

Mikrobiyal Büyümenin Moleküler Biyolojisi

Prof. Dr. Bektaş TEPE

Mikrobiyoloji

Bölüm 7

Patlayıcı Hücre Ölümü ve Biyofilm Başlangıcı

- Mikroorganizmalar, çevresel zorluklara karşı dayanmak ve besin döngüsünden yararlanmak için üç boyutlu biyofilm toplulukları oluşturur.
- Biyofilme geçişte hücrelerin yüzeye tutunmasını sağlayan özel fenotipik değişiklikler gerçekleşir.
- Bu değişimler ve hücreler arası iletişim, planktonik yaşamdan bağlı yaşama geçişi mümkün kılar.

EPS'in Yapısı ve Biyofilm İçindeki Rolü

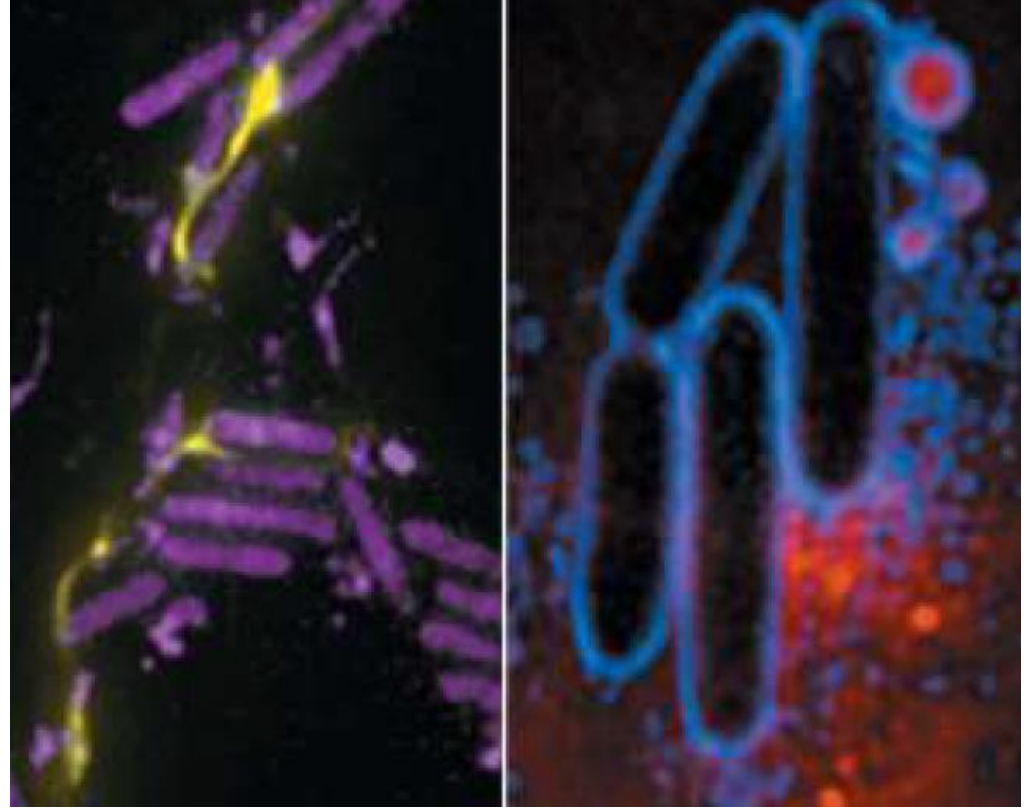
- Ekstrasellüler polimerik maddeler (EPS), biyofilmi oluşturan hücreleri hem korur hem de birbirine bağlar.
- EPS; polisakkaritler, ekstrasellüler DNA ve sitoplazmik proteinlerden oluşur.
- Biyofilm yaşamına geçiş bazı durumlarda yararlı sonuçlar doğurabilirken, patojenlerde kronik hastalıklara ve antibiyotik direncine yol açabilir.

Pseudomonas aeruginosa ve Biyofilm Direnci

- *Pseudomonas aeruginosa*, antibiyotiklere dirençli biyofilmler oluşturabilen iyi çalışılmış fırsatçı bir patojendir.
- Bu türün biyofilm geliştirme döngüsü, araştırmacıların patlayıcı hücre ölümü adı verilen yeni bir olguyu tanımlamasını sağlamıştır.
- Patlayıcı hücre ölümü, biyofilm oluşumuna katkıda bulunan özel bir hücre alt popülasyonunda meydana gelir.

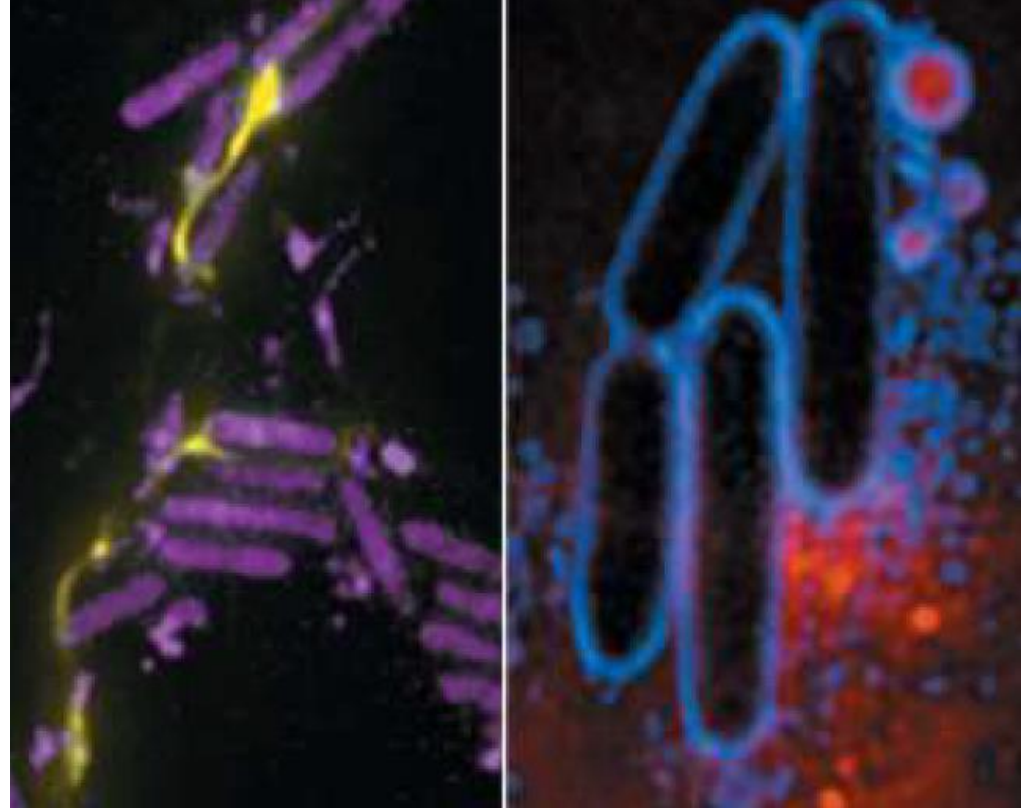
Patlayıcı Hücre Ölümünün Mekanizması

- Hücre ölümü, bakteriyel hücre duvarını yırtmak için kullanılan viral bir lizis enziminin etkisiyle gerçekleşir.
- Bu enzimi kodlayan virüs DNA'sı, *P. aeruginosa* genomunda bir profaj olarak bulunur.
- Soldaki fotoğraf, lizis enzimi üretiminin hücrelerin parçalanmasına ve DNA'nın dışarı salınmasına yol açtığını gösterir.



EPS'in Oluşumunda Patlayıcı Hücre Ölümünün Katkısı

- Hücre patlaması sırasında açığa çıkan DNA, biyofilmi bir arada tutan EPS yapısında kritik bir bileşen hâline gelir.
- Sağdaki fotoğraf, serbest DNA'nın (kırmızı) salınımını ve membran parçalarının küçük veziküllere dönüşümünü göstermektedir.
- Bu veziküller, protein ve DNA içeren yapılar olarak EPS oluşumuna ek katkı sağlar.



Antibiyotikler ve Patlayıcı Hücre Ölümü Arasındaki İlişki

- DNA hasarı yaratan bir etken ya da antibiyotik, normalde profajın aktive olmasına neden olur.
- Ancak patlayıcı hücre ölümü, viral lizis geninin rastlantısal olarak ifade edildiği sınırlı bir hücre grubunda oluşur.
- Birkaç hücrenin yok olması, kalan hücrelerin biyofilmi güçlendirmesi nedeniyle topluluk için avantaj sağlar.
- Bu bulgu, antibiyotiklerin neden bazen biyofilm oluşumunu artırdığına dair bir açıklama sunar.

Bölümün Genel Bağlamı ve Önceki Bilgilerin Hatırlatılması

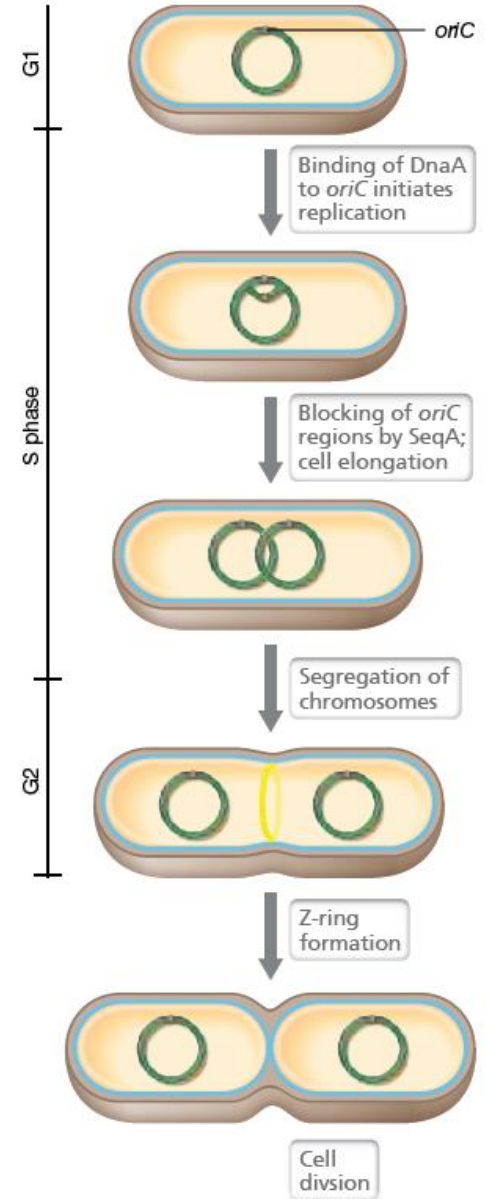
- Önceki bölümlerde prokaryot kromozomunun çoğaltılması (Bölüm 4), hücre büyümesi ve bölünmesi (Bölüm 5) ele alınmıştı.
- Ayrıca, prokaryotlarda gen ifadesinin düzenlenmesi (Bölüm 6) de ayrıntılı biçimde açıklanmıştır.
- Bu bölümde mikrobiyal büyüme döngüsünde gerçekleşen temel moleküler süreçlere odaklanılacaktır.

Bakteriyel Hücre Bölünmesine Giriş

- Çoğu bakteri hücresi, ikili bölünme ile çoğalır.
- Bu süreç, her bir yavru hücrenin genomun bir kopyasını almasını sağlayan belirli aşamalardan oluşur.
- Prokaryotlarda hücre bölünmesi hem zamansal hem de mekânsal kontrol gerektirir.

Hücre Döngüsünde Zamansal ve Mekânsal Düzen

- Hücre bölünmesinden önce genomun iki kopyasının eksiksiz olarak oluşturulması gerekir.
- Bu iki kopya eşit biçimde ayrılmalı ve septum (bölme) doğru konumda oluşmalıdır.
- Bölünme döngüsü boyunca hücre, ozmotik basınca karşı dayanmak için yeni peptidoglikan ve iskelet elemanları üretir.
- Tüm bu olayların koordinasyonu çeşitli düzenleyici kaskadlarla sağlanır.



E. coli ve *Caulobacter crescentus* Üzerine Moleküler Yaklaşımlar

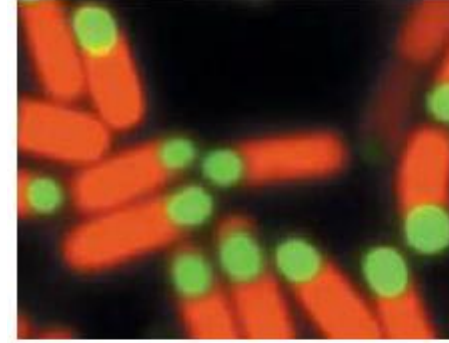
- Bu bölümde gram-negatif iki model organizma olan *E. coli* ve *Caulobacter crescentus* üzerinde durulacaktır.
- Hücre bölünmesi ve hücre morfolojisini yöneten moleküler yollar gelişmiş mikroskopi teknikleri ile ortaya çıkarılmıştır.
- Bu teknikler, hücresel süreçlerin gerçek zamanlı ve detaylı analizine olanak sağlar.

Hücrede Moleküler Yapıların Görselleştirilmesi

- Standart ışık mikroskobu hücrelerin boyut ve şeklini gösterebilir ancak kromozom, protein ve membran gibi makromolekülleri görmek için daha güçlü teknikler gerekir.
- Bu gereksinim doğrultusunda, floresan moleküllerden yararlanan süper çözünürlüklü mikroskopi geliştirilmiştir.
- Süper çözünürlük teknikler, yaşayan hücrelerde 10–50 nm büyüklüğündeki yapıları çözebilerek dinamik süreçlerin gerçek zamanlı izlenmesini sağlar.

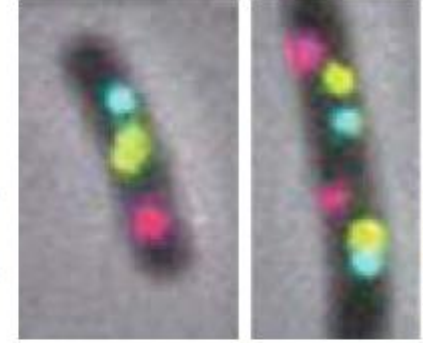
Floresan Etiketleme: Temel Yaklaşım

- Belirli proteinlerin konumunu görmek ve gen ifadesini izlemek amacıyla uzun süredir raportör genler kullanılmaktadır.
- Bu genler, kolay tespit edilebilen bir ürün kodlar ve ilgi duyulan genlerle birleştirilerek izleme olanağı sağlar.
- Moleküler olayların görselleştirilmesinde GFP (yeşil floresan proteini) gibi floresan ürünler kodlayan raportör genler yaygın olarak kullanılır.
- Floresan mikroskopi ve birden fazla floresan raportör sayesinde farklı makromoleküllerin konum ve aktiviteleri eşzamanlı belirlenebilir.



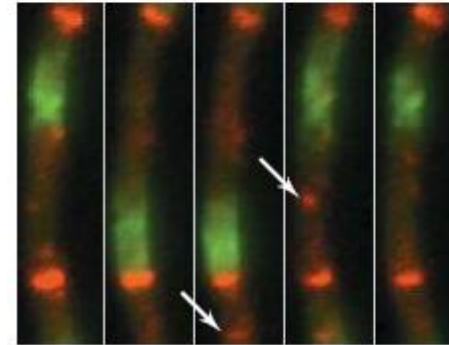
T. Doan, R. Losick, and D. Rudner

(a)



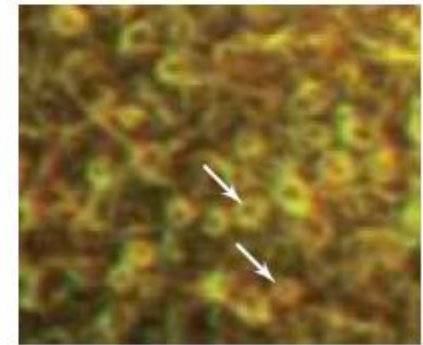
Conrad L. Woldringh

(b)



Fabai Wu and Cees Dekker Lab

(c)

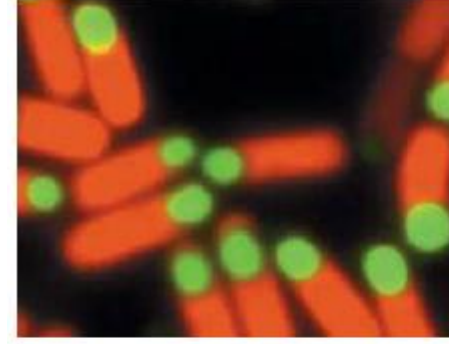


Martin Loeferl/ST Austria

(d)

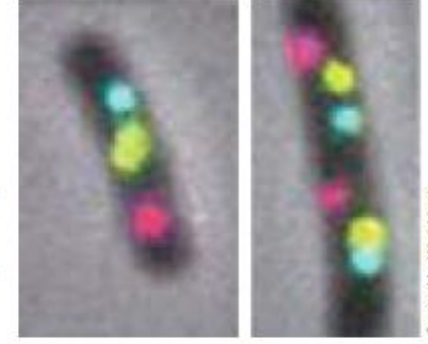
Sigma Faktörlerinin Floresan Etiketlerle İzlenmesi

- Figür a'da, σ^F ve σ^E adlı spor-spesifik sigma faktörlerinin hücre içindeki konumlarının GFP ve diğer floresan proteinlerle nasıl belirlendiği gösterilmektedir.
- Bu sigma faktörleri, *Bacillus* türlerinde endospor gelişiminde kritik roller üstlenir.
- Floresan etiketleme, bu proteinlerin gelişim sürecindeki dağılımını canlı hücrelerde izlemeye olanak tanır.



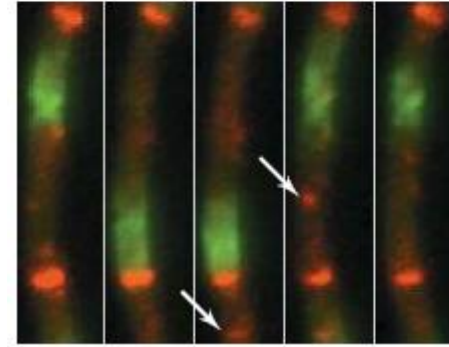
(a)

T. Doan, R. Losick, and D. Rudner



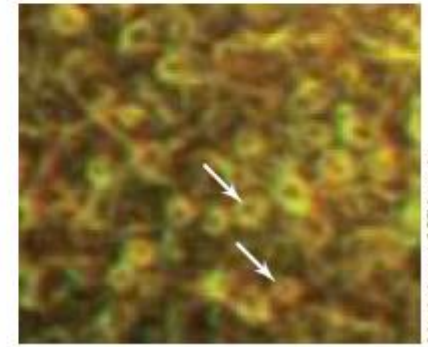
(b)

Conrad L. Woldring



(c)

Fabai Wu and Cees Dekker Lab

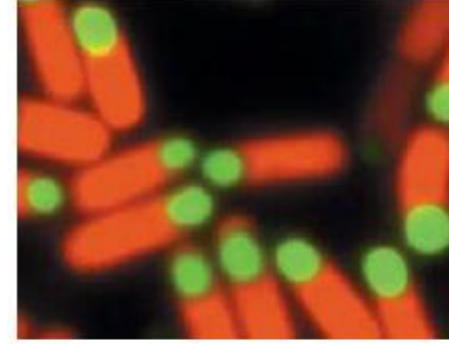


(d)

Martin Loose/IST Austria

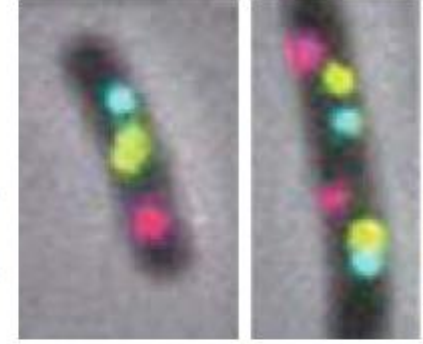
Nükleik Asitlerin Floresan Etiketlerle Görselleştirilmesi

- Floresan etiketleme, hücredeki farklı nükleik asitleri (örneğin kromozom ve plazmid) ayırt etmek için de kullanılabilir.
- Aynı nükleik asit üzerindeki farklı lokusların bile canlı hücrelerde izlenmesi mümkündür.
- DNA veya RNA lokusları GFP gibi ürünlere doğrudan bağlanmasa da, hedef lokusa özgü bağlayıcı proteinler raportör genlerle birleştirilebilir.
- Gerekirse, ilgili DNA/RNA bağlanma dizileri rekombinant tekniklerle nükleik aside eklenebilir (Figür b).



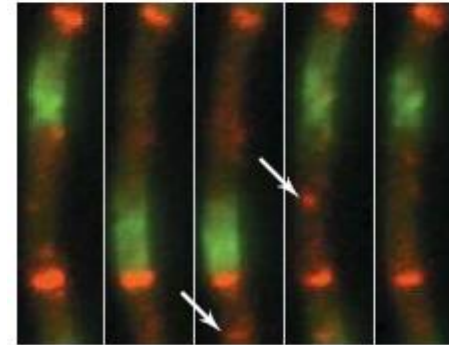
(a)

T. Doan, R. Losick, and D. Rudner



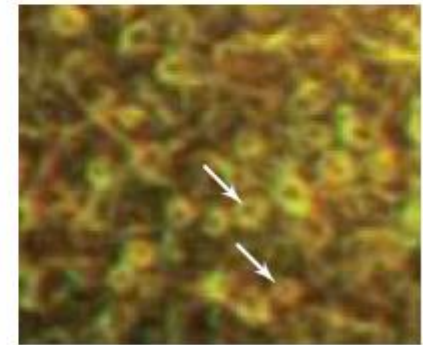
(b)

Conrad L. Woldring



(c)

Fabai Wu and Cees Dekker Lab

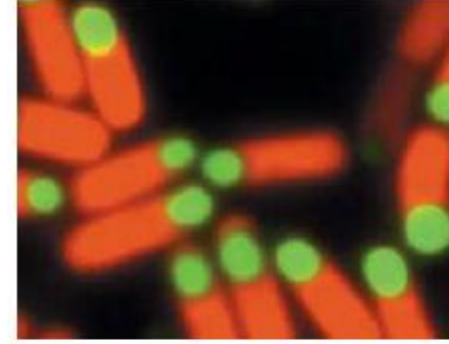


(d)

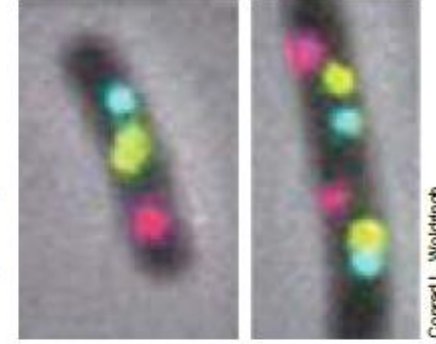
Martin Loose/IST Austria

E. coli Kromozomu Üzerindeki Lokusların Etiketlenmesi

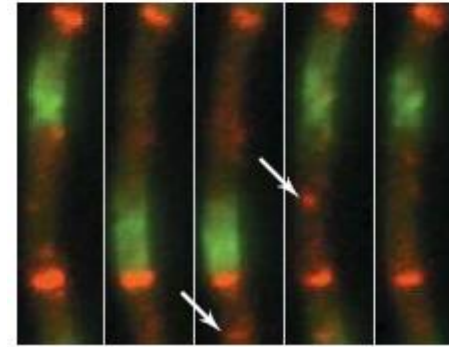
- Figür b'de, *E. coli* kromozomunun “kollarının” nasıl canlı bir hücrede görselleştirilebildiği gösterilmektedir.
- Bu yöntemde, kromozoma belirli DNA dizileri eklenir ve bu dizilere bağlanan proteinler farklı floresan raportör genlerle işaretlenir.
- Böylece aynı molekül üzerindeki farklı bölgelerin hücre içi konumları ayrıntılı biçimde izlenebilir.



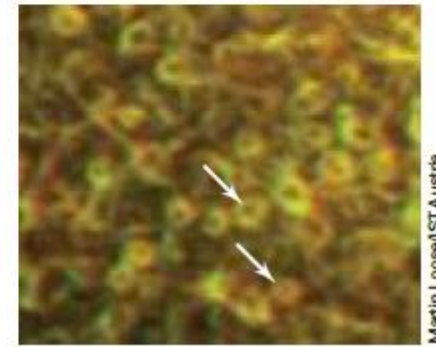
(a)



(b)



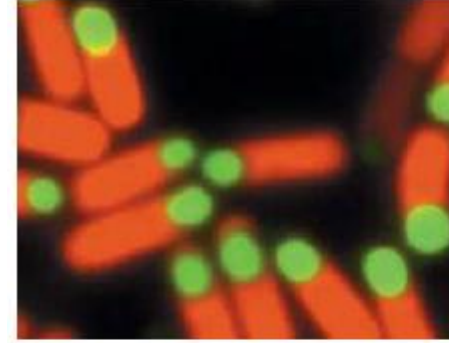
(c)



(d)

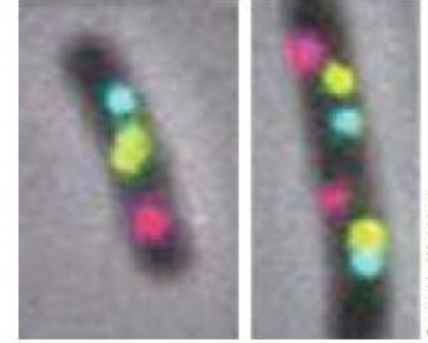
Protein Dinamiklerinin Zamansal ve Konumsal İzlenmesi

- Protein etiketleme ve mikroskopi tekniklerindeki gelişmeler, hızlı katlanan yeni floresan varyantların kullanılmasını sağlamıştır.
- Figür c, bölünme proteinleri MinD ve FtsZ'nin büyüyen bir hücredeki zaman-serisi davranışlarını göstermektedir.
- Membrana bağlı proteinleri izlemek için lipid çift tabakaları oluşturulup floresan etiketli proteinler bu yüzeye uygulanabilir.
- FtsZ ve FtsA gibi bölünme proteinleri ile dönen FtsZ halkalarının etkileşimleri bu yöntemle görüntülenmiştir (Figür d).



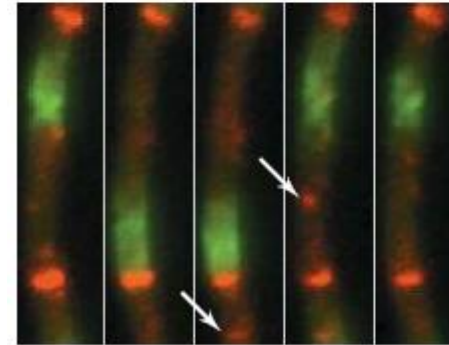
T. Doan, R. Losick, and D. Rudner

(a)



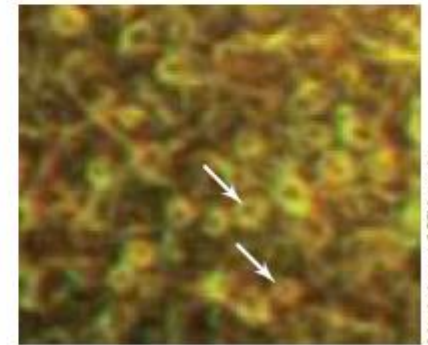
Conrad L. Woldring

(b)



Fabai Wu and Cees Dekker Lab

(c)

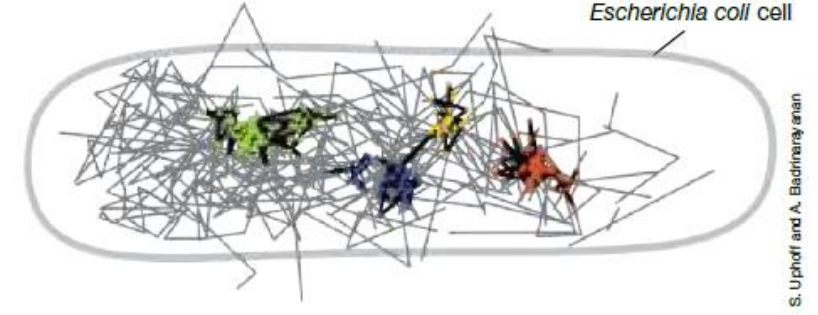


Martin Loose/IST Austria

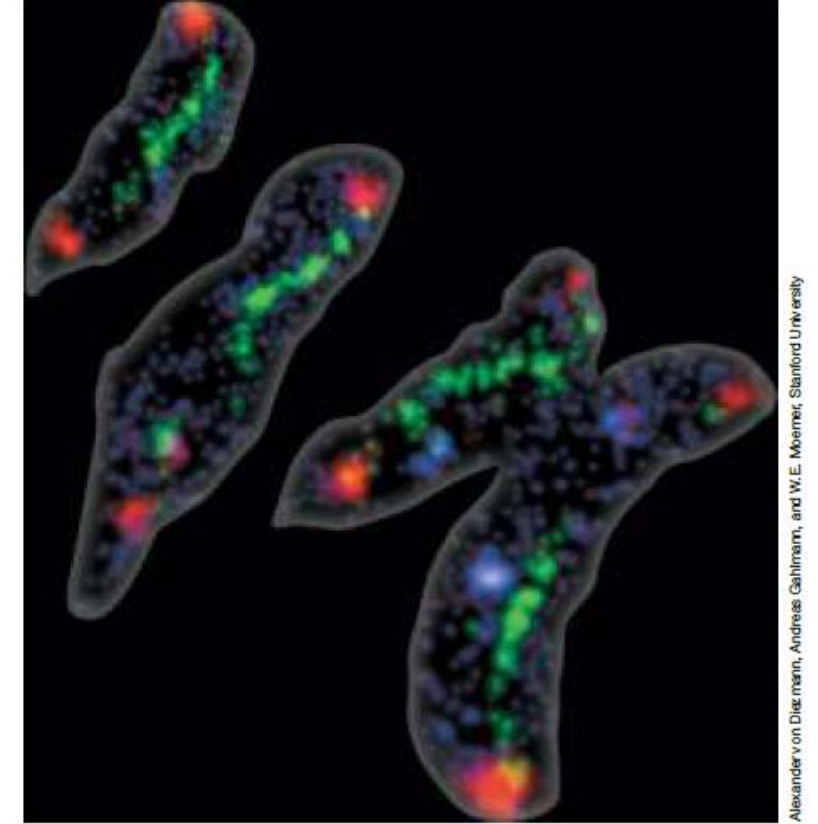
(d)

Süper Çözünürlük: Tek Molekül Düzeyinde Görselleştirme

- Floresan mikroskopisi iç yapılara dair önemli veriler sunar ancak çözünürlüğü moleküler düzeyde yetersiz kalabilir.
- Süper çözünürlük teknikleri, tek bir molekülün konumunu canlı hücre içinde belirlemeye olanak tanır.
- Bu tekniklerde kullanılan fotoaktive edilen proflar, belirli dalga boylarında aydınlatıldığında parlak ya da karanlık hâle geçerek tek bir hedefin seçilmesini sağlar.
- Tek tek moleküllerin zaman içindeki konumları kaydedilerek süper çözünürlüklü görüntüler oluşturulur (Figür a).



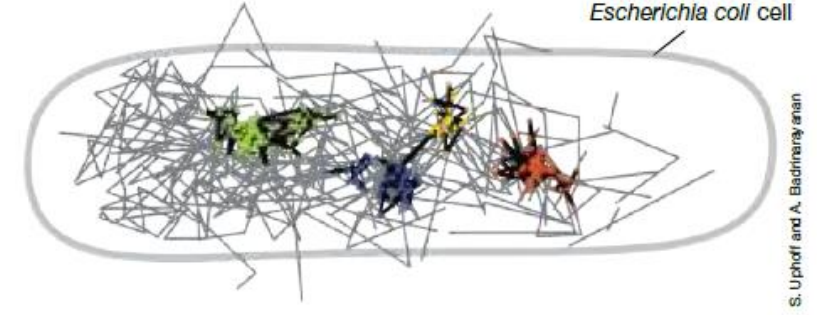
(a)



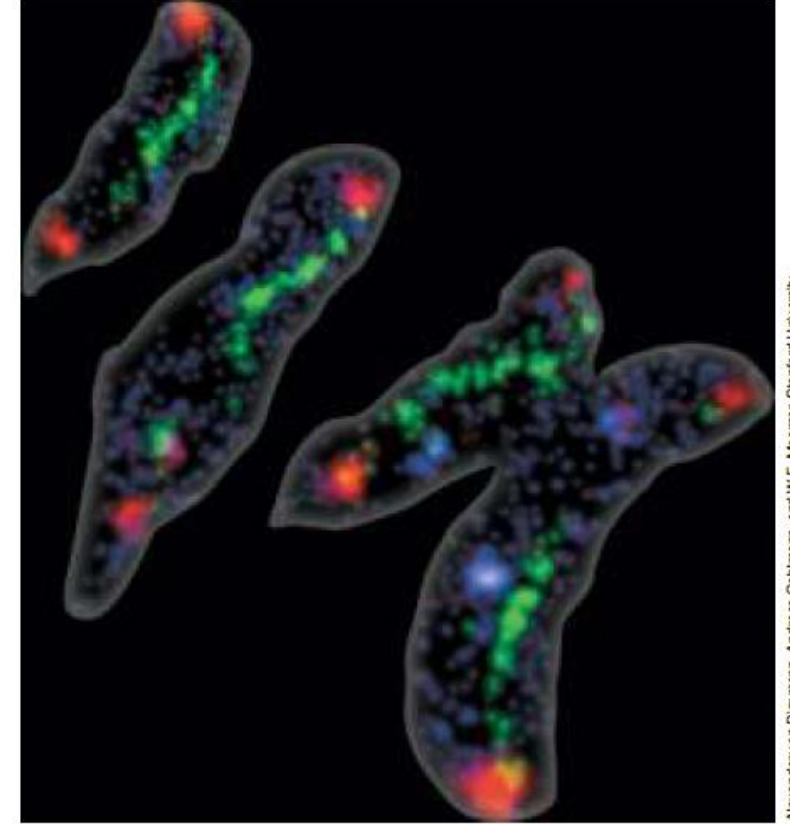
(b)

MukB Hareketlerinin Süper Çözünürlükle Haritalanması

- Figür a'da, süper çözünürlüklü mikroskopinin bir türü olan fotoaktif lokalizasyon mikroskopisi ile bireysel MukB moleküllerinin hareketleri haritalanmıştır.
- MukBEF kompleksi, nükleoid üzerinde konumlanarak replikasyondan sonra kardeş kromozomların çözülmesine yardımcı olur.
- Bu teknik, hücresel komplekslerin zamanla geçirdiği yapısal değişikliklerin yüksek hassasiyetle izlenmesini mümkün kılar.



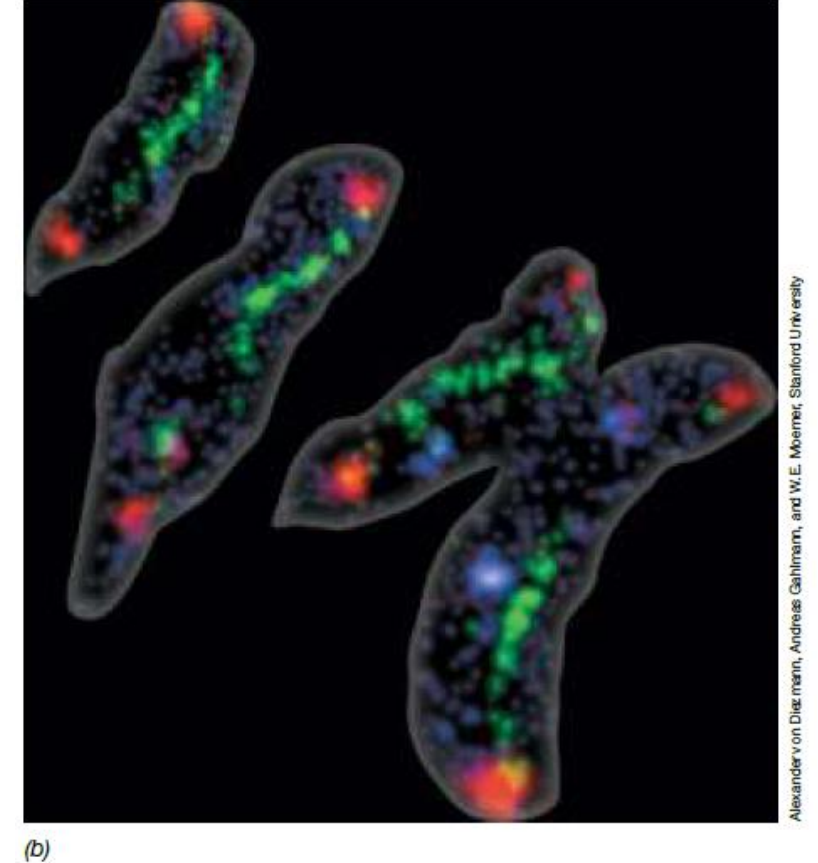
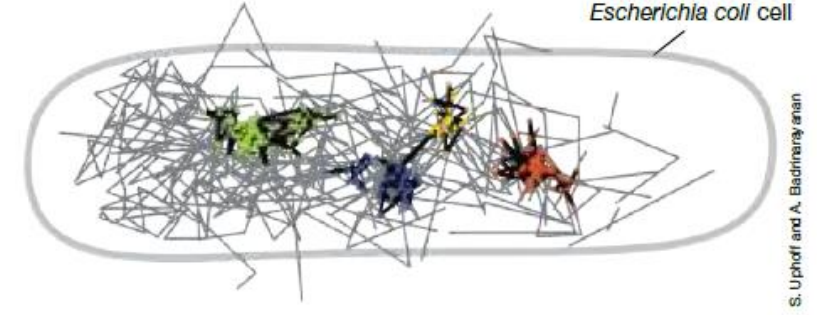
(a)



(b)

Üç Boyutlu Süper Çözünürlüklü Görüntüleme

- Süper çözünürlüklü görüntüler, gerekli işlemlerle üç boyutlu (3D) yapılar hâline dönüştürülebilir.
- Figür b'de, *Caulobacter crescentus* adlı tomurcuklanan bakteride farklı protein komplekslerinin dizilimleri 3D alt-difraksiyon tekniği ile görselleştirilmiştir.
- Bu yöntem, hücre içi süper yapıların düzeninin ayrıntılı biçimde ortaya konmasına olanak tanır.

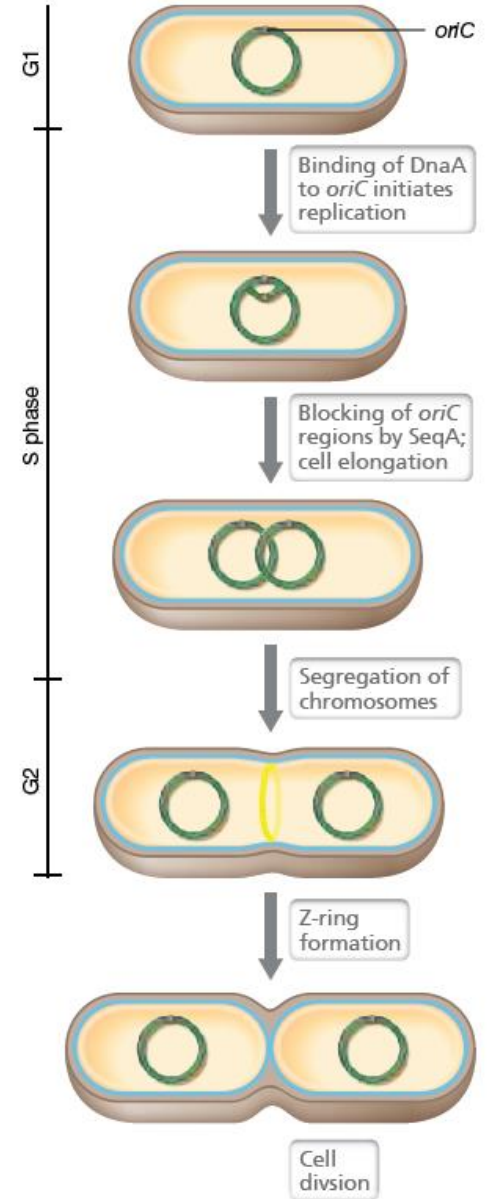


Prokaryotlarda Dinamik Alt Hücresel Organizasyon

- Süper çözünürlüklü teknikler, tek tek proteinlerin hem konumsal hem zamansal davranışlarını ortaya koyar.
- Bu bulgular, prokaryot hücrelerin de ökaryot benzerleri gibi oldukça dinamik bir alt hücresel organizasyona sahip olduğunu göstermiştir.
- Ayrıca bu organizasyonun, hücresel büyüme süreci boyunca moleküler düzeyde izlenebildiği de kanıtlanmıştır.

Bakterilerde Kromozom Çoğalmasının Temel İlkesi

- Bakteriyel büyümenin gerçekleşebilmesi için hücrenin genomunu çoğaltması gerekir.
- Kromozom replikasyonunun, hücre bölünmesiyle uyumlu şekilde sıkı biçimde düzenlenmesi önem taşır.
- Replikasyon tamamlandıktan sonra bölünme öncesinde kardeş kromozomların ayrılması gerekir.

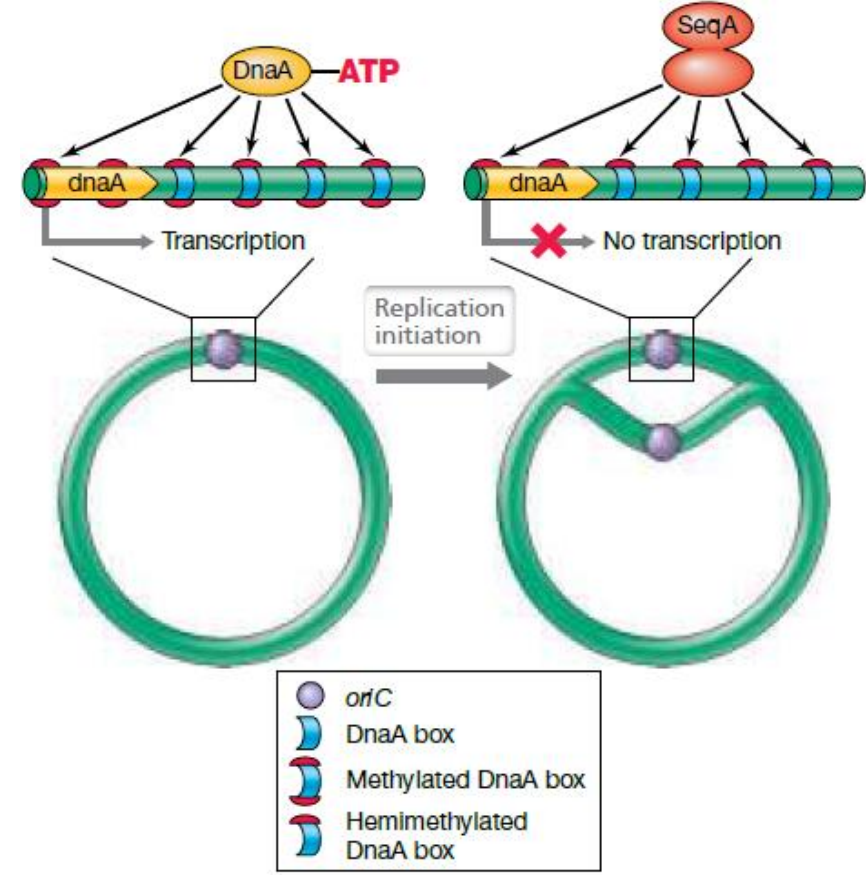


Replikasyon Başlangıcının Kontrol Gereksinimi

- Hücre, genomu bölünmeden önce tam olarak çoğaltırken aynı zamanda gereksiz yeniden başlatmaların önüne geçmelidir.
- *E. coli*'de replikasyonun başlatılmasını ve engellenmesini birden fazla protein düzenler.
- Bu süreçte odaklandığımız ana protein DnaA'dır.

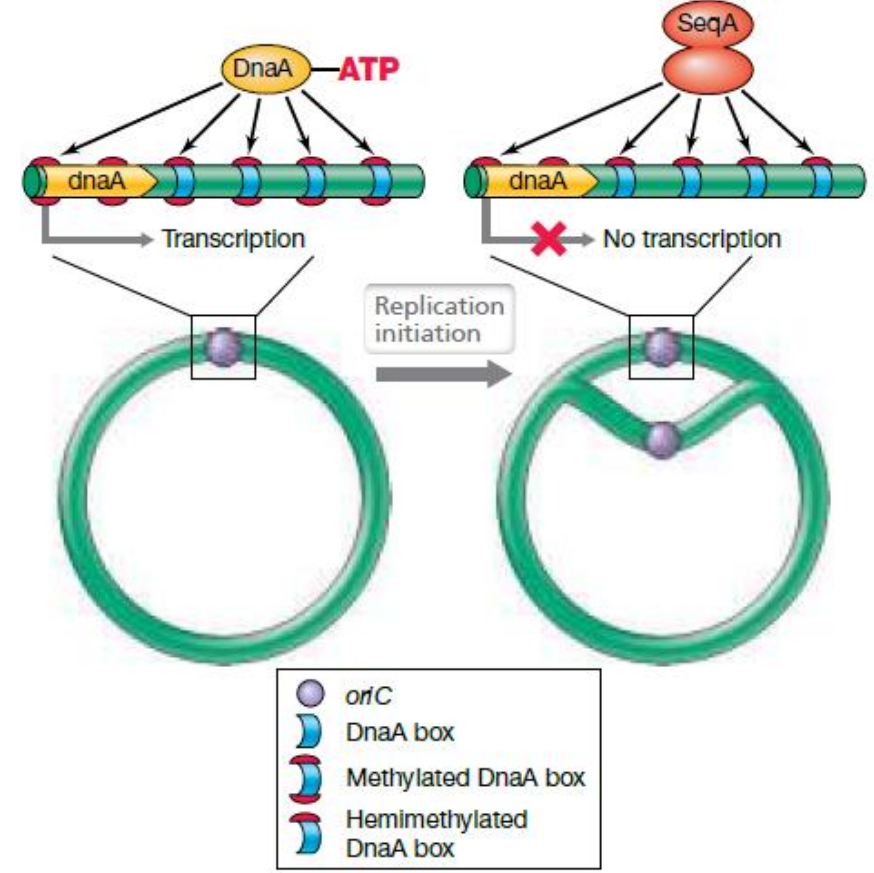
DnaA'nın OriC Bölgesine Bağlanması

- OriC bölgesindeki özgül dizilere DnaA'nın bağlanması DNA'nın açılmasını sağlar.
- Bu bağlanma replizomun yüklenmesini ve replikasyonun başlatılmasını mümkün kılar.
- DnaA, ATP bağlı olduğunda en aktif formu olan DnaA-ATP hâlinindedir.



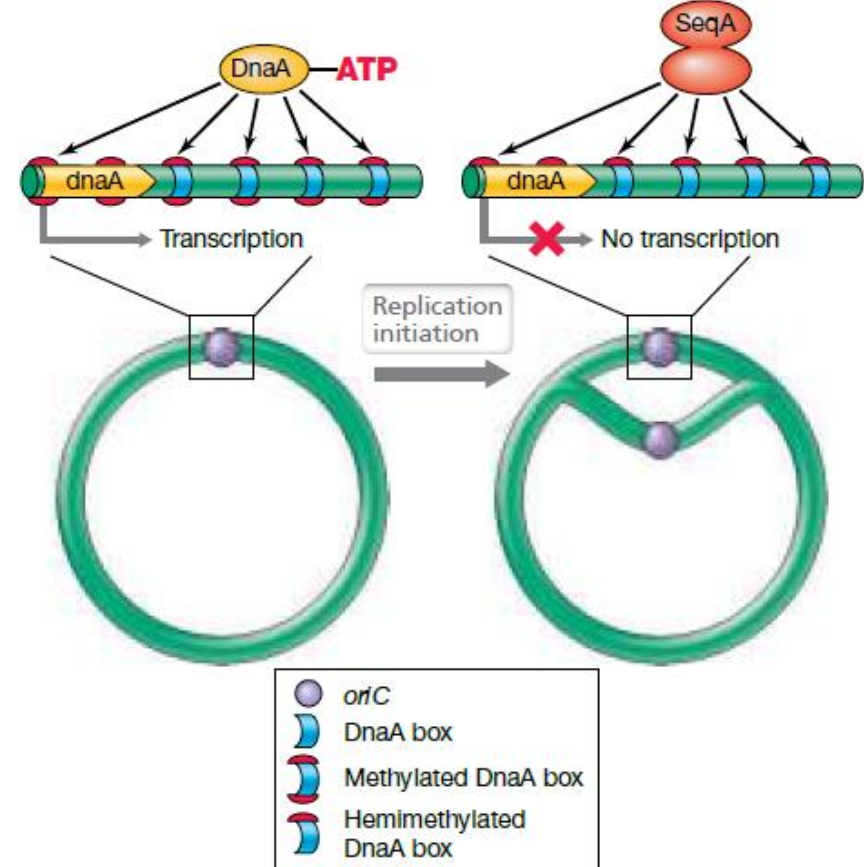
DnaA–ATP'nin Etkinliğinin Sıkı Kontrolü

- Replikasyon başladıktan sonra DnaA–ATP'nin inaktive edilmesi için çeşitli düzenleyici mekanizmalar devreye girer.
- Bu mekanizmalar arasında *oriC* için bağlanma rekabeti, *dnaA* geninin baskılanması ve DnaA–ATP'nin farklı yerlere çekilmesi bulunur.
- Ayrıca DnaA–ATP'nin doğrudan inaktivasyonu da sürecin bir parçasıdır.



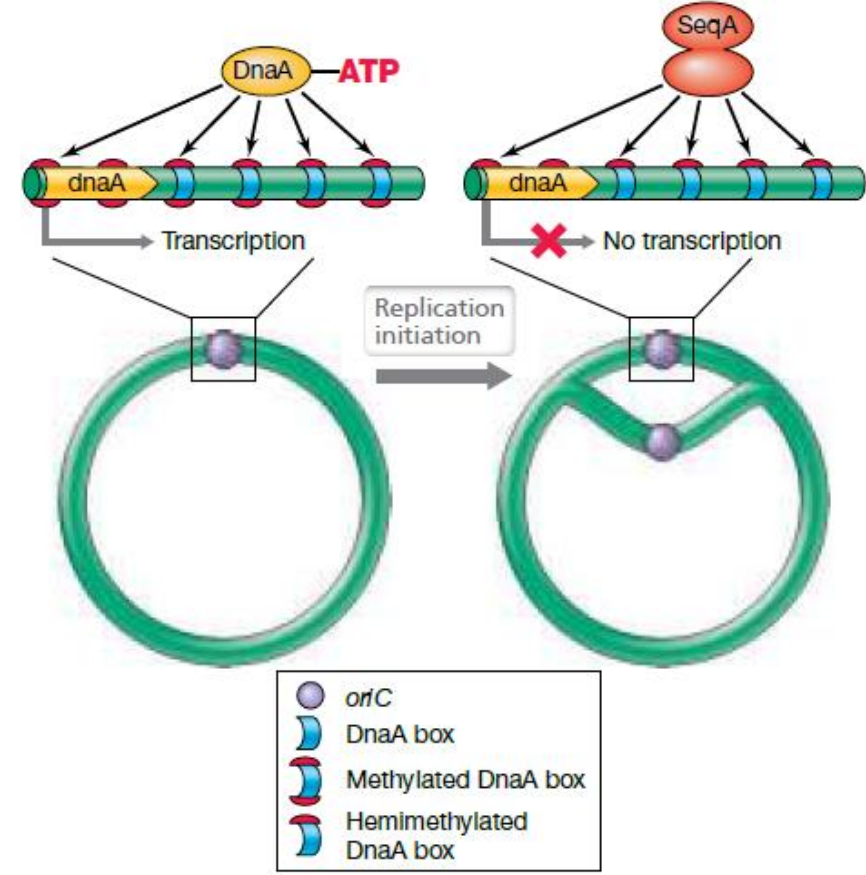
Replikasyon Sonrası Yarı Metilasyonun Ortaya Çıkışı

- Replikasyon başlamadan önce her iki DNA zinciri üzerindeki –GATC– dizileri adeninde metillidir.
- Replikasyon başladığında yalnızca kalıp zincir metilli kalır ve yarı metillenmiş (hemimetile) DNA oluşur.
- Bu yarı metilasyon, DnaA–ATP ile SeqA arasında oriC bölgesi için rekabete yol açar.



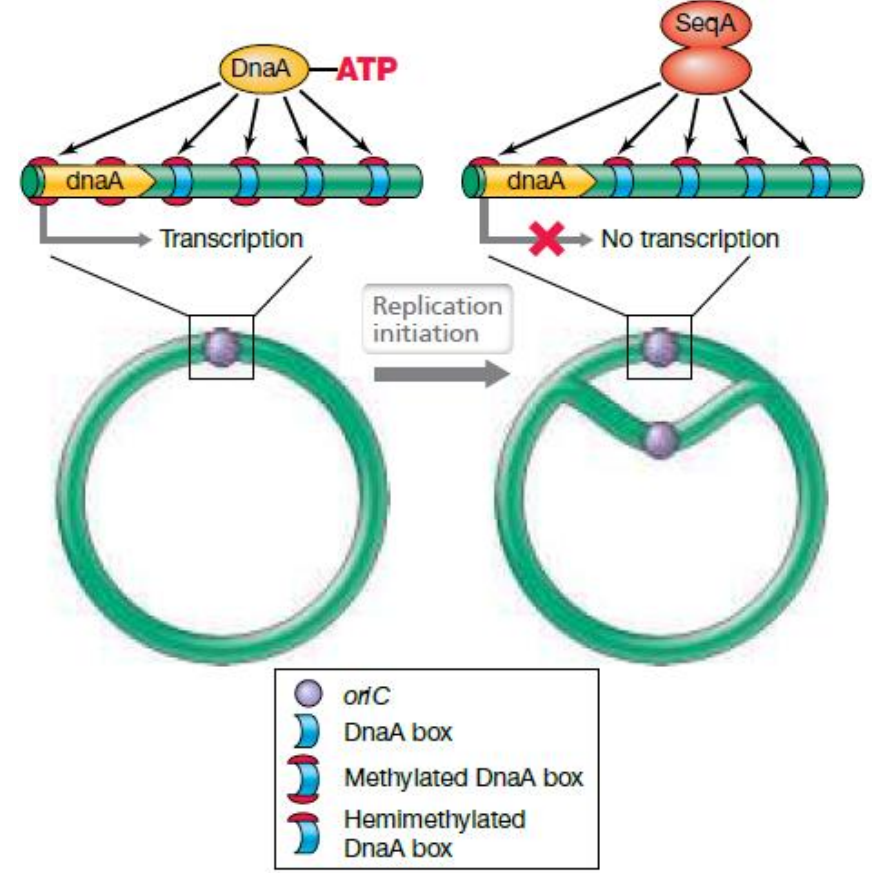
SeqA'nın Yarı Metile Bölgelere Bağlanması ve Engelleme

- Yarı metile oriC dizilerini SeqA güçlü şekilde bağladığı için DnaA-ATP'nin yeniden bağlanması engellenir.
- Bu durum yeni bir replikasyonun erken başlamasını önler.
- Yaklaşık 10 dakika sonra yeni sentezlenen zincirdeki GATC dizileri yeniden metillenir.



dnaA Geninin İfadesinin SeqA ile Baskılanması

- dnaA geninin oriC'e yakın konumda bulunması ve promotorda GATC dizisinin yer alması SeqA'nın etkisini artırır.
- Replikasyon başlar başlamaz dnaA'nın promotörü hızla yarı metile olur ve SeqA bağlanarak RNA polimerazın girişini engeller.
- DnaA proteininin kendi promotör bölgesindeki DnaA kutularına bağlanmasıyla dnaA ifadesi ayrıca otomatik olarak düzenlenmiş olur.



DnaA–ATP’nin DnaA–ADP’ye Dönüştürülmesi

- DnaA–ATP’nin oriC’ye bağlanmasını engelleyen diğer mekanizma, hücrede DnaA–ATP miktarının azaltılmasıdır.
- Replizom yakınlarında DNA ile ilişkili ATPaz HdaA, özellikle DnaA–ATP’yi hedef alır.
- Bu enzim ATP’nin hidrolizini uyararak DnaA’nın ADP bağlı hâle geçmesini sağlar.

DnaA–ATP Düzeylerinin Hücre Döngüsündeki Dalgalanması

- Tüm bu mekanizmalar birlikte çalışarak hücredeki DnaA–ATP miktarının döngü boyunca değişmesine neden olur.
- DnaA–ATP düzeyi, replikasyonun başlatılacağı anda en yüksek seviyeye çıkar.
- Daha sonra süreç ilerledikçe bu düzey azalır.

Hızlı Büyüyen Hücrelerde Replikasyonun Zorlukları

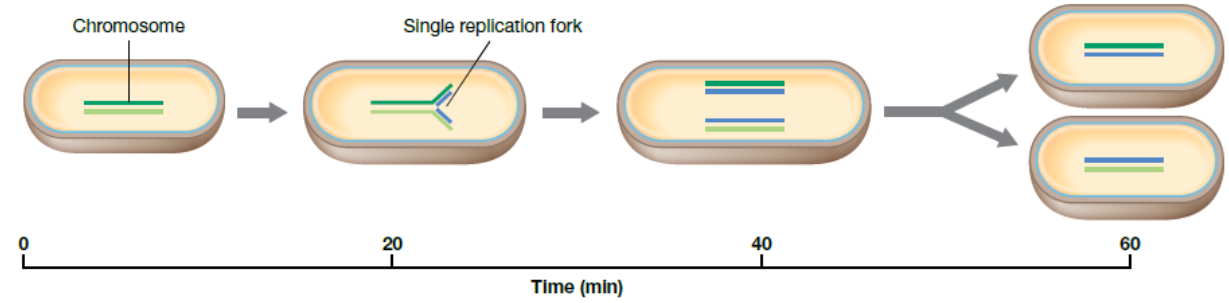
- *E. coli*'nin halka şeklindeki kromozomu çift yönlü replikasyona imkân tanır.
- Çift yönlü replikasyon, kesintili ve kesintisiz zincirlerde eşzamanlı sentezle hızlı DNA çoğalmasını sağlar.
- *E. coli* genomunun replikasyonu yaklaşık 40 dakika sürer ve bu süre hücrenin jenerasyon zamanından bağımsızdır.

Kısa Jenerasyon Zamanında Ortaya Çıkan Sorun

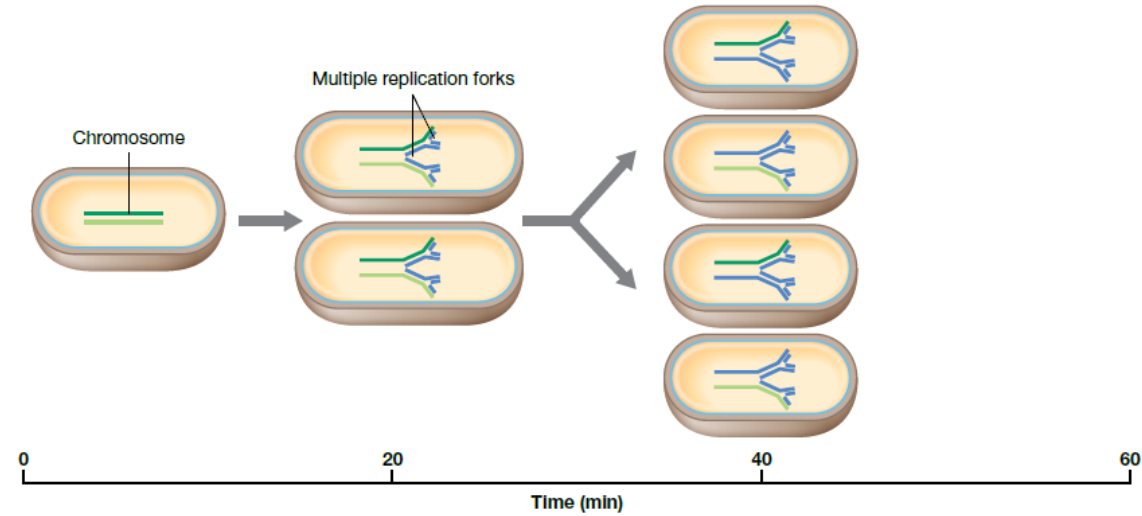
- *E. coli* kimi koşullarda 20 dakikada bir bölünebilir ve bu durum replikasyon süresinin yarısı kadardır.
- Hücre, bölünme hızının replikasyon hızını aşması durumunda bir çözüm geliştirmek zorundadır.
- Aksi hâlde her bölünmede tam bir genom aktarımı mümkün olamazdı.

Birden Fazla Replikasyon Çatalının Oluşması

- Jenerasyon zamanı 40 dakikadan kısa olduğunda hücrelerde birden çok replikasyon çatalı bulunur.
- Yeni bir replikasyon turu önceki tur tamamlanmadan başlatılır.
- Böylece bazı genler hücre içinde birden fazla kopya hâlinde bulunabilir.



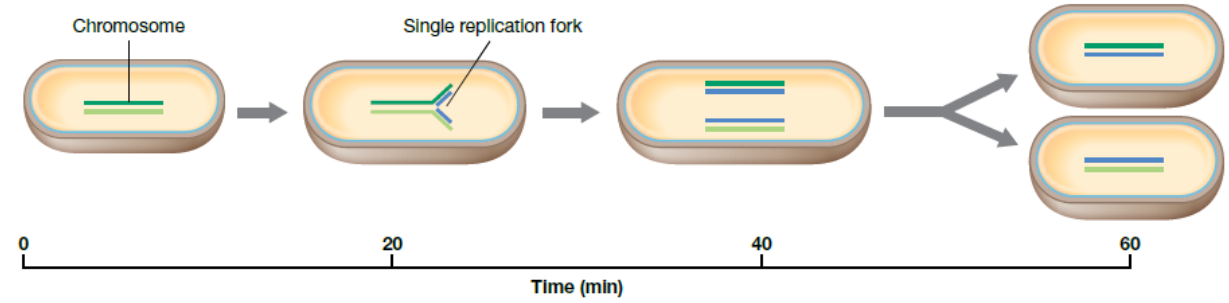
(a) Generation time, 1 h; replication time, 40 min.



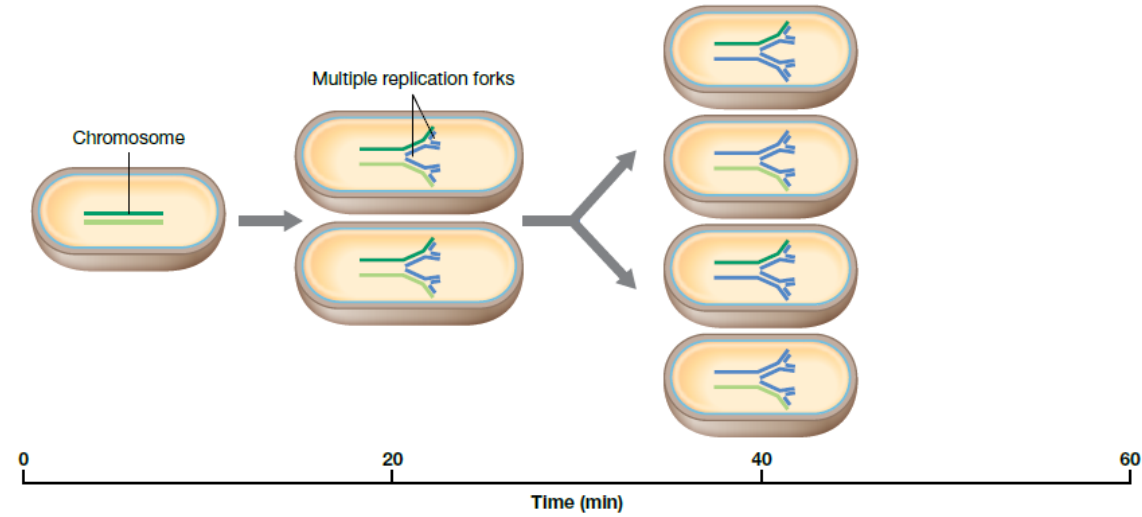
(b) Generation time, 20 min; replication time, 40 min.

Yeni Turların Başlamasını Sağlayan Şartlar

- Yeni replikasyon turu, yeni sentezlenen DNA zinciri metillendikten sonra gerçekleşebilir.
- Metilasyon SeqA'nın DNA'dan ayrılmasını sağlar ve DnaA-ATP yeniden oriC'ye çekilebilir.
- Bu mekanizma, replikasyon süresi sabitken her bir yavru hücrenin bölünme anında tam bir genom almasını garanti eder.



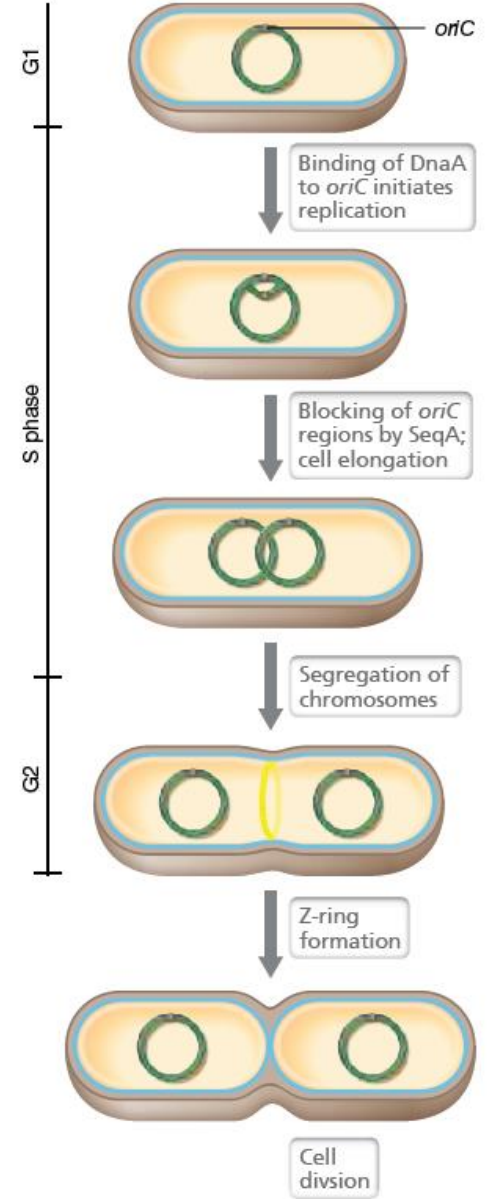
(a) Generation time, 1 h; replication time, 40 min.



(b) Generation time, 20 min; replication time, 40 min.

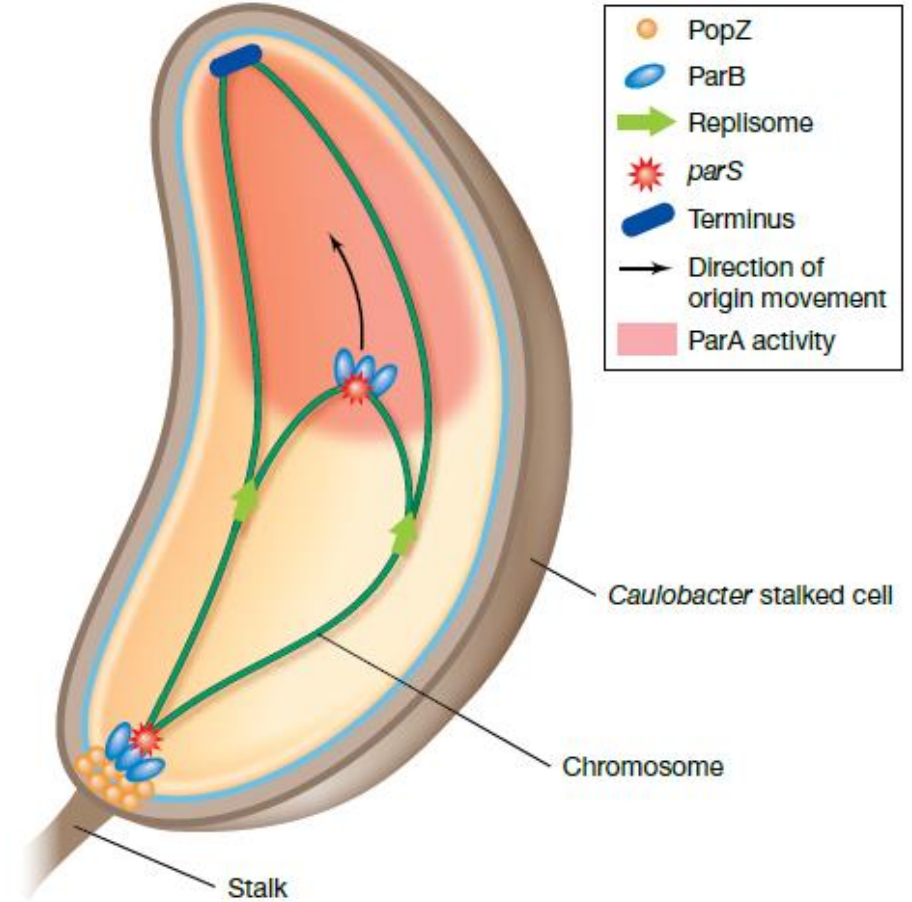
Kromozom Ayrılmasının Temel Gerekliliđi

- Hücre bölünmesi sırasında kromozomların kutuplara doğru ayrılması, her bir yavru hücrenin genomun bir kopyasını alması için gereklidir.
- Ayrılma aynı zamanda bölünme oluşunun oluşabilmesine imkan verir.
- Kopyalanmış nükleoidlerin hücrenin ortasında kalması, nükleoid oklüzyonu nedeniyle bölünmeyi engeller.



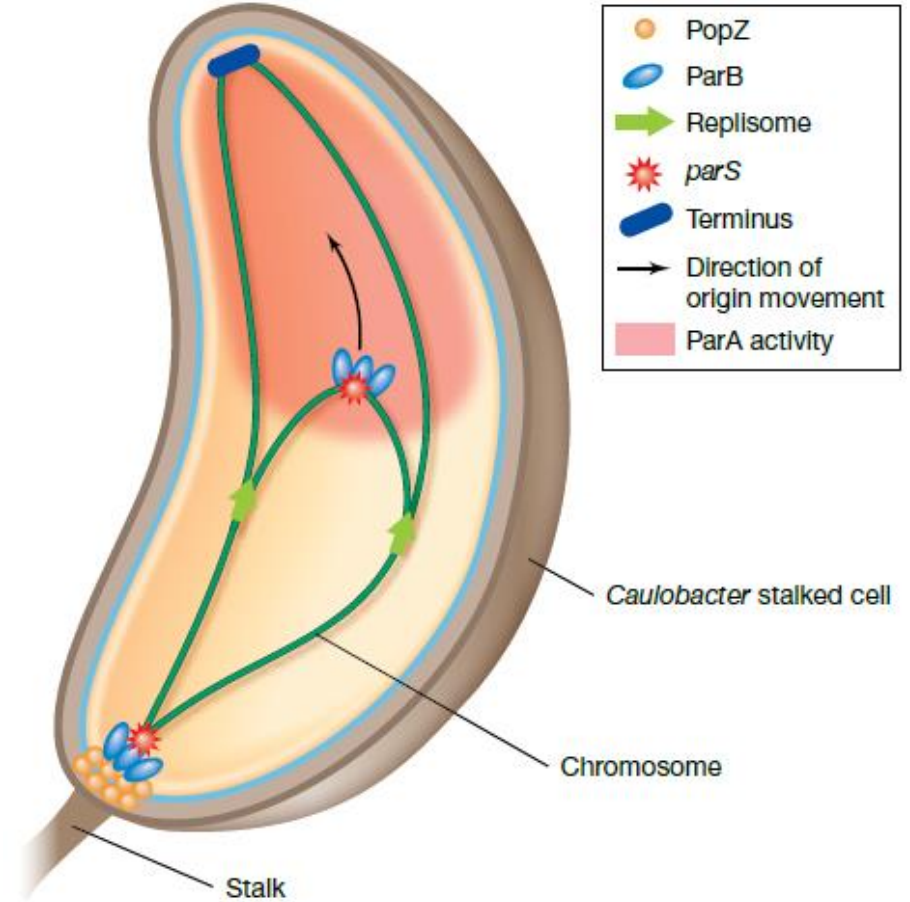
Ökaryotlarda ve Bakterilerde Kromozom Ayrılması

- Ökaryotlarda kopyalanmış kromozomlar mitotik iğ iplikleri tarafından ayrılır.
- *Caulobacter* gibi türlerde, Par sistemi adı verilen benzer bir mekanizma görev yapar.
- Par sistemi ParA ATPazı, ParB bağlayıcı proteini, PopZ kompleksi ve oriC yakınındaki parS bölgesinden oluşur.



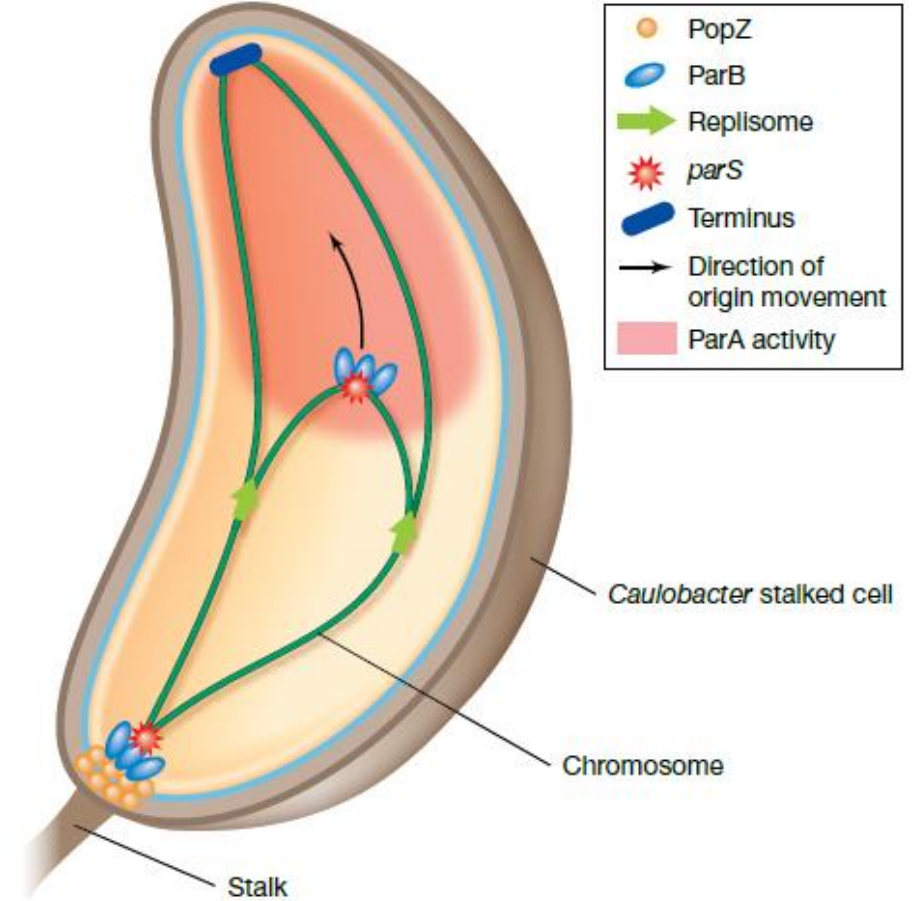
Par Sisteminin Çalışma Mantığı

- Par sistemi ökaryotlardakinin aksine tamamen kopyalanmış kromozomları ayırmaz.
- PopZ proteinleri hücrenin eski kutbunda bulunur ve ParB–parS etkileşimi üzerinden kromozomu bu bölgeye sabitler.
- Replikasyon başladığında yeni sentezlenen parS bölgesi yeni bir ParB molekülüne bağlanır ve ParA'nın ATPaz aktivitesiyle yeni kutba taşınır.



PopZ'nin Çift İşlevi

- PopZ yalnızca ebeveyn kromozomun *parS* bölgesini eski kutba sabitlemekle kalmaz.
- Aynı zamanda ParA'nın yeni *parS*–ParB kompleksini yeni hücre kutbuna taşımak üzere toplanmasına yardımcı olur.

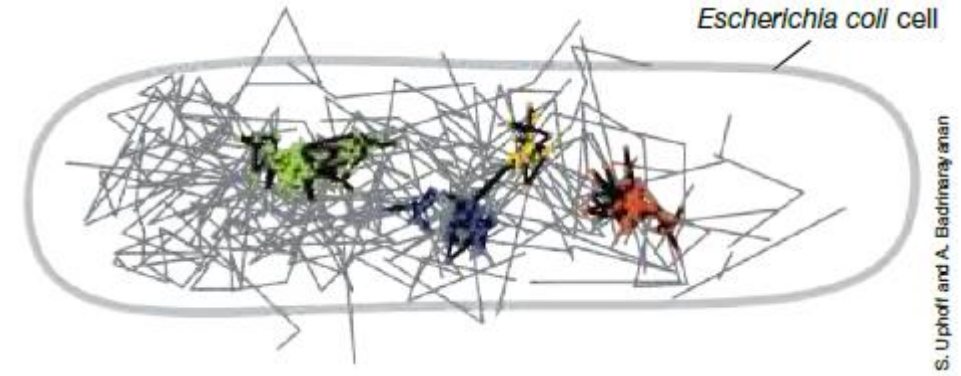


E. coli'de Par Sisteminin Yokluğu ve Sonuçları

- *E. coli*'de Par sistemi bulunmaz ancak yavru kromozomların bölünmeden önce ayrılması yine gereklidir.
- Replikasyon sonrası oluşan halkasal kromozomlar birbirine zincir halkası gibi dolaşarak bağlı kalır.
- Bu bağlantı, topoizomerez IV ve MukBEF proteinlerinden oluşan kompleks tarafından çözülür.

MukBEF Hareketi ve Dekatenasyon

- Süper çözünürlüklü görüntüler MukBEF'in nükleoid içinde belirgin konumlara hareket ettiğini göstermektedir.
- Bu proteinler kardeş kromozomların ayrılmasını sağlayan bir topoizomerazı bölgeye toplar.
- Bu ayrıştırma işlemine dekatenasyon adı verilir ve bölünme öncesinde gerçekleşir.

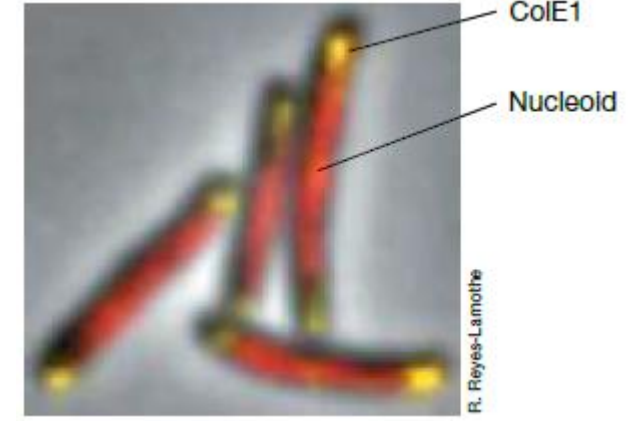


E. coli'de Ayrılmanın Fiziksel Süreci

- Kromozom ayrılmasının tüm ayrıntıları net olarak bilinmese de kromozom “kolları” replikasyon sırasında belirgin şekilde ayrılmış görünür.
- Kromozomal bölgeler, replikasyon sırasına uygun biçimde hücre kutuplarına doğru ilerletilir.
- Bu ayrılma belirli proteinlere bağımlı değildir; çoğunlukla replikasyonun fiziksel etkisi ve DNA birikimiyle ilerler.

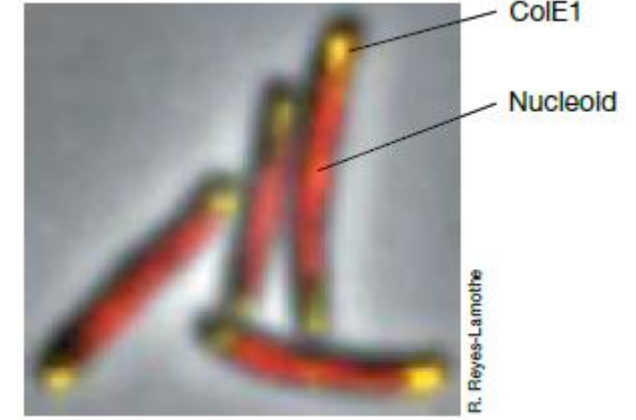
Plazmidlerin Yavru Hücrelere Dağılımı

- Ekstra kromozomal elemanlar olan plazmidlerin yavru hücrelere aktarımı da düzenli bir süreç gerektirir.
- Plazmidler, kromozomla aynı hücresel mekanizmalarla çoğaltılır.
- Çeşitli kontrol mekanizmaları, plazmidlerin nesiller boyunca belirli bir kopya sayısı ile aktarılmasını sağlar.



Plazmid Replikasyonunun Hücre İçindeki Konumu

- Büyük ColE1 tipi plazmidlerin replikasyonu, nükleoidin bulunduğu hücre merkezinden ziyade kutuplarda gerçekleşir.
- Bu konumlanma, bölünme sırasında yavru hücrelere verimli aktarımı kolaylaştırır.
- Zamanla nesiller boyunca plazmidlerin stabil olarak kalmasını destekler.



Plazmid Ayrılması İçin Alternatif Mekanizmalar

- Plazmidlerin ayrılması için Par sistemine benzer başka bölüştürme mekanizmaları da bulunabilir.
- Bu mekanizmalar plazmidlerin eşit dağılımını sağlayarak hücresel kalıtımın korunmasına katkıda bulunur.

Hücre Bölünmesinin Genel İlkeleri

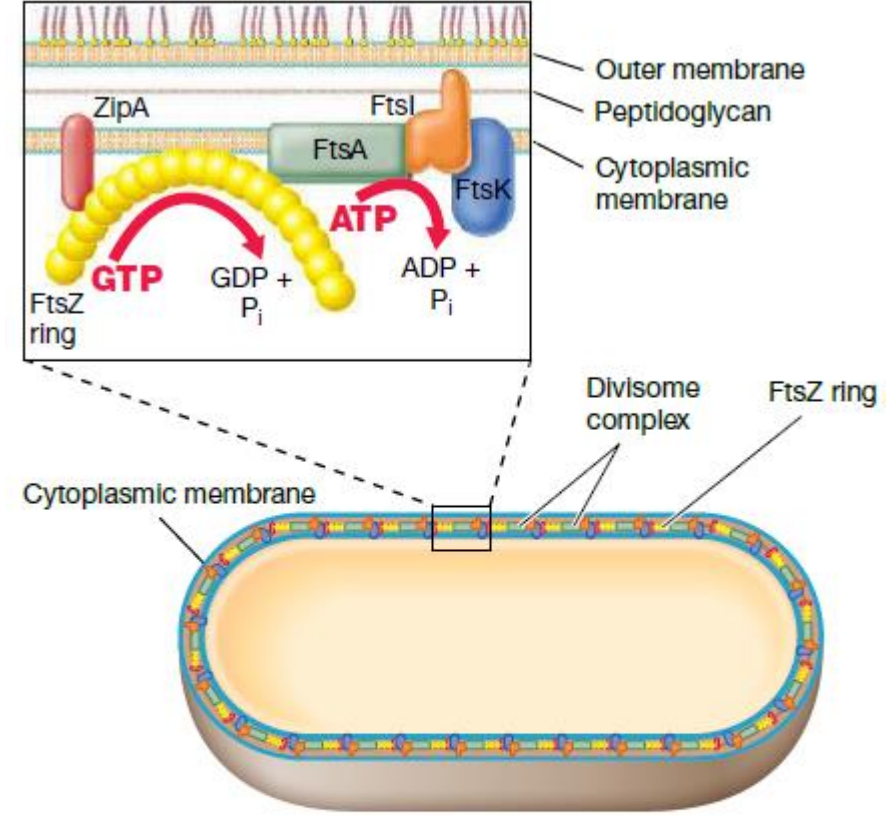
- Hücre bölünmesi hem mekânsal hem zamansal olarak kontrol edilir ve böylece bölme kapanmadan önce her bir yavru hücre, genomun bir kopyasını almış olur.
- Bu kısımda septum (bölme) oluşumunun nasıl düzenlendiği ve bölünme bölgesini belirleyerek tüm süreci yöneten temel proteinler ele alınacaktır.
- Bakterilerde görev yapan bu proteinlerin genel olarak hücre bölünme mekanizmasını nasıl koordine ettiği açıklanacaktır.

Divizom ve Fts Proteinlerinin Rolü

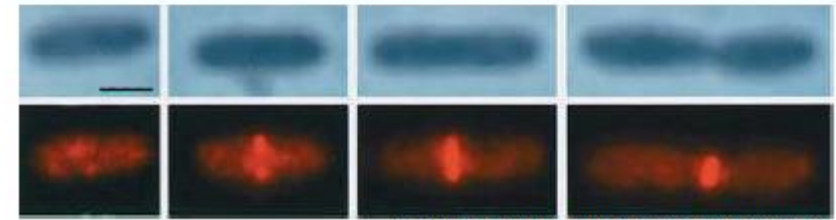
- Bakterilerde hücre bölünmesinde görev alan temel proteinler Fts proteinleridir ve bunlardan FtsZ, ikili bölünmede kritik bir rol üstlenir.
- FtsZ, ökaryotlarda önemli bir bölünme proteini olan tübüline benzer ve neredeyse tüm Archaea'larda bulunurken, diğer Fts proteinleri yalnızca Bakterilerde bulunur.
- *E. coli* ve *Bacillus subtilis*, hücre bölünmesi araştırmalarında model organizmalar olarak kullanılmıştır.

FtsA ve ZipA'nın Görevleri

- ZipA, FtsZ halkasını sitoplazmik zara bağlayan ve onu stabilize eden bir çapa görevi görür.
- Aktine benzeyen FtsA, hem FtsZ ve diğer divizom proteinlerini bölgeye toplar hem de halkanın zara bağlanmasına katkıda bulunur.
- Divizom, hücre bölünme döngüsünün yaklaşık dörtte üçlük kısmı tamamlandığında oluşur; ancak bu sırada hücre uzamaya başlamış ve DNA eşlenmesi çoktan gerçekleşmiştir.



(a)

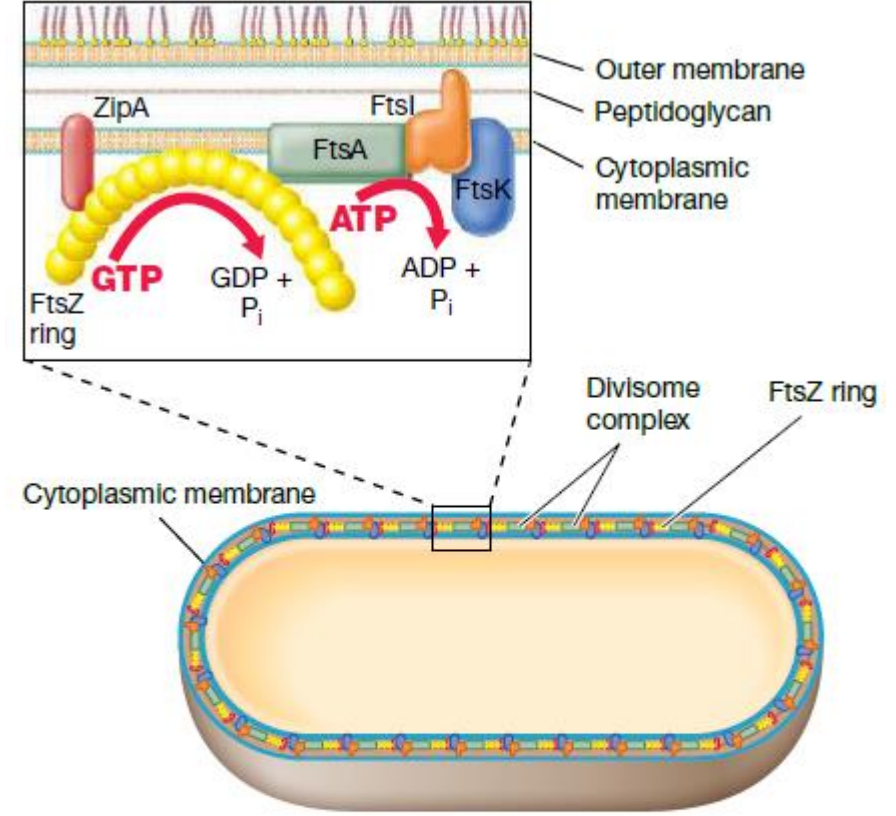


(b)

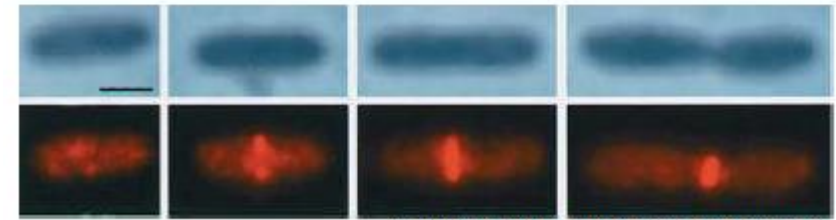
T. den Blaauwen & Nanne Nanninga, Univ. of Amsterdam

Peptidoglikan Sentezinde Görevli FtsI

- Divizom, peptidoglikan sentezi için gerekli Fts proteinlerini de içerir ve bunlardan biri FtsI'dir.
- FtsI, hücrede bulunan birkaç penisilin bağlayan proteinden biridir; bu proteinlerin aktiviteleri penisilin tarafından engellenir.
- Divizom, hücrenin ortasında yeni zar ve hücre duvarı materyallerinin sentezini yöneterek bölmenin oluşmasını sağlar.



(a)



(b)

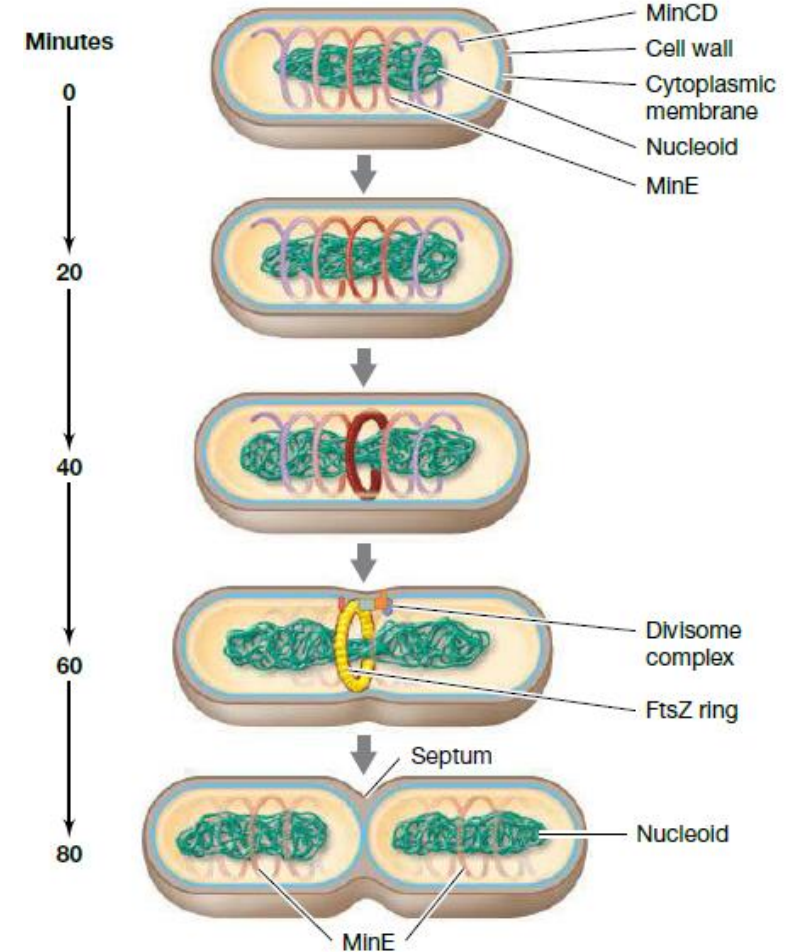
T. den Blaauwen & Nanne Nanninga, Univ. of Amsterdam

Bölme Oluşumu ve Hücre Bölünmesi

- Hücre uzayıp orijinal uzunluğunun iki katına ulaştığında, merkezde oluşan bölme hücreyi iki yavru hücreye ayırır.
- Bu süreçte yeni hücre duvarı ve zar materyalleri düzenli bir şekilde içeri doğru büyür ve bölünme tamamlanır.

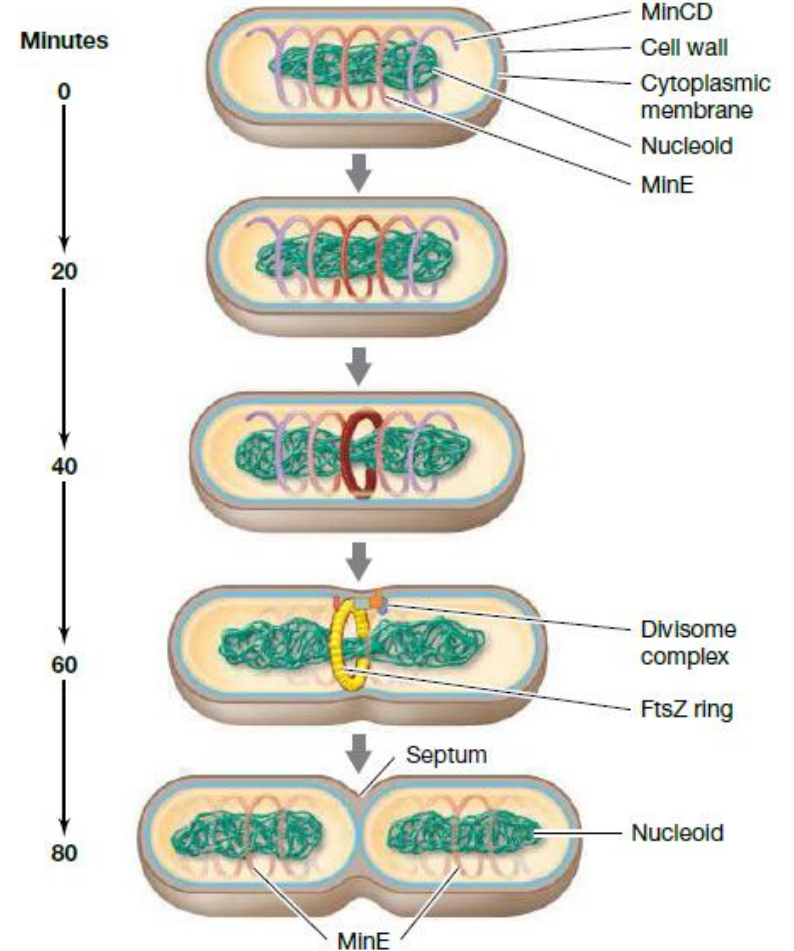
Min Proteinleri ve FtsZ Halkasının Konumlandırılması

- DNA, FtsZ halkası oluşmadan önce eşlenir; çünkü halkayı oluşturan bölge, iki nükleoid arasındaki boşluktur.
- Nükleoidler ayrılmadan önce bu bölgeyi kapladığı için FtsZ halkasının burada oluşmasını engeller; bu olaya nükleoid engellenmesi denir.
- MinC, MinD ve MinE proteinleri, FtsZ'nin hücre merkezine yönlendirilmesini sağlayarak bölünme bölgesinin doğru belirlenmesine yardımcı olur.



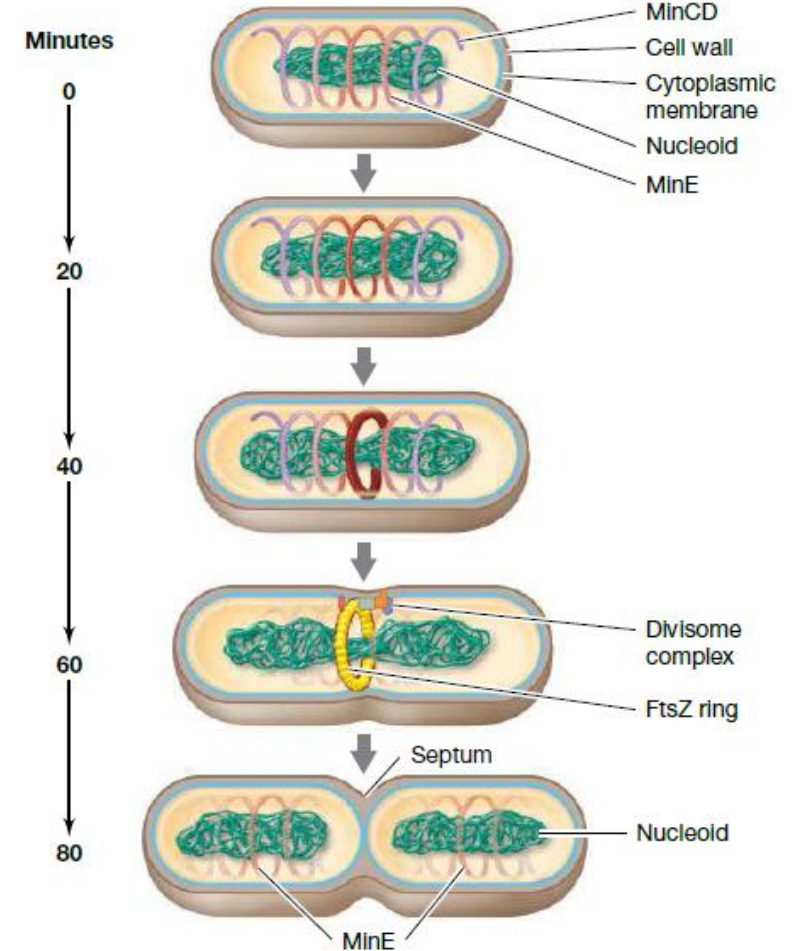
Min Proteinlerinin Mekanizması

- MinD, sitoplazmik zarın iç yüzeyinde spiral bir yapı oluşturur ve MinC'yi bu bölgeye yönlendirir; bu ikili FtsZ halkasının oluşumunu engeller.
- MinD spirali hücren boyunca kutuplar arasında gidip gelir ve bu hareket, bölünmeyi inhibe eden MinC'nin konumunu belirler.
- Aynı anda MinE de kutuplar arasında salınarak MinC ve MinD'yi uzaklaştırır; böylece bu proteinlerin en düşük yoğunlukta olduğu hücre merkezi, FtsZ halkasının oluşması için en uygun bölge hâline gelir.



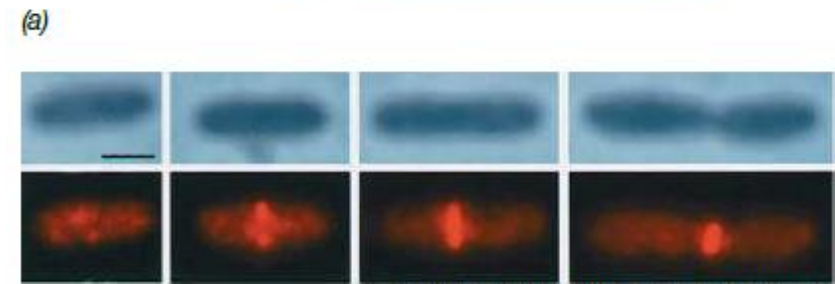
Kromozomların Ayrılması ve FtsZ Dinamiği

- Hücre uzamaya devam ederken ve bölme oluşumu başlarken, iki kromozom kopyası da yavaş yavaş ayrılarak her bir yavru hücreye doğru çekilir.
- FtsK ve diğer bazı Fts proteinleri, kromozomların doğru şekilde ayrılmasına yardımcı olur.
- Hücre büzülmeye başladığında FtsZ halkası depolimerize olur ve bu depolimerizasyon, bölmenin içe doğru büyümesini tetikler.



PROF. DR. DEKTAŞ İLFF

- 54



T. den Blaauwen & Nanne Nanninga, Univ. of Amsterdam

(b)

Tıbbi Önemi: Hücre Bölünmesini Hedefleyen İlaçlar

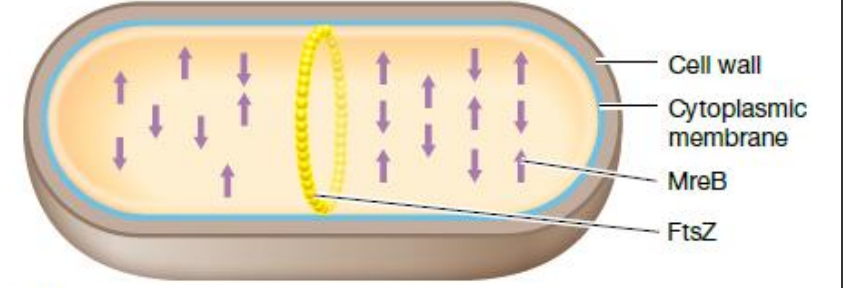
- Bakteriyel hücre bölünmesinin ayrıntılı olarak anlaşılması, patojen bakterilere karşı yeni ilaçların geliştirilmesine katkı sağlayabilir.
- Penisilin gibi hücre duvarı sentezini hedef alan ilaçlara benzer şekilde, Fts proteinleri veya diğer bölünme proteinlerini hedefleyen ilaçlar geniş klinik uygulamalara sahip olabilir.
- Bu nedenle hücre bölünmesinin moleküler düzeyde anlaşılması, tıbbi açıdan yüksek öneme sahiptir.

Hücre Morfolojisi ve Sitoplazma İskeleti

- Bakterilerde belirli proteinler, hücre bölünmesini yönettiği gibi sitoplazma iskeletini oluşturarak hücre şeklinin belirlenmesini sağlar.
- Sitoplazma iskeleti, bakterilerin küresel, spiral, hilal biçimli gibi tipik morfolojilere sahip olmasına izin veren bir yapı görevindedir.
- Bu şekil belirleyici proteinler, ökaryot hücrelerdeki temel hücre iskeleti proteinleriyle dikkate değer bir benzerlik gösterir.
- Bakteriler de tıpkı ökaryotlar gibi dinamik ve çok işlevli bir hücre iskeleti yapısına sahiptir.

MreB: Bakterilerde Şekil Belirleyici Ana Protein

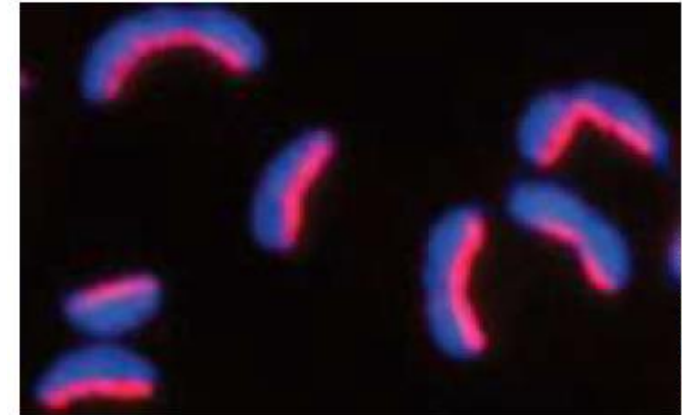
- Bakterilerde hücre şeklinin belirlenmesinde en önemli faktör MreB adlı proteindir.
- MreB, bazı Archaea türlerinde de bulunan basit bir hücre iskeleti oluşturur.
- Bu protein, hücre zarının hemen altında yama benzeri filamentler hâlinde dizilir.
- MreB, hücre duvarı sentezinde görev alan diğer proteinleri belirli bir desende organize ederek şeklin oluşmasını sağlar.



(a)



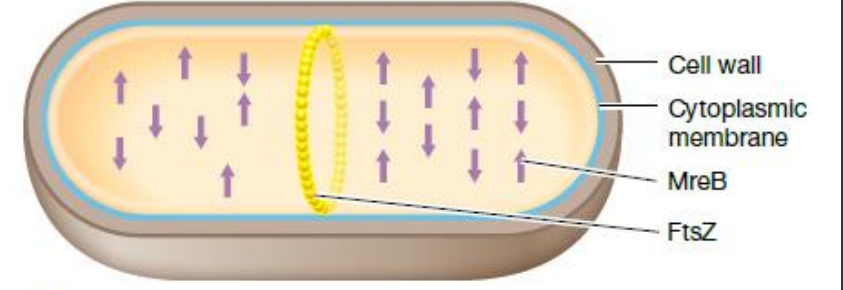
(b)



(c)

MreB'in Yokluğunda Hücre Şekli Değişimi

- Çubuk biçimli bakterilerde mreB geninin inaktive edilmesi, hücrelerin küresel forma dönüşmesine neden olur.
- Doğal olarak kok biçimli olan birçok bakteri, mreB genine sahip değildir ve bu protein üretilemez.
- Bu bulgu, bakterilerde varsayılan morfolojinin evrensel olduğunu düşündürmektedir.
- Evrensel olmayan bakterilerde MreB filamentlerinin düzenindeki farklılıklar, çeşitli morfolojik tiplerin ortaya çıkmasını sağlar.

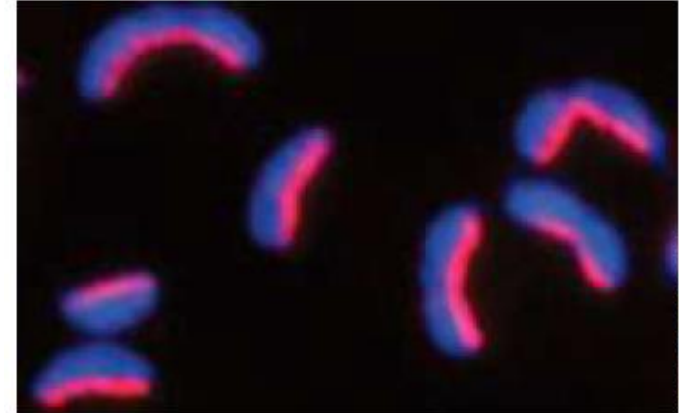


(a)



Alex Farnstone

(b)

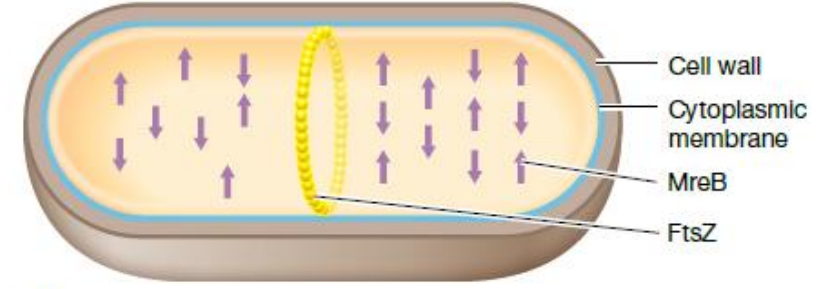


Christine Jacobs-Wagner

(c)

MreB Filamentlerinin Dinamik Yapısı ve İşlevi

- MreB filamentleri statik değildir; büyüyen bir hücrenin sitoplazmasında bir yandan diğer yana hareket eder (Figür a).
- Bu filamentler, temas ettikleri membran bölgelerinde peptidoglikan sentezinin gerçekleşmesini sağlar.
- Böylece yeni hücre duvarı, FtsZ bölgesinden tek bir noktadan değil, hücrenin birçok noktasından eşzamanlı olarak oluşturulur.
- MreB, hücre silindrine dik hareket ederek uzama boyunca duvar sentezinin dağılımlı şekilde gerçekleşmesine olanak tanır.



(a)



(b)



Alex Farnstone

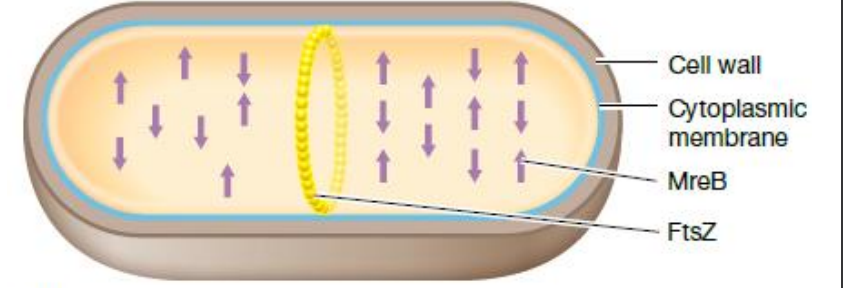


Christine Jacobs-Wagner

(c)

Çubuk Şeklindeki Hücrelerde Uzama Mekanizması

- MreB sayesinde çubuk biçimli hücreler, yalnızca uzun eksen boyunca kontrollü bir şekilde uzar.
- Bu uzama, hücre duvarı sentezinin belirli aralıklarla hücre boyunca dağılmasıyla gerçekleşir.
- Tek bir merkezden büyüme yerine çok noktalı bir sentez mekanizması etkin hâle gelir.
- Bu süreç, çubuk şeklin korunması için temel bir biyolojik düzenlemedir.

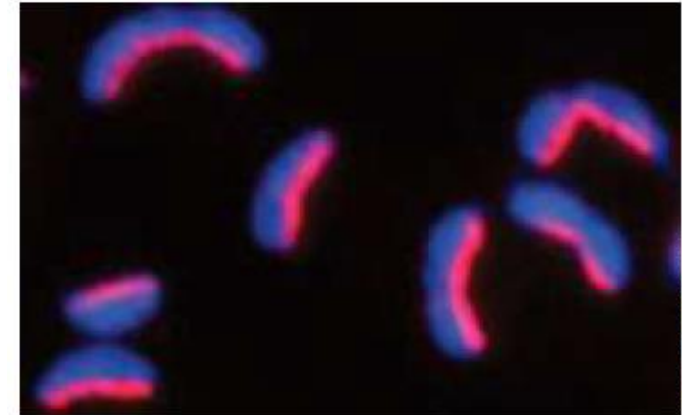


(a)



Alex Farnstone

(b)

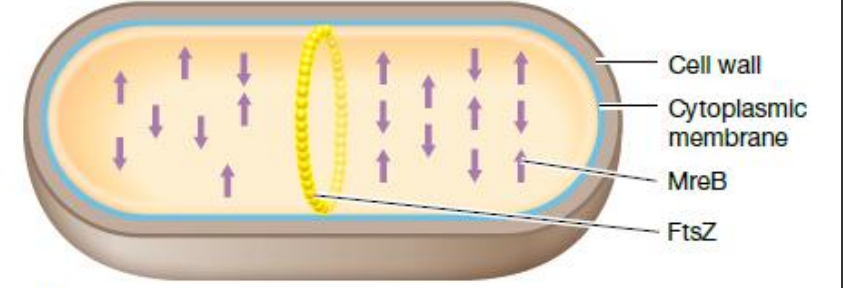


Christine Jacobs-Wagner

(c)

Crescentin: Kavisli Hücrelerin Şekil Belirleyicisi

- Vibrio biçimli *Caulobacter* türünde MreB'ye ek olarak crescentin adı verilen bir şekil belirleyici protein bulunur.
- Crescentin yaklaşık 10 nm genişliğinde filamentler oluşturur ve hücrenin iç yüzeyinde konkav tarafa yerleşir.
- Bu filamentlerin düzeni, *Caulobacter* hücrelerine karakteristik kavisli morfolojiyi kazandırır (Figür c).
- Crescentin'in varlığı, hücrede görülen eğimli yapının temel belirleyicisidir.



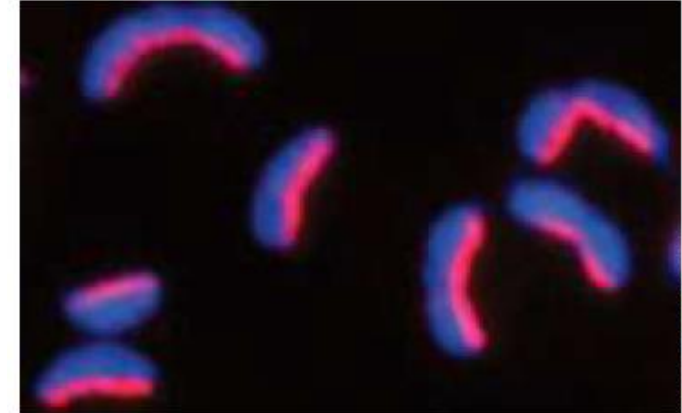
(a)



(b)



Alex Farnstone



(c)

Christine Jacobs-Wagner

Caulobacter'in Yaşam Döngüsü ve Crescentin'in Rolü

- *Caulobacter*, suda yaşayan ve karmaşık bir yaşam döngüsüne sahip bir bakteri türüdür.
- Hareketli “swarmers” hücreleri zamanla yüzeye tutunarak sap oluşturan hücrelere dönüşür.
- Saplı hücreler bölünerek yeni swarmer hücreleri oluşturur ve bu hücreler yeni yaşam alanlarına yayılır.
- Bu yaşam döngüsünün genetik düzeyde sıkı bir şekilde kontrol edilmesi nedeniyle *Caulobacter*, hücrel farklılaşmanın incelenmesinde model bir sistemdir.

Crescentin ve Diğer Kavis Oluşturan Proteinler

- Crescentin sadece *Caulobacter*'de bulunur, ancak benzer proteinler *Helicobacter pylori* gibi başka kavisli bakterilerde de keşfedilmiştir.
- Bu benzerlik, crescentin benzeri proteinlerin kavisli hücre morfolojisinin oluşması için gerekli olabileceğini düşündürmektedir.
- Bu gözlem, eğrilik oluşturan mekanizmaların evrimsel olarak korunmuş olabileceğine işaret eder.
- Kavisli bakterilerde morfolojik düzenlemenin temelinde bu proteinlerin yer aldığı kabul edilmektedir.



Bakteriler ve Ökaryotlarda Hücre Şekli/Evrimi

- Bakterilerdeki MreB, yapısal olarak helikal olmasa da işlev bakımından ökaryotlardaki aktin proteinine benzer.
- FtsZ proteini, hem yapı hem işlev bakımından ökaryotik tübülün proteinine yakın bir özellik gösterir.
- Crescentin ise ökaryotlardaki keratin proteinleriyle ilişkilidir ve ara filamentlere benzerlik taşır.
- Bu durum, hücre bölünmesi ve hücre iskeletini yöneten birçok proteinin evrimsel kökenlerinin bakterilere dayandığını düşündürmektedir.

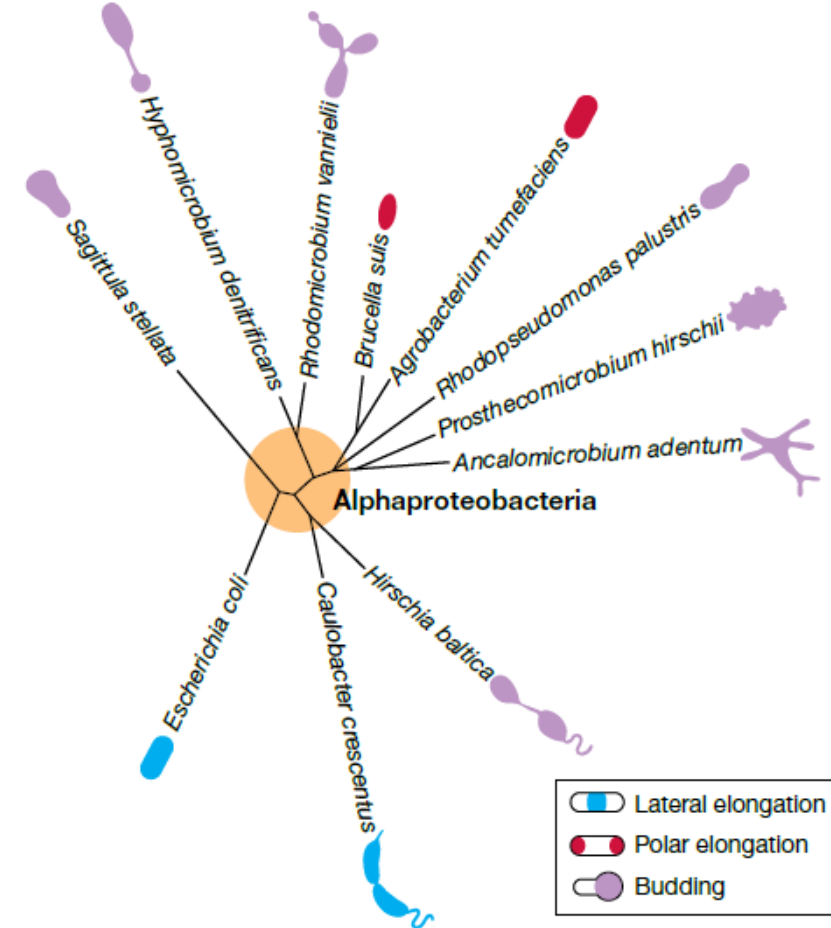


Archaea ve Evrimsel Genetik Perspektif

- FtsZ dışındaki şekil belirleyici proteinlerin çoğuna ait genler, Archaea'nın büyük bölümünde bulunmamaktadır.
- Bu farklılık, prokaryotik alanlar arasında hücre iskeleti sistemlerin evrimsel olarak ayrıştığını göstermektedir.
- Bakteriyel hücre iskeleti elemanları ile ökaryotik karşılıkları arasında anlamlı bir evrimsel bağ mevcuttur.
- Bu bağ, hücre iskeletinin kökenine yönelik önemli ipuçları sunmaktadır.

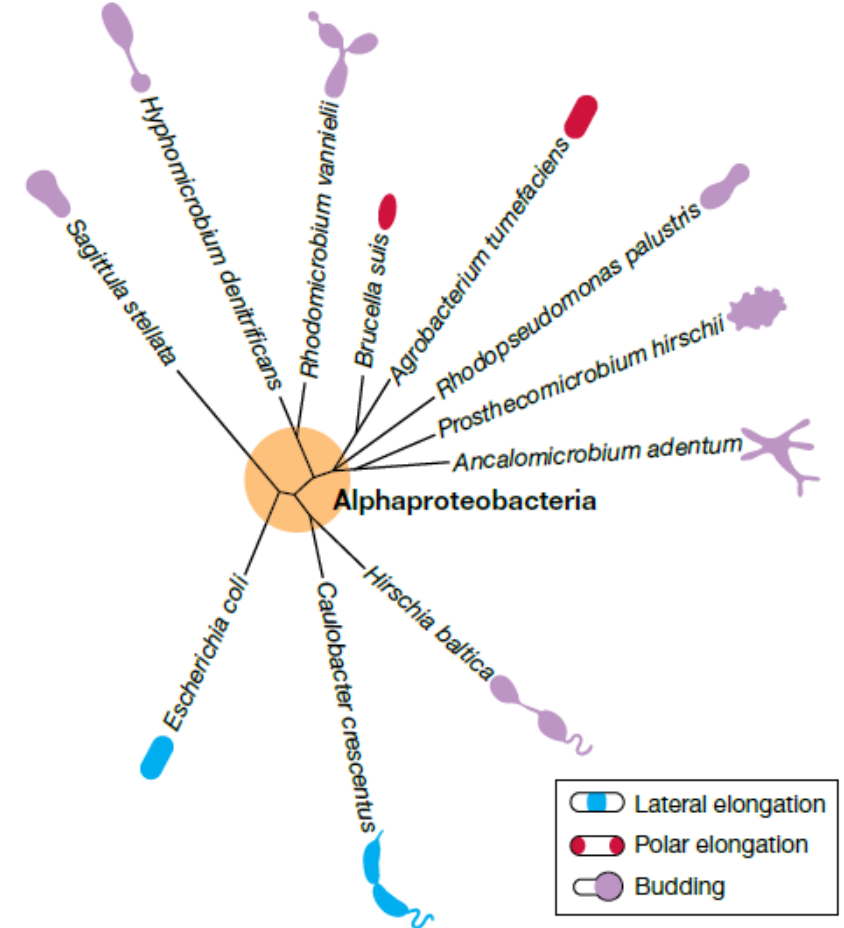
Bakterilerde Morfolojik Çeşitlilik ve *Alphaproteobacteria*

- Bakteriyel dünyada büyük bir morfolojik çeşitlilik bulunur ve bu çeşitlilik özellikle *Alphaproteobacteria* türlerinde belirgindir.
- *Alphaproteobacteria*, morfolojik çeşitliliğe ek olarak metabolik açıdan da son derece çeşitlidir.
- Bu grup, toprak ve su ortamlarından bitki ve hayvanlarla kurulan simbiyotik ilişkilere kadar geniş ekolojik alanlarda yaşam sürer.
- Farklı habitatlara uyum sağlayabilmeleri morfolojik esneklikleriyle ilişkilidir.



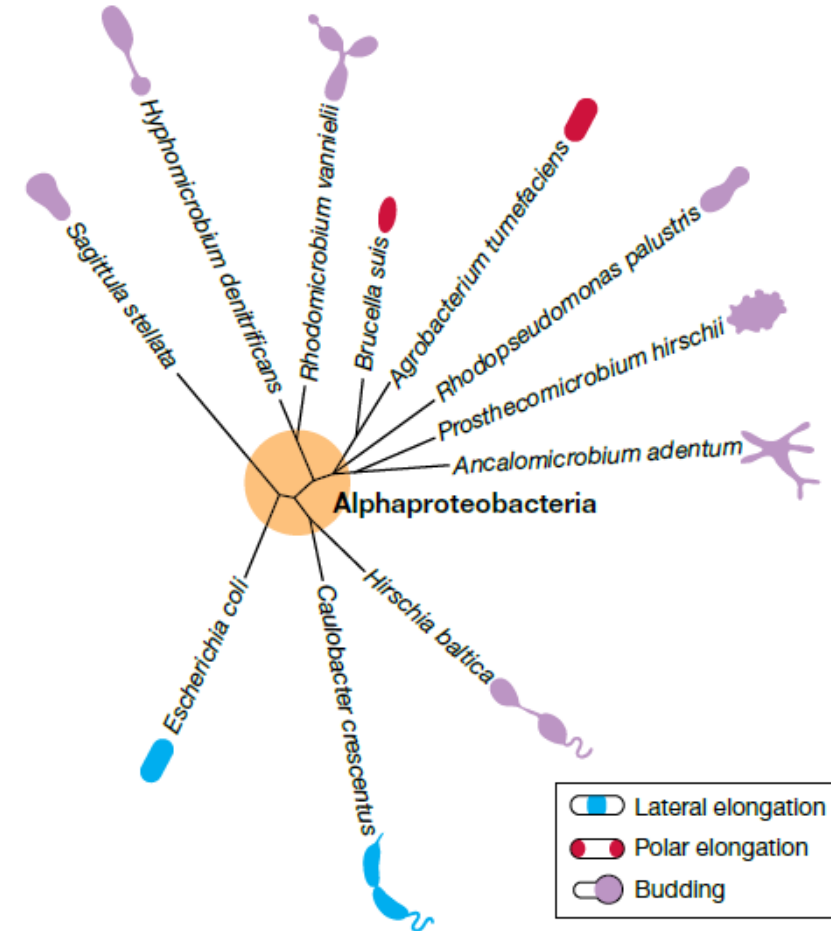
Polar Uzama ve Tomurcuklanma (Budding) Mekanizmaları

- Bazı *Alphaproteobacteria* türleri, peptidoglikanı hücrenin kutuplarında sentezleyerek büyür (polar elongation).
- Bazıları ise tomurcuklanma (budding) olarak bilinen süreçle yeni hücreler oluşturur.
- Tomurcuklanma, hücre içinde farklı bölgelere yerleşmiş peptidoglikan sentez bölgeleriyle ilişkili olarak çeşitli morfolojiler üretir.
- Ancak tomurcuklanan hücrelerde peptidoglikan sentez sisteminin tam konumlanma mekanizması hâlâ bilinmemektedir.



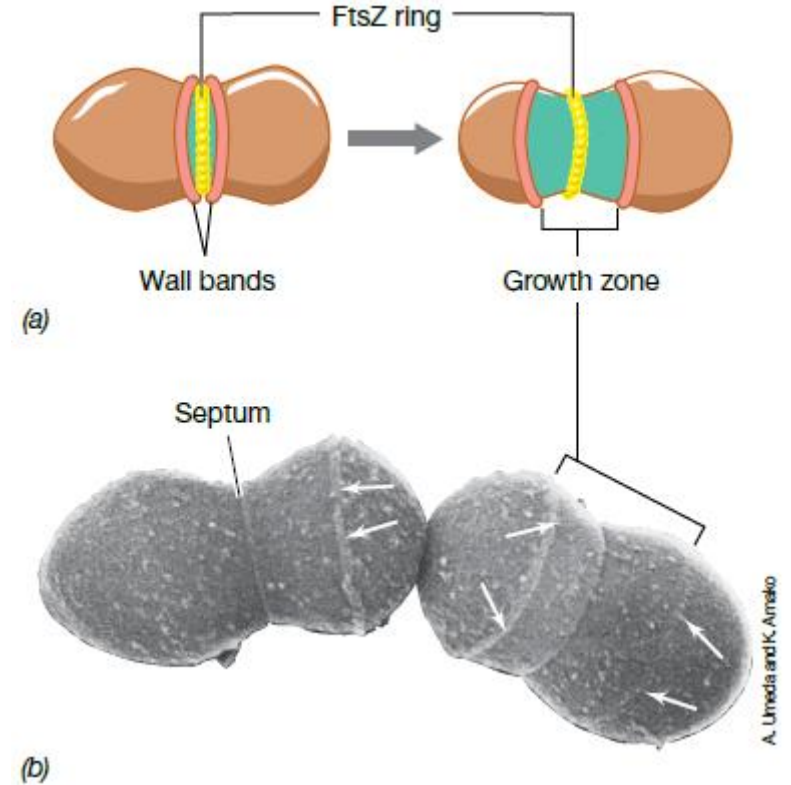
Morfoloji ve Filogenetik İlişkinin Güvenilmezliği

- Yandaki figür, morfolojinin filogenetik konumu öngörmek için güvenilir bir kriter olmadığını açıkça göstermektedir.
- Bir bakterinin şekline bakarak onun evrimsel akrabalık ilişkileri kesin olarak belirlenemez.
- Aynı morfoloji farklı evrimsel çizgilerde bağımsız olarak ortaya çıkabilir.
- Bu prensip, mikrobiyal çeşitliliği anlamada morfolojinin tek başına yeterli olmadığını vurgular.



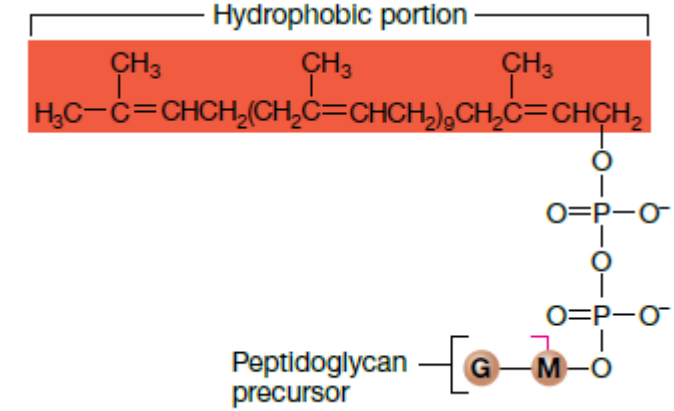
Büyüyen Hücrelerde Peptidoglikan Sorunu

- Bakteri hücreleri büyürken, yeni peptidoglikanın eklenebilmesi için mevcut peptidoglikanın geçici olarak kesilmesi gerekir.
- Koklarda yeni hücre duvarı, FtsZ halkasından iki yöne doğru ilerleyerek büyür.
- Çubuk biçimli hücrelerde ise yeni duvar, hücre boyunca birden fazla noktada oluşur.
- Her morfolojide büyüyen bir hücre, yeni peptidoglikanı sentezleyip bunu sitoplazmik membranın dışına taşımak zorundadır.



Yeni Peptidoglikanın Eklenmesi: Genel İlke

- Peptidoglikan, kauçuk benzeri ince bir tabaka gibi gerilime dayanıklı bir yapı olarak düşünülebilir.
- Büyüme sırasında eski peptidoglikanın kontrollü biçimde kesilmesi ve aynı anda yeni öncüllerin eklenmesi gerekir.
- Bactoprenol adı verilen lipid taşıyıcı, peptidoglikan öncüllerinin eklenmesinde temel rol oynar.
- Bactoprenol, bağlı olduğu NAG/NAM/pentapeptit öncülünü hidrofobik hâle getirerek membranı geçmesini sağlar.

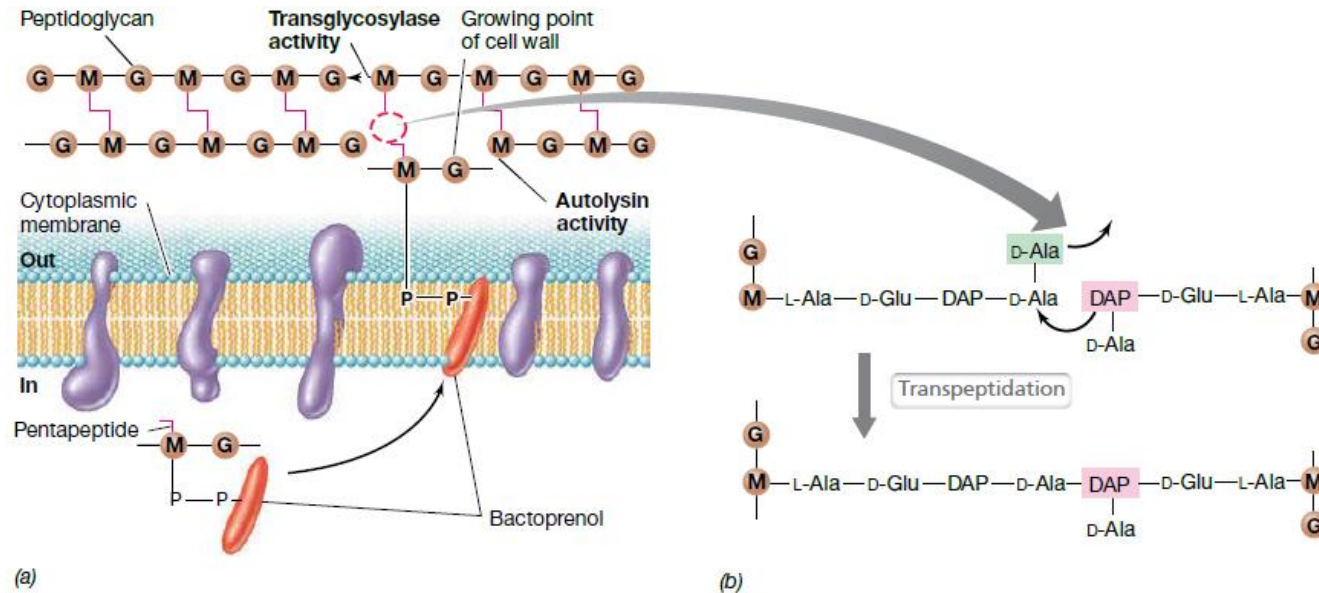


- Hücre dışına çıkan bactoprenol kompleksi, transglikozilaz enzimiyle etkileşerek öncülleri hücre duvarındaki büyüme noktasına yerleştirir.
- Transglikozilazlar aynı zamanda glikozidik bağların oluşmasını katalizler.



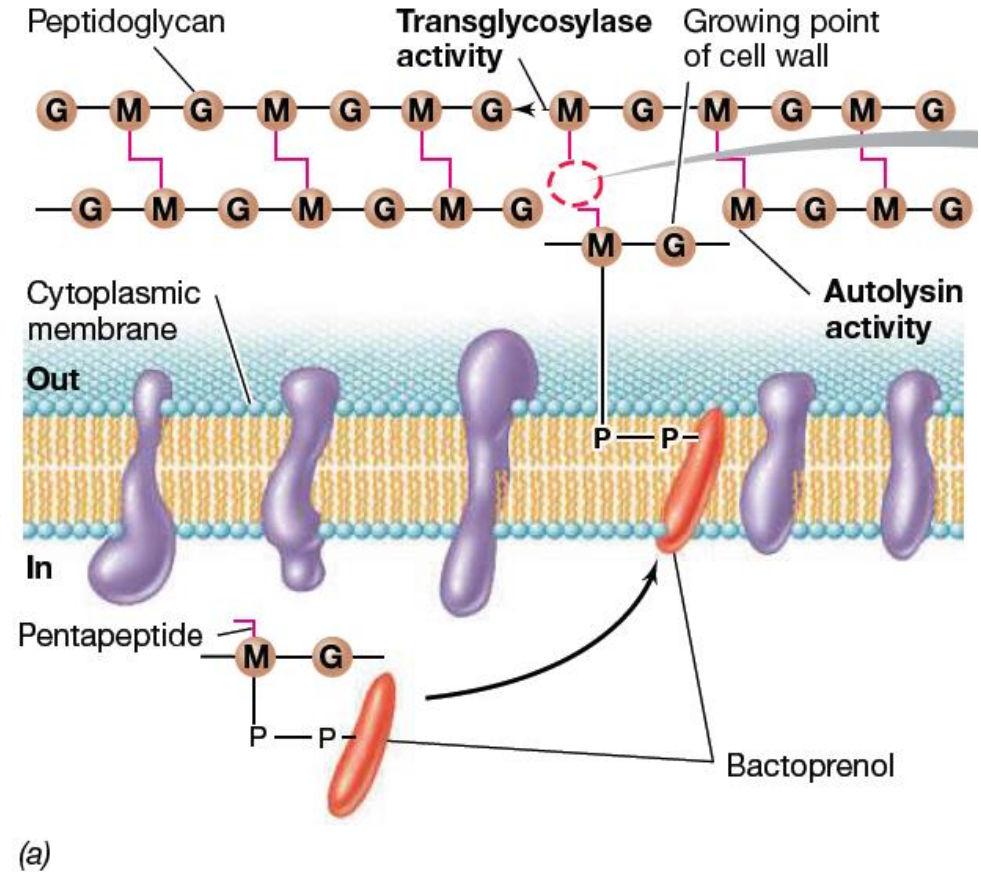
Bactoprenol ve Transglukozilazların Rolü

- Bu işlemden önce, mevcut peptidoglikanda küçük boşluklar oluşturan otolizin enzimleri görev yapar.
- Otolizinler, NAG ve NAM arasındaki bağları hidrolize ederek yeni malzemenin eklenebileceği aralıkları oluşturur.



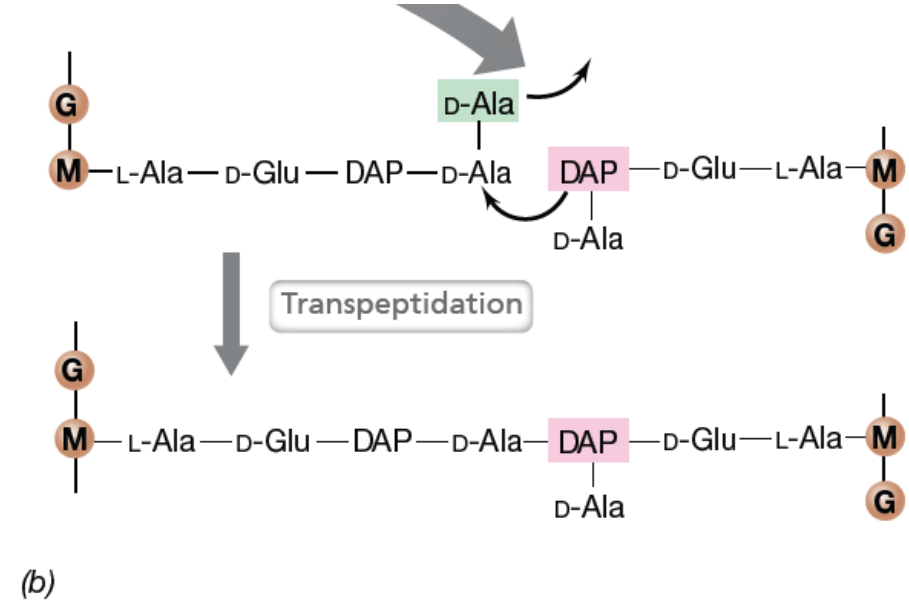
Yeni ve Eski Peptidoglikanın Birleşimi

- Otolizinlerin açtığı boşluklara yeni peptidoglikan eklenir.
- Gram pozitif bakterilerde, yeni ve eski peptidoglikanın birleştiği bölgede hücre yüzeyinde bir duvar bandı görülür.
- Peptidoglikan sentezi çok sıkı şekilde koordine edilmelidir; öncüllerin otolizin aktivitesi sırasında hazır bulunması gerekir.
- Aksi hâlde, ek yerinde oluşacak bir açıklık peptidoglikan dokusunda zayıflamaya ve hücrenin kendiliğinden parçalanmasına (otolizis) yol açabilir.



Transpeptidasyonun Önemi

- Peptidoglikan sentezinin son basamağı, komşu glikan zincirlerindeki muramik asit kalıntıların peptid bağlarıyla çapraz bağlanmasıdır.
- Gram negatif bakterilerde, çapraz bağ DAP ile D-alanin arasında kurulur.
- Öncülün ucundaki iki D-alanin'den biri transpeptidasyon sırasında uzaklaştırılır.
- Bu reaksiyon ekzergoniktir ve transpeptidasyonu ileriye taşıyacak enerjiyi sağlar.



Transpeptidazlar ve FtsI Proteini

- *E. coli*'de FtsI proteini bir transpeptidaz olarak görev yapar.
- Transpeptidasyon, hücre duvarı bütünlüğünün korunmasında zorunlu bir basamaktır.
- Bu basamak bozulduğunda glikan zincirleri yeterince güçlenemez.
- Otolizinler çalışmaya devam ettiği için duvar zayıflar ve hücre parçalanabilir.

Penisilinin Etki Noktası

- Penisilin, transpeptidasyonu gerçekleştiren penisilin bağlayıcı proteinlere bağlanarak bu proteinleri inaktive eder.
- FtsI dahil birçok penisilin bağlayıcı protein bakterilerde tanımlanmıştır.
- Transpeptidasyon durduğunda, otolizinlerin devam eden aktivitesi peptidoglikanı zayıflatır ve hücre patlar.
- İnsanlarda peptidoglikan bulunmadığından, penisilin yalnızca büyüyen bakterileri hedef alır ve bu seçicilik klinik etkinliğin temelidir.

Bakteriyel Gelişim ve Farklılaşmaya Giriş

- Bakterilerin bazı türleri, tek hücreli olmalarına rağmen belirli koşullarda özel hücre tiplerine farklılaşabilir.
- Bu farklılaşma süreçleri, genetik olarak aynı iki hücrede farklı işlevlerin ortaya çıkmasıyla sonuçlanır.
- *Bacillus*, *Caulobacter* ve *Anabaena* bu gelişim süreçlerinin klasik örneklerini oluşturur.
- Ayrıca bazı bakteriler, süspansiyon hâinden çıkıp çok hücreli biyofilmler oluşturma kapasitesine sahiptir.

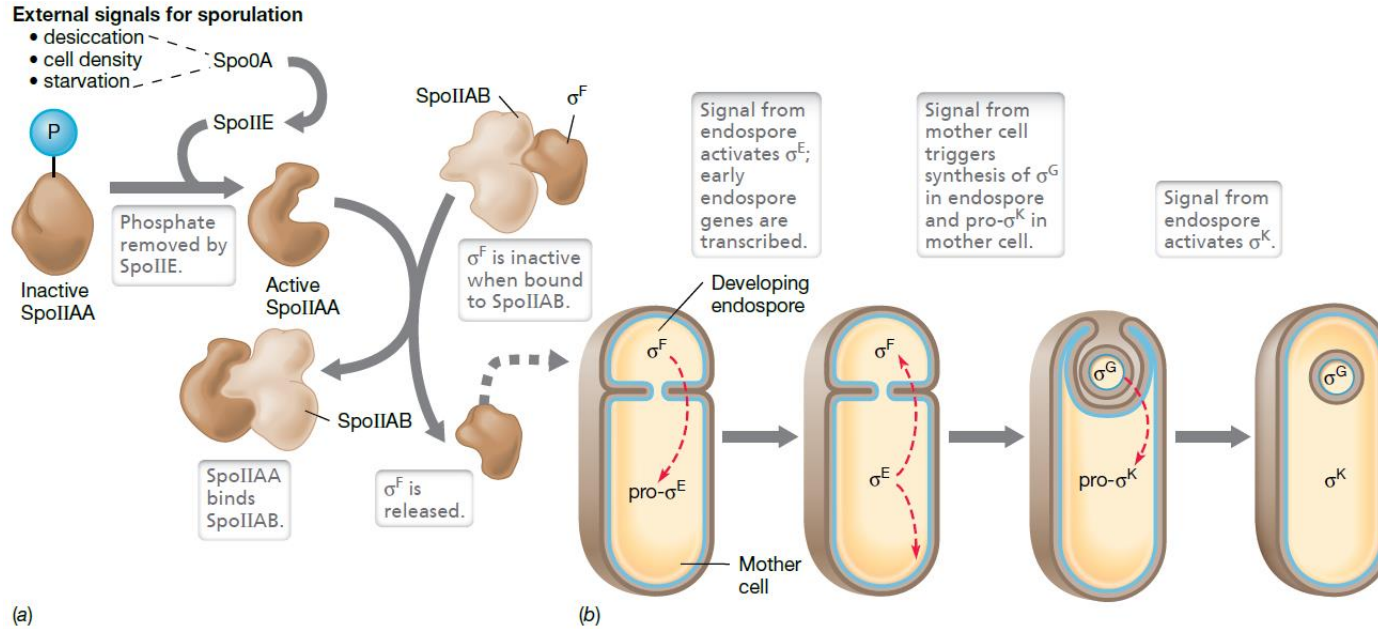


Endospor Oluşumunun Genel Özellikleri

- Elverişsiz koşullarda bazı bakteriler vejetatif hücrelerden spor oluşturarak hayatta kalır.
- *Bacillus* türlerinde spor, hücre içinde gelişen bir endospor şeklinde ortaya çıkar.
- Spor oluşmadan önce hücre asimetric bölünür ve küçük hücre endosporun temelini oluşturur.
- Gelişim tamamlandığında ana hücre parçalanır ve olgun endospor serbest kalır.

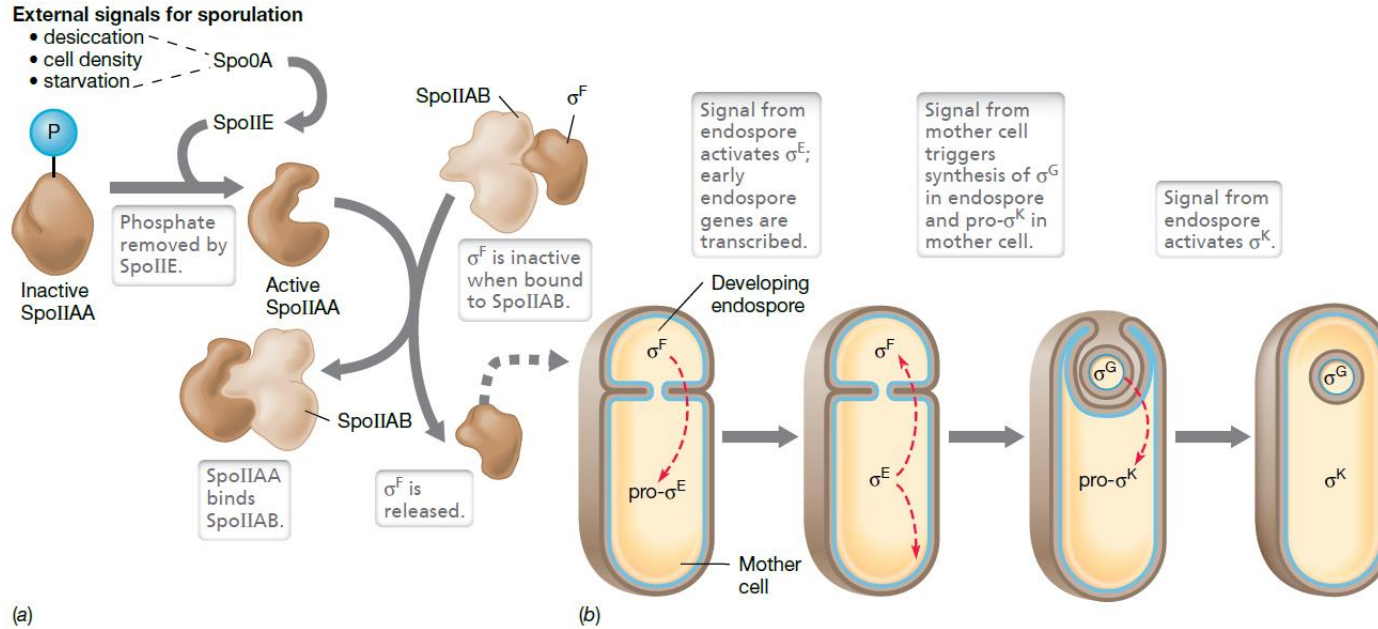
Sporulasyonun Başlatılması

- *Bacillus subtilis*'te spor oluşumu açlık, kuraklık ve büyümeyi engelleyen sıcaklıklar gibi olumsuz koşullarla tetiklenir.
- Hücre çevresel koşulları beş adet sensör kinaz aracılığıyla izler.



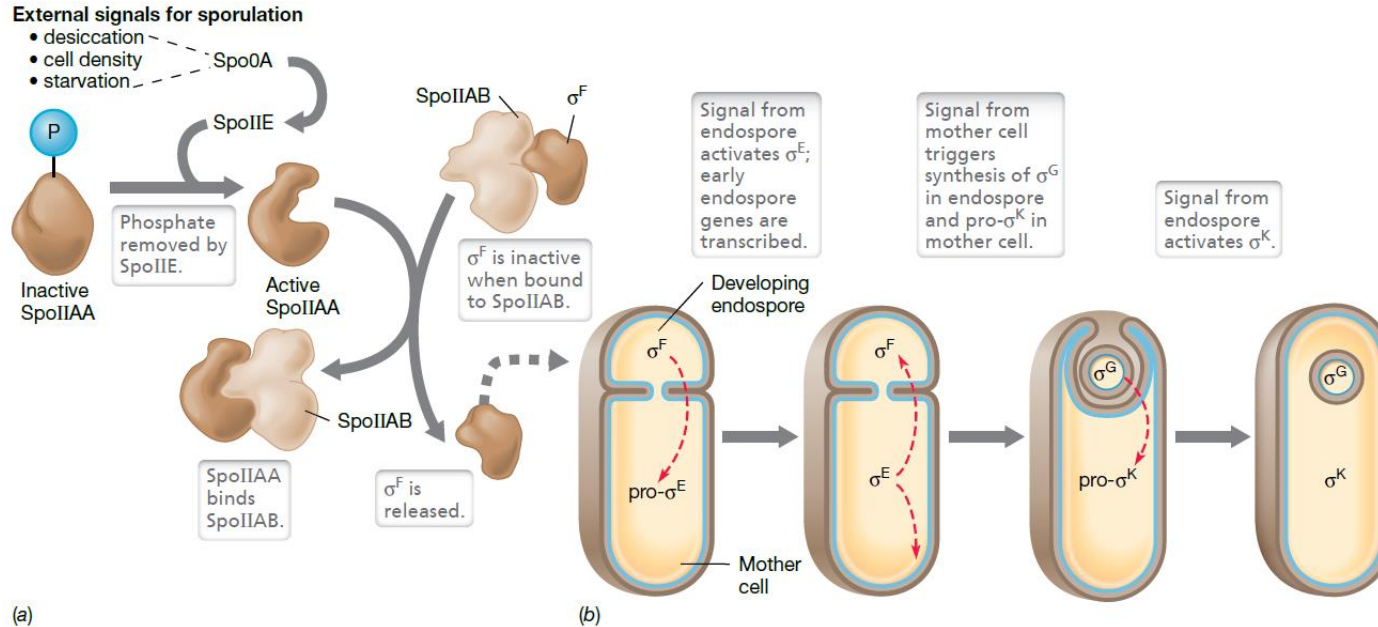
Sporulasyonun Başlatılması

- Bu kinazlar, iki bileşenli sistemlere benzeyen fakat daha karmaşık bir fosfo-iletim mekanizması yürütür.
- Bu süreç sonunda Spo0A proteininin fosforilasyonu artar ve sporulasyon başlamış olur.



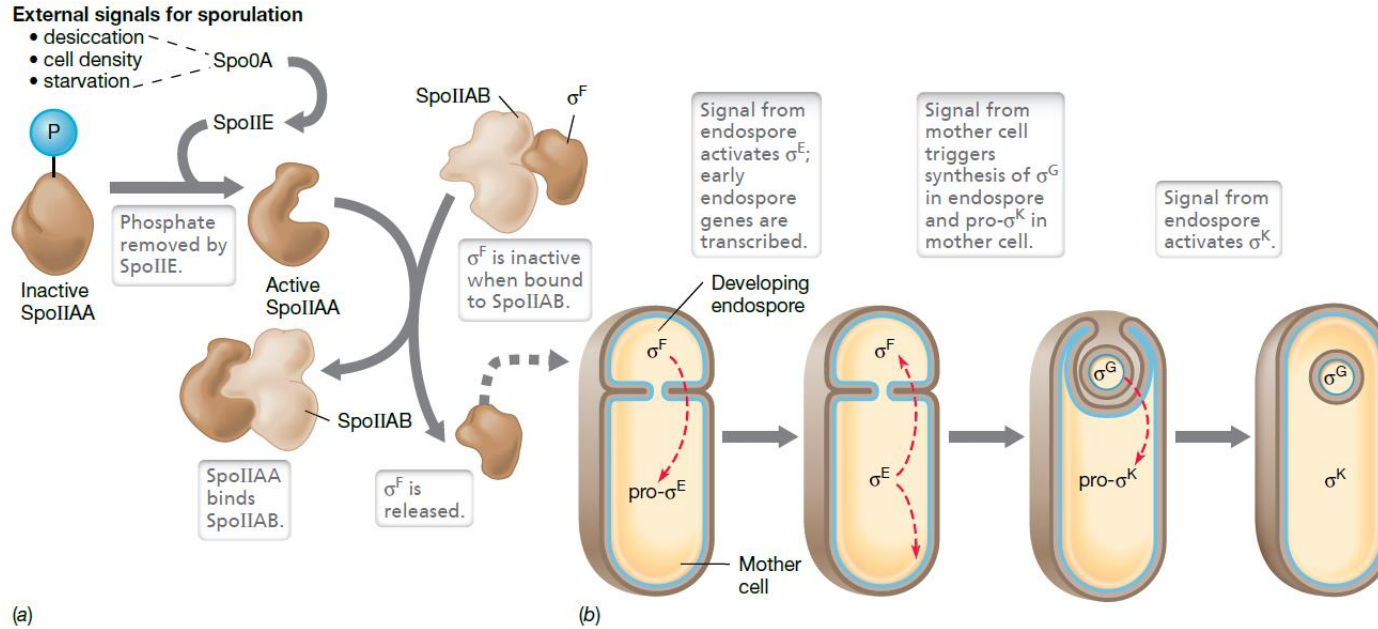
Sporulasyon Faktörlerinin Rolü

- Yüksek fosforilasyon düzeyine ulaşan Spo0A, sporulasyonla ilişkili birçok genin ifadesini düzenler.
- Bu genlerden biri olan SpoIIE, SpoIIAA üzerindeki fosfatı uzaklaştırarak anti-sigma faktörü SpoIIAB'nin etkisini ortadan kaldırır.



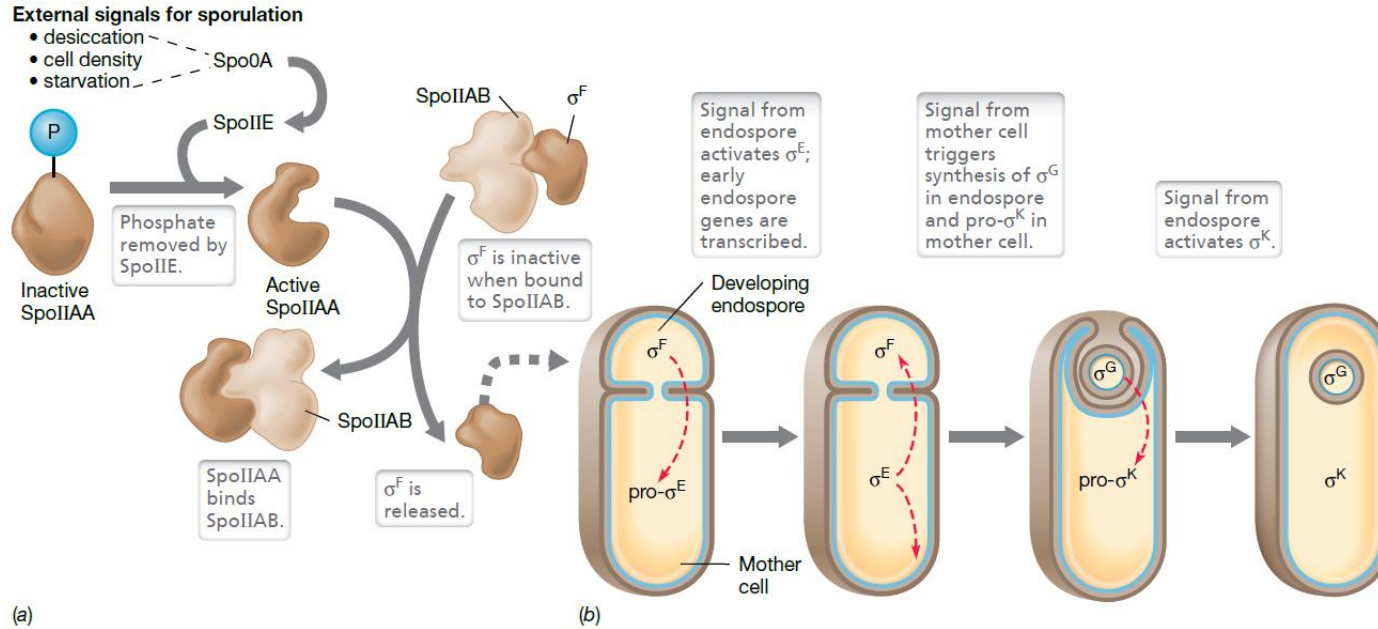
Sporulasyon Faktörlerinin Rolü

- Böylece sigma faktörü σ^F serbestleşir ve sporulasyonun ilerlemesi için gerekli genlerin transkripsiyonunu başlatır.
- σ^F 'in aktive olması, gelişimin bir sonraki aşamalarının gerçekleşmesi için kritik bir adımdır.



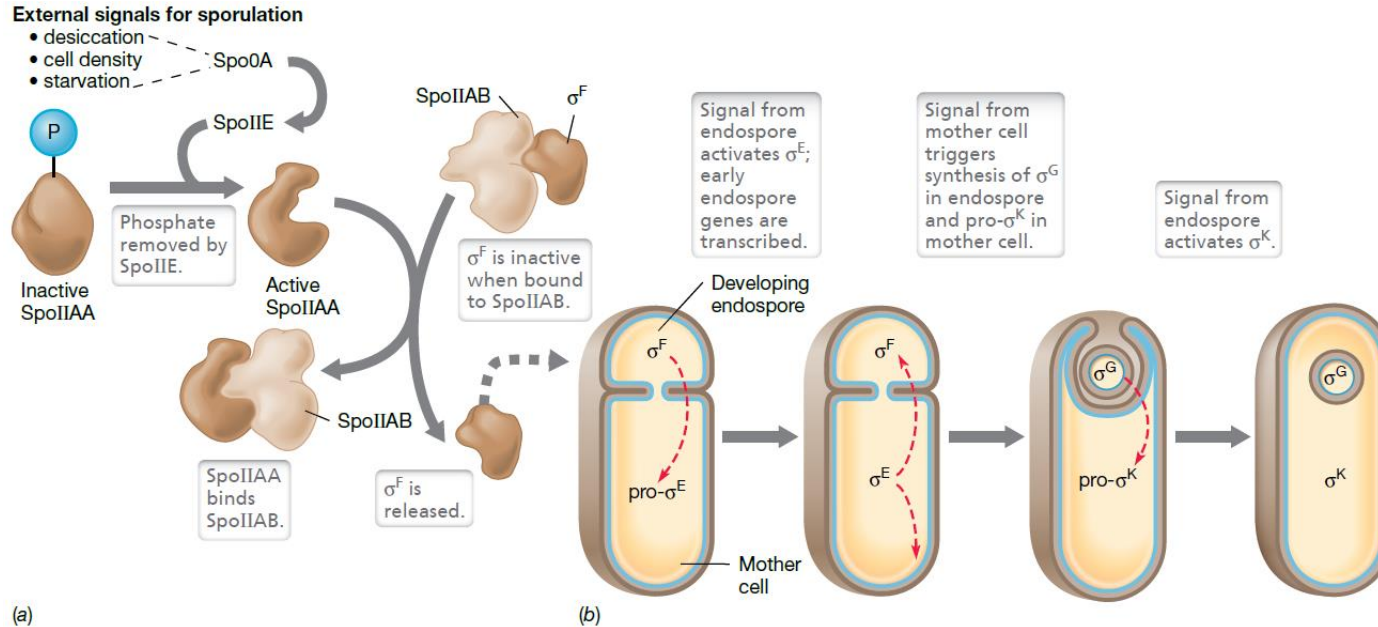
Alternatif Sigma Faktörlerinin Koordinasyonu

- Sporulasyona giren bir *Bacillus* hücresi, gelişimi dört farklı sigma faktörü ile kontrol eder.
- σ^F ve σ^G gelişmekte olan endosporun içinde (forespore), σ^E ve σ^K ise ana hücrede görev yapar (Figür b).



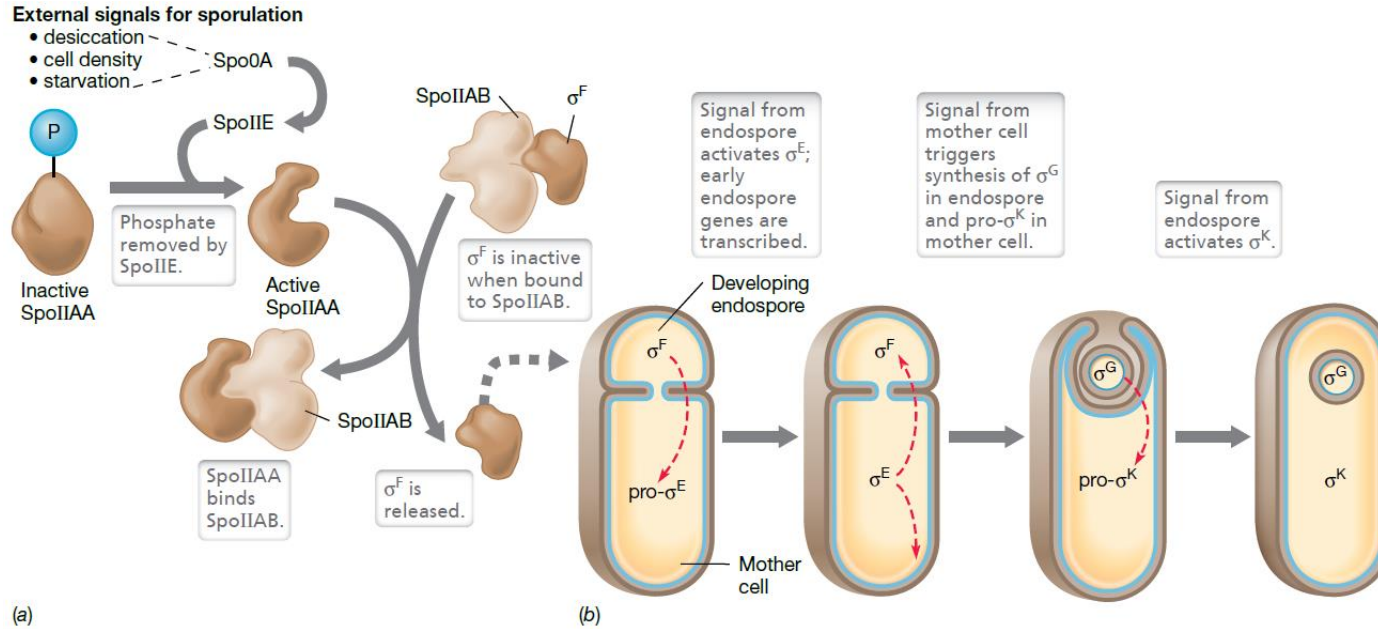
Alternatif Sigma Faktörlerinin Koordinasyonu

- Sporulasyon sinyali, forespore içinde zaten bulunan fakat inaktif olan σ^F 'in aktive olmasını sağlar (Figür a).
- Aktif σ^F , bir sonraki sigma faktörü olan σ^G 'yi kodlayan genlerin ifadesini başlatır ve ana hücrede σ^E 'nin aktivasyonuna katkıda bulunur.



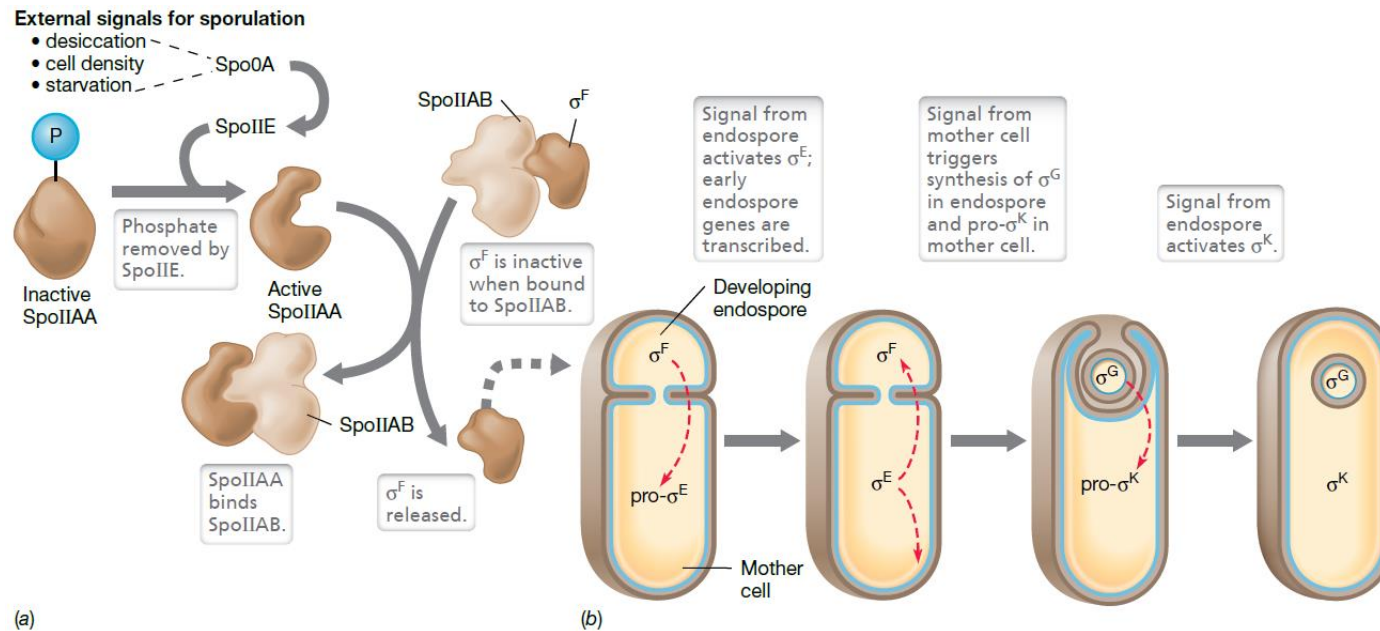
Geç Evre Sporulasyon ve Endosporun Olgunlaşması

- Aktive olan σ^E , ana hücrede daha ileri aşamada görev alacak olan σ^K 'yi kodlayan genlerin transkripsiyonunu başlatır.
- σ^G (forespore) ve σ^K (ana hücre) birlikte geç evre sporulasyon genlerini ifade eder.



Geç Evre Sporulasyon ve Endosporun Olgunlaşması

- Bu süreçte endosporun kendine özgü katmanları ve yapıları oluşur.
- Gelişim tamamlandığında olgun endospor serbest bırakılır.



Sporulasyonda Besin Kısıtının Rolü

- *Bacillus* türlerinde besin kıtlığı spor oluşumunun temel tetikleyicisidir.
- Sporulasyona başlayan hücreler, henüz Spo0A aktive olmamış komşu *Bacillus* hücrelerini parçalamak üzere toksik bir protein salgılar.
- Aynı hücreler, komşu hücrelerin sporulasyona girmesini geciktiren ikinci bir protein daha üretir.
- Sporulasyona başlamış hücreler, kendi salgıladıkları toksine karşı bir antitoksin sentezleyerek kendilerini korur.

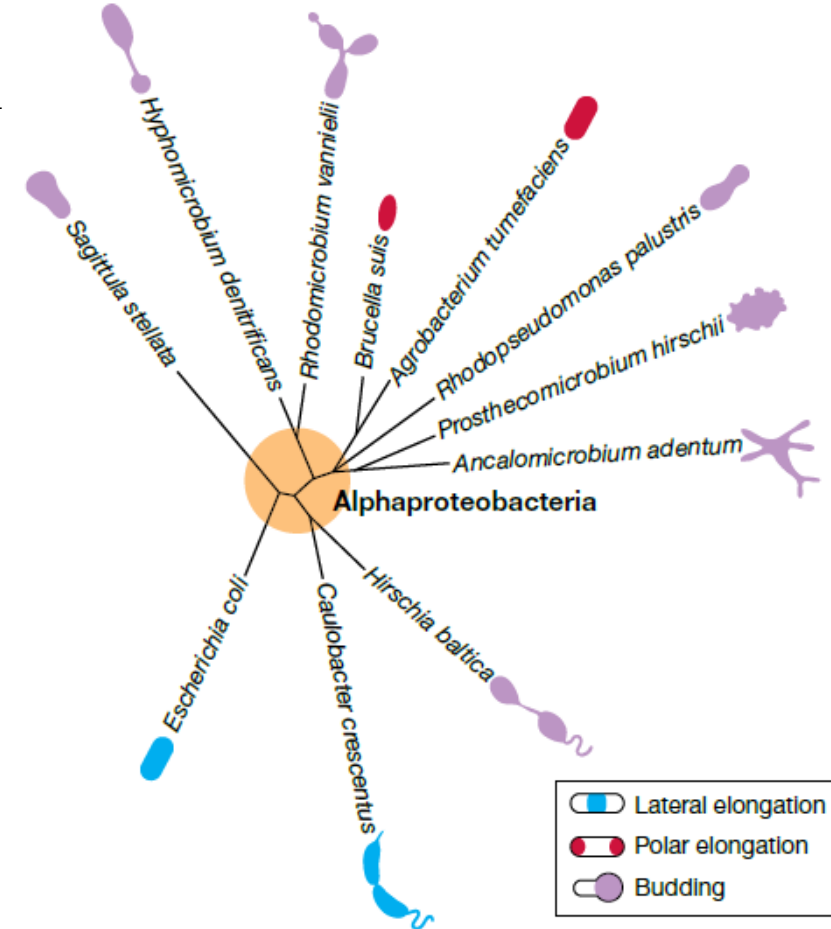


Besin Sağlama ve Topluluk Düzeyinde Strateji

- Parçalanmış komşu hücreler, gelişmekte olan endosporlar için besin kaynağı olarak kullanılır.
- Özellikle fosfat eksikliği, toksik proteini kodlayan genin transkripsiyonunu artırır.
- Bu süreç, türün tüm bireylerinin değil, bir kısmının hayatta kalmasını hedefleyen bir "fedakârlık stratejisini" yansıtır.
- Böylece yalnızca gelişim sürecine girmiş hücrelerin hayatta kalması ve spor oluşturabilmesi sağlanır.

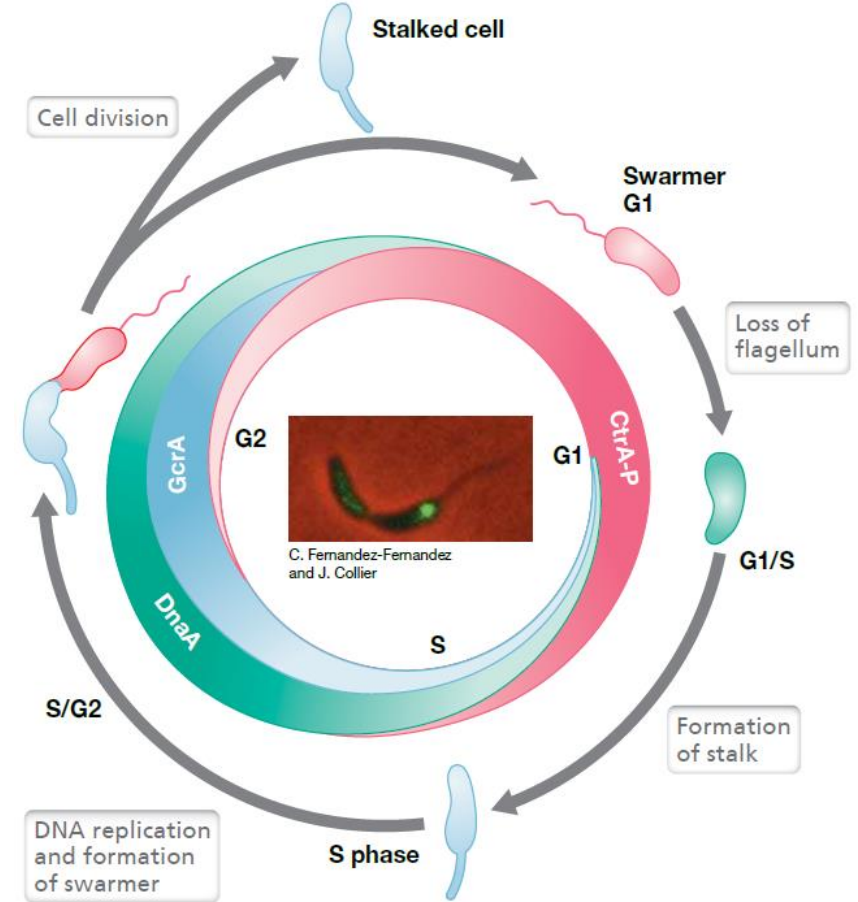
Caulobacter'in Ayırt Edici Hücresel Farklılaşması

- *Caulobacter*, genetik olarak aynı fakat yapı ve işlev bakımından farklılaşmış iki kardeş hücre oluşturan gram-negatif bir bakteridir.
- Bu cins, basit bir yaşam döngüsüne sahip olan ve oligotrofik sucul ortamlarda yaygın bulunan *Alphaproteobacteria* grubunda yer alır.
- Yaşam döngüsünde, serbest yüzen (swarmer) hücreler ile flagellası olmayan ve yüzeylere sapçık ile tutunan stalked hücreler birbirinin yerine geçer.
- Swarmer hücreler yalnızca yayılmayı sağlarken, stalked hücreler bölünebilme yeteneğine sahip olan tek hücre tipidir.



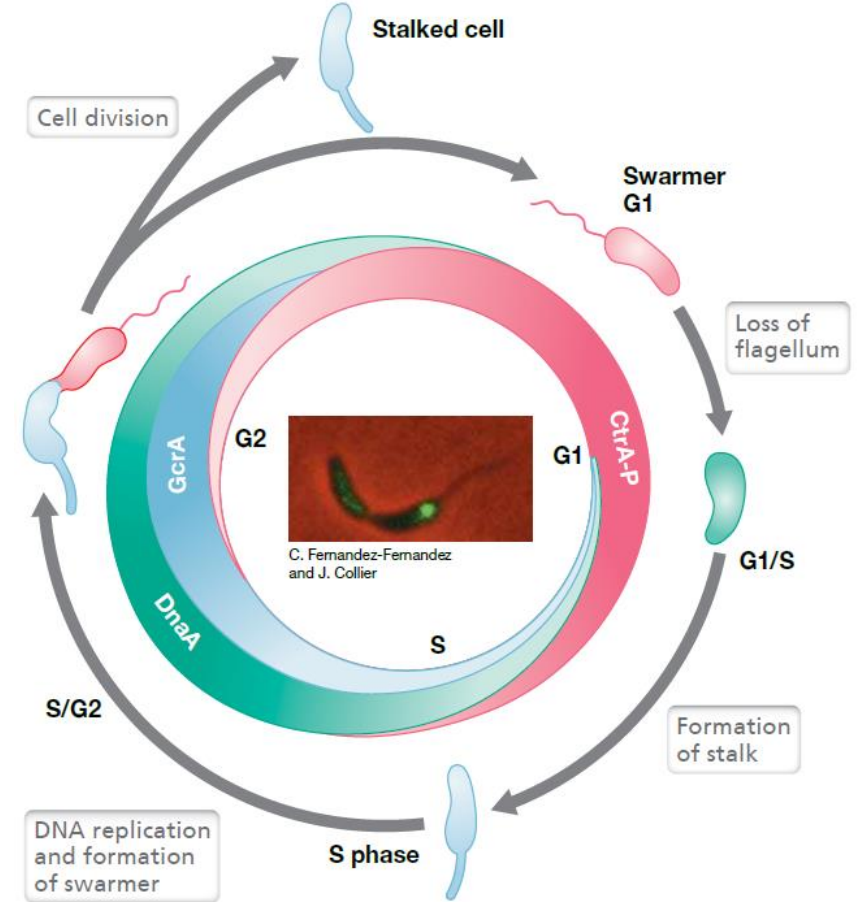
Swarmer ve Stalked Hücrelerin Rol Dağılımı

- Swarmer hücreler ne DNA replikasyonu yapabilir ne de kendileri gibi yeni swarmer hücreler oluşturabilir.
- Stalked hücreler bölünmeden sorumludur ve yaşam döngüsünde çoğalma görevini üstlenir.
- Swarmer hücreler yüzme yeteneğini kaybedip stalked hücreye farklılaşmadan bölünemez.
- Stalked hücrelerin yüzebilen hücre oluşturabilmesi için önce swarmer hücreleri üretmesi gerekir.



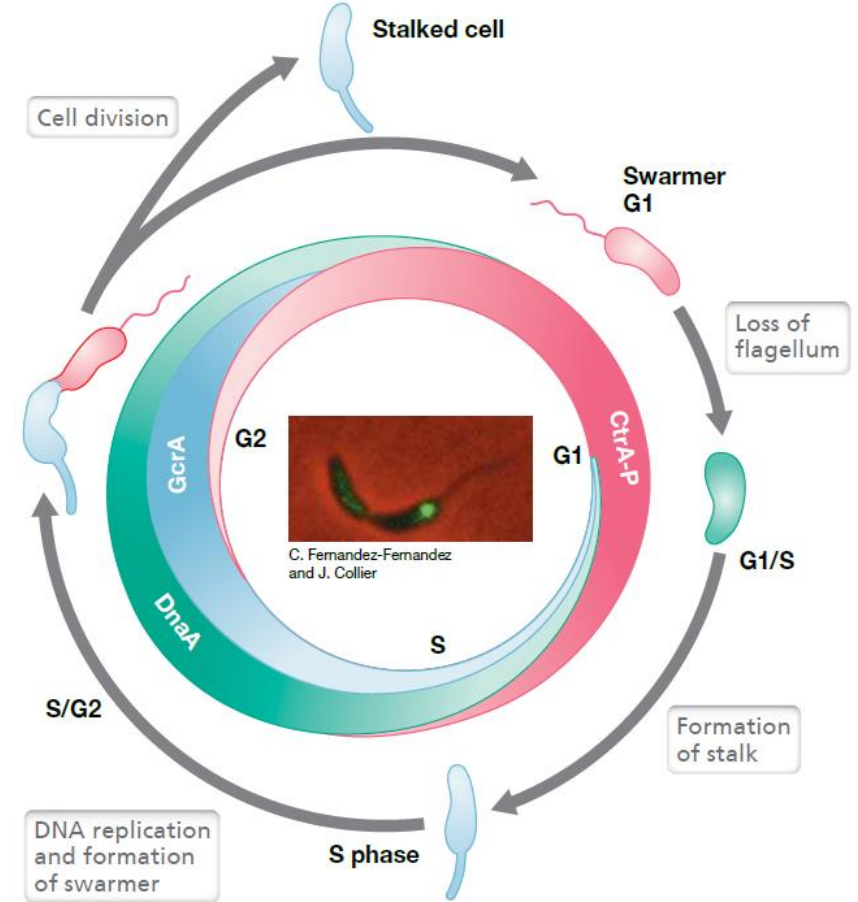
Caulobacter Hücre Döngüsünün Temel Düzenleyicileri

- Hücre döngüsü, ardışık dalgalanan konsantrasyonlara sahip üç ana düzenleyici protein tarafından kontrol edilir.
- Bunlar iki transkripsiyonel düzenleyici olan GcrA ve CtrA ile hem DNA replikasyonunu başlatan hem de transkripsiyonel düzenleyici olarak işlev gören DnaA proteindir.
- Her düzenleyici yalnızca döngünün belirli bir evresinde aktiftir ve o evre için gerekli genlerin kontrolünü sağlar.
- Bu düzenleyicilerin ardışık aktivitesi, *Caulobacter* hücresinin yaşam döngüsünü düzenli bir şekilde ilerletir.



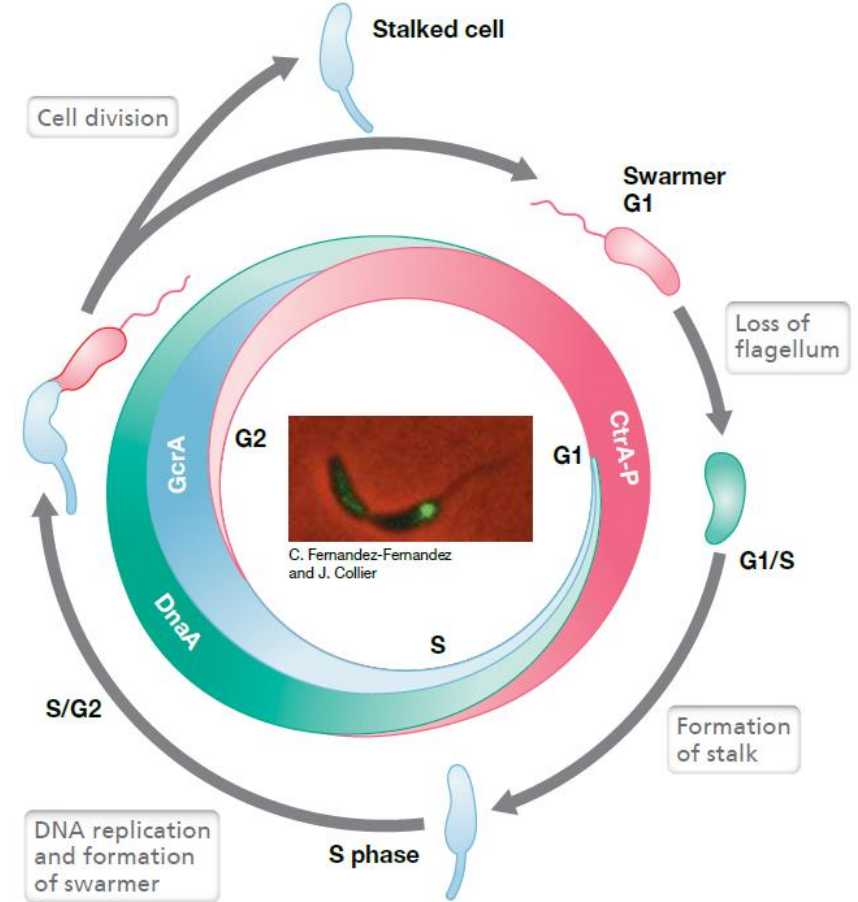
CtrA'nın Swarmer Hücrelerdeki Rolü

- Yeni oluşan swarmer hücrelerde CtrA, dış sinyallere yanıt olarak fosforile edilerek aktif hâle gelir.
- CtrA-P, flagellum sentezi ve swarmer hücrelere özgü diğer işlevlerden sorumlu genlerin transkripsiyonunu başlatır.
- Aynı zamanda CtrA-P, GcrA sentezini baskılar ve replikasyon orijinine bağlanarak DNA replikasyonunun başlamasını engeller.
- Bu baskılama, swarmer hücrelerin yalnızca yayılma amaçlı kullanılmasını ve bölünememesini sağlar.



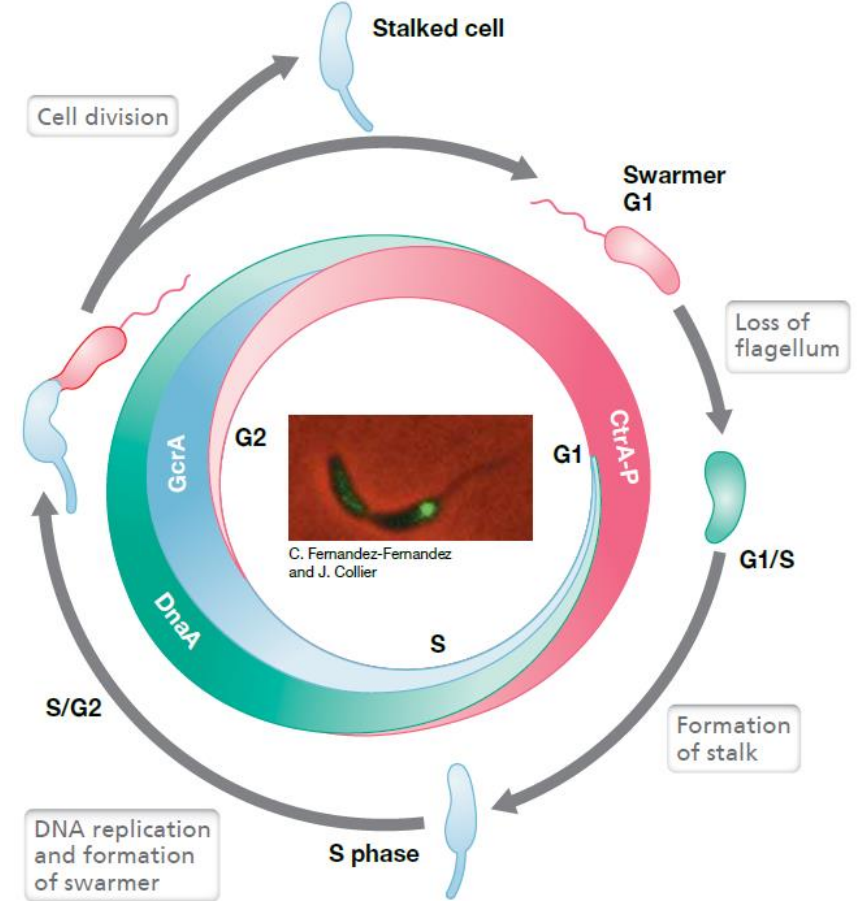
CtrA'nın Yıkımı ve DnaA Aktivitesinin Doğması

- Hücre döngüsü ilerledikçe CtrA, belirli bir proteaz tarafından parçalanır ve CtrA düzeyleri azalır.
- CtrA-P'nin ortadan kalkması, DnaA'nın kromozomal replikasyon orijinine erişmesine olanak tanır.
- DnaA orijini bağlayarak DNA replikasyonunu başlatır ve *Caulobacter*'de replikasyona yönelik birçok başka genin aktivasyonunu sağlar.
- DnaA düzeylerinin proteaz tarafından düşürülmesiyle döngüde yeni bir düzenleyici evreye geçilir.



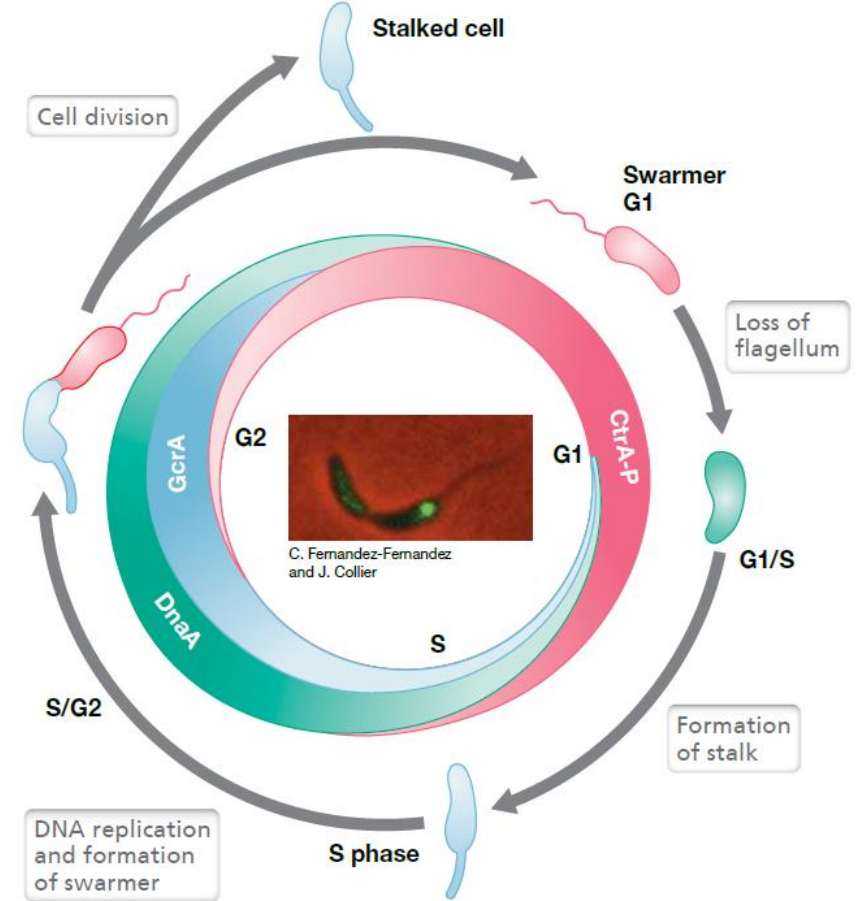
GcrA'nın Etkinlik Dönemi ve Hücredeki Yapısal Değişimler

- DnaA seviyeleri azaldıkça GcrA düzeyi yükselir ve döngünün bir sonraki evresini kontrol etmeye başlar.
- GcrA, kromozom replikasyonunun uzama evresini ve hücre bölünmesinin gerçekleşmesini destekler.
- Ayrıca immobile (yüzemeyen) kardeş hücrede stalk yapısının büyümesini yönlendirir.
- GcrA düzeylerinin yeniden azalmasıyla CtrA tekrar ortaya çıkar ve yüzme yeteneğine sahip olacak kardeş hücrede etkinleşir.



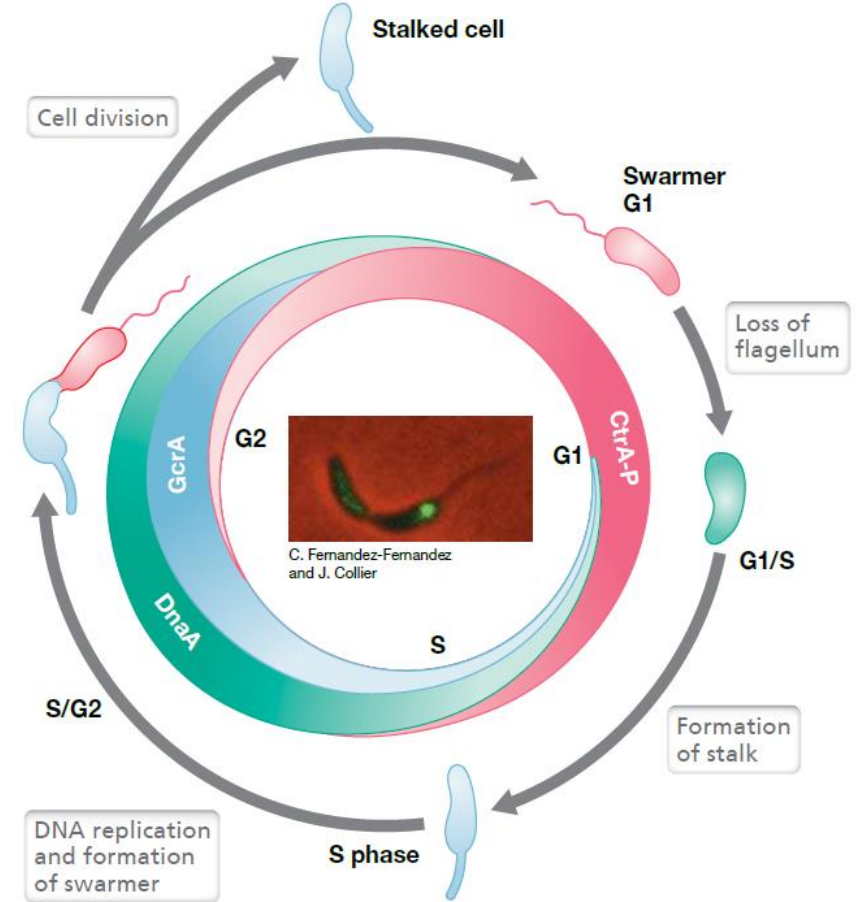
Caulobacter Hücre Döngüsünün Ökaryotik Hücre Döngüsü ile Benzerliği

- *Caulobacter*'de hem dış uyaranlar hem de hücre içi metabolik ve besin düzeyleri hücre döngüsünün koordinasyonunda rol oynar.
- Türün genomunun dizilenmiş olması ve iyi çalışan gen aktarım sistemleri, onu hücresel gelişim süreçlerini incelemek için bir model organizma hâline getirmiştir.
- *Caulobacter*'in düzenli ve aşamalı hücre döngüsü, ökaryotik hücre döngüsündeki G₁, S ve G₂ evrelerine benzer bir yapı sergiler.
- Bu benzerlik o kadar belirgindir ki ökaryotik hücre döngüsü terminolojisi *Caulobacter* sistemini tanımlamak için uyarlanmıştır.



Eşleşen Hücre Döngüsü Evreleri: G₁, S ve G₂ Analogları

- Ökaryotlarda G₁ evresi büyüme ve metabolik faaliyetlerin yürütüldüğü dönemdir.
- G₂ evresi, M evresindeki mitotik olaylara hazırlığın gerçekleştiği aşamadır ve S evresi DNA replikasyonunun yapıldığı dönemdir.
- *Caulobacter*'de mitoz bulunmamasına rağmen bu üç evrenin karşılıkları yaşam döngüsünde açık biçimde gözlenir.
- Bu durum, *Caulobacter*'i yüksek organizmalardaki hücre bölünmesi süreçlerini anlamak için güçlü bir model hâline getirir.

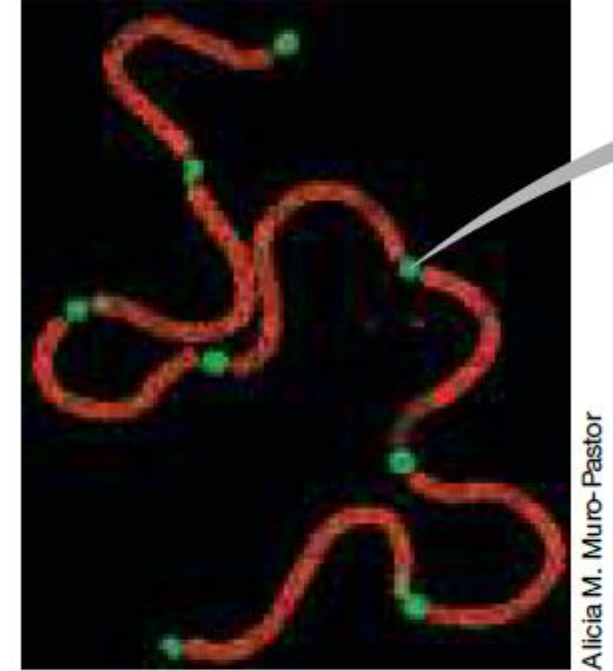


Anabaena'da Heterosist Oluşumunun Temel Sorunu

- Cyanobacteria hem oksijenik fotosentez yapar hem de nitrojeni N_2 'den NH_3 'e indirger.
- Ancak nitrojen fiksasyonu için gerekli nitrojenaz enzimi oksijene karşı son derece hassastır.
- Bu nedenle oksijen üretimi ile nitrojen fiksasyonunun aynı hücrede eşzamanlı yürütülmesi büyük bir çelişki yaratır.
- Filamentli cyanobacteria bu sorunu çözmek için heterosist adı verilen özelleşmiş hücreler geliştirir.

Heterosistlerin Rolü ve Anoksik Yaşam

- Heterosistler, oksijen üreten fotosistem II'yi taşımadıkları için doğal olarak anoksik bir ortama sahiptir.
- Bu anoksik koşullar nitrojenazın etkin çalışmasını mümkün kılar.
- Heterosistler, oksijen üreten vejetatif hücrelerden farklılaşarak oluşur ve filament boyunca düzenli bir örüntü oluşturur.
- Bu düzenleme, iki uyumsuz metabolik sürecin ayrılmasını ve yine de besin alışverişinin sürmesini sağlar.

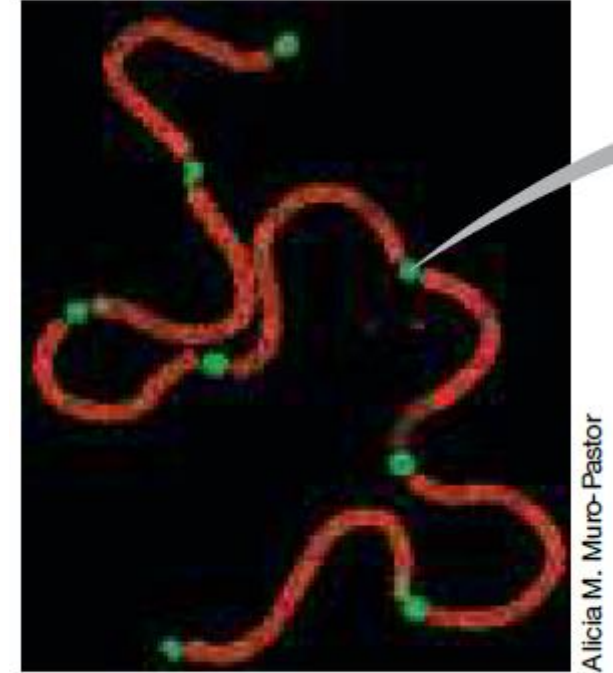


(a) A filament of *Anabaena*

Alicia M. Muro-Pastor

Heterosist Gelişimi Sırasındaki Ana Değişimler

- Heterosist oluşumu, dış çevreyi ve hücre içi sinyalleri algılayan düzenleyici ağlar tarafından kontrol edilen morfolojik ve metabolik dönüşümler gerektirir.
- Bu dönüşümlere kalın bir hücre duvarının oluşması ve oksijen girişinin engellenmesi dahildir.
- Ayrıca fotosistem II'nin inaktivasyonu ve nitrojenazın ekspresyonu gerçekleşir.
- Heterosist örüntüsünün filament boyunca düzenlenmesi de bu süreçte kritik bir adımdır.

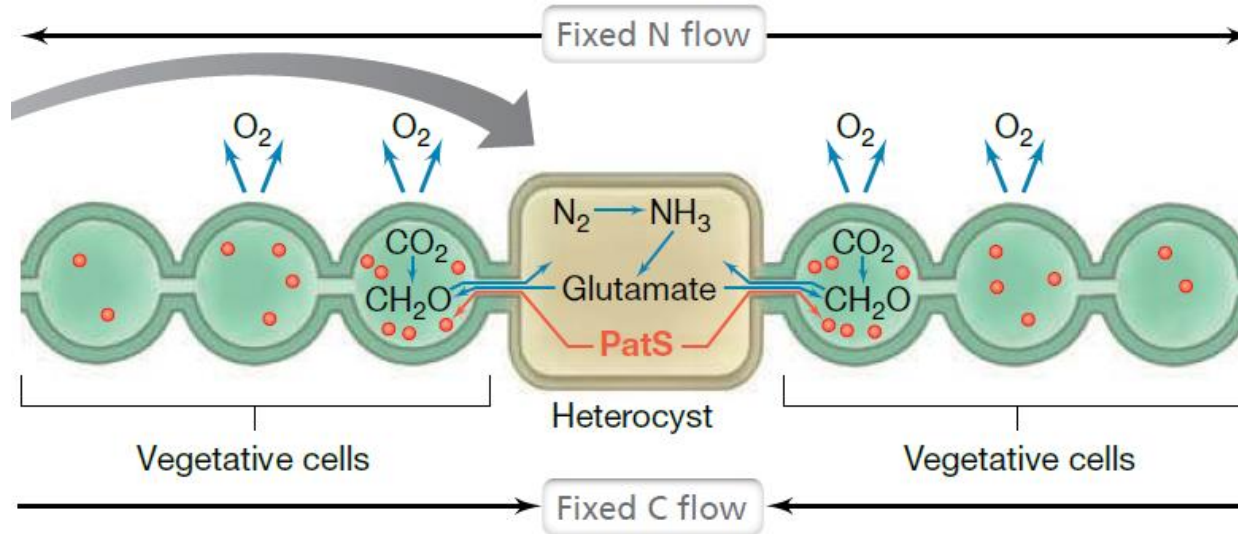


(a) A filament of *Anabaena*

Alicia M. Muro-Pastor

Heterosistler ve Vejetatif Hücreler Arasındaki Besin Alışverişi

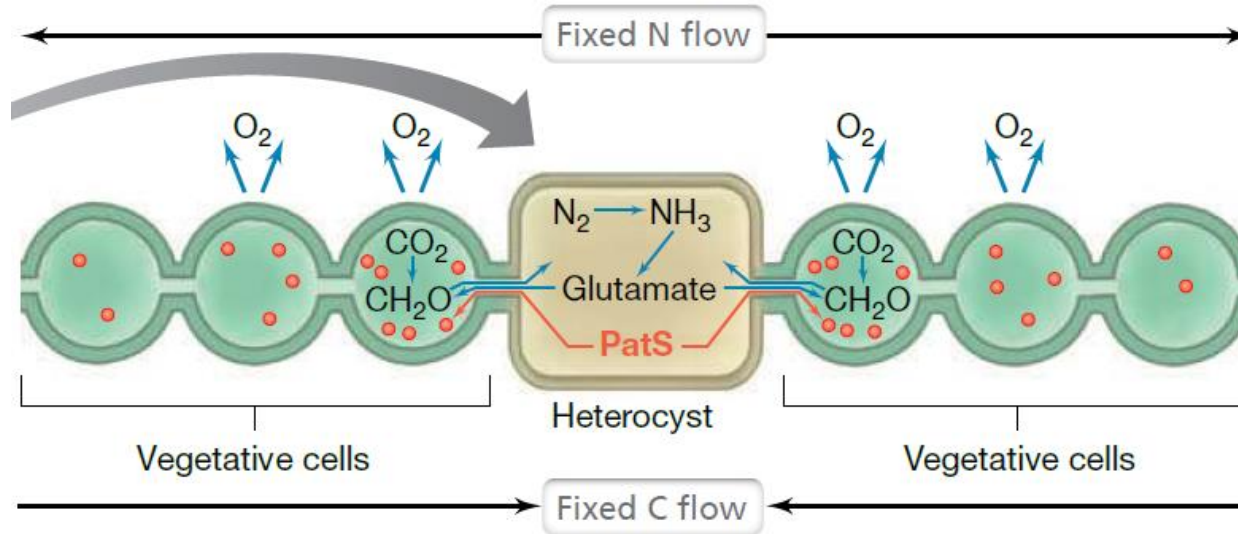
- Heterosistler ile yanlarındaki vejetatif hücreler arasında besin alışverişi yapılır.
- Vejetatif hücreler, nitrojenazın N_2 'yi indirgemesi için gerekli elektron vericisini sağlayan sabit karbonu heterosiste aktarır.



(b) Heterocyst—vegetative cell interactions

Heterosistler ve Vejetatif Hücreler Arasındaki Besin Alışverişi

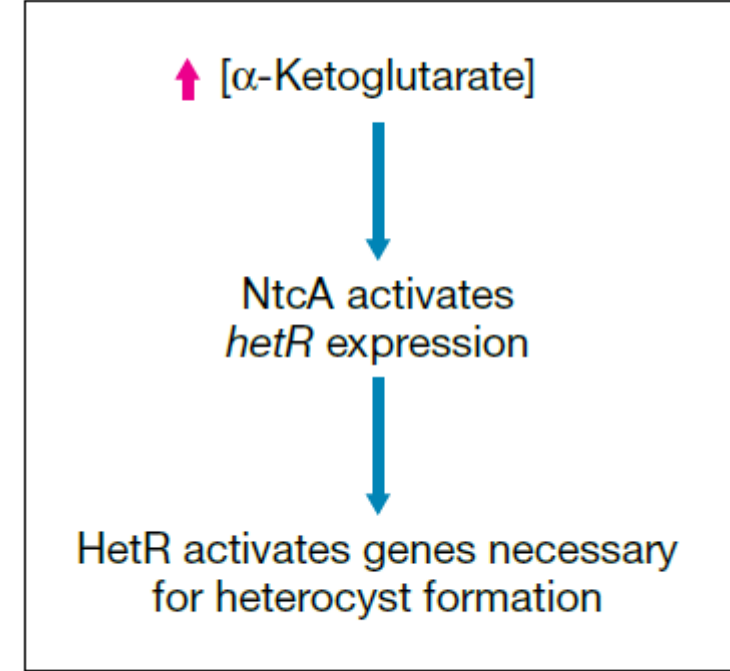
- Buna karşılık heterosist, ürettiği NH_3 'ün bir kısmını vejetatif hücrelere verir.
- Bu karşılıklı ilişki, büyümenin ve metabolik dengelerin korunmasına yardımcı olur.



(b) Heterocyst—vegetative cell interactions

Nitrojen Kıtlığının Algılanması ve Düzenleyici Başlangıç

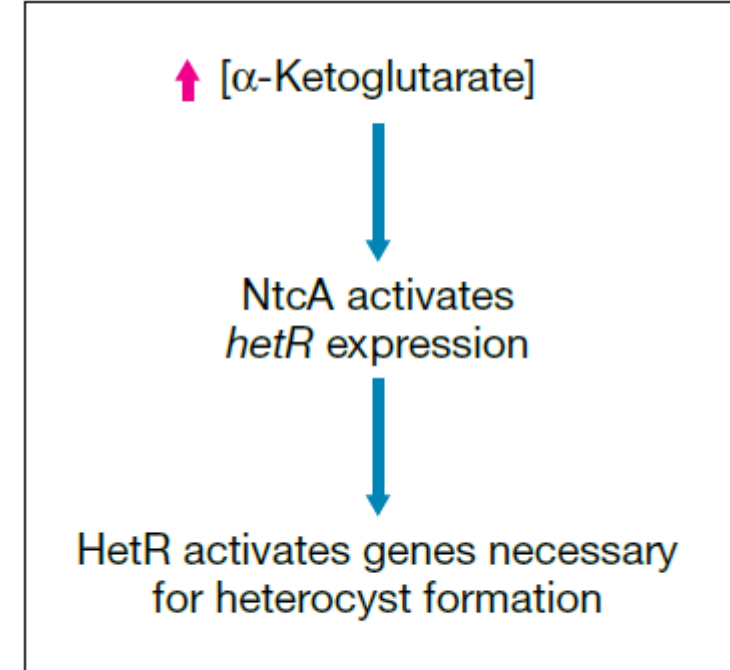
- Heterosist oluşumunu başlatan temel sinyal, hücrenin sabit azot (nitrat, amonyum vb.) bakımından sınırlı hale gelmesidir.
- Bu koşullarda, glutamat sentezi için gerekli kabul molekülü olan α -ketoglutarat hücrede birikir.
- Artan α -ketoglutarat düzeyi evrensel düzenleyici NtcA'yı aktive eder.
- NtcA, heterosist gelişiminin ana düzenleyicisi olan *hetR* geninin transkripsiyonunu başlatır.



(c) Triggering heterocyst formation

HetR Düzenlemesi ve Nitrojenazın Ekspresyonu

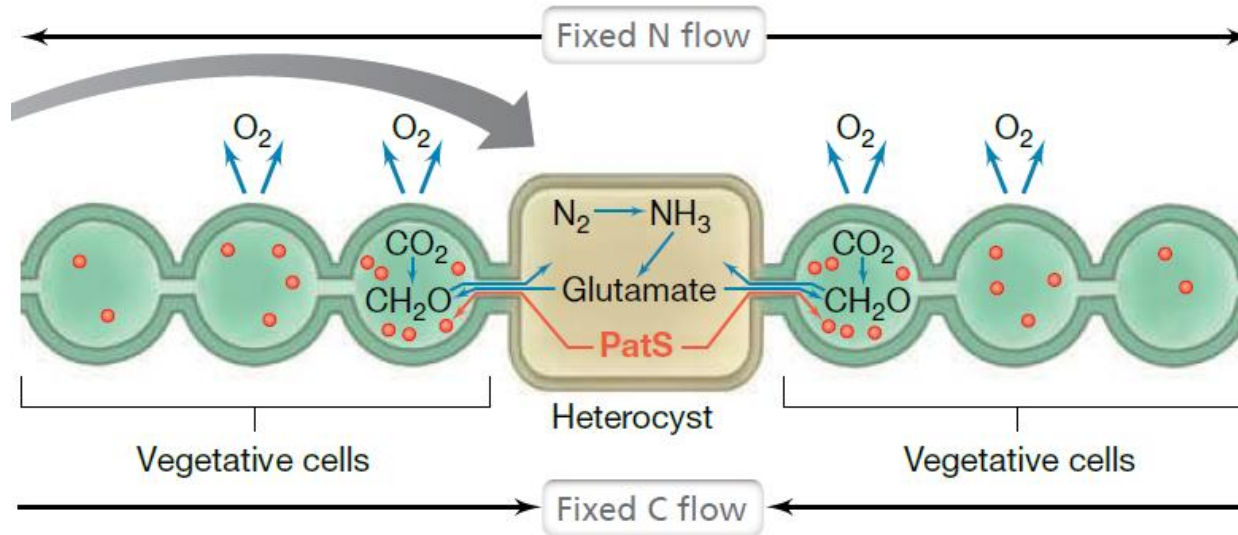
- HetR, heterosist farklılaşması için gerekli genleri aktive eden temel transkripsiyonel düzenleyicidir.
- Heterosist gelişiminde az miktarda oksijenin uzaklaştırılması için sitokrom c oksidazların üretimi teşvik edilir.
- Ayrıca nitrojenaz sentezi ve düzenlenmesinden sorumlu nif operonu ekspresyona girer.
- Bu düzenlemeler heterosistin oksijensiz koşullarda nitrojen fiksasyonuna tam olarak hazırlanmasını sağlar.



(c) Triggering heterocyst formation

Heterosist Örüntüsünün Filament Boyunca Kontrolü

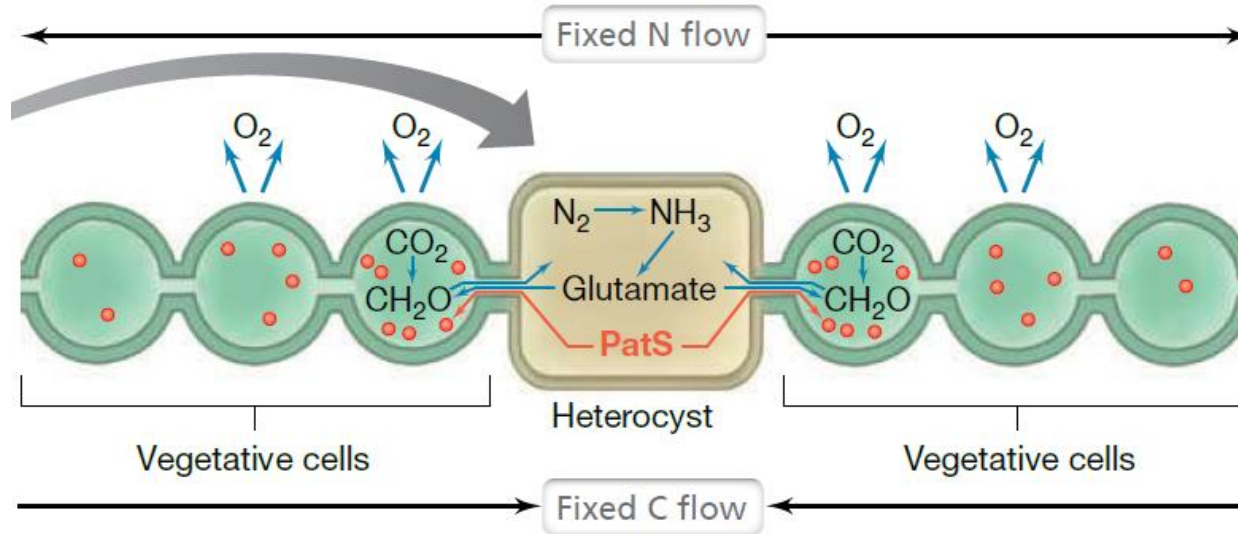
- Sadece belirli vejetatif hücreler heterosiste dönüşür ve bu örüntü sıkı bir şekilde kontrol edilir.
- Hücreler arasındaki bağlantılar, besin akışının yanı sıra düzenleyici moleküllerin taşınmasını da mümkün kılar.



(b) Heterocyst—vegetative cell interactions

Heterosist Örüntüsünün Filament Boyunca Kontrolü

- Gelişmekte olan heterosistlerden salınan PatS adlı küçük peptit, filament boyunca yayılarak bir gradyan oluşturur.
- Bu PatS gradyanı, HetR'nin etkisini baskılayarak komşu vejetatif hücrelerin heterosiste dönüşmesini engeller.



(b) Heterocyst—vegetative cell interactions

PatA'nın Rolü ve Diğer Düzenleyici Etkileşimler

- PatA, PatS'nin baskılayıcı etkisini azaltarak HetR'nin aktivitesini destekleyen ikinci bir düzenleyicidir.
- Ayrıca PatA'nın hücre bölünmesinde de rol oynayabileceği düşünülmektedir.
- PatA ve PatS birlikte, heterosistlerin filament boyunca düzenli aralıklarla konumlanmasını sağlar.
- Bu mekanizma, prokaryotik hücrelerde çok hücreli örüntü oluşturma'nın eşsiz bir örneğidir.



Çok Hücreli Örüntüleme ve Hücreler Arası İletişimin Önemi

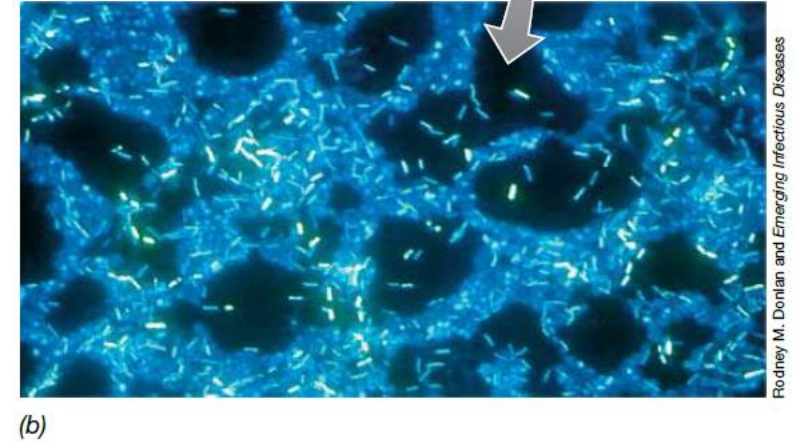
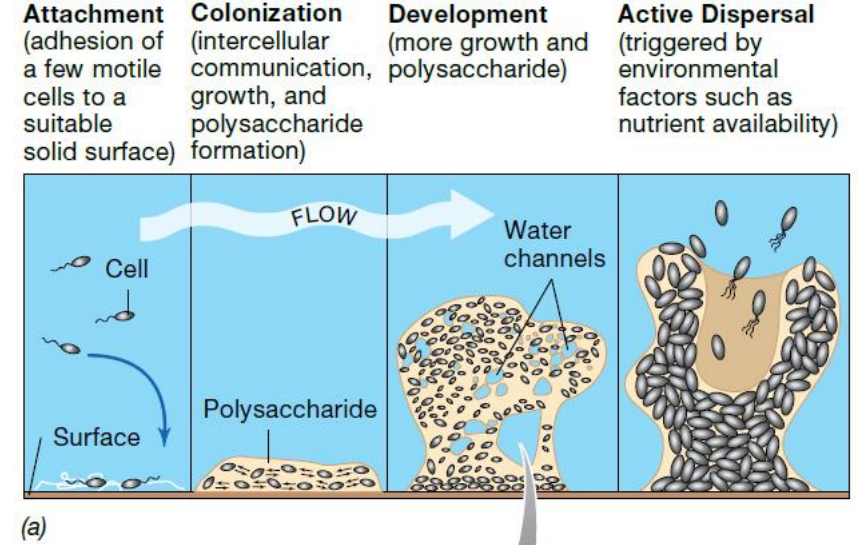
- Heterosist oluşumu, vejetatif hücrelerin kontrollü bir şekilde farklılaşmasıyla gerçekleşen özel bir gelişim sürecidir.
- Bu süreç, prokaryotlarda görülen nadir çok hücreli örüntüleme mekanizmalarından birini temsil eder.
- Hücreler arası bağlantılar yoluyla gerçekleşen iletişim, hem besin alışverişi hem de düzenleyici sinyallerin aktarımı için kritiktir.
- Bu özellik, heterosistli Cyanobacteria'yı gelişim biyolojisi açısından ilginç bir model haline getirir.

Bakteriyel Biyofilmlere Genel Bakış

- Biyofilmler, bakteri hücrelerinin polisakkarit bir matriks içinde gömülü olarak bulunduğu yapılar olup çevresel ve tıbbi açıdan büyük önem taşır.
- Bu kısımda, biyofilm gelişimini kontrol eden moleküler mekanizmalar ele alınacaktır.
- *Pseudomonas aeruginosa* ve *Vibrio cholerae* gibi gram-negatif bakteriler biyofilm oluşumunun iyi çalışılmış modelleridir.

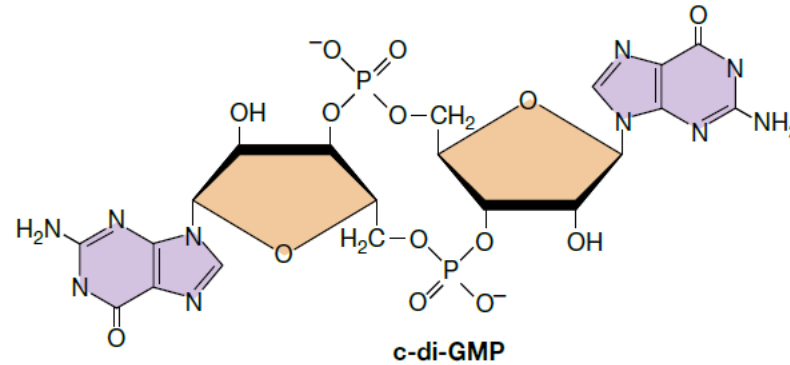
Biyofilm Oluşumunun Dört Temel Aşaması

- Biyofilm oluşumu dört ana basamakta ilerleyen gelişimsel bir süreçtir: yapışma, kolonizasyon, gelişim ve dağılma.
- Hücrelerin yüzeye rastlantısal teması, flagella, pilus ve yüzey proteinleri aracılığıyla kolaylaşan ilk yapışmayı başlatır.
- Yüzeye bağlanma, hücrede biyofilme özgü genlerin ekspresyonunu tetikler ve matriks oluşumu için gerekli polisakkaritlerin üretimini başlatır.
- Hücre flagellasını kaybederek hareketsiz hale gelmesine karşın, yapı zamanla aktif bir dağılma süreciyle hücre salınımına da olanak tanır.



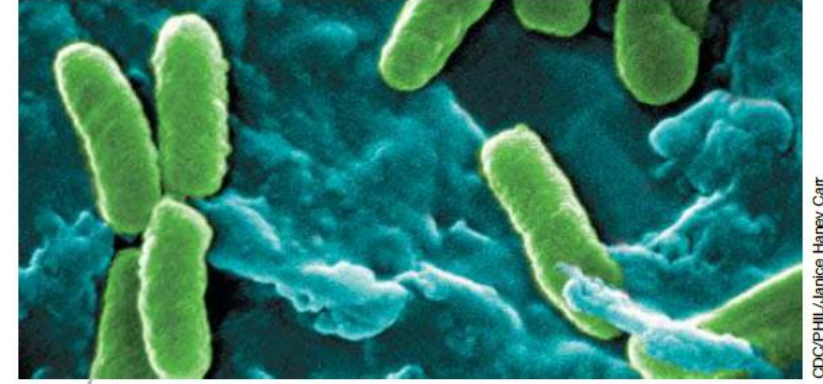
Planktonikten Biyofilme Geçişi Düzenleyen Sinyaller

- Planktonik büyümeden biyofilm yaşamına geçişi yönlendiren birçok çevresel ve hücrel sinyal bulunur.
- Pek çok bakteride bu geçişi tetikleyen temel mekanizma, c-di-GMP adlı düzenleyici nükleotidin hücre içinde birikmesidir.
- c-di-GMP, flagellar motor aktivitesini azaltan, yüzey yapışmasını düzenleyen ve matriks polisakkaritlerinin sentezini uyaran proteinlere bağlanarak etkisini gösterir.



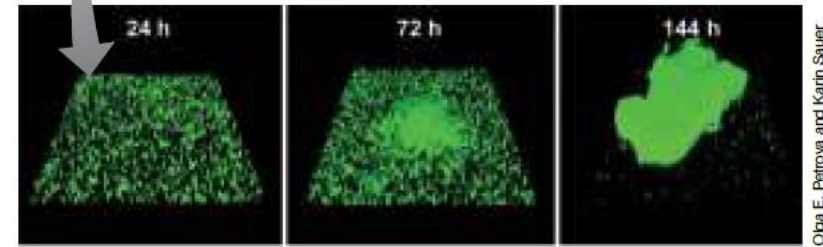
Pseudomonas aeruginosa ve Biyofilm Oluşumu

- *Pseudomonas aeruginosa*, belirli polisakkaritlerin yer aldığı ve antibiyotiklere nüfuzu engelleyen güçlü bir biyofilm tabakası oluşturur.
- Bu bakteri, toprak kökenli bir fırsatçı patojen olup kan, akciğer, idrar yolu, kulak, deri ve diğer dokuları enfekte edebilir.
- Kistik fibrozis hastalığındaki başlıca semptomlar, akciğerlerde gelişen yoğun *P. aeruginosa* biyofilmlerinden kaynaklanır.
- *P. aeruginosa* aynı zamanda önemli bir hastane enfeksiyonu etkenidir.



CDC/PHIL/Janice Haney Carr

(a)



Olga E. Petrova and Karin Sauer
2009, PLoS Pathogens 5(11): e1000668

(b)

Biyofilmde Quorum Sensing'in Rolü

- *P. aeruginosa* biyofilmlerinin gelişimi ve sürdürülmesinde quorum sensing mekanizması kritik bir rol oynar.
- AHL birikimi, popülasyonun büyüdüğünü komşu hücrelere bildirerek biyofilm için gerekli bazı genlerin ekspresyonunu tetikler.
- Bu sinyaller, özellikle ekstrasellüler polisakkarit ve c-di-GMP sentezini artıran genlerin etkinleşmesine katkı sunar.

c-di-GMP ve *P. aeruginosa*'da Yapısal Biyofilm Gelişimi

- Artan c-di-GMP düzeyleri, Pel gibi polisakkaritlerin sentezini başlatır ve bu yapı hem hücrel iskelet hem antibiyotik direnci sağlar.
- c-di-GMP artışı aynı zamanda flagellar hareketin azalmasına yol açar.
- Besince zengin koşullarda *P. aeruginosa*, milyonlarca hücre içeren 0.1 mm'den yüksek mantar şeklinde mikrokoloniler geliştirebilir.
- Biyofilmin nihai mimarisi, sinyal moleküllerine ek olarak besin düzeyi ve akış koşulları tarafından da şekillenir.



Pseudomonas fluorescens'te c-di-GMP'nin Farklı Etkileri

- *P. fluorescens*'te artan c-di-GMP düzeyleri de biyofilm oluşumunu teşvik eder.
- Ancak bu türde c-di-GMP tarafından kontrol edilen biyofilm mekanizması, *P. aeruginosa*'dan tamamen farklıdır.
- c-di-GMP düzeylerindeki değişim, yüzeye tutunmayı sağlayan büyük LapA proteininin salgılanmasını ve hücre yüzeyine taşınmasını düzenler.

LapA Düzenlenmesi ve Besin Sinyalleri

- Düşük fosfat koşullarında *P. fluorescens* düşük c-di-GMP düzeylerini korur ve LapA'nın dış zar yüzeyine taşınmasını engeller, böylece başlangıçtaki tutunma süreci durur.
- Fosfat azalması devam ederse, c-di-GMP'deki daha da belirgin düşüş LapA'nın bir proteaz tarafından kesilmesini tetikler.
- LapA'nın uzaklaştırılması, yüzeye bağlanmış hücrelerin serbest kalmasını sağlayarak onların yakındaki daha besinli habitatları aramasına imkân verir.



Vibrio cholerae'da Sinyal Sistemleri ve Biyofilm Kontrolü

- *Vibrio cholerae* hem hücre içi hem de hücreler arası sinyal mekanizmalarını kullanarak biyofilm oluşumunu düzenler.
- c-di-GMP sinyalleme biyofilm oluşumunda görevli genlerin ifadesini artırırken, quorum sensing sistemi ters yönde çalışır.
- Hücre yoğunluğu arttıkça quorum molekülleri birikir ve biyofilm genlerinin baskılanmasına yol açar.
- Bu durum, *Pseudomonas aeruginosa*'nın biyofilm davranışıyla zıt bir örüntü sergiler.



Hücre Yoğunluğuna Bağlı Biyofilm Davranışları

- *V. cholerae* düşük hücre yoğunluklarında biyofilm oluştururken yüksek yoğunlukta bu süreç baskılanır.
- Quorum sinyal moleküllerinin artışı, flagellum ve virülans genlerinin aktifleşmesine neden olur.
- Böylece bakteri, çevresel koşullara göre yaşam stratejisini esnek biçimde değiştirir.
- Bu düzenleme, bakterinin farklı ortamlar arasında geçiş yaparken avantaj elde etmesini sağlar.



Biyofilmin Ekolojik Rolü ve Yayılım

- Doğal denizel ortamlarda besinlerin sınırlı olması küçük popülasyonlara yol açtığı için biyofilm oluşumu daha olasıdır.
- Biyofilmler, bakterinin plankton, kabuklular ve deniz sedimentleri gibi yüzeylere tutunmasını kolaylaştırır.
- Bu tutunma, hem besine erişimi artırır hem de çevresel değişimlere karşı koruyucu bir avantaj sağlar.
- Biyofilmin son aşaması olan dağılma, bakterinin yeni konaklara taşınmasına katkı sunar.

Biyofilmlerin Klinik Önemi ve Tıbbi Yansımalar

- Biyofilm oluşturan patojenler kalıcı (persist) hücrelerin veya antibiyotiğe dirençli hücrelerin gelişimine yol açabilir.
- Biyofilmler, antibiyotiklerin dokuya veya bakteriye nüfuz etmesini zorlaştıran fiziksel bir bariyer oluşturur.
- Bu nedenle biyofilm gelişiminin moleküler düzeyde anlaşılması tıbbi açıdan büyük önem taşır.
- Biyofilmlerin ekolojisi ve kontrol stratejileri ilerleyen bölümlerde daha ayrıntılı incelenecektir.

Antibiyotiklerin Mikroorganizma Büyümesine Etkileri

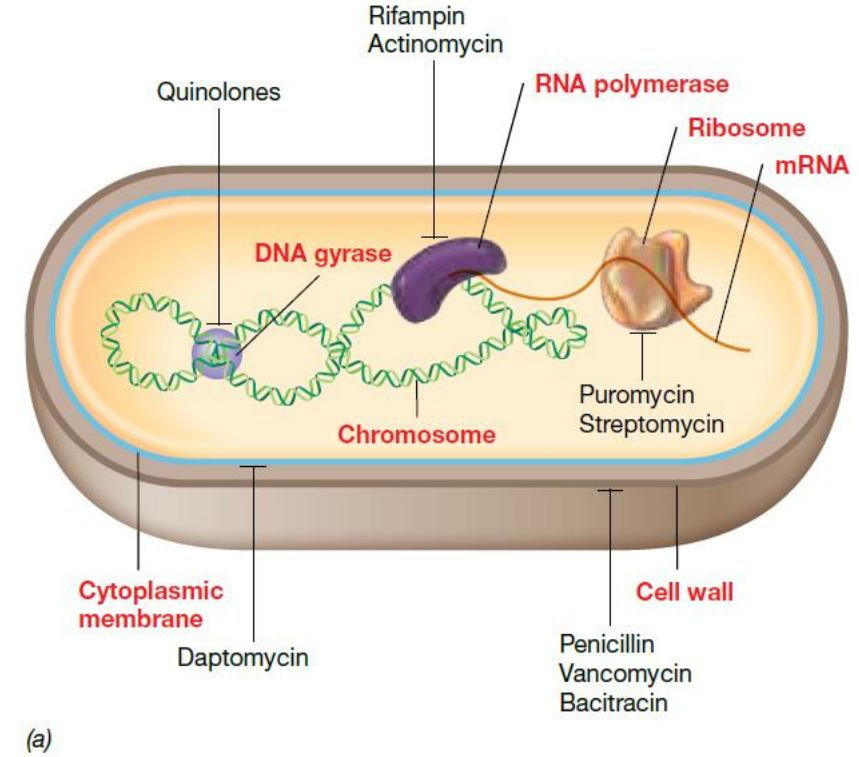
- Bu kısımda antibiyotiklerin mikrobiyal büyüme süreçlerini nasıl sekteye uğrattığı ele alınacaktır.
- Antibiyotikler, büyüme için gerekli moleküler adımları hedefleyerek bu süreçleri kesintiye uğratabilir.
- Bakterilerin geliştirdiği direnç ve ısrar/inat/dayanıklılık mekanizmaları büyümenin kontrolünü karmaşık hâle getirir.

Antibiyotiklerin Temel Hedefleri ve Direnç Mekanizmaları

- Antibiyotikler, bakteriler ve mantarlar tarafından doğal olarak üretilen ve bakteri büyümesini durduran maddelerdir.
- Tümü, bakterinin hayatta kalması için zorunlu olan moleküler süreçleri hedef alır.
- Bu kısımda antibiyotiklerin çalışma biçimleri ve bakterilerin geliştirdiği direnç yolları ele alınacaktır.
- Direnç mekanizmaları, antibiyotik kullanımının etkinliğini doğrudan etkiler.

DNA ve RNA Süreçlerini Hedefleyen Antibiyotikler

- Santral dogmanın her basamağı büyüme için gerekli olduğu için birçok antibiyotik bu süreçlerdeki enzimleri hedefler.
- Kinolonlar gram-negatiflerde DNA girazı ve gram-pozitiflerde topoizomerez IV'ü hedef alarak DNA replikasyonunu durdurur.
- Rifampin ve aktinomisin RNA polimerazın aktif bölgesini veya DNA'daki büyük oluğu bağlayarak RNA sentezini engeller.
- Bu süreçler yanda gösterilmiştir.

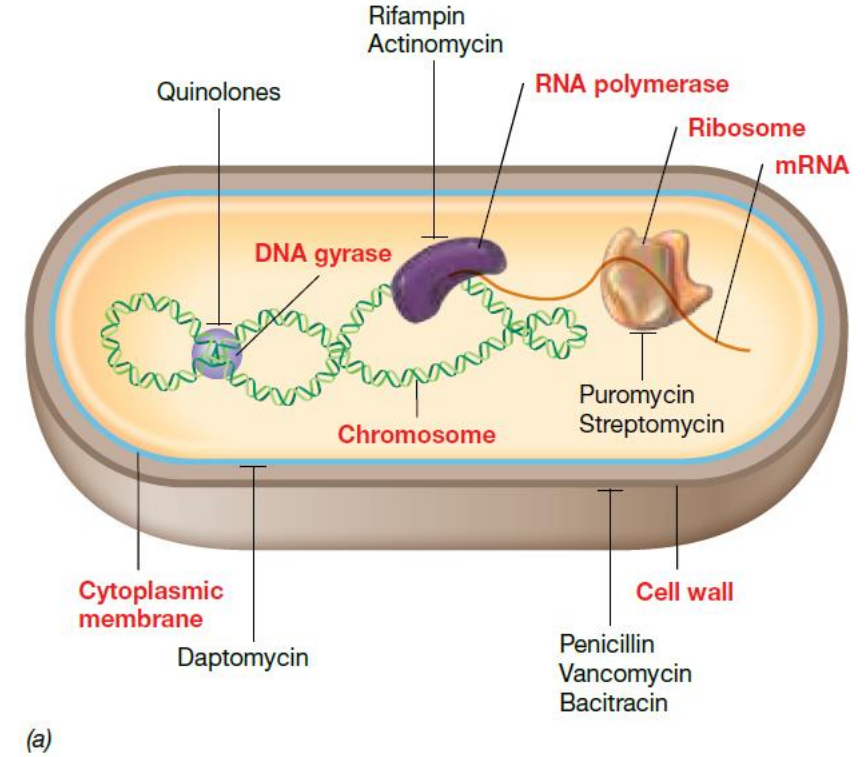


Protein Sentezini Hedefleyen Antibiyotikler

- Birçok antibiyotik, protein sentezinin bir aşamasına müdahale ederek bakteriyel büyümeyi durdurur.
- Puromisin tRNA'nın 3' ucunu taklit ederek ribozomun A bölgesine bağlanır ve zincir sonlanmasına yol açar.
- Streptomisin gibi aminoglikozidler 30S alt birimin 16S rRNA'sını hedefleyerek mRNA'nın hatalı okunmasına neden olur.
- Bu hatalı protein birikimi hücresel işlevleri bozar ve büyümenin durmasına yol açar.

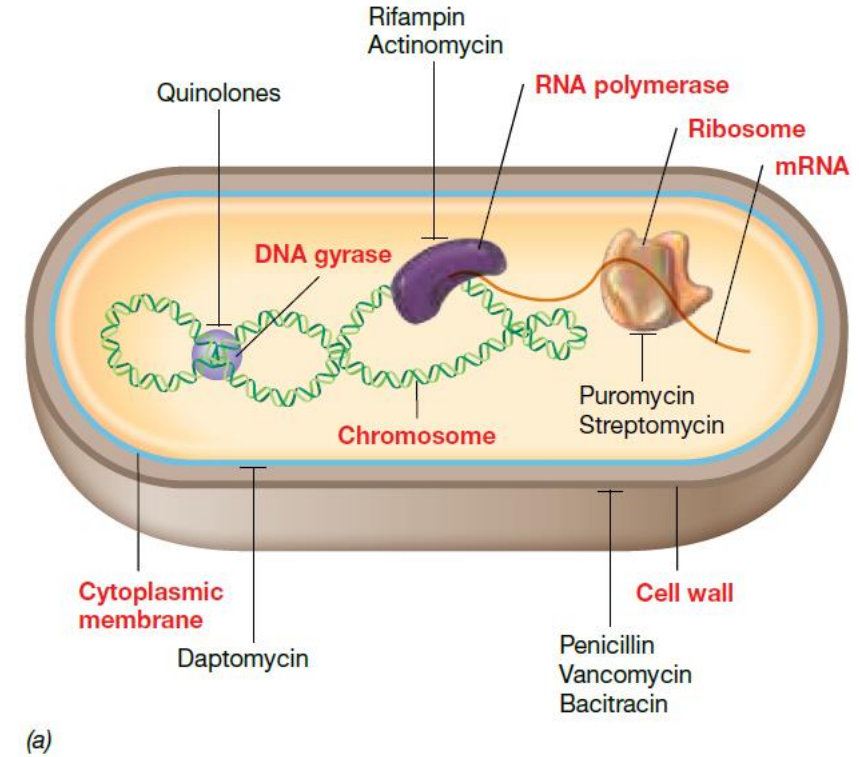
Hücre Zarı ve Hücre Duvarını Hedefleyen Antibiyotiklere Giriş

- Antibiyotiklerin önemli bir kısmı hücre zarı, hücre duvarı ve belirli metabolik süreçleri hedef alır.
- Bu hedefler, bakterinin yaşamsal yapısına doğrudan müdahale ederek hücre bütünlüğünü bozar.
- Hücre zarına ya da duvarına yönelik antibiyotikler genellikle hızlı ve etkili bir bakterisidal etki oluşturur.
- Böylece, klinik olarak önemli birçok antibiyotiğin etki mekanizması bu temel yapılara dayandırılır.



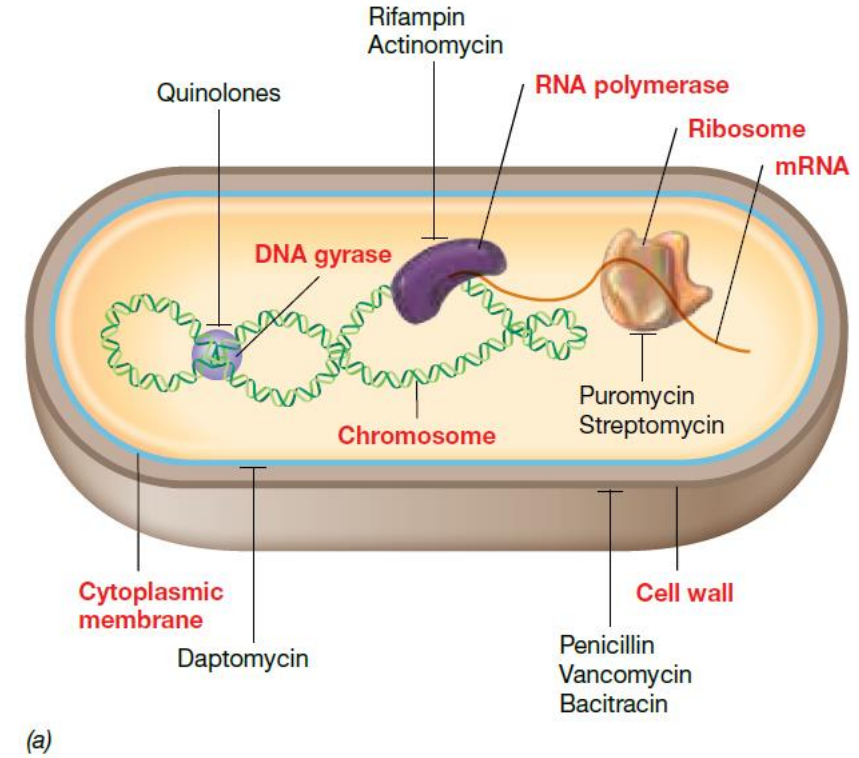
Daptomisin ve Bakteri Sitoplazmik Zarının Hedeflenmesi

- Daptomisin, *Streptomyces* tarafından üretilen bir lipopeptittir ve doğrudan sitoplazmik zar üzerindeki fosfatidilgliserol kalıntılarına bağlanır.
- Bu bağlanma, zar üzerinde por oluşumuna ve membranın hızlı şekilde depolarize olmasına yol açar.
- Membran potansiyelinin bozulması hücrede geri dönüşü olmayan bir ölüm süreci başlatır.



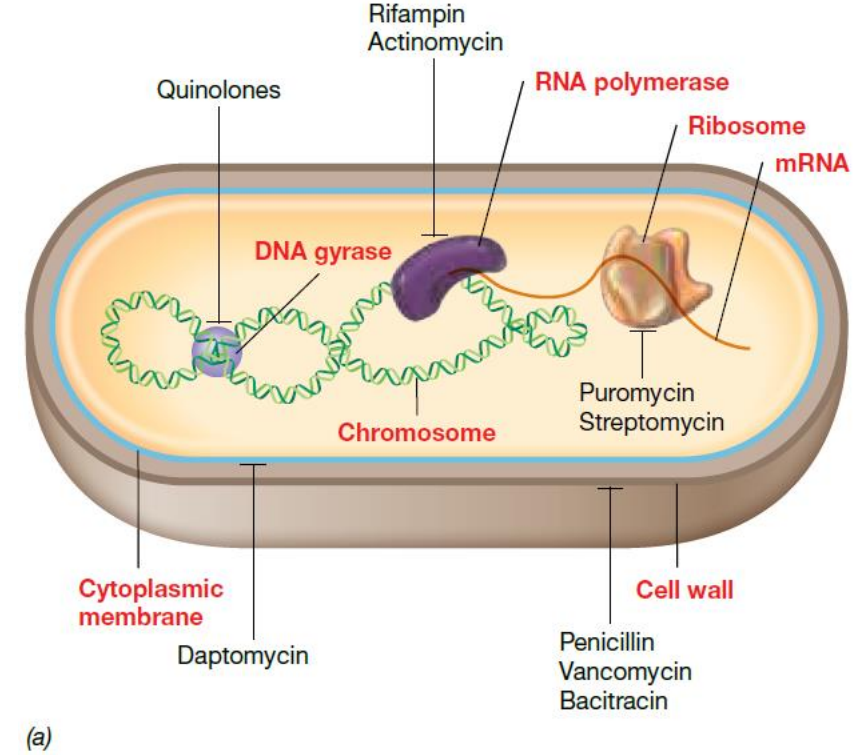
Polimiksinler ve Gram-Negatif Dış Zarın Hedeflenmesi

- Polimiksinler, uzun hidrofobik kuyrukları olan siklik peptit yapısındaki antibiyotiklerdir.
- Gram-negatif bakterilerin LPS tabakasını özellikle hedef alarak dış zar yapısını bozarlar.
- Zar bütünlüğünün bozulması hücre içeriğinin sızmasına ve hızlı hücre ölümüne neden olur.



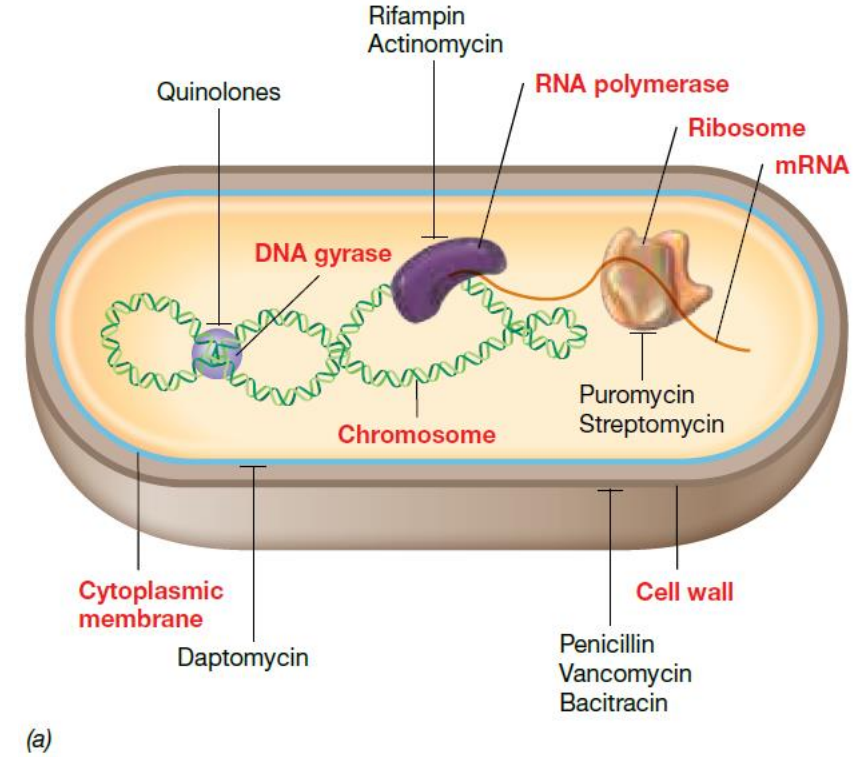
β -Laktamlar ve Peptidoglikan Sentezinin Engellenmesi

- Penisilin, sefalosporin ve türevleri gibi β -laktam antibiyotikleri peptidoglikan sentezini hedef alır.
- Bu antibiyotikler, transpeptidasyon adımını katalizleyen ve “penisilin bağlayan proteinler” olarak bilinen proteinlerin işlevini engeller.
- Transpeptidasyon, muramik asit kalıntıları arasında çapraz bağların kurulmasını sağlayarak hücre duvarına dayanıklılık kazandırır.



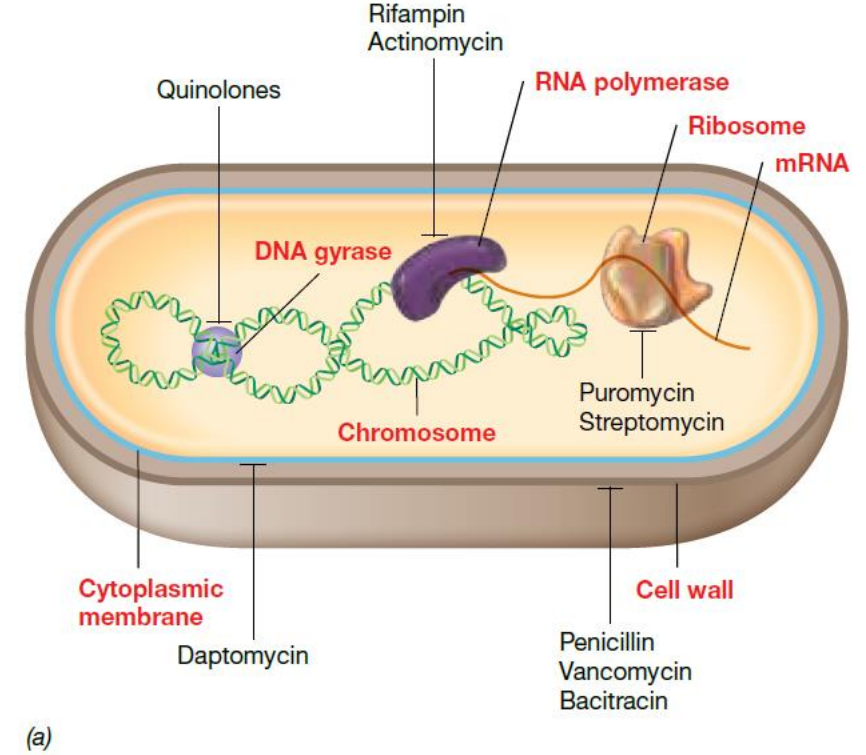
Vancomycin: Gram-pozitiflerde Peptidoglikan Önleyici Etki

- Vancomycin, gram-pozitif bakterilerde peptidoglikan sentezini hedef alan güçlü bir antibiyotiktir.
- Peptidoglikan öncüllerinin pentapeptidine bağlanarak transpeptidazların kuracağı köprüleri engeller.
- Bu engelleme, hücre duvarının olgunlaşmasını durdurur ve yapıyı zayıflatır.



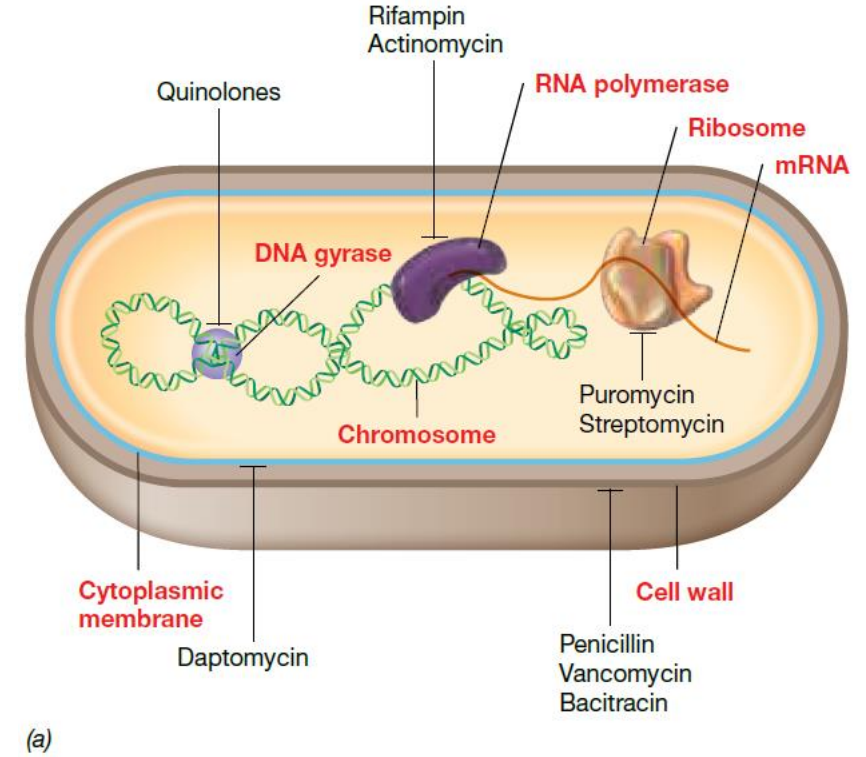
Bacitracin ve Peptidoglikan Ön Madde Taşınımının Engellenmesi

- Bacitracin, peptidoglikan öncüllerini taşıyan bactoprenol adı verilen sisteme bağlanarak bu taşıma sürecini engeller.
- Yeni öncüller sentez bölgesine ulaşamayınca duvar sentezi durma noktasına gelir.
- Bu sırada otolizinler mevcut duvarda küçük boşluklar açmaya devam eder.
- Öncül madde eksikliği nedeniyle bu boşluklar onarılamaz ve hücre duvarı zayıflayarak lizis gerçekleşir.



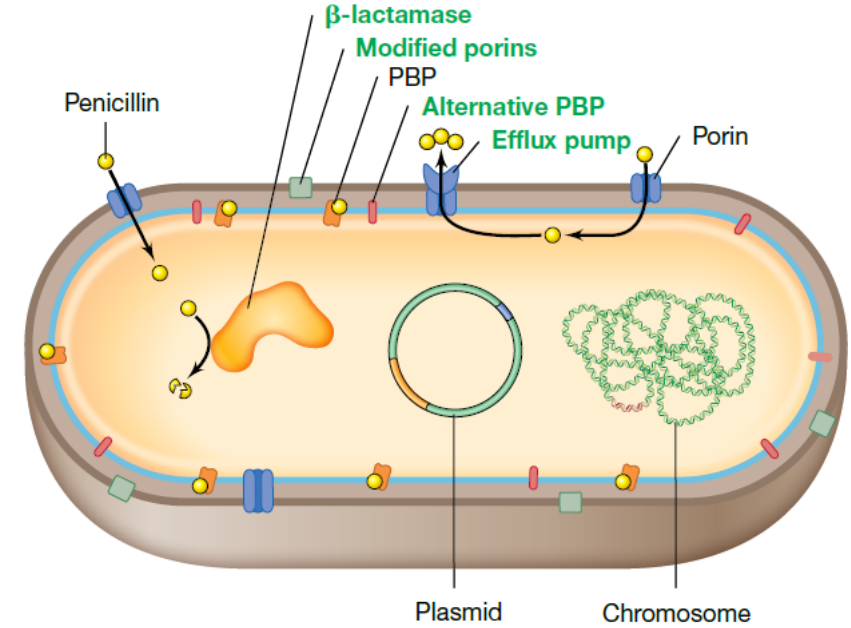
Diğer Antibiyotiklerin Önemli Hedefleri

- Bazı antibiyotikler metabolik reaksiyonlar gibi hücrenin biyolojik süreçlerini hedef alır.
- Bununla birlikte, klinik açıdan en yaygın antibiyotikler yanda gösterilen temel yapılara yönelir.
- Hücre duvarı, zar veya temel enzimatik süreçlerin hedeflenmesi tedavide yüksek etkinlik sağlar.



Antibiyotik Direnci: Genel Bakış

- Bakteriler, antibiyotik saldırılarından korunmak için çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmiştir.
- Direnç mekanizmaları kalıtsal olup dört ana grupta toplanır
 - Hedefin değiştirilmesi
 - İlacın enzimlerle inaktive edilmesi
 - İlacın hücre dışına atılması
 - Metabolik bypass mekanizmaları
- Bu mekanizmalar yanda özetlenmektedir.

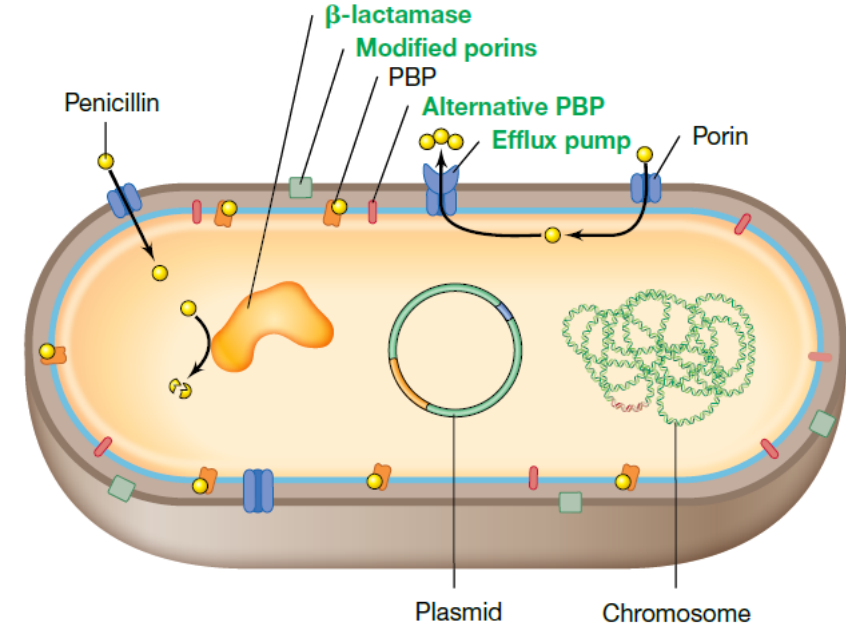


Spontan Mutasyonlarla Direnç Gelişimi

- Büyük bakteri popülasyonları antibiyotiklere maruz kaldığında spontan mutasyon taşıyan hücreler seçimle baskın hâle gelebilir.
- Rifampin direncinin gelişimi buna iyi bir örnektir; mutasyonlu RNA polimeraz, ilacın etkisinden bağımsız çalışabilir.
- Böylece antibiyotik hedefi değiştiğinden antibiyotiğin bağlanması engellenir.
- Bu süreç, antibiyotik direncinin genetik kökenlerini anlamada önemlidir.

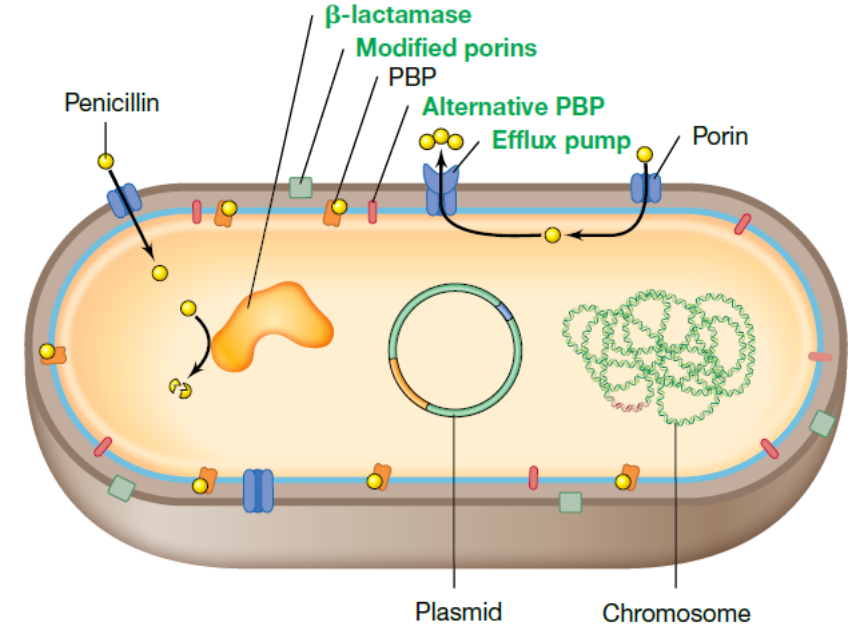
Hareketli Genetik Elementler ve Direnç Genlerinin Yayılımı

- Direnç genleri yalnızca kromozomal mutasyonlarla değil, hareketli genetik elementler üzerinde de taşınabilir.
- Bu genler aynı tür içinde ya da farklı türler arasında yatay gen transferi ile hızla yayılabilir.
- R plazmitleri üzerinden taşınan birçok direnç geni, antibiyotiklerin yapısını kimyasal olarak değiştiren enzimler kodlar.
- Yandaki figür, bu tür mekanizmaların genel şemasını göstermektedir.



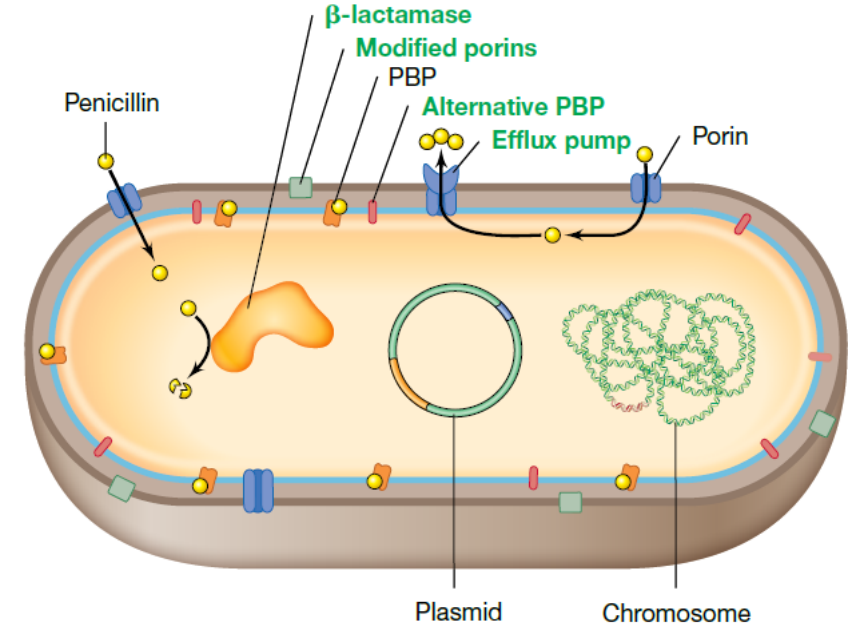
Dirençte Enzimatik İnaktivasyonun Örnekleri

- β -laktamaz enzimi, β -laktam antibiyotiklerinin halka yapısını kırarak işlevsiz hâle getirir.
- Bazı enzimler, kloramfenikol gibi ilaçlara asetil grubu ekleyerek hedefe bağlanmalarını engeller.
- Kimyasal olarak modifiye edilen antibiyotik artık hedefe tutunamaz ve bakteri normal büyümesine devam eder.



Hücreden Antibiyotik Atımı: Genel Bakış

- Bazı bakteriler, hücre içine giren antibiyotikleri dışarı pompalayarak direnç kazanır ve bu sistemler özellikle gram-negatif bakterilerde yaygındır.
- Antibiyotiğin hücre içi derişimini düşüren bu pompalar, bakterinin daha yüksek dış konsantrasyonlarda bile hayatta kalabilmesini sağlar.
- Birçok efluks pompası farklı sınıflardaki antibiyotikleri aynı anda uzaklaştırabilir ve bu durum çoklu ilaca direnç gelişimine katkıda bulunur.
- AcrAB-TolC sistemi, *E. coli*'de en iyi tanımlanan efluks pompalarından biridir ve rifampisin, kloramfenikol ve florokinolonlar gibi çeşitli antibiyotikleri dışarı atabilir.

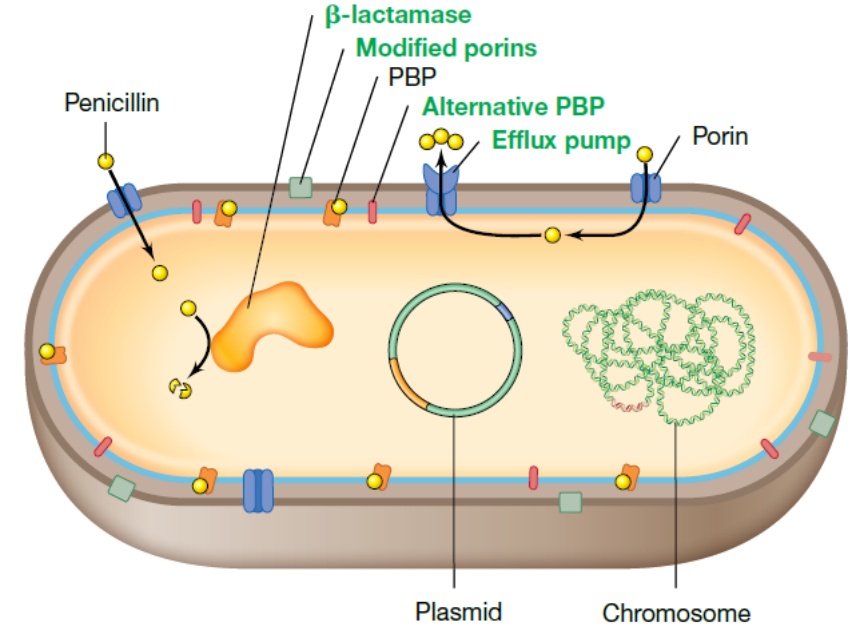


Biyofilm Oluşumu ve Artan Direnç

- Biyofilm halinde büyüme, antibiyotik direncini artırır ve bu yapıdaki enfeksiyonlar tedaviyi zorlaştırır.
- Biyofilmin dış polisakkarit matriksi antibiyotik geçişini azaltır ancak efluks pompaları da bu direncin önemli bir parçasıdır.
- *E. coli* biyofilm moduna geçtiğinde AcrAB-TolC pompasını kodlayan genler daha fazla ifade edilir.
- *Pseudomonas aeruginosa* gibi güçlü biyofilm oluşturucular da bağlı büyüme halinde çoklu ilaca dirençli efluks pompalarını daha etkin kullanır.

Hedeften Vazgeçilmesi: MRSA Örneği

- Bazı durumlarda antibiyotiğin hedefi hücre için artık hayati olmadığında direnç ortaya çıkar.
- Bu durumun klasik örneği, ciddi enfeksiyonlara neden olabilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarıdır.
- Metisilin bir β -laktam antibiyotiktir ve penisilin bağlayan proteinleri hedef alır ancak β -laktamazlarla parçalanmaya dirençlidir.
- MRSA suşları, kromozomal bir ada olan SCCmec üzerinde metisilin tarafından tanınmayan MecA adlı alternatif bir penisilin bağlayan proteini kodlar.



MecA İfadesinin Düzenlenmesi

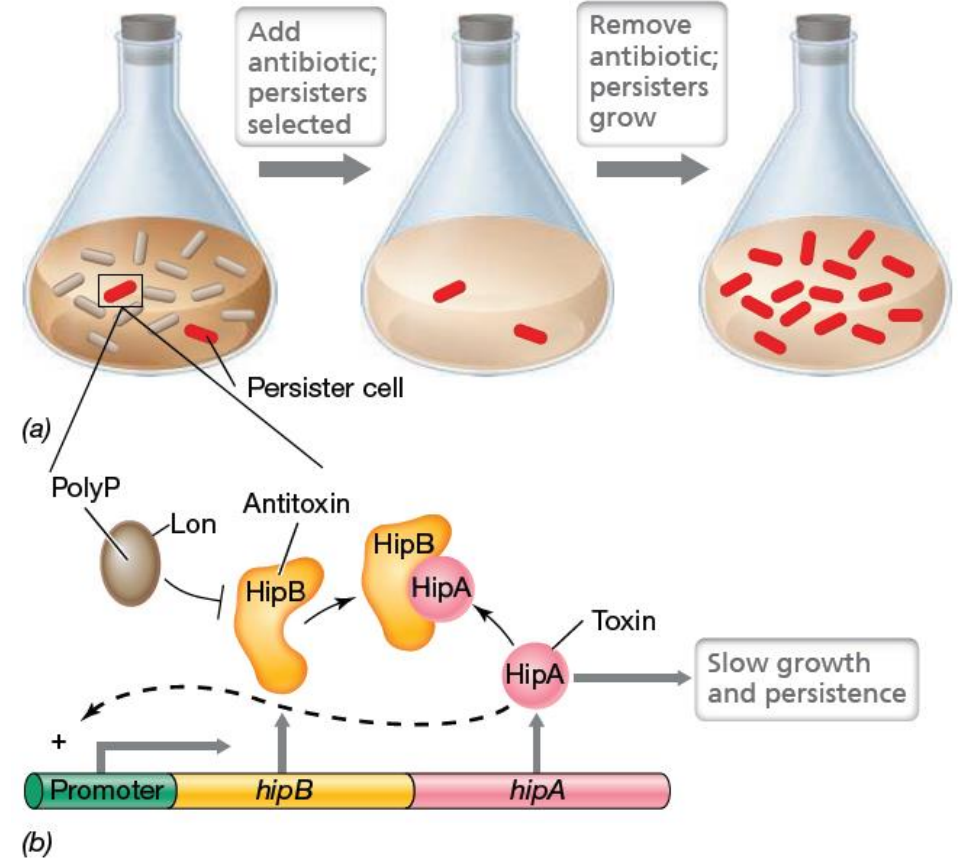
- MRSA suşları MecA proteinini yalnızca metisilin veya diğer β -laktamların varlığında sentezler.
- Bu düzenleme, MecI represörü ve β -laktam sensörü MecR1 sayesinde gerçekleşir.
- β -laktam yokluğunda MecI, mecA operatörüne bağlanarak transkripsiyonu baskılar.
- Metisilin bulunduğunda MecR1, MecI'yi parçalar ve mecA ifadesi indüklenir; böylece hücre antibiyotik varlığında peptidoglikan sentezini sürdürebilir.

SCCmec Adasınının Ek Dirençleri

- SCCmec adası, eritromisin ve spektinomisine karşı direnç sağlayan bir transpozon da içerir.
- Bu yapı, yatay gen transferine uygun olduğundan, çoklu ilaç direncinin yayılmasında önemli olabilir.

Persistens (Kalıcılık): Dirençten Farklı Bir Hayatta Kalma Stratejisi

- Bakteriler yalnızca duyarlı veya dirençli olmayabilir; üçüncü bir yanıt olan persistens (kalıcılık) de görülür.
- Persistens, duyarlı popülasyon içinde çok küçük bir alt grubun geçici olarak birçok antibiyotiğe tolerans göstermesiyle ortaya çıkar.
- Persister (kalıcı) hücreler, genetik olarak duyarlı kardeşleriyle aynıdır; bu nedenle persistens kalıtsal değildir.
- Bu hücreler büyümeyen ancak canlı kalan bir durgunluk hâli nedeniyle antibiyotik etkisinden korunur.



Persistensin Klinik Önemi

- Tedavi sonlandığında, durgun durumdaki persister hücreler yeniden büyümeye başlar.
- Persistens, özellikle kronik tüberkülozda *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonlarının yeniden ortaya çıkmasıyla ilişkilidir.
- Ayrıca *Pseudomonas aeruginosa* kaynaklı kistik fibrozis enfeksiyonlarında da persistens önemli bir rol oynar.

Persistens Nasıl Ortaya Çıkar?

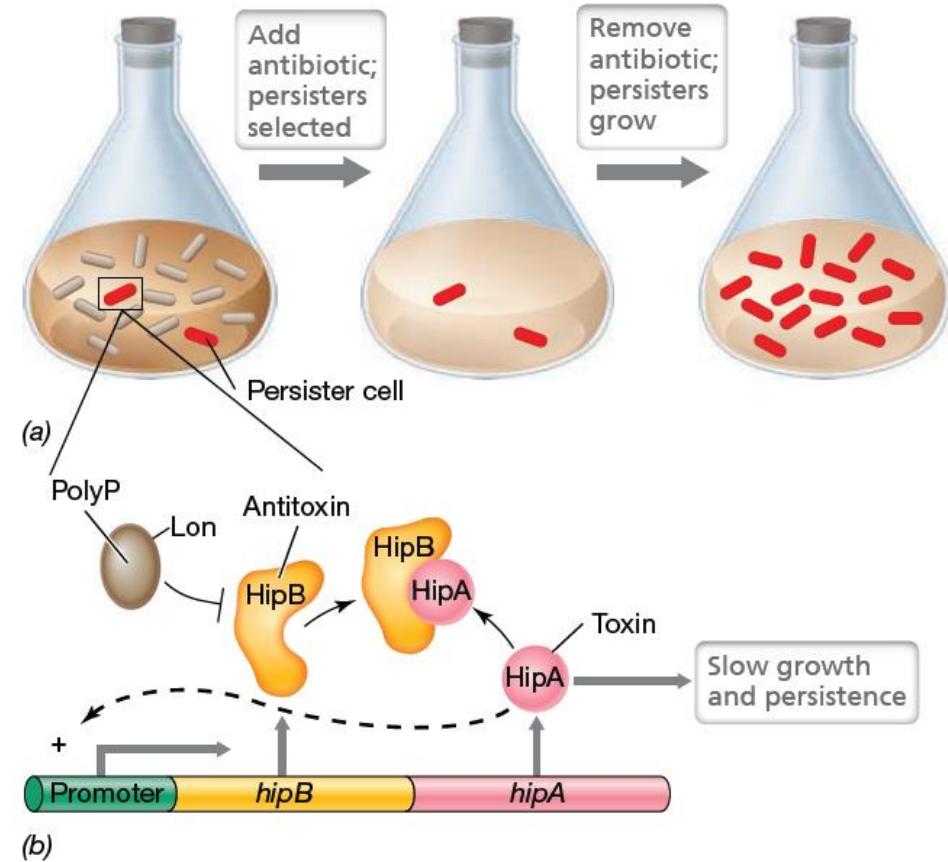
- Genetik olarak aynı olan hücrelerin neden farklı davranabildiğini açıklamak için üç temel unsur önemlidir.
- Bu unsurlar toksin–antitoksin modülleri, stringent (sıkı) yanıt ve fenotipik heterojenliktir.
- Persistensin oluşması ve geri dönüşümlü olması için, hücre büyümesini etkileyen bir dizi koordineli moleküler olay gereklidir.

Toksin–Antitoksin (TA) Modüllerinin Rolü

- TA modülleri, büyümeyi durduran bir toksin ve onu etkisiz hâle getiren bir antitoksin üreten gen bölgeleridir.
- Bu modüller, hemen hemen tüm Bakterilerde ve birçok Archaea'da bulunur ve normal fizyolojide olduğu kadar patojenitede de önemli rol oynar.
- *E. coli*'de 30'dan fazla, *M. tuberculosis*'te ise 60 civarında TA sistemi tanımlanmıştır.
- Toksinler, zorlayıcı çevre koşullarında büyümeyi yavaşlatarak hücrel uyumu artırabilir.

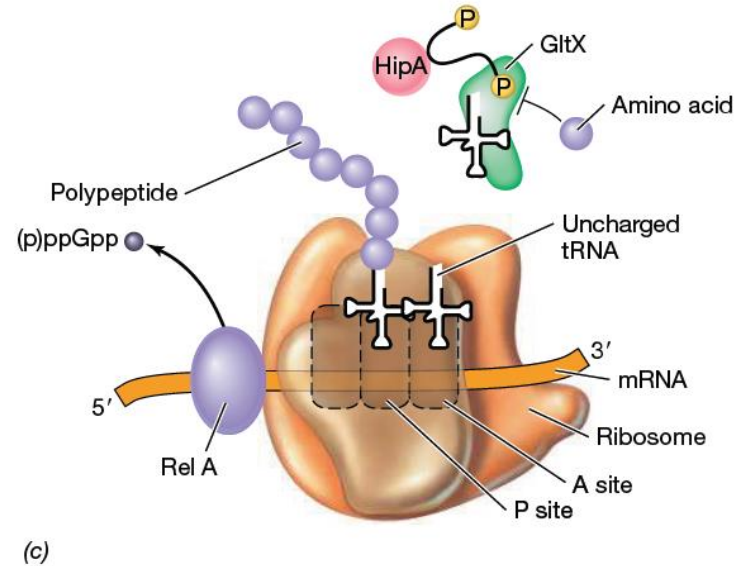
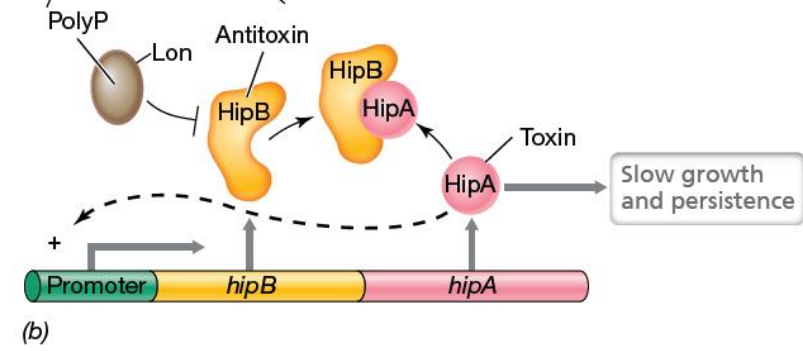
HipAB Sisteminin Persistens Oluşturması

- hipAB genleri, *E. coli*'de persistensi tetiklediği bilinen bir TA modülünü kodlar (Figür b).
- HipA, translasyonu durduran bir toksindir; HipB ise Lon proteazına duyarlı bir antitoksindir.
- Normalde HipA ve HipB birlikte kararlı bir kompleks oluşturur ve toksin etkisiz kalır.
- Ancak Lon, sinyal molekülü polifosfat (PolyP) tarafından aktive edilirse, HipB parçalanır ve HipA serbest kalarak büyümeyi durdurur.



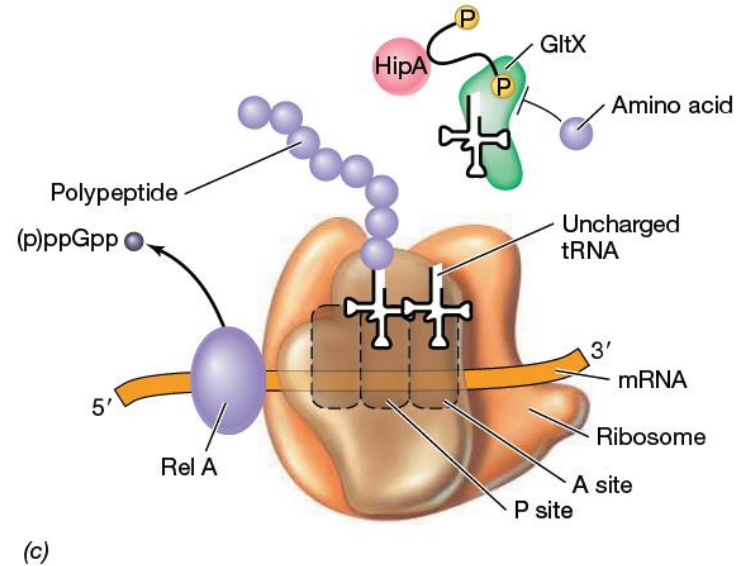
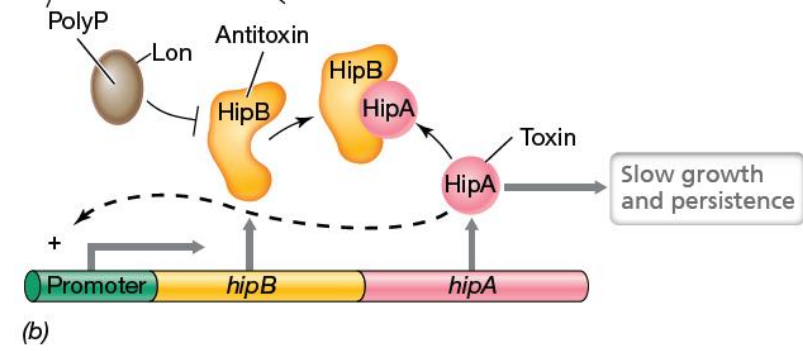
HipA Translasyonu Nasıl Engeller?

- HipA, bir kinaz olarak GltX enzimini fosforile eder ve bu enzim tRNA'ları glutaminle yükleyemez hâle gelir.
- Bu durumda yüklenmemiş tRNA'lar ribozomun A bölgesine girer ve ribozom duraklar, RelA aktive olur (Figür c).
- Bu duraklama hem translasyonu hem de protein sentezini baskılar.
- Serbest HipA ayrıca hipAB operonunun yukarısına bağlanarak transkripsiyonu artırır ve hücredeki HipA düzeylerini yükseltir (Figür b).



HipA ve Ribozom Durmasının Başlatıcı Rolü

- Serbest HipA, ribozomların durmasına neden olur ve protein sentezi belirgin şekilde yavaşlar.
- Bu durma, alarmon olan (p)ppGpp üretimini tetikler ve böylece hücrede stringent (sıkı) yanıt yolu başlatılmış olur (Figür c).
- Alarmon üretimi RelA tarafından gerçekleştirilir ve süreç, kalıcılık (persistence) durumunun en kritik aşamasını temsil eder.
- Bu olaylar, popülasyondaki bazı hücrelerin dormansiye doğru kaymasını sağlar.



Stringent (Sıkı) Yanıtın Hücre Üzerindeki Etkileri

- Stringent yanıt, rRNA ve tRNA sentezini azaltarak protein üretiminin düşmesine yol açar.
- Aynı yol, DNA replikasyonunu ve hücre bölünmesini de baskılar.
- Bu değişimler sonucunda, yanıtı tetikleyen hücreler büyümeyi durdurur ve dormansi durumuna geçer.
- Antibiyotik uygulamaları, bu durumu başlatmış olan hücrelerin popülasyonda tercih edilmesine neden olur.



Persister Hücrelerin Tedavi Sonrası Davranışı

- Antibiyotik baskısı ortadan kalktığında persister (kalıcı) hücreler stringent (sıkı) yanıtı sonlandırabilir.
- Bu aşamada, toksinin etkisini nötralize etmek için tekrar antitoksin üretmeye başlarlar.
- Protein sentezi yeniden normal seviyelerine yükselir ve hücreler büyümeye geri döner.
- Böylece geçici dormansi sona ermiş olur.

Persistens Neden Sadece Alt Popölasyonda Görölür?

- Olayların yalnızca bazı hücrelerde gerçekleşmesinin nedeni rastlantısal olarak daha yüksek PoliP üretimi yapan hücrelerin varlığıdır.
- Bu durum genetik bir talimata değil, tamamen fenotipik heterojeniteye dayanır.
- Klonal bir popölasyonun tamamen homojen olduğu varsayılsa da, hücreler arasında metabolit, protein ve mRNA düzeylerinde önemli farklılıklar bulunur.
- Bu farklılıklar, hücrelerin eşit olmayan molekül dağılımı veya RNA polimerazın DNA ile rastlantısal etkileşimleri sonucu oluşabilir.

Fenotipik Heterojenitenin Klinik Önemi

- Hücreler arası bu farklılıklar pek çok biyolojik sonuca yol açabilir.
- Klinik açıdan en önemli sonuçlardan biri, tedaviye dirençli uyku halinde kalıcı patojenik bakterilerin varlığıdır.
- Bu dormant hücreler tedavi sırasında “iyileşme” izlenimi oluşturabilir.
- Ancak süreç sonunda aynı patojen yeniden aktifleşerek tekrarlayan enfeksiyonlara neden olabilir.



Teşekkür ederim

Prof. Dr. Bektaş TEPE

