilmiştir. Mavi renkteki eğriler adı geçen bakterinin rastlanma sıklığındaki artış ve azalışı göstermektedir (bağıl gösterim). Grafiğin en sağında bakterilerin kliniklerde kullanılan isimleri yer almaktadır.

Stafilokoklarda antibiyotik direnç genleri suşlar arasında değiş tokuş edilir ve antibiyotiğe dirençli birçok suş ortaya çıkar. Metisilin direnci, çoklu direncin bir göstergesi olarak kabul edilir. Çoklu direnç gösteren MRSA suşlarına bağlı enfeksiyonların artması nedeniyle, son 25 senedir glikopeptidler (vankomisin ve teikoplanin) stafilokokal hastane kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Ancak, 1990 yılında *S.*

aureus enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan glikopeptid antibiyotiklerdeki klinik başarısızlıklar ve 1997 yılında Japonya, ABD, Fransa, Hong Kong ve Kore'de vankomisine azalmış duyarlılık gösteren MRSA'nın (GISA/VISA izolatları) nın ortaya çıkması bilim dünyasını kaygılandırdı. GISA suşlarının glikopeptidlere azalmış hassasiyeti terapötik alternatifleri sınırladı. 2002 yılı Haziran ayında ise ABD'de ilk vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) izolatı bildirildi. Bu izolatın, VISA suşlarında olmayan, enterokoklara özgü vankomisin direnç geni *vanA* taşıdığı tespit edildi (16,30,43-52).

Staphylococcus aureus'un Hastane Enfeksiyonlarındaki Önemi

Hastane kaynaklı enfeksiyonların sağlık hizmetlerine etkisi üzerine birçok çalışma mortalite ve morbiditeyi arttırdığını, hastane ve yoğun bakım ünitesinde yatış süresini



Şekil 8. 2008 yılında hastalık etkeni olarak izole edilen *S. aureus* suşlarında MRSA oranı (52)

Şekilde Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (EARSS)'nin 2008 yılı raporundan alınan ve ülkeler bazında, bir yılda izole edilen *S. aureus* suşlarında MRSA oranını veren harita sunulmaktadır. Bu haritada oranlar yüzdelik dilimlerle verilmekte ve bu değerler harita üzerinde farklı renkler ile vurgulanmaktadır. Kırmızı renkle vurgulanmış Türkiye'de izole edilen *S. aureus* suşlarında MRSA oranı %25-50 dilimine denk gelmektedir.

uzattığını gösterir. Yatan hastalarda tıbbi girişimler, cerrahi müdahaleler ve protez uygulamalarının yaygınlığı özellikle hastane ortamında bulunan dirençli suşlarla enfeksiyon riskini arttırmaktadır. Hastanede uzun süreli yatış diyabet ve kanser gibi altta yatan hastalığın varlığı riski artıran diğer önemli faktörlerdendir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre hastanede yatan hastaların %15'inden fazlası hastane kaynaklı enfeksiyonlara maruz kalır. Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (EARSS)'nin 2008 yılı raporuna göre (Şekil 8) Türkiye'de hastalardan izole edilen *S. aureus* suşlarının metisilin direnç oranı %25-50'lik dilim içerisindedir (50,53,54).

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesinde 2008 yılında Karahocagil ve ark. tarafından yapılan çalışmada hastalarda tespit edilen hastane enfeksiyonlarından izole edilen mikroorganizmaların dağılımı Tablo 3'de verilmiştir. Buna göre *S. aureus* hastane enfeksiyonlarına yol açan izolatların %11'ini oluşturmuştur. Bu çalışmada ayrıca enfeksiyon ajanlarının anatomik dağılımı da çapraz incelenmiş (%48,2'si pnömoni, %19,6'si üriner sistem, %18,7'si cerrahi alan, %13,4'ü kan dolaşımı enfeksiyonu) ve *S. aureus*'un cerrahi alan enfeksiyonlarında %23,8 oranla *E. coli* ile birlikte birinci sırada, kan dolaşım enfeksiyonlarında %20 ile ikinci ve pnömonilerde %7,4 ile beşinci sırada yar aldığı bulunmuştur (51).

Tablo 3. Van 100. Yıl Üniversitesi Hastastanesinde 2008 yılında hastane enfeksiyonuna neden olan mikroorganizmaların dağılımı (51)

Mikroorganizma	Sayı (n=109)	%
Acinetobacter baumannii	26	23,8
Escherichia coli	22	20,2
Klebsiella pneumoniae	18	16,5
Pseudomonas aeruginosa	13	11,9
Staphylococcus aureus	12	11,0
Enterecoccus faecium	10	9,2
Staphylococcus epidermidis	6	5,5
Candida albicans	2	1,8

Tabloda Karahocagil ve ark.'ın çalışmasında izole edilen hastane enfeksiyon ajanlarının dağılımı gösterilmektedir. İkinci sütun hasta sayılarını ve son sütun yüzdelik oranları vermektedir. *S. aureus*'un %11,0 oranda hastane enfeksiyon ajanları arasında yer aldığı görülmektedir.

Hastane çalışanlarında da *S. aureus* kolonizasyonu hastane enfeksiyonu riskini arttıran önemli bir faktördür. Trakya Üniversitesi Eğitim Uygulama ve Araştırma Hastanesi'nde 2010 yılında riskli bölümlerde 180 personel üzerinde yapılan kolonizasyon incelemesinde denek

grubunun %19,44'ünde kolonizasyon saptanmıştır. Kolonize personel mesleklerine göre incelendiğinde farklı kolonizasyon oranlarına rastlanmıştır. Altı meslekten üçüne ait değerler Tablo 4'te verilmiştir. İzolatlarının %2,86'sı MRSA olarak bulunmuştur (49).

Tablo 4. Trakya Üniversitesi Hastanesinde 2010 yılında *S.aureus* kolonizasyonu ile ilgili veriler (49)

Denek grubunda *S. aureus* kolonizasyon oranı	%19.4
S.aureus izolatlarında MRSA oranı	%2.86
Kolonize personel içinde doktor oranı	%23.7
Kolonize personel içinde hemşire oranı	%12.5
Kolonize personel içinde temizlik personeli oranı	%31.2

Tabloda %19,4 olarak gösterilen izolatların MRSA pozitifliği ve izole edildiği deneklerin üç meslek grubu için dağılımı görülmektedir. Hemşirelerde rastlanan kolonizasyonun hekimlerin yarısı oranında olması bu personelin dikkatli çalıştığını, temizlik personelinde heşirelere göre 2,3 kat yükseklikte taşıyıcılık oranı saptanması bu personelin dikkatsiz çalıştığını düşündürmektedir.

Bu bilgilerin ışığında *S. aureus* enfeksiyonlarının hastane enfeksiyonlarında önemli olduğu, direnç sorununun bu önemi arttırdığı, diğer yandan hastane çalışanlarının hijyen kurallarına uygun çalışmasının direnç sorununu önemli oranda hafifletebileceği anlaşılmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarı ve ayrıca üniversitemizin Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji Bölüm Laboratuvarlarında yapıldı. Çalışmanın inokülasyon işlemleri aseptik çalışma koşullarında kabin ve ateş altında yapılmıştır. Çalışmada kullanılan tüm ayıraç formülleri EK-3'de verildi. Çalışma yöntemleri şu sırayla açıklandı: (a) Çalışma Materyali ve Bakteri Stoklama; (b) Agar ve Sıvı Besiyerinde Bakteri Kültürü; (c) Suşların Antibiyotiğe Maruziyeti (A/ Antibiyotiklerin Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun Belirlenmesi; B/ Ara Seyreltmeyle Hassas MİK Değerinin Belirlenmesi; C/ Bakteri Üremesini %20, %50 ve %80 Oranında İnhibe Edebilecek Antibiyotik; Ç/ Konsantrasyonlarının Grafik Üzerinde Araştırılması; D/ Antibiyotik Stresine Maruziyet Şartlarının Optimizasyonu ve Maruziyet Deneyi); (ç) Elektroforetiplendirme Çalışması (A/ Protein İzolasyonu; B/ Protein Konsantrasyon Tayini; C/ Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi); (d) Antibiyotiğe Karşı Stres Yanıtında Rol Alan İfade Ürünlerinin Elektroforetipik Analizi ve Elektroforetiplerin Proteom Evrenlerinin Tahmini.

ÇALIŞMA MATERYALİ VE BAKTERİ STOKLAMA

Bu çalışmada 7 adet *S. aureus* bakteri suşu incelenmiştir. Bunlardan standart suş ATCC® 29213 suşu olup İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Nezahat Gürler'den, üç adet MSSA suşu Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Murat Tuğrul'dan alınmıştır.

Diğer suşlar Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Bölümünde hastalardan izole edilmiştir. Standart suş transport besiyeriyle alınmıştır. Hastalardan izole edilen suşlar agar besiyerinde teslim alınmıştır. Agar besiyerindeki örnekler için buradaki tek koloniden örnek alınarak kanlı agar besiyerine pasajlanmış, stoklamak için saf kolonilerden 3-4 koloni alınarak bakteriler boncuklu tüpe aktarılmış ve -80^{0}C'de saklanmıştır. Burun izolatları boncuklu besiyerinden kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan suşlardan 3'ü metisilin dirençli ve 4'ü metisilin duyarlıdır (Tablo 5). Hastalardan izole edilen suşlar hakkında bilgiler ilgili laboratuvar ve hastane arşiv kayıtlarında bulunmaktadır (49).

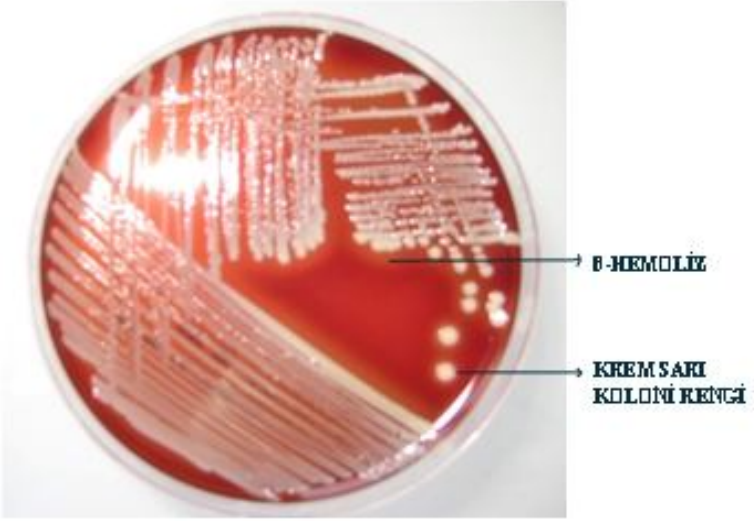
Tablo 5. Çalışmada kullanılan bakteri suşlarının özellikleri

Suşlar	İzolasyon yeri	Antibiyotik direnç durumu	Elde edilme şekli
ATCC® 29213	(Standart suş)	Metisilin duyarlı	Transport besiyeri
MSSA1	Burun sürüntüsü	Metisilin duyarlı	Boncuklu tüpler -80^{o}C
MSSA2	Burun sürüntüsü	Metisilin duyarlı	Boncuklu tüpler -80^{o}C
MSSA3	Burun sürüntüsü	Metisilin duyarlı	Boncuklu tüpler -80^{o}C
MRSA1	Burun sürüntüsü	Metisilin dirençli	Petriden izolasyon
MRSA2	Endotrakeal Aspirat	Metisilin dirençli	Petriden izolasyon
MRSA3	Burun sürüntüsü	Metisilin dirençli	Petriden izolasyon

AGAR VE SIVI BESİYERİNDE BAKTERİ KÜLTÜRÜ

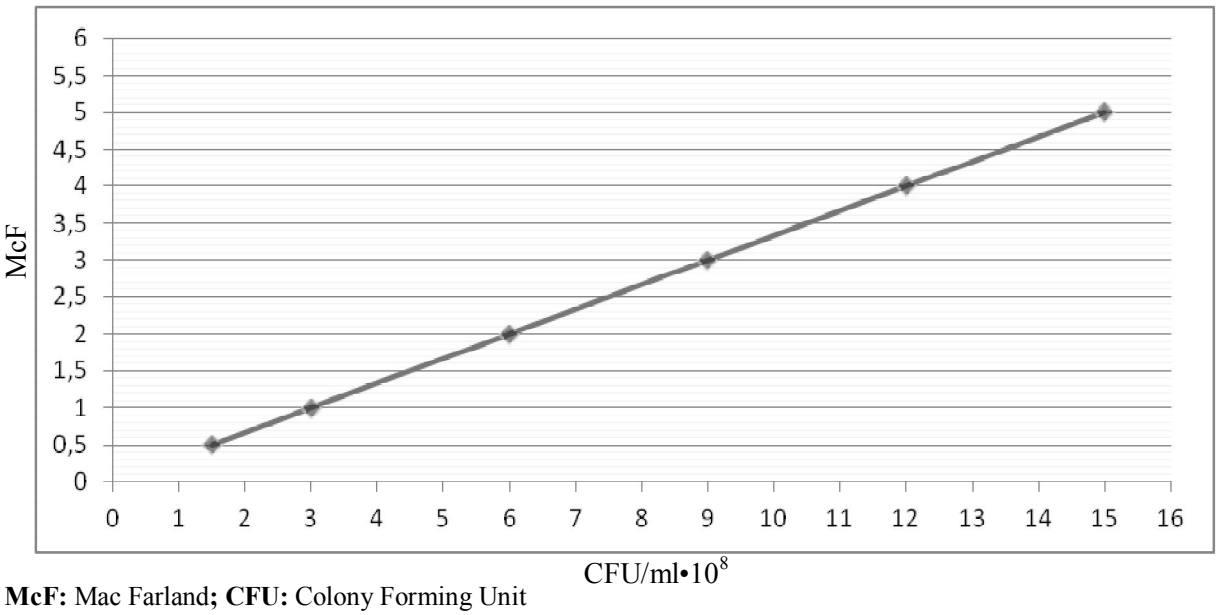
Bakteri kültür çalışmalarında pasaj işlemleri alev altında aseptik koşul sağlanarak ve eldiven kullanılarak; inokülasyon ve besiyeri tazeleme işlemleri tip II biyogüvenlik kabini altında alev kullanarak gerçekleştirildi. Pipet uçları, kültür tüpleri gibi tüm malzemeler otoklavda 121^{o}C'de 20 dk steril edilerek kullanıldı veya steril tek kullanımlık malzeme kullanıldı.

Boncuklu tüplerden bakteri kullanmak için iki boncuk 5 mL'lik BHIB besiyerine aktarıldı, vortekslendi ve 37^{o}C etüvde 4 saat inkübasyona bırakıldı. Üreyen bakteriler kanlı agar besiyerine pasajlandı. Bu maksatla sıvı besiyerindeki kültürden öze yardımıyla alınan bakterilerden koyun kanlı agar plak besiyerine çizgi ekim yapıldı, plaklar 37^{o}C etüvde bir gece inkübe edildi. Ertesi gün bakteri kolonisi hemoliz ve koloni morfolojisi yönünden değerlendirildi (Şekil 9) (49).



Şekil 9. Kanlı agarda üreyen standart suşun koloni yapısı
16 saat inkübasyon sonunda *S. aureus* suşları ß-hemoliz yaparak krem sarı renkte koloniler oluşturmaktadır.

Sıvı besiyerinde kültür yapmak için kanlı agardaki birkaç koloni alınarak serum fizyolojikte süspanse edildi ve bunun McFarland spektrofotometresinde yoğunluğu ölçüldü. Ölçümde absorbans değerinin 0,100-1,200 arasında elde edilmesi sağlandı, gereğinde seyreltidi. Ölçüm sonunda süspansiyonun yoğunluğunun 0,5 McF'a (10^8 CFU/ml) gelmesi



McF: Mac Farland**; CFU:** Colony Forming Unit

Şekil 10. McF değerinin CFU/mL değerine çevrimini sağlayan grafik (55)
Apsis ve ordinatta gösterilen değerler kaynakta belirtilen listeden alınarak bu grafik çizildi.

için gereken seyreltme miktarı bulundu ve bakteriler BHIB sıvı besiyerinde bu yoğunluğa getirildi. Ardından, kültür için arzu edilen nihai bakteri sayısına ulaşmak için gereken seyreltme oranı bulundu. McF cinsinden yoğunluğun CFU/mL sayısına çevrilmesi için Şekil 10'daki çevirim grafiği kullanıldı. Süspansiyon BHIB ile gerekli miktarda seyreltilerek 12 saat 37 ^{0}C'de durağan olarak çoğaltıldı. İnkübasyon sonrası bakteri yoğunluğu tekrar ölçülerek bakteri sayısı bulundu. Süspansiyonun kontaminasyon kontrolü için agar plağa yapılan ekim yapıldı ve kültür sonrası koloni yapısı incelendi (55).

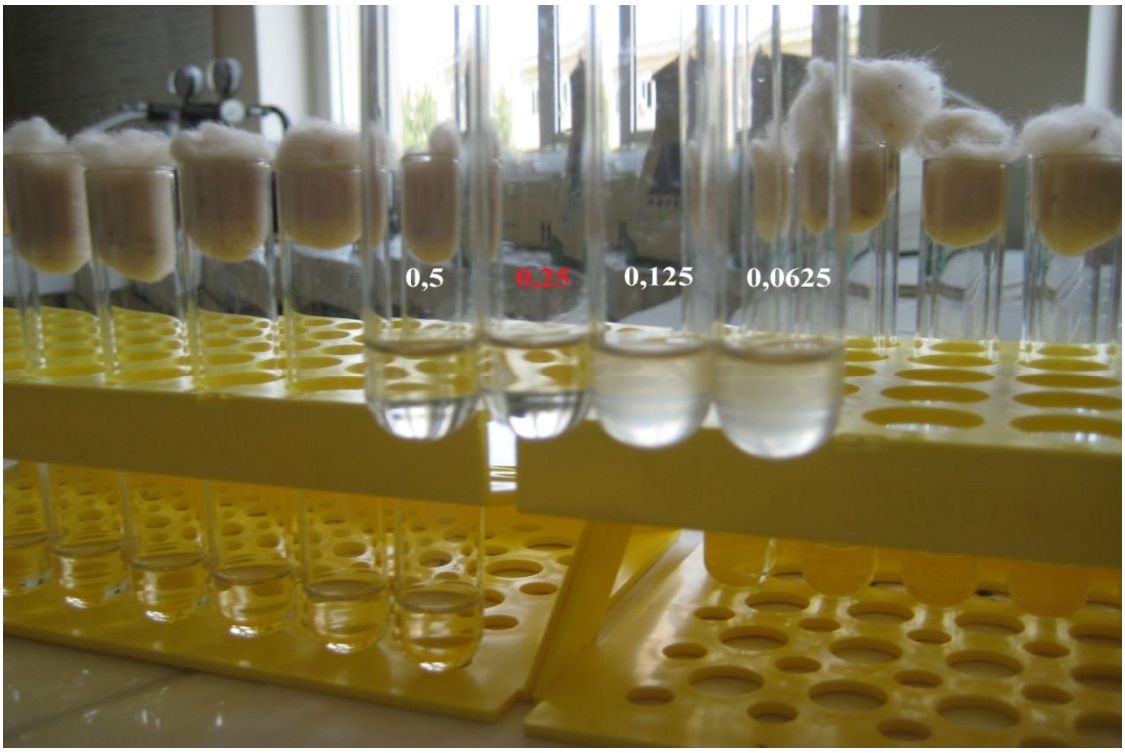
MİK deneylerinde sıvı besiyeri MHB besiyeri kullanılarak yapıldı. Bu deneylerde bakterilerin sayısı 10^6 CFU/ml'ye ayarlandı.

SUŞLARIN ANTİBİYOTİĞE MARUZİYETİ

Antibiyotiklerin Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun Belirlenmesi

MİK deneyinde antibiyotik çözeltisi ve bakteri süspansiyonu ayrı ayrı hazırlanarak bunlar çapraz kültür edildi. Bu maksatla, önce stok antibiyotik çözeltisi hazırlamak için toz oksasilin (Sigma, Almanya) ve vankomisin (Hospira, UK) antibiyotikleri ayrı ayrı suda 1024 µg/mL konsantrasyonunda çözüldü ve 0,22 µm'lik steril filtreden geçirildi. Tüm antibiyotik çözeltileri deney öncesi taze hazırlandı.

Çapraz karıştırma işlemi standart suş için hem standart yöntem olan tüplerde seri seyreltme ile hem de 24 kuyucuklu steril plastik plaklarda seri seyreltme ile yapıldı. Tüplerle yapılan deneyde ilk tüpten sonraki tüplere 1 mL MHB eklendi. Geri kalan 13 tüpe 1'er ml MHB eklendi. Stok antibiyotik çözeltisinden ikinci tüpe 1 mL eklendi ve bundan sonra 1/2 seri seyreltme son tüpe kadar yapıldı, son tüpten alınan 1 mL atıldı. Birinci boş tüpe ise 1 mL antibiyotik eklendi. Bu şekilde tüplerde 1024 µg/mL'den başlayıp 0,125 µg/mL'ye kadar seri antibiyotik konsantrasyonu elde edildi. Bundan sonra tüm tüplere 10^6CFU/ml bakteri süspansiyonundan 1'er mL eklendi. Sonuçta 14 tüpte hem antibiyotik konsantrasyonu yarı yarıya seyreldi hem de her birinde $5X10^5$ CFU/mL sayıda bakteri yer aldı. Deneye Şekil 12'de bildirilen kontroller de dahil edildi. Tüm tüpler 18-24 saat 37 ^{0}C'de durağan olarak inkübasyona kaldırıldı. Ertesi gün üreme inhibisyonunun son olarak gözlendiği tüpteki antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak tespit edildi (Şekil 11) (55).



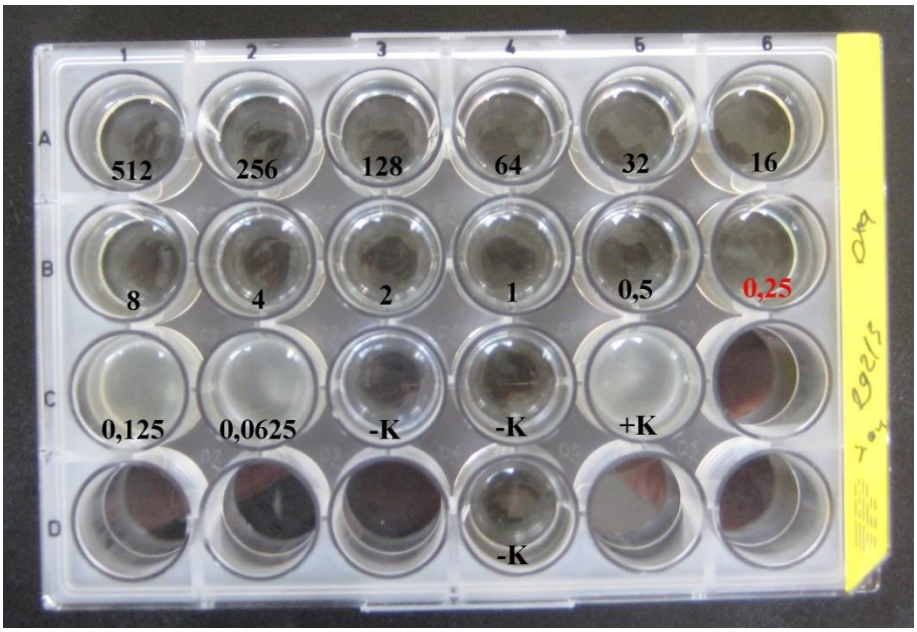
Şekil 11. Oksasilin MİK deneyinde MİK değerinin saptanması

Şekilde dört nihai antibiyotik konsantrasyonunun tüpü öne alınmış ve fotoğraf öyle çekildi. Burada görüldüğü gibi standart suş için üremenin son engellendiği tüp 0,25 µg/ml oksasilin içeren ve üzerinde kırmızı rakam olan tüptür, sonraki 0,125 µg/ml tüpte ve sonraki tüplerde üreme görülmektedir. Tüpler üzerindeki sayılar antibiyotik konsantrasyonunu belirtmektedir ve birimi µg/ml'dir.

24 kuyucuklu plakta yapılan deneyde yukarıdaki çapraz karşılaştırma ve seri seyreltme oranlarının aynısı uygulandı. Ertesi gün üreme inhibisyonunun son olarak gözlendiği kuyucuktaki antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak tespit edildi. İlgili tüplerin optik yoğunluğunu ölçmek üzere 200 µL numuneler 96 çukurlu U dip ELISA plaklara aktarıldı ve mikro okuyucuda 600 nm'de optik yoğunluk ölçüldü.

Ara Seyreltmeyle Hassas MİK Değerinin Belirlenmesi

Standart suşun MİK değerinin hassasiyetinin arttırılması için ara seyreltme testi tüplerde yapıldı. Bunun için standart yöntemle saptanan MİK değerinin iki üstündeki ve iki altındaki değerler arasında MİK deneyi yapıldı. Antibiyotik konsantrasyon seyreltmesi 4/5 oranında olmak üzere diğer manipülasyonlar standart MİK deneyindeki gibi yapıldı. Ayrıntı



Sayılar (siyah-kırmızı): Antibiyotik konsantrasyonları (µg/ml); **Kısaltmalar: +K:** pozitif kontrol kuyucuğu; **-K:** negatif kontrol kuyucuğu

Şekil 12. Oksasilin MİK deneyinde MİK değerinin 24 kuyucuklu plakta saptanması

A1 kuyucuğundan başlayıp A2 ile devam eden seri seyreltildi oksasilin konsantrasyonları C2'de son buldu. Bu kuyucuklara bakteri süspansiyonu eklendi. C5 kuyucuğuna antibiyotik içermeyen serum fizyolojik üzerine bakteri süspansiyonu eklendi. C3 kuyucuğunda sadece antibiyotik, C4 ve D4 kuyucuklarında sadece besiyeri bulunmaktadır. İlk 14 kuyucuk üzerindeki sayılar antibiyotik konsantrasyonunu belirtmektedir ve birimi µg/ml'dir. Burada görüldüğü gibi üremenin son engellendiği kuyucuk 0,5 µg/ml oksasilin içeren ve üzerinde kırmızı rakam olan kuyucuktur, sonraki 0,125 µg/ml kuyucukta ve sonrakilerde üreme görülmektedir.

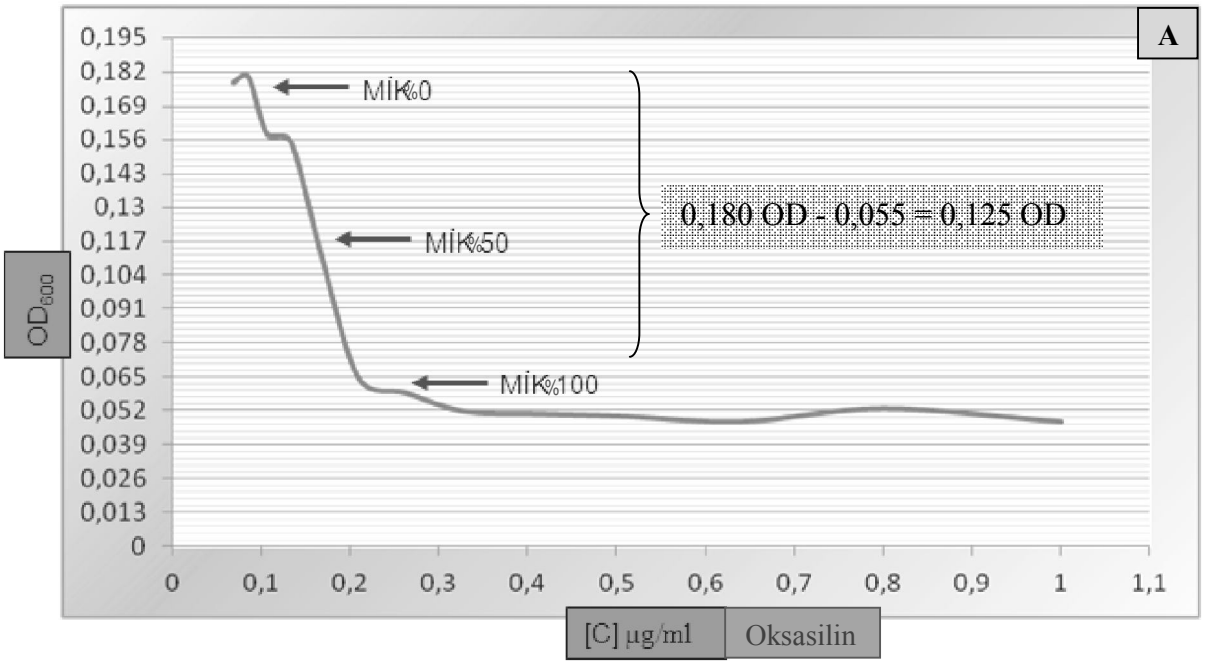
şöyledir: Seyreltme için ilk tüpe 0,75 mL antibiyotik, ilk tüpten sonraki tüpe 0,75 mL MHB üzerine 3 mL antibiyotik solüsyonu eklendi. Her seferinde tüpten 3 mL besiyeri-antibiyotik çözeltisi alınarak yandaki tüpe aktarıldı. Vankomisin seyreltmeleri 4/5 oranlı ve 7 basamaklı nihai 2µg/mL ile 0,524µg/mL arasında; oksasilin seyreltmeleri 4/5 oranlı ve 13 basamaklı nihai 1 µg/mL ile 0,068µg/mL arasında yapıldı. Buna göre tüpler içinde vankomisin için 2, 1,6, 1,28, 1,024, 0,819, 0,665, 0,524 µg/mL; oksasilin için 1, 0,8, 0,64, 0,512, 0,41, 0,327, 0,262, 0,209, 0,167, 0,133, 0,106, 0,085, 0,068 µg/mL nihai konsantrasyonlar oluşturuldu. Tüplere eklenen eş hacimli ve nihai $5X10^5$ CFU/mL yoğunlukta bakteri süspansiyonu 20-24 saat inkübe edildi. Ertesi gün üreme inhibisyonunun son olarak gözlendiği tüpteki antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak tespit edildi. Süspansiyonlardan alınan 200 µL numuneler 96 çukurlu U dip ELISA plaklara aktarıldı ve mikro okuyucuda 600 nm'de optik yoğunluğu ölçüldü (55).

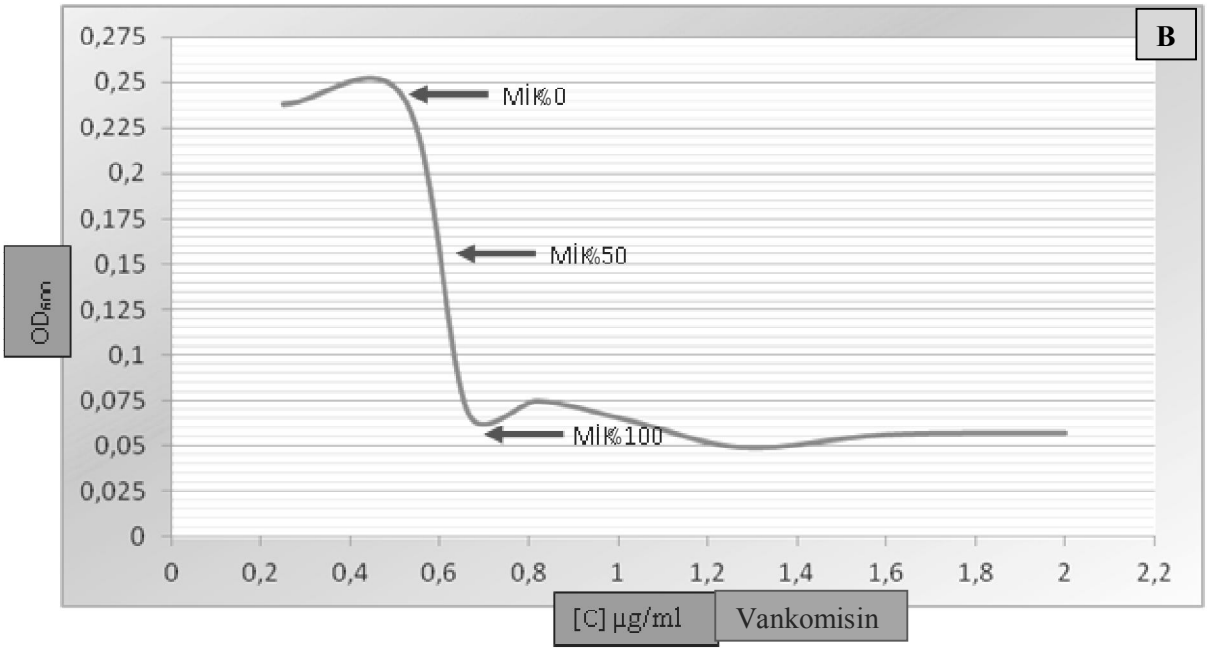
Bakteri Üremesini %20, %50 ve %80 Oranında İnhibe Edebilecek Antibiyotik Konsantrasyonlarının Grafik Üzerinde Araştırılması

Bakterinin antibiyotiğe yanıt vermesi ve kullandığımız teknik ile bir yanıt saptanması arasında fark olup olmadığını anlamak için bakterinin antibiyotikten etkilenme grafiği oluşturuldu. Bu maksatla hassas MİK değerinin optik yoğunluk değeri ordinata ve deneyde kullanılan antibiyotik konsantrasyonları apsise konarak bir grafik çizildi. Bir plato ile sonuçlanan lineer bir eğri elde edildi. Platonun başladığı değer üremenin durduğu %100 MİK değeri olarak kabul edildi ve MİK%100 olarak işaretlendi. Antibiyotik bulunmayan tüpteki optik değer üremenin % 0 inhibe olduğu değer kabul edildi ve MİK%0 dendi. İki optik değer arasındaki fark üremenin %0 ile %100 arasındaki dağılımını içeren eğriyi belirledi. Farkın yarısı MİK%100'e karşı gelen optik yoğunluğa eklenerek üremenin % 50 inhibe olduğu antibiyotik konsantrasyonu apsisten bulundu ve MİK%50 olarak işaretlendi. Hesaplama, Şekil 13'de örneği verildiği gibi okasilin için şu şekilde yapıldı: MİK%100 =0,180 OD ile MİK%0 =0,055 arasındaki fark 0,125 OD olarak bulundu. MİK%50 için bu değerin yarısı alınarak (0,125/2)+0,055 =0,1225 OD değeri bulundu ve karşılığında 0,16 µg/ml antibiyotik konsantrasyonu elde edildi. Benzer oranlama ile üremenin % 20 ve % 80 inhibe olduğu optik yoğunluklar ve bunlara karşı gelen antibiyotik konsantrasyonları belirlendi. Bunlarda, MİK%80 için (0,125/5) + 0,055 ve MİK%20 için (0,125/5) 4 + 0,055 formülleri kullanılarak hesaplamalar yapıldı.

Antibiyotik Stresine Maruziyet Şartlarının Optimizasyonu ve Maruziyet Deneyi

Bakterilerin strese yanıt verdiğini saptayacağımız deney koşulunu bulmak üzere antibiyotiklerin konsantrasyon ve maruziyet süresi optimize edildi. Bu maksatla satandart suş kullanılarak aşağıda açıklanan dört deney yapıldı ve her deney sonrası yanıtlar elektroforetiplendirildi. Bu deneylerde kullanılan kontrol tüplerine antibiyotik eklenmedi. Her deneyin kontaminasyon kontrolü için hem besiyeri değişimi hem de protein izolasyon öncesi bakterilerden agar ve sıvı besiyerine ekim yapıldı.





Şekil 13. Oksasilin ve Vankomisin için üremeyi %20, %50 ve %80 oranında inhibe eden konsantrasyonu saptama grafiği.

Üstteki A grafiği Oksasilin ve altındaki B grafiği Vankomisn için çizildi Üreme sonrası ölçülen optik yoğunluklar apsise, antibiyotik konsantrasyonları ordinata yazılarak Excel programında grafik çizildi. Kırmızı oklarla gösterilen noktalar oksasilin için MİK%0, MİK%50 ve MİK%100 değerlerini verdi. MIK%100 ile MIK%0 arasındaki optik yoğunluk farkı üstteki A grafiğinde görece koyu renk kutu içinde hesaplandı.

1. deneyde, bakterilerin farklı antibiyotiklerin farklı konsantrasyonlarına farklı sürelerde maruz kalması çapraz karşılaştırıldı: Bunun için, 10^5 CFU/ml yoğunlukta standart suş bir gece 37 ^{0}C'de inkübe edildi. Ertesi gün bakteri sayısı bulundu ve besiyeri değiştirilerek bakteriler ayrı ayrı 1/27 MİK, 1/67,5 MİK ve 1/108 MİK oksasilin veya vankomisin konsantrasyonlarına ayrı ayrı 40 dk, 2 sa, 7 sa ve 24 sa süreyle 37 ^{0}C'de maruz bırakıldı.

2. deneyde, bakterilerin farklı antibiyotiklere maruz kalması çapraz karşılaştırıldı: Bunun için, 10^7 CFU/ml yoğunlukta standart suş bir gece 37 ^{0}C'de 1/60 MİK değerinde vankomisin veya oksasilin konsantrasyonuna 18 sa maruz bırakıldı.

3. deneyde, bakterilerin farklı antibiyotiklere farklı sürelerde maruz kalması çapraz karşılaştırıldı: Bunun için, $2X10^5$ CFU/ml yoğunlukta standart suş bir gece 37 ^{0}C'de inkübe edildi. Ertesi gün bakteri sayısı bulundu ve besiyeri değiştirilerek bakteriler 1/180 MİK değerinde vankomisin veya oksasilin konsantrasyonuna ayrı ayrı 5 dk, 2 sa, 7 sa ve 24 sa süreyle 37 ^{0}C'de maruz bırakıldı.

4. deneyde, bakterilerin farklı antibiyotiklerin 1MİK konsantrasyonuna farklı sürelerde maruz kalması çapraz karşılaştırıldı: Bunun için, $5X10^5$ CFU/ml yoğunlukta standart suş 12 saat 37 ^{0}C'de inkübe edildi. Ertesi gün bakteri sayısı bulundu ve besiyeri değiştirilerek bakteriler 1 MİK değerde oksasilin veya vankomisin konsantrasyonlarına ayrı ayrı 5dk, 2 sa, 7 sa, 24 sa, 3 gün, 6 gün ve 9 gün süreyle 37 ^{0}C'de maruz bırakıldı (56).

Dört optimizasyon deneyinde kullanılan değişkenler toplu halde Tablo 6'da verildi.

Tablo 6. Optimizasyon çalışmalarında uygulanan stres koşulları

DN	Bakteri sayısı (CFU/ml)	Antibiyotik konsantrasyonu	İnkübasyon
1	$2,7X10^9$	▪ 1/27-1/108 MİK Oksasilin ▪ 1/27-1/108 MİK Vankomisin	40 dk, 2 sa, 7 sa, 24 sa
2	$1,2X10^9$	▪ 1/60 MİK Oksasilin ▪ 1/60 MİK Vankomisin	18 sa
3	$2,7X10^9$	▪ 1/180 MİK Oksasilin ▪ 1/180 MİK Vankomisin	5 dk, 2 sa, 7 sa, 24 sa
4	$2,7X10^9$	▪ 1 MİK Oksasilin ▪ 1 MİK Vankomisin	5 dk, 2 sa, 7 sa, 24 sa, 3 gün, 6 gün, 9 gün

DN: Deney numarası; **dk:** dakika; **sa:** saat; **CFU/ml:** colony forming unit/mililitre

Yukarıda açıklanan optimizasyon çalışmalarının sonucunda optimum saptanabilir antibiyotik stres koşulu saptandı ve tüm suşlar optimum maruziyet şartlarında deneye alındı. Buna göre, suşlar nihai $5X10^5$ CFU/ml yoğunlukta 10 ml sıvı BHIB içinde 12 saat 37 ^{0}C'de çoğaltıldı. Tüplerin kontaminasyon kontrolü için ertesi gün koloni yapısını incelemek üzere agar plağa bunlardan ekim yapıldı. Sıvı besiyerindeki çoğalma sonrası bakteri üremeleri McF bulanıklık testiyle ölçüldü ve Şekil 10'daki eğriden yararlanılarak militredeki bakteri sayısı bulundu (Tablo 7). Bakteriler taze besiyerinde aynı hacimde süspanse edildi. Bakteri süspansiyonuna 1 MIK konsantrasyonunu sağlayan oksasilin (Sigma, Almanya) veya vankomisin (Hospira, UK) miktarını bulmak için, minimum inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesi deneyinde saptanan antibiyotik miktarı orantılandı ve bu miktarlar süspansiyonlara ilave edildi (Tablo 7). Oksasilin dirençli suşlara standart suş için elde edilen oksasilinin 1 MİK değerinin 10 katı antibiyotik eklendi. Bakteriler 5 sa veya 24 sa antibiyotiğe maruz bırakıldı. 24 saatlik tüplerin besiyeri 12'nci saatte tazelendi. Kontrol tüplerine antibiyotik eklenmedi. İnkübasyonlar

Tablo 7. 12 saat kültür sonrası besiyerinde McF bulanıklığı, bakteri sayıları ve deneyde kullanılan antibiyotik miktarları

Suşlar		29213	MSSA1	MSSA2	MSSA3	MRSA1	MRSA2	MRSA3
McF		8,85	9,9	8,1	10,5	10,5	10,05	8,85
CFU•10^8		26,55	29,7	24,3	31,5	31,5	30,15	26,55
10 mL kültür için	Oksasilin (µg)	8867,7	14850	63000	12150	105210	100701	88677
	Vankomisin (µg)	27187,2	22869	48510	37422	97020	46431	40887

Tabloda dikkat edilirse oksasiline dirençli MRSA1, MRSA2, MRSA3 için kullanılan antibiyotik miktarları standart suş için kullanılan oksasilin miktarının 10 katı düzeyindedir.

bittiğinde her tüpteki canlı bakteri varlığı sıvı besiyerine ve saflığı katı besiyerlerine ekim ile takip edildi ve yanıtlar elektroforetiplendirildi (56,57).

ELEKTROFORETİPLENDİRME ÇALIŞMASI

Protein çalışmalarında tüm tüp ve pipet ucu gibi proteinlerle temas eden malzemeler otoklavlanarak ve cam malzemeler Pasteur fırınında sterilize edilerek kullanıldı.

Protein İzolasyonu

Antibiyotiğe maruz kalan ve kalmayan bakterilerin hücre duvar protein izolasyonu için sıvı besiyerinde kültür sonrası bakteriler 4^{o}C'da 2000 g'de 30 dk santrifüj edildi, üst sıvı atıldı, çökelti nihai %0,05 NaN_3 içeren soğuk PBS ile ve vorteks yardımıyla homojenize edilerek ependorf tüpe aktarıldı ve 10000 g'de 1 dk santrifügasyonlarla 3 kez yıkandı. 5 dk antibiyotiğe maruz kalan tüpler ise PBS ile yıkama öncesi maruziyetin hemen ardından soğuk PBS ile 4 kat seyreltildi. Çökelti, 8-10 µl/ml proteaz inhibitör kokteyli içeren PBS içinde dağıtılarak -80^{o}C soğutucuya stoklandı. İzolasyon için örnek üzerine 0,5 mL soğuk aseton eklendi, süspansiyon buz üzerinde 5 dk bekletildi, santrifügasyon sonrası üst sıvı uzaklaştırıldı, çökelti üzerine hacminin iki katı ekstraktör eklendi, 5 dk 100 ^{o}C'de kaynatıldı, 10000 g'de 5 dk santrifüj edilerek üst sıvı toplandı, örnek gereğinde -20 ^{0}C'de saklandı.

Stoplazmik protein izolasyonu için yukarıda açıklandığı gibi çöktürülen ve açıklanan bakteriler üzerine çökelti hacminin iki katı kadar %5 tween 80 içeren TRIS tamponu-pH 7,4 veya PBS 1:2 oranda eklendi, örnek buz içinde iken 200 W 20 kHz ultrasonik homojenizatör kullanılarak üç kez ve her defasında 1dk % 36-37 güç uygulama ile sonifikasyon yapıldı, örnek 2000 g'de 10 dk santrifüj edilerek üst sıvı toplandı, gereğinde örnek -20 ^{0}C'de saklandı (57,59,60).

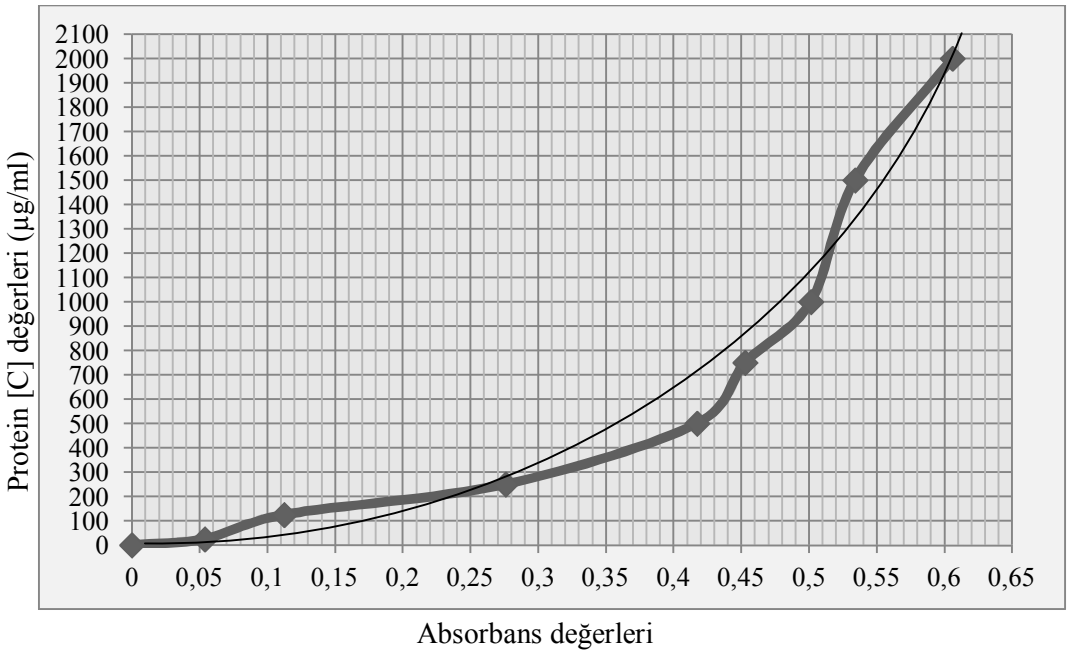
Protein Konsantrasyon Tayini

Bradford yöntemiyle yapılacak tayinde önce kalibratör serisi Bovin Serum Albümin (BSA) hazırlandı (Tablo 8). Seriyi hazırlamak için önce 2 mg/ml taze stok çözelti PBS içerisinde hazırlandı. Bunun için kalibratör serisinin tüplerine stoktan sırasıyla 300 µL, 375 µL ve devamı Tablo 8'de gözüken hacimler eklendi. Bunların üzerine sırasıyla 0 µL, 125 µL ve devamı Tablo 8'de gözüken PBS hacimleri eklendi. Böylece, nihai konsantrasyonları sırasıyla 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25, 0 µg/µL olan BSA kalibratörler elde edildi. Bu kalibratörler ve örneklerden 10 µL 96'lık mikroplak kuyucuklarına nakledildi ve üzerine 200 µL Bradford boyası eklendi, 30 sn üç boyutlu çalkalayıcıda çalkalandı ve sabit plak oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Protein içeren örneklerin kuyucuklarda kahverenginden maviye renk değişimi gözlendi. Mikrospektrofotometrede 595 nm dalga boyunda kuyucuklardaki absorbans değerleri ölçüldü. İçinde protein bulunmayan çukurcuğun absorbans değeri tüm örneklerin absorbans değerlerinden çıkarıldı. Kalibratör değerleriyle bir eğri çizildi (Şekil 14). Örneğin konsantrasyonunu bulmak için, kalibratör eğrisi üzerinde

Tablo 8. BSA kalibratörlerinin hazırlanması

PBS (µL)	Stok BSA (2000 µg/mL)	Nihai Konsantrasyon (µg/µL)
0	300 µL	2000
125	375 µL	1500
325	375 µL	1000
175	B'den 175 µL	750
325	C'den 325µL	500
325	E'den 325 µL	250
325	F'den 325 µL	125
400	G'den 100 µL	25
400	0	0

Birinci ve ikinci sütunda gösterilen PBS ve BSA stok hacimleri karıştırıldığında son sütunda görülen kalibratör serisi elde edildi.



Şekil 14. Bradford standart değerler eğrisi

Apsise örneklerin blank sonrası absorbans değerleri, ordinata BSA kalibratör konsantrasyonları gelecek şekilde Excel programıyla eğri çizildi. Eğri düzeltmesi, Office Word programındaki şekillerden eğri seçeneği kullanılarak yapıldı (ince çizgi).

absorbans değerine karşı gelen konsantrasyon bulundu (63).

Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi

İzole edilen bakteri hücre duvar proteinlerinin elektroforetiplendirilmesi için SDS-PAGE ile inceleme yapıldı. İzolatların yüklenmesi için bir yükleme planı oluşturuldu ve en az bir çukur moleküler ağırlık kontrolü için ayrıldı. Örnekler 1 dk 8000 g'de santrifüj edildi ve üst sıvı toplandı. Örneklerin protein konsantrasyonları saptandı. Yükleme öncesi protein ekstraktı örnek tampon ile 5 dk su banyosunda kaynatılarak denatüre edildi. Tüm örnekler yükleme için buzda beklemeye alındı. Örneklerin yükleneceği jel kuyu hacimleri tarak dişlerinden faydalanarak hesaplandı ve en fazla 3/4'ü dolacak şekilde yükleme örnekleri hazırlandı. Bunun için ayrı her bir ependorf tüpe 10 µg protein düşecek örnek eklendi ve üzeri takip boyasıyla tamamlandı. Bakteri hücre duvar protein ekstraktı yarı hacimde örnek tamponu ile karıştırılacak hacimde ayarlandı.

Slab gel elektroforez jel camı alkolle temizlendi ve çerçeve bantlarıyla mesafe 1,5 mm sabitlenerek kasete yerleştirildi. Kaset jel polimerleştirme düzeneğine yerleştirildi. Jellerin oluşturulmasında Laemmli metodu modifiye edilerek uygulandı. Hazırlanan %10-12,5'lik taze ayırma jel eriyiği camlar arasına hava kabarcığı oluşmamasına özen gösterilerek ve camların üst sınırına 15 mm mesafe kalana dek döküldü. Yüzeyin düzleşmesi için 1 ml izopropil alkol eklendi. Polimerleşmenin takibi için çözelti cam tüpe eklendi ve tüp eğri pozisyonda bekletildi. Polimerizasyonun 15-20 dk'da gerçekleşmesi ardından izopropil alkol ortamdan uzaklaştırıldı, hazırlanan %4'lük yığma jel eriyiği ayırma jelinin üzerine doldurulduu, içine tarak yerleştirildi ve polimerleşme yine eğri tüpte takip edildi. Polimerleşmenin ardından kaset düzenekten çıkarılarak elektroforez tankına yerleştirildi. Üst hazneden alt hazneye kaçak olup olmadığı distile su kullanılarak test edildi (60).

Elektroforez için TRIS tampon sistemi kullanıldığında, tampon her iki hazneye; borat tampon sistemi kullanıldığında üst tampon üst hazneye ve alt tampon alt hazneye eklendi. Jel tarağı dikkatlice çıkartıldı, cihaz 10 dk boşta 25mA, 100 V değerleriyle çalıştırıldı. Ardından yükleme yapılarak elektroforez aynı elektrik değerleriyle başlatıldı. Optimizasyonun 1., 2. ve 3. deneyleri borat tampon sistemi ile, optimizasyonun 4. deneyi ve stres yanıt ifade ürünlerinin elektroforetiplendirilmesi TRIS tampon sistemi ile yürütüldü (61).

Proteinler ayırma jeline 15-20 dakikada erişti, bundan sonra voltaj 150 V'a arttırıldı. Boyanın elektroforez camlarının alt sınırına 10 mm yaklaşana kadar elektroforeze devam edildi ve bu süre boyunca akımın sabit kalmasının takibi yapıldı. Elektrik kesilerek elektroforeze son verildi. Hızla jel kaseti elektroforez tankından çıkarıldı, camlar kasetten ayrıldı, küçük cam elle dikkatlice jelden ayrıldı, büyük cam ve jel arasına 1000 µL'lik pipet

marifetiyle boya ve hava vererek jel camdan ayrıldı, jel %25 metanol, %10 asetik asit ve %0.005 Brom Fenol Mavisi içeren taze fiksasyon boyasına aktarıldı. İki boyutlu çalkalayıcıda 30 rpm'de jeller gece boyu boyanmaya bırakıldı. Jelden boya çıkarma işleminde %35 metanol ve %10 asetik asit içeren boya giderici banyo kullanıldı ve işlem 2 saat arayla tazelendi.

Jellerin beyaz ışıklı görüntüleme kutusunda fotağrafları çekildi. Moleküler ağırlık kontrollerinin jel üzerindeki yerinden yararlanılarak cetvel oluşturuldu ve bantların ağırlıkları bu cetveller ve büyüteç kullanılarak saptandı. Kurutmak için jeller iki selofan tabaka arasında %10 gliserol içeren asetik asitli suda 15 dk bekletildi, ardından cam plak üzerinde selofanlar gerilerek arada kalan jel 36 saat oda sıcaklığında kurutuldu. Jeller laboratuvar defterinde gereğinde tekrar incelenmek üzere muhafaza edildi (60).

ANTİBİYOTİĞE KARŞI STRES YANITINDA ROL ALAN İFADE ÜRÜNLERİNİN ELEKTROFORETİPİK ANALİZİ VE ELEKTROFORETİPLERİN PROTEOM EVRENLERİNİN TAHMİNİ

Her deneydeki her örneğin yapılan elektroforezinden birbirinden farklı ve suşa has elektroforetip profilleri elde edildi. Öncelikle standart suşlara ait ve antibiyotik içermeyen kontrol örneklerinin bantları deneyler arasında karşılaştırmalı ve manuel olarak incelendi. İncelemede standart suşa özgü profil bulundu ve varsa farklılıklar ortaya kondu. Daha sonra standart suşun değişik konsantrasyonlarda ve sürelerde antibiyotiklere maruziyeti sonucu elde edilen stres yanıtı bantları ortaya kondu. Daha sonra da tüm çalışma materyalleri için aynı incelemeler yapıldı, profiller arası benzerlikler ve farklar, keza bunların strese yanıt sonucu değişimleri karşılaştırmalı ortaya kondu, mega analiz ile strese yanıtta ortak davranan bantlar bulundu.

Expasy veb serverin UniProt veri bankasından anahtar kelime olarak "*S. aureus* cell wall associated protein" kelime grubu kullanılarak uzaktan kumanda ile arama yapıldı. *S. aureus*'un duvarına ilişkin 326 proteinin gen isimleri, veri bankasına ait erişim numaraları, suş adı ve aminoasit uzunluklarını içeren bir liste elde edildi. Aynı genin veri bankasında çoklu girişleri bulunduğundan listede aynı protein için tekrarlar olduğu görüldü ve bunlardan biri rastgele seçilerek diğerleri dışlandı. Elektroforetiplendirme çözünürlük aralığımız 16-145 kDa arasında olduğundan buna karşılık gelen 118-1385 aminoasit aralığı dışındaki proteinler dışlandı. Listede bulunan 11 sitoplazmik protein listeden çıkarıldı. Listedeki proteinlerin aminoasit uzunlukları 0,11 ile çarpılarak denk gelen kDa elde edildi ve bu bilgi listeye

eklendi. Proteinler, çalışmamızda bulunan bantlarla +/-5 kDa yakınlıkta olmalarına göre eşleştirildi. Çalışmadaki herhangi bir bantla eşleşmeyenler dışlandı. Sonuçta incelemeye alınacak bir proteom evreni elde edildi (62).

Proteom evrenindeki proteinlerin strese yanıt elektroforetipledirilmesi sonucu elde edilen bantlar ile eşleşmeleri analiz edildi, antibiyotik stresine yanıtta ifade edilen proteinleri içeren proteom havuzu elde edildi. Strese yanıt ile proteom havuzundaki proteinlerin karşılaştırmalı değerlendirmesi manuel olarak yapıldı. Ayrıca, tüm denek grubundaki ortaklıkları inceleyen mega analiz yaklaşımı da kullanıldı. Proteinlerin UniProt veri bankasından işlevleri bulundu, kullanılan proteom evrenlerinin işlevlerine göre kendi içlerinde % dağılımı çıkarıldı (62).

BULGULAR

Çalışmadaki bulgular aşağıdaki sıra ile verilmiştir: (a) Çalışma Materyallerinin Kalite Kontrol Sonucu; (b) Minimum İnhibitör Konsantrasyon Sonuçları; (c) Bakteri Üremesini Düşük Oranında İnhibe Edebilecek Antibiyotik Konsantrasyonlarının Dar Bir Aralıkta Yer Aldığının Saptanması; (ç) Protein Çalışma Sonuçları; (d) Antibiyotiğe Karşı Stres Yanıt İfadesinin Saptanması İçin Yapılan Optimizasyon Çalışmasının Sonucu; (e) Trakya Bölgesinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus*'un Antibiyotiğe Karşı Stres Yanıt İfade Elektroforetipleri; (f) Elektroforetiplerin Proteom Evrenleri.

ÇALIŞMA MATERYALLERİNİN KALİTE KONTROL SONUCU

Çalışma materyallerin kanlı agarda üç morfolojik kriter ve bir kimyasal kriter kullanılarak incelendi. Koloni renginin krem sarı ve parlak olması, koloni çaplarının ve dağılımlarının benzerliği morfolojik kriterlerimizdir. Kimyasal açıdan da ß-hemoliz görmemiz bir diğer kriter oldu. Buna göre tüm suşlar ayrı ayrı incelendiğinde hepsinin ilk ekildiğinden deney sonuna kadar saf *S. aureus* bakterileri olduğu saptandı.

MİNİMUM İNHİBİTÖR KONSANTRASYON SONUÇLARI

Antibiyotiklerin Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Standart yöntemle yapılan MİK deneyinin sonuçları ve standart suş için yapılan ara dilüyonla hassas sonuçlar Tablo 9'da verilmiştir. Görüldüğü gibi vankomisin MİK değerleri suşlar hassas olduğu halde oksasilin konsantrasyonundan genelde yüksek çıkmıştır. Metisilin dirençli suşlarda ise MİK değeri iki suşta duyarlıların 2000 katı kadar yüksek düzeye çıkmış, bir suşta 15 katı civarında bir yükseklik görülmüştür.

Tablo 9. Standart yöntemle belirlenen MİK ve ara dilüsyon sonuçları

	MİK Değerleri (µg/mL)	
	Oksasilin	Vankomisin
Standart suş	0,25 (0,167)	1 (0,665)
MSSA1	0,25	0,5
MSSA2	0,25	1
MSSA3	1	1
MRSA1	512	2
MRSA2	512	1
MRSA3	4	1

Tabloda standart suş için verilen MİK değerlerinin yanına parantez içerisinde hassas MİK sonucu da yazılmıştır.

Tüp yöntemi ile yapılan standart suşun oksasilin MİK deney sonucundan bir görüntü Şekil 11'de verilmiştir. Bulanıklıkların göz ile daha iyi saptanması için son dört tüpün karşılaştırma görüntüsü Şekil 12'de verilmiştir. Şekillerden anlaşılacağı gibi standart suşun oksasilin MİK sonucu 0,25 olarak tespit edildi.

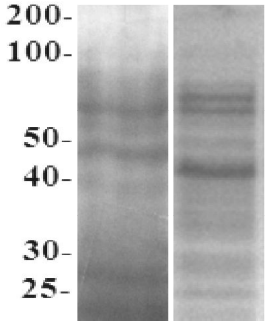
BAKTERİ ÜREMESİNİ DÜŞÜK ORANINDA İNHİBE EDEBİLECEK ANTİBİYOTİK KONSANTRASYONLARININ DAR BİR ARALIKTA YER ALDIĞININ SAPTANMASI

Grafik üzerinde inceleme yapıldığında üremenin % 20, %50 ve % 80 inhibe olduğu konsantrasyonlar Şekil 13'de bulunan grafiklerden saptanmış ve oksasilin için sırasıyla 0,075, 0,100 ve 0,150 µg/mL; vankomisin için sırasıyla 0,550, 0,600 ve 0,640 µg/mL değerleri bulunmuştur. Bu inceleme sonucunda bakteri popülasyonunun kademeli inhibe olmasını sağlayan antibiyotik konsantrasyonlarının kısıtlı bir aralığa karşılık geldiği bulunmuştur. Bu

da göstermektedir ki bakteriler 1 MİK değerine çok yakın konsantrasyonlardan etkilenmektedirler, halbuki stres yanıtı kullandığımız tekniklerle 1MİK konsantrasyonu uygulandığında saptanabilmiştir.

PROTEİN ÇALIŞMA SONUÇLARI

Bakteri hücre duvarının izolasyonu için kullanılan metodun bakteri sitoplazmasından ne kadar kaçak taşıdığını ya da taşıyıp taşımadığını anlamak için ayrıca sitoplazma proteinleri izole edilmiş ve duvar ekstraksiyonu ile karşılaştırılmıştır (Şekil 15). 80 kDa dışında bakteri duvar ve sitoplazma ekstraktının içerisinde sadece duvara özgü bileşenlerin bulunduğu anlaşılmıştır.



Şekil 15. Bakteri sitoplazma ve duvar bileşenlerinin karşılaştırmalı elektroforez sonucu
Şekilde sol taraftaki elektroforetip, bakteri sitoplazmasına ve sağ taraftaki bakteri duvar ve membranına aittir. Şekilde görüldüğü gibi 80 kDa'lık proteinin bakteri sitoplazmasından duvar ekstraktına kaçak yapmış bileşenleri içermektedir.

Protein miktar tayininde Bradford ayıracının yüksek deterjan konsantrasyonu ile etkileşebildiği görülmüş ve sonuçlar dikkatlice yorumlanarak gereğinde doğrudan elektroforez jeli yüklemesi ile konsantrasyon takibi yapılmıştır.

Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi yönteminde standart suş ile Borat tampon elektroforez sistemi rahat kullanıulmış ancak farklı suşlarda TRIS tampon sistemiyle daha keskin bant elde edildiğinden Trakya suşları ile yapılan elektroforezlerde doğrudan TRIS tampon sistemi kullanılmıştır.

ANTİBİYOTİĞE KARŞI STRES YANIT İFADESİNİN SAPTANMASI İÇİN YAPILAN OPTİMİZASYON ÇALIŞMASININ SONUCU

Optimizasyon maksadıyla yapılan dört deneyde stres yanıtının en iyi saptandığı maruziyet koşulu aranmıştır. 1 MİK'den düşük değerdeki antibiyotik konsantrasyonları kullanıldığında antibiyotik içermeyen standart suşu ile antibiyotik uygulanan suşların aynı elektroforetip profilleri verdiği görülmüş, farkın en iyi 1 MİK değerde antibiyotik konsantrasyonuyla saptanabildiği görülmüştür. Optimizasyon deneylerinde kullanılan koşullar ve sonuçları toplu halde aşağıda Tablo 10'da görülmektedir.

Tablo 10. Standart suşun stres yanıtı optimizasyon sonuçları

Antibiyotik	Deney no	Antibiyotik konsantrasyonu	İnkübasyon	Saptama
Oksasilin	1	1/27 MİK, 1/67,5 MİK, 1/108 MİK	40 dk, 2 sa, 7 sa, 24 sa	Negatif
	2	1/60 MİK	18 sa	Negatif
	3	1/180 MİK	5 dk, 2 sa, 7 sa, 24 sa,	Negatif
	4	1 MİK	5 dk, 2 sa, 7 sa, 24 sa, 3 gün, 6 gün, 9 gün	Pozitif
Vankomisin	1	1/27 MİK, 1/67,5 MİK, 1/108 MİK	40 dk, 2 sa, 7 sa, 24 sa	Negatif
	2	1/60 MİK	18 sa	Negatif
	3	1/180 MİK	5 dk, 2 sa, 7 sa, 24 sa	Negatif
	4	1 MİK	5 dk, 2 sa, 7 sa, 24 sa, 3 gün, 6 gün, 9 gün	Pozitif

DN: Deney numarası; **dk:** dakika; **sa:** saat; **CFU/ml:** colony forming unit/mililitre

Tabloda görüldüğü gibi her iki antibiyotik için stress yanıtının saptandığı antibiyotik konsantrasyonu 1 MİK değerindedir.

Standart suşun dört optimizasyon deneyinin normal şartlardaki kültüründen elde edilen karşılaştırmalı sonuçlar toplu halde Tablo 11'de verilmektedir. Burada görüldüğü gibi birinci deneyde, standart suşun normal şartlarda ve ayrı ayrı oksasilin (Sigma, Almanya) veya vankomisin (Hospira, UK) antibiyotiklerine değişik sürelerde maruz kaldığında elde edilen elektroforetip profili karşılaştırılmıştır. Bu deneyde ekstraktların hepsinde 90, 80, 70, 60, 50, 38 ve 27 kDa protein bantlarını gösteren profil elde edilmiştir.

İkinci deneyde, stadart suş normal ve Tablo 9'da belirtilen konsantrasyonlarda oksasilin veya vankomisine 18 saat maruz bırakılmıştır. Uygulanan elektroforezde çözünürlük arttırılarak ekstraktların hepsinde 90, 80, 74, 70, 60, 55, 50, 45, 43, 40, 38, 35, 33, 28, 27, 26,

25 ve 23 kDa bantları görüntülenmiştir. Bu bantların içerisinde deney 1'de saptanan bantların hepsi yer almaktadır.

Üçüncü deneyde, standart suşun normal şartlarda ve ayrı ayrı oksasilin ve vankomisin antibiyotiklerine değişik sürelerde maruz kaldığında elde edilen elektroforetip profili

Tablo 11. Dört optimizasyon deneyi ve bir sonraki başlıkta açıklanan Trakya suşları ile yapılan maruziyet deneyinde kontrol ekstraktlarından elde edilen bantların kDa ağırlıkları

Deney 1 (kDa)	Deney 2 (kDa)	Deney 3 (kDa)	Deney 4 (kDa)	Maruziyet deneyi (kDa)
			145	Ç
			125	125
			110	
Ç	Ç	Ç	105	
90	90	90	90	90
80	80		80	80
			76	
	74	74	74	74
			72	
70	70		70	70
60	60		60	60
			58	58
	55	55	55	
				52
50	50	50	50	50
			47	
	45		45	45
	43	43	43	43
	40	40	40	40
38	38	38	38	38
	37		37	
	35			
	33	33	33	33
	32	32	32	32
			30	30
	28	28		28
27	27		27	27
Ç	26			
	25	25	25	25
				24
	23	23	23	23

kDa: kilo Dalton, **Ç:** çözünürlük sınırı

Tabloda farklı tarihlerde yapılan optimizasyon deneylerinin faz varyasyonuna ve elektroforez çözünürlüğüne bağlı olarak bazı bant farkları gösterdiği görülmektedir. Herbir sütunda çözünürlüğün son bulduğu nokta "Ç" harfi ile sınırlanmıştır. Görüldüğü gibi *S. aureus* bakterisi strese yanıt vermediğinde bakteri duvarında standart bir profil ifade etmektedir. Buradaki 80 kDa bandın bakteri hücresinin içinden kaçakları da taşıyabileceği unutulmamalıdır.

karşılaştırılmıştır. Bu deneyde ekstraktların hepsinde 90, 74, 55, 50, 43, 38, 33, 32, 28, 25 ve 23 kDa bantları saptanmıştır. Elde edilen bantlar deney 1 ve 2'deki bantlarla tutarlıdır.

Birinci, ikinci ve üçüncü deneylerde elde edilen ortak bantlar 90, 80, 74, 70, 60, 55, 50, 43, 40, 38, 33, 32, 27, 25 ve 23 kDa standart suşta bakteri duvarı ve membranda ifade edilmektedir. İkinci deneyde ayrıca, üreme fazı varyasyonunu gösteren ek 37, 35 ve 26 kDa bantlar ortaya çıkmıştır.

Dördüncü deneyde, standart suşun normal şartlarda ve ayrı ayrı oksasilin ve vankomisin antibiyotiklerine değişik sürelerde maruz kaldığında elde edilen elektroforetip profili karşılaştırılmıştır. Deneyde, stadart suş normal şartlarda inkübe edildiğinde 7 sa ve 24 sa kontrol örnek şeritlerinde 145, 125, 110, 105, 90, 80, 76, 74, 72, 70, 60, 58, 55, 50, 47, 45, 43, 40, 38, 37, 33, 32, 30, 27, 25 ve 23 kDa bantları saptanmıştır. Bu deneyde stasyoner fazdan kaynaklanan değişiklikler, 76, 72, 58, 47 ve 30 kDa ortaya çıkan ve 28 kDa kaybolan bantlardır. Aynı ikinci deneydeki gibi, 45 ve 37 kDa bantların bu deneyde de ortaya çıktığı

Tablo 12. Dördüncü optimizasyon deneyinde antibiyotiğe karşı stres yanıt bant sonuçları

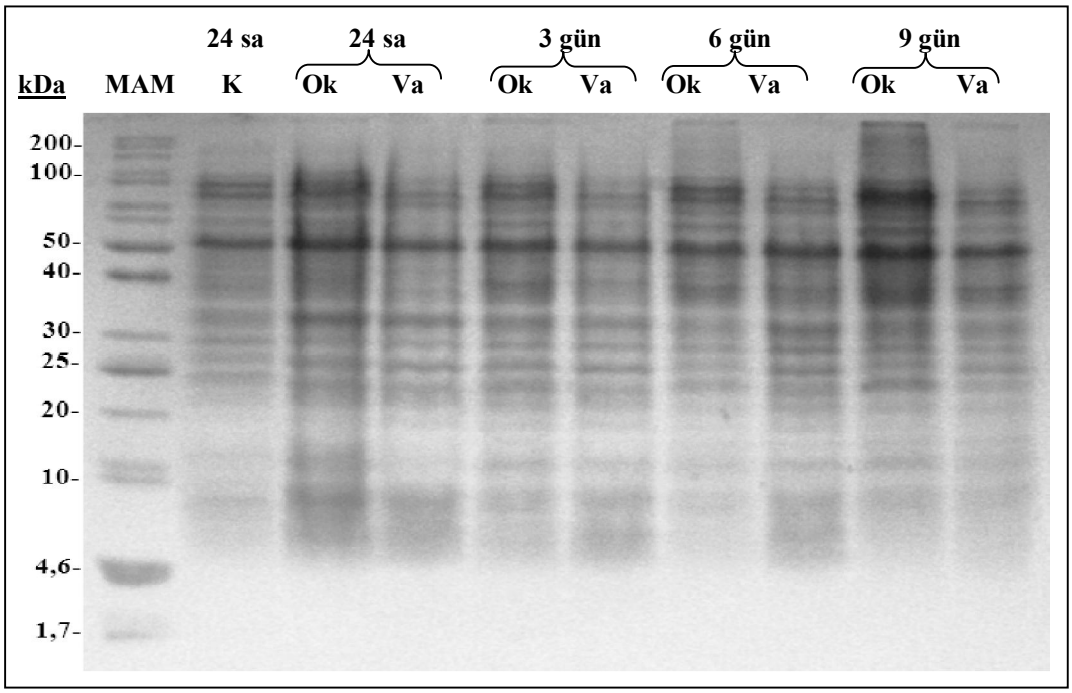
Zaman	Stres etkeni (1MİK)	Saptamalar (kDa)																											
		23	25	27	30	32	33	37	38	40	43	45	46	47	50	55	58	60	70	72	74	76	78	80	90	105	110	125	145
5 dk	Ok	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	y	*s*	•	•	•
	Va	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	y	*s*	•	•	•
2 sa	Ok	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	—	•	•	•	•	—	+	•	•	•	•	•	•
	Va	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	—	+	•	•	•	•	•	•
7 sa	Ok	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	—	+	•	•	•	•	•	•
	Va	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	—	+	•	•	•	•	•	•
7 sa Kontrol		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•
24 sa	Ok	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	+	•	•	•	•	•	—	•	•	•		•	•	•	•	•	•
	Va	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	+	•	•	•	•	•	—	•	•	•		•	•	•	•	•	•
24 sa Kontrol		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•
3 gün	Ok	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	+	•	•	•	•	•	—	•	•	•		•	•	•	•	•	•
	Va	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	+	•	•	•	•	•	—	•	•	•		•	•	•	•	•	•
6 gün	Ok	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	—	•	•	•		•	•	•	•	•	•
	Va	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	—	•	•	•		•	•	•	•	•	•
9 gün	Ok	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	—	•	•	•		•	•	•	•	•	•
	Va	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	—	•	•	•		•	•	•	•	•	•

DN: Deney numarası; **kDa:** Kilo Dalton; **Ok:** oksasilin; **Va:** vankomisin

Tabloda değişik maruziyet koşullarında elde edilen bantların ilgili kontrol ekstraktı ile elde edilen bantlarla karşılaştırması yer almaktadır. 5 dk, 2 sa ve 7 sa ekstraktlarının bantları 7 sa kontrol ekstarktının bantları ile karşılaştırılmıştır. Benzer şekilde, 24 sa ve sonrası ekstraktlarının bantları 24 sa kontrol ekstraktının bantlarıyla karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda kontrolden farklı olmayan bantlar için ilgili kutu içine siyah nokta (•), bant yoğunluğunda kontrole göre artma olduğunda yoğunlaşma anlamında "y" harfi, bant yoğunluğunda kontrole göre azalma olduğunda seyrelme anlamında "s" harfi, işareti, kontrolde bulunmayan yeni bant ortaya çıktığında artı işareti (+), kontrole göre kaybolan bant saptandığında eksi işareti (—) konmuştur.

saptanmıştır. Bu deneyde antibiyotik uygulandığı zaman elde edilen bant profili standart suşunki ile karşılaştırıldığında stres yanıtını gösteren bantlar saptanmıştır (Tablo 12). Stres yanıtını gösteren bantlar şunlardır: (a) Her iki antibiyotik uygulandığı zaman 5 dk maruziyette 90 kDa bant yoğunlaşırken 105 kDa bant seyrelmiştir; ve ayrıca, 2 sa ve 7 sa maruziyette 76 kDa, 24 sa ve sonraki maruziyetde 70 kDa bant kaybolurken 2 ve 7 sa maruziyette 78 kDa bant ve 24 sa ve 3 gün maruziyette 46 kDa yeni ortaya çıkmaktadır. (b) 2 sa oksasilin uygulandığı zaman 58 kDa bant özgül olarak kaybolmaktadır. Bunun dışında antibiyotikler arası farka rastlanmamıştır. (c) Antibiyotik uygulanan tüplerin bant profilleri karşılıklı incelendiğinde 2 sa ve 7 sa profillerinin ortak bir grubu, 24 sa ve sonrası bant profillerinin ise bir diğer ortak grubu oluşturduğu gözlenmiştir.

Deneylerin sonuçları zaman açısından değerlendirildiğinde, *S. aureus* bakterisi okasilin veya vankomisin stresine maruz kaldığında 5 sa içinde bir stres yanıtı geliştirmekte, bu yanıt sonraki 19 saat içinde değişim göstererek yeni karakteriyle devam etmektedir. Böylece bakterilerin antibiyotik stresine yanıtının 24 sa öncesi ve sonrası olmak üzere iki ayrı ifade grubunda yapıldığı saptanmıştır. 24 sa sonrası günlerde bakteriler 1 MİK değeri



Ok: Oksasilin; **Va:** Vankomisin; **K:** Kotrol; **sa:** Saat; **MAM:** Moleküler Ağırlık Markırı

Şekil 16. Standart suşunun 24 saat ile 9 gün arasında antibiyotiğe maruz kalması sonucu elde edilen stres yanıt ifade ürünlerinin elektroforetiplendirme jeli
Islak jeller ışık kutusu yardımıyla mercek kullanılarak manuel incelenmiştir. Şekilde görünen çözünürlük laboratuvarda incelenen ıslak jeldeki çözünürlükten biraz düşüktür.

karşısında stasyoner faza geçtiği veya öldüğünden başkaca bir yanıt farkı gözlenmemiştir. Tüm bu nedenlerle deneylerde 5 ve 24 sa olmak üzere iki ayrı zamanda stres yanıtının aranmasına karar verilmiştir. Şekil 16'da 24 sa ve sonrası maruziyet suşları jelde görülmektedir.

TRAKYA BÖLGESİNDEN İZOLE EDİLEN *Staphylococcus aureus* SUŞLARININ STRES YANIT İFADE ELEKTROFORETİPLERİ

Çalışmada, standart suş ile birlikte 4 adet metisilin duyarlı ve 3 adet metisilin dirençli toplam 7 adet *S. aureus* suşu 1 MİK konsantrasyonunda ayrı ayrı oksasilin (Sigma, Almanya) veya vankomisin (Hospira, UK) stresine ayrı ayrı 5 sa ve 24 sa maruz bırakılmıştır. Ardından, her suşun stres yanıtı hem kendi kontrolü ile hem de diğer suşların stres yanıtları ile karşılaştırılmıştır.

Bu deneydeki standart suş kontrol tüp profili, optimizasyon deneylerindeki kontrol tüp ortak profili ile karşılaştırıldığında, 90, 80, 74, 70, 60, 50, 43, 40, 38, 33, 32, 27, 25 ve 23 kDa bantlar doğrulanmıştır (Tablo 13). Ayrıca, optimizasyonun sadece dördüncü deneyinde saptanamayan ancak diğer deneylerde saptanan 28 kDa bant bu deneyde bir kez daha doğrulanmıştır. Bu deneye özgü olarak 55 kDa bandın kaybolduğu, 52 ve 24 kDa bantların ortaya çıktığı saptanmıştır. Bu deneydeki standart suşun ve dördüncü optimizasyon deneyindeki suşun antibiyotiğe maruziyet sonucunda elde edilen profiller karşılaştırıldığında, sadece ikisinde saptanan 58 ve 30 kDa bantlar doğrulanmıştır.

Tablo 14'de toplu halde verildiği gibi, MSSA1 suşuyla yapılan elektroforetiplendirme deneyinde kontrol tüpünde 16, 17, 18, 20, 23, 24, 25, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 37, 38, 40, 43, 45, 50, 52, 58, 60, 70, 74, 80, 90, 105, 110, 125 ve 145 kDa protein bantları tespit edilmiştir. 5 sa vankomisin uygulandığında 23, 24, 27, 30, 70 ve 74 kDa bantlarda yoğunlaşma, 25 kDa bandında kaybolma, 37 kDa bandında seyrelme; 5 sa oksasilin uygulandığında 23, 24, 27, 30, 33, 70 ve 74 kDa bantlarında yoğunlaşma, 45 kDa bandında kaybolma, 37 kDa bandında seyrelme gözlenmiştir. 24 sa vankomisin uygulandığında 16, 20, 23, 24, 27, 30, 70 ve 74 kDa bantlarda yoğunlaşma, 25 kDa bandında kaybolma, 90 kDa bandında seyrelme; oksasilin uygulandığında 17, 18, 20, 23, 24, 27, 30, 33, 52, 70 ve 74 kDa bantlarında yoğunlaşma, 16 kDa bandında kaybolma gözlenmiştir.

Tablo 13. Stres yanıt ifade ürünlerinin elektroforetiplendirme deneylerinde standart suş ve Trakya suşlarına ait antibiyotiksiz kontrol tüplerinden elde edilen bantlar

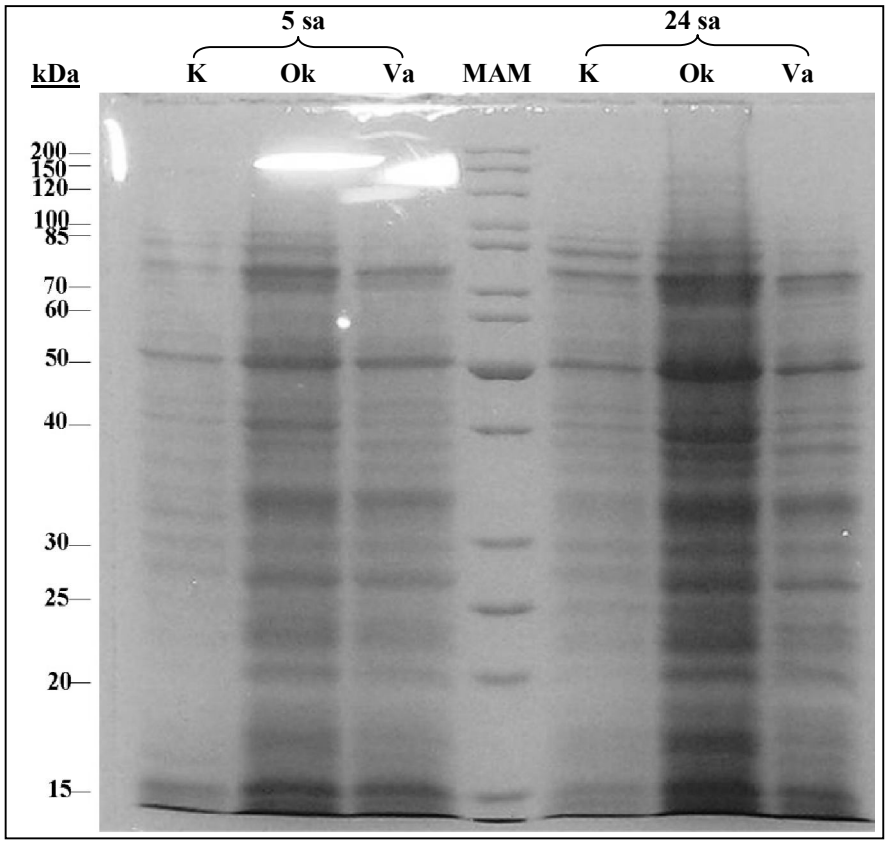
MSSA1 (kDa)	MSSA2 (kDa)	MSSA3 (kDa)	MRSA1 (kDa)	MRSA2 (kDa)	MRSA3 (kDa)	Sd
145	145	145		145	145	
125	125	125		125	125	125
110		110		110	110	
105	105	105	Ç	105	105	
90	90	90	90	90	90	90
80	80	80	80	80	80	80
74	74	74	74	74	74	74
70	70	70	70	70	70	70
60	60	60	60	60	60	60
58	58	58	58	58	58	58
52	52	52	52	52	52	52
50	50	50	50	50	50	50
45		45	45	45	45	45
43	43	43	43	43	43	43
40	40	40	40	40	40	40
			39	39		
38	38	38	38	38	38	38
37	37		37	37	37	
33	33	33	33	33	33	33
32	32	32	32	32	32	32
31	31					
30	30	30	30	30	30	30
28	28	28	28	28	28	28
27	27	27	27	27	27	27
25	25	25	25	25	25	25
24	24	24	24	24	24	24
23	23	23	23	23	23	23
20	20	20	20	20	20	Ç
18	18	18	18	18	18	
17	17	17	17	17	17	
16	16	16		16	16	

kDa: kilo Dalton, **Sd:** Standart suş, **Ç:** çözünürlük sınırı

Tablodaki sütunlarda çözünürlüğün son bulduğu nokta "Ç" harfi ile sınırlanmıştır.

MSSA2 suşuyla yapılan elektroforetiplendirme deneyinde kontrol tüpünde Şekil 17'de görüldüğü gibi 16, 17, 18, 20, 23, 24, 25, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 37, 38, 40, 43, 50, 52, 58, 60, 70, 74, 80, 90, 105, 125 ve 145 kDa protein bantları tespit edilmiştir. 5 sa vankomisin uygulandığında 27, 33 ve 38kDa bantlarında yoğunlaşma, 25 ve 90kDa bantlarında seyrelme; oksasilin uygulandığında 17, 18, 27, 38 ve 40 kDa bantlarında yoğunlaşma gözlenmiştir. 24 sa vankomisin uygulandığında 27, 33 ve 38 kDa bantlarında yoğunlaşma, 25 ve 90 kDa bantlarında seyrelme, 65 kDa bandında ortaya çıkma; oksasilin uygulandığında 17, 18, 27, 38 ve 40 kDa bantlarında yoğunlaşma, 65 kDa bandında ortaya çıkma gözlenmiştir.

MSSA3 suşuyla yapılan elektroforetiplendirme deneyinde kontrol tüpünde 16, 17, 18, 20, 23, 24, 25, 27, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 43, 45, 50, 52, 58, 60, 70, 74, 80, 90, 105, 110, 125 ve 145 kDa protein bantları tespit edilmiştir. 5 sa veya 24 sa, vankomisin veya oksasilin uygulandığında 16, 17, 18, 20, 23, 24, 27 ve 70 kDa bantlarında yoğunlaşma, 80 kDa



Ok: Oksasilin; **Va:** Vankomisin; **K:** Kotrol; **sa:** Saat

Şekil 17. MSSA2 suşunun antibiyotiğe karşı stres yanıt ifade ürünlerinin elektroforetiplendirme jeli

Şekilde MSSA2 suşunun 5 saatlik ve 24 saatlik, 1 MİK değerde oksasilin ve vankomisin antibiyotikleri ile maruziyeti sonucu protein ifade farkını saptamak için yapılmış SDS-PAGE jeli verilmiştir. Yedi şeritten oluşan jelde ilk üç şerit 5 saatlik antibiyotik stres tüplerden izole edilen örnekleri, dördüncü şerit moleküler ağırlık markırını, son 3 tüp ise aynı şablonda 24 saatlik tüplerden alınan örnekleri göstermektedir. İlk üç tüpten birincisi konrol, ikincisi oksasilin muameleli, üçüncüsü de vankomisin muameleli örneği gösteriyor.

bandında seyrelme, 25, 30 ve 45 kDa bantlarında kaybolma 65 kDa bandında ortaya çıkma gözlenmiştir.

MRSA1 suşuyla yapılan elektroforetiplendirme deneyinde kontrol tüpünde 17, 18, 20, 23, 24, 25, 27, 28, 30, 32, 33, 37, 38, 39, 40, 43, 45, 50, 52, 58, 60, 70, 74, 80 ve 90 kDa protein bantları tespit edilmiştir. 5 sa vankomisin uygulandığında 23, 24, 27 ve 70 kDa bantlarında yoğunlaşma, 33 ve 45 kDa bandında seyrelme, 80 ve 90 kDa bandında kaybolma; oksasilin uygulandığında 23, 24 ve 27 kDa bantlarında yoğunlaşma, 33 ve 45 kDa bandında seyrelme, 80 ve 90 kDa bandında kaybolma gözlenmiştir. 24 sa vankomisin uygulandığında 27 kDa bandında yoğunlaşma, 33 kDa bandında seyrelme, 80 ve 90 kDa bandında kaybolma;

KOMBİNASYONLAR			BANTLAR (kDa)																																					
			16	17	18	20	23	24	25	27	28	30	31	32	33	37	38	39	40	43	45	50	52	58	60	65	70	74	80	90	105	110	125	145
Standart suş	5 sa	Ok	Ç	Ç	Ç	Ç	•	y	y	y	s	•		•	•		•		•	•	•	•	•	•	•		•	•	s	•			•	Ç
		Va	Ç	Ç	Ç	Ç	•	y	y	y	s	•		•	•		•		•	•	•	•	•	•	•		•	•	s	•			•	Ç
		K	Ç	Ç	Ç	Ç	•	•	•	•	•	•		•	•		•		•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•			•	Ç
	24 sa	Ok	Ç	Ç	Ç	Ç	•	y	y	y	s	•		•	•		•		•	•	•	•	•	•	•		•	•	s	s			•	Ç
		Va	Ç	Ç	Ç	Ç	•	y	y	y	s	•		•	•		•		•	•	•	•	•	•	•		•	•	s	s			•	Ç
		K	Ç	Ç	Ç	Ç	•	•	•	•	•	•		•	•		•		•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•			•	Ç
Trakya suşları	MSSA1	Ok	Ç	Ç	Ç	Ç	y	y	•	y	•	y	•	•	y	s	•		•	•	—	•	•	•	•		y	y	•	•	•	•	•	•
		Va	Ç	Ç	Ç	Ç	y	y	—	y	•	y	•	•	•	s	•		•	•	•	•	•	•	•		y	y	•	s	•	•	•	•
		K	Ç	Ç	Ç	Ç	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•
	24 sa	Ok	—	y	y	y	y	y	•	y	•	y	•	•	y	•	•		•	•	•	•	y	•	•		y	y	•	•	•	•	•	•
		Va	y	•	•	y	y	y	—	y	•	y	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•		y	y	•	s	•	•	•	•
		K	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•
	MSSA2	Ok	•	y	y	•	•	•	•	y	•	•	•	•	y	•	y		y	•		•	•	•	•		•	•	•	•	•		•	•
		Va	•	•	•	•	•	•	s	y	•	•	•	•	y	•	y		•	•		•	•	•	•		•	•	•	s	•		•	•
		K	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•		•	•	•	•		•	•	•	•	•		•	•
	24 sa	Ok	•	y	y	•	•	•	•	y	•	•	•	•	y	•	y		y	•		•	•	•	•	+	•	•	•	•	•		•	•
		Va	•	•	•	•	•	•	s	y	•	•	•	•	y	•	•		•	•		•	•	•	•	+	•	•	•	s	•		•	•
		K	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•		•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•
	MSSA3	Ok	y	y	y	y	y	y	—	y	•	—		•	•		•		•	•	—	•	•	•	•	+	y	•	s	•	•	•	•	•
		Va	y	y	y	y	y	y	—	y	•	—		•	•		•		•	•	—	•	•	•	•	+	y	•	s	•	•	•	•	•
		K	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•		•		•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•
	24 sa	Ok	y	y	y	y	y	y	—	y	•	—		•	•		•		•	•	—	•	•	•	•	+	y	•	s	•	•	•	•	•
		Va	y	y	y	y	y	y	—	y	•	—		•	•		•		•	•	—	•	•	•	•	+	y	•	s	•	•	•	•	•
		K	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•		•		•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•
	MRSA1	Ok	Ç	•	•	•	y	y	•	y	•	•		•	s	•	•	•	•	•	s	•	•	•			•	•	—	—	Ç	Ç	Ç	Ç
		Va	Ç	•	•	•	y	y	•	y	•	•		•	s	•	•	•	•	•	s	•	•	•			y	•	—	—	Ç	Ç	Ç	Ç
		K	Ç	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•			•	•	•	•	Ç	Ç	Ç	Ç
	24 sa	Ok	Ç	•	•	•	•	•	•	y	•	•		•	s	•	•	•	•	•	•	•	•	•			•	•	—	—	Ç	Ç	Ç	Ç
		Va	Ç	•	•	•	•	•	•	y	•	•		•	s	•	•	•	•	•	•	•	•	•			•	•	—	—	Ç	Ç	Ç	Ç
		K	Ç	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•			•	•	•	•	Ç	Ç	Ç	Ç
	MRSA2	Ok	•	•	•	•	•	y	s	•	s	•		•	•	•	•	•	•	•	s	•	•	s	s		•	•	s	s	•	•	•	•
		Va	y	•	•	y	y	y	—	y	—	•		•	y	•	•	•	•	•	s	•	•	s	s		•	•	—	s	•	•	•	•
		K	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•
	24 sa	Ok	•	•	•	•	•	y	s	•	s	•		•	•	•	•	•	•	•	s	•	•	s	s		•	•	s	s	•	•	•	•
		Va	y	•	•	y	y	y	—	y	—	•		•	y	•	•	•	•	•	s	•	•	s	s		•	•	—	s	•	•	•	•
		K	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•
	MRSA3	Ok	—	•	•	y	•	y	s	•	•	•		•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•		•	•	s	s	•	•	•	•
		Va	•	y	y	y	y	y	s	•	•	•		•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•		•	•	s	s	•	•	•	•
		K	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•
	24 sa	Ok	—	y	y	y	•	y	s	•	•	•		•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•		•	•	s	s	•	•	•	•
		Va	•	y	y	y	y	y	s	•	•	•		•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•		•	•	s	s	•	•	•	•
		K	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•

Tablo 14. Antibiyotiğe karşı stres yanıt ifadelerinin elektroforetipik analiz sonucu

Ç: Çözünürlük sınırı, **Ok:** oksasilin; **Va:** vankomisi, **K:** kontrol

Tabloda maruziyet sonrası elde edilen bantların ilgili kontrol ekstraktı ile elde edilen bantlarla karşılaştırması yer almaktadır. Tablo, kombinasyonlar ve bantlar başlıklarıyla iki ana sütun halinde verilmiştir. Kombinasyonlar sütunu üçe bölünmüş ve burada birinci sütunda suşlar, sonraki sütunlarda antibiyotik maruziyet süre ve ismi verilmiştir. Bantlar sütununda 16-145 kDa arasında saptanmış 32 adet bantın herbiri için alt sütunlar açılmıştır. Bu alt sütunlarda her ekstraktlarının bantları kendi kontrol ekstarktının bantları ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda kontrolden farklı olmayan bantlar için ilgili kutu içine siyah nokta (•), bant yoğunluğunda kontrole göre artma olduğunda yoğunlaşma anlamında "y" harfi, bant yoğunluğunda kontrole göre azalma olduğunda seyrelme anlamında "s" harfi, işareti, kontrolde bulunmayan yeni bant ortaya çıktığında artı işareti (+), kontrole göre kaybolan bant saptandığında eksi işareti (—) konmuştur. Sütunlarda çözünürlüğün son bulduğu nokta "Ç" harfi ile sınırlanmıştır.

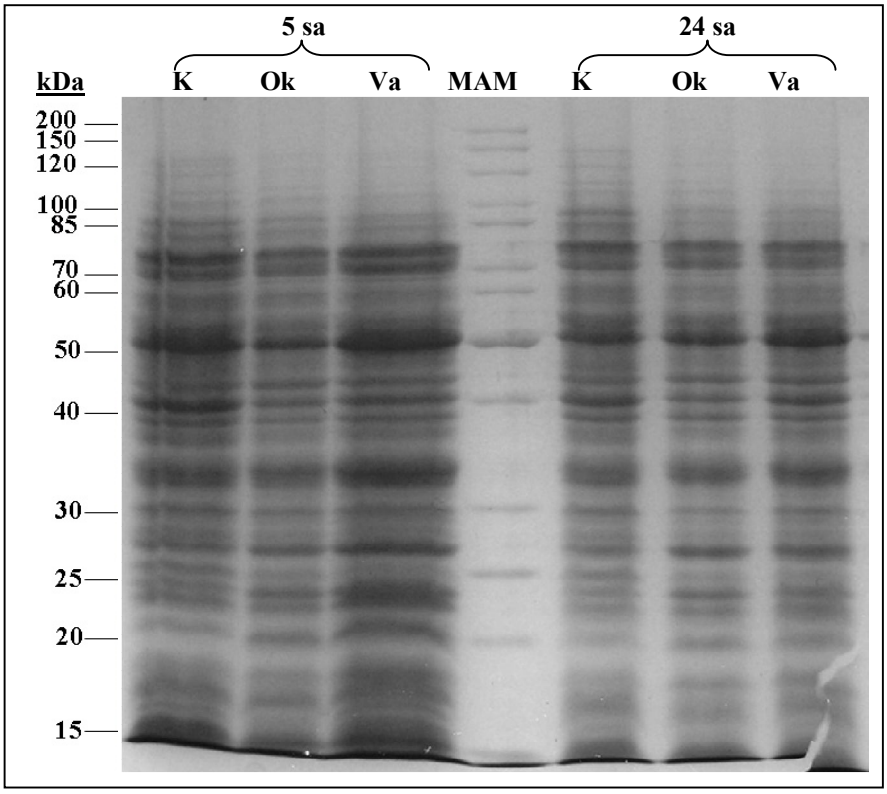
oksasilin uygulandığında 27 kDa bandında yoğunlaşma, 33 kDa bandında seyrelme, 80 ve 90 kDa bandında kaybolma gözlenmiştir.

MRSA2 suşuyla yapılan elektroforetiplendirme deneyinde kontrol tüpünde 16, 17, 18, 20, 23, 24, 25, 27, 28, 30, 32, 33, 37, 38, 39, 40, 43, 45, 50, 52, 58, 60, 70, 74, 80, 90, 105, 110, 125 ve 145 kDa protein bantları tespit edilmiştir. 5 sa vankomisin uygulandığında 24 ve 27 kDa bantlarında yoğunlaşma, 25, 28, 45, 55, 60, 80 ve 90 kDa bantlarında seyrelme, 25, 28 ve 80 kDa bantlarında kaybolma; oksasilin uygulandığında 24 kDa bandında yoğunlaşma; 25, 28, 45, 55, 60, 80 ve 90 kDa bantlarında seyrelme gözlenmiştir. 24 sa vankomisin uygulandığında 24 ve 27 kDa bantlarında yoğunlaşma, 25, 28, 45, 55, 60, 80 ve 90 kDa bantlarında seyrelme, 25, 28 ve 80 kDa bantlarında kaybolma; oksasilin uygulandığında 24 kDa bandında yoğunlaşma; 25, 28, 45, 55, 60, 80 ve 90 kDa bantlarında seyrelme gözlenmiştir.

MRSA3 suşuyla yapılan elektroforetiplendirme deneyinde kontrol tüpünde Şekil 18'de görüldüğü gibi 16, 17, 18, 20, 23, 24, 25, 27, 28, 30, 32, 33, 37, 38, 40, 43, 45, 50, 52, 58, 60, 70, 74, 80, 90, 105, 110, 125 ve 145 kDa protein bantları tespit edilmiştir. 5 sa vankomisin uygulandığında 17, 18, 20, 23 ve 24 kDa bantlarında yoğunlaşma, 25, 80 ve 90 kDa bantlarında seyrelme; oksasilin uygulandığında 20 ve 24 kDa bantlarında yoğunlaşma, 25, 80 ve 90 kDa bantlarında seyrelme gözlenmiştir. 24 sa vankomisin uygulandığında 17, 18, 20, 23 ve 24 kDa bantlarında yoğunlaşma, 25, 80 ve 90 kDa bantlarında seyrelme; oksasilin uygulandığında 17, 18, 20 ve 24 kDa bantlarında yoğunlaşma, 25, 80 ve 90 kDa bantlarında seyrelme gözlenmiştir. Tüm elektroforetiplendirme toplu sonuçları Tablo 14'de sunulmuştur.

Yukarıda bildirilen stres yanıtı verileri, (a) bant ifade eğilimleri; (b) antibiyotiğe özgü ifade eğilimleri; ve (c) suşları gruplayıcı ifade eğilimleri açısından da analiz edilmiştir. Tüm suşların birbirleriyle ve kontrolleriyle farklı antibiyotik ve maruziyet süresi için çapraz karşılaştırmalı analizi yapıldığında, yoğunlaşan, seyrelen, kaybolan ve ortaya çıkan ortak bir bant görülmemiştir.

Yoğunlaşma bakımından 27 kDa bant MRSA3 deneyinin tümü ve MRSA2'nin 5 veya 24 sa oksasilin uygulanması hariç diğer tüm suş ve zaman parametrelerinde yoğunlaşma göstermiştir. Yoğunlaşma bakımından 24 kDa bandı MSSA2 ve MRSA1'in 24 sa antibiyotik uygulamaları hariç diğer tüm deney ve suşlarda yoğunlaşma göstermiştir. Buna benzer olarak 20 ve 23 kDa bantları deneyler boyunca gösterdiği yoğunlaşmalar ile dikkat çekmektedir.



Ok: Oksasilin; **Va:** Vankomisin; **K:** Kotrol; **sa:** Saat

Şekil 18. MRSA3 suşunun antibiyotiğe karşı stres yanıt ifade ürünlerinin elektroforetiplendirme jeli

Şekilde MRSA3 suşunun 5 saatlik ve 24 saatlik, 1 MİK değerde oksasilin ve vankomisin antibiyotikleri ile maruziyeti sonucu protein ifade farkını saptamak için yapılmış SDS-PAGE jeli verilmiştir. Yedi şeritten oluşan jelde ilk üç şerit 5 saatlik antibiyotik stres tüplerden izole edilen örnekleri, dördüncü şerit moleküler ağırlık markırını, son 3 tüp ise aynı şablonda 24 saatlik tüplerden alınan örnekleri göstermektedir. İlk üç tüpten birincisi konrol, ikincisi oksasilin muameleli, üçüncüsü de vankomisin muameleli örneği gösteriyor.

Seyrelme ve kaybolma bakımından en dikkat çekici bantlar 80 ve 90 kDa bantlarıdır. 80 ve 90 kDa bantları MRSA suşlarının tümünde ve her iki antibiyotik deneyinde ifade farkı olarak ya seyrelmiş ya da yok olmuştur. MSSA suşlarındaki 90 kDa bandının ifadesi incelendiğinde özellikle vankomisin stresinde seyrelme gösterdiği görülmüş MSSA3 suşunda, bant yoğunluğunda herhangi bir değişiklik olmaz iken, 80 kDa bandı her iki antibiyotikte de seyrelmiştir. 80 kDa bandı detaylı incelendiğinde MSSA1 ve MSSA2 suşlarında herhangi bir değişiklik olmaz iken, diğer tüm suşlarda her iki antibiyotikte de seyrelme ya da kaybolma gözlenmiştir.

Trakya suşlarının normal şartlarda elektroforetik bant analizi, 39 kDa bandı MRSA1 ve MRSA2'de; 31 kDa bandı MSSA1 ve MSSA2'de ifade olarak diğer suşlardan farklılık

göstermiştir. Antibiyotiğe özgü ifade eğilimleri incelemek üzere 31 kDa bandını kodlayan MSSA1 ve MSSA2'nin ifade profili MSSA3 ile karşılaştırıldığında, MSSA1 ve MSSA2'de 25 kDa bandında seyrelme ve kaybolma bakımından sadece vankomisin stresinde seyrelme ya da kaybolma gözlenirken MSSA3'de 25 kDa bandı her iki antibiyotiğe karşı yanıt olarak kaybolma profilini göstermiştir. 39 kDa bandının ifade olunmasıyla diğer suşlardan ayrılan MRSA1 ve MRSA2, MRSA3 ile karşılaştırıldığında, 45 kDa bandı MRSA1 ve MRSA2'de seyrelme gösterirken MRSA3'de herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. MRSA2 suşunde 58 ve 60 kDa bantları her iki antibiyotiğe karşı seyrelme göstererek diğer suşlardan farklılık göstermiştir.

Suşları gruplayıcı ifade eğilimleri yaklaşımıyla yapılan mega analizde, suşlar arasında en fazla profil değişikliği MSSA3 suşunda görülmüştür. Diğer suşlarda olmayan ve MSSA2'nin her iki antibiyotiğin 24 sa deneyinde ifade olan 65 kDa bandı MSSA3'de tüm zamanlarda ve her iki antibiyotikte ortaya çıktığı görülmüştür. Ayrıca Trakya suşları arasında ifade olan 37 kDa bandı MSSA3'de mevcut değildir. Benzer şekilde Trakya suşları arasında hiçbir deneyde ifade farkı bulunmayan, sadece MSSA1'de her iki antibiyotik stresinde ve tüm zamanlarda yoğunlaşan 30 kDa bandı MSSA3'de kaybolma yönünde ifade farkı yaratmıştır.

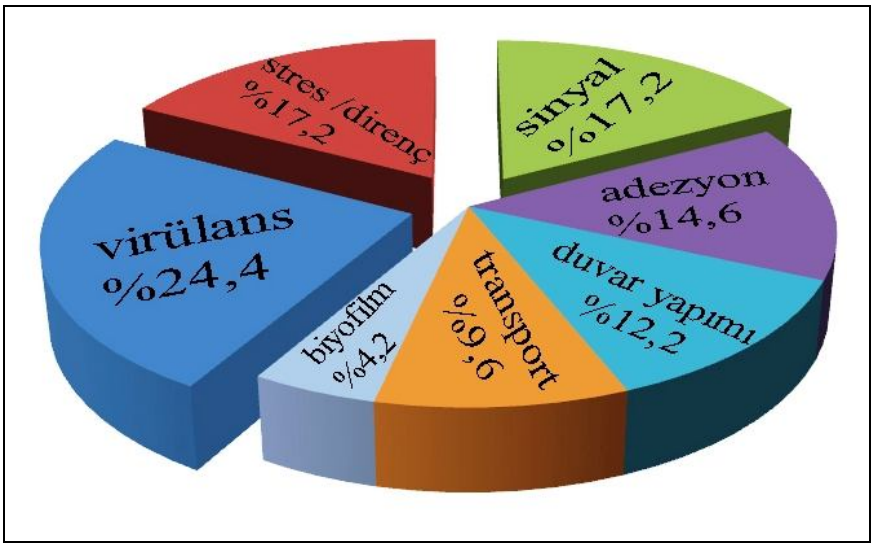
Profilleri genel anlamda çözünürlük aralığının yüksek olduğu 16-90 kDa arasında değerlendirecek olursak ve proteinleri 16-30, 31-74 ve 80-90 kDa bantlarıyla gruplayacak olursak 16-30 kDa ve 80-90 kDa gruplarında sık ifade değişikliği olduğunu; 31-74 kDa gruplarında ise seyrek ifade değişikliği olduğunu görüyoruz. Sık ifade değişikliği olan 16-30 kDa gruplarında bu değişikliğin yoğunlaşma yönünde olduğunu, 80-90 kDa gruplarında ise seyrelme ya da kaybolma yönünde olduğunu söyleyebiliriz. Diğer taraftan 31-74 kDa grubunda seyrek ve karışık (bazen yoğunlaşma, bazen seyrelme/kaybolma) ifade değişikliği görülse de, ortaya çıkan 65 kDa bandıyla bu bölgenin de dikkat çekici olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak, yedi suşun arasında MSSA3 ve MRSA2'nin antibiyotik stresine özgün ama birbirinden farklı profilde en yüksek yanıt veren suşlar olduğu görülmektedir. Dieğr beş suş ise birbirlerine daha benzer ortaklıklar taşımakla birlikte 25 ve 31 kDa bantları MSSA1 ve MSSA2 için, 24 ve 39 kDa bantların MRSA1 için ve 27 kDa bantın MRSA3 için ayırt edici olduğu anlaşılmaktadır. İncelenen suşlarda antibiyotik direncine özgü bir ifade saptanmamıştır.

ELEKTROFORETİPLERİ PROTEOM EVRENLERİ

16-145 kDa arasında saptadığımız 37 adet bandımıza karşılık veri bankasından 72 adetten oluşan protein havuzu elde edilmiştir. Bantlar ve proteinlerin eşleştirilmesi Tablo 15'te görülmektedir. Bazı bantların karşılığı protein veri listesinde bulunmamaktadır, örneğin, 16, 17 ve 18 kDa bantlara karşılık veri bankasından sadece "Holin-benzeri protein"in listeden elde edilmesi gibi. Benzer şekilde bazı bantlar için birden fazla olasılık elde edilmiştir, örneğin, 145 kDa karşılığında beş farklı protein olasılığının belirmiş olması gibi. Bu protein havuzunda yer alan proteinler işlev açısından incelendiğinde 72 adet proteinin gösterdiği 95 adet işlev incelendiğinde bunlardan 25 adedinin virülans ilişkili işlevi (%26,3), 5 adedinin biyofilm ilişkili işlevi (%5,3), 4 adedinin transport ilişkili işlevi (% 4,2), 29 adedinin adezyon ilişkili işlevi (%30,5), 15 adedinin stres yanıtı/direnç ilişkili işlevi (%15,8), 8 adedinin sinyal aktarımı ilişkili işlevi (%8,4) ve 9 adedinin bakteri duvar yapımı ilişkili işlevi (%9,5) temsil ettiği anlaşılmaktadır.

72 proteinlik havuz üzerinde yapılan mega analizde bunlardan 32'sinin antibiyotik stresine yanıtta ifade edildiği, kalan %56,6'lık kısmın bakterinin bekçi genleri ve stasyoner fazla ilgili genlerin ürünü olduğu anlaşılmaktadır. Strese yanıtta kullanılan 32 proteinlik havuzun gösterdiği 41 adet işlev incelendiğinde bunlardan yaklaşık %41,6'sının virülans ve strese yanıt işlevlerinden sorumlu proteinlerini içeren ifade ürünlerinden oluştuğu anlaşılmaktadır (Şekil 19).



Şekil 19. Saptanan stres yanıt proteinlerinin işlevsel dağılımı

Tablo 15. Stres yanıt ifade ürünlerinin muhtemel proteinlerini içeren havuz (62)

kDa	kDa	aa	Gen	Protein	Erişim no	Bilgi ve fonksiyon
16 17 18	14,41	131	cidA SAPIG2591	Holin-benzeri protein CidA	D2NAC3	Transmembran protein, antibiyotik veya diğer stres altında membranda sitoliziz ile programlı hücre ölümü
20	21,45	195	M013TW_2461	Virulans-ilişkili duvara bağlı protein SasG	G8RED2	Virülans ilişkili bakteri duvar proteini
23	21,56	196	sasG SA2981_2432	Skuamöz nazal epitel hücrelere tutunan Virülans-ilişkili duvara bağlı protein SasG (LPXTG motif)	D3ET43	Bakteri hücre duvar proteini, virülans, salgılanıyor
24	25,08	228	SAPIG1127	Demir-düzenleyen yüzey determinant protein C (Stafilokokal demir-düzenleyen protein D)	D2N6A4	Bakteri hücre duvar proteini, hem transportu
25	25,63	233	SAPIG1979	Muhtemel iki bileşenli protein	D2N8L9	Bakteri hücre duvarında aktif stres sinyal proteini
26	26,51	241	SAPIG0148	Hücre duvar yüzeyine bağlananlar ailesi proteini	D2N3I8	Bakteri duvarında ve salgılanan protein, biofilm oluşumu
27	27,72	252	SAP102A_001	Biyofilm-ilişkili yüzey proteini	D2JFX3	Biyofilm oluşturulması
28	30,69	279	M013TW_2462	Virülans-ilişkili duvara bağlı protein SasG	G8RED3	Virülans, IgA degredasyon peptidazı
30 31	30,69	279	SAPIG0831	LysM domain proteini	D2N5G1	Duvar makromoleküllerinin katabolizması
32	32,01	291	uppP SAPIG0761	Undekaprenil-difosfataz (EC 3.6.1.27) (Basitrasin direnç proteini) (Undekaprenil pirofosfat fosfataz)	D2N591	Membran proteini, duvar biyosentezi ve şekillenmesi, antibiyotik yanıtı/direnci, undekaprenil-difosphataz aktivite
33	33,11	301	SAPIG1782	Penisilin-bağlayan protein 1A	D2N858	Duvar proteini, duvar biyosentezi ve şekillenmesi, katalitik aktivite, penisilin bağlanma
35	35,64	324	M013TW_2460	Virülans-ilişkili duvara bağlı protein SasG	G8RED1	Duvar proteini, virülans, peptidoglikana bağlı ve sekrete ediliyor
37	36,96	336	sspA SAOUHSC_00988	Glutamil endopeptidaz (EC 3.4.21.19) (Endoproteinaz Glu-C) (Stafilokokal serin proteinaz) (V8 proteaz) (V8 proteinaz)	Q2FZL2	Salgılanıyor, virülans, hidrolaz, proteaz, serin proteaz, serin-tip endopeptidaz aktivite
38	38,06	346	graS SAOUHSC_00666	Sensör histidin kinaz graS (EC 2.7.13.3) (Glikopeptid direnci-ilişkili protein S)	Q2G0D9	Membran proteini, virülans, katyonik antimikrobiyal peptidleri (CAMPs)'ne karşı dirençle ilgili iki-bileşenli regülatör sistem graR/graS üyesi, kinaz, transferaz, peptidil-histidin fosorilasyon, antibiyotik yanıt, fosforilasyon ile sinyal aktarımı
39	38,28	348	SAPIG2551	Fibronektin-bağlayan protein	D2NA83	Duvar proteini, fibronektin-bağlayan, bakteri adezyonu
40	38,5	350	isdA frpA stbA MW1012	Demir-tarafından düzenlenmiş yüzey determinant protein A (Fur-tarafından düzenlenen protein A) (Stafilokokal transferrin-bağlayan protein A)	Q7A152	Duvar/salgı proteini, metal iyon bağlama, hem için rezervuar, aderans, proteaz aktiviteye karşı koruma ve laktoferrisin direnci, hidrojen peroksit direnci

Tablo 15. (devam) Stres yanıt ifade ürünlerinin muhtemel proteinlerini içeren havuz (62)

	38,61	351	saeS SAOUHSC_00714	Histidin protein kinaz saeS (EC 2.7.13.3) (Sensör protein saeS) (*Staphylococcus* ekzoprotein ekspresyon protein S)	Q2G2U1	Çoklu geçiş membran proteini, kinaz ve transferaz özelliğe sahip, iki-bileşenli regülatör sitem üyesi, virülans
	38,94	354	isdA frpA sasE stbA	Demir- tarafından düzenlenmiş yüzey determinant protein A (Fur-tarafından düzenlenen protein A) (Stailokokal transferrin-bağlayan protein A)	P0C1S5	Duvar proteini, metal iyon bağlama,aderans
	39,16	356	SAPIG0822	Ggdef domain proteini	D2N5F2	İntegral membran-intrasellüler protein, duvar organizasyonu, biyosentetik siklik nükleotid süreci, intrasellüler sinyal aktarımı, fosforilasyon ile sinyal aktarımı
43	42,9	390	SAP067A_043	Biyofilm-ilişkili tepesi kesik yüzey proteini	D2JED7	Biyofilm oluşması
45	46,09	419	walK yycG	Sensör protein kinaz walK (EC 2.7.13.3) (Fragment)	A5A2P0	Membran proteini, iki-bileşenli regülatör sistem, kinaz, transferaz, peptidil-histidin fosforilasyon, fosforilasyon ile sinyal aktarımı
50	48,73	443	SAP075A_043	Bakteri hücre duvar-ilişkili biyofilm proteini	D2JEQ0	Biyofilm oluşması
	48,73	443	SAPIG2550	Fibronektin-bağlayan protein B	D2NA82	Bakteri hücre duvar protein, fibronektin-bağlayan,
	48,84	444	sasG SA2981_2433	Skuamöz nazal epitel hücrelere tutunan Virülans-ilişkili duvara bağlı protein SasG (LPXTG motif)	D3ET44	Salgılanıyor, ektrasellüler kesim/membrane, virülans
	50,6	460	tcaA SA2146	Membran-ilişkili protein TcaA	Q7A3X6	Tek geçişli membran proteini, metal iyon bağlayıcı, antibiyotik yanıtı/direnci, teikoplanin, vankomisin ve oksasilin gibi duvar proteinlerine yanıtta vraSR iki-bileşenli sistem tarafından trankripsiyonel regülâsyonu
52	53,24	484	SAPIG1480	Elastin-bağlayan protein EbpS	D2N7A6	Duvar makromolekülleri katabolizma süreci, adezyon
	53,24	484	SAPIG0122	Ig G bağlayan protein A	D2N3G2	Bakteri hücre duvar/salgı, membran proteini, virülans, hücre duvar makromolekülleri katabolizma süreci,
55	53,46	486	dltA SAPIG0915	Elastin-bağlayan protein ebpS	Q53630	Çoklu geçişli hücre membran proteini, transport, çözünür elastin peptidleri ve tropoelastinin *S.aureus* hücrelerine yapışmasının arttırılması, aderans
58 **60**	59,95	545	SAP077A_019 (SAP078A_043)	Bakteri hücre duvar-ilişkili biyofilm protein	D2JAN8	Salgılanıyor, ekstrasellüler kesim, biyofilm, membrane protein
65	64,24	584	lytS SAUSA300_0254	Sensör protein lytS (EC 2.7.13.3) (Autolysin sensor kinase)	Q2FK10	Membran proteini, ATP bağlayan, iki-bileşenli sensör activitesi, transport, sinyal aktarımı

Tablo 15. (devam) Stres yanıt ifade ürünlerinin muhtemel proteinlerini içeren havuz (62)

	64,35	585	mecR1 mecR	Metisilin direnç mecR1 protein	P0A0B1	Bakteri hücre duvarında PBP'lerin yerini alır. Antibiyotik direnci/yanıtı, peptidoglikan temelli duvar biyogenezi, penisilin bağlama, penisilin etkileşimli potansiyel antirepresör
	64,35	585	SAPIG2019	Reglatör protein blaR1	D2N8Q9	Bakteri hücre duvarında PBP'lerin yerini alır, antibiyotik direnci/yanıtı, peptidoglikan temelli hücre duvar biyogenezi, penisilin bağlama
	66,88	608	walK SAS0019	Sensör protein kinaz walK (EC 2.7.13.3)	Q6GD71	Çoklu geçişli hücre membran proteini, biyofilm oluşumu, duvar metabolizması ve otolizizde rol oynayan genlerin regülasyonunda rol alan iki-bileşenli walK/walR sistem üyesi
70	69,41	631	SAPIG2696	Lpxtg hücre duvar yüzeyi bağlı ailesi proteini	D2NAM8	Bakteri hücre duvar yüzeyi, biofilm oluşumu
	70,29	639	SAPIG1125	Demir-tarafından düzenlenen, hem-demir bağlayan protein	D2N6A2	Bakteri hücre duvar/salgı, membran protein, demir alma
	70,51	641	isdB SAA6159_00983	Demir -ilişkili domain-içeren protein	D9RG58	Bakteri hücre duvar/salgı protein, transport
72	70,95	645	isdB frpB sasJ sirH NWMN_1040	Demir-düzenleyen yüzey determinant protein B (Fur-tarafından düzenlenen protein B) (Stafilokokal demir düzenleyici protein H) (*Staphylococcus aureus* yüzey protein J)	A6QG30	Bakteri hücre duvar/salgı proteini, virülansta, demir bağlama
	71,72	652	isdB frpB sasJ sirH SAR1102	Demir-düzenleyen yüzey determinant protein B (Fur-tarafından düzenlenen protein B) (Stafilokokal demir düzenleyici protein H) (*Staphylococcus aureus* yüzey protein J)	Q6GHV7	Bakteri hücre duvar/salgı proteini, virülans, hemoglobin için primer reseptör, IsdA ve/veya isdB-hidrojen peroksit direnci
74	73,48	668	SAPIG0042	Penisilin-bağlayan protein 3 (Pbp 3) (Pspb20)	D2N382	Duvar biyogenzi, antibiyotik yanıtı, penisilin bağlanma
	73,48	668	mecA ORF35	MecA (Pbp2a) (Penisilin bağlayan protein 2 üssü) (Penisilin bağlayan protein 2') (Penisilin bağlayan protein 2a (PBP2a))	Q7DHH4	Bakteri hücre duvar biyogenzi, antibiyotik yanıtı, penisilin bağlanma
76	75,68	688	SAVG_02330	Duvar-ilişkili fibronektin-bağlayan protein	D6GZT8	Fibronektin-bağlayan
	76,01	691	SAPIG1617	Dimerleşen domainli penisilin-bağlayan protein ailesi	D2N7P3	Bakteri hücre duvar biyogenzi, penisilin bağlanma
	76,89	699	SABG_01372	Duvar-ilişkili fibronektin-bağlayan protein	C8A3X9	Fibronektin-bağlayan
80	79,2	720	SAPIG2679	Klamping faktör B (Fibrinojen-bağlayan protein B) (Fibrinojenreseptör B)	D2NAL2	Bakteri hücre duvar/salgı proteini, adezyon, reseptör aktivitesi
	79,64	724	M013TW_2463	Virülans-ilişkili duvara bağlı protein SasG	G8RED4	Membran/salgı/ekstrasellüler protein, virülans

Tablo 15. (devam) Stres yanıt ifade ürünlerinin muhtemel proteinlerini içeren havuz (62)

	79,97	727	SAPIG1450	Penisilin-bağlayan protein 1A/1B (PBP1)	D2N776	Bakteri hücre duvar proteini, Bakteri hücre duvar biyogenezi ve şekillenmesi, hidrolaz aktivite, penisilin bağlanma, transferaz aktivite
	79,97	727	pbp2	Penisilin-bağlayan protein 2	Q53724	Bakteri hücre duvar biyogenezi ve şekillenmesi, katalitik aktivite, penisilin bağlanma
	81,84	744	M013TW_0026	Virülans-ilişkili duvara bağlı protein SasH	G8RFD5	Nükleotid katabolizma reaksiyonu, virülans, hidrolaz aktivite, metal iyon ve nükleotid bağlanma
	84,15	765	SAFG_00456	Duvar-ilişkili fibronektin bağlayan protein	C8L4I4	Fibronektin-bağlayan
	84,48	768	M013TW_0026	Virülans-ilişkili duvara bağlı protein SasH	G8RFD5	Nükleotid katabolizma reaksiyonu, virülans, hidrolaz aktivite, metal iyon ve nükleotid bağlanma
	84,92	772	sasH SA2981_0023	Virülans-ilişkili duvara bağlı protein SasH (LPXTG motif); 5-nükleotidaz (EC 3.1.3.5)	D3ER64	Hidrolaz aktivite, nukleotid katabolizma reaksiyonu, virülans, 5'-nuükleotidaz aktivite, metal iyon ve nükleotid bağlanma
	85,03	773	SAPIG0025	Ser/Thr protein fosfataz ailesi proteini	D2N365	Hidrolaz aktivite, nükleotid katabolizma reaksiyonu, metal iyon ve nükleotid bağlanma
90	87,78	798	SAPIG0636	Serin-aspartat repeat-containing protein C	D2N4W6	Bakteri hücre duvar/salgı proteini, bakteri hücre adezyonu
105	100,43	913	clfB NWMN_2529	Klamping faktör B (Fibrinojen reseptör B) (Fibrinojen-bağlayan protein B)	O86476	Bakteri hücre yüzeyi, virülans, fibrinojene tutunma, nazal kaviteye tutunma
	101,97	927	clfA SAOUHSC_00812	Klamping faktör A (Fibrinojen reseptör A) (Fibrinojen-bağlayan protein A)	Q2G015	Bakteri hücre duvar/salgı proteini, bakteri hücre yüzeyi, fibrinojene tutunma, anti-fagositik etki
	104,17	947	sdrC SAUSA300_0546	Serin-aspartat tekrarı-içeren protein C	Q2FJ79	Bakteri hücre duvar/salgı proteini, bakteri hücre hüzeyi, adezyon, kalsiyum bağlanma
	105,27	557	sdrC SAS0519	Serin-aspartat tekrarı-içeren protein C	Q6GBS6	Bakteri hücre duvar/salgı proteini, bakteri hücre hüzeyi, adezyon, kalsiyum bağlanma
	108,79	989	clfA SA0742	Klamping faktör A (Fibrinojen reseptör A) (Fibrinojen-bağlayan protein A)	Q99VJ4	Bakteri hücre duvar proteini, bakteri hücre yüzeyi, virülans, fibrinojene tutunma, pagositozu azaltan etki, trombosit çökelme, endokardit
110	109,34	994	SAPIG2553	Fibronektin-bağlayan protein A	D2NA85	Bakteri hücre duvar/salgı proteini, fibronektin-bağlayan, bakteri hücre adezyonu,
	109,45	995	sdrC SAOUHSC_00544	Serin-aspartat tekrarı-içeren protein C	Q2G0L5	Duvar/salgı proteini, bakteri yüzeyi, kalsiyum bağlanma
	111,98	1018	fnbA SAOUHSC_02803	Fibronektin-bağlayan protein A	P14738	Bakteri hücre duvar/salgı proteini, virülans, bakteri hücre adezyonu, fibronektin-bağlama

Tablo 15. (devam) Stres yanıt ifade ürünlerinin muhtemel proteinlerini içeren havuz (62)

	113,19	1029	clfA SAR0842	Klamping faktör A (Fibrinojen reseptör A) (Fibrinojen-bağlayan protein A)	Q6GIK4	Bakteri hücre duvar/salgı proteini, virülans, bakteri hücre adezyonu, bakteri hücre yüzeyi, fibrinojen bağlanma
125	120,78	1098	SAAG_02044	Bakteri hücre duvar-ilişkili fibronektin-bağlayan protein (Fragment)	C7ZW51	Fibronektin bağlayan, virülans
	124,96	1136	ebh2 HMPREF0776_2456	Muhtemel hücre duvarı ilişkili fibronektin-bağlayan protein (Fragment)	C5N5J7	Fibronektin bağlayan, virülans
	125,51	1141	sdrE SAS0521	Serin-aspartat tekrarı-içeren protein E	Q6GBS4	Bakteri hücre duvar/salgı proteini, virülans, adezyon, bakteri yüzeyi, trombosit çökelme, endokardit, kalsiyum bağlanma
	126,94	1154	sdrE SAUSA300_0548	Serin-aspartat tekrarı-içeren protein E	Q2FJ77	Bakteri hücre duvar/salgı proteini, virülans, adezyon, bakteri yüzeyi, trombosit çökelme, endokardit, kalsiyum bağlanma
145	144,65	1315	sdrD NWMN_0524	Serin-aspartat tekrarı-içeren protein D	O86488	Bakteri hücre duvar/salgı proteini, virülans, adezyon, bakteri yüzeyi, kalsiyum bağlanma
	148,61	1351	sasA SAR2734	Serince zengin adezini adhesin (*Staphylococcus aureus* yüzey protein A)	Q6GDE9	Bakteri hücre duvar/salgı proteini, virülans, trombosite adezyon, bakteri yüzeyi, endovasküler enfeksiyonlar, Ca++ bağlanma
	150,15	1365	sdrD SAS0520	Serin-aspartat tekrarı-içeren protein D	Q6GBS5	Bakteri hücre duvar/salgı proteini, adezyon, bakteri yüzeyi, Ca++ bağ
	151,36	1376	SAPIG0637	Ser-Asp'ce zengin fibrinojen-bağlayan, kemik sialoproteini-bağlayan protein	D2N4W7	Bakteri hücre duvar/salgı proteini, bakteri adezyonunda rol oynar
	152,35	1385	sdrD SAV0562	Serin-aspartat tekrarı-içeren protein D	Q99W47	Bakteri hücre duvar/salgı proteini, adezyon, bakteri yüzeyi, Ca++ bağ

kDa: protein moleküler ağırlık ünitesi kilo Dalton; **aa:** proteinin amino asit uzunluğu

Birinci sütunda bakteri hücrelerinde ifade edilen ürünlerin elektroforetiplendirilmesinden elde edilen moleküler ağırlıklar; ikinci ve sonraki sütunlarda bu ağırlıklara karşılık gelen ve bakteri hücre duvar veya membranında yer alan muhtemel 72 adet proteinin, sırasıyla, moleküler ağırlığı, amino asit uzunluğu, gen isimleri, protein isimleri, veri bankasında erişim numaraları ve proteinlerin anahtar kelimeler halinde verilmiş fonksiyonları bulunmaktadır. 72 adet proteinin son sütunda görülen işlevleri renklerle kodlanmıştır (yeşil, Virülans ilişkili, 25 adet (%26,3); gri, Biyofilm ilişkili, 5 adet (%5,3); sarı, Transport , 4 adet (%4,2); pembe, adezyon ilişkili, 29 adet (%30,5); kırmızı stres yanıtı/direnç ilişkili, 15 adet (%15,8); mavi sinyal aktarımı ilişkili, 8 adet (%8,4) ve mor bakteri hücre duvarı yapımı ilişkili, 9 adet (%9,5)) olarak verilmiştir. 72 proteinlik havuzda antibiyotik stresine yanıt olarak ifade edilmesi muhtemel proteinler 32 adet olup bunlar üçüncü sütunda turkuvaz ile vurgulanmıştır.

Proteinler, elektroforetik incelemede yoğunlaşma, ortaya çıkma ve seyrelme veya kaybolma ifadesi gösteren bantlara göre gruplandığında dikkat çeken 27 kDa bant proteinleri, SAPIG1127 geninin kodladığı hem transportu ilişkili, SAPIG1979 geninin kodladığı stres sinyal iletimi yapan ve SAPIG0148 ve SAP102A_001 genlerinin kodladığı biyofilm oluşturma eğiliminde rol alan proteinlerdir. Antibiyotik stresi karşısında MRSA3'de kaybolan; MSSA1 ve MSSA2'de vankomisin stresi karşısında seyrelen veya kaybolan proteinler bu havuzda yer almaktadır.

Yine aynı grupta yer alan 20 ve 23 kDa bantları aynı protein havuzuna denk gelmektedir. Bu havuzda yer alan proteinlere baktığımızda, M013TW_2461 ve *sas*G SA2981_2432 genlerinin kodladığı virülans ilişkili iki proteinin olduğunu görmekteyiz.

Ortaya çıkma grubundaki 65 kDa proteine denk gelen protein havuzuna bakıldığında *lyt*S geninin kodladığı transport ve sinyal aktarımından sorumlu bir membran proteinine; *mec*R1 geninin kodladığı bakteri duvar biyogenezi ve penisilin bağlanma görevi olan bir proteine; SAPIG2019 geninin kodladığı ve penisilin bağlayan protein (PBP)'lerin yerini alabilen ayrıca antibiyotik direç/yanıtında rol alan BlaR1 düzenleyici proteinine ve son olarak *wal*K geninin kodladığı, bakteri duvar metabolizmasında rol alan ve iki-bileşenli walK/walR sistem üyesi Sensör protein kinaz WalK'nin yer aldığı 4 farklı proteinden görüyoruz. Ancak metisilin direnci kodlayan *mec*R1 gen ürününün MSSA2 ve MSSA3'de 65 kDa bant olarak ortaya çıkması beklenmediğinden bu proteinin var olma olasılığı dikkatlice ele alınmalıdır.

Seyrelme ve kaybolma grubundaki en dikkat çeken bantlar 80 ve 90 kDa proteinleridir. 80 kDa'ya karşılık gelen protein havuzuna bakıldığında SAPIG2679 geninin kodladığı ve adezyon eğiliminde olan Klamping faktör B; M013TW_2463 geninin kodladığı virülans ilişkili duvara bağlı protein SasG; SAPIG1450 geninin kodladığı PBP1; *pbp2* geninin kodladığı PBP2; M013TW_0026 geninin kodladığı virülans ilişkili duvara bağlı protein SasH; SAFG_00456 geninin kodladığı adezyon ilişkili fibronektin bağlayan protein; M013TW_0026 geninin kodladığı virülans ilişkili duvara bağlı protein SasH; SA2981_0023 geninin kodladığı transport ve virülans ilişkili protein; son olarak da SAPIG0025 geninin kodladığı transport ilişkili Ser/Thr protein fosfataz ailesi protein ile toplamda 9 adet protein bulunmaktadır. 90 kDa'ya karşılık gelen protein havuzuna bakıldığında SAPIG0636 geninin kodladığı adezyon ilişkili Serin-aspartat repeat-containing protein C protein görülmektedir.

Suşları gruplayıcı veya ayırt edici ifade eğilimleri proteom açısından incelendiğinde, MRSA1 ve MRSA2'de ayırıcı ifade eden 39 kDa banda karşılık gelen protein havuzunda, *gra*S geninin kodladığı virülans, sinyal aktarımı ve antibiyotik yanıtında (glikopeptid direnci)

görevli sensör histidin kinaz GraS proteini; SAPIG2551 geninin kodladığı adezyon ilişkili fibronektin bağlayan protein ve MW1012 geninin kodladığı adezyon ilişkili, aynı zamanda laktoferrisin ve H_2O_2 direnci sağlayan, stafilokokal transferring bağlayan protein A proteinlerinin olduğu görülmektedir. Bu protein havuzundan ortak ifade yapan MRSA1 ve MRSA2 ile yine metisilin dirençli olan MRSA3 karşılaştırmalı incelendiğinde, 45 kDa banta karşılık gelen sinyal aktarımında görevli sensör protein kinaz WalK'nın sonuncuda ifade azalması göstermediği, böylece bu dirençli suşların birbirinden farklandığı görülmektedir.

MSSA1 ve MSSA2'de ayırıcı ifade eden 31 kDa banda karşılık gelen protein havuzuna bakıldığında M013TW_2462 geninin kodladığı IgA peptidazı ve virülans ilişkili duvara bağlı protein SasG ve SAPIG0831 geninin kodladığı bakteri duvar yapımında rol alan LysM domain proteini bulunmaktadır. Bunun dışında, her iki antibiyotik stresinde ve tüm zamanlarda sadece MSSA1'de yoğunlaşan ve MSSA3'de kaybolan bant da bu havuzda bulunmaktadır.

MRSA2 suşu için ayırt edici 58 ve 60 kDa bantlarının protein havuzunda, SAP077A_019 geninin kodladığı biyofilm oluşturma eğiliminde olan bir membran proteini bulunmaktadır. MSSA3'de ise ifade olmayan 37 kDa banta karşılık gelen protein havuzunda, M013TW_2460 geninin kodladığı virülans ilişkili duvara bağlı SasG ve *ssp*A geninin kodladığı virülans ilişkili glutamil endopeptidaz proteini bulunmaktadır.

Proteom bulguları toplu olarak ele alındığında, vankomisin stresine karşı 27 kDa ağırlıkta, stres ve/veya biyofilm yapımından sorumlu dört gen (SAPIG1127, SAPIG1979, SAPIG0148, SAP102A_001) ürünü havuzdan ilgili protein(ler)in ifadesini, MRSA3 suşu dışında özgün olarak arttırdığı saptanmıştır. Yine bu küçük protein havuzundan ilgili proteinin vankomisin stresi karşısında özgün olarak tüm suşlarda ifadesini azalttığı, MSSA3'de ise oksasilinde de aynı azalmanın oluştuğu saptanmıştır. Yine bu havuz içerisindeki ilgili proteinin stres karşısındaki MSSA2 ve MSSA1'de özgül olarak ifadesini azalttığı saptanmıştır.

İncelenen suşlarda iki adet LPXTG motifi içeren özellikle SasG virülans proteinlerinin antibiyotik stresi karşısında suşların hemen hepsinde ifadesini arttırdığı, serin-aspartat tekrarı içeren protein C'nin ifadesinin genelde azaldığı görülmüştür. Ayrıca, *Clumping factor* B, SasG, PBP-1 ve -2 ve SasH ürünlerini içeren ayrıca 8 proteinlik havuzdan ilgili proteinlerin antibiyotik stresi karşısında ifadesini genelde azalttığı saptanmıştır.

TARTIŞMA

S. aureus'un moleküler yapısı iyi bilinmekle birlikte stres biyolojisi tam anlaşılmamıştır, ilgili çalışmalar kısıtlı ve yenidir. Kuroda ve ark. (14) bakterinin genomunun dizi analizi yapmış, Singh ve ark. (17) oksasiline karşı savunma yapan genlerin kromozomal lokusunu incelemiş, Shaw ve ark. (19) virülans determinantlarını araştırmış, ancak, Price (1) tarafından da vurgulandığı gibi bakterinin antibiyotik stresine yanıt veren genleri tam olarak ortaya konamamıştır. Oysaki antibiyotiklere duyarlı ve dirençli stafilokok enfeksiyonlarına karşı alternatif çözümler arasında, hastada antibiyotik başlanması sonrası bakterinin stres yanıt ifadelerini dizginleyecek "drug tasarımı" düşünülebilir. Bu tasarımları oluşturmak ve kliniğe yansıtmak için *S. aureus* stres yanıtının mega ve moleküler düzeyde anlaşılması gereklidir. Bu çalışmada *S. aureus*'un vankomisin ve oksasilin stresi karşısında ifade ettiği bakteri duvar stres yanıt proteinleri tek boyutlu elektroforez yöntemiyle aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Farklı mekanizmalara sahip ancak *S. aureus* bakteri duvarına etkili antibiyotikler olan oksasilin (Sigma, Almanya) ve vankomisin (Hospira, UK) bu çalışmada stres modeli olarak incelenmiştir. Bakterinin stres karşısındaki davranışları incelendiğinde ilk 5 sa içinde gelişen ve sonraki 19 sa içinde değişim göstererek yeni karaktere bürünen iki ifade fazı saptanmıştır. Bu esnada bakterinin duvarında yer alan ifade değişimlerinin 32 adet proteinlik bir havuzda yer alan proteinler tarafından oluşturulduğu ortaya konulmuştur. Bu proteinler işlev açısından incelendiğinde %24,4'ünün virülans işlevli, %4,8'inin biyofilm işlevli, %9,6'sının transport işlevli, %14,6'sının adezyon işlevli, %17,2'sinin stres yanıtı/direnç işlevli, %17,2'sinin genel sinyal aktarımı işlevli ve %12,2'sinin bakteri duvar yapımı işlevli olabileceği anlaşılmıştır.

Dengler ve ark. (48) yaptıkları benzer çalışmalarda benzer işlevsel yanıtlar elde ettklerini rapor etmişlerdir. Bu bilgiler bakterilerin antibiyotiğe maruziyet sonrasında stresi hemen algılayarak sinyal aktarımı ile duvar-membran geçirgenliğini değiştiren porin, iyon kanalları ve sekresyon makinelerini aktive ettiğini, eş zamanlı bakteri duvar yapımı, ve adezyon ilişkili proteinleri ile adapte olmaya çalıştığını, aynı zamanda stres/direnç ve virülans genleri ile stresi gidermek ve bakteriyel hücre içi mutasyon makineleri üzerinden evrilmek için ifadeye başladığını düşündürmektedir. Cordwell ve ark. (36) da çalışmalarında benzer hükme varmışlardır.

Çalışmada incelenen farklı suşların ifade ve yanıt benzerlik ve farklılıkları araştırılmıştır. Trakya suşlarının ifade ettiği 32 adet bakteri duvar proteininden 20 adedinin ortak ifade edildiği ve 12 adedinin bir algoritma içinde ayırıcı tanı sağladığı görülmüştür. Buna göre 7 suştan 2'sinin strese daha güçlü yanıt veren ancak birbirlerinden farklı fenotipte olduğu, diğer 5'inin benzer yanıt veren grubu oluşturduğu görülmektedir. Genelde Trakya suşları arasında ve onlarla standart suş arasında elektroforetik tipleme açısından beklenenden çok daha küçük farklılık görülmüştür. Bunun nedeni *S. aureus* bakterisinin strese karşı gelişkin yanıt repertuvarına sahip olması, böylece, genotipik varyasyonlara evrilmeye karşı direnç göstermesi olabilir. Nagao ve ark. (23) yaptıkları çalışmada benzer sonuçlara ulaşmışlardır. Bununla birlikte suşlar arasındaki küçük varyasyonların nededinin suşların farklı konaktan izole edilmiş olması ve doğada farklı streslere maruz kalmış olmaları olabilir. Périchon ve ark. (24) farklı coğrafyadan topladıkları uşlarda benzer varyasyonları göstermişleridr.

Yapılan çalışmada antibiyotiğe maruz kalacak bakteri yoğunluğu ve uygulanacak antibiyotik konsantrasyonu gerçek enfeksiyonu temsilen tasarlanmıştır. Bir başka deyişle enfeksiyon ajanı sıvı besiyerinde çoğaltılma sonrası dokudaki doğal popülasyonuna erişmiş ve ardından antibiyotik konsantrasyonuna maruz bırakılmıştır. Tüpteki kültür ortamında bakterinin ulaştığı yoğunluk ve ortamda gelişen ikinicil ve üçüncül derece reaksiyonlar kontrol tüpleri ile takip edilmiştir. Muhtemel olumsuzluklara engel olmak için kültürdeki besiyerleri antibiyotiğe maruz kalma veya kalmama durumlarında her 12 saatte bir tazelenmiştir. Benzer metodolojik yaklaşımın Markova ve ark. (32) tarafından kullanıldığı rapor edilmiştir.

Bakterinin antibiyotiğe karşı saptanabilir stres yanıtını subinhibitör konsantrasyonlarında vermediği, bu yanıtın sadece MİK konsantrasyonda geliştiği optimizasyon deneylerinde saptanmıştır. Halbuki bakteri üremesinin %20 oranından

başlayarak %100 engelleyen minimum inhibitör konsantrasyonları araştırıldığında bu değerlerinin birbirine oldukça yakın olduğu bulunmuştur. Bu sonuç göstermiştir ki bakteriler düşük antibiyotik seviyesini algılamakta ancak protein ifadesinde büyük değişikliği belirli seviyeden sonra yapmaktadır. Charpentier ve ark. (63) ve Toprak ve ark. (64) yaptıkları çalışmalarda erken algılamanın gerçekleşme sürecini açıklamış ve metodolojilerine buna göre tasarlamışlardır. Sözkonusu bakteriyel davranış muhtemelen mikroorganizmanın rakip koloni antibiyotiklerine karşı geliştirdiği evrimsel bir kazanımıdır. Bu nedenle çalışmadaki metisiline dirençli suşlar, kendi MİK değerleri çok daha yüksek olduğu halde standart suşun 10XMİK oksasilin konsantrasyonunda stresi algılamışlar ve konsantrasyon eşik değerin üzerinde olduğundan saptanabilir stres yanıtı vermişlerdir. Bu sonuç göstermektedir ki bakteride stres algılama ve yanıt geliştirme mekanizmaları aynı kontrol noktasından düzenlenmemektedir.

Yaptığımız çalışma lokal suşlarla yürütülmüş ve proteom analizi olarak tek boyutlu elektroforez kullanılmıştır. Bu şekilde, Cordwell ve ark. (36) çalışmalarında gösterilen sonuca götüren kromotografik analiz preparatları hazırlanmış ve üzerinde çalışılacak proteom evreni hakkında ön bilgiler elde edilmiştir.

Bant ağırlıklarının tahmini için çoklu moleküler ağırlık belirleyicileri kullanılmış ve biri standart cetvel olarak kullanılmak üzere seçilmiştir. Çalışmanın optimizasyonu boyunca yapılan tekrarlar, standart suşa ait prototipik bant profilini doğrulamıştır. Deneyler arasında standart bakteri ifadelerinde kısıtlı varyasyonlar gözlenmiş ve bunun quarum sensing mekanizması sonucu gelişen büyüme faz varyasyonuna bağlı olabileceği düşünülmüştür. Yarwood ve ark. (20) ile Morikawa ve ark. (40) çalışmalarında benzer sonuçları rapor etmişlerdir. Deneyler boyunca ortak besiyeri havuzu kullanılması, kültürden ara ekimler ile kontaminasyon kontrolü yapılması, bakterilerin düzenli pasajlanması ve sıvı besiyerine taze agar besiyerinden ekim yapılması ile büyüme faz varyasyonu dışındaki olasılıklar dışlanmıştır.

Bu çalışmaların yapılması esnasında alternatif bir MİK yöntemi geliştirilmiştir. 24 kuyucuklu plak kullanılarak uygulanan MİK yönteminin tüple yapılan klasik deneyle karşılaştırıldığında pratiklik ve sayısal ölçülebilirlik yönlerinden klasik deneyden üstün olduğu gösterilmiştir.

Çalışmada kullanılan deterjanın preparatta Bradford protein miktar tayini yöntemini verimsiz kıldığı görülmüş, Goel ve ark. (65) tarafından da gösterildiği gibi bunun *S. aureus* duvar bileşenleri ile etkileşimden kaynaklanabileceği düşünülmüş ve gereğinde lokal yükleme ile konsantrasyon takip edilmiştir.

Bakteriler antibiyotik ile uzun süre muamele edilerek dirençli suşlar oluşturulabilir. Çalışmada dokuz güne kadar süren stres uygulamaları yapılmış ancak dirençli suş gelişimine rastlanmamıştır. Diğer ekiplerin daha uzun süreli çalışmalarla dirençli suş geliştirebildiği bilinmektedir (35). Dirençli suş geliştirmek bu çalışmanın kapsamı dışında olduğundan çalışma bu yönde değerlendirilmemiştir.

Bu çalışmanın sonuçları *S. aureus* enfeksiyonuna karşı geliştirilebilecek ve bakteride stres yanıt proteinlerini hedefleyecek "drug tasarımı" çalışmalarına veri sağlamak açısından heyecan vericidir. Moellering ve ark. (45) *S. aureus* enfeksiyonlarına karşı yeni ve daha etkin tedavi ajanlarının gerekliliğini vurgulamaktadır. Çalışmamız devam ettirilerek ayrıntılı proteom analizi yapıldığında tam veri elde edilmesi mümkün olabilecektir. Bu şekilde süren çalışmalar ile (28,66) antibiyotiklere alternatif tedavi yöntemlerini ön gören ve gen veya gen ürünü hedefleyici moleküler drug geliştirme çalışmaları ümit vaad edicidir.

SONUÇLAR

1. Trakya bölgesinden izole edilen patojen *S. aureus* bakterileri ve standart suş normal koşullarda 32 adet elektroforetik banta karşı gelen bir ifade yapmaktadır. Mega analiz sonuçlarına göre bunlardan 20 adedi tüm suşlar arasında ortaktır. Bu sonuç bakterilerin coğrafya içinde büyük farklılaşma geçirebildiğini göstermektedir.
2. *S. aureus* bakterisi okasilin veya vankomisin stresine maruz kaldığında 5 saat içinde bir stres yanıtı geliştirmekte, bu yanıt sonraki 19 saat içinde değişim göstererek yeni karakteriyle devam etmektedir. Bu sonuç stres yanıtının iki fazlı ortaya çıktığını göstermektedir.
3. İncelenen 7 suşun arasında MSSA3 ve MRSA2 suşları antibiyotik stresine özgün ama birbirinden farklı profilde en yüksek yanıt veren suşlardır. Diğer beş suş ise birbirlerine daha benzer ortaklıklar taşıyarak daha zayıf yanıt vermektedir. 25 ve 31 kDa bantları MSSA1 ve MSSA2 için, 24 ve 39 kDa bantların MRSA1 için ve 27 kDa bantın MRSA3 için ayırt edici özgünlükte olduğu saptanmıştır. Bu sonuç bakterilerin strese yanıtta farklı proteinleri ifade edebildiğini göstremektedir.
4. Mega proteom analizinde çalışmadaki 7 adet *S. aureus* bakterisinin 72 muhtemel proteinlik havuzdan ifade yaptığı ve bunun 32 proteinlik kısmının strese yanıtta rol aldığı bulunmuştur. Bu havuzun işlevsel açıdan %41,6 oranında virülans ve stres/direnç yanıtından sorumlu stres proteinlerini, geri kalanının sinyal, duvar yapımı, transport ve biyofilm/adezyon işlevlerinden sorumlu proteinlerden oluştuğu bulunmuştur. Oksasilin veya vankomisin stresi karşısında 32 proteinlik havuzun 23 proteinlik kısmında tüm bakterilerde mutlaka değişiklik olduğu saptanmıştır.

Çalışmada elektroforetiplerin metisiline direnç veya duyarlılık açısından özgün protein ifade profili göstermediği anlaşılmıştır. Bu sonuç bakterilerin stres karşısında yukarıda verilen 6 ana gen grubunda ifade yaptığını göstermektedir.

5. Suşlarda LPXTG motifli SasG virülans proteinlerin ifadesinin antibiyotik stresi karşısında baskın arttığı; serin-aspartat tekrarlı protein-C, klamping faktör B, SasG, PBP-1 ve -2 ve SasH ürünlerini içeren 8 proteinlik havuzdan ilgili proteinlerin ifadesinin antibiyotik stresi karşısında 5 saatte ani düştüğü saptanmıştır. MSSA1 ve MSSA2 suşlarında stres ve/veya biyofilm yapımından sorumlu 25 kDa'luk gen ürünü havuzundan (SAPIG1127, SAPIG1979, SAPIG0148, SAP102A_001) ilgili protein ifadesinin vankomisine özgü azaldığı; MRSA3 dışında kalan suşların %86'sında 27 kDa'lık ilgili protein ifadesinin strese karşı arttığı; suşların %71'inde 24 kDa protein ifadesinin mutlaka arttığı saptanmıştır.
6. Çalışmada 24 çukurlu plakta yapılabilen pratik bir MİK deney tekniği geliştirildi (56) ve bunun tüpte yapılan klasik MİK deneyi ile boy ölçüşebilir düzeyde sağlıklı sonuç verdiği, pratik ve zaman bakımından avantajlı olduğu gösterilmiştir.
7. *S. aureus* duvar proteinlerinin asetonlanmış bakteriden %4 SDS içeren TRIS tampon içerisinde 5 dk 100 ^{o}C'de kaynatılarak verimli bir şekilde izole edilebileceği gösterilmiştir.
8. Bu çalışmada tek boyutlu elektroforetiplendirme ile sınırlı bir proteom analizi yapılabildiği ve içerisinde dizi analizi için kromotografi ünitesine gönderilmeye hazır bantları içeren örneklerin üretilebildiği ortaya konmuştur.

ÖZET

Bu çalışma, antibiyotik stresi karşısında farklı *Staphylococcus aureus* suşlarının ifade ettiği stres yanıtlarını karşılaştırmalı incelemek amacıyla yapıldı. Metisilin duyarlı 4 ve metisilin dirençli 3 suş sıvı kültürde ve 1MİK değerde (MRSA suşları için standart suşun 10 MIK değerinde) oksasilin (Sigma, Almanya) veya vankomisine (Hospira, UK) 5 veya 24 saat maruz bırakıldı. Suşların duvar ve membran proteinleri izole edilerek tek boyutlu SDS-PAGE elektroforezde elektroforetiplendirme yapıldı ve muhtemel proteinlerin oluşturduğu kısıtlı proteom evreni kullanılarak stres yanıtları analiz edildi.

Antibiyotik stresine maruziyet sonrasında bakterinin 5 saat içinde bir stres yanıtı geliştirdiği, sonraki 19 saat içinde yanıtın yeni karakterine değiştiği görüldü. Elektroforetiplendirme çalışmasında saptanan 32 adet farklı elektroforetik banttan 20 adedinin tüm suşlarda ortak ifade edildiği ve 23 adedinin strese yanıtta rol aldığı saptandı. Proteom evrenini tahmin çalışmasında 32 adet elektroforetipik bantın 72 adet proteinle eşleştiği, bu proteinlerin 32'siyle oluşan bir havuzun strese yanıtta rol aldığı ve mega analizde bunun 23 adedinin tüm bakterilerde stres karşısında mutlaka değiştiği saptandı. 32 adet proteinin işlevsel incelemesi yapıldığında bunun %41,6'lık kısmının virülans ve stres/direnç yanıtından, geri kalanının sinyal, duvar yapımı, transport ve biyofilm/adezyondan sorumlu olduğu bulundu. Antibiyotik stresi karşısında ifadesi değişen muhtemel proteinler incelendiğinde, LPXTG motifli SasG proteininin ifadesinin arttığı, serin-aspartat tekrarlı protein-C, klamping faktör B, SasG, PBP1, PBP-2 ve SasH proteinlerinden oluşan havuzundan bazılarının ifadesinin azaldığı saptandı. Bakterilerin antibiyotiğe duyarlılığı ile strese yanıtları arasında bir ilişki gözlenmedi.

Bu çalışmanın sonuçları *S. aureus* enfeksiyonuna karşı geliştirilebilecek ve bakteride stres yanıt proteinlerini hedefleyecek drug tasarımı çalışmalarına veri sağlamaktadır. Bu tip tedavi ajanları antibiyotiklere alternatif veya kombine tadavi ajanı olarak düşük doz antibiyotik kullanımı için ümit vaad edicidir.

Anahtar kelimeler: stres, *Staphylococcus aureus*, proteom

STRESS RESPONSE OF *Staphylococcus aureus* AGAINST VANCOMYCIN AND METHICILLIN

SUMMARY

Stress response of *Staphylococcus aureus* strains were comparatively investigated following antibiotic treatment. Four methicillin-sensitive and three methicillin-resistant strains were treated with MIC of oxacillin (Sigma, Germany) or vancomycin (Hospira, UK) for 5 or 24 hours (10 x MIC of oxacillin of the standard strain for MRSA strains). Cell wall and membrane proteins were isolated, their electrophoretyping were identified using one dimensional SDS-PAGE electrophoresis, and the stress responses of the strains were analyzed using a particular set of possible proteins.

The strains developed stress response in 5 hours and changed it to new character in consecutive 19 hours. 20 out of 32 bands of the electrophoretyping study expressed in all strains, and 23 of them involved in stress response. In prediction of a particular set of possible proteins, 72 proteins matched with 32 electrophoretyping bands, a 32 protein pool had a role in stress response, and 23 of them changed in all strains in mega analysis. %41,6 of the 32 proteins were responsible from stress/resistance and virulence, and the rest from signalization, cell wall biogenesis, transport and biofilm formation/adhesion. Expression of SasG protein with LPXTG motive increased, and some members of protein-C with serine-aspartate repeats, clamping factor B, SasG, PBP-1 and -2 and SasH group decreased in response to stress. No correlation was detected between sensitivity level of the strains and stress responses.

The results of this study provide data for drug design studies targeting *S. aureus* stress response proteins. These types of drugs can be alternative for antibiotics and promising agents in combination therapy with low-dose antibiotics.

Keywords: stress, *Staphylococcus aureus*, proteome

KAYNAKLAR

1. Price CW. The general stress response B. subtilis and related Gram-positive bacteria. In: Storz G, Hengge R, (Eds). Bacterial stress response. 2nd ed. ASM press, Washington DC; 2011.p.301.

2. Sayers EW, Barrett T, Benson DA, Bolton E, Bryant SH, Canese K, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Research 2012;40:13–25.

3. Dos PD, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA et al. The Firmicutes. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. Springer Science+ Bussiness Media LLC, New York, USA 2009.

4. Kutlu SB. Çeşitli klinik materyallerden izole edilen materyellerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında metisiline direnci ve E-test ile vankomisin MIC değerlerinin araştırılması (tez). İstanbul: T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 2006.

5. Dündar V, Dündar DÖ. Stafilokok enfeksiyonları. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2008. s.2065-77.

6. Neidhardt FC. Bacterial structures. In: Ryan KJ, Ray CG, (Eds). Sherris Medical Microbiology An Introduction to Infectious Diseases. 4th ed. New York: McGraw Hill; 2004. p.11-25.

7. Ryan KJ. Staphylococci. In: Ryan KJ, Ray CG, (Eds). Sherris Medical Microbiology An Introduction to Infectious Diseases. 4th ed. New York: McGraw Hill; 2004. p.261-71.

8. Bannerman TL, Peacock SJ. Gram-positive cocci *staphylococcus*, *micrococcus*, and other catalase positive cocci. In: Murray PR, Baron AJ, Jorgensen JH. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington, D.C.: ASM press; 2007. p.390-411.

9. Kingsbury DT, Wagner GE, Segal GP. Gram-positive cocci: Staphylococci, streptococci, and pneumococci. In: Microbiology. Pennsylvania: Harwal publishing co.; 1985. s.81-94.

10. Navarre WW, Schneewind O. Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. Microbiol Mol Biol Rev 1999;63(1):174–229.

11. Sibbald MJJB, Ziebandt AK, Engelmann S, Hecker M, Jong A, Harmsen HJM. Mapping the pathways to Staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. Microbiol Mol Biol Rev 2006;70(3):755–88.

12. Ünal T. İnsan ve hayvan kökenli *Staphylococcus aureus* izolasyonlarının fenotipik ve genotipik özellikleri üzerine çalışmalar (tez). Kırıkkale: Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi; 2007.

13. Hair PS, Ward MD, Semmes OJ, Foster TJ, Cunnion KM. *Staphylococcus aureus* clumping factor A binds to complement regulator factor I and increases factor I cleavage of C3b. J Infect Dis 2008;198:125–33.

14. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I et al. Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 2001:357;1225–40.

15. Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, Deboy RT, Ravel J et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. J Bacteriol 2005;187(7):2426–38.

16. Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang YW, Unger ER, Relman DA et al. Moleküler mikrobiyoloji tanı prensipleri ve uygulamaları. (Çeviri: Tekeli A, Ustaçelebi Ş). Alpay Azap (Editör) Bakteriyel infeksiyonların tanı tedavi ve kontrolünde genomik bilginin uygulanması: *Staphylococcus aureus* modeli. Ankara: Palme Yayıncılık; 2006. s.408-18.

17. Singh VK, Moskovitz J, Wilkinson BJ, Jayaswal RK. Molecular characterization of a chromosomal locus in *Staphylococcus aureus* that contributes to oxidative defence and is highly induced by the cell-wall-active antibiotic oxacillin. Microbiology 2001;147:3037–45.

18. Clements MO, Foster SJ. Stress resistance in *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol 1999;7:458-62.

19. Shaw LN, Aish J, Davenport JE, Brown MC, Lithgow JK, Simmonite K et al. Investigations into σ^B-modulated regulatory pathways governing extracellular virulence determinant production in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 2006;188(17):6070–80.

20. Yarwood JM, Schlievert PM. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. J Clin Invest 2003;112:1620–25.

21. Tsuji BT, Lean RDM, Dresser LD, Gavin MJM, Simor AE. Impact of accessory gene regulator (agr) dysfunction on vancomycin pharmacodynamics among Canadian community and health-care associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2011;10:20.

22. Cheung AL, Chien YT, Bayer AS. Hyperproduction of alpha-hemolysin in a sigB mutant is associated with elevated SarA expression in *Staphylococcus aureus*. Infect Immun 1999;67(3):1331–7.

23. Nagao M, Okamoto A, Yamada K, Hasegawa T, Hasegawa Y, Ohta M. Variations in amount of TSST-1 produced by clinical methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates and allelic variation in accessory gene regulator (agr) locus. BMC Microbiology 2009;9:52.

24. Périchon B, Courvalin P. VanA-Type Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2009;53(11):4580–87.

25. Tang YW, Stratton CW. Advanced techniques diagnostic microbiology. In: Francois P, Schrenzel J. (Eds) Rapid screening and identification. 9th ed. NewYork: Springer Science+Business Media, LLC; 2006. p.411-26.

26. Komatsuzawa H, Sugai M, Ohta K, Fujiwara T, Nakashima S, Suzuki J, Lee C Y, Suginaka H. Cloning and characterization of the fmt gene which affects the methicillin resistance level and autolysis in the presence of triton X-100 in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1997;41(11):2355-61.

27. Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. Penicillin-binding proteins and ß-lactam resistance. FEMS Microbiology Reviews 2008;3:2361–85.

28. Callum NM, Bächi BB, Senn MM. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol 2010;300:118–29.

29. Moreira B, Boyle-Vavra S, Jonge BL, Daum RS. Increased production of penicillin-binding protein 2, increased detection of other penicillin-binding proteins, and decreased coagulase activity associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1997;41(8):1788.

30. Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. Lancet 2001;1:147–55.

31. Morikawa K, Maruyama A, Inose Y, Higashide M, Hayashi H, Ohta T. Overexpression of sigma factor, σB, urges *Staphylococcus aureus* to thicken the cell wall and to resist ß-lactams. Biochem Biophys Res Commun 2001;288:385–9.

32. Markova N, Haydoushka I, Michailova L, Ivanova R, Valcheva V, Jourdonava M et al. Cell wall deficiency and its effect on methicillin heteroresistance in *Staphylococcus aureus*. Int J Antimicrob Ag 2008;31:255–60.

33. Lakhotia SC. Stress biology a paradigm for integrative biology. Biology International The News Magazine of The International Union of Biological Sciences (IUBS) 2001;40:1-2.

34. Dikici A. Çevresel stres faktörlerine karşı bakteriyel adaptasyonlar ve mekanizmaları. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi 2009;4(3):59-68.

35. Pietiäinen M. Stress responses of Gram-positive bacteria to cationic antimicrobial peptides. National Institute for Health and Welfare 2010;36.

36. Cordwell SJ, Larsen M.R, Cole RT, Walsh BJ. Comparative proteomics of *Staphylococcus aureus* and the response of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains to Triton X-100. Microbiology 2002;148:2765–81.

37. Hecker M, Schumann W, Völker U. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol 1996;19(3):417-28.

38. Chan PF, Foster SJ, Ingham E, Clements MO. The *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor σB controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model. J Bacteriol 1998;180(23):6082–9.

39. Chowdhury R, Sahu GK, Das J. Stress response in pathogenic bacteria. J Biosciences 1996;21(2):149–60.

40. Morikawa K, Ohniwa RL, Ohta T, Tanaka Y, Takeyasu K, Msadek T. Adaptation beyond the stress response: Cell structure dynamics and population heterogenecity in *Staphylococcus aureus*. Microbes Environ 2010;25(2):75-82.

41. Schaik W, Tjakko A. The role of σB in the stress response of Gram-positive bacteria–targets for food preservation and safety. Curr Opin Biotechnol 2005;16(2): 218-24.

42. Wenstern RA, Heiden MK. Multiple drug resistant pathogenes: Epidemiology and control. In: Jarvis WR. Bennett & Brachman's Hospital Infections. 5th ed. Philadelphia, PA. Lippincott-Raven 2007;p.215-36.

43. Çıtak S, Karaçocuk E. Hastane ve toplum kaynaklı metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılığı. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2004;26(1):13–17.

44. Emori TE, Gaynes RP. An Overview of Nosocomial Infections, Including the Role of the Microbiology Laboratory. Clin Microb R 1993, Vol. 6, No. 4, 428-42.

45. Moellering RC. MRSA: the first half century. J Antimicrob Chemother 2012;67:4–11.

46. Horsburgh MJ, Aish JL, White IJ, Shaw L, Lithgow JK, and Foster SJ. σ^B modulates virulence determinant expression and stress resistance: Characterization of a functional rsbU strain derived from *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 2002;184(19):5457–67.

47. Utaida S, Dunman PM, Mecapagal D, Murphy E, Projan SJ, Singh VK et al. Genome-wide transcriptional profiling of the response of *Staphylococcus aureus* to cell-wall-active antibiotics reveals a cell-wall-stress stimulon. Microbiology 2003;149:2719–32.

48. Dengler V, Meier PS, Heusser R, Bächi BB, Callum NM. Induction kinetics of the *Staphylococcus aureus* cell wall stress stimulon in response to different cell wall active antibiotics. BMC Microbiology 2011;11(16):1471-2180.

49. Tekin A. Trakya Üniversitesi Sağlık, Araştırma ve Uygulama Merkezi Sağlık Çalışanlarında metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) taşıyıcılık oranlarının belirlenmesi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2010.

50. Siempos II, Fragoulis KN, Falagas ME. World wide web resources on control of nosocomial infections. Crit Care 2007;11:101.

51. Karahocagil MK, Yaman G, Göktaş U, Sünnetçioğlu M, Çıkman A, Bilici A ve ark. Hastane Enfeksiyon Etkenlerinin ve Direnç Profillerinin Belirlenmesi. Van Tıp Dergisi: 2011;18(1):27-32.

52. The EARSS Management Team, members of the Advisory Board, and national representatives of EARSS. Antimicrobial resistance in Europe. In: The European Antimicrobial Resistance Surveillance System Annual Report 2008. Netherlands. Antimicrobial Resistance in Europe Publication, Bilthoven, 2008, p.57.

53. Çağatay AA. Yoğun bakım birimlerinde antibiyotik direnç problemi ve tedavide güncel durum: Gram-pozitif bakteriler (MRSA, VRE). Türk Yoğun Bakım Derneği Dergisi 2007;5:23–24.

54. Yalçın AN. Yoğun bakım ünitesinde antibiyotik kullanımı ve direnç sorununa genel bakış; ANKEM Dergisi 2009;23:136-42.

55. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests For Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Seventh Edition. CLSI document M7-A7 (ISBN 1-56238-587-9) 2006.

56. Aleese FM, Wu SW, Sieradzki K, Dunman P, Murphy E and Projan S. Overexpression of Genes of the Cell Wall Stimulon in Clinical Isolates of Staphylococcus aureus Exhibiting Vancomycin-Intermediate-*S. aureus*-Type Resistance to Vancomycin. J Bacteriol 2006;188(3):1120–33.

57. Harris LG, Foster SJ, Richards RG. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying S. aureus adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. Eur Cells Mater 2002;4:39-60.

58. Ürün Ş. Bitki patojenleri Pectobacterium carotovorum, Pectobacterium atrosepticum ve Erwinia amylovora'da RelA proteininin western blot yöntemiyle araştırılması (tez). Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi; 2008.

59. Bhaduri S, Demchick PH. Simple and rapid method for disruption of bacteria for protein studies. Appl Environ Microbiol 1983;46(4):941-3.

60. Akış N, Sayhan O, Karaçavuş A, Töreci K. Immunogenicity and specificity of *Salmonella typhimurium* outer membrane antigens. J Cell Mol Biol 2003;2:91-7.

61. Güven D. Salmonella'da strese yanıt gen ifadelerinin elektroforetik tiplendirilmesi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2012.

62. UniProtKB-Protein Knowledgebase, UniProt consortium, http://www.uniprot.org/, (ET: 11/07/2012).

63. Charpentier X, Polard P, Claverys JP. Induction of competence for genetic transformation by antibiotics: convergent evolution of stress responses in distant bacterial species lacking SOS. Curr Opin Microbiol 2012;15;1–7.

64. Toprak E, Veres A, Michel J, Chait R, Hartl DL, Kishony R. Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. Nat Genet 2011;44:101-5.

65. Goel R, Phillips-Mason PJ, Raben DM, Baldassare JJ. Alpha-thrombin induce rapid and sustained Akt phosporilation by beta-arrestin 1-dependent and -independent mechanisms, and only the sustained Akt phosporilation is essential for G1 phase progression. J Biol Chem 2002;277:18640.

66. Yan N, Shi Y. Allosteric activation of bacterial stress sensor. Cell 2007;131:441.

TABLOLAR VE ŞEKİLLER LİSTESİ

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Klinik öneme sahip *Staphylococcus* türlerinin özellikleri

Tablo 2. *S. aureus* suşlarında bulunan direnç ilgili genler

Tablo 3. Van 100. Yıl Üniversitesi hastastanesinde 2008 yılında hastane enfeksiyonuna neden olan mikroorganizmaların dağılımı

Tablo 4. Trakya Üniversitesi Hastanesinde 2010 yılında S.aureus kolonizasyonu ile ilgili veriler

Tablo 5. Çalışmada kullanılan bakteri suşlarının özellikleri

Tablo 6. Optimizasyon çalışmalarında uygulanan stres koşulları

Tablo 7. 12 saat kültür besiyerinde McF bulanıklığı, bakteri sayıları ve deneyde kullanılan antibiyotik miktarları

Tablo 8. BSA kalibratörlerinin hazırlanması

Tablo 9. Standart yöntemle belirlenen MİK ve ara dilüsyon sonuçları

Tablo 10. Standart suşun stres yanıtı optimizasyon sonuçları

Tablo 11 Dört optimizasyon deneyi ve bir sonraki başlıkta açıklanan Trakya suşları ile yapılan maruziyet deneyinde kontrol ekstraktlarından elde edilen bantların kDa ağırlıkları

Tablo 12. Dördüncü optimizasyon deneyinde antibiyotiğe karşı stres yanıt bant sonuçları

Tablo 13. Stres yanıt ifade ürünlerinin elektroforetiplendirme deneylerinde standart suş ve Trakya suşlarına ait antibiyotiksiz kontrol tüplerinden elde edilen bantlar

Tablo 14. Antibiyotiğe karşı stres yanıt ifadelerinin elektroforetipik analiz sonucu

Tablo 15. Stres yanıt ifade ürünlerinin muhtemel proteinlerini içeren havuz
Tablo 16. Araştırmanın süreçlendirilmesi

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Gram-pozitif bakteri duvar yapısı
Şekil 2. *S.aureus*'un moleküler yapıları
Şekil 3. *S. aureus* N315'in kromozomunun halkasal sunumu ve Mu50'ye özgü genetik elementler
Şekil 4. Vankomisin direnci kodlayan Tn1246 molekülü
Şekil 5. σB'nin S. aureus genomunda regüle ettiği genler
Şekil 6. *S. aureus*'un neden olduğu enfeksiyonlar
Şekil 7. Bazı bakteriler ve *S. aureus*'un kazandığı direnç ve zaman grafiği
Şekil 8. 2008 yılında hastalık etkeni olarak izole edilen *S. aureus* suşlarında MRSA oranı
Şekil 9. Kanlı agarda üreyen standart suşun koloni yapısı
Şekil 10. McF değerinin CFU/mL değerine çevrimini sağlayan grafik
Şekil 11. Oksasilin MİK deneyinde MİK değerinin saptanması
Şekil 12. Oksasilin MİK deneyinde MİK değerinin 24 kuyucuklu plakta saptanması
Şekil 13. Oksasilin ve Vankomisin için üremeyi %20, %50 ve %80 oranında inhibe eden konsantrasyonu saptama grafiği.
Şekil 14. Bradford Standart Değerler Eğrisi
Şekil 15. Bakteri sitoplazma ve duvar bileşenlerinin karşılaştırmalı elektroforez sonucu
Şekil 16. Standart suşunun 24 saat ile 9 gün arasında antibiyotiğe maruz kalması sonucu elde edilen stres yanıt ifade ürünlerinin elektroforetiplendirme jeli
Şekil 17. MSSA2 suşunun antibiyotiğe karşı stres yanıt ifade ürünlerinin elektroforetiplendirme jeli
Şekil 18. MRSA3 suşunun antibiyotiğe karşı stres yanıt ifade ürünlerinin elektroforetiplendirme jeli
Şekil 19. Saptanan stres yanıt proteinlerinin işlevsel dağılımı

ÖZGEÇMİŞ

Samet Alboy, 1985 yılında Kırklareli'nin Pehlivanköy ilçesine bağlı Doğanca Köyü'nde doğdu. İlkokul eğitimini Doğanca'da tamamladı. 1996 yılında giriş yaptığı Babaeski Anadolu Lisesi'nde ortaokul ve lise öğrenimini 2003 yılında tamamladı. 2004-2005 öğrenim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde başladığı lisans eğitiminden 2009 yılında mezun olarak aynı yıl içerisinde Trakya Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda tezli yüksek lisans programına başladı. 2010-2011 eğitim yılı güz döneminde Ulusal Ajans burslu, altı ay süre ile Almanya'nın RWTH Aachen Üniversitesi'nde Erasmus değişim öğrencisi olarak eğitimini sürdürdü. 2011 yılında ORPHEUS-İzmir toplantısı, 2012 yılında Host/Pathogen Interplay-Berlin toplantısı ve ayrıca Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Kongresi için katılım bursları kazandı; uluslararası ORPHEUS-İzmir toplantısında sözlü İngilizce bildiri sundu. Trakya Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında sürdürdüğü bilimsel araştırma projesi kapsamında bakteri kültürü, antibiyotik stres çalışmaları, prokaryotik hücre duvar protein izolasyonu, SDS-PAGE ve biyoinformatik analiz gibi moleküler yöntemleri içeren tez çalışmalarına devam etti. Üç bilimsel bildiri yayını bulunmakta olup, ayrıca 2009 yılında Dirimbilim (eski adıyla Biyologlar.net) elektronik dergisinde biyoloji meslek camiasıyla ilgili yazıları ve mizahi çizimleri yayınlandı. Samet Alboy, A1 düzey Almanca, B2 düzey İngilizce bilmektedir.

EKLER

Ekler bölümünün anlatımı aşağıda listeklenmiş başlıklar halinde sunulmuştur.

EK-1: ETİK KURUL ONAYI

EK-2: TÜBAP ONAYI

EK-3: KULLANILAN TAMPON VE JEL FORMÜLLERİ

EK-4: KULLANILAN GEREÇLER

EK-5: ARAŞTIRMANIN SÜREÇLENDİRİLMESİ

EK-1: ETİK KURUL ONAYI

T.C. TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA DEĞERLENDİRME KOMİSYONU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜBADK 2011/55	
	PROTOKOL ADI	Staphylococcus Aureus'un Vankomisin ve Metisilme Karşı Savunma Faktörlerinin Analizi	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Doç. Dr. Neşe AKIŞ	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	☒ Tek Merkez ☐ Ulusal	☐ Çok Merkez ☐ Uluslararası

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No: 05/ 17** **Tarih: 23.02.2011**
	Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında görevli Doç. Dr. Neşe AKIŞ'ın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen çalışmanın Bütçenin planlanması ile ilgili yapılan protokol değişikliğinin etik ve bilimsel standartlar açısından uygun olduğuna mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.
DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜBADK Yönergesi

ÜYELER

Ünvanı/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Hakan KARADAĞ Başkan	Farmakoloji	T.Ü.T.F Farmakoloji A.D	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Doç. Dr. Hasan ÜMİT Başkan Yardımcısı	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F İç Hastalıkları A.D	E	E☐ H☐	E☐ H☐	
Doç. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Üye	Çocuk Sağ. ve Hast.	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E☐ H☒	E☒ H☐	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. BiyoistatistikA.D.	K	E☐ H☒	E☒ H☐	
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR Üye	Tıbbi Biyoloji	T.Ü.T.F. Tıbbi Biyoloji A.D.	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Üye	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E☐ H☒	E☒ H☐	
Doç. Dr. Tunç KUTOĞLU Üye	Anatomi	T.Ü.T.F. Anatomi A.D.	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Doç. Dr. Erhan TABAKOĞLU Üye	Göğüs Hastalıkları	T.Ü.T.F. Göğüs Hastalıkları A.D.	E	E☐ H☐	E☒ H☐	
Doç. Dr. Figen KULOĞLU Üye	Enfeksiyon Hastalıkları	T.Ü.T.F. Enfeksiyon Hastalıkları A.D.	K	E☐ H☒	E☒ H☐	
Doç. Dr. Ömer Nuri PAMUK Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Prof. Dr. Yener YÖRÜK Üye	Göğüs Cerrahisi	T.Ü.T.F. Göğüs Cerrahisi A.D.	E	E☐ H☐	E☐ H☐	
Doç. Dr. Recep YAĞIZ Üye	Kulak, Burun ve Boğaz Hastalıkları	T.Ü.T.F. K.B.B. Hast. A.D.	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Doç. Dr. Ümit Nusret BAŞARAN Üye	Çocuk Cerrahisi	T.Ü.T.F. Çocuk Cerrahisi A.D.	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Yrd. Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Avukat Gülden ATİLLA ÖZTÜRK Üye		T.Ü. Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürlüğü	K	E☐ H☐	E☒ H☐	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Murat DİKMENGİL
Dekan

EK-2: TÜBAP ONAYI

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
İdari ve Mali İşler Daire Başkanlığı

SAYI : B.30.2.TRK.0.73.00.00/ 1946 -6853
KONU :

EDİRNE
07 NİSAN 2011

Sayın Doç. Dr. Neşe AKIŞ
Trakya Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
EDİRNE

Yöneticiliğini yapmış olduğunuz yüksek lisans öğrencisi Samet ALBOY'un "*Staphylococcus Aureus*'un Vankomisin ve Metisiline Karşı Savunma Faktörlerinin Analizi" başlıklı yüksek lisans projesinin, 6 (altı) ay süre 6.999,00 TL ile desteklenmesine, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun 29.03.2011 tarih ve 2011/02 sayılı toplantısında mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilimsel Araştırma Projeleri Yönergesi'nin 12. maddesi uyarınca düzenlenen ve ekte sunulan Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Sözleşmesi'nin tarafınızca imzalanarak 1 (bir) hafta içinde Rektörlüğe iletilmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Beyhan KARAMANLIOĞLU
Rektör Yardımcısı ve
Komisyon Başkanı

EK: 1 adet protokol sözleşmesi

Posta Adresi
Trakya Üniversitesi Rektörlüğü
22050 Karaağaç/ EDİRNE

Tel : 0 284 223 13 85 Faks : 0 284 223 08 48
e-mail: tubap@trakya.edu.tr

EK-3: KULLANILAN TAMPON VE JEL FORMÜLLERİ

PBS

10X stok çözelti için 80 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g KH_2PO_4 800 mL ultra saf suda çözüldü, pH 7,3'e ayarlandı, hacim ultra saf su eklenerek 1000 mL'ye tamamlandı, otoklavlandı, kullanım öncesi ultra af su ile 1/10 seyreltilerek 1X seyreltmede kullanıldı.

İzolasyon TRIS tamponu, pH 7,4

1 M stok çözelti için 12,1 g TRIS 80 mL ultra saf suda çözüldü, pH 7,4'e ayarlandı; hacim ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlandı, kullanım öncesi ultra saf su ile 1/6,66 seyreltilerek 0,15 M TRIS tampon izolasyon için kullanıldı.

Ekstraktör

10 mL ektraktör hazırlamak için 6,5 g TRIS tartılıp, 20 mL suda çözüldü, pH 6,15 olarak ayarlandı, bu tampondan 1.288 mL alınıp üzeri, 2 mL gliserol, 0.55 ml ß-merkaptoetanol, 2 ml % 20 SDS ve ultra pure su ile 10 mL'ye tamamlandı, son pH 6,7 olarak kaydedildi (nihai 1,06 M TRIS, %0,2 gliserol, %0,055 ß-merkaptoetanol, %4 SDS).

%10'luk amonyum persülfat

1 g amonyum persülfat 10 mL ultra saf suda çözüldü; 0,5 mL'lik porsiyonlara ayrılarak -20 ^{0}C soğutucuya kaldırıldı.

0,5 M EDTA

1,86 g disodium EDTA.$2H_2O$ 100 mL ultra saf suda çözüldü; pH 8,0'e ayarlandı.

Sodyum azid stok çözeltisi

0,5 g NaN_3 50 mL ultra saf suda çözüldü. .

Akrilamid/Bis çözeltisi

14,6 g akrilamid, 0,4 g bis akrilamid 50 mL ultra saf suda çözüldü. %30 oranında Akrilamid/bisakrilamid içeren stok hazırlandı, karanlıkta muhafaza edildi.

Akrilamid çözeltisi

50 mL'lik hacimlerde ultra saf su kullanılarak %33 w/v oranında stok hazırlandı, karalıkta muhafaza edildi.

Bisakrilamid çözeltisi

50 mL'lik hacimlerde ultra saf su kullanılarak %1 w/v oranında stok hazırlandı, karalıkta muhafaza edildi.

Brain Hearth Infusion Besiyeri

1 L Brain Hearth Infusion sıvı besiyeri hazırlamak için 37 g toz Brain Hearth Infusion Broth 1 L distile su içerisine kondu. Manyetik karıştırıcı ile karıtırılarak toz besiyeri, su içerisinde tamamen çözüldü. 121 ^{0}C'de 15 dk otoklavda sterilize edildi. Kullanıma hazır vaziyette +4 ^{0}C'ye kaldırıldı.

Mueller Hinton Besiyeri

1 L Mueller Hinton sıvı besiyeri hazırlamak için 21 g toz Brain Hearth Infusion Broth 1 L distile su içerisine kondu. Manyetik karıştırıcı ile karıtırılarak toz besiyeri, su içerisinde tamamen çözüldü. 121 ^{0}C'de 15 dk otoklavda sterilize edildi. Kullanıma hazır vaziyette +4 ^{0}C'ye kaldırıldı.

10X üst tampon*

24,74 g Borik asit (0,4 M), 49,65 g TRIS (0,41), 10 g SDS, 800 mL ultra saf suda çözüldü; pH 8,64'e ayarlandı; hacim ultra saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

5X alt tampon*

256,97 g TRIS (2,122 M) 800 mL ultra saf suda çözdürüldü; pH 9,18'e ayarlandı; hacim ultra saf su ile 1L'ye tamamlandı.

Yığma jel tamponu*

6,55 g TRIS (0,541 M) 80 mL ultra saf suda çözüldü ve pH 6,1'e ayarlandı; hacim ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Yığma jel*

%11'lik alt jel için 10 mL akrilamid çözeltisi, 3,3 mL bisakrilamid çözeltisi, 6,7 mL 5X alt tampon, 9,3 mL ultra saf su, 0,33 mL %10'luk amonyum persülfat, 0,015 mL TEMED karıştırıldı.

Ayırma jel*

%2,7'lik üst jel için 1,25 akrilamid çözeltisi, 2,5 bisakrilamid çözeltisi, 1,25 mL üst jel tamponu, 4,8 mL ultra saf su, 0,2 mL amonyum persülfat, 0,01 mL TEMED karıştırıldı.

Örnek tampon*

10 mL 10X üst tampon, 5 g sakkaroz, 185 mg disodyum-EDTA, 20 mL ultra saf su, 5 mL ß-merkaptoetanol karıştırıldı; üzerine 1,9 g SDS eklendi ve çözüldü; pH 8,64'e ayarlandı; hacim ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Takip boyası*

0,5 g bromfenol mavisi /100 mL ultra saf su hazırlandı ve 6 mL gliserin bu boya ile 1/3 oranında boyandı.

TRIS tampon, pH 8,8**

54,45 g TRIS (1,5 M) 150 mL ultra saf suda çözüldü; pH 8,8'e ayarlandı; hacim ultra saf su ile 300 mL'ye tamamlandı.

TRIS tampon, pH 6,8**

6 g TRIS (pH: 6,8) 60 mL ultra saf suda çözüldü; pH 6,8'e ayarlandı; hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

5X Koşturma tamponu**

45 g TRIS, 216 g glisin, 15 g SDS 3 L ultra saf suda çözüldü, pH ayarlaması yapılmadı. +4 ^{0}C'de saklandı. Kullanım öncesi 1/5 oranında ultra saf su ile seyreltildi ve 37 ^{0}C'ye ısıtıldı.

Yığma jeli**

% 4'lük jel için 1,3 mL akrilamid/bisakrilamid çözeltisi, 6,1 mL ultra saf su, 1,5 mL 0,5 M TRIS (pH: 6,8) çözeltisi, 0,1 mL %10'luk SDS, 0,05 mL %10'luk amonyum persülfat ve 0,01 mL TEMED karıştırıldı.

Ayırma jeli**

%12'lik jel için 4 mL akrilamid/bisakrilamid çözeltisi, 3,35 mL ultra saf su, 2,5 mL 1,5 M TRIS (pH: 8,8) çözeltisi, 0,1 mL %10'luk SDS, 0,1 mL %10'luk amonyum persülfat ve 0,01 mL TEMED karıştırıldı.

%10'luk SDS**

10 g SDS 80 mL ultra saf suda çözüldü; hacim ultra saf su eklenerek 100 mL'ye tamamlandı.

250X Takip boyası**

0.02 g bromophenol blue tartılarak 8 ml distile su içerisinde çözüldü.

2X Yükleme tampon**

5 mL 2X yükleme tampon hazırlamak için 1,02 mL gliserol, 0,25 mL 250X takip boyası, 1,25 mL 4X TRIS/SDS (pH 6,8), 0,5 mL %10 SDS, 0,1 mL EDTA eklendi, hacim ultra saf su eklenerek 5 mL'ye tamamlandı. 2X seyreltide kullanıldı.

4X TRIS/SDS pH 6,8 **

3 g TRIS 20 mL ultra saf suda çözüldü; pH 6,8'e ayarlandı; % 20 SDS çözeltisinden 1 mL ilave edildi; hacim ultra saf su ile 50 mL'ye tamamlandı

***** Borat tamponlu Elektroforez Sisteminde kullanılan ayıraçlar
****** TRIS Tamponlu Elektroforez Sistemi

EK-4: KULLANILAN GEREÇLER

Biyolojik Aktif Preparatlar ve Kimyasallar

Akrilamid (Merck, Almanya)

Amonyum persülfat (GPR RECTAPUR, Prolabo, İspanya)

Asetik asit (Smyras, Amoras Food&Chemical Industry, Türkiye)

Aseton (Kimetsan, Türkiye)

BHIB besiyeri (AnalaR NORMAPUR, Prolabo, İspanya)

Bisakrilamid (ABCR, Almanya)

Boncuklu saklama besiyeri (Microbank, Kanada)

Bovine Serum Albumin (Sigma, Almanya)

Bradford Commasie Plus Reagent (Thermo Scientific, ABD)

Di-sodyum hidrojen fosfat di hidrat (Emsure, Merck, Almanya)

Elektroforez Moleküler Ağırlık Markörü, Broad Range (Thermo Scientific, ABD)

Elektroforez Moleküler Ağırlık Markörü, Proein-Marker II (PreQLab, Almanya)

Gliserin (Applichem, Almanya)

Glisin (Merck, Almanya)

Metanol (Emsure, Merck, Almanya)

MHB besiyeri (HiMedia, Hindistan)

Oksasilin (Sigma, Almanya)

Proteaz inhibitör kokteyli (Thermo Scientific, ABD)

Sodyumazid (CorloERBA, İtalya)

Sodyum hidrojenfosfat (Emsure, Merck, Almanya)

Sodyum hidroksit (CarloERBA, İtalya)

Sodyum Klorür (AnalaR NORMAPUR, Prolabo, İspanya)

SDS (Merck, Almanya)

TEMED (Sigma, Almanya)

TRIS-asit (Merck, Almanya)

TRIS-base (AnalaR NORMAPUR, Prolabo, İspanya)

Vankomisin (Hospira, UK)

%5 koyun kanlı agar (Salibrus, Türkiye)

%37 HCl (Riedel-de Haen, Sigma Aldrich, Almanya)

Cihazlar

Buzdolabı (Bosch, Almanya)

Derin dondurucu (Nuair, Revco, ABD)

Çalkalayıcı Mini Rocker (BioSan, Letonya)

Çalkalamalı banyo (Nüve ST402)

Etüv EN500 (Nüve, Türkiye)

Güç kaynağı (Bio-Rad, Almanya)

Hassas terazi AEX-120 G (Shimadzu, Japonya)

Isıtmalı su banyosu (Nüve ST402, Türkiye)

Manyetik karıştırıcı MSH-20A (WiseStir, Kore)

Mikrofüj Micro120 (Hettich, Almanya)

Optik yoğunluk ölçüm cihazı DensiCHECK (Biomerieux, Fransa)

Otoklav OT4060 (Nüve, Türkiye)

Poliakrilamid Mini Jel Elektroforez Sistemi (Bio-Rad, Almanya)

pH metre 6173 (Jenco, Kanada)

Santrifüj NF800R (Nüve, Türkiye)

Tip II kabin (Esco Class II)

Vitek II cihazı (Biomerieux, Fransa)

EK-5: ARAŞTIRMANIN SÜREÇLENDİRİLMESİ

Araştırmamızın süresi 13 ay sürmüştür. Bakteri kültürü, antibiyotik stres uygulamaları, protein zolasyon, görüntüleme ve analiz gibi tekniklerin uygulandığı çalışmamızın tüm işlemlerini zaman-ay parmetresine göre Tablo 16'da bulabilirsiniz.

Tablo 16. Araştırmanın süreçlendirilmesi

Süreç (Ay) / Uygulamalar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Hipotez tartışma	X													
Literatür araştırma	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Membran izolasyon ve SDSPAGE ön çalışma	X	X												
Proje başvurularının ve bütçesinin oluşturulması		X	X											
Satın alma					X	X	X	X	X					
Suş toplama	X	X	X	X	X									
Suç direnç inceleme		X												
Suş MİK bulma						X	X	X	X					
Membran izolasyon optimizasyonu				X	X	X	X	X						
Stres optimizasyonu						X	X	X	X	X	X	X		
Standart suşta stres yanıtının incelenmesi										X	X			
Trakya suşlarında stres yanıtının incelenmesi												X		
Biyoinformatik analiz													X	
Tez yazımı		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X