

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**KARBAPENEM DİRENÇLİ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
İZOLATLARINDA PROFAJ İZOLASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

HAZIRLAYAN

NİSANUR AYAS

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA- 2025

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**KARBAPENEM DİRENÇLİ *KLEBSİELLA PNEUMONİAE*
İZOLATLARINDA PROFAJ İZOLASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

HAZIRLAYAN

NİSANUR AYAS

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. AYLİN ÜSKÜDAR GÜÇLÜ

ANKARA - 2025

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Nisanur Ayas tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 30/07/2025

Tez Adı: Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Profaj İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı- Soyadı, Kurumu)

İmza

ONAY

Enstitü Müdürü

Tarih: ... / ... /

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 10/07/2025

Öğrencinin Adı, Soyadı: Nisanur Ayas

Öğrencinin Numarası: 22210300

Anabilim Dalı: Tıbbi Mikrobiyoloji Programı: Yüksek Lisans

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı: Doç. Dr. Aylin Üsküdar Güçlü

Tez Başlığı: Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Profaj İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç bölümünden oluşan, toplam 84 sayfalık kısmına ilişkin, 10/07/2025 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %4'dür. Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:

ONAY

Tarih:

Öğrenci Danışmanı Unvan, Ad, Soyad, İmza:

TEŞEKKÜR

Bilimsel merakımı besleyen, her adımda yolumu aydınlatan ve karşılaştığım her zorlukta yanımda olan değerli danışmanım Doç. Dr. Aylin Üsküdar Güçlü'ye en içten teşekkürlerimi sunarım. Akademik yolculuğum boyunca yalnızca bilgi ve deneyimiyle değil, aynı zamanda güven veren yaklaşımıyla da yanımda olduğu için kendisine minnettarım. Akademik yolculuğumda sadece bilgi ve deneyimiyle değil, aynı zamanda güven veren yaklaşımıyla bana her zaman cesaret aşılayan; yolumu açan, varlığıyla ilham veren ve rehberliğini bir baba şefkatiyle hissettiren değerli hocam Prof. Dr. Ahmet Celal Başustaoğlu'na gönülden teşekkür eder, en içten saygılarımı sunarım. Başkent Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın değerli hocaları Prof. Dr. Ayşe Hande Arslan, Doç. Dr. Hasan Cenk Mirza ve Doç. Dr. Aylin Altay Koçak'a, bilgi ve deneyimlerini cömertçe paylaştıkları için teşekkür ederim. Tezimi titizlikle inceleyip katkı sağlayan değerli jüri üyeleri Prof. Dr. Ayşe Hande Arslan, Doç. Dr. Aylin Üsküdar Güçlü, Prof. Dr. Ayşe Kalkancı, Prof. Dr. İpek Mumcuoğlu ve Prof. Dr. Yunus Kasım Terzi'ye zaman ve emekleri için saygı ve şükranlarımı sunarım. Tez sürecim boyunca laboratuvarında her an yanımda olan, desteğini, emeğini ve samimi arkadaşlığını hiç eksik etmeyen çok değerli arkadaşlarıma; özellikle sabrıyla, özveriyle ve pozitif enerjisiyle bu süreci benim için çok daha katlanılır ve keyifli hale getiren canım laboratuvar partnerim Sezin Ünlü'ye en içten teşekkürlerimi sunarım. Titizliğiyle işleri en ince ayrıntısına kadar ele alan Gizem İnce Ceviz'e, esprileri ve pozitif enerjisiyle herkesi güldüren Salih Danyıldız'a, yeni üyemiz sevgili arkadaşım Tara Enami Namın'a, İlgin Ata Vural'a, Süleyman Yalçın'a içten teşekkürlerimi iletirim. Her biri bu süreçte yanımda olarak yolculuğumu çok daha özel ve unutulmaz kıldı. İyi ki varsınız!

Hayatım boyunca maddi ve manevi tüm desteğini eksik etmeyen, bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan; kızları olmaktan her zaman gurur duyduğum canım annem Saniye Ayas'a ve sevgili babam Ahmet Cevdet Ayas'a ve sevgili ikizim Simay'a sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım. Endişelerimi hiç çekinmeden paylaştığım, zor zamanlarımda hep yanımda olan ve mutluluğumu çoğaltan en yakın arkadaşım Berk Alay'a; hayatıma kattığın sevgi ve anlam için, her anımda yanımda olduğun için sonsuz minnet ve sevgilerimi sunuyorum. Ayrıca, minik kalpleri ve tatlı mırıltılarıyla her an yanımda olan can dostlarım Paris ve Mia'ya teşekkür ederim. Varlıkları, bu süreçte bana moral ve huzur veren en kıymetli destek oldu.

ÖZET

AYAS N. Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Profaj İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Başkent Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı, Ankara, 2025.

Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* (KDKP), hem intrinsik mekanizmaları hem de kazanılmış direnç geliştirme yetenekleri nedeniyle dünya genelinde ciddi bir halk sağlığı tehdidi oluşturmaktadır. Bu tez çalışmasında, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda yer alan ve çeşitli klinik örneklerden izole edilen 20 KDKP suşu, profaj varlığı açısından değerlendirilmiştir. UV, mitomisin C, levofloksasin ve siprofloksasin ile yapılan geleneksel indüksiyon işlemlerinde çift katmanlı teknikle plak oluşumu gözlenmemiş; MTT boyama yöntemiyle plak benzeri yapılar saptanmış ancak yeterli miktarda faj elde edilememiştir. Bu nedenle farklı sekans tiplerine sahip dört izolat seçilerek tüm genom sekanslamaya alınmış ve toplam 19 profaj dizisi tespit edilmiştir. Profajların 14'ü "tam", 2'si "şüpheli", 3'ü ise "kısmi" olarak sınıflandırılmış; kısmi profajlar değerlendirme dışı bırakılmıştır. Seçilen izolatlara daha önce izole edilen litik fajlarla yeniden indüksiyon yapılmış ve 13 profajın aktif hale geçtiği in silico analizlerle doğrulanmıştır. Böylece bazı profajların klasik yöntemlerle tespit edilemese de moleküler düzeyde indüklenebilir olduğu gösterilmiştir. Tüm genom analizlerinde, profajlarda doğrudan antibiyotik direnç genlerine rastlanmamış; ancak virülans faktörleri, stres yanıtı proteinleri, regülasyon ve savunma ile ilişkili çeşitli genlerin bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca bazı profajlarda anti-CRISPR proteinleri, tRNA genleri ve yatay gen transferiyle ilişkili mobil genetik elemanlar tespit edilmiştir. Bu öğelerin, doğrudan direnç geni taşımamasına rağmen, bakterinin çevresel streslere ve antibiyotik baskısına karşı adaptasyonunu kolaylaştırarak direnç gelişimine dolaylı yoldan katkı sağlayabileceği düşünülmüştür. Pangenom analizleri ise bu profajların yüksek genetik çeşitlilik gösterdiğini ve çoğunlukla esnek gen havuzunda yer alan kabuk genleri taşıdığını ortaya koymuştur. Elde edilen bulgular, KDKP genomlarında bulunan profajların moleküler düzeyde aktif, klasik yöntemlerle her zaman tespit edilemeyen ancak konak bakterinin evrimsel başarısına çok yönlü katkılar sunabilen mobil genetik elemanlar olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Klebsiella pneumoniae*, Bakteriyofajlar, Profaj, Karbapenem Direnci, Moleküler Karakterizasyon

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no: KA23/393 ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.



ABSTRACT

AYAS N. Prophage Isolation and Characterization of Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates. Başkent University, Institute of Health Sciences, Medical Microbiology Master's Program with Thesis, Ankara, 2025.

Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) poses a serious global public health threat due to its intrinsic resistance mechanisms and ability to acquire additional resistance traits. In this thesis study, 20 CRKP isolates obtained from various clinical specimens and preserved in the culture collection of Başkent University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, were evaluated for the presence of prophages. Classical induction methods including UV irradiation, mitomycin C, levofloxacin, and ciprofloxacin were applied; however, no plaque formation was observed using the double-layer technique. Although MTT staining revealed plaque-like structures, sufficient amounts of phages could not be isolated. Therefore, four isolates with different sequence types were selected for whole genome sequencing, leading to the identification of 19 prophage regions. Among them, 14 were classified as “intact,” 2 as “questionable,” and 3 as “incomplete,” with the latter excluded from further analysis. Re-induction of these isolates using previously isolated lytic phages confirmed the activation of 13 prophages through in silico analyses, indicating that some prophages, although undetectable by traditional methods, may still be inducible at the molecular level. Whole genome analysis revealed no direct antibiotic resistance genes in the prophages; however, genes associated with virulence, stress response, regulation, and defense were identified. Additionally, some prophages harbored anti-CRISPR proteins, tRNA genes, and mobile genetic elements related to horizontal gene transfer. While these elements do not directly encode resistance, they may contribute to bacterial adaptation under environmental stress and antibiotic pressure, thereby indirectly supporting resistance development. Pangenome analyses showed that the prophages were genetically diverse and primarily carried shell genes located in the accessory genome. Overall, the findings suggest that prophages integrated into CRKP genomes are molecularly active mobile genetic elements that may evade classical detection methods, yet significantly contribute to the evolutionary success and adaptability of their bacterial hosts.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, Bacteriophages, Prophages, Carbapenem Resistance, Molecular Characterization

This study was approved by Baskent University Institutional Review Board (Project no: KA23/393) and supported by Baskent University Research Fund.



ÖNSÖZ

Klebsiella pneumoniae, hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan gram-negatif bir bakteridir. Hem intrinsik hem de kazanılmış direnç mekanizmaları sayesinde antibiyotiklere karşı kolaylıkla direnç geliştirebilen *K. pneumoniae*'nin karbapenem dirençli suşları dünya genelinde bildirilmektedir. Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* insidansındaki artış, alternatif tedavi yöntemlerine olan ihtiyacı artırmıştır. Bu çalışmada, karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarını enfekte eden ve bakteriyel genoma entegre olan lizojenik fajların indüklenmesi sonrası fajların izolasyonu ve karakterizasyonu amaçlanmıştır. Çalışmada, dört karbapenem dirençli klinik *K. pneumoniae* izolatının genomuna entegre olmuş toplam 16 profajın moleküler karakterizasyonları belirlenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
1.1.1. Klinik önemi.....	2
1.1.2. Virülans faktörleri.....	2
1.2. Karbapenem dirençli <i>Klebsiella pneumoniae</i> (KDKP).....	3
1.3. KDKP’de Virülans ve Dirence Katkı Sağlayan Ekstra-kromozomal Genetik Elemanlar.....	7
1.3.1. Plazmitler.....	7
1.3.2. Bakteriyofajlar.....	8
1.3.2.1. Profaj indüksiyon mekanizmaları.....	10
1.3.2.1.1. SOS-bağımlı profaj indüksiyon mekanizmaları	10
1.3.2.1.2. SOS-bağımsız profaj indüksiyon mekanizmaları .	10
1.3.2.2. Profajların yatay gen transferindeki rolü.....	12
1.4. Profaj bölgelerinin biyoinformatik analizlerle bakteri genomunda gösterilmesi.....	13
1.4.1. Pangenom Analizi	14
1.4.2. Profajların Genomik Organizasyonu ve Yapısal Anotasyonu...	15
1.4.3. Genler arası mesafe.....	15
1.4.4. Virülans ve Antimikrobiyal Direnç (AMR) Genlerinin taranması ...	15
1.4.5. Anti-CRISPR ve İmmün Modülasyon Genlerinin Tespiti.....	16
1.4.6. Karşılaştırmalı Genomiks ve Evrimsel Analiz.....	16
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
2.1. Laboratuvarda Kullanılan Gereç ve Malzemeler.....	17
2.1.1. Gereçler.....	17

2.1.2. Besiyerleri, kimyasallar ve kitler.....	18
2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> İzolatları.....	19
2.2.1. İzolatların seçilmesi ve saf kültürü elde etme.....	19
2.3. Bakteriyofajların İndüksiyonu.....	19
2.3.1. Mitomisin C (MitC) ile profajların indüksiyonu.....	19
2.3.2. Antibiyotik ile profajların indüksiyonu	20
2.3.3. UV ile profajların indüksiyonu.....	20
2.3.4. H ₂ O ₂ ile profaj indüksiyonu.....	21
2.3.5. MTT ile faj plaklarının görünürlüğünün arttırılması.....	21
2.4. İndüksiyon işlemi sonrasında profajların tüm genom sekanslama ve biyoinformatik analizi.....	21
2.4.1. Bakteriyofaj DNA izolasyonu.....	21
2.4.2. Tüm genom sekanslama	22
2.4.3. Biyoinformatik analiz.....	23
2.5. Bakteri Tüm genom sekanslama / Biyoinformatik Analizi.....	24
2.5.1. Bakteri DNA izolasyonu.....	24
2.5.2. Tüm genom sekanslama.....	25
2.5.3. Biyoinformatik analiz.....	25
3. BULGULAR.....	27
3.1. Karbapenem Dirençli <i>Klebsiella pneumoniae</i> İzolat Profili.....	27
3.2. Karbapenem Dirençli <i>Klebsiella pneumoniae</i> Plazmitleri.....	33
3.2.1. Plazmitler üzerinde kodlanan antimikrobiyal direnç ve virülans genleri.....	34
3.3. Profaj Profilleri.....	35
3.3.1. MTT uygulaması sonra indüklenen profajların plak görünümü	38
3.3.2. Faj genom analizleri.....	39
3.3.3. Profaj bölgelerinin karşılaştırmalı genetik organizasyonu.....	45
3.3.4. Profajların yapısal analizi.....	48
3.3.5. Profaj genomlarında kodlanan genler.....	50
3.3.5.1. Virülans genleri.....	50
3.3.5.2. Litik/lizojenik döngüyü kontrol eden genler	51
3.3.5.3. Savunma proteinleri genleri.....	52
3.3.5.4. Adaptasyon ve stres ile ilişkili proteinler.....	55

3.3.5.5. Regölasyon ve rekombinasyon ile ilişkili proteinler.....	58
3.3.5.6. Metabolizma ile ilişkili proteinler	59
3.3.5.7. Transport ve membran proteinleri.....	61
3.3.5.8. Yatay gen transferi ile ilişkili proteinler.....	63
3.3.5.9. Anti-faj proteinleri.....	63
3.3.5.10. tRNA analizi	65
3.4. Pangenom Analizi.....	66
3.5. Filogenetik Analiz.....	69
3.5.1. Nökleik asit dizisine göre yakın ilişkili fajlar ile intergenomik analiz.....	69
3.5.2. Genler Arası Mesafeler.....	71
3.5.3. Yapısal homoloji	72
4. TARTIŞMA.....	74
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	86
KAYNAKLAR.....	87

TABLÖLER LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> beta-laktamazları.....	5
Tablo 2. <i>K. pneumoniae</i> izolatlarının genom özellikleri, sekans tipleri, kapsül tipleri, antimikrobiyal direnç ve virülans genleri.....	29
Tablo 3. <i>K. pneumoniae</i> izolatlarında saptanan plazmitler (replikon tipleri).....	33
Tablo 4. Plazmitler üzerinde taşınan virülans, direnç genleri ve etki ettiği antibiyotik sınıfları	34
Tablo 5. Profajların genomik özellikleri.....	37
Tablo 6. Profajlar üzerinde taşınan virülansla ilişkili gen / protein adı.....	50
Tablo 7. Profajlar üzerinde taşınan savunma proteinleri.....	53
Tablo 8. Profajlar üzerinde taşınan Anti-CRISPR proteinleri.....	54
Tablo 9. Profajlar üzerinde taşınan adaptasyon ve stres proteinleri.....	57
Tablo 10. Profajlar üzerinde taşınan regülasyon proteinleri.....	59
Tablo 11. Profajlar üzerinde taşınan metabolizma proteinleri.....	61
Tablo 12. Profajlar üzerinde taşınan transport ve membran proteinleri.....	62
Tablo 13. Profajlar üzerinde taşınan MGE ile ilişkili proteinler.....	63
Tablo 14. Profajlar üzerinde taşınan anti-faj proteinleri.....	64
Tablo 15. Profajların üzerinde bulunan tRNA Tipleri.....	65
Tablo 16. Kabuk genleri ve bulundukları profajlar.....	67
Tablo 17. Yakın ilişkili bakteriyofajlar ve morfolojileri.....	69

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1. MTT boyama sonrası plak görünümü.....	39
Şekil 2. Profaj genomlarında kodlanan genlerin fonksiyonel dağılımları.....	40
Şekil 3. KP1-Φ1, KP2-Φ2, KP4-Φ3 profajlarına ait genom haritaları.....	41
Şekil 4. KP2-Φ3, KP4-Φ1 profajlarına ait genom haritaları.....	42
Şekil 5. KP2-Φ4, KP3-Φ5 profajlarına ait genom haritaları.....	43
Şekil 6. KP2-Φ7, KP3-Φ4 profajlarına ait genom haritaları.....	44
Şekil 7. Farklı <i>Klebsiella pneumoniae</i> izolatlarında tespit edilen benzer profaj bölgelerinin karşılaştırmalı genetik organizasyonu.....	46
Şekil 8. Profajların üzerinde kodlanan savunma ve regülasyon proteinleri.....	66
Şekil 9. Profajlar üzerinde kodlanan ortak genlerin dağılımı	68
Şekil 10. Yakın ilişkili fajlar ile profajların intergenomik analizi.....	70

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ACLAME	a classification of mobile genetic elements
Ad	adaptor proteini
AMR	antimikrobiyal direnç
CFU	colony-forming unit
CLSI	clinical and laboratory standards institute
CRAB	Carbapenem-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i>
ÇİD	çoklu ilaç dirençli
DinF	DNA-damage-inducible protein F
DinI	DNA-damage-inducible protein I
DL	çift katmanlı (double layer)
dsDNA	çift iplikli dna
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	etilendiamin tetra asetik asit
EMB	eozin metilen blue
EOP	efficiency of plating
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter species</i>
EtBr	Etidyum Bromür
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FCIA	Fenol:kloroform:izoamilalkol
Grx1	glutaredoksin 1 proteinleri
GSBL	genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz
Hcp	head-closure proteini
HPs	hipotetik proteinler
HSP	ısı şoku proteini
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IMP	İmipenemaz
iucC	aerobactin synthetase
iutA	ferric aerobactin receptor

KDAB	Karbapenem Dirençli <i>A. baumannii</i>
KDKP	Karbapenem Dirençli <i>Klebsiella pneumoniae</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Karbapenemazları
LB	luria broth
LPS	lipopolisakkaritler
MBL	metallo- β -laktamazlar
MCP	methyl-accepting chemotaxis protein
MCP	major capsid protein
MGE	mobil genetik element
MİK	minimum inhibisyon konsantrasyonu
MLST	multilocus sequence typing
MOI	multiplicity of infection
MRSA	Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MTP	major tail protein
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NDM	new-delhi-metallo-beta-laktamaz
NTPaz	nükleozit-trifosfat hidrolaz
OMP	dış membran porinleri
OXA	oksasilinaz
PAPS Redüktaz	fosfoadenosin fosfosülfat redüktaz
PBP	penisilin bağlayıcı proteinlerin
PCR	polymerase chain reaction
PFU	plaque forming unit
pIV	filamentli faj sekretin proteini iv
PotF	putresin abc taşıyıcısı
QS	quorum sensing
rmlB proteini	DTDP-glucose 4,6-dehidratase proteini
SDS	sodyum dodesil sülfat
ssDNA	tek iplikli DNA
ssRNA	tek iplikli RNA
STEC	Shiga toksini üreten <i>E.coli</i>
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskopu
TerC	tellurium direnç proteini

TermL	terminase
TSA	tryptic soy agar
TSB	tryptic soy broth
UV	ultraviyole
VAN	vankomisin
VFDB	virulence factor database
VIM	verona integron-encoded metallo- β -laktamaz
YBÜ	yoğun bakım ünitesi
YGT	yatay gen transferi
Δ malR	MalR mutantı



1. GİRİŞ

Antimikrobiyallere dirençli bakterilerin ortaya çıkması ve yayılması, özellikle antibiyotiklerin biyosidal etkisinden kaçmakla ünlü ESKAPE patojenleri olarak bilinen - *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter spp.*- üzerinde durulması gereken acil bir küresel sağlık sorunu haline gelmiştir. Bunlar arasında *Klebsiella pneumoniae*, çoklu ilaç ve karbapenem direnci kazanma konusundaki yüksek kabiliyeti nedeniyle önemli bir fırsatçı patojen olarak öne çıkmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından kritik öncelikli patojen olarak tanımlanan karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* (KDKP), özellikle yüksek morbidite ve mortalite oranlarına katkıda bulunduğu yoğun bakım ünitelerinde sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonların önde gelen nedeni haline gelmiştir. KDKP suşları genellikle β -laktamlar, aminoglikozidler ve florokinolonlar dahil olmak üzere birçok antibiyotik sınıfına karşı direnç göstermekte ve tedavi seçeneklerini ciddi şekilde sınırlamaktadır. *K. pneumoniae*, direnç profiline ek olarak, kapsüller polisakkaritler, sideroforlar, adhezinler ve biyofilm oluşturma yeteneği gibi hayatta kalma ve patojenik potansiyelini arttıran birçok virülans faktörlerine de sahiptir [1]. Antibiyotiklere bakteriyel direnç gelişiminde birçok mekanizma rol almakta ve özellikle plazmitler direnç genlerinin yatay aktarımı için iyi bilinen vektör olarak bildirilmektedir. Plazmitler, bakterilerin genetik materyallerini aktarmasına, adaptasyonlarına, hızlıca evrimleşebilmelerine ve çeşitli metabolik avantaj sağlamalarına hizmet eden önemli genetik araçlardır [2, 3]. Bununla birlikte, bakteri kromozomuna entegre olabilme kabiliyeti olan ve profaj olarak adlandırılan lizojenik bakteriyofajlar da bir diğer önemli genetik araçlardır ve profajların genetik transfer araçları olarak dirençli patojenlere olan genetik katkılarıyla ilgili rolünü net olarak ortaya koyacak çalışmalara ihtiyaç vardır. Bakteriyel evrimde önemli itici güçler ve mobil genetik unsurlar olarak bakteriyofajlar, araştırma alanı olarak giderek daha fazla ilgi görmektedir. Profajlar antibiyotik direnci, virülans veya bağışıklıktan kaçınma ile ilişkili genler taşıyabilir ve yatay gen transferi ve bakteri genom plastisitesinde önemli rol oynayabilir [4, 5]. Bu nedenle, KDKP izolatlarında profaj profilinin araştırılması, direnç ve virülans özelliklerinin evrimini ve yayılmasını anlamak için gereklidir.

1.1. *Klebsiella pneumoniae*

Enterobacteriaceae üyesi *Klebsiella pneumoniae*, gram-negatif basil formunda, oksidaz negatif, katalaz pozitif, hareketsiz ve glukozyu fermente eden fakültatif anaerobik bir bakteridir. Çevrede yaygın olarak bulunur ve insan gastrointestinal sistemindeki normal mikrobiyotanın bir parçasıdır. Boyutu genellikle 1-2 µm uzunluğunda ve 0.5-0.8 µm genişliğinde olup polisakkarit yapıda kapsüle sahiptir. Optimal üreme koşulları 37°C sıcaklık ve pH 7 seviyesidir. Kapsül varlığından dolayı besiyerinde mukoid, ıslak görünümlü koloniler oluşturur. Aynı zamanda EMB agarda laktoz pozitif renkli koloniler oluşturmaktadır. Taksonomik olarak aile üyeleri *Enterobacterales* Takımı, *Gammaproteobacteria* Sınıfı, *Proteobacteria* Şubesinde sınıflandırılır [6].

1.1.1. Klinik önemi

K. pneumoniae, hem toplum hem de hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan önemli bir patojendir. Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde ciddi hastalık tablolarına neden olduğu bilinmektedir. *K. pneumoniae* suşları, sıklıkla bronkopnömoni, bronşit, akciğer apsesi ve üriner sistem enfeksiyonları gibi toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olur. Alkol tüketimi ve bakteriyemi varlığı, mortalite oranını artırır ve tedavi sürecini zorlaştırır. *K. pneumoniae* ventilatör, kateter gibi invaziv cihazlara tutunarak kolonize olabilir ve hastane ortamında varlığını sürdürebilir. Bu cihazların kullanımına bağlı olarak ilgili hastalarda nozokomiyal enfeksiyonlar gelişebilmektedir. İdrar yolu enfeksiyonları, pnömoni, sepsis ve yara enfeksiyonları hastane kaynaklı enfeksiyonlardan bazılarıdır [6].

1.1.2 Virülans faktörleri

K. pneumoniae, konağın bağışıklık sisteminden kaçıp, kendi eliminasyonunu engelleyen, çevresel streslere karşı adaptasyonunu arttıran ve aynı zamanda konak hücrelere zarar verecek çeşitli virülans faktörlerine sahiptir [7, 8]. Sahip olduğu en önemli virülans faktörlerinden biri polisakkarit yapıdaki kapsüldür. Kapsül yapısı, bakteriyi fagositoza karşı korumaktadır. Kompleman aracılı bağışıklık yanıtını inhibe ederek bakterinin konak bağışıklık sisteminden kaçarak enfeksiyon oluşturmaya da katkı sağlar. Kapsül yapısı *wzi*, *wza*, *wzb*, *wzc*, *gnd*, *wca*, *cpsB* ve *galF* gibi genlerin yer aldığı kapsül polisakkarit (KPS) gen kümesi tarafından

düzenlenmektedir [9]. Serolojik farklılıklarına göre yapılan sınıflandırmada (K antijenleri) şu ana kadar 79 kapsül serotipi tanımlanmıştır. Özellikle K1, K2, K54, K57, K20 ve K5 tipleri toplum kökenli invaziv piyogenik karaciğer absesi, septisemi ve pnömoni tablolarıyla ilişkilendirilir. *K. pneumoniae* kapsül yapısının, fagositoza ve kompleman aracılı lizise karşı dirençli olduğu ve K1, K2 ve K57 gibi kapsül tiplerinin de yüksek virülansla ilişkili olduğu tespit edilmiştir [10, 11]. Bir diğer çalışmada ise kapsül üretiminin aşırı olduğu hipermukoid fenotipli çeşitli *Klebsiella* suşlarının, karaciğer absesi, septisemi ve pnömoni riskini artırdığı bildirilmiştir. Bakterinin aşırı miktarda polisakkarit üretmesi hipermukoid fenotip olarak tanımlanır. Bu durum, bakterinin fagositoza karşı direncini artırırken biyofilm oluşumunu da desteklemektedir [12].

Lipopolisakkarit (LPS), önemli bir diğer virülans faktörüdür. LPS'nin bir bileşeni olan Lipid A, endotoksin aktivitesiyle inflamatuvar yanıtı tetikler ve bakteriyi kompleman aracılı bağışıklık tepkilerine karşı korur [9]. LPS alt birimi olan ve günümüzde tespit edilen sekiz O serotipi arasından, O1 ve O2 serotipleri, klinik suşlarda en yaygın olanlar olup, invaziv enfeksiyonlarla ilişkilidir [13].

K. pneumoniae tarafından hücre zarlarında demir moleküllerinin taşınmasından sorumlu olan enterobaktin, aerobaktin, salmochelin ve yersiniabaktin sideroforlar türleri bulunmaktadır. Bu moleküller, *K. pneumoniae*'nin antimikrobiyal ajanlara karşı direnç geliştirmesine katkıda bulunur ve bakterinin yüksek enfeksiyon potansiyeline sahip olduğunu gösteren önemli göstergelerdir [14]. İdrar yolu enfeksiyonlarıyla ilişkili olduğu bilinen Tip 1 fimria, *K. pneumoniae* suşlarının mesane epitel hücrelerine tutunma afinitesini artırır. Tıbbi cihazların yüzeylerine yapışma eğilimi kazandıran Tip III fimbrialar, bakterinin biyofilm oluşturarak antibiyotik direncine de katkı sağlamaktadırlar [9]. Pili ve fimbrialar, yapışmayı kolaylaştırmanın yanı sıra bakterinin hareketliliğine de katkıda bulunabilirler. *K. pneumoniae* genellikle hareketsiz olarak kabul edilse de tip IV pili tarafından sağlanan seğirme hareketi, yüzeyleri geçmesine olanak verir. Bu hareketlilik biçimi, besin kazanımı ve kolonizasyon genişlemesi için yüzey hareketinin gerekli olduğu biyofilmler gibi yoğun ortamlarda özellikle avantajlıdır [15, 16].

1.2. Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* (KDKP)

Çok ilaca dirençli (ÇİD) bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde mevcut en etkili ve günümüzde son çare olarak tercih edilen antibiyotik sınıfı karbapenemler ve 3. kuşak

sefalosporinlerdir. *Enterabacteriaceae* üyesi olan *K. pneumoniae* suşlarında *Klebsiella pneumoniae* Karbapenemazları (KPC), ekspresyonu ilk olarak 1996 yılında ABD'de tanımlandıktan sonra tüm dünyada hızla yayılmaya ve evrimleşmeye devam etmektedir [6]. Genişlemiş spektrumlu β -laktamazların (GSBL) endemisitesi ve yüksek karbapenem kullanımına bağlı olarak KDKP insidansında dramatik bir artış gözlenmektedir [17]. KPC üreten *K. pneumoniae* izolatları karbapenemlere ek olarak penisilinler, sefalosporinler, florokinolonlar ve aminoglikozidler dahil birçok sayıda antibiyotik sınıfına dirençli hale gelmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre KDKP, kritik öncelikli patojenler listesi içerisinde yer almaktadır. DSÖ'nün Avrupa'da Antimikrobiyal Direnç Sürveyansı 2023 verilerine göre KDKP izolatlarının sürveyansı 2017-2021 yılları boyunca takip edilmiştir. Elde edilen verilere göre 2021 yılında, *K. pneumoniae* için veri raporlayan 45 ülkenin 7'sinde (%16), %10'un altında direnç yüzdeleri gözlemlenirken, bölgenin güney ve doğu kesimlerindeki 19 ülkede (%42), %50 veya üzerinde direnç yüzdeleri rapor edilmiştir. Türkiye, 2017–2021 yılları arasında test edilen toplam *K. pneumoniae* için izolat sayısı ve direnç fenotipi verilerine göre karbapenem (imipenem/meropenem) direnci, 2017 yılında %32.5, 2018 yılında %34.4, 2019 yılında %39.4, 2020 yılında %48.2 ve 2021 yılında ise %49.1 olarak hesaplanmıştır [18]. Bakterilerde antibiyotik sınıflarına direnç gelişimi birçok şekilde olabilmektedir. Bunlardan bazıları;

- **Azalmış dış membran geçirgenliği**

Direnç gelişiminde rol oynayan membran sistemi, bakteri hücre etkileşimi ve canlı hücrelerin bütünlüğü için ana bileşendir. Bu etkileşim, besin maddelerinin, iyonların ve suyun ya da toksik elementlerin hücrenin içi ve dışı arasında taşınmasını içerir. Membran geçirgenliğinin bozulması ile hücre içine ilaç alımı azalır ve çeşitli antibiyotik ailelerine direnç gelişebilir [19].

- **Mutasyon/Enzimatik modifikasyon**

KDKP genomlarında gerçekleşen mutasyon ve/veya translasyon gibi enzimatik modifikasyonlar sonucu antibiyotik molekülleri hedef bölgelerine bağlanamazlar ve etki edemezler [19].

- **Dışa atım pompaları**

Çoğu antibiyotik sınıfına karşı direnç gelişiminde bakteriyel dışa atım pompaları önemli rol oynamaktadır. *K. pneumoniae* için bildirilen; *AcrAB*, *KdeA*, *CepA*, *EefAB*, *KmrA*, *KexD*, *OqxAB*, *pmexAB-oprY* ve *tmexCD1-toprJ* dışa atım pompaları bulunur ve özellikle geniş substrat aralığı ve Gram-negatif bakterilerde ÇİD ile ilişkili olanlar, *AcrAB*, *EefAB*, *KexD* ve *OqxAB* dışa atım pompalarıdır. Bunların aşırı ekspresyonuyla, antibiyotik, antiseptik, boya ve deterjanlar gibi çeşitli antimikrobiyal kimyasal ve bazı metabolitler hücre dışına atılarak direnç gelişimi sağlanır [19].

- **Metabolik inaktivasyon**

Bakteri metabolizmasında etkisizleşen antibiyotik molekülleri hücre içinde bozularak direnç gelişimine katkı sağlayabilirler [19].

- **Beta laktamaz üretimi**

Klinikte en çok karşılaşılan direnç gelişimi *K. pneumoniae* suşlarında β -laktam antibiyotiklerin etkisini spesifik olarak inhibe eden β -laktamazların üretimi *K. pneumoniae*'nin karbapenemlere karşı direnç geliştirmesine neden olmaktadır. Karbapenemazlar, moleküler gen yapıları ve aktif bölgelerindeki farklılıkları nedeniyle çeşitli sınıflara ayrılırlar [19, 20]. *K. pneumoniae* suşlarında kodlanan yaygın beta-laktamazlar Tablo 1.'de verilmiştir [21, 22, 23].

Tablo 1. *Klebsiella pneumoniae* Beta-laktamazları

Beta laktamazlar	Ambler Sınıfı	Örnekler	Özellikler
Serin bazlı- β -laktamaz	A	TEM, SHV, CTX-M, KPC	ESBL ve KPC tipi karbapenemazlar
	C	CMY, DHA	Plazmit kaynaklı AmpC yayılımı
	D	OXA-48	Karbapenemazlar
Metallo- β -laktamaz	B	NDM, VIM, IMP	Çinko bağımlı karbapenemazlar

Aktif bölgelerinde serin rezidüleri taşıyan sınıf A beta-laktamazların çoğu plazmitler ile taşınmaktadır. Bu grubun en yaygın örneği olan KPC enzimleri, karbapenemleri ve diğer β -laktam antibiyotikleri hidrolize edebilir. İlk olarak 1996 yılında Kuzey Karolina, ABD'de tanımlanan KPC enzimleri, giderek dünya genelinde yayılmış ve özellikle *K. pneumoniae* suşlarında tespit edilmiştir. Metallo- β -laktamazların (MBL'ler) aktif bölgelerinde Zn^{+2} bağımlı “thiol” grubu bulunmaktadır. NDM (New Delhi metallo- β -laktamaz), VIM (Verona integron-encoded metallo- β -laktamaz) ve IMP (imipenemaz) bu sınıfta yer alan önemli enzimler olup karbapenemlerin yanı sıra diğer β -laktam antibiyotikleri de hidrolize edebilirler. 2008 yılında Hindistan'da tanımlanan ve kısa sürede birçok ülkeye yayılan NDM-1, özellikle *Escherichia coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında tespit edilmektedir. Aktif bölgelerinde serin rezidüleri taşıyan, büyük moleküler ağırlıklı enzimler olan NDM-1, bir sınıf B metallo- β -laktamaz olup, karbapenemleri inaktive eder ve çinko bağımlıdır. AmpC ise sınıf C serin β -laktamazdır ve genellikle 3. kuşak sefalosporinleri hidrolize eder. OXA tipi β -laktamazlar, sınıf D serin enzimlerdir ve çoğu karbapenemaz aktivitesi gösterir. Her biri farklıdır. Bu sınıfın önemli bir üyesi olan ve karbapenemlere karşı direnç sağlayan OXA-48, ilk olarak 2001 yılında Türkiye'de tanımlanmış ve sonrasında Avrupa ve Orta Doğu'da yayılmıştır. OXA-48, karbapenemlere karşı düşük hidrolitik aktiviteye sahip olmasına rağmen diğer direnç mekanizmalarıyla birlikte yüksek direnç gelişimine neden olabilmektedir. Günümüzde KDKP, *Enterobacteriaceae* ailesinde yer alan diğer türlere kıyasla en çok aktarılabılır karbapenemaz enzimleri eksprese etmektedir. Bu genler KPC, IMP, NDM, VIM, OXA-48 olup coğrafik olarak farklı ülkelerde endemik veya sporadiktir. Türkiye'de *K. pneumoniae* için en sık saptanan ve endemik olan karbapenemaz tipi OXA-48 olup bunu NDM ve KPC takip etmektedir [24]. KDKP'de OXA-48 enziminin ilk tespiti 2003 yılında Türk hastadan alınan idrar örneğinde olmuştur. Sonraki yıllarda dünya çapındaki dağılımları artık Avrupa'da, Akdeniz'in güney ve doğu kesiminde ve Afrika'daki ülkeler dahil olmak üzere birçok ülkede OXA-48 salgını bildirilmiştir [25]. Sonuç olarak *Enterobacteriales* karbapenemaz enziminin üretimi, antibakteriyel tedavi başarısını olumsuz etkilemekte ve yüksek mortalite oranları ile karşımıza çıkmaktadır.

Karbapenemaz üreten bakterilerin tespiti, genomik özelliklerinin analizi ve virülans ve direnç özelliklerinin ortaya konması, enfeksiyon kontrolü ve uygun tedavi seçimi için kritiktir. Tedavi seçenekleri sınırlı olmakla birlikte, bu ajanların kullanımı dikkatle değerlendirilmelidir ve direnç gelişimi sürekli izlenmelidir.

1.3. KDKP’de Virölans ve Dirence Katkı Sağlayan Ekstra-kromozomal Genetik Elemanlar

1.3.1. Plazmitler

Plazmitler, bakteriyel DNA'dan bağımsız olarak replike olabilen ve genellikle dairesel, çift sarmallı DNA molekülleridir. Plazmitlerin bakteri türleri arası aktarımı konjugasyon ile gerçekleşmektedir. Plazmitler; antibiyotik direnç genleri, bakteriyel metabolizmaya avantaj sağlayacak genler veya virölans faktörleri (toksin üretimi, adezyon yetenekleri ve invazyon kapasitesi) gibi çeşitli gen bölgeleri taşıyabilirler. Plazmit aracılı yatay gen transferi (YGT), antimikrobiyal direnç genlerinin ve virölans faktörlerinin bakteriyel popülasyonlar arasında hızla yayılmasına aracılık etmektedir. Bu durum bakterilerin genetik çeşitliliğini artırarak evrimsel süreçlerini hızlandırır ve çevresel değişimlere adaptasyonlarını kolaylaştırır. Bakterilerin zorlu şartlara adaptasyonu ve kazandığı patojenik karaktere bağlı olarak zor eliminasyonu ve antibiyotik direnci gibi istenmeyen özelliklerin yayılması ilgili bakterinin ciddi bir halk sağlığı sorununa haline gelmesine neden olmaktadır. Örneğin, *Enterobacteriaceae* ailesine ait bakterilerde bulunan R-plazmitleri, taşıdıkları çoklu antibiyotik direnç genlerini (beta-laktam, kinolon ve aminoglikozidlere karşı direnç sağlayan genler) konjugasyon aracılığıyla diğer bakterilere aktarılabilir [26]. Araştırma verilerine göre, ilk kez Hintli bir hastada tanımlanan NDM-1 geni, plazmitler aracılığıyla bakteriler arasında hızla yayılmıştır [27]. *E. coli* ve *K. pneumoniae* türlerinde bulunan plazmitlerin GSBL genlerini taşıdığı ve hastane enfeksiyonlarında direnç oranlarını artırdığı tespit edilmiştir. Çevresel çalışmalarda, kanalizasyon ve atık sularda direnç genleri taşıyan plazmitlerin yaygın olduğu ve antibiyotiklerin aşırı kullanımı sonucu seçilim baskısına uğrayarak dirençli suşların baskın hale gelmesine neden olmuştur [28]. Dolayısıyla plazmitlerin YGT'deki rollerinin daha iyi anlaşılması, antibiyotik direnci ve enfeksiyon kontrolü stratejilerinin geliştirilmesi için önemlidir.

K. pneumoniae'de virölans ve direnç fenotipini etkileyen ve en yaygın olarak incelenmiş plazmitler IncF, IncHI1B, IncL/M, IncA/C2 ve IncX3'tür. Bu plazmitler hem direnç hem de virölans genlerini taşımakta olup bakteriyel patojeniteyi katkı sağlarlar. IncFII plazmitleri üzerinde bulunan karbapenemaz KPC, NDM, OXA-48 ve CTX-M direnç genleri beta laktam antibiyotiklerine karşı direnç kazandırdılar. Ayrıca aminoglikozid direnç genleri (*aac(6')-Ib*, *aadA1*, *aadA2*, *aph(3')-Ia*) ve florokinolon direnç genleri (*qnrB19*, *qnrS1*) de bu plazmitler üzerinde taşınmaktadır. Aynı zamanda bazı suşlarda *rmpA/rmpA2*, aerobactin

(iucABCD-iutA) gibi hipervirölans genlerini de taşıyabilir. IncFIB(K) ve IncFII(K) plazmitleri, iroABCDN, iucABCD, iutA, bla_CTX-M-14, bla_TEM-191, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, qnrS1, aac(6')-Ib-cr, aadA16, sul1, dfrA27 gibi virölans ve çoklu direnç genlerini taşımaktadır [29]. IncR plazmit tipi ise karbapenem ve diğer antibiyotik direnç genlerinin taşınmasında rol oynar. İlk kez Tayvan'da tanımlanan ve hipervirölans genleri açısından zengin olan plazmit IncHI1B (pLVPK) ve IncHI1B (pK2044) özellikle rmpA, rmpA2, iucABCDiutA, iroBCDN ve ağır metal direnç genlerini taşımaktadır. Ancak son yıllarda üzerlerinde direnç genleri de sık sık tespit edilmektedir. Özellikle Orta doğu ve Avrupa bölgelerinde yaygın olarak tespit edilen plazmit IncL/M OXA-48 genini taşır. NDM geninin taşınmasını sağlayan plazmit IncX3, küçük boyutlu ve yüksek transfer oranına sahiptir ve genellikle direnç genleri taşır [29, 30].

1.3.2. Bakteriyofajlar

Bakteriyofajlar, bakterilere özgü virüsler olup zorunlu hücre içi parazitlerdir ve genetik materyallerini bakteri hücrelerine enjekte ederek çoğalırlar. Bakteriyofajların keşfi, ilk olarak Frederick Twort (1915) ve Félix d'Herelle (1917) tarafından yapılmıştır [31, 32]. Bakteriyofajlar, doğada oldukça yaygın bulunan mikroorganizmalar olup pek çok ekosistemde yer alırlar. Bakteriyofajların sınıflandırılması genetik yapılarından morfolojik özelliklerine kadar farklı kriterlere dayanır. Genetik materyal açısından değerlendirildiğinde, fajların büyük çoğunluğu çift iplikli DNA (dsDNA) taşırken, tek iplikli DNA (ssDNA) ve tek iplikli RNA (ssRNA) içeren fajlar daha nadirdir. Bu farklılıklar, fajların replikasyon mekanizmalarını ve konak hücrelerle etkileşimlerini etkileyebilir. Morfolojik yapılarına göre ise bakteriyofajlar elektron mikroskobu altında kuyruk yapıları ve kapsid şekillerine göre tiplendirilirler. Bu gruplar arasında Miyovirüs morfolojisindekiler uzun, kasılabilir kuyruğa, Sifovirüs morfolojisindekiler uzun, kasılamayan kuyruğa ve Podovirüs morfolojisindekiler ise kısa kasılamayan kuyruğa sahiptirler [33]. Konak aralığı, bir fajın hangi bakteri türlerini enfekte edebildiğini ifade eder. Bazı fajlar yalnızca tek bir bakteri türüne özgüyken (dar konak aralığı), bazıları birden çok türü enfekte edebilir (geniş konak aralığı).

Fajlar, lizojenik ve litik döngüye ek olarak daha az bilinen psödolizojeni ve taşıyıcılı durum dahil olmak üzere farklı yaşam döngülerine sahiptirler. Psödolizojeni tanımı daha çok fajın konak genomuna entegre olmadığı veya litik döngüye de geçmediği inaktif fajlar için

kullanılsa da gerçek bir yaşam döngüsünü mü yoksa hücrenin azalan aktivitesinin bir sonucu mu olduğu net değildir [34, 35]. Antibiyotiklere karşı dirençli bakterilerle mücadelede umut vaat eden terapötik ajanlar olarak karşımıza çıkan litik fajlar ise konağın tüm kaynaklarını kullanarak çok sayıda faj partikülleri üretir ve bakteriyi lizize uğratarak dışarı çıkarlar. Ayrıca, biyoteknolojide gıda sanayisinde, tarımda patojen bakterilerin kontrolünde vs. sık sık kullanılabilmektedir [36, 37]. Genetik mühendisliğinde önemli araçlar olan ve gen transferi, modifikasyon işlemlerinde de rol oynayan lizojenik fajlar ise konak genomuna entegre olarak sessiz bir şekilde kalabilir [36]. Aynı zamanda konak hücrede plazmitler gibi çoğalıp horizontal olarak aktarılabilen ve faj-plazmit olarak da bilinen bazı ılıman fajların da varlığı bilinmektedir [38]. Bu aşamada profajlar, lizojenik döngü sırasında bakteriyel genomlara entegre olmuş genetik olarak sessiz bakteriyofaj DNA segmentleri olarak tanımlanır. Lizojen fazında profajlar aktif bir enfeksiyon gerçekleştirmez, ancak konak hücreyle birlikte replike olur ve genetik materyallerini nesilden nesile aktarabilirler. Bu durum, konak hücreye zarar vermeden faj genomunun korunmasını sağlar. Ancak çevresel stresler veya DNA hasarı gibi tetikleyici faktörler, profajın indüksiyonuna neden olabilir. Bu durumda profaj, litik döngüyü başlatarak viral partikül üretimine başlar ve sonuçta konağı parçalar [36].

Profajlar üzerlerinde çeşitli AMD genleri ve virülans genleri taşıyabilirler ve bakteriler arasında transfer edebilir. Profajların taşıdıkları önemli patojenite genlerinin, yatay gen transfer mekanizmaları ile bakteriler arasındaki aktarımı, bakterilerin adaptasyon ve virülans potansiyellerini etkileyebilir. Bakteriyel genomda latent olarak bulunan profajlar konak bakteriye yeni genetik materyal kazandırarak bakterilerin genetik çeşitlilikleri artırabilir ve/veya genotipik/fenotipik özelliklerini değiştirebilir [39]. Profajların varlığı, bakterilerin biyolojik ve metabolik karakterlerini büyük ölçüde etkilediğini gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bazı profajlar, bakterilere çevresel koşullara uyum sağlama, toksin üretimi veya antibiyotiklere direnç geliştirme gibi avantajlar kazandırabilir. Örneğin, difteri toksini üreten *Corynebacterium diphtheriae* veya kolera toksini üreten *Vibrio cholerae*, bu toksin genlerini profajlar tarafından kazanmışlardır [40]. Bu durum, bakteriyel patogeneizde profajların kritik role sahip olabileceğini göstermektedir. Bakteri genomlarının incelenmesi, profajların genetik çeşitlilik, evrimsel ve patojenik süreçlerdeki etkilerini daha iyi anlamamızı sağlayacaktır [5, 40].

1.3.2.1. Profaj indüksiyon mekanizmaları

Profaj indüksiyonu, bakteri genomuna entegre olan ılıman faj DNA veya RNA'sının konak bakterinin kromozomundan ayrılması, yeni faj partikülleri üretmesi ve konak hücreyi parçalayarak litik evreye geçmesini tanımlamaktadır. Bu değişim fajın çoğalması için önemli bir süreçtir. Ancak hem bakterinin hem de fajın hayatta kalabilmesi için çeşitli mekanizmalar ile kontrol edilir [41].

1.3.2.1.1. SOS-bağımlı profaj indüksiyon mekanizmaları

Profajların litik döngüye geçmesinin en iyi bilinen yolu, bakteriyel DNA hasar gördüğünde gerçekleşen bakteriyel SOS tepkisidir. Normalde, cI proteini represor görevine sahip olup hücre yıkımına neden olan profaj genlerini baskılayarak fajın bakteri genomuna entegre şekilde sessiz kalmasını sağlar. DNA hasarı oluştuğunda, RecA proteini aktive olur ve cI'nin parçalanmasına neden olur. Bu da litik genler üzerindeki engeli kaldırarak fajın çoğalmaya başlamasına ve sonunda konak hücreyi lizise uğratmasına olanak tanır. cI ve Cro gibi diğer proteinler arasındaki etkileşim, fajın hareketsiz kalmasına ya da aktif hale gelmesine karar verilmesine yardımcı olur. Konak faktörleri de bu dengenin korunmasına yardımcı olur. Böylece bu fajlar yalnızca stres koşulları altında aktive olur [42].

1.3.2.1.2. SOS-bağımsız profaj indüksiyon mekanizmaları

Profaj indüksiyonu, çevresel stres, hücresel metabolik koşullar ve spesifik genetik düzenleyici mekanizmalar gibi faktörler tarafından yönlendirilen klasik SOS yanıtından bağımsız olarak da gerçekleşebilir [43]. Bunlar;

- **Spontane indüksiyon:** Bazen profajlar belirgin bir neden olmadan kendiliğinden indüklenebilirler. Bu durum gen aktivitesindeki rastgele değişikliklerden kaynaklanmaktadır [44].
- **Isı ve iyonik stres ile indüksiyon:** Yüksek sıcaklık veya tuz gibi çevresel streslere maruziyet profajların indüksiyonuna neden olabilir. Örneğin bu dış faktörler ısı represör proteinlerinin dengesini bozabilir veya tuz konsantrasyonu hücrenin iyon dengesini değiştirerek profaj baskılamasını zayıflatabilir [45].

- **Poli-profajlı bakterilerde rekabet:** Genomunda birkaç profaj içeren bakteriler, her bir faj için farklı indüksiyon sinyallerine sahip olabilmektedir. Bazı profajlar DNA hasarına, diğerleri ise bakteriyel iletişim sinyallerine yanıt verebilir. Bu durum, profajların rekabet etmelerine veya koordine olmalarına, konakçılarına çok fazla zarar vermeden üreme şanslarını optimize etmelerine olanak tanır [41, 46].
- **CRISPR aracılı indüksiyon:** Profaj indüksiyonu için spesifik olarak cI veya C gibi represör genleri hedeflemek ve inhibe etmek için CRISPR yapıları kullanılır ve böylece fajın litik döngüye geçişi tetiklenir ve faj-konak etkileşimleri üzerinde hassas kontrol sağlanır [41, 46].
- **Metabolik Tetikleyiciler:** Profaj indüksiyonu bakteriyel metabolizma ve mevcut besinlerden etkilenebilir. Örneğin, amino asit açlığı, profaj aktivasyonunu tetikleyebilen stres tepkilerini aktive eder. Bazı bağırsak bakterileri, asetik asit gibi kısa zincirli yağ asitleri üretir ve bu da profajları indükleyebilir. Ek olarak, enfeksiyon sırasında bağışıklık hücreleri, patojenlerde profaj indüksiyonunu ve toksin üretimini uyarabilen hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerini serbest bırakır [41].
- **Quorum Sensing (QS):** Bakteriler, nüfus yoğunluğunu algılamalarına yardımcı olan bu sistem kimyasal sinyalleri kullanarak iletişim kurar. Bu sinyaller DNA hasarından bağımsız olarak profaj indüksiyonunu tetikleyebilir. Bazı profajlar yalnızca belirli QS sinyallerine yanıt vererek fajların yaşam döngülerini bakteri topluluğunun durumuyla koordine etmesine olanak tanır. Örneğin, *Bacillus subtilis* ve bazı *Vibrio* türlerinde, profaj aktivasyonu, QS yoluyla tespit edilen bakteri yoğunluğundaki değişikliklerle bağlantılıdır. Bu koordinasyon, fajların hareketsiz durumdan aktif duruma ne zaman geçeceklerine karar vermelerine yardımcı olur [47].
- **İlaçlar:** İlaçlar, özellikle de antibiyotikler, bakteriyel homeostaziyi bozabilir ve faj indüksiyonunu tetikleyebilir. Florokinolonlar, MitC ve beta-laktamlar gibi bazı antibiyotikler bakteriyel DNA'ya zarar verebilir veya replikasyonunu engelleyebilir. Bu SOS yanıtını aktive ederek LexA baskılayıcısının bozulmasına ve profajların

litik döngüye geçmesine neden olur. Bununla birlikte, DNA hasarı oluşturmada da profaj indüksiyonuna neden olan ilaçlar bulunmaktadır. Örneğin aminoglikozidler veya tetrasiklinler gibi antibiyotikler protein üretimine müdahale ederek hücrenin iç dengesini bozar ve metabolik strese neden olur. Polimiksinler gibi ilaçlar hücre zarına zarar vererek profaj aktivasyonuna yol açabilir. Bazı ilaçlar bakterilerin QS sistemini etkileyerek profaj indüksiyonuna yol açabilir. Bazı antibiyotikler reaktif oksijen türleri üreterek hücrede strese neden olur ve bu da SOS sistemini dahil etmeden profajları aktive edebilir [41, 48].

1.3.2.2. Profajların yatay gen transferindeki rolü

Karbapenemaz genleri, plazmit kodlu olmaları nedeniyle YGT ile bakteriler arasında hızla yayılabilmektedirler. Bu durum, direnç genlerinin farklı bakteriyel türler arasında transferini kolaylaştırmakta ve dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Ancak bir diğer önemli genetik araç olan profajların rolü tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu nedenle, profajların YGT'deki rollerinin anlaşılması, mikrobiyal genetiğin anlaşılması için altyapı oluşturacaktır. Profajlar hem klinik hem çevresel bakterilerde AMD genleri ve virülans faktörlerinin yayılmasında anahtar bir rol oynayabilirler. Profajlar, çeşitli stres faktörleri varlığında latent evreden çıkıp aktifleşir ve yeni faj partikülleri üretirler. Bu süreç ile fajlar taşıdıkları genetik materyali diğer bakteri hücrelerine aktarımı sonucu AMD genleri ve virülans faktörlerinin bakteriyel popülasyonlar arasında hızla yayılır. Genetik materyalin transferi sadece aynı tür bakteriler arasında değil, farklı türler arasında da gerçekleşebildiği bilinmektedir. Profajların da plazmitler gibi yatay gen transferi mekanizmalarıyla çeşitli direnç ve virülans genlerinin yayılımını hızlandırdığını aynı zamanda bakterilere toksin üretimi, adezyon ve invazyon kapasitesi kazandırabildiği, bulunduğu konağın genomundaki genlerinin ekspresyonu ve biyolojik özelliklerini etkileyebildiği bildirilmiştir [49-52]. Örneğin virülans faktörlerinin profaj aracılı transferini inceleyen bir çalışmada, *E.coli* suşlarının, profajlar aracılığıyla çeşitli direnç ve virülans genlerini aldığı ve bu sayede yüksek patojenite kazandığı belirtilmiştir [53, 54, 55, 56]. Bir başka çalışmada *E. coli* suşlarında bulunan profajların silinmesi sonucu konakçının biyofilm oluşturma ve olumsuz ortamlara karşı adaptasyon yeteneğini kaybettiği tespit edilmiştir [40]. Profajların bakteriyel uyumu üzerindeki etkisini çeşitli bakteri türlerinde incelendiği bir çalışmada; *Ralstonia solanacearum*'da ϕ RSM'nin entegrasyonu sonucu bakteriyel virülansın azaldığı tespit edilmiştir [50]. *Salmonella enterica* suşlarının, profajlar aracılığıyla antibiyotik direnç

genlerini aldığı ve bu genlerin farklı serotipler arasında yayıldığı gösterilmiştir [57]. *Streptococcus* spp. ve *Staphylococcus aureus* profajlarının toksin üretimi ve virülans genlerinin aktarılmasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir. *Streptococcus*'ta, vanG tipi vankomisin direnç lokusu ve oksazolidinon direnç geni *optrA* dahil olmak üzere 10 antimikrobiyal sınıfa direnç kazandıran profajların varlığı tespit edilmiş ve direnç genlerinin yayılımındaki önemi vurgulanmıştır [58]. *S.aureus*'ta profajların virülans, antibiyotik direnci ve bakteri evrimindeki rollerinin incelendiği bir çalışmada, virülans faktörlerini ve antibiyotik direnç genleri taşıyan binlerce profaj dizisi keşfedilmiş olup bu genlerin YGT mekanizmaları ile diğer bakteriyel taksonlara aktarılabilceği bildirilmiştir [52]. Başka çalışmada ise Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) endokarditinde yeni bir profaj ϕ SA169 varlığının vankomisin (VAN) tedavisini olumsuz yönde etkilediği ve bazı profajların antibiyotik direnç genleri taşıyabileceği ve bu durumun klinik açıdan önemli olduğu bildirilmiştir [59]. Profajların, bakteriler arasında AMD genleri ve virülans faktörlerinin yatay transferinde kritik bir rol oynadığı çeşitli çalışma verileriyle desteklenmektedir. Ancak KDKP izolatlarının kromozomlarında yer alan profajlar hakkında kapsamlı araştırma verisi bulunmamaktadır. Profajlar KDKP'ya metabolik avantaj sağlayacak özellikler veya virülans faktörleri (toksin üretimi, adezyon yetenekleri ve invazyon kapasitesi) gibi çeşitli avantajlar veya dezavantajlar sağlayabilir. Bu nedenle, KDKP genomunda bulunan profajların analiz edilmesi, YGT'deki rollerinin daha iyi anlaşılması, bakterinin genetik çeşitliliği ve potansiyel evrimsel sürecinin arka planını daha doğru yorumlanması için iyi bir alt yapı oluşturacaktır.

1.4. Profaj bölgelerinin biyoinformatik analizlerle bakteri genomunda gösterilmesi

Tüm genom dizileme teknolojilerinin gelişmesiyle birlikte bakteriyel genomlarda yer alan profaj bölgelerinin saptanması, karakterizasyonu ve karşılaştırmalı analizi mümkün hale gelmiştir. Profaj bölgelerinin in silico olarak tanımlanmasında çeşitli biyoinformatik araçlardan faydalanılmakta ve bu sayede fajların genom organizasyonu, kor (core) ve aksesuar gen içerikleri, modüler yapıları, evrimsel ilişkileri, taşıdıkları genlerin işlevsel özellikleri ile filogenetik konumları analiz edilebilmektedir. Profajların genom içindeki tanımlanması genellikle fajlara özgü ayırt edici yapısal ve fonksiyonel genlerin (örneğin integrase, kapsid, portal protein, kuyruk proteinleri vb.) varlığına, ayrıca bilinen faj dizileriyle olan benzerliklerine ve att (attachment) bölgelerinin lokalizasyonuna dayandırılmaktadır [4]. Bu amaçla en yaygın kullanılan araçlardan bazıları PHASTER,

PhiSpy, Prophage Hunter gibi yazılımlardır. PHASTER hem BLAST benzerlik skorlarına hem de yapısal gen varlığına göre profajların bütünlüğünü değerlendirerek bunları "intact", "questionable" ve "incomplete" gibi kategorilere ayırmakta; PhiSpy ise homolojiye ek olarak nükleotid kompozisyonu, kodlama yoğunluğu ve genetik çevre gibi özellikleri de göz önünde bulundurarak öngöründe bulunmaktadır. Prophage Hunter ise profajların potansiyel aktivitesini tahmin etmeye yönelik bir skorlandırma sistemi sunmaktadır. Sonuç olarak, bu araçlar sayesinde bakteriyel genomlardaki latent faj elementlerinin tespiti ve detaylı analizi mümkün olmakta; bu da hem temel mikrobiyoloji araştırmaları hem de uygulamalı alanlar (örneğin faj terapisi, antimikrobiyal direnç takibi) için önemli bir kaynak sunmaktadır. [60, 61, 62].

1.4.1. Pangenom Analizi

Tanımlanan tüm profajların gen içeriği, kapsamlı karşılaştırmalı genomik analizler ile değerlendirilmektedir. Bu amaçla, Roary, PPanGGOLiN veya Phage Orthologous Groups (POGs) gibi araçlar kullanılarak belirlenen profaj dizileri pangenomik analizlere tabi tutulmakta; böylece taşıdıkları genler çekirdek (core), aksesuar (accessory) ve benzersiz (unique) olmak üzere üç ana kategoriye ayrılmaktadır [63, 64]. Moleküler biyoloji ve genetik alanlarında, pan-genom, bir klad içindeki tüm suşlardan gelen tüm gen setini (core ve aksesuar genlerinin bütünü) içermektedir. Core Genler (%99-100 yaygın), tüm izolatlarda bulunan ortak genleri temsil etmektedir. Bu genler mikroorganizmanın temel biyolojik işlevlerini yerine getiren ve hayati fonksiyonları için gerekli/zorunlu olan genlerden oluşmaktadır (Hücresel metabolizma, protein sentezi vb.) Genel olarak, bir core genomun boyutu, pangenom üyeleri arasındaki filogenetik mesafenin artmasıyla azalmalıdır Aksesuar genler (%0-99), tüm izolatlarda bulunmayan, yalnızca bazı izolatlarda görülen genleri temsil etmektedir. Bunlar mikroorganizmaya popülasyon içerisindeki genetik çeşitliliği artıran ve adaptif özellikler kazandıran gen gruplarıdır (örneğin: antibiyotik direnci, virülans faktörleri). Aksesuar genler iki alt gruba ayrılır. Kabuk genler (%15-99, orta sık görülen genler) izolatların çoğunda mevcut olup hepsinde bulunmayan genlerdir. Aynı zamanda aksesuar genom olarak da bilinmektedir. Aksesuar genlerinin genom evriminde ve genom ve çevre arasındaki karmaşık etkileşimde önemli bir rol oynayan pangenom birimidir [65].

1.4.2. Profajların Genomik Organizasyonu ve Yapısal Anotasyonu

Profaj genomlarının yapısal ve işlevsel organizasyonunun analizinde çeşitli genom anotasyon ve görselleştirme araçları kullanılmaktadır. Prokka ve RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology), profaj dizilerinde yer alan genlerin otomatik olarak tanımlanmasında ve fonksiyonel anotasyonunda sıklıkla tercih edilen platformlardır. Anotasyon sonrasında elde edilen profaj genomları, Geneious, Easyfig veya Clinker gibi araçlar kullanılarak görselleştirilebilmekte ve bu sayede profajların yapısal düzeni, gen kümelenmeleri ve homolog bölgeleri karşılaştırmalı olarak incelenebilmektedir. Özellikle Clinker, homolog gen kümelerini hizalayarak görsel temsiller oluşturmakta; Easyfig ise genetik elementler arasındaki sentez ve homoloji ilişkilerini BLAST sonuçlarına dayalı olarak grafiksel olarak göstermektedir. Fonksiyonel anotasyon aşamasında ise gen ürünlerinin potansiyel görevleri, sıklıkla BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool for proteins) aracılığıyla bilinen protein veri tabanları ile karşılaştırılarak belirlenmektedir. Böylece korunan bölgeler, lizojeni, replikasyon, paketlenme gibi işlevsel bölgeler fonksiyonel anotasyon araçlarıyla belirlenmekte ve yapısal organizasyon ortaya konulmaktadır [66, 67, 68].

1.4.3. Genler arası mesafe

Genler arası mesafe faj genom organizasyonu, gen ekspresyonu ve evrimsel korunmuşluk açısından önemli biyolojik ipuçları verir. Kısa veya sıfır mesafe (overlapping/open reading frame çakışması) genlerin transkripsiyonel olarak birlikte düzenlendiğini ve birlikte evrim geçirdiğini (ko-transkripsiyon/operon) göstermektedir. Uzun mesafeler, transkripsiyonel regülasyonun veya farklı ekspresyon zamanlamasının işareti olabilir. Baş-boyun-kuyruk modülündeki genlerin sıkı organizasyonu ve kısa aralıklarla sıralanması, bu proteinlerin birlikte evrimleştiğini ve morfolojik çeşitliliğe rağmen korunmuş yapısal çözümler kullanıldığını gösterir [69]. Bu yaklaşım sayesinde çok sayıda düşük homoloji gösteren protein doğru şekilde sınıflandırılabilir.

1.4.4. Virülans ve Antimikrobiyal Direnç (AMR) Genlerinin taranması

Bakteriyel genomlarda yer alan virülans ve antimikrobiyal direnç (AMR) genlerinin in silico analizinde, güvenilir ve kütatörlü veri tabanlarını içeren çeşitli biyoinformatik araçlar kullanılmaktadır. VFDB (Virulence Factor Database), bilinen virülans genlerini; CARD ve ResFinder, antimikrobiyal direnç genlerini belirlemek amacıyla kullanılır.

PathogenFinder ise analiz edilen genomun insan patojeni olma olasılığını, özgül gen imzalarına dayalı olarak tahmin eder. Bu araçlar, bakteriyel suşların potansiyel patojenitesi ve tedaviye direnç profili hakkında bilgi edinilmesini sağlar. Bu araçlar, genomlarda yer alan klinik açıdan önemli genetik elemanların hızlı ve güvenilir şekilde saptanmasını sağlar [70, 71, 72, 73].

1.4.5. Anti-CRISPR ve İmmün Modülasyon Genlerinin Tespiti

Bu genlerin tespiti için Anti-CRISPRdb gibi veri tabanları kullanılarak BLAST tabanlı taramalar yapılmaktadır. Ayrıca, profajlar restriksiyon-modifikasyon sistemleri, toksin-antitoksin modülleri gibi immün modülasyon genleri de içerebilir. Bu genler, BLASTp, Pfam ve InterProScan gibi araçlarla fonksiyonel olarak tanımlanabilir. Bu analizler, profajların bağışıklık sistemlerinden kaçış mekanizmalarının anlaşılmasına katkı sağlar [74, 75].

1.4.6. Karşılaştırmalı Genomiks ve Evrimsel Analiz

Profajların evrimsel ilişkileri gen dizileri üzerinden filogenetik ağaçlarla incelenir. Daha karmaşık ilişkiler için, protein benzerliklerine dayanan vContact2 gibi ağ tabanlı araçlar kullanılır. Ayrıca, ANI, Mash ve ProteinOrtho gibi programlar intergenomik ve proteomik karşılaştırmalar yaparak profajların genetik yakınlığını belirler [76, 77, 78, 79]. Bu çalışmanın amacı, karbapenem antibiyotiklere karşı yüksek direnç gösteren *K. pneumoniae* izolatlarının bakteriyel kromozomuna entegre olan profajları geleneksel ve moleküler yöntemler ile tespit etmek ve tüm genom dizileme ve biyoinformatik analizler yoluyla genetik yapılarını ayrıntılı olarak karakterize etmektir. Profaj genomlarında bulunan virülans faktörleri, MGE'ler, regülatör proteinler ve potansiyel antibiyotik direnç genleri gibi fonksiyonel genler, konakçı bakterinin patojenitesi, çevresel adaptasyonu ve genetik evrimi üzerindeki olası etkilerini değerlendirmek için tanımlanacaktır. Çalışma sonunda elde edilen veriler ışığında antibiyotik direnci ve enfeksiyon kontrolü stratejilerinin geliştirilmesi, *K. pneumoniae* kaynaklı enfeksiyonların kontrolü için yeni tedavi hedeflerinin belirlenmesi için önemlidir. Ek olarak profajların genetik araç olarak kullanımı, bakteriyel genom mühendisliği ve direnç yönetimi açısından umut verici olabilir. Bu çalışma, karbapenem dirençli suşların genomik analizi, patojenin evrimsel süreçlerinde profajların rolünü anlamak ve tedavi yöntemlerine yaklaşımda yol gösterici olabilmesi için önemli bir katkı sunmaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Laboratuvarda Kullanılan Gereç ve Malzemeler

2.1.1. Gereçler

- EZ1 Advanced Otomatize DNA İzolasyon Cihazı (QIAGEN, Almanya)
- Oxford Nanopore PromethION Tüm genom sekans Cihazı (Oxford Nanopore Technologies, İngiltere)
- Etüv (Nüve, Türkiye)
- Pastör Fırını (Nüve, Türkiye)
- Isı Bloğu (Biosan, Türkiye)
- Santrifüj (Hettich, Almanya)
- Mikro Santrifuj (Isolab, Almanya)
- Otoklav (Hirayama, Japonya)
- Biyogüvenlik Kabini Lvl-2 (Heraeus, Almanya)
- Vorteks (Daihan, Güney Kore)
- Derin Dondurucu (Arçelik, Türkiye)
- Qubit 4 Florometre (Thermo Ficher Scientific, ABD)
- NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Hassas Terazı (Scaltec, ABD)
- Su Banyosu (Mettler, Almanya)
- Otomatik Pipet Seti 0,5-10; 20-200; 100-1000 µl (Eppendorf, Almanya)
- Steril CA Şırınga Filtresi, Por 0.22 µm, Housing (Isolab, Almanya)
- Steril CA Şırınga Filtresi, Por 0.45 µm, (Isolab, Almanya)
- Balon Joje
- Steril Filtreli Pipet Ucu 10;200;1000;10000 µl (Eppendorf, Almanya)
- Petri Kabı (Fıratmed, Türkiye)
- Steril Plastik Öze (Microcult, Türkiye)
- Steril Pamuk Uçlu Eküvyon
- Mikrosantrifüj Tüp 1,5 ml (Microcult, Türkiye)

- Falkon Tüpü (15 ml, 50 ml) (Isolab, Türkiye)
- Cam Deney Tüpü 16x100 mm
- UV lamba

2.1.2. Besiyerleri, Kimyasallar ve Kitler

- Eozin Metilen Blue Agar (Condalab, İspanya)
- Tryptic Soy Broth, (Condalab, İspanya)
- Tryptic Soy Agar (Condalab, İspanya)
- Luria Broth (Condalab, İspanya)
- Agar Agar (Condalab, İspanya)
- Skim-Milk Besiyeri (BD Difco, ABD)
- %5 Koyun Kanlı Agar (Or-Bak, Türkiye)
- Levofloksasin (Sigma-Aldrich, ABD)
- Siprofloksasin (AppliChem, Almanya)
- *Mitomycin-C* (Adooq-bioscience, US & Canada)
- MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) (AppliChem, Almanya)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) tamponu (Sigma-Aldrich, ABD)
- Kloroform (Isolab chemicals, Türkiye)
- Fenol-Kloroform-İzoamil Alkol (25:24:1) (İnterlab, Türkiye)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Merck, US & Canada)
- Proteinaz K (Sigma-Aldrich, ABD)
- Tris-EDTA tamponu (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)
- Sodyum klorür, Magnezyum sülfat (SM) tamponu (0.1 M NaCl, 1 mM MgSO₄, 0.2 M Tris-HCl, pH 7.5)
- The EZ1&2 Virus Mini Kit v2.0 (QIAGEN, Almanya)
- Ligation sequencing gDNA- Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24) (Oxford Nanopore Technologies, İngiltere)
- Ligation sequencing gDNA- Native Barcoding Kit 96 V14 (SQK-NBD114.96) (Oxford Nanopore Technologies, İngiltere)
- Qubit dsDNA HS Assay Kit (Oxford Nanopore Technologies, İngiltere)

- Dnaz (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Sodyum asetat
- İzopropil Alkol (Merck, US & Canada)
- Etanol (Merck, US & Canada)
- Nükleaz-free water (Thermo Fisher Scientific, ABD)

2.2. *Klebsiella pneumoniae* İzolatları

2.2.1. İzolatların seçilmesi ve saf kültürü elde etme

- -80°C'de skim-milk içerisinde stoklanan bakteri suşlarından, EMB veya kanlı agar plaklarına ekim yapıldı ve 37°C'de 1 gece inkübe edildi.
- Ertesi gün EMB agarda laktoz pozitif koloniler ve kanlı agarda mukoid kolonilerden tek koloni alınarak Luria-Bertani (LB) besiyerine ekimi yapılarak 37°C'de inkübe edildi.

2.3. Bakteriyofaj İndüksiyonu

2.3.1. Mitomisin C ile profajların indüksiyonu

- *Klebsiella pneumoniae* suşları bir gece boyunca 37°C'de çalkalanarak (180 rpm) inkübe edildi ve daha sonra 15 mL Luria-Bertani (LB) broth'a inoküle edildi.
- Kùltürler OD₆₀₀: 0,5'e ulaşınca kadar inkübe edildi.
- Ardından 0.5-10 µg/mL değişen konsantrasyonlarda *MitC* eklendi ve kùltürler 6, 8 ve 18 saat boyunca inkübe edildi ve bakteri bulanıklığı ölçüldü.
- Hücre kalıntıları 3.500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant 0,22 µm filtre ile filtrelendi.
- Nihai konsantrasyon 0.5 M olacak şekilde NaCl eklendikten sonra süspansiyonlar karıştırıldı ve 1 saat boyunca buz üzerinde bırakıldı.
- Ardından süspansiyonlar 4°C'de 40 dakika boyunca 3.500 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatantlar steril tüplere toplandı ve +4°C'de bir gecelik inkübasyona bırakıldı.
- Ertesi gün + 4°C'de 40 dakika 3.500 rpm'de santrifüj edildi ve SM tamponunda (0.1 M NaCl, 1 mM MgSO₄, 0.2 M Tris-HCl, pH 7.5) yeniden süspanse edildi.

- Faj lizatından 100 µl alınarak 900 µl TSB içeren santrifüj tüplerinde seri dilüsyonu yapıldı.
- 100 µl 1 mf taze bakteri süspansiyonu, seyreltilen 100 µl faj lizatı ve 4 ml soft agar cam tüp içerisinde karıştırılıp TSA plağına dökülerek katılaşması için beklendi ve sonrasında plaklar gece boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldı ve ertesi gün agar üzerindeki liziz zonları incelendi [49].

2.3.2. Antibiyotik ile profajların indüksiyonu

- 0.01g levofloksasin ve siprofloksasin antibiyotikleri 1 ml steril distile su içerisinde çözdürüldü.
- Gecelik bakteri süspansiyonları 8000g'de 10 dk boyunca santrifüj edildi.
- Pelet, steril 10 ml TSB ile çözdürüldükten sonra içerisinde 1ml alınıp 5 ml TSB içeren 4 yeni falkona aktarıldı.
- OD₆₂₀: 0.1 olana kadar 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası bakteri süspansiyonu içeren farklı falkon tüplere 125 µl levofloksasin, 125 µl siprofloksasin, 50 µl 0.5 µg/ml MitC ve 3 ajan bir arada eklenerek 37°C'de 4 saat boyunca inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası 3000g 15 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant 0,22 µm filtre ile filtrelip 15 ml'lik steril falkona aktarıldı ve spot test yapıldı [49].

2.3.3. UV ile profaj indüksiyonu

- UV ile profaj indüksiyonu için bazı modifikasyonlar yapıldı.
- Gecelik bakteri süspansiyonlarından 100 µl alınıp taze 5ml TSB içeren falkona aktarıldı.
- 37°C'de 3 saat inkübe edildikten sonra 6000g 10 dk oda ısısında santrifüj edildi.
- Pelet 5 ml steril 0.1M ile çözdürülüp steril petriye aktarıldı.
- Petri 120 rpm'de ve UV ışıktan 16 cm uzakta olacak şekilde yerleştirildi.
- Petri 20-30 sn UV ışık altında bekletildikten sonra süspansiyon 5 ml TSB içeren falkon tüpe aktarıldı.
- Su banyosunda 6 saat 37°C'de 254 nm UV'den uzakta inkübe edildi ve süre sonunda lizat 3000g 12 dk 4°C'de santrifüj edildi.
- Süpernatant pH:7'ye ayarlandı ve spot test yapıldı.

- İnkübasyonun ardından fajın damlatıldığı bölgede bakteri üremesinin baskılandığı bir liziz zonunun varlığı arandı. Faj duyarlılığı, fajların damlatıldığı bölgede liziz tipine göre liziz bölgeleri tamamen berrak, yarı berrak ve opak olarak değerlendirildi. Liziz bölgesi olmayan bakteri izolatları uygulanan faja dirençli olarak değerlendirildi [80].

2.3.4. H₂O₂ ile profaj indüksiyonu

- Bakteri suşları, 130 rpm çalkalama ile 37°C'de LB ortamında bir gece inkübasyona bırakıldı.
- Ertesi gün, gecelik bakteri kültür LB ortamında 1:100 oranında seyreltildi ve OD₆₀₀ =0.1~0.15 olana kadar inkübe edildi.
- Bakteri süspansiyonuna 3 mM H₂O₂ eklendi ve kültürler 4 saat boyunca çalkalanarak inkübe edildi [81].

2.3.5. MTT ile faj plaklarının görünürlüğünün arttırılması

- Soft agara, nihai konsantrasyonu 0.005% (w/v) olacak şekilde MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) eklendi.
- *Double-Layer*” (DL) metodu; 4 ml LB soft agara (55°C) 100 µl faj solüsyonu (her bir dilüsyondan ayrı ayrı) ve 100 µl bakteri solüsyonu eklenerek TSA üzerine dökülüp donmaya bırakılarak yapıldı.
- İnkübasyon süresi sonunda agar üzerindeki bakteri hücreleri mavi-mor tonlarında görülürken faj plakları renksiz olarak görüldü. [82]

2.4. İndüksiyon işlemi sonrasında profajların tüm genom sekanslama ve biyoinformatik analizi

2.4.1. Bakteriyofaj DNA izolasyonu

- Faj süspansiyonu, indüksiyon protokolleri sonrası 0,22 µm filtre ile filtrelendi.
- Faj DNA izolasyonu fenol:kloroform:izoamilalkol (FCIA) (25:24:1) yöntemi kullanılarak yapıldı.
- 1 ml faj süspansiyonu 15000 rpm’de 99 dk boyunca santrifüj edildi.
- Alt fazdan 500 µl alınıp yeni santrifüj tüpüne aktarıldı.

- Üzerine 1.25 µl (20 mg/µl) Dnaz eklenerek 37°C'de 30 dk boyunca inkübe edildi.
- Süre sonunda 1.25 µl proteinaz K (20 mg/µl), 25 µl %10 SDS ve 20 µl 0.5M EDTA pH:8.0 eklenerek 56°C'de 2 saat inkübe edildi.
- Süre sonunda eşit hacimde fenol/kloroform/izoamil alkol (25:24:1) ilave edildi ve 12.000g'de ve 4°C'de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Bu adım 2 kez tekrarlandı.
- Süre sonunda süpernatantın üst fazı yeni santrifüj tüpüne aktarıldı.
- Üzerine 40 µl 3M sodyum asetat ve 400 µl isoproponil eklenerek 30 dk boyunca buz üzerinde inkübe edildi.
- Süre sonunda 15000g'de 30 dk santrifül edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pelete %70'lik 500 µl etanol eklendi, vortekslendi ve 12000 rpm de 10 dk boyunca santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldı pelet ise havayla kurumaya bırakıldı.
- Pelet tamamen kuruduktan sonra üzerine 50 µl nükleaz-free water eklendi.
- DNA kalitesi ve miktarı, Qubit 4 Fluorometer kullanılarak Qubit dsDNA HS Assay Kit ile ölçüldü.
- DNA saflığı ayrıca NanoDrop 2000 spektrofotometresi ile değerlendirildi.
- DNA örneklerinde A260/A280 oranı 1,8–2,0 aralığında olanlar saf kabul edildi ve kütüphane hazırlığına dahil edildi.
- DNA örnekleri kullanılana kadar -20°C'de saklandı.
- Örnekler, 100 µl TE tamponunda (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) yeniden süspanse edildi ve analizden önce +4 °C'de saklandı [83].

2.4.2. Tüm genom sekanslama

- Profajların tüm genom sekanslama işlemi Oxford Nanopore PromethION cihazı ile yapıldı.
- Bunun için; Barkodlama işlemi, her örneğin ayrı ayrı tanımlanabilmesi amacıyla native barcoding yöntemi ile yapıldı.
- Barkodlama işlemi Ligation sequencing gDNA- Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24) (Oxford Nanopore Technologies, İngiltere) ile yapıldı.
- Bu kapsamda, her DNA örneği uygun barkod ile işaretlendikten sonra ligasyon reaksiyonu uygulandı.

- Ligasyon işlemi sırasında, DNA uçlarına adaptörler eklenerek Nanopore cihazının okuma yapabileceği yapılar elde edildi.
- Barkodlanmış örnekler daha sonra eşit miktarda olacak şekilde havuzlandı.
- Kütüphane hazırlığı sonrası, oluşturulan kütüphanenin toplam DNA konsantrasyonu tekrar ölçülerek en az 20–50 ng/μl olacak şekilde ayarlandı. Bu değerin altında kalan kütüphaneler cihaz yüklemesine dahil edilmedi.
- Kütüphane hazırlığı öncesinde ve sonrasında örneklerin DNA kalitesi ve miktarı, Qubit 4 Fluorometer kullanılarak Qubit dsDNA HS Assay Kit ile ölçüldü.
- DNA saflığı ayrıca NanoDrop 2000 spektrofotometrik olarak değerlendirildi.
- DNA örneklerinde A260/A280 oranı 1,8–2,0 aralığında olanlar saf kabul edildi ve dizileme işlemine tabi tutuldu.
- Profaj dizileri flye (versiyon 2.9.4-b1799) ile DeNovo assembly işlemi yapıldı. Kalite skorları $Q \geq 20$ ve üzeri olarak belirlendi.
- Elde edilen FASTA dosyaları ile Blastn yapıldı.

2.4.3. Biyoinformatik analiz

- PHASTEST ile her bir profaj dizisi in silico olarak tespit edildi. Sadece program tarafından sağlam olarak (puan > 90) tanımlanan ılıman bakteriyofajlar analiz için kullanıldı [84].
- Tüm profaj genomik dizileri, RGI ve ResFinder 4.1 veritabanı kullanılarak antibiyotik direnç genlerini tanımlamak için kullanıldı. [85, 86].
- Belirlenen Profaj dizileri VirulenceFinder 2.0, The Virulence Factor Database (VFDB) kullanılarak virülans genlerinin varlığı açısından tarandı [87, 88].
- AcrFinder ile profajların genomlarında kodlanan Anti-CRISPR proteinlerin tespiti yapıldı [89].
- Profajların tRNA varlığı tRNAscan-SE v. 2.0 ile tarandı [90].
- Fajların yaşam döngüleri, PhaBOX ile tahmin edildi [91].
- Sağlam fajlarının çekirdek ve pan genomu, Roary (versiyon 3.13) kullanılarak, çekirdek genom ayarları olarak profaj sağlam genomlarının en az %99'unda mevcut olan genler, minimum BLASTp yüzdesi özdeşliği kullanılarak belirlendi [92].
- Tanımlanan profajlar, yapısal baş-boyun-kuyruk proteinlerine göre in silico olarak VIRFAM kullanılarak sınıflandırıldı [93].

- ACLAME veritabanı kullanılarak, fajlara ait korunmuş bölgeler genom organizasyonuna dayanarak belirlendi ve bu süreçte korunmuş bölgeler ile izin verilen genler arası mesafe aralıkları tanımlandı [94].
- VIRIDIC ile fajların virüsler arası intergenomik benzerlikleri hesaplandı [95].
- ViPTree ile profajların viral genom dizileri 5648 faj dizisi kullanılarak tBLASTx tarafından hesaplanan dizi benzerliklerine dayalı bir "*proteomik ağaç*" oluşturuldu [96].
- İPGA, faj genomlarını analiz etmek, karşılaştırmak ve görselleştirmek için kullanıldı. Pan-genom profillerinin güvenilirliğinin değerlendirmesi için mevcut bir skor sistemi kullanıldı [97].
- MEGA 12.0 yazılımında, maksimum olasılık yöntemi ile filogenetik analizi yapıldı [98].

2.5. Bakteri Tüm genom sekanslama / Biyoinformatik Analizi

2.5.1. Bakteri DNA izolasyonu

- KDKP izolatlarının DNA izolasyonları EZ1 Advanced cihazı ve The EZ1&2 DNA FFPE Kit kullanılarak üretici firmanın direktiflerine göre gerçekleştirdi.
- Bakteri kültürleri kanlı agar plaklarına ekildi ve 1 gece 37 °C'de inkübe edildi.
- Ertesi gün her izolat için tek koloni alınarak EZ1&2 Virus Mini Kit v2.0 ile DNA izolasyonları üretici firma direktifleri takip edilerek yapıldı. Cihazın 4. bölmesine yerleştiren 2 ml santrifüj tüpleri içerisine steril PBS ile süspanse edilmiş bakteri koloni eklendi. Cihazın 3. bölmesine yerleştirilen 1.5 ml santrifüj tüpleri içerisine 56 µl buffer ve 4 µl carrier RNA eklendi. Cihazın 2. bölmesine pipet ve uçları yerleştirildi. Cihazın 1. bölmesine 1.5 ml boş santrifüj tüpleri yerleştirilerek cihaz çalıştırıldı ve DNA izolasyonu yapıldı.
- DNA kalitesi ve miktarı, Qubit 4 Fluorometer kullanılarak Qubit dsDNA HS Assay Kit ile ölçüldü. DNA saflığı ayrıca NanoDrop 2000 ile ölçüldü.
- DNA örneklerinde A260/A280 oranı 1.8–2.0 aralığında olanlar saf kabul edildi ve kütüphane hazırlığına dahil edildi.

2.5.2. Tüm genom sekanslama

- *K. pneumoniae* izolatlarının tüm genom sekanslama işlemi Oxford Nanopore PromethION cihazı ile yapıldı.
- Barkodlama işlemi Ligation sequencing gDNA- Native Barcoding Kit 24 V14 ile yapıldı.
- Barkodlama işlemi, her örneğin ayrı ayrı tanımlanabilmesi amacıyla native barcoding yöntemi ile yapıldı.
- Bu kapsamda, her DNA örneği uygun barkod ile işaretlendikten sonra ligasyon reaksiyonu uygulandı.
- Ligasyon işlemi sırasında, DNA uçlarına adaptörler eklenerek Nanopore cihazının okuma yapabileceği yapılar elde edildi.
- Barkodlanmış örnekler daha sonra eşit miktarda olacak şekilde havuzlandı.
- Kütüphane hazırlığı sonrası, oluşturulan kütüphanenin toplam DNA konsantrasyonu tekrar ölçülerek en az 20–50 ng/μl olacak şekilde ayarlandı. Bu değerin altında kalan kütüphaneler işleme dahil edilmedi.
- Kütüphane hazırlığı öncesinde ve sonrasında örneklerin DNA kalitesi ve miktarı, Qubit 4 Fluorometer kullanılarak Qubit dsDNA HS Assay Kit ile ölçüldü.
- DNA saflığı ayrıca NanoDrop 2000 spektrofotometresiyle değerlendirildi.
- DNA örneklerinde A260/A280 oranı 1.8–2.0 aralığında olanlar saf kabul edildi ve kütüphane hazırlığına dahil edildi.
- Bakteri tüm genom dizileri flye (versiyon 2.9.4-b1799) ile DeNovo assembly işlemi yapıldı.
- Elde edilen FASTA dosyaları ile Blastn yapıldı.

2.5.3. Biyoinformatik analiz

- Bakteri izolatlarının kapsül tipi ve MLST tipleri MLST 2.0 ile belirlendi [99].
- Bakteri izolatlarının plazmit dizileri PlasmidFinder ile tespit edildi [100].
- Bakteri genom analizinde, indüklenen fajların varlığını doğrulamak amacıyla PHASTEST aracı kullanıldı; analiz sonuçları karşılaştırılarak faj bölgeleri eşleştirildi, kromozoma entegre oldukları lokasyonlar belirlendi ve bu bölgelerin doğruluğu teyit

edildi. Sadece program tarafından süpheli ve sağlam olarak (puan> 70) tanımlanan ılıman bakteriyofajlar analize dahil edildi [84].

- Tüm profaj genomik dizileri, RGI ve ResFinder 4.1 veritabanı kullanılarak antibiyotik direnç genleri tanımlamak için kullanıldı [85, 86].
- Profaj dizileri VirulenceFinder 2.0 kullanılarak virülans genleri açısından tarandı [87, 88].
- Phandango ile profajların pangenom dağılımı görselleştirildi [101].
- AcrFinder ile profajların genomlarında kodlanan Anti-CRISPR proteinlerin tespiti yapıldı [89].
- Profajların tRNA varlığı tRNAscan-SE v. 2.0 ile tarandı [90].
- Fajların yaşam döngüleri, PhaBOX ile tahmin edildi [91].
- Sağlam fajların çekirdek ve pan genomları Roary (versiyon 3.13) kullanılarak belirlendi [92].
- Proksee ile profajların dairesel genom haritalarının görselleştirmesi yapıldı [102].
- Clinker ile profajların gen kümelerinin karşılaştırmalı analizi yapıldı [103].
- Tanımlanan profajlar, VIRFAM ile faj genomlarındaki baş-boyun-kuyruk modül genlerini tespit edildi ve bakteriyofajların yakın olduğu protein aileleri ve uzak homologları belirlendi [93].
- ACLAME veri tabanının fajlarının çoğu arasında gözlemlenen korunmuş genom organizasyonu, izin verilen genler arası mesafe aralıklarını tanımlamak için kullanıldı [94].
- VIRIDIC ile virüsler arası intergenomik benzerlikleri hesaplandı [95].
- ViPTree ile profajların viral genom dizileri 5648 faj dizisi ile tBLASTx tarafından hesaplanan dizi benzerliklerine dayalı bir "*proteomik ağacı*" oluşturuldu [96].
- İPGA, faj genomları analiz etmek, karşılaştırmak ve görselleştirmek için kullanıldı. Pan-genom profillerinin güvenilirliğinin değerlendirmesi için bir skor sistemi mevcuttur [97].
- Filogenetik analiz MEGA 12.0 yazılımında eşit bir önyükleme ile maksimum olasılık yöntemi ile yapıldı [98]

Faj genomları, GenBank sistemine anotasyonları yapılarak yüklendi. Accession numberları; PV833090, PV833093, PV833094, PV833091, PV833092, PV833095, PV856204, PV856205, PV856206, PV856207, PV856208, PV856209, PV856210, PV856211, PV856212, PV856213'tür.

3. BULGULAR

Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan karbapenem dirençli olarak tanımlanan 20 adet *K. pneumoniae* izolatı çalışmaya dahil edilmiş, farklı sekans tipi belirlenen 4 izolat tüm genom sekansına seçilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 20 izolat profaj izolasyonu için UV, *MitC* ve levofloksasin ve siprofloksasin antibiyotikleri ile indüksiyon işlemlerine tabi tutulmuş ancak geleneksel yöntemler ile profaj indüksiyonu plak yöntemi ile gösterilememiştir. 20 izolattan hiçbirinde DL tekniğiyle plak formasyonu gözlenmemiştir. Bu sebeple MTT ile agar üzerindeki faj plaklarının görünürlüğü artırılmaya çalışılmıştır. MTT işlemi sonrası agar üzerinde plaklar gözlemlenmiş ancak pürifikasyon işlemi için yeterli miktarda izole edilememiştir. Bu nedenle 4 adet *K. pneumoniae* izolatına tüm genom sekanslama yapılmış böylece genomda bulunan profajların varlığı *in silico* olarak karakterize edilmiştir. Kromozom üzerinde 4 izolatta toplam 19 adet profaj dizisi tespit edilmiştir. Bu 4 izolata farklı genomik karakterizasyona sahip daha önceki çalışmalarımızda izole edilip karakterize edilen litik fajlarla yeniden indüksiyon işlemi yapılmış ve tüm genom analizine alınmış böylece farklı contigler olarak saptanan 13 adet profajın indüklendiği *in silico* yöntemler ile doğrulanmıştır. Buna göre elde edilen verilerle belirlenen 19 adet profaj dizisinin hepsi konak kromozomuna entegre olarak bulunmuştur. Profajlar, bakteriyel genomlar üzerindeki profaj bölgelerini üç kategoride sınıflandırarak değerlendirilmiştir; *tam* (profaj bölgesi bilinen bir fajın tüm genlerini içeren), *kısmi* (profaj bölgesi %50'den daha az fajla ilişkili gen içeren) ve *şüpheli* (belirlenen dizideki genlerin %50'sinden fazlası fajla ilişkili). Bu kriterlere göre bunlardan 14'ü “*tam*”, 2 tanesi “*şüpheli*” ve 3 tanesi ise “*kısmi*”, olarak tanımlanmıştır. Kısmi olan profajlar düşük skordan dolayı değerlendirme dışı bırakılmıştır. Tüm genom analizi yapılan KDKP izolatlarının genomlarına entegre olan toplam 16 profajın genomik karakterizasyonu biyoinformatik düzeyde detaylı olarak yapılmıştır.

3.1. Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* İzolat Profili

Başkent Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan ÇİD olarak tanımlanan KP1, KP2, KP3, KP4 kodlu *K. pneumoniae* izolatlarının hepsi karbapeneme dirençlidir.

Doku kültüründen izole edilen KP1'in tüm genom sekanslama verilerine göre genom boyutu 5.289,943 bp uzunluğunda olup MLST tipi 985, kapsül tipi K39 olarak belirlenmiştir. Kromozom üzerinde çeşitli antibiyotik sınıflarına etki eden direnç genleri ve virülans genleri bulunmaktadır. Kromozom üzerinde çeşitli antibiyotik sınıflarına etki eden direnç genleri ve virülans genleri Tablo 2'de özetlendiği gibidir. İzolata ait 3 adet plazmit tipi tespit edilmiş olup bu veriler Tablo 3'te verilmiştir.

Kan kültüründen izole edilen KP2 izolatının genom boyutu 5.480,194 bp uzunluğunda olup MLST tipi 101, kapsül tipi K17 olarak belirlenmiştir. Kromozom üzerinde çeşitli antibiyotik sınıflarına etki eden direnç ve virülans genleri bulunmakta olup ilgili veriler Tablo 2'de verilmiştir. İzolata ait 5 adet plazmit tipi tespit edilmiş olup bu veriler Tablo 3'te verilmiştir.

Kan kültüründen izole edilen KP3 izolatının genom boyutu 5.346,852 bp uzunluğunda olup MLST tipi 307, kapsül tipi KL102, KL149, KL155 olarak belirlenmiştir. Kromozom üzerinde çeşitli antibiyotik sınıflarına etki eden direnç ve virülans genleri ile ilgili veriler Tablo 2'de verilmiştir. İzolata ait 3 adet plazmit tipi tespit edilmiş ve ilgili veriler Tablo 3'te verilmiştir.

Balgam örneğinden izole edilen KP4 izolatının genom boyutu 5.315,558 bp uzunluğunda olup MLST tipi 2096, Kapsül tipi K14.K64 olarak belirlenmiştir. Kromozom üzerinde çeşitli antibiyotik sınıflarına etki eden direnç genleri ve virülans genleri Tablo 2'de özetlendiği gibidir. İzolata ait 4 adet plazmit tipi tespit edilmiş ve ilgili veriler Tablo 3'te verilmiştir. Böylece farklı sekans ve kapsüller tiplere ait farklı suşların genomunda taşınan profajların analizi yapılmıştır.

Tablo 2. *K. pneumoniae* izolatlarının genom özellikleri, sekans tipleri, kapsül tipleri, antimikrobiyal direnç ve virülans genleri.

	İzolat		AMR	Antibiyotik sınıfı	Virülans
KP1	bp	5.289,943	aac(3)-Ile, aac(6')-Ib-cr5 aph(3'')-Ib aph(6)-Id	Aminoglikozid	papA, ipaH, KPK_RS2863, ibeB
	%GC	57.4	qnrB1 oqxA oqxB25 aac(6')-Ib-cr5	Florokinolon	
	MLST	985	blaCTX-M-15 blaOXA-1 blaOXA-48 blaSHV-187 blaTEM-1	Beta-laktam	
	Kapsül tipi	K39	catB3	Kloramfenikol	
			dfrA14	Trimetoprim	
			fosA	Fosfomisin	
			sul2	Sülfonamid	

Tablo 2. Devamı *K. pneumoniae* izolatlarının genom özellikleri, sekans tipleri, kapsül tipleri, antimikrobiyal direnç ve virülans genleri.

KP2	bp	5.480,194	aac(3)-IIe, aac(6')-Ib, aadA1 aadA1 aadA2	Aminoglikozid	agn43
			blaOXA-9 blaSHV-1 blaTEM-1 ompK36_D135DG D	Beta-laktam	
			cmlA1, oqx A, oqx B20	Kloramfenikol	
	%GC	57.1	dfrA14	Trimetoprim	
			floR	Fenikol	
			fosA	Fosfomisin	
	MLST	101	gyrA_D87N, gyrA_S83Y, oqx A, oqx B20, parC_S80I	Florokinolon	
			mgrB_Q30STOP	Polimiksin	
			mph(A)	Makrolid	
	Kapsül Tipi	K17	sul3	Sülfonamid	
			tet(D)	Tetrasiklin	
			qacL	Antiseptik ve Dezenfektan	

Tablo 2. Devamı *K. pneumoniae* izolatlarının genom özellikleri, sekans tipleri, kapsül tipleri, antimikrobiyal direnç ve virülans genleri.

KP3	bp	5.346,852	aac(3)-Ile, aac(6')-Ib-cr5 aph(3'')-Ib, aph(6)-Id,	Aminoglikozid	papA, ipaH, tssM, t ssH/clpV1, ibeB, clpV1, wcaJ, hasD, fepC, irp1 KPK_RS2863 5 clpV
			aac(6')-Ib-cr5 gyrA_S83I oqx A, oxqB parC_S80I qnrB1	Florokinolon	
	%GC	57.4	blaCTX-M-15, blaOXA-1 blaOXA-48 blaSHV-28 blaTEM-1 ompK36_D135 DGD	Beta-laktam	
			catB3 oxqA oxqB	Kloramfenikol	
			dfrA14	Trimetoprim	
	MLST	307	fosA	Fosfomisin	
			sul2	Sülfonamid	
	Kapsül Tipi	KL102, KL155, KL149	tet(A)	Tetrasiklin	

Tablo 2. Devamı *K. pneumoniae* izolatlarının genom özellikleri, sekans tipleri, kapsül tipleri, antimikrobiyal direnç ve virülans genleri.

KP4	bp	5.315,558	aac(6')-Ib-cr5 aadA2 armA	Aminoglikozid	iutA, iucC iucA KPK_RS28635 tssM wcaJ papA
			aac(6')-Ib-cr5 gyrA_S83Y gyrA_D87G oqxA oqxB parC_S80I	Florokinolon	
	%GC	57.5	blaOXA-1 blaOXA-232 blaSHV-28 ompK36_D135DG D	Beta-laktam	
			mph(E)	Makrolid	
	MLST	2096	catB3 oqxA oqxB	Kloramfenikol	
			dfrA1 dfrA12 dfrA14	Trimetoprim	
			fosA	Fosfomisin	
	Kapsül Tipi	K14.K64	sat2	Streptogramin	
			sul1	Sülfonamid	
			qacEdelta1	Antiseptik ve Dezenfektan	

3.2. Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* Plazmitleri

Bakteri izolatlarında farklı sayı ve özellikte birçok plazmit tespit edilmiştir. Tespit edilen plazmit replikon tiplerinden bazılarının birkaç izolatta taşındığı görülmüştür. Buna göre IncFIB(K), replikon tipi KP1, KP3 ve KP4; IncFII(K), IncL replikon tipi ise KP1 ve KP3 izolatlarında saptanmıştır. Col440II, ColRNAI, IncFIA(HI1), IncR repB(R1701) replikon tipleri sadece KP2 izolatında; ColKP3 replikon tipi sadece KP3 izolatında ve IncHI1B replikon tipi ise sadece KP4 izolatında saptanmış olup saptanan replikon tiplerine ilişkin analiz tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. *K. pneumoniae* izolatlarında saptanan plazmitler (replikon tipleri)

İzolat No	Replikon tipi	% Benzerlik	Sorgu/kalıp Uzunluğu	Contig	Contigdeki konum
KP1	IncFIB(K)	98.75	560 / 560	contig_4	109256..109815
	IncFII(K)	97.3	148 / 148	contig_4	51820..51967
	IncL/M	100	661 / 661	contig_3	49041..49701
KP2	Col440II	99.29	282 / 282	contig_12	317..598
	ColRNAI	96.95	131 / 130	contig_13	8158..8288
	IncFIA(HI1)	98.45	387 / 388	contig_6	4840..5226
	IncR	100	251 / 251	contig_7	5992..6242
	repB(R1701)	99.2	623 / 623	contig_6	20029..20651
KP3	IncFIB(K)	98.93	560 / 560	contig_16	84409..84968
	IncFII(K)	95.95	148 / 148	contig_16	150773..150920
	IncL/M	100	661 / 661	contig_15	50462..51122
	repFIB	99.1	443 / 443	contig_18	188197..188639
	repHI5B	97.18	568 / 568	contig_18	39720..40287
KP4	ColKP3	100	280 / 280	contig_8	4822..5101
	IncFIB(K)	100	560 / 560	contig_7	34385..3494
	IncFIB	99.54	439 / 439	contig_5	226591..227029
	IncHI1B	100	570 / 570	contig_5	24162..24731

3.2.1. Plazmitler üzerinde kodlanan antimikrobiyal direnç ve virülans genleri

ST985 KP1 izolatında, ST307 KP3 izolatında ve ST2096 KP4 izolatında IncFIB(K) replikon tipi bulunmaktadır. ST985 KP1 izolatında ve ST307 KP3 izolatında IncFII(K) replikon tipi ve ST101 KP2 izolatında IncFIA(HI1) replikon tipi bulunmaktadır. KP1 izolatu için tespit edilen plazmit tipleri; IncFIB(K), IncFII(K), IncL olup IncFII(K) plazmiti üzerinde çeşitli antibiyotik sınıfına etkili 9 adet AMD geni ve IncL/M plazmiti üzerinde 1 adet AMD geni saptanmıştır. KP2 izolatu için tespit edilen plazmit tipleri; Col440II, ColRNAI, IncFIA(HI1), IncR, repB(R1701)'dir. IncFIA (HI1) üzerinde 8 adet direnç geni bulunmaktadır. Col440II, ColRNAI, IncR, repB(R1701) plazmitleri üzerinde AMD ve virülansla ilişkili gen bölgesi saptanmamıştır. KP3 izolatu için tespit edilen plazmit tipleri; IncFIB(K), IncFII(K), IncL'dir. IncFIB(K) üzerinde 4 direnç geni ve traT virülans geni bulunmaktadır. traT proteini, bir dış membran proteini olarak işlev görür ve bakterilerin konak kompleman sistemine karşı direnç geliştirmelerine katkı sağlar. IncL/M(pOXA-48) plazmiti üzerinde 2 adet AMD geni bulunmaktadır. KP4 izolatu için tespit edilen plazmit tipleri; ColKP3, IncFIB(K), IncFIB, IncHI1B'dir. IncHI1B plazmiti üzerinde çeşitli antibiyotik sınıflarına etki eden 12 adet AMD genleri ve virülansla ilişki 3 gen tespit edilmiştir. TerC (Tellurium ion resistance protein), bakteri hücrelerinde tellüryum iyonlarına karşı direnç sağlamakla ilişkilendirilmiş bir proteindir. iutA (Ferric aerobactin receptor), demir alımında rol oynayan bir dış membran proteinidir. iucC (Aerobactin synthetase) aerobactin üretim sürecinde rol oynayan bir enzimdir. ColKP3 plazmiti üzerinde 1 adet AMD geni tespit edilmiştir. IncFIB(K) plazmiti üzerinde ve virülansla ilişkili dış membran proteini olarak işlev gören ve konak kompleman sistemine karşı direnç geliştirmelerine katkı sağlayan traT proteini bulunmaktadır. Plazmitler üzerinde kodlanan AMD ve virülans genlerine ilişkin detaylı analiz Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Plazmitler üzerinde taşınan virülans, direnç genleri ve etki ettiği antibiyotik sınıfları

	Plazmit tipi	Etki Ettiği Antibiyotik Sınıfı	AMD geni
KP1	IncFII(K)	Aminoglikozid	aph(6)-Id., aph(3'')-Ib, aac(6')-Ib-cr, catB3
		Beta-Laktam	blaTEM-1B, blaOXA-1
		Kinolon	dfrA14, aac(6')-Ib-cr, qnrB1
		Sülfametoksazol	sul2
	IncL/M	Beta-Laktam	blaOXA-48

Tablo 4. Devamı Plazmitler üzerinde taşınan virülans, direnç genleri ve etki ettiği antibiyotik sınıfları

KP2	IncFIA(HI1)	Efflux Pump/ Antiseptik Direnci	qacL
		Aminoglikozid	aac(3)-Iia, aadA2b, aadA1
		Tetrasiklin	tet(D)
		Sülfametoksazol	sul3
		Amfenikol	flor, cmlA1
KP3	IncFII(K), IncFIB(K)	Beta-Laktam	blaTEM-1B
		Sülfametoksazol	sul2
		Aminoglikozid	aph(6)-Id, aph(3'')-Ib
		Omp-Kompleman Direnci	traT
		Isı Şokunda Hayatta Kalma	clpK1
	IncL/M	Beta-Laktam	blaOXA-48, blaCTX-M-15
KP4	IncFIB(Mar), IncHI1B	Makrolid	msr(E), mph(E)
		Aminoglikozid	armA, aadA2, aac(6')-Ib-cr
		Sülfametoksazol	sul1
		Trimetoprim	dfrA12, dfrA14
		Beta-Laktam	blaOXA-1
		Kloramfenikol	catB3
		Efflux Pump/ Antiseptik Direnci	qacE
		Tellür İyon Direnci Proteini	terC
		Ferrik Aerobaktin Reseptörü	iutA
		Aerobaktin Sentetaz	iucC
	ColKP3	Beta-laktam	blaOXA-232
	IncFIB(K)	Omp-kompleman direnci	traT

3.3. Profaj Profilleri

PHASTEST ile farklı sekans ve kapsüler tiplere ait farklı suşların genomunda taşınan profaj bölgeleri tespit edilmiştir. KP1 izolatında; 2 tam, KP2; 6 tam 2 kısmi, KP3; 3 tam ve 3 şüpheli, KP4 ise; 3 tam 1 kısmi profaj olmak üzere toplam 19 profaj saptanmış ve 16 adet profaj bölgesi analize dahil edilmiştir. Toplam 4 izolatta saptanan 16 faja ait genomik özellikler tablo 5'te özetlenmiştir. 13 profajın indüksiyonu ise moleküler yöntemler ile

doğrulanmıştır. Bu fajların kromozomda tespit edilen faj dizileriyle uyumlu olduğu görülmüştür. İndüklendiği moleküler teknikler ile tespit edilen profajlar KP1-Φ1, KP1-Φ2, KP2-Φ1, KP2-Φ3, KP2-Φ4, KP2-Φ5, KP2-Φ7, KP3-Φ1, KP3-Φ2, KP3-Φ3, KP3-Φ5, KP4-Φ1, KP4-Φ4'tür.

KP1-Φ1 44163 bp uzunluğunda ve %GC 52.85 olup 44'ü hipotetik olmak üzere toplam 82 adet ORF taşımaktadır. KP1-Φ1 üzerinde virülansla ilişkili veya antibiyotik direnç geni saptanmamış olup 2 adet tRNA ve 4 adet Acr (Anti-crispr geni) gen bölgeleri bulunmaktadır. KP1-Φ2 53309 bp uzunluğunda olup %GC 51.15 toplam 77 ORF'ye sahip olup 42 tanesi hipotetik protein kodlamaktadır. Bir adet virülansla ilişkili protein kodlayan gen bölgesine ve 1 adet Acr gen bölgesine rastlanmıştır.

KP2-Φ1, %GC değeri 53.66 ve 59960 bp uzunluklu olup 31'i hipotetik toplam 99 ORF kodlamaktadır. Üzerinde virülansla ilişkili 2 gen bölgesi bulunmaktadır. KP2-Φ2, 49409 bp uzunluklu ve %GC 52.68 olup toplam 87 ORF'ye sahip olup 46 ORF hipotetik protein kodlamaktadır. 2 adet tRNA ve 3 adet Acr genine sahiptir. KP2-Φ3, %GC 54.23 20406 bp uzunluğundadır. Toplam 38 ORF'ye sahip olup 13 ORF hipotetik protein kodlamaktadır. 3 adet tRNA taşımaktadır. KP2-Φ4, %GC 51.32 47762 bp uzunluğundadır. Toplam 79 ORF'ye sahip olup 41 ORF hipotetik protein kodlamaktadır. 1 adet virülansla ilişkili gen bölgesi, 1 adet Acr geni ve 3 adet tRNA taşımaktadır. KP2-Φ5 %GC 52.37 38467 bp uzunluğundadır. Toplam 62 ORF'ye sahip olup 42 ORF hipotetik protein kodlamaktadır. Virülans, tRNA ve Acr gen bölgeleri saptanmamıştır. KP2-Φ7 %GC 51.77 64653 bp uzunluğundadır. Toplam 106 ORF'ye sahip olup 44 ORF hipotetik protein kodlamaktadır. Üç adet virülans, 1 adet tRNA ve 1 adet Acr geni taşımaktadır.

KP3-Φ1, %GC 51.52 39595 bp uzunluğundadır. Toplam 61 ORF'ye sahip olup 15 ORF hipotetik protein kodlamaktadır. Dört adet virülansla ilişkili ve 3 adet Acr gen bölgesi taşımaktadır. KP3-Φ2, %GC 53.23 45515 bp uzunluğundadır. Toplam 89 ORF'ye sahip olup 52 tanesi hipotetik protein kodlamaktadır. Üç adet tRNA ve 1 adet Acr gen bölgesi taşımaktadır. KP3-Φ3, %GC 51.84 19945 uzunluğundadır. Toplam 38 ORF'ye sahip olup 22 tanesi hipotetik protein kodlamakta olup şüpheli yapıda bir profajdır. Üzerinde AMR, virülans, tRNA ve Acr gen bölgeleri saptanmamıştır. KP3-Φ4, %GC 50.58 34687 bp uzunluğundadır. Toplam 58 ORF'ye sahip olup 20 tanesi hipotetik protein kodlamakta olup şüpheli yapıda bir profajdır. Üzerinde 4 adet virülansla ilişkili gen bulunmaktadır. KP3-Φ5, %GC 50.57 41229 bp uzunluğundadır. Toplam 66 ORF'ye sahip olup 34 tanesi hipotetik protein kodlamaktadır. Üzerinde 1 adet Acr geni ve 1 adet tRNA bulunmaktadır.

KP4-Φ1, %GC 50.96 37351 bp uzunluğundadır. Toplam 50 ORF bulunmaktadır. 14 ORF hipotetik protein kodlamaktadır. Üzerinde 1 adet Acr geni bulunmaktadır. KP4-Φ3, %GC 52.83 46839 bp uzunluğundadır. Toplam 81 ORF bulunup 42 ORF hipotetik protein kodlamaktadır. Üzerinde 1 adet Acr geni bulunmaktadır. KP4-Φ4, %GC 52.21 51057 bp uzunluğundadır. Seksen üç ORF bulunmakta olup 37 ORF hipotetik protein kodlamaktadır. Üzerinde 3 adet virülans geni ve 2 adet Acr geni bulunmaktadır. İlgili izolatlara ait profajlara ilişkin detaylı analiz Tablo.5'te verilmiştir.

Tablo 5. Profajların genomik özellikleri

İzolat	Profaj No	Konum	Score*	ORF	%GC	bp	AMR	VF	tRNA	Acr
KP1	KP1-Φ1	1295085 1339247	150	82	52.85	44163	0	0	2	4
	KP1-Φ2	2094023 2147331	150	77	51.15	53309	0	1	0	1
	Toplam						0	1	2	5
KP2	KP2-Φ1	177120 237079	150	99	53.66	59960	0	1	0	0
	KP2-Φ2*	1204879 1254287	150	87	52.68	49409	0	0	2	3
	KP2-Φ3	3314254 3334659	100	38	54.23	20406	0	0	3	0
	KP2-Φ4	3353545 3401306	150	79	51.32	47762	0	1	3	1
	KP2-Φ5	3951565 3990031	120	62	52.37	38467	0	0	0	0
	KP2-Φ7	4109968 4174620	150	106	51.77	64653	0	0	1	1
	Toplam						0	3	9	5

Tablo 5. Devamı Profajların genomik özellikleri

KP3	KP3-Φ1	1601641 1641235	150	61	51.52	39595	0	0	0	3
	KP3-Φ2	2089502 2135016	140	89	53.23	45515	0	0	3	1
	KP3-Φ3	3960576 3980520	80	38	51.84	19945	0	0	0	0
	KP3-Φ4*	4688706 4723392	80	58	50.58	34687	0	3	0	0
	KP3-Φ5	4974755 5015983	150	66	50.57	41229	0	0	1	1
						Toplam	0	3	4	5
	KP4-Φ1	1924292 1961642	150	50	50.96	37351	0	0	0	1
	KP4-Φ3*	3210145 3256983	150	81	52.83	46839	0	0	0	1
KP4	KP4-Φ4	3852556 3903612	150	81	52.21	51057	0	1	0	2
						Toplam	0	1	0	4

*PHASTEST biyoinformatik aracı ile belirlen faj bütünlüğü skoru tabloda verilmiştir. Skor değeri 90 puan ve üzeri ise tam profaj (profaj bölgesi bilinen bir fajın tüm genlerini içeren), skoru 70-90 arası ise şüpheli profaj (belirlenen dizideki genlerin %50'sinden fazlası fajla ilişkili) ve skoru 70 ve daha düşük ise kısmi profaj (profaj bölgesi %50'den daha az fajla ilişkili gen içeren) olarak tanımlanmaktadır. * işareti ile belirtilen profajların indüksiyonu gerçekleşmemiştir [84].

3.3.1. MTT uygulaması sonra indüklenen profajların plak görünümü

İndüksiyon işlemi sonrasında yalnızca az miktarda faj plakları gözlemlendi. İndüksiyon gerçekleşti. İndüklenen profaj kısıtlı olduğu için yeterli faj pürifikasyonu gerçekleştirilemedi. Titre belli bir orana çıkamadığı için fajların morfolojik ve diğer biyolojik özellikleri çalışılamadı. Bu sebeple profaj indüksiyonun tespiti moleküler yöntemler ile belirlenmeye çalışıldı. İndüksiyon işlem sonrasında filtreleme işlemi

uygulandı ve sekanslama işlemine geçildi. Sekanslama işlemi sonrası farklı kontikler arandı.

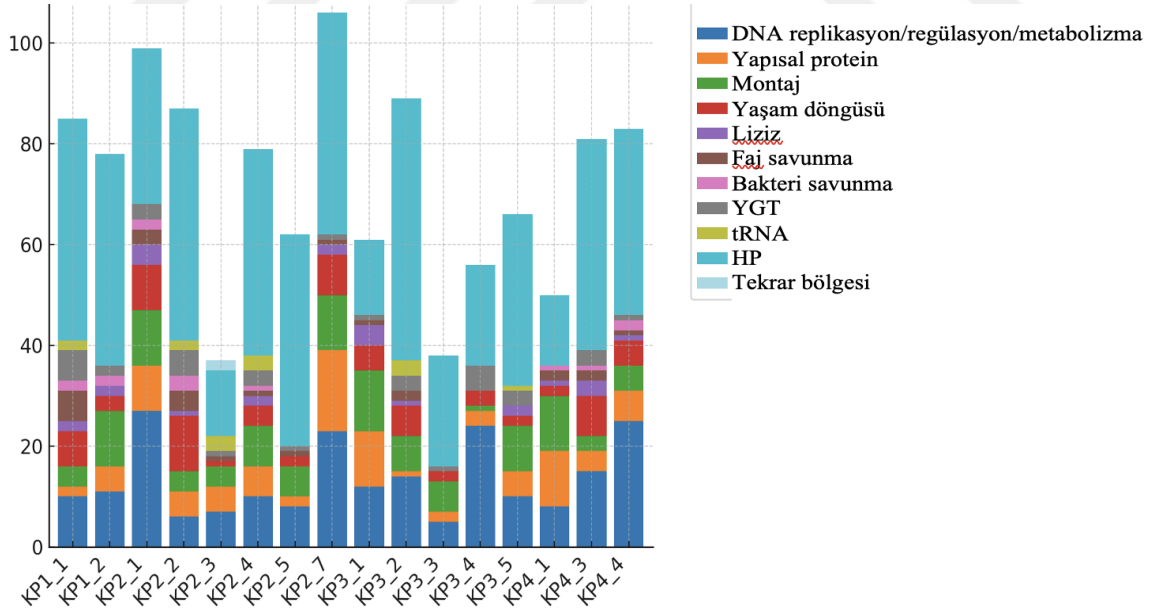


Şekil 1. MTT boyama sonrası plak görünümü. İşlem sonrası agar üzerinde bulunan renksiz bölgeler faj plaklarını temsil etmektedir. Canlı bakteri hücreleri mavimsi/mor tonlarında görülmektedir.

3.3.2. Faj genom analizleri

Tüm profajlarda hipotetik proteinler (HPs) en büyük grubu oluşturmaktadır. HPs, fonksiyonu henüz tanımlanmamış proteinleri ifade etmekte olup, profaj genomlarının önemli bir kısmının işlevsel açıdan keşfedilmeyi bekleyen genetik elemanlar içerdiğini göstermektedir. HPs grubundan sonra en yaygın görülen gen grupları DNA replikasyonu, metabolizması ve düzenlemesi ile ilişkili genler ve yapısal proteinleri kodlayan genlerdir. Bunun yanı sıra, profajlarda montaj, yaşam döngüsü ve lizis ile ilişkili genler de çeşitli oranlarda tespit edilmiştir. Bu kategoriler, profajların tam bir faj yaşam döngüsünü gerçekleştirme için gerekli genleri barındırır. Bazı profajlarda faj savunma ve bakteri savunma genlerinin varlığı dikkat çekici olup, bu genler bakteriyel konak ile fajlar arasındaki evrimsel silahlanma yarışının bir göstergesidir. tRNA genleri, yatay gen transferi (HGT) ile ilişkili genler ve tekrar bölgeleri ise daha sınırlı sayıda profajda saptanmıştır. Özellikle HGT genlerinin varlığı, bu profajların genetik çeşitliliğin yayılmasına katkı sağlarlar. Profajlar arasında toplam gen sayısı bakımından genom boyutlarıyla ilişkili olarak belirgin farklılıklar

gözlenmiştir. Örneğin, KP2-Φ7 ve KP2-Φ1 profajları 100'e yakın gen barındırırken, KP2-Φ3 ve KP3-Φ3 gibi bazı profajlar yaklaşık 40 gen içermektedir. Bu varyasyon, profaj genomlarının boyut ve içerik açısından heterojen yapısını ortaya koymaktadır. On altı profaj bölgesi üzerinde kodlanan gen bölgelerine ait nükleik asit dizileri, protein dizilerine çevrilmiştir. NCBI BlastP veritabanı ile kodlanan proteinler fonksiyonlarına göre DNA replikasyon/metabolizma/regülasyon, yapısal protein, montaj, yaşam döngüsü, liziz, faj savunma, bakteri savunma HGT (horizontal gen transferi), tRNA ve HP proteinleri olarak gruplandırılmıştır. KP1-Φ1, KP2-Φ2, KP4-Φ3 profajları, FAJ_Erwini_vB_EhrS_59_NC_048198 ile yakın ilişkili bulunmuştur. KP2-Φ3 ve KP4-Φ1 profajları, FAJ_Klebsi_ST16_OXA48phi5.4_NC_049450 ile yakın ilişkili bulunmuştur. KP2-Φ4, KP3-Φ5 ve KP4-Φ4 profajları, FAJ_Salmon_118970_sal3_NC_031940 ile yakın ilişkili bulunmuştur. KP2-Φ7 ve KP3-Φ4 profajları, FAJ_Escher_500465_1_NC_049342 ile yakın ilişkili bulunmuştur. Analize ilişkin detay profaj genomlarında kodlanan genlerin fonksiyonel dağılımları Şekil 2.'de; KP1-Φ1, KP2-Φ2, KP4-Φ3 profajlarına ait genom haritaları Şekil 3.'te; KP2-Φ3, KP4-Φ1 profajlarına ait genom haritaları Şekil 4.'te; KP2-Φ4, KP3-Φ5 profajlarına ait genom haritaları Şekil 5.'te ve KP2-Φ7, KP3-Φ4 profajlarına ait genom haritaları Şekil 6.'da verilmiştir.



Şekil 2. Profaj genomlarında kodlanan genlerin fonksiyonel dağılımları

16 profajın genetik özellikleri bar grafikte gösterilmiştir. X eksenı örnek adlarını, Y eksenı özellik sayılarını belirtir. Renkli çubuklar, her örnekteki farklı kategori sayılarını gösterir. Sağdaki lejant, renklerin temsil ettiği genetik kategorileri açıklar.

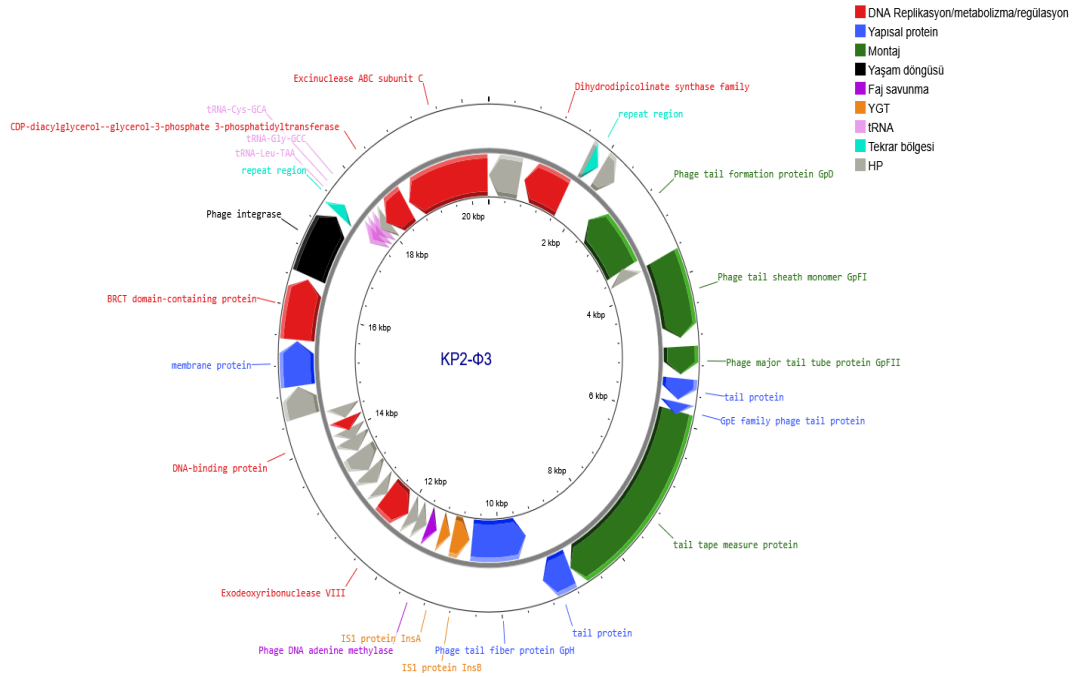
C.



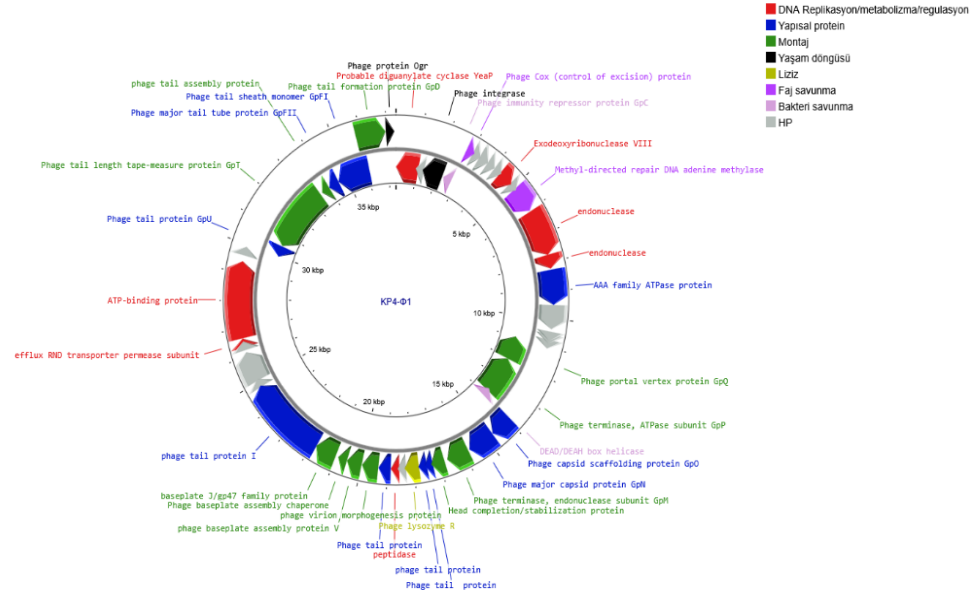
Şekil 3. KP1-Φ1, KP2-Φ2, KP4-Φ3 profajlarına ait genom haritaları

A) KP1-Φ1, B) KP2-Φ2, C) KP4-Φ3 profajlarına ait genom haritaları yukarıda verilmiştir.

A.



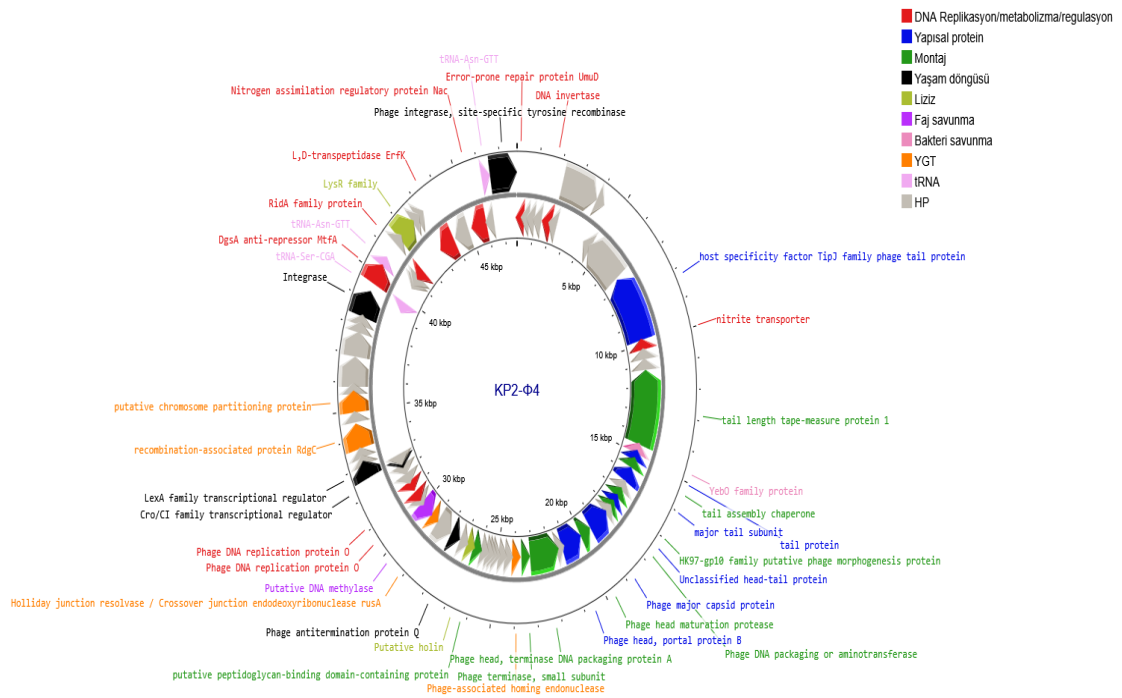
B.



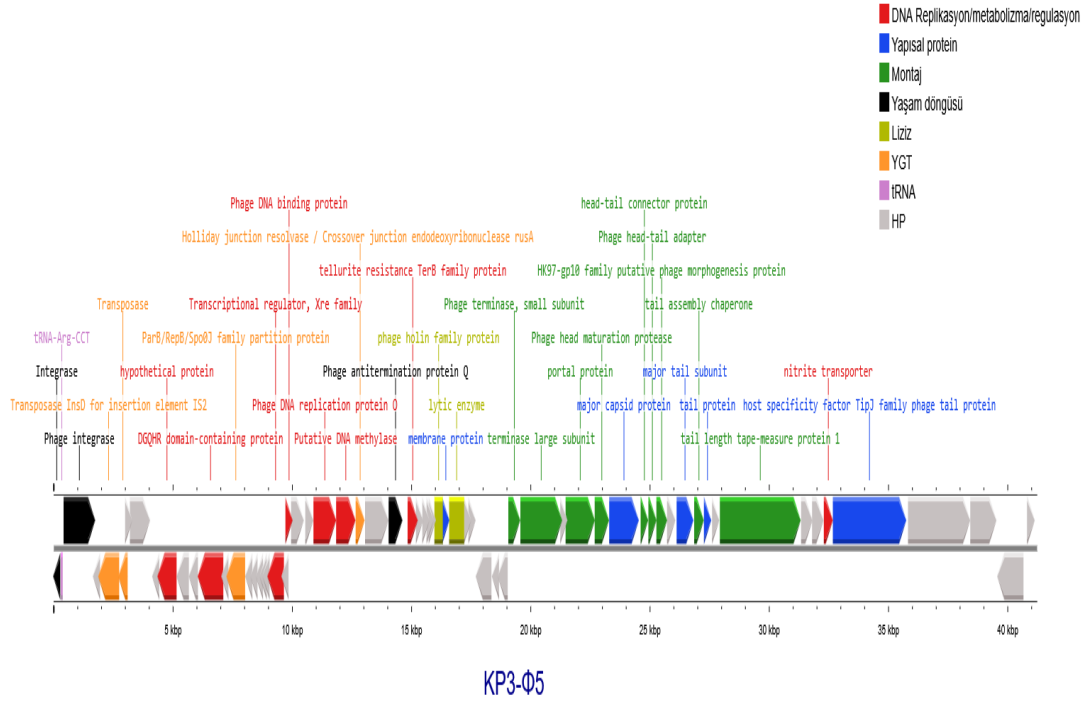
Şekil 4. KP2-Φ3, KP4-Φ1 profajlarına ait genom haritaları

A) KP2-Φ3, B) KP4-Φ1 profajlarına ait genom haritaları yukarıda verilmiştir.

A.



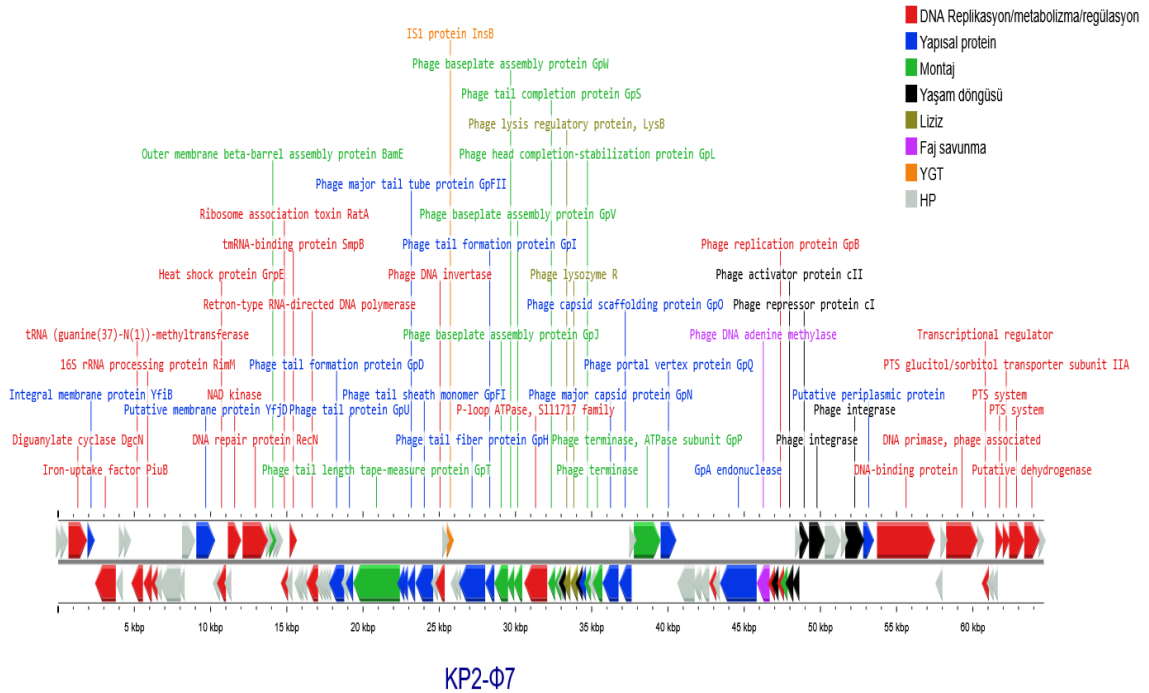
B.



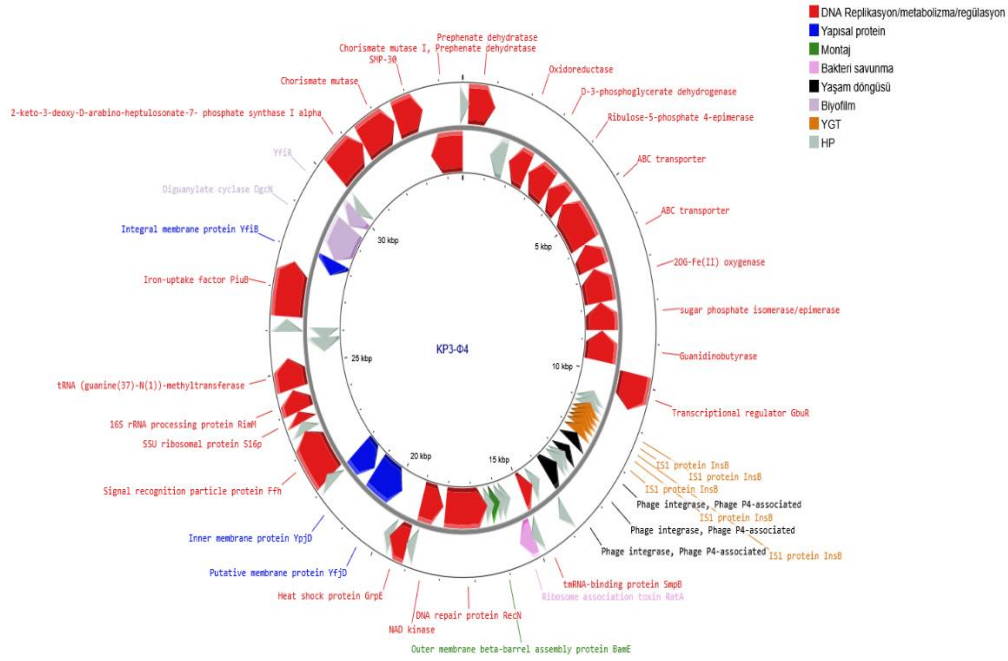
Şekil 5. KP2-Φ4, KP3-Φ5 profajlarına ait genom haritaları

A) KP2-Φ4, B) KP3-Φ5 profajlarına ait genom haritaları yukarıda verilmiştir.

A.



B.



Şekil 6. KP2-Φ7, KP3-Φ4 profajlarına ait genom haritaları

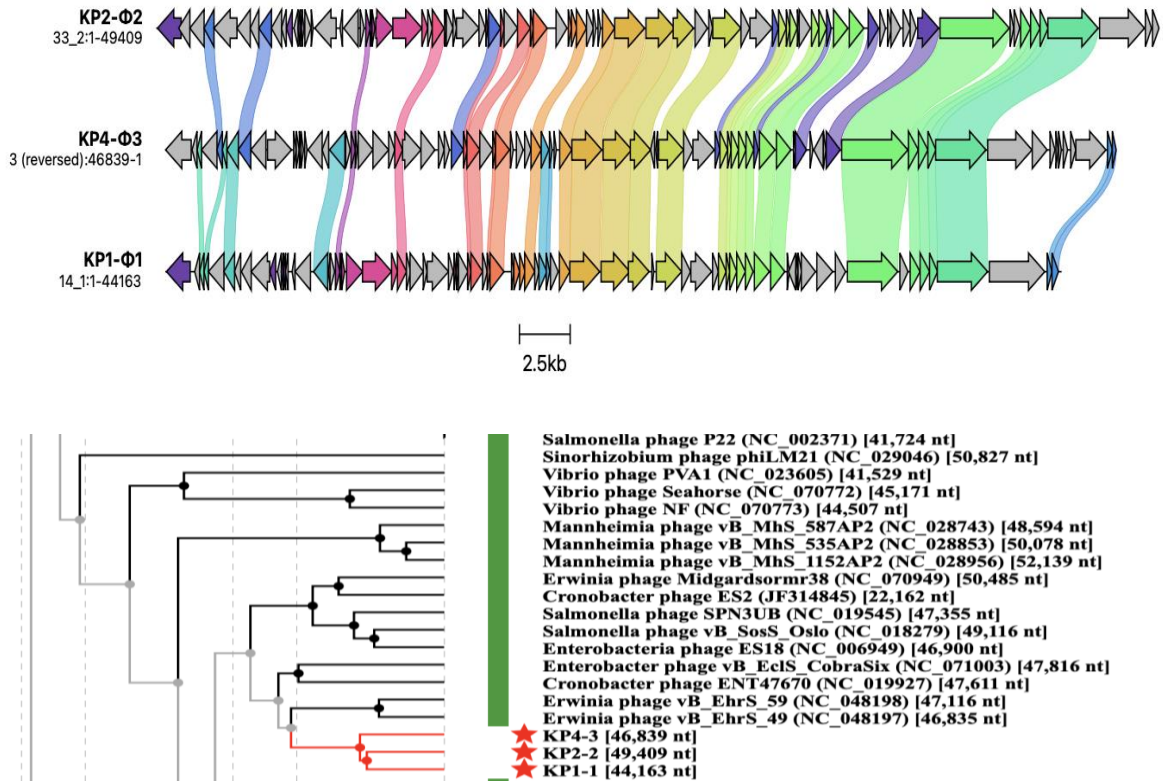
A) KP2-Φ7, B) KP3-Φ4 profajlarına ait genom haritaları yukarıda verilmiştir.

3.3.3. Profaj Genom Organizasyonlarının Karşılaştırmalı Analizi

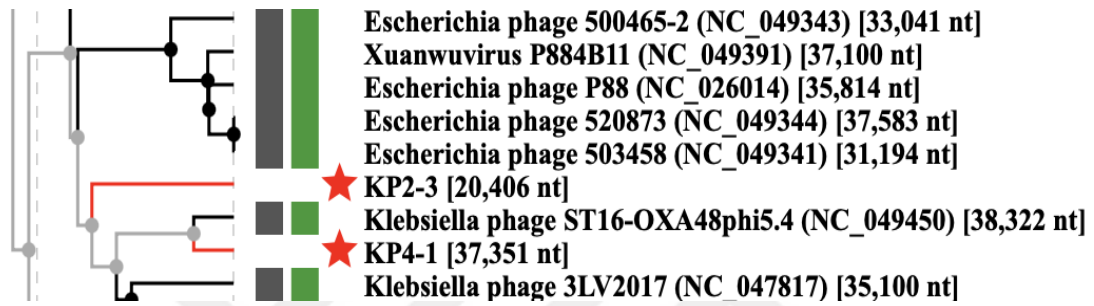
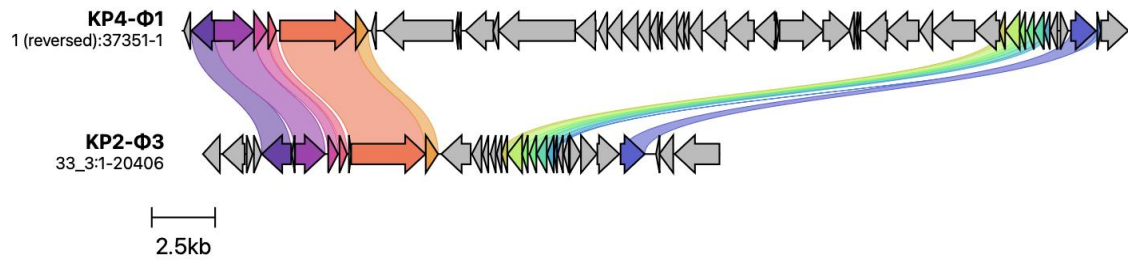
16 profaj için sinteni analizi yapılmıştır. Farklı *K. pneumoniae* izolatlarında tespit edilen profajların karşılaştırmalı genetik analizleri, bu elemanların genomik yapı açısından hem korunmuş hem de çeşitlilik gösteren özelliklere sahip olduğunu ortaya koymuştur. KP1-Φ1, KP2-Φ2, KP4-Φ3; KP2-Φ3, KP4-Φ1; KP2-Φ4, KP3-Φ5, KP4-Φ4; KP3-Φ1, KP2-Φ7; KP2-Φ7, KP3-Φ4 numaralı profajların yapı ve içerik bakımından birbirleriyle yüksek oranda ortak korunmuş genetik organizasyonlara sahip oldukları ancak bununla birlikte, genel olarak mozaik yapı sergiledikleri görülmüştür. Bu durum, profajların evrimsel süreçte rekombinasyon ve yeniden düzenlenme olaylarına maruz kaldığını göstermektedir. Ayrıca profaj bölgelerindeki genomik organizasyon ve dizilim farklılıkları, bazı profajların ters yönlü entegrasyon geçirdiğini ya da bozulmuş ve/veya eksik yapılar taşıdığını göstermektedir. Bu çeşitlilik, *K. pneumoniae* genomlarının genetik esnekliğine ve profajların bakteriyel evrimdeki önemli rolüne işaret etmektedir. KP1-Φ1, KP2-Φ2 KP4-Φ3 profajlarının karşılaştırma genomik analizine göre çok sayıda ortak gen kümelerine sahiptirler. 3 profaj FAJ_Erwin_i_vB_EhrS_59_NC_048198 ile yakın ilişkili bulunmuştur.

KP2-Φ3 KP4-Φ1 profajlarının genomik karşılaştırma analizine göre çok sayıda ortak gen kümelerine sahiptirler. Bazı bölgeler oldukça korunmuşken, bazı bölgelerde gen kaybı veya yeniden dizilim gibi farklılıklar görülmektedir. 2 profaj FAJ_Klebsi_ST16_OXA48phi5.4_NC_049450 ile yakın ilişkili bulunmuştur. KP2-Φ4, KP3-Φ5 ve KP4-Φ4 profajlarının genomik karşılaştırma analizine göre çok sayıda ortak gen kümelerine sahip oldukları ve aynı zamanda bazı yapısal farklılıkların da bulunduğu görülmektedir. 3 profaj FAJ_Salmon_118970_sal3_NC_031940 ile yakın ilişkili bulunmuştur. KP2-Φ7 ve KP3-Φ4 profajlarının genomik karşılaştırma analizine göre çok sayıda ortak gen kümelerine sahip oldukları ve aynı zamanda bazı yapısal farklılıklarında bulunduğu görülmektedir. KP2-Φ7 ve KP3-Φ4 profajları FAJ_Escher_500465_1_NC_049342 ile yakın ilişki bulunmuştur. Farklı *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında tespit edilen profaj bölgelerinin karşılaştırmalı genetik organizasyonuna ilişkin detaylı analiz Şekil 7’de verilmiştir.

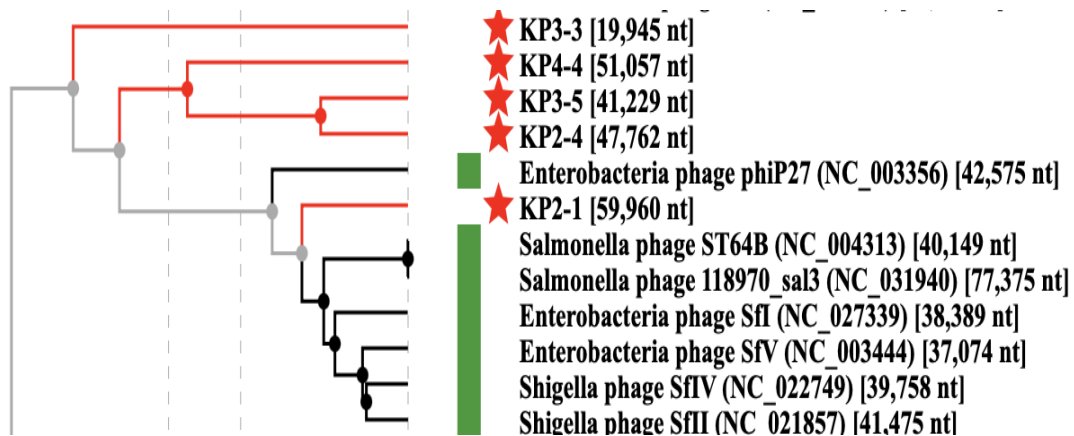
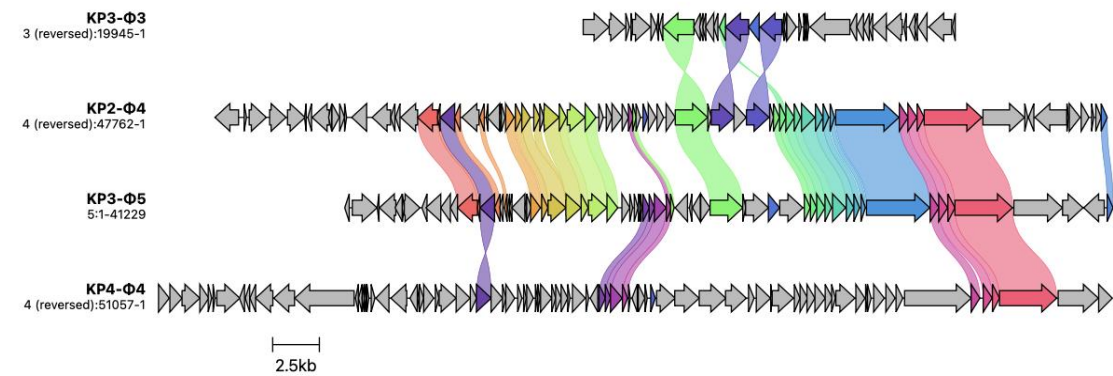
A)



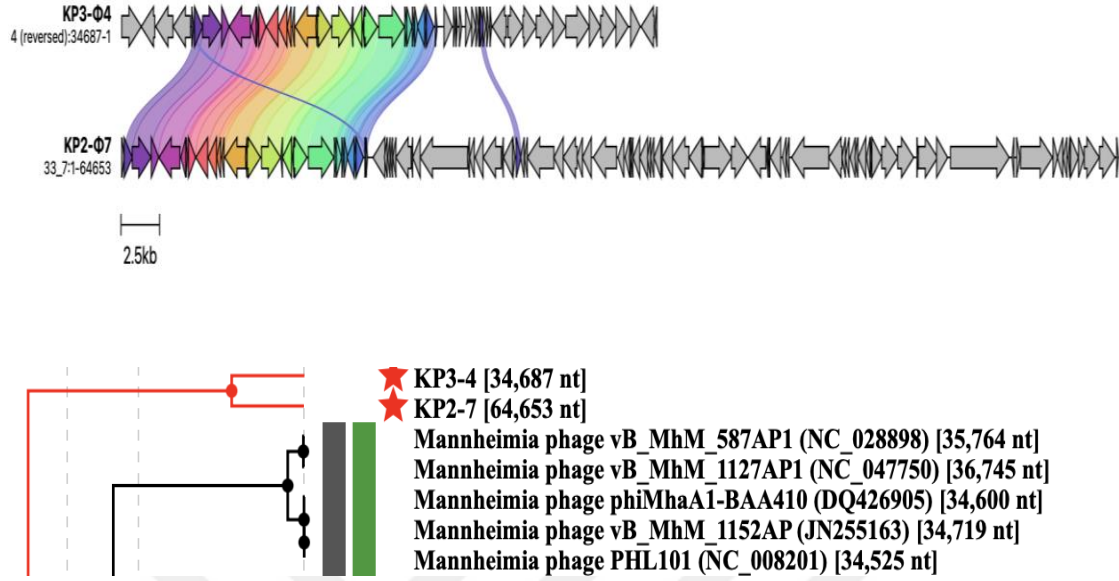
B)



C)



D)



Şekil 7. Farklı *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında tespit edilen benzer profaj bölgelerinin karşılaştırmalı genetik organizasyonu.

Yakın ilişkili profajların genetik organizasyonunu ve karşılıklı homolog bölgelerini gösteren bir genom karşılaştırma haritası yukarıda verilmiştir. *Clinker* biyoinformatik aracı ile oluşturulan bu şema farklı profajların genetik benzerliklerini ve yapısal düzenlerini ifade etmektedir. Her bir ok, bir geni temsil eder. Okların yönü, genin transkripsiyon yönünü gösterir. Gri oklar, benzersiz veya eşlenmeyen genleri temsil eder. Renkli oklar, benzer veya homolog genleri gösterir. Renkli gölgelendirmeler (bağlantılar) iki profaj bölgesi arasında paylaşılan homolog dizileri temsil eder. Sol altta yer alan ölçek çubuğu 2.5 kb'dir. A) KP1-Φ1, KP2-Φ2, KP4-Φ3 profajlarının karşılaştırmalı genomik analizi, B) KP2-Φ3, KP4-Φ1 profajlarının karşılaştırmalı genomik analizi, C) KP2-Φ4, KP3-Φ5 ve KP4-Φ4 profajlarının karşılaştırmalı genomik analizi, D) KP2-Φ7 ve KP3-Φ4 profajlarının genomik karşılaştırma analizi verilmiştir.

3.3.4. Profajların yapısal analizi

Profaj genomları baş-boyun-kuyruk modül genlerinin eksprese ettiği proteinlerin (MCP, Portal, TermL, MTP, Sheath, Ad1, Hc1, Ne1, Tc1, Ad2, Hc2, Tc2, Ad3, Hc3, Ad4) varlığı açısından incelenmiştir. Analiz sonucuna göre bakteriyofajların yakın olduğu protein aileleri ve homologları belirlenmiştir. Bazı profajlarda proteinlerin indeks değerleri bulunmaktadır. İndeks değeri ilgili genom üzerindeki proteinin genomunda bulunduğu pozisyonu ifade eder. Bu bilgi, genom dizilimlerinde belirli proteinlerin nerede ifade

edildiğini anlamak için önemlidir. Bazı profajlarda ilgili proteinler "NOT FOUND" olarak belirtilmiştir. Bu ifade proteinlerin bazı profajlarda eksik olduğunu veya biyolojik farklılıklarla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Ad2, Hc2, Tc2, Ad4 proteinleri hiçbir profaj genomunda bulunmamaktadır. KP3 profajının genomunda ilgili proteinlerin hiçbirisi saptanmamıştır. Enfeksiyon sırasında kasılarak kuyruk tüp proteininin hücre zarını delmesini ve genetik materyalin konağa enjekte edilmesini sağlayan Kılıf proteini beklenildiği gibi sadece Myoviridae morfotipli fajlarının tümünde bulunmaktadır. DNA'nın kapsid içine girişi ve çıkışı için kanal oluşturan ve eksiklik durumunda başarısız viral genomun paketlenmesi ile sonuçlanan portal proteini, 15 profaj genomunda tespit edilmiştir. MTP (Majör Kuyruk Proteini), genetik materyalin konağa düzgün bir şekilde aktarılmasında görev alan ve başarılı bir enfeksiyon süreci için gerekli olan bir proteindir. Bu proteinin eksikliği durumunda kuyruk tüpü oluşamaz. Faj, konağa genetik materyalini aktaramadığı için enfeksiyon gerçekleşemez. Siphoviridae morfotipli KP1-Φ1, KP3-Φ3 ve KP4-Φ4 profajlarında; KP2-Φ1, KP3-Φ2 profajlarında ve Podoviridae morfotipli KP2-Φ6 profajında Majör Kuyruk Proteini (MTP) proteini saptanmamıştır. Majör Kapsid Proteini (MCP) viral genomu çevreleyen ve koruyan kapsid oluşumu için gerekli temel yapısal proteindir. Bu proteinin eksikliği sonucunda kapsid oluşamaz, yapısal bütünlük kaybolur. Bu durum genetik materyalin korunamamasına ve enfektif viral partikül oluşumunun engellenmesine neden olur. Myoviridae morfotipli KP2-Φ3 profajında MCP saptanmamıştır. Ad (Adaptor Proteini), portal proteine bağlanarak portal kanalının kapanmasını sağlayarak kuyruk bağlantısına yardımcı olan yapısal bir protein olup bu proteinin eksiklik durumunda fajın kuyruk proteinleri konağa bağlanamaz ve genetik materyalini konağa aktarma yeteneğini kaybeder. Ad proteini Myoviridae morfotipli KP2-Φ3, Podoviridae morfotipli KP2-Φ6 profajlarında saptanmamıştır. Head-closure Proteini (Hcp), adaptör proteinine bağlanır ve portal kanalını kapatır. Kuyruk proteinleri için bir bağlantı noktası oluşturur. Bu proteinin eksiklik durumunda kuyruk yapısı tamamlanamadığı için faj konak hücreye tutunamaz. Hc proteini Podoviridae morfotipli KP2-Φ6 ve Myoviridae morfotipli KP2-Φ3, KP2-Φ7, KP3-Φ1, KP4-Φ1 profajlarında saptanmamıştır. Terminaz (TermL), ATPaz aktivitesi ile enerji üretir ve endonükleaz işlevi ile DNA'yı keserek kapsid içine aktarılmasını sağlar. Eksiklik durumunda faj genetik materyali başarılı bir şekilde paketlenemez ve fajın enfeksiyon potansiyeli kaybolur. Bu protein KP2-Φ6 profaj genomunda saptanmamıştır.

3.3.5. Profaj genomlarında kodlanan genler

3.3.5.1. Virölans genleri

KP1-Φ2 üzerinde tagR proteinini kodlayan gen bulunmaktadır. Efektör sekresyon genleri tarafından kodlanan tagR proteini, bakterilerin konak savunması için önemli olup hücre duvarı biyosentezi ve yapısal stabilizasyonda rol almaktadır [104]. KP2-Φ1 ve KP3-Φ4 profajı üzerinde kodlanan adherans (yapışma) faktörleri PapA, konak hücreye bağlanma açısından önemli olan pilusların ana yapısal proteinidir [105]. KP2-Φ4 profajı üzerinde kodlanan rmlB proteini (dTDP-glukoz 4,6-dehidrataz), kapsül polisakkaritlerinin dTDP-L-ramnoz biyosentezinde rol almaktadır [106]. Besin/metabolizma ile ilgili genler tarafından kodlanan fbpC, ybtP proteinleri demir alımı gibi yaşamsal işlevler için gerekli olup bakteriyel virölansa katkı sağlarlar. KP3-Φ4 profajı üzerinde bakteriyel demir taşıma ve kapsül biyosentezinde rol alan fbpC [107], demir alımında görevli ybtP [108] proteinleri kodlanmaktadır. KP4-Φ4 profajı üzerinde virölansla ilişkili algU proteini kronik enfeksiyonlarda önemli rol oynamakta olup biyofilm oluşumunu desteklemektedir. Bu protein mukoid hücrelerde oldukça aktiftir ve artmış algR transkripsiyonuna yol açar [109]. Profaj bölgelerinde saptanan virölansla ilişkili genlere ilişkin detaylı analiz Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. Profajlar üzerinde taşınan virölansla ilişkili gen / protein adı

Örnek ID	Gen/ Protein	Fonksiyon	Virölans Mekanizması	Organizma Kaynağı
KP1-Φ2	tagR	Tip VI sekresyon ile ilişkili protein	Efektör dağıtım sistemi (HSI-1)	<i>Pseudomonas</i>
KP2-Φ1	papA	P pilus ana alt birimi	Yapışma (P fimbriae)	<i>E. coli</i> O7:K1
KP2-Φ4	rmlB	dTDP-glukoz 4,6-dehidrataz	Kapsüler polisakkarit	<i>Vibrio fischeri</i>
KP3-Φ4	fbpC	Demir ABC taşıyıcı, ATP bağlayıcı	Beslenme/Metabolik faktör (FbpABC)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
	papA	P pilus major subunit	Yapışma (P fimbriae)	<i>E. coli</i> O7:K1
	ybtP	Yersiniabactin ABC taşıyıcı	Beslenme/Metabolik faktör	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
KP4-Φ4	algU	Biyosentez düzenleyici	Biyofilm oluşumu (Aljinat)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

3.3.5.2. Litik/lizojenik döngüyü kontrol eden genler

KP2-Φ1 profajında tespit edilen S24 family peptidaz, recA proteini ile kendi oto katalizini sağlayarak faj litik döngüyü başlatır [110]. KP1-Φ1 proprofajında tespit edilen Arc family DNA-binding protein. litik döngü sırasında antirepresör proteininin sentezini baskılayan trans-etkili bir proteini kodlar ve litik-lizojenik döngüyü kontrol eder [111]. KP2-Φ1, KP2-Φ4, KP3-Φ4, KP4-Φ4 profajlarında tespit edilen SOS-response represor LexA DNA hasarına karşı savunma ve SOS yanıtının baskılanmasında rol alır. LexA family transkripsiyonel regülatörü aynı zamanda P3 litik promotörünü baskılayarak lizojenik döngüyü destekler [112, 113]. KP2-Φ2, KP2-Φ4, KP2-Φ7, KP4-Φ3 profajlarında tespit edilen Cro/CI proteini bir transkripsiyonel regülatörlerdir. CI faj represörü olup fajın lizojenik döngüye geçişini sağlarken, Cro ise antirepresör olup litik döngüye geçişini destekler. KP2-Φ2, KP2-Φ7, KP3-Φ1, KP4-Φ4 profajlarında tespit edilen faj aktivatör protein cII, faj yaşam döngüsünün litik-lizojenik geçişini kontrol eder ve litik döngüyü aktive eder [114]. KP3-Φ1, KP4-Φ1 profajlarında tespit edilen Faj proteini Ogr, faj portal vertex protein GpQ, viral genom çoğalma ve kapsid montajı için gerekli geç genlerin ekspresyonu, genom paketlenmesi ve faj yaşam döngüsünün belirlenmesinde rol alırlar. KP2-Φ7, KP3-Φ1, KP4-Φ1 profajlarında tespit edilen Faj Orf80 proteini P87 promotörü tarafından transkribe edilir ve faj yaşam döngüsünde litik-lizojenik geçişi düzenler [115].

KP2-Φ4, KP2-Φ7, KP3-Φ3, KP4-Φ1, KP4-Φ3 profajlarında tespit edilen lizojenik döngüde rol alan integras proteinleri ise faj genomunun bakteriyel DNA'ya entegrasyonunu sağlar ve faj yaşam döngüsünü belirlemede önemli olup lizojenik döngü için gerekli bir proteindir [116]. KP2-Φ2, KP2-Φ4, KP2-Φ7 KP1-Φ1, KP3-Φ1 KP4-Φ1 KP3-Φ2 KP4-Φ4, KP4-Φ3 profajlarında tespit edilen LysA, LysB, LysC, holin, lizozimi R, holin/antiholin bileşeni S proteinleri sahip oldukları litik aktivite ile bakteriyel hücre duvarını degrades ederek fajın hücreyi enfekte etmesini sağlar [117]. KP4-Φ4 profajında tespit edilen YdfD proteini hücre bölünme inhibitörü olan dicB ve sulA genlerini baskılayan litik bir proteindir [118]. KP1-Φ1, KP2-Φ2, KP2-Φ7, KP3-Φ1 profajlarında tespit edilen faj TraR/YbiI family proteini, bakteride konjugasyon ile plazmit transferini optimize eder. Bu proteinin homologları bazı fajlarda transkripsiyonu düzenler ve fajın replikasyonunu hızlandırır. Konak hücrenin büyümesini yönlendirerek faj yaşam döngüsünü etkileyebilir [119]. KP1-Φ1, KP4-Φ3, KP4-Φ4 fajlarında tespit edilen Helix-turn-helix domaini, bir DNA bağlanma motifidir ve çoğu bakteriyofaj genomunda bulunmaktadır. HTH domainleri, fajların enfeksiyon sırasında gen ekspresyonunun kontrolünü sağlayan transkripsiyon

regülatörleriyle ilişkilidir. Faj DNA onarımı, replikasyonu ve faj yaşam döngüsünün düzenlenmesine hizmet eder [120].

3.3.5.3. Savunma proteinleri genleri

KP1-Φ1, KP1-Φ2, KP2-Φ1, KP2-Φ2, KP2-Φ3, KP2-Φ4, KP2-Φ5, KP2-Φ7, KP3-Φ1, KP3-Φ2, KP3-Φ5, KP4-Φ1, KP4-Φ3, KP4-Φ4 profajlarında çok sayıda ve çeşitte kendi genomlarını dış tehditlerden koruyan savunma proteinlerine rastlanılmıştır. KP1-Φ1, KP2-Φ2, KP2-Φ3, KP2-Φ4, KP2-Φ5, KP2-Φ7, KP3-Φ1, KP3-Φ2, KP4-Φ1, KP4-Φ3 profajları üzerinde DNA metiltransferaz enzimleri tespit edilmiştir. Bu enzimler, DNA üzerindeki adeninin amino grubunu metilleyen metiltransferazlardır. DNA replikasyonu ve onarımı gibi hücresel süreçlere katkılarının yanı sıra, faj genomlarının metil grupları ile modifiye edilmesi sayesinde bakteriyel restriksiyon-modifikasyon sistemleri tarafından tanınmaları engellenir. KP1-Φ1, KP2-Φ2, KP4-Φ4 profajlarında tespit edilen Dcm metilaz, CC(A/T)GG dizisindeki ikinci sitozinin metilasyonunu sağlar. Bu işlem, bazı restriksiyon enzimlerinin tanıma bölgeleriyle örtüşebilir ve bu da DNA'nın bu enzimler tarafından kesilmesini engelleyebilir. Böylece faj genomunun bakteriyel restriksiyon-kısıtlama sistemleri tarafından tanınıp degrade edilmesi önlenir [121].

On bir profaj üzerinde çeşitli tip ve sayıda Acr protein tipleri tespit edilmiştir. KP1-Φ2, KP3-Φ1 profajları üzerinde AcrIIA1 proteini bulunmaktadır. KP1-Φ1, KP2-Φ2, KP3-Φ2, KP4-Φ3, KP4-Φ4 profajları üzerinde AcrIIA7-1 proteini bulunmaktadır. KP1-Φ1, KP3-Φ1 profajları üzerinde AcrIIA15 proteini bulunmaktadır. KP1-Φ1 profajı üzerinde AcrIIA7-0, KP2-Φ4 profajı üzerinde AcrIIA7-3, KP2-Φ2 profajı üzerinde AcrIIA14, KP3-Φ5 profajı üzerinde AcrIIA, KP4-Φ1 profajı üzerinde AcrIE1, KP2-Φ7 profajı üzerinde AcrIF9, KP4-Φ4 profajı üzerinde AcrIF11, KP2-Φ2 profajı üzerinde AcrVA1 proteinleri bulunmamaktadır. KP2-Φ1, KP2-Φ3, KP2-Φ5, KP3-Φ3, KP3-Φ4 profajları üzerinde Acr proteinleri bulunmamaktadır. Acr proteinleri bakteri restriksiyon-kısıtlama sistemlerinden biri olan CRISPR sistemini çeşitli mekanizmalar ile bloke ederek faj genomunun konak savunma sistemi tarafından tanınması önler veya Cas proteinlerinin aktivitesini engelleyerek CRISPR-Cas aktivitesini inhibisyonunu sağlar. Tespit edilen AcrIIA proteinleri bakteriyel Tip II-A CRISPR-Cas sistemlerini hedef alırlar. AcrIF proteinleri, Tip I-F CRISPR-Cas sistemlerini hedef alırlar. AcrIIVA proteinleri, bakteriyel Tip IV-A CRISPR-Cas sistemlerini hedef alırlar. AcrIE proteinleri, bakteriyel Tip I-E CRISPR-Cas sistemlerini

hedef alırlar [122]. KP1-Φ1 KP1-Φ2, KP2-Φ1, KP2-Φ2, KP3-Φ2, KP4-Φ3 KP4-Φ4 profajları üzerinde taşınan faj antiterminasyon protein Q, fajın konak hücreyle olan etkileşimlerinde kritik bir rol oynar. Faj transkripsiyonunu önleyen mekanizmaları bloke ederek geç dönem genlerinin transkripsiyonuna devam etmesini ve enfeksiyonun ilerlemesini sağlar [123]. KP1-Φ1, KP2-Φ2, KP4-Φ4 profajlarında tespit edilen Kila-N domain-containing protein ve KP1-Φ1 profajı üzerinde tespit edilen BRO family domain-containing protein, bakterileri ve ökaryotları enfekte eden büyük DNA virüslerinde yaygın olan iki DNA bağlayıcı motifi içeren proteinlerdir. Hem fajların hem de transpozonların, konak hücre döngüsüne yanıt olarak genlerini düzenleyerek seçici avantajlar elde etmesini sağlar. [124]. KP1-Φ1 KP3-Φ2 profajlarında tespit edilen Host nükleaz inhibitörü GamL'nin etkileşim yüzeyi genişletir ve DNA substratının moleküler taklidini içerir. RecBCD'in DNA bağlanma bölgesi ile rekabet ederek RecBCD'i inhibe eder. RecBCD hem çift sarmallı DNA kırılmalarının onarımında hem de bakteriyofaj DNA'sının bozulmasında rol alır. Bu kompleksin inhibisyonu faj genomunun konakçı sistem tarafından parçalanmasına önler [125]. KP2-Φ2 profajında anti-CBASS protein Acb1 proteinlerini tespit edilmiştir. Bu proteinler faj enfeksiyonunu önlemek için hücre ölümünü indükleyen ve siklik nükleotid sinyalleri ile viral yayılmayı engelleyen bakteriyel CBASS sistemine karşı geliştirilen faj savunma mekanizmasıdır. Anti-CBASS protein Acb1 proteinleri ile bakteri CBASS sisteminin inhibisyonu sağlanır [126]. Profajlar üzerinde taşınan savunma proteinlerine ilişkin detaylı analiz Tablo 7. ve Tablo 8.'de verilmiştir.

Tablo 7. Profajlar üzerinde taşınan Savunma Proteinleri

Protein	Profaj(lar)	Fonksiyon
QS sistemi ile ilişkili proteinler	KP1-Φ1, KP2-Φ2, KP2-Φ7	Fajlar, konak bakteri popülasyon yoğunluğunu algılayarak enfeksiyon stratejilerini optimize ederler.
Dcm metilaz	KP1-Φ1, KP2-Φ2, KP4-Φ4	Faj DNA'sını metilleyerek kısıtlama sistemlerinden korunmasını sağlar.
Bro-N domain-containing protein	KP1-Φ1	Anti-viral konak hücre algılamasına karşı koruma sağlamak için sitoplazmadaki viral DNA'yı bağlayabilir.
Kila-N domain-containing protein	KP1-Φ1, KP2-Φ2, KP4-Φ4	Anti-viral konak hücre algılamasına karşı koruma sağlamak için sitoplazmadaki viral DNA'yı bağlayabilir.

Tablo 7. Devamı Profajlar üzerinde taşınan Savunma Proteinleri

Host nükleaz inhibitör GamL	KP1-Φ1, KP3-Φ2	Faj genomunun konakçı sistem tarafından parçalanmasını önler.
Faj DNA N-6-adenin metiltransferaz	KP1-Φ1, KP2-Φ2, KP2-Φ3, KP2-Φ4, KP2-Φ5, KP2-Φ7, KP3-Φ1, KP3-Φ2, KP4-Φ1, KP4-Φ3	Faj DNA'sını modifiye ederek restriksiyon enzimlerinden korunma, replikasyon kontrolü ve gen ekspresyonu regülasyonunda rol alır.
Faj antiterminasyon protein Q	KP1-Φ1 KP1-Φ2, KP2-Φ1, KP2-Φ2, KP3-Φ2, KP4-Φ3 KP4-Φ4	Faj transkripsiyonunun devam etmesi ve enfeksiyonun ilerlemesi için gereklidir.
Anti-CBASS protein (Acb1 family protein)	KP2-Φ2	Konak CBASS savunma sistemini inhibe ederek fajın hayatta kalmasını sağlar.

Tablo 8. Profajlar üzerinde taşınan Anti-CRISPR Proteinleri

Anti-CRISPR Proteinini	Bulunduğu Profaj(lar)
AcrIIA1	KP1-Φ2, KP3-Φ1
AcrIIA7-0	KP1-Φ1
AcrIIA7-1	KP1-Φ1, KP2-Φ2, KP3-Φ2, KP4-Φ3, KP4-Φ4
AcrIIA7-3	KP2-Φ4
AcrIIA14	KP2-Φ2
AcrIIA15	KP1-Φ1, KP3-Φ1
AcrIIA	KP3-Φ5
AcrVA1	KP2-Φ2
AcrIF9	KP2-Φ7
AcrIF11	KP4-Φ4
AcrIE1	KP4-Φ1

3.3.5.4. Adaptasyon ve stres ile ilişkili proteinler

KP3-Φ1 proprofajında tespit edilen glutaredoksin 1 proteinleri (Grx1), redoks sinyal iletimini düzenler [127]. KP2-Φ1 KP3-Φ3 profajlarında tespit edilen tRNA-dihidroüridin sentaz DusB tRNA üzerinde dihidrouridin sentezini gerçekleştirir. tRNA moleküllerinin stabilitesini ve çevresel strese karşı adaptasyonunu sağlar [128]. KP2-Φ1 profajında tespit edilen cupin alanı içeren protein, bakteri hücresinin asit stresi koşullarında sağ kalımını sağlar. Litik transglikosilaz, bakteriyel katalik bir enzimdir ve bakteri hücre duvarındaki peptidoglikan yapısını keser [129]. KP2-Φ1 profajında tespit edilen asit fosfataz AphA *Escherichia coli* ve *Haemophilus influenzae* için önemli bir periplazmik proteindir. Nükleotitlerin fosfat gruplarını uzaklaştırarak nükleozitlere dönüşümünü katalize eder. Bu süreç bakteriyel beslenme, karbon metabolizması, patogeneze ve virülansını etkiler. Ayrıca cAMP bağlanma proteindir. cAMP tarafından inhibe edilerek bakteriye stres koşullarına adaptasyon sağlar [130]. KP2-Φ1 profajında tespit edilen aromatik amino asit transaminaz, nitrojen kaynağı olarak triptofan ve fenilalanin üretimi için bir amino grubunun bir α -keto aside geri dönüşümlü transferini katalize eder [131]. KP2-Φ1 profajında tespit edilen alanin rasemaz, hücre duvarı bileşeni peptidoglikan sentezi için L-alaninin D-alanine dönüşümünü katalizler [132]. KP3-Φ5 profajında tespit edilen toksik metallerle dirençli olan tellürit direnci TerB proteini tellür gibi toksik metallerin hücreye girişini engeller [114]. KP2-Φ1 profajında tespit edilen faj şok protein G, filamentli faj sekretin proteini IV'ün (pIV) aşırı ekspresyonunda ve protein stres durumlarında ekspresyon seviyesi artar ve konak dış zarında porlar oluşturur. Bu durum fajların montajını ve dışa sekresyonunu kolaylaştırır [133]. KP2-Φ7, KP3-Φ4 profajlarında tespit edilen GrpE ısı şoku proteini (HSP'), fizyolojik ve stres koşullarında protein katlanması, birleştirilmesi, taşınması ve bozunması yoluyla hücresel fonksiyonların sürdürülmesinde rol oynayan temel moleküler şaperonlardır [134, 135, 136]. KP2-Φ1 profajında tespit edilen YmfL proteini, konak hücre adezyonuna ve invazyonuna katkı sağlayarak bakteriye virulan karakter kazandırır [137]. KP2-Φ4 profajında tespit edilen L, D-transpeptidaz ErfK, hücre duvarı sentezi sırasında, penisilin bağlayıcı proteinlerin (PBP'ler), bitişik glikan zincirlerine çapraz bağlanmasını engeller böylece beta-laktam direncine katkı sağlar [138]. KP3-Φ1 profajında tespit edilen oksijene-duyarsız NADPH nitroredüktaz NADPH bağımlı; oksijene duyarsız, nitroaromatik bileşiklerin indirgenmesini katalize eden flavoenzimdir [139]. KP3-Φ2 profajında tespit edilen MarR ailesi transkripsiyonel regülatörü ise, nitroredüktaz genlerinin, kontrolünü sağlamaktadır. Bakteri arkelere ve bazı ökaryotik türlerin genomlarında bulunan nitroredüktazlar, çoğu canlı

organizmalar için toksik ve mutajenik olan nitroaromatik ve nitroheterosiklik bileşiklerin üzerindeki nitro gruplarının NAD (P) H'ye bağlı indirgenmesini katalize ederler. Çeşitli antibiyotiklere, çevresel kimyasal tehlikelere ve spesifik oksidatif stres koşullarına yanıtlarda yer alırlar [139, 140]. KP1-Φ2 proprofajında tespit edilen YafY geni tarafından kodlanan endosomal lipoprotein YafY transkripsiyon faktörü, degP geninin ekspresyonunu indükler. Periplazmik proteazı kodlayan gen degP olumsuz koşullar konak hücre büyümesi için gerekli bir proteindir [141]. KP1-Φ2, KP2-Φ5 K profajlarında tespit edilen PerC family transkripsiyonel regülatör proteinleri sıklıkla profaj bölgelerinde kodlanır. Bakteriyel anaerobik metabolizma ve fimbrialar gibi genlerin düzenlenmesinde rol oynar ve bakterilerin farklı çevresel koşullara uyum sağlama yeteneğine katkıda bulunur [142]. KP1-Φ1 profajında tespit edilen Ren proteini, bakteriyofaj λ'nın RexA ve RexB proteinlerinin etkilerini dengeleyerek, bakterinin UV'e karşı dirençli olmasını sağlar. RexA ve RexB, bir faj dışlama mekanizması olarak görev yapar. Bu sistemin aktif olduğu durumlarda, bakteriyel hücreler UV ışınlarına karşı daha duyarlı hale gelir, ancak Ren proteini bu duyarlılığı azaltarak hücre lizisini önleyebilir [143, 144, 145].

KP1-Φ2, KP3-Φ1, KP4-Φ4 profajlarında bulunan DNA-damage-inducible protein I (DinI) genotoksik strese karşı DNA yapısının hasara karşı korunması ve SOS yanıtı için çeşitli genlerin transkripsiyonunu sağlar. DinI'nın ekspresyonu, RecA'nın koproteaz aktivitesi tarafından düzenlenir [146]. KP2-Φ1 profajında bulunan DNA-damage-inducible protein F (dinF) hücreleri oksidatif strese ve safra tuzlarına karşı koruyan bir membran proteindir. dinF'nin ekspresyonu, SOS sisteminin bir parçası olarak düzenlenir. DNA'ya zarar verme potansiyeline sahip moleküllerin detoksifikasyonunu sağlar [147]. KP2-Φ2 profajında tespit edilen Rrf2 family transcriptional regulator protein, hidrojenden sülfata elektron taşınması için bir sitokrom redoks kompleksini kodlayan hmc operonunun bir baskılayıcısıdır [148]. Fe-S kümelerinin ve Fe-S içeren proteinlerin biyogeneğinde yer alan çeşitli operonların ve genlerin transkripsiyonunu düzenler [149]. KP2-Φ1 proprofajında tespit edilen Zinc uptake regulation protein Zur The Ferric uptake regulator (Fur) ailesi, Çinko homeostazında ve bakterilerin virölansında önemli roller oynar. Zur domaini, çinko duyarlı genlerin promotörlerine bağlanır ve transkripsiyonlarını kontrol eder [150]. KP2-Φ1 profajında tespit edilen PrtN, piyosin sentezi genleri için transkripsiyonel bir aktivatördür. DNA hasarına yanıt olarak aktive olan PrtN transkripsiyon faktörü aracılığıyla düzenlenmektedir. Piyosinler, tür içi rekabette avantaj sağlayan bakteriyosinlerdir ve çoğu faj kökenli yapısal benzerlikler taşımaktadır [151]. KP2-Φ7, KP3-Φ4 profajlarında tespit edilen Iron-uptake factor PiuB hücre içine demir alımını sağlayan bir membran proteindir. Aynı zamanda

Ekzoselüler polisakkarit üretimi, biyofilm oluşumu, hareketlilik, oksidatif stres direnci ile ilişkilidir [152]. KP3-Φ3 profajında tespit edilen Ribosomal protein L11 metiltransferaz, ribozomal RNA büyük alt birimin evrensel olarak korunmuş bir bileşenidir ve protein sentezinin başlatılması, uzaması ve sonlandırılması sırasında rol oynar. L11 metiltransferaz aracılı metilasyonun sinyali yanıtı ve ribozomal homeostazın bakımı için önemlidir [153]. Bu bölge bakterilerde, antibiyotik tiostreptonun hedefidir [154]. Ek olarak bakteri hücrelerinin durağan faza girerken ortaya çıkan amino asit, lipid veya demir açlığı, ısı şoku ve diğer stres koşullarına karşı bir stres tepkisini düzenler [153]. Profajlar üzerinde taşınan adaptasyon ve stres proteinlerine ilişkin detaylı analiz Tablo 9'da verilmiştir. KP4-Φ4 profajında tespit edilen Glutamat 5-Kinaz, prolin biyosentezinin ilk adımını katalizler ve bu süreç, hücrelerin ozmotik streslere karşı korunmasında önemlidir. Fajlar, bu enzimi kullanarak konak hücrenin stres yanıtlarını modüle edebilir [155].

Tablo 9. Profajlar üzerinde taşınan adaptasyon ve stres proteinleri

Protein/Gen	Profaj(lar)	Fonksiyon
Ren proteini	KP1-Φ1	UV ışınlarına karşı direnç, RexA/RexB dengelemesi
YafY endosomal lipoprotein	KP1-Φ2	Stres koşullarında konak büyümesi
PerC proteini	KP1-Φ2, KP2-Φ5	Anaerobik metabolizma ve çevresel adaptasyon
DinI proteini	KP1-Φ2, KP3-Φ1, KP4-Φ4	DNA hasarına yanıt, oksidatif stres yanıtı
DusB proteini	KP2-Φ1, KP3-Φ3	tRNA stabilitesi, stres adaptasyonu
Cupin domain protein	KP2-Φ1	Asit stresinde bakteri sağkalımı
Litik transglikosilaz	KP2-Φ1	Peptidoglikan yapısını kesme
Asit fosfataz AphA	KP2-Φ1	Bakteriyel beslenme, karbon metabolizması, stres yanıtı
Zur proteini	KP2-Φ1	Demir alım regülasyonu ve stres yanıtı
PrtN protein	KP2-Φ1	DNA hasarı stresi yanıtı
Faj şok proteini G	KP2-Φ1	Protein stresi ve konak dış membranında por oluşturma
YmfL proteini	KP2-Φ1	Antibiyotik direnci
DinF proteini	KP2-Φ1	DNA hasarı yanıtı

Tablo 9. Devamı Profajlar üzerinde taşınan adaptasyon ve stres proteinleri

L, D-transpeptidaz ErfK	KP2-Φ4	Hücre duvarı sentezi, beta-laktam direnci
GrpE (ısı şoku proteini)	KP2-Φ7, KP3-Φ4	Protein katlanması ve stres yanıtı
PiuB proteini	KP2-Φ7, KP3-Φ4	Demir alımı ve stres yanıtı
Nitroredüktaz	KP3-Φ1	Flavoenzim
Grx1 proteini	KP3-Φ1	Redoks homeostazı
MarR transkripsiyonel regülatör	KP3-Φ2	Flavoenzim
Rrf2 transkripsiyonel regülatör	KP2-Φ2	Redoks dengesi, stres toleransı
TerB proteini	KP3-Φ5	Toksik metallere direnç
MCP proteini	KP4-Φ3	Çevresel kimyasal sinyallere yanıt
Ribozomal protein L11 metiltransferaz	KP3-Φ3	rRNA regülasyonu ve stres yanıtı
Glutamat 5-Kinaz	KP4-Φ4	Ozmotik stres direnci

3.3.5.5. Regülasyon ve rekombinasyon ile ilişkili proteinler

KP2-Φ2 KP4-Φ3 fajlarında tespit edilen NlpC/P60 family proteinleri, büyüme ve bölünmeye yardımcı olan hidrolazlardır. Peptitlerin kesilimi, peptidoglikan biyosentezi ile hücre duvarı sentezini düzenler. [156]. KP1-Φ1, KP2-Φ2, KP3-Φ2, KP3-Φ4, KP4-Φ1, KP4-Φ4 profajlarında rekombinasyonla ilişkili bazı proteinler tespit edilmiştir. Faj rekombinasyon proteini Bet, holliday junction resolvazı, endodeoksiribonükleazı RusA, HNH endonükleazı, ekzonükleaz fajla ilişkili homing endonükleaz faj rekombinasyon proteini NinB, faj rekombinasyon proteini NinG, proteinleri bakteriyofaj genom regülasyonu ve rekombinasyonunda rol alan genetik varyasyona neden olan red rekombinasyon yolağında yer alan önemli proteinlerdir [157]. KP1-Φ1, KP2-Φ4, KP2-Φ7, KP3-Φ4, KP4-Φ1 fajlarında tespit edilen DNA tamir proteini RecN, ekzodeoksiribonükleaz VIII, Methyl-directed tamir DNA adenin metilaz ve plazmit kodlu Error-prone tamir proteini UmuD, DNA hasarına bağlı SOS yanıtını düzenler [158]. KP3-Φ1 proprofajında tespit edilen sensör iletim regülatörü YbjN, proteobakterilerde bulunan varsayılan bir sensör iletim düzenleyici proteindir. Bazı kararsız proteinler için genel bir stabilizatör olarak çalıştığı

düşünülmektedir [159]. Profajlar üzerinde taşınan regülasyon proteinlerine ilişkin detaylı analiz Tablo 10'da verilmiştir. KP1-Φ1 profajında tespit edilen TagO proteini Tip VI sekresyon sistemi ile ilişkili olup teikoik asit sentezinde rol alır. Konak hücre duvarının yapısal bütünlüğü ve hücre duvarını hidrolize edebilen faj endolizinlerinin hücre duvarına erişimini düzenlerler [160].

Tablo 10. Profajlar üzerinde taşınan regülasyon proteinleri

Protein/Gen	Profaj(lar)	Fonksiyon
TagO proteini	KP1-Φ1	Tip VI sekresyon sistemi
NlpC/P60 proteini	KP2-Φ2, KP4-Φ3	Hidrolaz
YbjN proteini	KP3-Φ1	İletişim
Bet, endodeoksiribonükleazı RusA, HNH endonükleazı, NinB, NinG	KP1-Φ1, KP2-Φ2, KP3-Φ2, KP3-Φ4, KP4-Φ1, KP4-Φ4	Rekombinasyon
DNA tamir proteini RecN, ExoVIII, Error-prone repair protein UmuD,	KP1-Φ1, KP2-Φ4, KP2-Φ7, KP3-Φ4, KP4-Φ1	DNA tamiri

3.3.5.6. Metabolizma ile ilişkili proteinler

KP3-Φ4 profajında tespit edilen Arojenat dehidrataz, corysmate mutaz I / sikloheksadienil dehidrojenaz, pafenat dehidrataz aromatik amino asitlerin biyosentezinde önemli bir rol oynar. Özellikle, corysmate mutaz ve pafenat dehidrataz, pafenatın arojenata dönüşümünü katalize eder. Arojenat dehidrataz ise arojenatı fenilalanine dönüştürür. [161]. KP3-Φ4 profajında tespit edilen guanidinobutiraz, guanidinobütirik asidin biyosentezinde yer alan bir enzimdir. Bu enzim, metabolik süreçlerde önemli bir ara madde olan guanidinobütirik asit üretir. Guanidinobutirazın işlevi, metabolik yollarda ve nörotransmitterlerin sentezinde özellikle önemlidir [162]. KP3-Φ4 profajında tespit edilen SMP-30 / Glukonolaktonaz proteini, hücrel metabolizmanın düzenlenmesinde rol oynarlar. Özellikle, glukonolaktonaz, glukonolaktonun metabolizmasını katalizler ve bu süreç, enerji üretimi ve hücrel homeostaz için önemlidir [163]. KP3-Φ4 profajında tespit edilen LRE (Ligand-Recognizing-Effector) domain içeren proteinler, özellikle hücrel

sinyal iletimi ve metabolik düzenleme gibi temel biyolojik süreçlerde görev alan modüler etkileşim alanlarıdır. Bu proteinler, ligand tanıma ve efektör yanıt başlatma işlevleriyle, hücreler arası iletişimde kilit roller üstlenirler [164]. KP3-Φ4 profajında tespit edilen 2OG-Fe(II) oksijenaz ailesi, oksijen molekülünü kullanarak çeşitli substratları hidroksilleyen enzimlerdir. Bu enzimler, protein modifikasyonu, DNA ve mRNA onarımı ve ikincil metabolitlerin sentezi gibi birçok biyolojik süreçte yer alır [165]. KP1-Φ2, KP3-Φ4, KP4-Φ1 ve KP2-Φ7 profajlarında tespit edilen oksidoredüktaz ve kısa zincir dehidrogenaz/redüktaz (SDR) Ailesi (NAD(P)(H)-bağımlı oksidoredüktazlardan oluşur ve lipid, amino asit, karbonhidrat ve koenzim metabolizmasında, ayrıca redoks sinyalizasyonunda görev alır. Bu enzimler hem fajların hem de konak hücrelerin enerji metabolizması için önemli olabilir [166, 167]. KP4-Φ3, KP4-Φ4 fajlarında tespit edilen Fosfoadenosin Fosfosülfat Redüktaz (PAPS Redüktaz) Ailesi, sülfat metabolizmasında 3'-fosfoadenosin 5'-fosfosülfatın indirgenmesini katalizleyen enzimatik bölümdür. Bu sayede sülfat, biyokimyasal reaksiyonlarda kullanılabilecek aktif forma çevrilir. Bu enzimler, konak hücredeki sülfür metabolizmasını etkileyerek fajların yaşam döngüsünü destekleyebilir [168]. KP4-Φ3 profajında tespit edilen Metil-alıcı kemotaksis protein (MCP), biyofilm oluşumu, flagellum biyosentezi, ksenobiyotik bileşiklerin bozulması, ekzopolisakkarit üretimi ve toksin üretimi dahil olmak üzere hücrel aktivite ve çeşitli yönlerinin düzenlenmesinde rol oynarlar [169, 170].

KP4-Φ4 profajında tespit edilen Gliserol-3-Fosfat Asiltransferaz, gliserolipidlerin biyosentezinde ilk ve hız sınırlayıcı adımı katalizler. Fajlar, bu enzimi kullanarak konak hücre membranlarının lipid bileşimini değiştirebilir [171]. KP2-Φ7, KP4-Φ1 fajlarında tespit edilen Diguanilat siklaz, c-di-GMP'nin yıkımını katalize eden DosP ile hücre içi c-di-GMP seviyelerinin modülasyonunda rol oynar. c-di-GMP seviyesinin aşırı ekspresyonu, hücre yüzeyinde değişikliklere, anormal hücre bölünmesine, biyofilm oluşumunun artmasına ve swimming hareketinin azalmasına neden olur [172]. KP1-Φ1 profajında tespit edilen SGNH/GDSL hidrolaz familya proteinleri; katalitik Ser, His, Gly ve Asn kalıntılarına sahiptir ve genellikle bakteriyofajların kuyruk fiberlerinde bulunurlar. Bu enzim ailesi esteraz ve lipaz aktivitesi ile biyokütle dönüşümü, patogeneze ve hücrel sinyaletiliminde rol alırlar [173]. Profajlar üzerinde taşınan metabolizma proteinlerine ilişkin detaylı analiz Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Profajlar üzerinde taşınan metabolizma proteinleri

Protein/Gen	Profaj(lar)	Fonksiyon
SGNH/GDSL hidrolaz	KP1-Φ1	Biyokütle dönüşümü, patogeneze ve hücrel sinyal iletimi
Dehidrogenaz/ Oksidoredüktaz SDR ailesi	KP1-Φ2, KP3-Φ4, KP4-Φ1 KP2-Φ7	Lipid, amino asit ve karbonhidrat metabolizması; redoks dengelemesi, redoks sinyalizasyonu.
PTS sistemi	KP2-Φ7	Hücre içine şeker alınımı ve fosforilasyon
Diguanilat siklaz	KP2-Φ7, KP4-Φ1	c-di-GMP üretimi, biyofilm oluşumu ve hücre yüzey süreçlerinin kontrolü
Arojenat dehidrataz, chorismate mutaz I/sikloheksadienil dehidrojenaz, prephenat dehidrataz	KP3-Φ4	Aromatik amino asitlerin biyosentezi
Guanidinobutiraz	KP3-Φ4	Guanidinobütirik asit biyosentezi ve metabolik süreçler.
SMP-30/Glukonolaktonaz	KP3-Φ4	Glukonolakton metabolizması ve enerji üretimi
LRE domain protein	KP3-Φ4	Metabolik yollar ve hücrel sinyal iletimi
D-3-fosfoglisarat dehidrojenaz	KP3-Φ4	Glikoliz ve glukoneogenez.
2OG-Fe(II) oksijenaz ailesi	KP3-Φ4	Substratları hidroksilleyen enzimler; gen ekspresyonu, DNA onarımı ve metabolik yollar
Fosfoadenosin fosfosülfat redüktaz (PAPS redüktaz)	KP4-Φ3, KP4-Φ4	Sülfatın sülfite indirgenmesi; kükürt metabolizması
Gliserol-3-fosfat asiltransferaz	KP4-Φ4	Gliserolipid biyosentezi

3.3.5.7. Transport ve membran proteinleri

Genom üzerinde çok sayıda transport ve membran proteini bulunmaktadır. KP2-Φ4 profajında tespit edilen PTS sistemi, hücre zarında yer alır ve temel görevi dış ortamdan çeşitli şekerleri hücre içine alırken aynı anda fosforilasyon yaparak enerjinin verimli

kullanılmasını sağlamaktır [174]. Konak-patojen ve simbiyotik süreçlerle ilişkili olabilmektedir [175]. KP2-Φ4 profajında tespit edilen nükleozit-trifosfat hidrolazlar (NTPazlar), tüm canlı organizmalarda bulunan çeşitli, ancak temel bir enzim grubudur. NTPazlar, nitrojen fiksasyonu sırasında elektron taşınmasından integral zar proteinlerinin doğru zarlarına hedeflenmesine kadar çok farklı işlevlere sahip olsalar da ortak bir atadan evrimleşmişlerdir [176]. KP2-Φ4, KP3-Φ5, KP4-Φ4 fajlarında tespit edilen nitrit taşıyıcıları, bakterilerde nitrat ve nitrit taşınması, ABC taşıyıcıları ve proton motive kuvvetine dayalı sekonder taşıyıcılar tarafından gerçekleştirilir. Bu taşıyıcılar, özellikle NarK ailesi üyeleri, nitrat ve nitritin sitoplazmik membran üzerinden taşınmasında rol oynar [177]. KP3-Φ1 profajında tespit edilen Putresin ABC Taşıyıcısı – PotF, putresin gibi poliaminlerin taşınmasında görev alan bir ABC taşıyıcı sisteminin bağlayıcı proteinidir. Bu sistem, hücre büyümesi ve stres yanıtları gibi çeşitli biyolojik süreçlerde önemlidir [178]. KP4-Φ1 profajında tespit edilen RND efflux pompaları, gram-negatif bakterilerde antibiyotik direncinde kritik rol oynar. Bu taşıyıcılar, toksik bileşenleri hücre dışına atarak bakteri hayatta kalmasını destekler [179]. Profajlar üzerinde taşınan transport ve membran proteinlerine ilişkin detaylı analiz Tablo 12’de verilmiştir.

Tablo 12. Profajlar üzerinde taşınan transport ve membran proteinleri

Protein/Gen	Profaj(lar)	Fonksiyon
ABC taşıyıcıları	KP3-Φ4	Çok çeşitli substratların ATP bağımlı taşınması; besin alımı, toksin dışı atımı ve antibiyotik direnci.
Nitrit taşıyıcıları	KP2-Φ4, KP3-Φ5, KP4-Φ4	Nitrat ve nitritin sitoplazmik membran üzerinden taşınımı.
Putresin ABC taşıyıcısı (PotF)	KP3-Φ1	Poliamin taşınımı; biyofilm oluşumu ve hücre zar bütünlüğü.
Pantothenate:Na ⁺ symporter	KP3-Φ3	Membran taşıma sistemi
Efluks RND taşıyıcı – permeaz alt birimi	KP4-Φ1	Gram (-) bakterilerde antibiyotik direnci; toksik bileşenlerin hücre dışına atılması.

3.3.5.8. Yatay gen transferi ile ilişkili proteinler

KP2-Φ2, KP2-Φ4, KP3-Φ5 fajlarında tespit edilen ParA-like protein, plazmit bölünme sistemi ParAB'nin bir birimi olup plazmitlerle yaygın olarak bulunur. Sahip olduğu ATPaz aktivitesi ile replikasyon sırasında plazmit ve kromozomların düzgün ayrılmasını ve genetik materyalin kaybolmamasını sağlar [180]. KP3-Φ5 profajında tespit edilen IS2 represor TnpA, transpozaz InsD (IS2), genetik materyal transferini sağlayan ve direnç genleri bulundurabilen MGE bölgeleridir [181]. Profajlar üzerinde taşınan MGE ile ilişkili proteinlere ilişkin detaylı analiz Tablo 13'te verilmiştir.

Tablo 13. Profajlar üzerinde taşınan MGE ile ilişkili proteinler

Protein/Enzim	Profaj(lar)	Fonksiyon
ParAB plazmit bölme protein	KP2-Φ2, KP2-Φ4, KP3-Φ5	Replikasyon sırasında plazmit ve kromozomların düzgün ayrılmasını sağlar.
Transposase InsD	KP3-Φ5	Genetik materyal transferi Direnç genlerini taşıyan MGE bölgelerinde bulunur.
Faj Cox (control of excision protein)	KP4-Φ1	Faj DNA'sının konak kromozomuna entegre olması veya oradan çıkmasına aracılık eder.

3.3.5.9. Anti-faj proteinleri

Bazı bakteriyel proteinler, bakterinin faj enfeksiyonlarına karşı savunma sisteminde önemli roller üstlenmektedir. Örneğin, KP1-Φ2 profajında tespit edilen Kiwa anti-faj proteinleri ve KwaB-benzeri domain içeren proteinler, bakterilerin yabancı genetik materyallere karşı korunmasını ve faj enfeksiyonlarına direnç geliştirmesine katkıda bulunur [182]. Buna ek olarak, bazı fajlar da konak bakterinin fizyolojisini bozarak kendi çoğalmaları için uygun ortamı hazırlar. Örneğin KP1-Φ2 profajında tespit edilen faj kökenli bir protein olan YdaT toksin ailesi, konak hücreyi toksik hale getirerek hücre bölünmesini bozar ve böylece bakterinin normal işleyişini engeller [183]. KP2-Φ1, KP4-Φ4 fajlarında tespit edilen YafO toksini, type II toksin-antitoksin sisteminin bir parçasıdır. YafN-YafO operonu tarafından kodlanır ve ribozomlara bağlı olarak mRNA'yı hedef alıp parçalayarak protein sentezini durdurur. Bu sayede hem bakteriyel savunmada hem de bazı hücresel

süreçlerin düzenlenmesinde görev alır [184]. KP2-Φ4 profajında tespit edilen YebO ailesi proteinleri ise, bir bakterinin halihazırda enfekte olduğu faj dışında başka fajlarla süper enfekte olmasını engelleyerek savunma sürecine katkıda bulunur [185]. KP2-Φ7 profajında tespit edilen RatA (YfjG) toksini, ratA-ratB (yfjG-yfjF) operonu tarafından kodlanır ve yalnızca protein sentezini durdurarak bakteriyel fizyolojiyi etkiler. DNA veya RNA sentezine doğrudan etki etmez, ancak protein sentezinin baskılanması yoluyla savunma tepkisi oluşturur [186]. KP4-Φ4 profajında tespit edilen HipA domain-containing protein, bir Ser/Thr kinazdır. Spesifik tRNA sentetazları fosforile ederek protein translasyonunun ve hücre proliferasyonunun inhibiyonu sağlanır. Antibiyotik toleransına neden olan HipA, bakteride geçici bir "uyku" hali yaratarak antibiyotiklerin öldürücü etkisinden kaçınmayı sağlar. Uyku hali durumu beta-laktamlar, aminoglikozidler, kinolonlar ve diğer protein sentez inhibitörlerine karşı tolerans gelişimine neden olabilmekte ve ilaç tedavisi sonrasında da tekrar bakteriyel çoğalmı gerçekleştirilmektedir [187]. KP4-Φ1 profajında tespit edilen DEAD/DEAH-box helikazları, RNA yapısının manipülasyonunda rol alan RNA metabolizma enzimleridir. DEAD/DEAH-box helikazlar, sitozolik DNA/RNA sensörleri, adaptör proteinler veya sinyalizasyon ve gen ifadesinin düzenleyicileri olarak hareket ederek doğuştan gelen bağışıklık sisteminde yer alırlar. Ayrıca DEAD/DEAH-box helikazlar virüsler tarafından konakçı bağışıklığından kaçmak ve viral replikasyona yardımcı olmak için kullanılabilir [188]. DEAD-box helikazlar, antiviral işlevlere sahip olarak ya da proviral faktörler olarak hareket ederek viral yaşam döngüsünde önemli roller oynarlar [189]. Profajlar üzerinde taşınan anti-faj proteinlerine ilişkin detaylı analiz Tablo 14'te verilmiştir.

Tablo 14. Profajlar üzerinde taşınan anti-faj proteinleri

Protein/Enzim	Profaj(lar)	Fonksiyon
Kiwa ve KwaB proteini	KP1-Φ2	Bakterinin yabancı genetik materyale karşı savunma sistemi
YdaT proteini	KP1-Φ2	Konak hücreyi toksik hale getirerek hücre bölünmesini bozar, bakteri fizyolojisini etkiler.
YafO toksini	KP2-Φ1 KP4-Φ4	Tip II toksin-antitoksin sistemi; stres yanıtında ve faj saldırılarına karşı hayatta kalma
YebO proteini	KP2-Φ4	Süper enfeksiyon
RatA (YfjG) toksini	KP2-Φ7	Protein sentezini inhibe eder

Tablo 14. Devamı Profajlar üzerinde taşınan anti-faj proteinleri

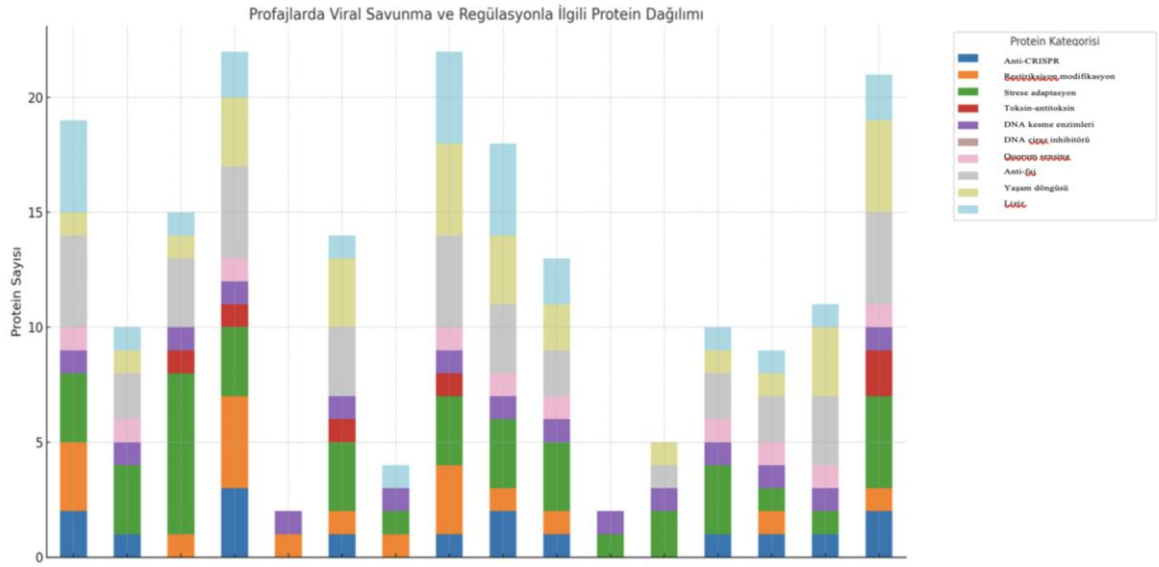
DEAD/DEAH-box helikazları	KP4-Φ1	RNA metabolizması; antiviral savunma, viral replikasyonun engellenmesi
HipA proteini	KP4-Φ4	Ser/Thr kinaz aktivitesi; translasyonun ve hücre proliferasyonunun inhibisyonu, antibiyotik toleransı

3.3.5.10. tRNA analizi

KP1, KP2 ve KP3 izolatlarına ait 7 profajda tRNA bölgeleri tespit edilmiştir. KP4 profajları üzerinde tRNA saptanmamıştır. tRNA translasyon süreci için amino asitlerin ribozoma taşınımından sorumlu hücre içi proteinlerdir. Genellikle Asn ve Arg tipi tRNA'lar baskın olarak bulunmaktadır. Profajlar üzerinde taşınan tRNA tiplerine ilişkin detaylı analiz Tablo 15'te verilmiştir.

Tablo 15. Profajların üzerinde bulunan tRNA Tipleri

tRNA Tipi	Profaj(lar)
Asn (Asparajin)	KP1-Φ1, KP2-Φ2, KP2-Φ4, KP3-Φ2
Arg (Arginin)	KP1-Φ1, KP2-Φ2, KP3-Φ2, KP3-Φ5
Gly (Glisin)	KP2-Φ3
Cys (Sistein)	KP2-Φ3
Leu (Lösin)	KP2-Φ3, KP2-Φ7
Ser (Serin)	KP2-Φ4



Şekil 8. Profajların üzerinde kodlanan savunma ve regülasyon proteinleri

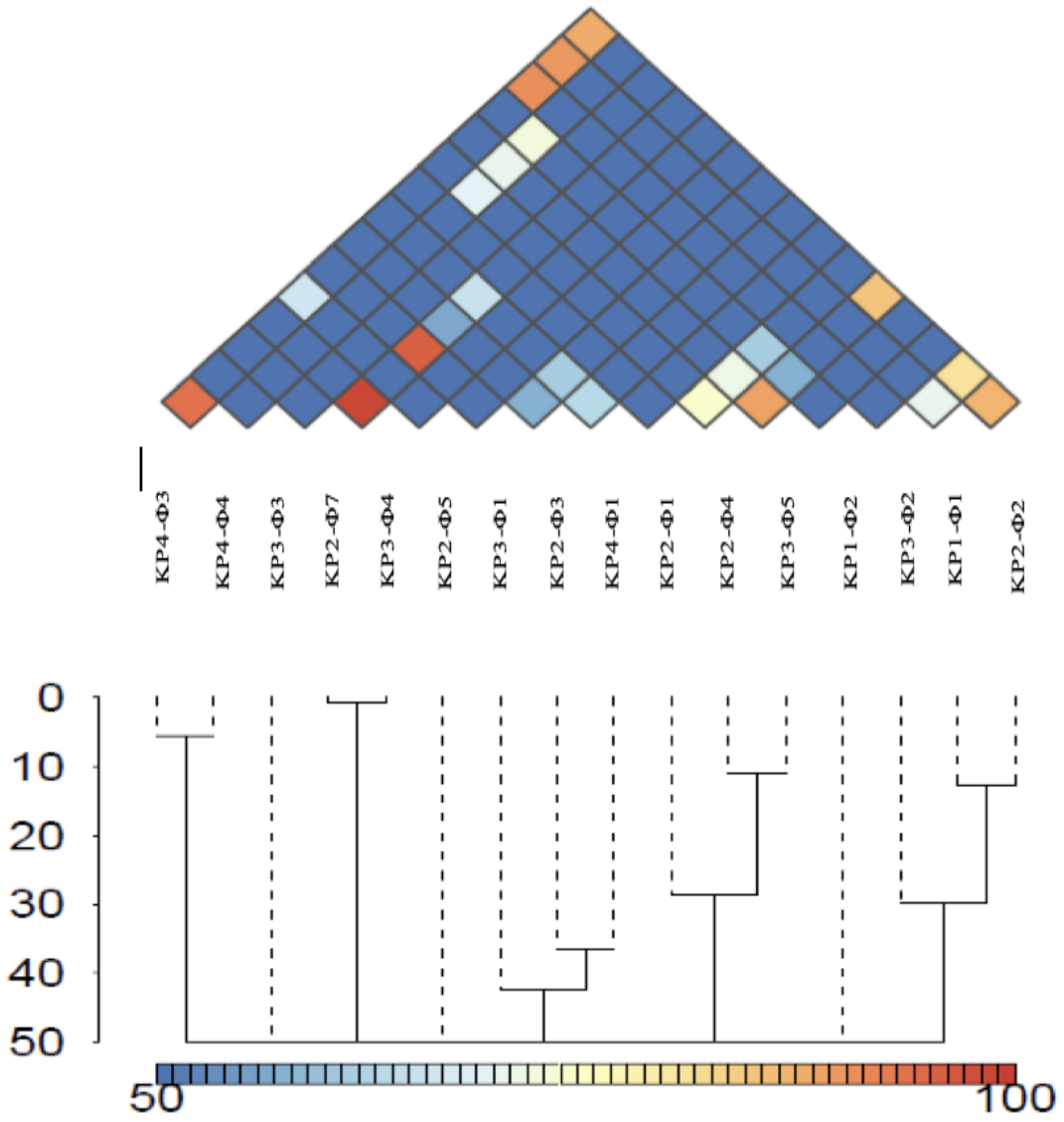
Yukarıdaki görsel, KP1, KP2, KP3, KP4 izolatlarına ait 16 profajda yer alan viral savunma ve regülasyonla ilişkili proteinlerin dağılımını göstermektedir. Her renk farklı bir protein kategorisini temsil etmektedir.

3.4. Pangenom Analizi

16 profajın pangenom analizi yapılmıştır. Toplam 786 pangen tespit edilmiştir. 16 izolatta ortak olarak bulunan core gen ve soft core gen bölgesi bulunmamaktadır. Genomlar arasında paylaşılan çok az ortak gen vardır / veya oranı çok düşüktür. Genomlar yüksek oranda farklı veya genetik olarak çeşitlilik göstermektedir. Profajların genomlarının bir kısmında (%15-%75 oranda bulunan) olan ancak hepsinde olmayan genleri ifade eden 12 adet klondan oluşan 29 Kabuk gen bölgesi tespit edilmiştir. Profaj genomlarında %0-%15 oranda bulunan 624 gen bulut gen olarak belirlenmiştir. 12 kabuk proteinin fonksiyonu bilinmemektedir. Fonksiyonlarına göre 5 adet yapı/montaj, 2 adet litik/lizojeni 1 adet lizis ile ilişkili gen 4 adet faj savunma proteinleri 4 adet regülasyonla ilişkili ve 1 adet MGE ilişkili gen bölgesi tespit edilmiştir. En çok ortak gen bölgesi taşıyan profajlar ve ortak gen sayıları şu şekildedir; KP1-Φ1; KP2-Φ2 (23), KP1-Φ1; KP4-Φ3 (20), KP2-Φ2; KP4-Φ3 (24), KP2-Φ4; KP3-Φ5 (24), KP2-Φ7; KP3-Φ1 (33), KP2-Φ7; KP3-Φ4 (19), KP3-Φ2; KP4-Φ3. Profajlar üzerinde taşınan ortak proteinlerine ilişkin detaylı analiz Şekil 8. ve Tablo 16'de verilmiştir.

Tablo 16. Kabuk genleri ve bulundukları profajlar

Profajlar	Gen sayısı	Kabuk genler
KP1-Φ1; KP2-Φ2; KP4-Φ3	1	Hipotetik protein
KP1-Φ1; KP2-Φ2; KP2-Φ5	1	Hipotetik protein
KP2-Φ5; KP3-Φ2; KP4-Φ4	1	Hipotetik protein
KP1-Φ1; KP2-Φ2; KP4-Φ3	12	Faj N-6-adenin-metiltransferaz Faj antiterminasyon protein Q Lizozim Terminaz Hipotetik protein(4x) Faj head morphogenesis Faj tail tape measure family protein Nlpc/P60 Faj Host özgüllük faktörü J kuyruk proteini
KP2-Φ1; KP2-Φ3; KP2-Φ7	1	IS1-like element IS1B family Transpozaz
KP1-Φ1; KP3-Φ2; KP4-Φ3	2	Trar/dksa transkripsiyonel regülatör* Faj N-6-adenin-metiltransferaz
KP2-Φ2; KP3-Φ2; KP4-Φ3	1	Hipotetik protein
KP2-Φ4; KP3-Φ5; KP4-Φ4	4	Parb/repb/Spo0J proteini Nitrit transporter Hipotetik protein Faj Host özgüllük faktörü J kuyruk proteini
KP2-Φ7; KP3-Φ1; KP4-Φ1	1	Replikasyon endonükleaz
KP1-Φ1; KP2-Φ2; KP3-Φ2; KP4-Φ3	4	CII transkripsiyonel regülatör Hipotetik protein(2x) Host nükleaz inhibitor Gaml
KP1-Φ1; KP2-Φ4; KP3-Φ5; KP4-Φ4	1	Hipotetik protein
KP1-Φ1; KP3-Φ5; KP4-Φ3; KP4-Φ4	1	SGNH/GDSL hidrolaz



Şekil 9. Profajlar üzerinde kodlanan ortak genlerin dağılımı

Üstteki matristeki her kare iki profaj arasındaki ortak gen sayısını gösterir. Kırmızı tonlar yüksek, mavi tonlar düşük ortak gen sayısını ifade eder. Alttaki dendrogram profajlar arası gen benzerliğini gösterir. Yakın dallar, daha fazla ortak gene sahip profajları ifade eder.

3.5. Filogenetik Analiz

3.5.1. Nükleik asit dizisine göre yakın ilişkili fajlar ile intergenomik analiz

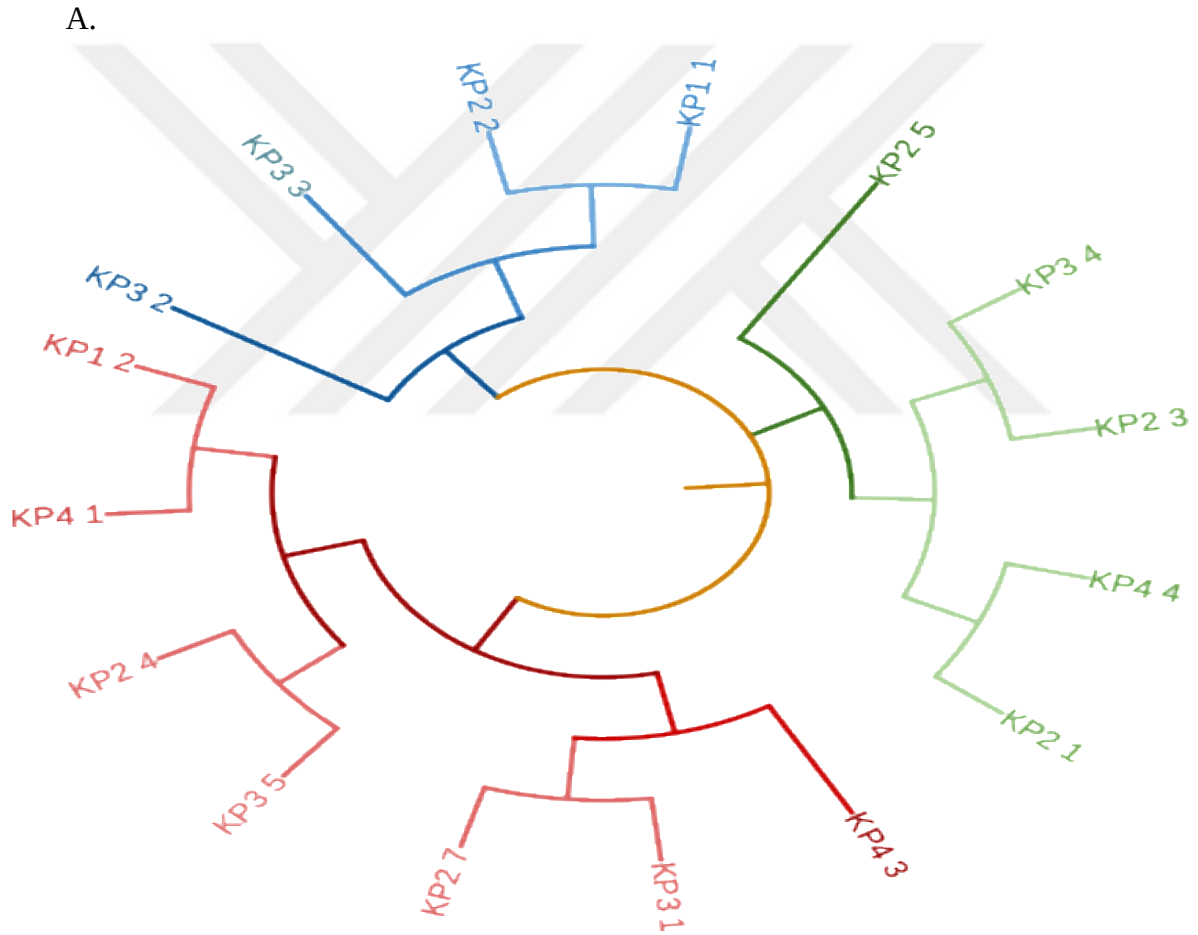
16 faj ve yakın ilişki oldukları 10 faj arasındaki intergenomik benzerlik görülmüştür. Buna göre KP3-Φ1; NC_047818.1 profajı ile %91.5, KP2-Φ7 profajı ile %47.9 ve NC_049342.1 fajı ile %53.9 benzerliğe sahiptir. KP3-Φ1 ve KP2-Φ7 aynı türün farklı varyantları olabilirler. KP2-Φ7; KP3-Φ4 profajı ile %33.5, NC_500465 fajı ile %55.3 intergenomik benzerliğe sahiptir. KP4-Φ1 profajı, NC_049450.1 fajı ile %70.2 intergenomik benzerliğe sahiptir. KP1-Φ1 profajı ile KP2-Φ2 profajı arasındaki benzerlik oranı %38.0 iken KP4-Φ3 profajı ile benzerliği %33.7 olarak bulunmuştur. KP2-Φ2 ile KP4-Φ3 arasındaki intergenomik benzerlik %40.8'dir. KP1-Φ2 profajı; NC_005857.1 fajı ile intergenomik benzerlik oranı %31.8 iken NC_021857 fajı ile %48.9'dur. KP2- Φ5 profajı ile NC_004775.2 fajı arasındaki intergenomik benzerlik %32.3'dür.

Tablo 17. Yakın İlişkili Bakteriyofajlar ve Morfotipleri

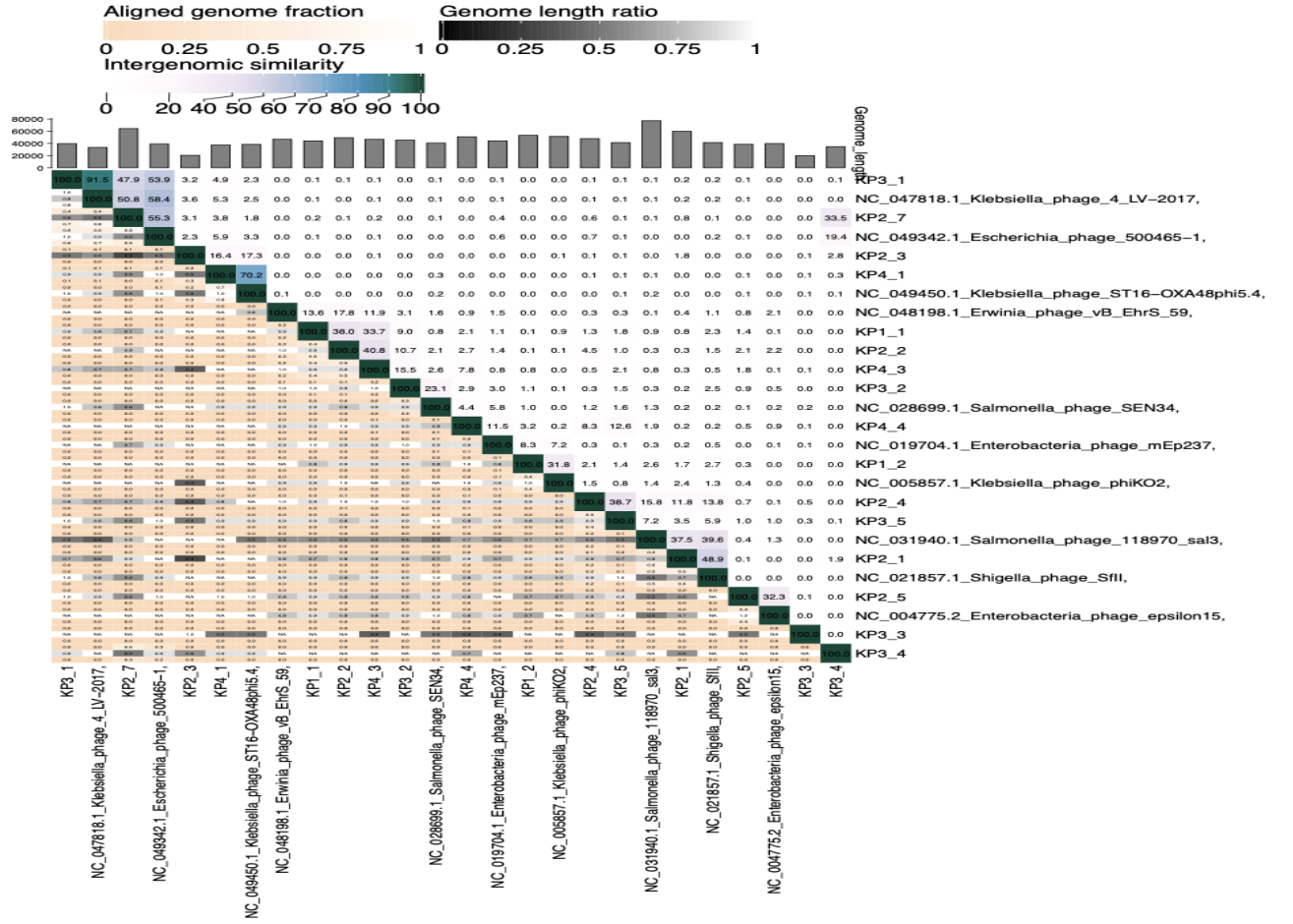
Profaj no	Yapısal gruplandırma	Yakın ilişkili fajlar
KP1		
KP1-Φ1	Siphoviridae Tip 1	FAJ_Erwin_vB_EhrS_59_NC_048198
KP1-Φ2	Siphoviridae Tip 1(Küme 3)	FAJ_Klebsi_phiKO2_NC_005857
KP2		
KP2-Φ1	Myoviridae Tip 1(Küme 3)	FAJ_Shigel_SfII_NC_021857
KP2-Φ2	Siphoviridae Tip 1	FAJ_Erwin_vB_EhrS_59_NC_048198
KP2-Φ3	Myoviridae	FAJ_Klebsi_ST16_OXA48phi5.4_NC_049450
KP2-Φ4	Siphoviridae Tip 1(Küme 3)	FAJ_Salmon_118970_sal3_NC_031940
KP2-Φ5	Podoviridae Tip 3	FAJ_Salmon_epsilon15_NC_004775
KP2-Φ7	Myoviridae Tip 1(Küme 9)	FAJ_Escher_500465_1_NC_049342
KP3		
KP3-Φ1	Myoviridae Tip 1(Küme 9)	FAJ_Klebsi_4LV2017_NC_047818
KP3-Φ2	Myoviridae Tip 1(Küme 7)	FAJ_Salmon_SEN34_NC_028699
KP3-Φ3	Siphoviridae Tip 1(Küme 3)	FAJ_Salmon_118970_sal3_NC_031940

Tablo 17. Devamı Yakın İlişkili Bakteriyofajlar ve Morfotipleri

KP3-Φ4	Tespit edilemedi	FAJ_Escher_500465_1_NC_049342
KP3-Φ5	Siphoviridae Tip 1(Küme 3)	FAJ_Salmon_118970_sal3_NC_031940
KP4		
KP4-Φ1	Myoviridae Tip 1(Küme 9)	FAJ_Klebsi_ST16_OXA48phi5.4_NC_049450
KP4-Φ3	Siphoviridae Tip 1	FAJ_Erwini_vB_EhrS_59_NC_048198
KP4-Φ4	Siphoviridae Tip 1(Küme 5)	FAJ_Entero_mEp237_NC_019704



B.



Şekil 10. Yakın ilişkili fajların filogenetik ağacı ve intergenomik analizi

A) 16 profajın filogenetik ağacı, B) BLASTn veri tabanında 16 profaj'ın yakın dizi benzerliğine sahip fajlar ile VIRIDIC analizi. Koyu renkler, genomlar arasında yüksek benzerliği gösterir. Üstteki şeritler, hizalanan genom oranı ile genom uzunluklarının benzerliğini belirtir; koyu renkler ve uzun şeritler, yüksek uyumu ifade eder. Sol kısımdaki mavi tonlar yüksek, turuncu tonlar ise düşük benzerlik oranlarını yansıtır. Siyah, yüksek oranları; açık gri düşük oranları temsil eder.

3.5.2. Genler arası mesafeler

KP1-Φ1, KP2-Φ1, KP2-Φ5, KP3-Φ2, KP3-Φ5, KP4-Φ3, KP4-Φ4 fajları analiz verilerine göre bazı genler arasında beklenmedik mesafe(ler) sahiptir. KP2-Φ2 profajında; Tc1<->Hc1, Ne1<->Hc1, Tc1<->AD1 ve Ne1<->AD1 proteinlerini kodlayan genler arasında beklenmedik mesafe(ler) vardır. KP2-Φ7 profajında, Tc1<->Ad1 ve Ne1<->Ad1 proteinlerini kodlayan genler arasında beklenmedik mesafe(ler) vardır. KP3-Φ1 profajında,

Tc1<->Ad1 ve Ne1<->Ad1 proteinlerini kodlayan genler arasında beklenmedik mesafe(ler) vardır. KP4-Φ1 profajında ise Tc1<->Ad1 ve Ne1<->Ad1 proteinlerini kodlayan genler arasında beklenmedik mesafe(ler) vardır.

3.5.3. Yapısal homoloji

16 profaj için en yakın faj homologları tespit edilmiştir. Aynı kümede yer alan çoğu profaj için genomlarında tespit edilen ilgili genlerin farklı fajlar ile homoloji gösterdiği görülmüştür. KP2-Φ5 Podoviridae of Tip 3, KP2-Φ3 Myoviridae ailesi, KP1-Φ1, KP2-Φ2 ve KP4-Φ3 Siphoviridae Tip 1 ile ilişkilendirilmiştir. Ancak küme tespiti için yeterli proteom benzerliği saptanamamıştır. FAJ_Escher_500465_1_NC_049342 fajı ile dizi homolojisine sahip KP3-Φ4 genomunda ilgili proteinlerin hiçbiri bulunmamakta olup morfotipi tespit edilememiştir. KP1-Φ2, KP2-Φ4, KP3-Φ3, KP3-Φ5 profajları yapısal olarak Siphoviridae Tip 1 Küme 3 ailesine atanmıştır. KP1-Φ2fajı; MCP, portal, MTP, Ad1, Hc1, Ne1, Tc1 proteinleri faj phiKO2 (%89, %90, %84, %91, %91, %93, %84) ile ilişkilendirilmiştir. TermL proteini ise faj PY54 (%58) ile ilişkilendirilmiştir. KP2-Φ4 fajı; MCP ve TermL, proteini için ST64B (%84), MTP, Hc1, Ne1 ve Tc1 proteinleri için faj HK97(%67, %66, %83, %57) ile benzer olduğu tespit edilmiştir.

Ad1 ve portal proteinleri ise sırasıyla faj V (%43) ve faj P27 (%82) ile ilişkilendirilmiştir. KP3-Φ3 fajı; ilgili proteinlerin dizi benzerliğine göre P27, ST64B, Geobacillus virus E2, P27 veHK97 fajları ile düşük yüzde benzerliğine sahiptir. KP3-Φ5 fajı; MCP, portal, TermL, Ad1 proteinleri faj V (%70, %85, %38, %50) ile ilişkilendirilmiştir. MTP, Hc1, Ne1 ve Tc1 proteinleri ise faj HK97 (%66, %64, %83, %57) ile ilişkilendirilmiştir. KP4-Φ4 profajı yapısal olarak Siphoviridae Tip 1 Küme 5 ailesine atanmıştır. KP4-Φ4 profajı; benzerlik oranları düşük olmakta birlikte MCP proteine için %19 benzerlikle faj A500'e; portal, Hc1 ve Tc1 proteinlerine için sırasıyla %35, %22 ve %22 benzerlik ile faj M6 fajına benzerdir. TermL proteini için faj KS7 ile %43 benzerdir. Ad1 proteini için %25 benzerlikle faj Xp15 ve Ne1 proteini için ise %22 oranda RTP fajı ile benzer olduğu görülmüştür. KP2-Φ1 profajı Myoviridae Tip 1 Küme 3 ailesine atanmıştır. KP2-Φ1 profajı; MCP ve Portal proteinleri açısından ST64B (%96, %99) (*Salmonella enterica*) fajı ile en benzerken; TermL, Sheath, Ad1, Hc1, Ne1, Tc1 proteinleri için fajV (%96, %99, %86, %82, %92, %98) (*Shigella flexneri*) ile yakın ilişkilidir. KP3-Φ2 profajı Myoviridae Tip 1 Küme 7 ailesine atanmıştır. KP3-Φ2 profajı; ilgili proteinlerin dizi

benzerliğine göre B054, Aaphi23, F8, Bcep43, BcepNY3 fajları ile düşük yüzde benzerliğine sahiptir. KP2-Φ7, KP3-Φ1, KP4-Φ1 profajları Myoviridae Tip 1 Küme 9 ailesine atanmıştır. KP2-Φ7 profajı; MCP proteini faj 186 (%59) ile ilişkilendirilmiştir. TermL, Ne1, portal proteinleri sırasıyla %67, %47, %67) faj RSA1 ile benzerdir. Sheath, MTP faj PSP3 ile (sırasıyla %69, %58) benzerdir. Ad1 proteini faj PSP3(%43) ile benzerken Tc1 proteini faj WPhi (%47) ile benzerdir. KP3-Φ1 profajı; MCP, Ne1proteinleri faj 186(%59, %48) ile ilişkilendirilmiştir. Portal, TermL proteinleri faj RSA1(%66, %67), MTP, sheath proteinleri faj PSP3(%58,%69), Ad1 proteini faj phiE202 (%43) ve Tc1 proteini faj L-413C (%48) ile ilişkilendirilmiştir. KP4-Φ1 profajı; ilgili proteinlerin dizi benzerliğine göre phi CTX, L-413C, 186, phiE202, RSA1 fajları ile düşük yüzde benzerliğine sahiptir. Yakın ilişkili bakteriyofajlar ve morfotiplerine ilişkin detaylı analiz Tablo 17’de verilmiştir.

4. TARTIŞMA

KDKP izolatları, günümüzde çoklu ilaç direnci geliştirmiş olmaları nedeniyle DSÖ'nün kritik öncelikli listesi içerisinde yer alan küresel bir halk sağlığı tehdididir. Bu bakteriler, evrimsel süreçte yatay gen transferi mekanizmaları aracılığıyla yalnızca antimikrobiyal direnç kazanmakla kalmayıp, aynı zamanda farklı çevresel koşullara adaptasyon yeteneklerini de artırmışlardır. Bu adaptif avantajlar, söz konusu bakterilerin eradikasyonunu oldukça güçleştirmektedir. Yatay gen aktarımında plazmitlerin rolü uzun süredir araştırılmakta ve iyi bilinmektedir; ancak genom dizileme platformların gelişmesi ile çoğu bakteri genomunda %20 gibi yüksek oranlarda profaj dizileri tespit edilmiştir [4]. Profajların ilgili direnç genlerinin ediniminde ve bakteri türleri arasındaki yayılımına aracılık etmesindeki rolü ve konak bakteri hücreesindeki; virülansı, konak genomundaki genlerinin ekspresyonu ve biyolojik özelliklerini etkilemesi, biyofilm oluşturma özelliği, antibiyotik direnci, bağışıklığı gibi hücresel olaylardaki rolü ve özellikle KDKP izolatları açısından oynadığı rol hâlâ yeterince aydınlatılamamıştır. Bu bağlamda, tez çalışmamızda farklı sekans tiplerine sahip klinik izolatlarda yer alan profaj dizilerini tanımlamayı ve bu dizilerin konak genomuna katkılarını genomik düzeyde incelemeyi amaçladık. İlgili sekans tipleri yeni genetik parçalar edinme ve daha fazla virülans ve direnç belirteçlerini yakalama eğiliminde olup epidemiyolojik olarak da yüksek riskli ve çoklu ilaç direnci ile ilişkili olduğu bilinmektedir [190, 191].

Bu klinik izolatların genomlarına entegre olan 19 lizojenik profaj dizisinden faj bütünlüğü açısından yüksek skoru olan 16'sı çalışmaya dahil edilmiş, bu profajların genomik özellikleri biyoinformatik araçlarla analiz edilmiş ve bakteri genomuna olası katkıları araştırılmıştır. Belirlenen 16 profajın litik döngüye indüklenebilirliklerini değerlendirmek amacıyla MitC UV, antibiyotik ve litik fajlarla etkileşim gibi çeşitli indüksiyon protokolleri uygulanmış ve biyolojik ve morfolojik özelliklerinin de incelenebilmesi için kültürle izole edilmeye çalışılmıştır. Profajların agar üzerindeki faj plaklarının görünürlüğünü artırmak amacıyla MTT boyama yöntemi uygulanmıştır. MTT uygulaması sonrasında plak oluşumu gözlenmiş olsa da izolasyonları ve pürifikasyonları gerçekleştirilememiştir. İndüksiyon başarısını ortaya koymak için moleküler düzeyde analizler gerçekleştirilmesi gerekmiştir. Zira bazı profajlar, geleneksel indüksiyon faktörlerine karşı duyarsız olabilmekte ve bu durum klasik yöntemlerle tespit edilmelerini engellemektedir.

Bu noktada, profaj indüksiyonunun güvenilir şekilde değerlendirilebilmesi için indüksiyon protokolleri sonunda filtre işlemi sonrasında faj DNA izolasyonu ve sekans analizi gerçekleştirilmiş, ayrı contig oluşturan faj dizileri biyoinformatik analizle gösterilmiş ve kromozomda saptanan faj bölgeleriyle hizalanmıştır. Literatürde de profajların indüklenebilirlikleriyle ilgili benzer durumlar rapor edilmiştir. Örneğin, *Lactococcus lactis* suşlarında *mitC* ile indüklenemeyen profajlar, yalnızca DNA temelli analizlerle tespit edilebilmiştir [192]. Yine başka bir çalışmada, yüksek verimli dizileme teknikleri sayesinde klasik yöntemlerle saptanamayan profajların genomik lokalizasyonları başarıyla belirlenmiştir [193]. Bu çalışmalar, profajların bazı durumlarda çok düşük frekanslarda spontan litik döngüye geçebileceğini ve bunun agar plaklarında gözle görülür bir faj plağı oluşturmaya yetemeyebileceğini göstermektedir. Ayrıca, *Corynebacterium glutamicum* suşlarında yer alan CGP3 profajının sadece küçük bir hücre alt popülasyonunda spontan olarak indüklenebildiği; bu nedenle klasik yöntemlerle tespit edilemediği bildirilmiştir [194]. İndüksiyonun gerçekleşmemesinin bir diğer nedeni ise çevresel koşullar olabilmektedir. pH, iyon dengesi, agar konsantrasyonu ve oksijen miktarı gibi parametreler, faj replikasyonu ve yayılımı üzerinde baskılayıcı etkiler oluşturabilir [195]. Bunlara ek olarak, fajların başarılı şekilde replike olabilmeleri, konak hücrenin fizyolojik durumu ile doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle, plak oluşumunun gözlenmemesi yalnızca profajın indüklenememesine değil, aynı zamanda enfeksiyöz faj partiküllerinin üretilmemesine de bağlı olabilmektedir. Profajların enfeksiyöz faj partikülleri oluşturamaması ise genellikle defektif yapılarına dayanmaktadır. Bu durum; profaj genomundaki mutasyonlar, yapısal genlerdeki (örneğin kapsid veya kuyruk proteinleri) bozulmalar, eksik paketleme mekanizmaları ve hatalı DNA replikasyonu gibi faktörlerden kaynaklanabilir. Örneğin, fajın kapsid ya da kuyruk proteinlerini kodlayan genlerinde oluşan mutasyonlar sonucunda yeni faj partiküllerinin üretilmemesi, plak oluşumunun gözlenmemesine yol açmaktadır [5, 196]. Bu bağlamda, birçok bakteriyel genomda defektif profajların bulunduğu ve bunların aktif faj üretme yeteneğini yitirdikleri bilinmektedir. Bu çalışma kapsamında analiz edilen ve *MitC*, UV, litik fajlara mazuriyet gibi klasik indüksiyon faktörlerine maruz bırakıldığında enfeksiyöz faj partikülü oluşturamayan profajların, düşük hareketlilik potansiyeline sahip oldukları ve bu durumun çeşitli genetik bozukluklardan kaynaklanabileceği öngörülmüştür. Bu hipotez doğrultusunda her bir profajın genomik yapısı ayrıntılı olarak analiz edilmiştir. Yapılan karşılaştırmalı analizler sonucunda, bazı yapısal genlerin referans profaj dizilerine göre konumlarının farklı olduğu tespit edilmiştir. Bu tür yapısal kaymalar, faj partikülünün

doğru şekilde oluşmasını engelleyebilecek nitelikte olabilir. Genler arası optimal mesafenin bozulması, ORF kaymasına ve bunun sonucunda hatalı ya da yetersiz protein ekspresyonuna neden olabilir. Bu tür bozulmalar, litik döngüde görev alan kritik genlerin de işlevsiz hale gelmesine yol açarak indüksiyon başarısızlığına katkı sağlayabilir. Ayrıca, genlerin genom üzerindeki organizasyonunun değişmiş veya bozulmuş olması, transkripsiyonel düzenlemeleri etkileyerek faj aktivitesini olumsuz yönde etkileyebilir.

Bir diğer olası mekanizma ise, bazı profajların kendi genomları tarafından kodlanan gen ürünlerinin indüksiyon sürecinde represör işlevi görmesidir. Bu represör proteinler, litik döngü aktivasyonunu baskılayarak profajların lizojenik durumda kalmasını sağlar. Dolayısıyla, profajların indüksiyon başarısızlığı, hem yapısal-genetik hem de düzenleyici (regülatör) faktörlerin etkileşimli bir sonucu olabilir. Örneğin, Ren proteininin bir faj (özellikle λ faji) tarafından bakteri genomuna taşınması, bakteriye doğrudan avantaj sağlamaz; aksine, bu olay genellikle fajın kendi replikasyon döngüsünü optimize etmek için gerçekleşir. Ancak, Ren proteininin bakteriyel hücre içinde yaratabileceği etkiler, bakterinin metabolizması ve stres yanıtları üzerinde dolaylı etkiler olabilir. KP1- Φ 1 ve KP2- Φ 2 profajlarında tespit edilen Ren proteini, λ fajının rexA ve rexB genlerinin birlikte ifade edilmesinin neden olduğu UV ışınına duyarlılığı azaltır. rexA ve rexB ekspresyonu, promotöründeki bir mutasyonla birlikte zamanından önce hücre lizisine neden olabilir. Ren proteini bu lizisi senkronize ederek fajın daha verimli çoğalmasını sağlar ve hücre ölümünü kontrol altına alır [143, 144, 145]. Bir başka adaptasyon proteini olan Din, bakteriyel SOS yanıtına bağlı olarak profaj indüksiyonunun inhibisyonunda rol alabilir. Bu inhibisyon, fajın lizojenik durumda kalmasını sağlayarak, konak savunma mekanizmalarından kaçmasına ve DNA hasarı koşullarında hayatta kalmasına olanak tanımaktadır [146]. Ayrıca SOS yanıtı sırasında önemli olan peptidaz motifleri eksik veya kusurlu ise RecA veya LexA aracılı mekanizmaların etkinleşmesini kısıtlar ve başarısız profaj indüksiyonu ile sonuçlanmasını açıklayabilir [112]. Ancak bu etkileşimlerin fonksiyonel düzeyde doğrulanabilmesi için ilave deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca birçok faj, rolleri tam olarak anlaşılamayan çeşitli tRNA genlerini kodlar, bunların litik süreçte translasyon verimliliğini artırdıkları veya konakçı tRNA'ları bozan konakçı savunmalarına karşı koydukları öne sürülmüştür [197]. tRNA eksikliği olan bir faj mutantının net plaklar oluşturdukları ve zorunlu litik büyümeye yol açtıkları bildirilmiştir. Profajlar üzerinde çok sayıda ve çeşitli tipte tRNA'ların taşındığı görülmüştür. Bu tRNA'lar, özellikle lizojeninin kurulması sırasında faj plak fenotipini ve oluşum verimini etkileyebilir; bu nedenle klasik plak tespit yöntemlerinde yanlış yorumlara

yol açabilir. [198]. İndüksiyon aynı zamanda litik faj maruziyeti ile tetiklenmeye çalışılmıştır. KP2-Φ4 profajında tespit edilen ve fonksiyonu net olarak bilinmeyen YebO membran proteininin, süper enfeksiyona neden olarak konak hücrenin başka fajlar tarafından enfekte olmasını önlediği bilinmektedir [185]. Bu sebeple ilgili profajın plak oluşumu gözlemlenecek kadar faj partikülü üretememiş olmasını açıklayabilir.

Plazmitler gibi profajlar da antibiyotik direnç ve virülans genlerinin yatay gen transferi yoluyla taşınmasında görev alan önemli genetik araçlar olarak dikkat çekmektedir. Bu çalışmada elde edilen veriler, profajların antibiyotik direnç genlerini taşımadıkları ancak konak genomunun genetik çeşitliliğine ve potansiyel patojenitesine anlamlı düzeyde katkı sağlayabileceğini göstermektedir. Profaj bölgelerinde tespit edilen bazı genler; konak bakterinin virülansını artırma, metabolik kapasitelerini genişletme ve çeşitli çevresel stres faktörlerine karşı adaptasyon yeteneğini geliştirme potansiyelini sağlayabilmektedir. Ayrıca, hücresel düzenleme süreçleriyle ilişkili bazı regülatör genlerin de profaj bölgelerinde yer aldığı saptanmış olup, bu genlerin konak hücrenin antibiyotiklere, çevresel streslere ve diğer baskılayıcı koşullara uyum sağlamasında rol oynayabileceği değerlendirilmektedir [199]. Bakteri sağ kalımı ve stres yanıtını düzenleyen transport sistemi proteini olan PotF proteininin, *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonadaceae* üyesi mikroorganizmalarda bulunduğu ve bunların en sık putresin üreticileri arasında yer aldığı bildirilmiştir [200]. KP3-Φ1 profajında tespit edilen Putresin, stres yanıtında ve sinyal molekülleri olarak biyolojik aktivite gösterir [201]. Bunun dışında, KP2-Φ1 profajında tespit edilen oksijene duyarlı NADPH nitroredüktaz, glutaredoksin 1 proteinleri redoks düzenleme ve stres yanıtında yer alırken; asit fosfataz AphA bakteriyel beslenme, karbon metabolizması, patogenez ve virülansını etkilemektedir [130]. KP1-Φ1 profajında tespit edilen SGNH/GDSL hidrolazları, biyokütle dönüşümü, patogenez ve hücresel sinyal iletiminde rol alan terapötik hedef bölgelerdir [173]. Ayrıca, KP1-Φ2 ve KP2-Φ5 profajlarında tespit edilen PerC familyasına ait transkripsiyonel regülatör proteinlerinin, fimbrial yapıların sentezi ve anaerobik metabolizma gibi çevresel adaptasyona yönelik genlerin düzenlenmesinde rol aldığı bilinmektedir [142]. Bu regülatörlerin, profaj kaynaklı ekspresyonları yoluyla konağın çeşitli stres koşullarına karşı direnç geliştirme kapasitesini dolaylı olarak artırabileceği düşünülmektedir. Bu bulgular çeşitli çalışma verileri ile desteklenmektedir. Örneğin *E. coli* K-12'de bulunan 9 profajın silinmesi sonucu konağının biyofilm oluşturma ve olumsuz ortamlara karşı adaptasyon yeteneğinin olumsuz yönde etkilendiği tespit edilmiştir [40].

Staphylococcus aureus'ta profajların virölans, antibiyotik direnci ve genom evrimindeki rollerine vurgu yapılmıştır.

Çalışma verilerine göre, virölans faktörlerini ve antibiyotik direncini kodlayan genlerle binlerce varsayılan profaj dizisi keşfedilmiştir. Profajlar üzerinde yer alan virölans veya direnç genlerinin yatay gen transferi mekanizmalarıyla farklı bakteriyel taksonlara aktarılabilirdiği ve profajlara ait genlerin ile fonksiyonların tespiti sayesinde bakteriyel suşlar arasındaki evrimsel ilişkiler ve yayılım dinamikleri hakkında önemli bilgiler elde edilebileceği vurgulanmıştır [52]. *Streptococcus*'ta, vanG tipi vankomisin direnç lokusu ve oksazolidinon direnç geni *optrA* dahil olmak üzere on antimikrobiyal sınıfa direnç kazandıran yirmi beş antimikrobiyal direnç geni barındıran SMfajlar olarak adlandırılan yaygın bir profaj ailesi karakterize edilerek profajların direnç genlerinin yayılımına katkısı vurgulanmıştır [58]. *R. solanacearum*'da PhiRSM'nin entegrasyonun virölansı azalttığı tespit edilmiştir [50]. *STEC* suşlarında ise spontan profaj indüksiyonu sonucu kolonizasyon için gerekli olan tip 3 sekresyon sisteminin CII tarafından negatif olarak kontrol edildiği görülmüştür [53, 54].

Çalışmaya dahil edilen bakterilere daha ayrıntılı baktığımızda, ST985 sekans tipli izolatta tespit edilen profajlar üzerinde AMD geni tespit edilmemiştir. Ancak üzerlerinde taşıdıkları çeşitli genler bakteriyel virölans ve patojenite katkı sağlamaktadır. Örneğin KP1-Φ1 üzerinde bulunan Ren proteini ve KP1-Φ2 profajı üzerinde tespit edilen PerC, DinI ve YafY endosomal lipoproteinler, çeşitli stres faktörlerine karşı genom bütünlüğünün korunmasını ve farklı çevresel koşullara adaptasyonu sağlayan önemli stres proteinlerdir [141, 142, 143, 146]. Ayrıca KP1-Φ2 profajı üzerinde tespit edilen çeşitli dehidrogenaz ve hidrolaz proteinleri, konak hücrenin lipid, amino asit, karbonhidrat ve koenzim metabolizması, redoks sinyalizasyonu ve enerji metabolizması için önemlidir. KP1-Φ1 profajında tespit edilen TagO proteini ise bakterinin hücre duvarı bileşeni sentezinde rol alarak hücre duvarının yapısal bütünlüğü sağlayarak bakteriye avantaj kazandırmaktadır [160].

ST101 özellikle nazokomiyal enfeksiyonlarla ilişkili istilacı bir klon olup diğer ST'lere kıyasla artan ölüm oranlarıyla ilişkilidir [202]. Bu izolatta tespit edilen profajlar üzerinde AMD genine rastlanmamıştır. Ancak KP2-Φ4 profajında tespit edilen L, D-transpeptidaz ErfK, hücre duvarı sentezi sırasında, penisilin bağlayıcı proteinlerin, bitişik glikan zincirlerine çapraz bağlanmasını engelleyerek beta-laktam antibiyotiklerin etkinliğini inhibe ederek antimikrobiyal dirence katkı sağlıyor olabilir [137]. Ek olarak profajlar üzerinde çok sayıda ve çeşitte bakteriyel adaptasyon ve virölansı arttıran proteinlere de rastlanmıştır. Bu

klona entegre olan profajlar üzerinde adherans proteini papA ve kapsül biyosentezinde rol alan rmlB proteini, bakteriyel patojenite ve virölansı artıran önemli proteinlerdir. PapA proteini, konak hücrelere yapışmayı sağlayan pilusların ana yapısal proteinidir ve enfeksiyon için kilit parçadır. Bakteriyel konakçıların diğer organizmalara yapışmasını ve enfeksiyon bölgelerine tutunmasını ve yayılmasını destekler. Profajlar, patojenlerin kolonizasyon kabiliyetini artırarak enfeksiyonların kalıcılığını sağlar [104, 105]. Ayrıca bazı profajlar üzerinde çeşitli stres faktörlerine karşı adaptasyonu sağlayan proteinlere de rastlanılmıştır. Örneğin KP2-Φ1 profajı üzerinde bulunan tRNA-dihidroüridin sentaz DusB, DinF, cupin alanı içeren protein, asit fosfataz AphA, faj şok protein G, PrtN piyosin, PerC ve Ren proteini bakterinin farklı çevresel koşullara ve strese uyum sağlama yeteneğine katkıda bulunur [128, 129, 130, 133, 142, 143, 147, 151]. KP2-Φ7 profajında tespit edilen ısı-şok proteinleri, fizyolojik ve stres koşullarında protein katlanması, entegrasyonu, transportu ve denatürasyonu ile hücresel fonksiyonların sürdürülmesinde rol alan temel moleküler şaperonlardır. Bu moleküler şaperonlar, yeni sentezlenen ve denatüre edilen proteinlerin doğru katlanması için gereklidir [134,135].

KP2-Φ7 profajında tespit edilen bir diğer önemli protein PiuB proteinidir. Bu protein demir metabolizmasına ek olarak ekzoselüler polisakkarit üretimi, biyofilm oluşumu, hareketlilik, oksidatif stres direnci ile ilişkilidir [152]. KP2-Φ1 profajında tespit edilen Ymfl proteini konak hücre adezyonun ve invazyona katkı sağlamanın yanı sıra antibiyotik dirençli veya hipermukoid *E. coli* izolatları için genetik bir belirteç olduğu da bilinmektedir [137]. KP2-Φ1 profajında tespit edilen alanin rasemaz, hücre duvarı bileşeni olan peptidoglikan sentezi için L-alaninin D-alanine dönüşümünde rol alarak hücre bütünlüğünü ve bakteri sağkalımını destekler. Bu durum enfeksiyon sürecinin ilerlemesi için konağa fayda sağlar [132]. KP2-Φ1 profajında tespit edilen asit fosfataz AphA, bakteriyel beslenme, karbon metabolizması, patogenez ve virölansını etkilen bir diğer protein gruplarıdır [130]. KP2-Φ1 profajında tespit edilen litik transglikosilaz peptidoglikan yapısını kesmeden sorumludur [129]. Bu durum yeni antimikrobiyal hedef olarak kullanılmasını sağlayabilir. Benzer şekilde KP2-Φ2 profajında tespit edilen hidrolaz aktivitesine sahip olan NlpC/P60 family proteinlerinin yakınlarında bulunan sistein proteazlarının yeni nesil antibiyotikler için işlevsel bir hedef olabileceği düşünülmektedir [156]. KP2-Φ7 profajında tespit edilen oksidoredüktazlar hem fajların hem de konak hücrelerin enerji metabolizmasında kritik rol oynar [166, 167]. KP2-Φ7 profajlarında tespit edilen diguanilat siklaz YeaP, c-di-GMP seviyesinin aşırı ekspresyonu sonucunda hücre yüzeyinde değişikliklere, anormal hücre

bölünmesine, biyofilm oluşumunun artmasına ve flagella aracılı yüzme motilitesinin azalmasına neden olabilir [172].

ST307 son zamanlarda kan kültürü izolatlarında artan istilacı bir klon olarak bilinmektedir [202]. Bu izolata entegre olan profajlar üzerinde de bakteriyel patojeniteyi artıran çeşitli proteinler tespit edilmiştir. KP3-Φ4 profajı üzerinde kodlanan adherans faktörü PapA, enfeksiyonun ilk adımı olan konak hücreye bağlanma sırasında gerekli bir virülans proteindir [54]. KP3-Φ4 profajı üzerinde bakteriyel demir taşıma ve kapsül biyosentezinde rol alan fbpC [87], demir alımında görevli ybtP proteinleri yaşamsal işlevler için gerekli olup bakteriyel virülansa katkı sağlarlar [88]. KP3-Φ1 profajında tespit edilen Grx1, DinI, KP3-Φ5 profajında tespit edilen TerB proteini ve KP3-Φ3 profajında tespit edilen tRNA-dihidroüridin sentaz DusB, KP3-Φ4 profajında tespit edilen ısı şok proteini GrpE çevresel strese karşı adaptasyonunu sağlar [114, 127, 128, 136, 146,]. KP3-Φ2 profajında tespit edilen MarR ailesi transkripsiyonel regülatörleri ise çeşitli antibiyotiklere, çevresel kimyasal tehlikelere ve spesifik oksidatif stres koşullarına yanıtlarda yer alırlar [139]. KP3-Φ4 profajında tespit edilen Iron-uptake factor PiuB bakteriyel virülansı arttıran özellikle biyofilm oluşumu, hareketlilik, oksidatif stres direnci ile ilişkili bir proteindir [132]. KP3-Φ2 profajında tespit edilen MarR ailesi transkripsiyonel regülatörü olan MalR geni, *Corynebacterium difteriae* ve *Mycobacterium leprae* gibi çeşitli türlerde bulunmaktadır. *C. diphtheriae*'deki MalR lokusunun genomik organizasyonu, *Corynebacterium glutamicum*'a uspA proteinin kodlayan operon bölgesi ile neredeyse özdeşdir [183]. MalR'nin yüksek ekspresyonu, çevresel strese yanıt olarak hücre membranının yeniden şekillenmesinde yol açar ve ciddi büyüme kusurlarına neden olup uzamış bir hücre morfolojisi gelişimine neden olur. Peptidoglikan ve dallı zincirli yağ asitlerinin sentezinde yer alan MalR mutantının [Δ malR] çeşitli β -laktam antibiyotiklere karşı değişmiş duyarlılığı gösterilmiştir. MalR ayrıca, çeşitli profaj genlerinin bir baskılayıcısı olarak da görev almaktadır. Örneğin CGP3 profajı için yapılan bir çalışmada MalR, strese duyarlı indüksiyonunun kontrolünü düzenleyerek profaj indüksiyonunu baskılar [183]. KP3-Φ1 profajında tespit edilen PotF'nin biyofilm oluşumu ve hücre zarının bütünlüğü üzerinde rol oynayabileceği gösterilmiştir [178, 200, 201]. KP3-Φ5 fajında TerB Family proteini kodlayan gen bölgesi, tellürit direnci, faj inhibisyonu, kolisin direnci ve patojenite ile ilişkilendirilmiştir ve bakteri türleri, özellikle patojenik türler arasında yaygın olarak bulunduğu bildirilmiştir. TerB proteininin tellüritin toksik olmayan tellüre indirgenmesinde ve oksidatif strese karşı genel savunmada da rol alır [114].

ST2096 sekans tipine sahip olan izolata entegre olan profajlar üzerinde de bakteriyel patojeniteyi artıran çeşitli proteinler tespit edilmiştir. KP4-Φ1 profajında tespit edilen RND ailesine ait efflux pompaları, gram-negatif bakterilerde antibiyotik direncinde kritik rol oynar. Bu taşıyıcılar, toksik bileşenleri hücre dışına atarak bakteri hayatta kalmasını destekler [179]. KP4- Φ1 profajı üzerinde tespit edilen diguanilat siklaz YeaP proteini konak hücrenin anormal hücre bölünmesine, biyofilm oluşumunun artmasına ve swimming hareketinin azalmasına neden olabilir [172]. Benzer şekilde KP4-Φ4 profajı üzerinde virülansla ilişkili olan algU proteini biyofilm oluşumunu desteklemektedir. Bu protein mukoid hücrelerde oldukça aktiftir [109].

KP4-Φ3 fajında tespit edilen NlpC/P60 family proteinleri, peptidoglikan biyosentezi ile hücre duvarı sentezini düzenler. [156]. KP4-Φ4 profajında tespit edilen Gliserol-3-Fosfat Asiltransferaz, gliserolipidlerin biyosentezinde ilk ve hız sınırlayıcı adımı katalizlemeden sorumlu olduğu için fajlar, bu enzimi kullanarak konak hücre membranlarının lipid bileşimini değiştirebilir [171]. KP4-Φ4 profajında bulunan DinI, glutamat 5-kinaz, KP4-Φ3 profajında tespit edilen MCP proteini ST2096 klonlarına adaptasyon yeteneği kazandırabilir [146, 155, 169]. P4-Φ1 profajında tespit edilen DEAD/DEAH-box helikazları, virüsler ve konakçı bağışıklık sistemi arasındaki evrimsel silahlanma yarışında önemlidir [188, 189].

Profajlar üzerinde kodlanan ortak bazı ortak faj savunma proteinleri tespit edilmiştir. Örneğin KP2-Φ2, KP2-Φ3, KP2-Φ4, KP2-Φ5, KP2-Φ7 profajları üzerinde tespit edilen çeşitli DNA metiltransferaz enzimleri evrimsel süreçte faj genomlarını konak tehditlerine karşı koruyan ve fajın devamlılığı için önemli proteinlerdir. Bir diğer önemli protein ise KP2-Φ1 ve KP2-Φ2 profajları üzerinde taşınan faj antiterminasyon protein Q'dur. Bu protein fajın konak hücreyle olan etkileşimlerinde kritik olup transkripsiyonuna devam etmesini ve enfeksiyonun ilerlemesi için gereklidir [123]. KP2-Φ2 profajında tespit edilen Kila-N domain-containing protein, bakterileri ve ökaryotları enfekte eden büyük DNA virüslerinde yaygın olan iki DNA bağlayıcı motifi içeren proteinlerdir. Kila-N anti-viral konak hücre algılamasına karşı koruma sağlamak için sitoplazmadaki viral DNA'yı saklar [124]. Ek olarak KP2-Φ2 profajında tespit edilen anti-CBASS protein Acb1, faj enfeksiyonunu önlemek için hücre ölümünü indükleyen ve siklik nükleotid sinyalleri ile viral yayılmayı engelleyen bakteriyel CBASS sistemine karşı geliştirilen faj savunma mekanizmasının parçasıdır. Anti-CBASS protein Acb1 proteinleri ile bakteri CBASS sisteminin inhibisyonu sağlanır [126]. Böylece faj genomu kendini konak tehditlerine karşı koruyabilir. KP2-Φ4 profajında tespit edilen ve fonksiyonu net olarak bilinmeyen membran

proteini YebO, süper enfeksiyona neden olarak konak hücrenin başka fajlar tarafından enfekte olmasını önleyerek konak hücrenin sağkalımını destekler [185]. KP2-Φ1 profajı üzerinde tespit edilen YafO toksini hem bakteriyel savunmada hem de bazı hücrel süreçlerin düzenlenmesi için önemlidir [184]. Benzer şekilde KP2-Φ7 profajında tespit edilen RatA (YfjG) toksini, protein sentezini durdurarak bakteriyel fizyolojiyi etkileyerek savunma tepkisi oluşturur [186].

Anti-CRISPR proteinleri, DNA metiltransferazlar, glikosiltransferazlar ve asetilazlar, toksin/antitoksin sistemleri, DNA kesim proteinleri, profajların bakteriyel savunma sistemlerinden korunmasına ve bakteriyel genomlarla etkili bir şekilde entegrasyonuna olanak sağlar. Bu proteinlerin varlığı fajların patojenite ve direnç genlerini yayılımındaki rolünü anlamak için önemli ipuçları verebilirler. Aynı zamanda profajların bakteriyle simbiyotik bir ilişki içinde hayatta kalmasına ve evrimsel başarısına katkıda bulunur. Bu bulgular, profajların hem savunma hem de saldırı mekanizmalarını geliştirdiğini göstererek, bakteriyofaj-bakteri ilişkilerinin dinamiklerini anlamada önemlidir. Özellikle bakteriyel savunma mekanizmasını bloke etmeye odaklı evrimleşen acr genlerinin varlığı faj-bakteri birlikte evriminin önemli bir göstergesidir. Dolayısıyla fajlar ve bakteriler arasındaki evrimsel silahlanma yarışının bir parçası olarak bu genler önemli bir adaptasyon stratejisi oluşturarak mikrobiyal ekosistemlerde genetik çeşitliliği ve dinamikleri etkilemektedirler [203, 204]. Profajlar üzerinde en sık rastlanan Acr tipi AcrIIA olup alt grupları ise AcrIIA7 AcrIIA15'tir. Ayrıca AcrIF, AcrVA, AcrIE tipleri de tespit edilmiştir. Bu proteinler, CRISPR-Cas sisteminin farklı tiplerini hedef alarak çeşitli inhibisyon mekanizmaları sergilemektedir. Anti-CRISPR genlerinin evrimsel kökenlerini araştırılması sonucu anti-CRISPR genlerinin, fajlar arasında yatay gen transferi yoluyla yayıldığını bildirmişlerdir. Doğal ekosistemlerde anti-CRISPR genlerinin yaygınlığını araştırmıştır. Anti-CRISPR genleri, deniz ve toprak bakterilerinde yaygın olarak bulunmuş ve fajların adaptasyonunda önemli rol oynamıştır. Bu genler, bakteriyel genomların evriminde ve mikrobiyal ekosistemlerin dinamiklerinde etkili bir araç olarak tanımlanmıştır. AcrIIA proteinlerinin CRISPR-Cas9 sisteminde nasıl çalıştığını inceleyen başka bir çalışmada AcrIIA4 proteini, Cas9'un DNA hedefleme ve kesme aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir. CRISPR tabanlı gen düzenleme teknolojilerinde, AcrIIA4'ün yan etkileri azaltmak için kullanılabileceği belirtilmiştir [205]. *Pseudomonas aeruginosa* bakterisini enfekte eden fajlarda tespit edilen AcrF1 ve AcrF2 proteinleri, CRISPR-Cas tip I-F sistemini inhibe ederek bakteriyel bağışıklığı etkisiz hale getirmiştir. Bu proteinler, Cas3 proteinine bağlanarak CRISPR

aracılığıyla DNA kesimini engellediği anlaşılmıştır [206]. Başka bir çalışmada; AcrF3 proteininin Cas3 enzimine bağlanmasını ve CRISPR aktivitesini inhibe etme mekanizmasını incelenmiştir. AcrF3 proteini, CRISPR sisteminin DNA hedefleme ve parçalama işlemini etkili bir şekilde engellemiştir. Protein yapısının kristal analizi, Cas3 üzerindeki kritik bağlanma bölgelerini engellediğini görmüşlerdir [207].

Bu durum Anti-CRISPR proteinlerinin, CRISPR-Cas tabanlı gen düzenleme teknolojilerinde off-target etkileri azaltmak ve gen düzenleme süreçlerini daha kontrollü hale getirmek için potansiyel araçlar olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir. Aynı zamanda bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde artan direnç bağı olarak kısıtlı antibiyotik seçeneğinde bakteriyofaj terapisi gibi yenilikçi tedavilerin geliştirilmesinde, savunma proteinlerinin etkileri ve mekanizmalarının anlaşılması için önemlidir.

KDKP klinik izolatlarımızda taşınan profajlar üzerinde virülans genleri bulunurken AMR genlerinin yokluğu, profajlar içinde AMR ve VF genlerinin birlikte bulunma olasılığının düşük olduğunu düşündürmektedir. Litaritür verilerine göre, AMR genlerini kodlayan profaj tipleri ile virülans geni kodlayan profaj tipleri farklı olabilir. Örneğin tüm genom dizilimi yapılan 7 türün (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* ve *Escherichia coli*) mevcut profajları incelenmiştir. AMR ve VF genlerin bulunma oranının türe bağlı olduğunu ve büyük ölçüde farklı olduğu görülmüştür. Sonuçlarımızla benzer olarak AMR ve VF genlerinin aynı profaj üzerinde nadiren bir arada bulunduğu bildirilmiştir [208]. Bu durum 16 profaj üzerinde sadece VF genlerinin mevcudiyetini desteklemektedir. Ek olarak AMR geni bakımından zengin profajların, P1 benzeri fajlar olduğu ve bu genlerin konak genomlarına transferinden önemli ölçüde sorumlu olduğu bilinmektedir. 16 KDKP profajın üzerinde AMR geni taşıyan profajların tespit edilmemesinin bir diğer açıklaması ise; AMR genlerini kodlayan profajların aksine, VF genlerini kodlayan profajlar genellikle faj yapısı için gerekli olan yapısal proteinleri kodlayan gen bölgelerine sahiptir. Dolayısıyla VF taşıyan profajlar genellikle sağlam bir virion yapısına sahip iken AMR taşıyan profajlar genellikle kusurlu yapıdadır. Bu sebeple KDKP klinik izolatlarına entegre olan yüksek faj bütünlüğüne sahip 16 profaj üzerinde tespit edilememiş olabilir. Ek olarak profajlar üzerinde integron bölgesi tespit edilmemiştir. Bu durum AMR genlerinin saptanmamasının olası nedenlerinden biri olabilir. Sınıf 1 integron içeren profajların, içermeyenlere göre daha fazla sayıda AMR geni içermesi sonuçlarımızı [208].

Farklı sekans ve kapsüler tiplere ait farklı suşların genomunda taşınan profajların genel anlamda birbirlerinden farklı genom yapılarına sahip olduğu ve pangenomdaki ortak gen sayısının kısıtlı olduğu görülmüştür. Bu genlerin büyük çoğunluğu bulut genler olup, analiz edilen fajların gen alışverişine yatkın olduğu görülmüştür. 16 profajın pangenom analizi sonucu tespit edilen 29 ortak kabuk gen bölgelerinin 12 tanesinin kodladığı proteinlerin fonksiyonu bilinmemektedir. Ancak, ortak paylaşılan genlerin çoğunun fonksiyonu; faj yaşam döngüsü, yapı/montaj, faj savunma ve regülasyonla ilişkili olup; temel faj döngüsünün devamı için gerekli olan genlerden oluştuğu görülmüştür.

Faj genom organizasyonu evrimsel korunmuşluk açısından önemli biyolojik ipuçları verebilir. Anotasyon sonucunda çoğu profajın yapısal genlerinin genom üzerindeki oryantasyonu referans değerlerden farklı olması ilgili profajların yeni varyantlar olabileceğini düşündürmektedir. Belirli genler arasındaki uzun mesafeler, rekombinasyon ve/veya yatay gen transferi sonucu yeni DNA segmentlerinin eklenmesinden kaynaklanıyor olabilir.

Filogenetik analiz sonucunda profajların farklı derecelerde akraba oldukları görülmüştür. Birbirleriyle benzerlik oranları oldukça düşüktür. Yakın akraba fajlar arasındaki hizalanmış yüksek genom fraksiyonu, bazı genomik bölgelerin önemli ölçüde korunduğunu ancak yine de yüksek gen alışverişinin de olduğunu göstermiştir. Bazı profajların benzer homoloji gösterdiği görülmüştür. Örneğin KP1-Φ2, KP2-Φ4, KP3-Φ3 ve KP3-Φ5 profajları evrimsel süreçte benzer yapısal homolojiye sahip olduğu Siphoviridae Tip 1 Küme 3 grubunda yer aldığı görülmüştür. Bu durum aynı atasal kökene sahip olan fajın farklı ST klonal suşları enfekte ederek genomlarına yerleştiğini göstermektedir. 16 profaj için tespit edilen yakın faj homologlarına göre aynı kümede yer alan çoğu profaj için genomlarında tespit edilen ilgili genlerin farklı fajlar ile homoloji gösterdiği görülmüştür.

Aynı homoloji benzerliği ile *Myoviridae* Tip 1 Küme 9 ailesine atanan KP2-Φ7 ve KP3-Φ1 ve KP4-Φ1 profajları ve *Siphoviridae* Tip 1 ile ilişkilendirilen KP1-Φ1, KP2-Φ2 ve KP4-Φ3 profajları için de geçerlidir. En geniş yapısal morfoloji çeşitliğine sahip klonal grubun ST101 KP2 ve ST307 KP3 suşlarında olduğu görülmektedir. En yaygın morfotip *Siphoviridae* olarak belirlenmiştir. KP2-Φ3 ve KP4-Φ1'in yakın ilişkili olduğu PHAGE_Klebsi_ST16, genelde yüksek riskli klonları olan ST307 ve ST2497 ile ilişkilidir. IncFIB(K) ve IncX3 gibi BlaNDM-1 ve blaOXA-48 gibi direnç genlerini taşıyan plazmitlerle bir arada bulunur [209]. Ancak KP2 ST101 sekans tipi olup Col440II, ColRNAI, IncFIA(HI1), IncR, repB(R1701) plazmitlerine sahiptir. KP4 ST2096 ssekans

tipi olup ColKP3, IncFIB(K), IncFIB, IncHI1B plazmitlerine sahiptir. Bu durum PHAGE_Klebsi_ST16 birçok klonla etkileşime açık olduğunu ve birçok plazmit tipi ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. KP2 klinik izolatlarımızda 64653 bp ve 106 ORF'ye sahip KP2-Φ7 (sağlam), 41229 bp ve 58 ORF'ye sahip KP3-Φ4 (şüpheli) profajları, PHAGE_Escher_500465'ı ile yakından ilişkili olduğu görülmüştür. Artan genom boyutu ve kazandığı genlerin çeşitliği bu profajın gen alışverişi açısından dinamik bir yapıya sahip olduğunu ve zamanla yeni genler kazanarak evrimleştiğini göstermektedir. Bu durum profajların klonal gruplar arasında yatay gen transferi aktif olarak hareket ettiklerini düşündürmektedir. Pangenom, intergenomik ve filogenetik analiz sonucu elde edilen veriler doğrultusunda, profajların genetik çeşitliliğini ve bakteriyel genomlara etkilerini anlamada önemli araçlar olduğu görülmektedir.



SONUÇ VE ÖNERİLER

Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan daha önceki çalışmalarda karbapenem-dirençli olarak tanımlanan 20 adet *K. pneumoniae* izolatı profaj indüksiyonu için çalışmaya dahil edilmiş; bu izolatlar arasından farklı sekans tipi belirlenen 4 izolat ise tüm genom dizileme işlemi için kullanılmıştır. Bu izolatların genomlarına entegre olan profajların karakterizasyonu gerçekleştirilmiş ve yatay gen transferi ile bakteriyel evrime katkısı incelenmiştir. KDKP izolatlarına entegre olan 19 profaj bölgesi tespit edilmiş ve aralarından yüksek faj bütünlüğü gösteren 16 profajın detaylı analizi yapılmıştır.

Tespit edilen profajlar çeşitli yöntemler ile indüklenmeye çalışılmıştır. Ancak tespit edilen profajların geleneksel indüksiyon faktörlerine karşı duyarsız oldukları görülmüştür. Bu sebeple klasik yöntemlerle tespiti mümkün olamadığı için moleküler yöntemlerle indüksiyon başarısı değerlendirilebilmiştir. Bu bağlamda, profaj indüksiyonunun güvenilir şekilde değerlendirilebilmesi için moleküler yöntemlerin kullanımı önemlidir.

Profajların antibiyotik direnç genlerini taşımadıkları ancak konak genomunun genetik çeşitliliğine ve potansiyel patojenitesine anlamlı düzeyde katkı sağlayabileceğini görülmüştür. Profaj bölgelerinde tespit edilen bazı genler; konak bakterinin virülansını artırma, metabolik kapasitelerini genişletme ve çeşitli çevresel stres faktörlerine karşı adaptasyon yeteneğini geliştirme potansiyeline sahiptir. Ayrıca, hücresel düzenleme süreçleriyle ilişkili bazı regülatör genlerin de profaj bölgelerinde yer aldığı saptanmış olup, bu genlerin konak hücrenin antibiyotiklere, çevresel streslere ve diğer baskılayıcı koşullara uyum sağlamasında rol oynayabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla KDKP izolatlarında tespit edilen profajlar konağın evrimsel süreçte yatay gen transferi mekanizmaları aracılığıyla yalnızca antimikrobiyal direnç kazandırmakla kalmayıp, aynı zamanda farklı çevresel koşullara adaptasyon yeteneklerini de arttırmaktadırlar. Bu adaptif avantajlar, söz konusu bakterilerin eradikasyonunu oldukça güçleştirmektedir.

Pangenom, intergenomik ve filogenetik analiz sonucu elde edilen veriler doğrultusunda profajların, genetik çeşitliliğinin yüksek olduğu ve bakteriyel evrime katkı sağlayan önemli bir araçlar olduğu görülmektedir. Bu fajların spesifik özelliklerini ve uygulamalarını aydınlatmak için daha detaylı analizlere ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Karampatakis T, Tsergouli K, Behzadi P. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Virulence factors, molecular epidemiology and latest updates in treatment options. *Antibiotics (Basel)*. 2023;12(2):234. doi:10.3390/antibiotics12020234. PMID: 36830145; PMCID: PMC9952820.
2. Di Pilato V, Pollini S, Miriagou V, Rossolini GM, D'Andrea MM. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: The role of plasmids in emergence, dissemination, and evolution of a major clinical challenge. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2024;22(1–3):25–43. doi:10.1080/14787210.2024.2305854. PMID: 38236906.
3. Founou LL, Founou RC, Essack SY. Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. *Front Microbiol*. 2016;7:1881. doi:10.3389/fmicb.2016.01881. PMID: 27933044; PMCID: PMC5120092.
4. Casjens SR. Prophages and bacterial genomics: What have we learned so far? *Mol Microbiol*. 2003;49(2):277–300. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03580.x.
5. Brüssow H, Canchaya C, Hardt W. Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004;68(3):560–602. doi:10.1128/membr.68.3.560-602.2004.
6. Reyes J, Aguilar AC, Caicedo A. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Microbiology Key Points for Clinical Practice. *Int J Gen Med*. 2019;12:437–46. doi:10.2147/IJGM.S214305. PMID: 31819594; PMCID: PMC6886555.
7. Zierke L, Mourad R, Kohler TP, Müsken M, Hammerschmidt S. Influence of the polysaccharide capsule on virulence and fitness of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol*. 2025;16:1450984. doi:10.3389/fmicb.2025.1450984.
8. Riwu KHP, Effendi MH, Rantam FA, Khairullah AR, Widodo A. A review: Virulence factors of *Klebsiella pneumoniae* as emerging infection on the food chain. *Vet World*. 2022;15(9):2172–9. doi:10.14202/vetworld.2022.2172-2179.
9. Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016;80(3):629–61. doi:10.1128/MMBR.00078-15. PMID: 27307579; PMCID: PMC4981674.

10. Xu L, Li J, Wu W, Wu X, Ren J. *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide: Mechanism in regulation of synthesis, virulence, and pathogenicity. *Virulence*. 2024;15(1). doi:10.1080/21505594.2024.2439509.
11. Wei DD, Chen KQ, Wang LH. Clinical and molecular characteristics of high virulent *Klebsiella pneumoniae* in infection in intensive care unit. *Chin J Nosocomiol*. 2016;26(1):5056–9.
12. Choby JE, Howard-Anderson J, Weiss DS. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* – clinical and molecular perspectives. *J Intern Med*. 2020;287(3):283–300. doi:10.1111/joim.13007.
13. Castro J, Araújo D, Oliveira H, Fernandes L, Oliveira R, Brinks E, et al. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella variicola* isolated from patients in Portuguese hospitals: Genomic and phenotypic characterization. *The Microbe*. 2024;5:100172. doi:10.1016/j.microb.2024.100172.
14. Farzand R, Rajakumar K, Barer MR, Freestone PPE, Mukamolova GV, Oggioni MR, et al. A Virulence Associated Siderophore Importer Reduces Antimicrobial Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol*. 2021;12:607512. doi:10.3389/fmicb.2021.607512.
15. Siddiqui T. Key features of *Klebsiella pneumoniae* pathogenicity. *Biol Insights*. 2022. Available from: <https://biologyinsights.com/key-features-of-klebsiella-pneumoniae-pathogenicity/>
16. Leung B. Bacterial movement mechanisms: Twitching motility in *Klebsiella pneumoniae* [Undergraduate Research Report]. Simon Fraser University; 2021. Available from: <https://journals.lib.sfu.ca/index.php/ugrs/article/download/4171/3459/17001>
17. Teo JQ-M, Tang CY, Tan SH, Chang HY, Ong SM, Lee SJ-Y, et al. Genomic Surveillance of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* from a Major Public Health Hospital in Singapore. *Microbiol Spectr*. 2022;10(5). doi:10.1128/spectrum.00957-22.
18. Dünya Sağlık Örgütü. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023–2021 data. Available from: <https://www.who.int/europe/publications/i/item/9789289058537> [Accessed 14 Apr 2023].

19. Karami-Zarandi M, Rahdar HA, Esmaeili H, Ranjbar R. *Klebsiella pneumoniae*: An update on antibiotic resistance mechanisms. *Future Microbiol.* 2023;18(1):65–81. doi:10.2217/fmb-2022-0097.
20. Telli M. *Klebsiella pneumoniae* klinik suşlarında, 2012-2020 yılları arasında karbapenem direnç oranlarındaki değişimin ve direnç genlerinin araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2022;52:95–102. doi:10.54453/TMCD.2022.05025.
21. Ferdosi-Shahandashti A, Pournajaf A, Ferdosi-Shahandashti E, et al. Identification of beta-lactamase genes and molecular genotyping of multidrug-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Microbiol.* 2024;24:549. doi:10.1186/s12866-024-03679-6.
22. Türkiye Klinikleri. Karbapenemazların sınıflandırması [Internet]. [cited 2025 Apr 14]. Available from: <https://www.turkiyeklinikleri.com/>
23. SlidePlayer. Genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar [Internet]. [cited 2025 Apr 14]. Available from: <https://slideplayer.com>
24. Aydın M, Altunal LN. Karbapenem dirençli gram-negatif bakteri enfeksiyonlarının epidemiyolojisi. In: Görenek L, editor. *Karbapenem Dirençli Gram-Negatif Bakteri Enfeksiyonları*. 1st ed. Türkiye Klinikleri; 2023. p. 8–10. Available from: <https://www.turkiyeklinikleri.com/article/tr-karbapenem-direncli-gram-negatif-bakteri-enfeksiyonlarinin-epidemiyolojisi-102811.html>.
25. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1791–8. doi:10.3201/eid1710.110655.
26. Al Doghaither H, Gull M. Plasmids as genetic tools and their applications in ecology and evolution. *IntechOpen*; 2019. doi:10.5772/intechopen.85705.
27. Rolain, J.M., Parola, P. and Cornaglia, G. (2010), New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic?. *Clinical Microbiology and Infection*, 16: 1699-1701. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03385.x>
28. Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol.* 2013;303(6–7):298–304.
29. Han B, Feng C, Jiang Y, et al. Mobile genetic elements encoding antibiotic resistance genes and virulence genes in *Klebsiella pneumoniae*: important pathways for the

- acquisition of virulence and resistance. *Front Microbiol.* 2025;16:1529157. doi:10.3389/fmicb.2025.1529157.
30. Pan T, Li Q. Mobile genetic elements in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol.* 2025;207(5):e0001225. doi:10.1128/jb.00012-25.
 31. Twort FW. An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses. *Lancet.* 1915;186(4814):1241–3. doi:10.1016/S0140-673.
 32. d'Herelle F. On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli: brief note by Mr. F. d'Herelle, presented by Mr. Roux. *C R Hebd Seances Acad Sci.* 1917.
 33. Fokine A, Rossmann MG. Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. *Bacteriophage.* 2014;4(2):e28281.
 34. Łoś M, Węgrzyn G. Pseudolysogeny. *Adv Virus Res.* 2012;82:339–49.
 35. Ripp S, Miller RV. The role of pseudolysogeny in bacteriophage-host interactions in a natural freshwater environment. *Microbiology.* 1997;143:2065–70.
 36. Zhang M, Zhang T, Yu M, et al. The life cycle transitions of temperate phages: regulating factors and potential ecological implications. *Viruses.* 2022;14(9):1904. doi:10.3390/v14091904.
 37. Keen EC. A century of phage research: Bacteriophages and the shaping of modern biology. *BioEssays.* 2015;37(1):6–9. doi:10.1002/bies.201400152.
 38. Pfeifer E, Bonnin RA, Rocha EP. Phage-plasmids spread antibiotic resistance genes through infection and lysogenic conversion. *MBio.* 2022;13(5):e01851-22.
 39. Boyd EF, Brüssow H. Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends Microbiol.* 2002;10(11):521–9. doi:10.1016/S0966-842X(02)02459-9.
 40. Wang, X., Kim, Y., Ma, Q. *et al.* Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments. *Nat Commun* 1, 147 (2010). <https://doi.org/10.1038/ncomms1146>-Mäntynen S, Laanto E, Oksanen HM, et al. Black box of phage–bacterium interactions: Exploring alternative phage infection strategies. *Open Biol.* 2021;11(9):210188.
 41. Mahmoud AA, Wang X, Liao X, et al. Impact of prophages on gut microbiota and disease associations. *Microb Pathog.* 2025;204:107642. doi:10.1016/j.micpath.2025.107642.

42. Jancheva M, Böttcher T. A metabolite of *Pseudomonas* triggers prophage-selective lysogenic to lytic conversion in *Staphylococcus aureus*. *J Am Chem Soc.* 2021;143(22):8344–51.
43. Alexeeva S, Guerra Martínez JA, Spus M, Smid EJ. Spontaneously induced prophages are abundant in a naturally evolved bacterial starter culture and deliver competitive advantage to the host. *BMC Microbiol.* 2018;18:1–16.
44. Dougherty PE, Nielsen TK, Riber L, et al. Widespread and largely unknown prophage activity, diversity, and function in two genera of wheat phyllosphere bacteria. [Preprint].
45. Shkilnyj P, Koudelka GB. Effect of salt shock on stability of λ imm434 lysogens. *J Bacteriol.* 2007;189(8):3115–23.
46. Induction and Elimination of Prophages Using CRISPR Interference Jeffrey K. Cornuault and Sylvain Moineau *The CRISPR Journal* 2021 4:4, 549-557 doi:10.1089/crispr.2021.0026.
47. Silpe JE, Bassler BL. A host-produced quorum-sensing autoinducer controls a phage lysis-lysogeny decision. *Cell.* 2019;176(1):268–80.
48. López E, Domenech A, Ferrándiz MJ, et al. Induction of prophages by fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*: implications for emergence of resistance in genetically-related clones. *PLoS One.* 2014;9(4):e94358.doi:10.1371/journal.pone.0094358.
49. Wang J, Wang X, Yang K, Lu C, Fields B, Xu Y, Shen Q, Wei Z, Friman VP. Phage selection drives resistance-virulence trade-offs in *Ralstonia solanacearum* plant-pathogenic bacterium irrespective of the growth temperature. *Evol Lett.* 2023 Nov 11;8(2):253-266. doi: 10.1093/evlett/qrad056. PMID: 38525025; PMCID: PMC10959482.
50. Addy, H. S., Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M., and Yamada, T. (2012). Loss of virulence of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* through infection by phiRSM filamentous phages. *Phytopathology* 102, 469–477. doi: 10.1094/PHYTO-11-11-0319-R
51. Ramisetty BCM, Sudhakari PA. Bacterial ‘grounded’ prophages: Hotspots for genetic renovation and innovation. *Front Genet.* 2019;10:65. doi:10.3389/fgene.2019.00065.
52. Sweet T, Sindi S, Siström M. Going through phages: A computational approach to revealing the role of prophage in *Staphylococcus aureus*. *Access Microbiol.* 2023;5:000424. doi:10.1099/acmi.0.000424.

53. Boyd EF, Brüssow H. Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends Microbiol.* 2002;10(11):521–9. doi:10.1016/S0966-842X(02)02459-9. tekrar
54. Robinson CM, Sinclair JF, Smith MJ, O'Brien AD. Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:9667–72. doi:10.1073/pnas.0602359103.
55. Shimizu T, Ohta Y, Noda M. Shiga toxin 2 is specifically released from bacterial cells by two different mechanisms. *Infect Immun.* 2009;77:2813–23. doi:10.1128/IAI.00060-09.
56. Li D, Liang W, Hu Q, et al. The effect of a spontaneous induction prophage, phi458, on biofilm formation and virulence in avian pathogenic *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2022;13:1049341. doi:10.3389/fmicb.2022.1049341.
57. Nedialkova, L. P., Sidstedt, M., Koeppel, M. B., Spriewald, S., Ring, D., Gerlach, R. G., et al. (2016). Temperate phages promote colicin-dependent fitness of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Environ. Microbiol.* 18, 1591–1603. doi: 10.1111/1462-2920.13077
58. Huang J, Dai X, Wu Z, et al. Conjugative transfer of streptococcal prophages harboring antibiotic resistance and virulence genes. *ISME J.* 2023;17(9):1467–81. doi:10.1038/s41396-023-01463-4.
59. Li, Y., Berti, A. D., Abdelhady, W., & Xiong, Y. Q. (2025). Prophage ϕ SA169 Enhances Vancomycin Persistence in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Antibiotics*, 14(2), 191. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14020191>
60. Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W16-21. doi:10.1093/nar/gkw387
61. Akhter S, Aziz RK, Edwards RA. PhiSpy: a novel algorithm for finding prophages in bacterial genomes that combines similarity- and composition-based strategies. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(16):e126. doi:10.1093/nar/gks406
62. Song W, Sun H-X, Zhang C, Cheng L, Peng Y, Deng Z, et al. Prophage Hunter: an integrative hunting tool for active prophages. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(W1):W74-W80. doi:10.1093/nar/gkz385

63. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*. 2015;31(22):3691-3. doi:10.1093/bioinformatics/btv421
64. Gautreau G, Bazin A, Gachet M, Planel R, Burlot L, Dubois M, et al. PPanGGOLiN: Depicting microbial diversity via a partitioned pangenome graph. *PLoS Comput Biol*. 2020;16(3):e1007732. doi:10.1371/journal.pcbi.1007732
65. Lemons D, McGinnis W. Genomic evolution of Hox gene clusters. *Science*. 2006;313(5795):1918–22.
66. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014;30(14):2068-9. doi:10.1093/bioinformatics/btu153
67. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*. 2008;9:75. doi:10.1186/1471-2164-9-75
68. Sullivan MJ, Petty NK, Beatson SA. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics*. 2011;27(7):1009-10. doi:10.1093/bioinformatics/btr039
69. Kang F, Chai Z, Li B, Hu M, Yang Z, Wang X, Liu W, Ren H, Jin Y, Yue J. Characterization and Diversity of *Klebsiella pneumoniae* Prophages. *Int J Mol Sci*. 2023 May 23;24(11):9116. doi: 10.3390/ijms24119116. PMID: 37298067; PMCID: PMC10252525.
70. Liu B, Zheng D, Jin Q, Chen L, Yang J. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(D1):D912-D917. doi:10.1093/nar/gkab1049
71. Jia B, Raphenya AR, Alcock B, Wagglechner N, Guo P, Tsang KK, et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(D1):D566-D573. doi:10.1093/nar/gkw1004
72. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(11):2640-4. doi:10.1093/jac/dks261
73. Cosentino S, Voldby Larsen M, Møller Aarestrup F, Lund O. PathogenFinder--distinguishing friend from foe using bacterial whole genome sequence data. *PLoS One*. 2013;8(10):e77302. doi:10.1371/journal.pone.0077302

74. Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell KL, Davidson AR. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature*. 2013;493(7432):429-32. doi:10.1038/nature11723
75. Blum M, Chang HY, Chuguransky S, Grego T, Kandasaamy S, Mitchell A, et al. The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):D344–D354. doi:10.1093/nar/gkaa977
76. Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, Li W. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*. 2012;28(23):3150-2. doi:10.1093/bioinformatics/bts565
77. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*. 2013;30(4):772-80. doi:10.1093/molbev/mst010
78. Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol*. 2015;32(1):268-74. doi:10.1093/molbev/msu300
79. Bin Jang H, Bolduc B, Zablocki O, Kuhn JH, Roux S, Adriaenssens EM, et al. Taxonomic assignment of uncultivated prokaryotic virus genomes is enabled by gene-sharing networks. *Nat Biotechnol*. 2019;37(6):632-9. doi:10.1038/s41587-019-0100-8
80. Abraha HB, Choi Y, Hyun W, et al. Prevalence, diversity and UV-light inducibility potential of prophages in *Bacillus subtilis* and their possible roles in host properties. *Viruses*. 2022;14(3):483. doi:10.3390/v14030483.
81. Filipiak M, Łoś JM, Łoś M. Efficiency of induction of Shiga-toxin lambdoid prophages in *Escherichia coli* due to oxidative and antibiotic stress depends on the combination of prophage and the bacterial strain. *J Appl Genet*. 2020;61:131–40. doi:10.1007/s13353-019-00525-8.
82. Kropinski AM, Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Methods Mol Biol*. 2009;501:69–76. doi:10.1007/978-1-60327-164-6_7.
83. PhagesDB. PCI SDS DNA Extraction Protocol. 2013. Available from: https://phagesdb.org/media/workflow/protocols/pdfs/PCI_SDS_DNA_Extraction_2.2013.pdf

84. Wishart DS, Han S, Saha S, et al. PHASTEST: Faster than PHASTER, better than PHAST. *Nucleic Acids Res.* 2023. doi:10.1093/nar/gkad382.
85. Alcock BP, Huynh W, Chalil R, Smith KW, Raphenya AR, Wlodarski MA, et al. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(D1):D690–D699. doi:10.1093/nar/gkac920. PMID: 36263822.
86. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(12):3491–3500. doi:10.1093/jac/dkaa345.
87. Center for Genomic Epidemiology. VirulenceFinder 2.0. Available from: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>. [Accessed 14 Apr 2025].
88. Virulence Factor Database (VFDB). Available from: <http://mgc.ac.cn/VFDB/>. [Accessed 14 Apr 2025].
89. Yi H, Huang L, Yang B, Gomez J, Zhang H, Yin Y, et al. AcrFinder: genome mining anti-CRISPR operons in prokaryotes and their viruses. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(W1):W358–W365. doi:10.1093/nar/gkaa351.
90. Lowe TM, Chan PP. tRNAscan-SE On-line: search and contextual analysis of transfer RNA genes. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W54–W57. doi:10.1093/nar/gkw413.
91. Shang J, Peng C, Liao H, Tang X, Sun Y. PhaBOX: a web server for identifying and characterizing phage contigs in metagenomic data. *Bioinformatics Adv.* 2023;3(1):vbad101. doi:10.1093/bioadv/vbad101.
92. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics.* 2015;31(22):3691–3693. doi:10.1093/bioinformatics/btv421.
93. Lopes A, Tavares P, Petit MA, Guérois R, Zinn-Justin S. Automated classification of tailed bacteriophages according to their neck organization. *BMC Genomics.* 2014;15:1027. doi:10.1186/1471-2164-15-1027.
94. Leplae R, Lima-Mendez G, Toussaint A. ACLAME: A classification of mobile genetic elements. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(Database issue):D45–D49. doi:10.1093/nar/gkh084.

95. Moraru C, Varsani A, Kropinski AM. VIRIDIC – a novel tool to calculate the intergenomic similarities of prokaryote-infecting viruses. *Viruses*. 2020;12(11):1268. doi:10.3390/v12111268.
96. Nishimura Y, Watai H, Honda T, et al. ViPTree: the viral proteomic tree server. *Bioinformatics*. 2017;33(15):2379–2380. doi:10.1093/bioinformatics/btx157.
97. Liu D, Zhang Y, Fan G, Sun D, Zhang X, Yu Z, et al. IPGA: a handy integrated prokaryotes genome and pan-genome analysis web service. *iMeta*. 2022;1:e55. doi:10.1002/imt2.55.
98. Kumar S, Stecher G, Suleski M, Sanderford M, Sharma S, Tamura K. MEGA12: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 12 for adaptive life. *Mol Biol Evol*. 2024;41(12):msae263. doi:10.1093/molbev/msae263.
99. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, et al. Multilocus sequence typing of total genome sequenced bacteria. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1355–61. doi:10.1128/JCM.06094-11.
100. Carattoli A, Zankari E, Garcia-Fernandez A, et al. PlasmidFinder and pMLST: in silico detection and typing of plasmids. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(7):3895–903.
101. Hadfield J, Croucher NJ, Goater RJ, et al. Phandango: an interactive viewer for bacterial population genomics. *Bioinformatics*. 2018;34(2):292–293. doi:10.1093/bioinformatics/btx610.
102. Grant JR, Enns E, Marinier E, et al. Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*. 2023;51(W1):W612–W619. doi:10.1093/nar/gkad326.
103. CAGECAT: Comparative Analysis of Genomes and Elements using CAT. Available from: <https://cagecat.bioinformatics.nl>. [Accessed 14 Apr 2025].
104. Casabona MG, Silverman JM, Sall KM, et al. An ABC transporter and an outer membrane lipoprotein participate in posttranslational activation of type VI secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*. 2013;15(2):471–486. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02816.x.
105. Wang YH, Chen HH, Huang Z, Li XJ, Zhou N, Liu C, Jiang CY, Li DF, Liu SJ. PapA, a peptidoglycan-associated protein, interacts with OmpC and maintains cell

- envelope integrity. *Environ Microbiol.* 2021 Feb;23(2):600-612. doi: 10.1111/1462-2920.15038. Epub 2020 May 6. PMID: 32329167.
106. Van der Beek SL, Zorzoli A, Çanak E, et al. Streptococcal dTDP-L-rhamnose biosynthesis enzymes: functional characterization and lead compound identification. *Mol Microbiol.* 2019;111(4):951–64. doi:10.1111/mmi.14197.
 107. Aono R, Emi S, Okabe-Watanabe K, et al. Autolysin as a fibronectin receptor on the cell surface of *Clostridium perfringens*. *Anaerobe.* 2023;83:102769. doi:10.1016/j.anaerobe.2023.102769.
 108. Wang Z, et al. Pathogenic siderophore ABC importer YbtPQ adopts a surprising fold of exporter. *Sci Adv.* 2020;6:eaay7997. doi:10.1126/sciadv.aay7997.
 109. Okkotsu Y, Little AS, Schurr MJ. The *Pseudomonas aeruginosa* AlgZR two-component system coordinates multiple phenotypes. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:82. doi:10.3389/fcimb.2014.00082.
 110. Sánchez-Osuna M, Cortés P, Lee M, et al. Non-canonical LexA proteins regulate the SOS response in the Bacteroidetes. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(19):11050–66. doi:10.1093/nar/gkab773.
 111. Susskind MM. A new gene of bacteriophage P22 which regulates synthesis of antirepressor. *J Mol Biol.* 1980;138(4):685–713. doi:10.1016/0022-2836(80)90060-1.
 112. Fornelos N, Browning DF, Pavlin A, et al. Lytic gene expression in the temperate bacteriophage GIL01 is activated by a phage-encoded LexA homologue. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(18):9432–43. doi:10.1093/nar/gky646.
 113. Asadulghani M, Ogura Y, Ooka T, et al. The defective prophage pool of *Escherichia coli* O157: prophage–prophage interactions potentiate horizontal transfer of virulence determinants. *PLoS Pathog.* 2009;5(5):e1000408. doi:10.1371/journal.ppat.1000408.
 114. Yu Xinyan, Xu Jing, Gu Yu, Zhang Ruiyang, Zhu Yefei, Liu Xiaoqiu. Molecular Characterization and Comparative Genomic Analysis of vB_PaeP_YA3, a Novel Temperate Bacteriophage of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2020;11:947. doi:10.3389/fmicb.2020.00947.
 115. Blatny JM, Ventura M, Rosenhaven EM, Risøen PA, Lunde M, Brüssow H, Nes IF. Transcriptional analysis of the genetic elements involved in the lysogeny/lysis switch in the temperate lactococcal bacteriophage phiLC3, and identification of the Cro-like

- protein ORF76. *Mol Genet Genomics*. 2003 Jul;269(4):487-98. doi:10.1007/s00438-003-0854-y.
116. Hazra M, Dubey RC. In silico study of cox protein from P2 type enteric bacteriophages based on sequence, structure and dynamics to understand its functional integrity. *J Biomol Struct Dyn*. 2022;40(24):14035-14050. doi:10.1080/07391102.2021.2000496
 117. Eugster MR, Loessner MJ. Wall Teichoic Acids Restrict Access of Bacteriophage Endolysin Ply118, Ply511, and PlyP40 Cell Wall Binding Domains to the *Listeria monocytogenes* Peptidoglycan. *J Bacteriol*. 2012;194(20). doi:10.1128/jb.00808-12.
 118. Masuda H, Awano N, Inouye M. ydfD encodes a novel lytic protein in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 2016 Mar;363(6). doi:10.1093/femsle/fnw039.
 119. Gopalkrishnan S, Ross W, Akbari MS, Li X, Haycocks JRJ, Grainger DC, Court DL, Gourse RL. Homologs of the *Escherichia coli* F Element Protein TraR, Including Phage Lambda Orf73, Directly Reprogram Host Transcription. *mBio*. 2022;13(4):e00952-22. doi:10.1128/mbio.00952-22.
 120. Davidson AR, Lu WT, Stanley SY, Wang J, Mejdani M, Trost CN, Hicks BT, Lee J, Sontheimer EJ. Anti-CRISPRs: Protein Inhibitors of CRISPR-Cas Systems. *Annu Rev Biochem*. 2020 Jun 20;89:309-332. doi: 10.1146/annurev-biochem-011420-111224. Epub 2020 Mar 18. PMID: 32186918; PMCID: PMC9718424.
 121. Jones M, Wagner R, Radman M. Mismatch repair of deaminated 5-methyl-cytosine. *J Mol Biol*. 1987;194(1):155-159. doi:10.1016/0022-2836(87)90724-8.
 122. Yin Y, Yang B, Entwistle S. Bioinformatics Identification of Anti-CRISPR Loci by Using Homology, Guilt-by-Association, and CRISPR Self-Targeting Spacer Approaches. *mSystems*. 2019;4(5):e00455-19. doi:10.1128/msystems.00455-19.
 123. Berdygulova Z, Esyunina D, Miropolskaya N, et al. A novel phage-encoded transcription antiterminator acts by suppressing bacterial RNA polymerase pausing. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(9):4052–4063. doi:10.1093/nar/gkr1285.
 124. Bareiss B, Barry M. Fowlpox virus encodes two p28-like ubiquitin ligases that are expressed early and late during infection. *Virology*. 2014;462-463:60-70. doi:10.1016/j.virol.2014.05.018.

125. Rotman EK, Kouzminova E, Plunkett G, Kuzminov A. Genome of *Enterobacteriophage* Lula/phi80 and Insights into Its Ability To Spread in the Laboratory Environment. *J Bacteriol.* 2012;194(22). doi:10.1128/jb.01353-12.
126. Hobbs SJ, Wein T, Lu A, et al. Phage anti-CBASS and anti-Pycsar nucleases subvert bacterial immunity. *Nature.* 2022;605(7911):522-526. doi:10.1038/s41586-022-04716-y.
127. Brzozowa-Zasada M, Piecuch A, Bajdak-Rusinek K, Gołabek K, Michalski M, Matysiak N, Czuba Z. A Prognostic Activity of Glutaredoxin 1 Protein (Grx1) in Colon Cancer. *Int J Mol Sci.* 2024;25(2):1007. doi:10.3390/ijms25021007.
128. Bou-Nader C, Montémont H, Guérineau V, Jean-Jean O, Brégeon D, Hamdane D. Unveiling structural and functional divergences of bacterial tRNA dihydrouridine synthases: perspectives on the evolution scenario. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(3):1386–1394. doi:10.1093/nar/gkx1294.
129. Cen L, Chang Y, Bedree JK, et al. Exploitation of a Bacterium-Encoded Lytic Transglycosylase by a Human Oral Lytic Phage To Facilitate Infection. *J Virol.* 2022;96(19):e01063-22. doi:10.1128/jvi.01063-22.
130. Kronborg K, et al. cAMP competitively inhibits periplasmic phosphatases to coordinate nutritional growth with competence of *Haemophilus influenzae*. *J Biol Chem.* 2023;299(12):10540. doi:10.1016/j.jbc.2023.105404.
131. Bommer M, Ward JM. A 1-step microplate method for assessing the substrate range of l- α -amino acid aminotransferase. *Enzyme Microb Technol.* 2013;52(4-5):218-225. doi:10.1016/j.enzmictec.2013.02.007.
132. Azam MA, Jayaram U. Inhibitors of alanine racemase enzyme: a review. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2016;31(4):517-526. doi:10.3109/14756366.2015.1050010.
133. Lloyd LJ, et al. Identification of a New Member of the Phage Shock Protein Response in *Escherichia coli*, the Phage Shock Protein G (PspG). *J Biol Chem.* 2004;279(53):55707-55714. doi:10.1074/jbc.M408994200.
134. Richter K, Haslbeck M, Buchner J. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Mol Cell.* 2010;40(2):253-266. doi:10.1016/j.molcel.2010.10.006.

135. Yura T, Tobe T, Ito K, Osawa T. Heat shock regulatory gene (htpR) of *Escherichia coli* is required for growth at high temperature but is dispensable at low temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(21):6803-7. doi:10.1073/pnas.81.21.6803.
136. Nachappa SA, Neelambike SM, Ramachandra NB. Differential expression of the *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein genes in response to drug-induced stress. *Tuberculosis (Edinb)*. 2022;134:102201. doi:10.1016/j.tube.2022.102201.
137. Lefebvre B, Diarra MS, Moisan H, Malouin F. Detection of Virulence-Associated Genes in *Escherichia coli* O157 and Non-O157 Isolates from Beef Cattle, Humans, and Chickens. *J Food Prot*. 2008;71(9):1774-84. doi:10.4315/0362-028X-71.9.1774.
138. Biarrotte-Sorin S, Hugonnet JE, Delfosse V, Mainardi JL, Gutmann L, Arthur M, Mayer C. Crystal Structure of a Novel β -Lactam-insensitive Peptidoglycan Transpeptidase. *J Mol Biol*. 2006;359(3):533-8. doi:10.1016/j.jmb.2006.03.014.
139. Roldán MD, Pérez-Reinado E, Castillo F, Moreno-Vivián C. Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases. *FEMS Microbiol Rev*. 2008;32(3):474-500. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00107.x.
140. Ramya Sree B, Sowjanya B, Divakar K. Metagenomic bioprospecting of novel oxygen insensitive nitroreductase for degradation of nitro aromatic compounds. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2019;143:104737. doi:10.1016/j.ibiod.2019.104737.
141. Comparative Transcriptomic Analysis of *Staphylococcus aureus* Reveals the Genes Involved in Survival at Low Temperature
Authors: by Biao Suo, Peng Guan, Zijie Dong, Yun Zeng, Shijia Fan, Huiping Fan, Zhongmin Huang and Zhilu Ai
Link: <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/7/996>
142. Mellies JL, Platenkamp A, Osborn J, Ben-Avi L. PerC Manipulates Metabolism and Surface Antigens in Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:32. doi:10.3389/fcimb.2017.00032
143. Thomason LC, Court DL. Study of Ren, RexA, and RexB Functions Provides Insight Into the Complex Interaction Between Bacteriophage λ and Its Host, *Escherichia coli*. *PHAGE*. 2022;3(3):153-164.
144. Thomason LC, Schiltz CJ, Court C, Hosford CJ, Adams MC, Chappie JS, Court DL. Bacteriophage λ RexA and RexB functions assist the transition from lysogeny to lytic

- growth. *Mol Microbiol.* 2021 Oct;116(4):1044-1063. doi: 10.1111/mmi.14792. Epub 2021 Aug 30. PMID: 34379857; PMCID: PMC8541928.
145. Larry Snyder, Karen McWilliams, The rex genes of bacteriophage lambda can inhibit cell function without phage superinfection, *Gene*, Volume 81, Issue 1, 1989, Pages 17-24 ISSN 0378-1119 [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90332-6](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90332-6). (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378111989903326>)
 146. Yoshimasu M, Aihara H, Ito Y, et al. An NMR study on the interaction of *Escherichia coli* DinI with RecA-ssDNA complexes. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(6):1735-43. doi:10.1093/nar/gkg272. PMID:12626715.
 147. Rodriguez-Beltran J, Rodriguez-Rojas A, Guelfo JR, Couce A, Blazquez J. The *Escherichia coli* SOS gene dinF protects against oxidative stress and bile salts. *PLoS One.* 2012;7(4):e34791. doi:10.1371/journal.pone.0034791.
 148. Keon RG, Fu R, Voordouw G. Deletion of two downstream genes alters expression of the hmc operon of *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *vulgaris* Hildenborough. *Arch Microbiol.* 1997;167(5):376-83. doi:10.1007/s002030050563.
 149. Yeo WS, Lee JH, Lee KC, Roe JH. IscR acts as an activator in response to oxidative stress for the suf operon encoding Fe-S assembly proteins. *Mol Microbiol.* 2006;61(1):206-18. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05232.x.
 150. Liu F, Su Z, Chen P, et al. Structural basis for zinc-induced activation of a zinc uptake transcriptional regulator. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(11):6511-6528. doi:10.1093/nar/gkab432.
 151. Matsui H, Sano Y, Ishihara H, Shinomiya T. Regulation of pyocin genes in *Pseudomonas aeruginosa* by positive (prtN) and negative (prtR) regulatory genes. *J Bacteriol.* 1993;175(5):1257-63. doi:10.1128/jb.175.5.1257-1263.1993.
 152. Su R, Jin L, Xu J, et al. The role of iron-uptake factor PiuB in pathogenicity of soybean pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 2024;40(1):177-189. Chinese. doi:10.13345/j.cjb.230338.
 153. Walukiewicz HE, Farris Y, Burnet MC, et al. Regulation of bacterial stringent response by an evolutionarily conserved ribosomal protein L11 methylation. *mBio.* 2024;15(3):e01773-24. doi:10.1128/mbio.01773-24.

154. Porse BT, Leviev I, Mankin AS, Garrett RA. The antibiotic thiostrepton inhibits a functional transition within protein L11 at the ribosomal GTPase centre. *J Mol Biol.* 1998;276(2):391-404. doi:10.1006/jmbi.1997.1553.
155. Pérez-Arellano I, Gil-Ortiz F, Cervera J, Rubio V. Glutamate-5-kinase from *Escherichia coli*: gene cloning, overexpression, purification and crystallization of the recombinant enzyme and preliminary X-ray studies. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2004;60(Pt 11):2091-4. doi:10.1107/S0907444904023972.
156. Griffin ME, et al. Peptidoglycan NlpC/P60 peptidases in bacterial physiology and host interactions. *Cell Chem Biol.* 2023;30(5):436-456. doi:10.1016/j.chembiol.2022.11.001.
157. Tarkowski TA, Mooney D, Thomason LC, Stahl FW. Gene products encoded in the ninR region of phage λ participate in Red-mediated recombination. *Genes Cells.* 2002;7(4):351-63. doi:10.1046/j.1365-2443.2002.00531.x.
158. Birkholz EA, et al. An intron endonuclease facilitates interference competition between coinfecting viruses. *Science.* 2024;385(6633):105-112. doi:10.1126/science.adl1356.
159. Chen X, Shen D, Zhou B. Analysis of the temperature-sensitive mutation of *Escherichia coli* pantothenate kinase reveals YbjN as a possible protein stabilizer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;345(3):834-42. doi:10.1016/j.bbrc.2006.04.114.
160. Soldo B, Lazarevic V, Karamata D. *tagO is involved in the synthesis of all anionic cell-wall polymers in Bacillus subtilis* 168. *Microbiology.* 2002 Jul;148(Pt 7):2079–87. doi:10.1099/00221287-148-7-2079. PMID: 12093906.
161. Tzin V, Malitsky S, Aharoni A, Galili G. Expression of a bacterial bi-functional chorismate mutase/prephenate dehydratase modulates primary and secondary metabolism associated with aromatic amino acids in Arabidopsis. *Plant J.* 2009;60(1):156-67. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03945.x.
162. Schomburg D, Salzmann M. Guanidinobutyrase. In: Schomburg D, Salzmann M, editors. *Enzyme Handbook 4.* Berlin, Heidelberg: Springer; 1991. p. 1-8. doi:10.1007/978-3-642-84437-9_186.
163. Kondo Y, Inai Y, Sato Y, et al. Senescence marker protein 30 functions as gluconolactonase in L-ascorbic acid biosynthesis, and its knockout mice are prone to scurvy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(15):5723-8. doi:10.1073/pnas.0511225103.

164. Fujita T, Inoue H, Kitamura T, et al. Senescence marker protein-30 (SMP30) rescues cell death by enhancing plasma membrane Ca^{2+} -pumping activity in Hep G2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;250(2):374-80. doi:10.1006/bbrc.1998.9276.
165. Jia B, Jia X, Kim KH, Jeon CO. Integrative view of 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent oxygenase diversity and functions in bacteria. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1861(2):323-334. doi:10.1016/j.bbagen.2016.12.001.
166. Kavanagh KL, Jörnvall H, Persson B, Oppermann U. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(23):3895-906. doi:10.1007/s00018-008-8588-y.
167. Persson B, Hedlund J, Jörnvall H. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(23):3879-93. doi:10.1007/s00018-008-8587-z.
168. Miccolis A, Galluccio M, Giancaspero TA, Indiveri C, Barile M. Bacterial over-expression and purification of the 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) reductase domain of human FAD synthase: functional characterization and homology modeling. *Int J Mol Sci*. 2012;13(12):16880-98. doi:10.3390/ijms131216880.
169. Salah Ud-Din AIM, Roujeinikova A. Methyl-accepting chemotaxis proteins: a core sensing element in prokaryotes and archaea. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(18):3293-3303. doi:10.1007/s00018-017-2514-0.
170. Harkey CW, Everiss KD, Peterson KM. The *Vibrio cholerae* toxin-coregulated-pilus gene *tcpI* encodes a homolog of methyl-accepting chemotaxis proteins. *Infect Immun*. 1994;62(7):2669-78. doi:10.1128/iai.62.7.2669-2678.1994.
171. Yu J, Loh K, Song ZY, Yang HQ, Zhang Y, Lin S. Update on glycerol-3-phosphate acyltransferases: the roles in the development of insulin resistance. *Nutr Diabetes*. 2018;8(1):34. doi:10.1038/s41387-018-0045-x.
172. Tuckerman JR, Gonzalez G, Sousa EHS, Wan X, Saito JA, Alam M, Gilles-Gonzalez MA. An oxygen-sensing diguanylate cyclase and phosphodiesterase couple for c-di-GMP control. *Biochemistry*. 2009;48(41):9764-74. doi:10.1021/bi901409g.
173. Chen Y, Guo R, Liang Y, et al. Characterization and genomic analysis of a novel lytic phage vB_PstM_ZRG1 infecting *Stutzerimonas stutzeri*, representing a new viral genus, *Elithevirus*. *Virus Res*. 2023;334:199183. doi:10.1016/j.virusres.2023.199183.

174. Liu X, Zeng J, Huang K, Wang J. Structure of the mannose transporter of the bacterial phosphotransferase system. *Cell Res.* 2019;29(8):680-682. doi:10.1038/s41422-019-0210-7.
175. Jeckelmann JM, Erni B. The mannose phosphotransferase system (Man-PTS) - Mannose transporter and receptor for bacteriocins and bacteriophages. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2020;1862(11):183412. doi:10.1016/j.bbamem.2020.183412.
176. Maggiolo AO, Mahajan S, Rees DC, Clemons WM Jr. Intradimeric Walker A ATPases: Conserved Features of A Functionally Diverse Family. *J Mol Biol.* 2023;435(11):167965. doi:10.1016/j.jmb.2023.167965.
177. Moir JW, Wood NJ. Nitrate and nitrite transport in bacteria. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(2):215-24. doi:10.1007/PL00000849.
178. Terui Y, Saroj SD, Sakamoto A, et al. Properties of putrescine uptake by PotFGHI and PuuP and their physiological significance in *Escherichia coli*. *Amino Acids.* 2014;46(3):661-70. doi:10.1007/s00726-013-1517-x.
179. Vargiu AV, Phan G, Venter H, Broutin I. The structural and functional study of efflux pumps belonging to the RND transporters family from Gram-negative bacteria. *Antibiotics (Basel).* 2022;11(4):429. doi:10.3390/antibiotics11040429.
180. Volante A, et al. Molecular anatomy of ParA-ParA and ParA-ParB interactions during plasmid partitioning. *J Biol Chem.* 2015;290(30):18782-18795. doi:10.1074/jbc.M115.649632.
181. Rajesh Kumar Sahoo, Mahendra Gaur, Suchanda Dey, Saubhagini Sahoo, Aradhana Das, Enketeswara Subudhi, Genomic insight of extremely drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST5378 from a paediatric bloodstream infection, *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, Volume 33, 2023, Pages 227-230, ISSN 2213-7165, <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.04.002>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716523000656>)
182. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2024.01.015>. Bacterial defense systems exhibit synergistic anti-phage activity Wu, Yi et al. *Cell Host & Microbe*, Volume 32, Issue 4, 557 - 572.e6
183. Bindal GKrishnamurthi RSeshasayee ASN, Rath D2017.CRISPR-Cas-Mediated Gene Silencing Reveals RacR To Be a Negative Regulator of YdaS and YdaT Toxins in

- Escherichia coli* K-12. mSphere2:10.1128/msphere.00483-17.<https://doi.org/10.1128/msphere.00483-17>
184. Zhang Y, Zhang J, Hara H, Kato I, Inouye M. Characterization of YafO, an *Escherichia coli* toxin. *J Biol Chem.* 2009;284(38):25522–31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.036624>.
 185. Cumby NE, Edwards AM, Davidson AR, Maxwell KL. 2012. The Bacteriophage HK97 gp15 Moron Element Encodes a Novel Superinfection Exclusion Protein. *J Bacteriol* 194:1. <https://doi.org/10.1128/jb.00843-12>
 186. Zhang, Y. and Inouye, M. (2011), RatA (YfjG), an *Escherichia coli* toxin, inhibits 70S ribosome association to block translation initiation. *Molecular Microbiology*, 79: 1418-1429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07506.x>
 187. Gerdes K, Bærentsen R, Brodersen DE. 2021. Phylogeny Reveals Novel HipA-Homologous Kinase Families and Toxin-Antitoxin Gene Organizations. *mBio* 12:10.1128/mbio.01058-21. <https://doi.org/10.1128/mbio.01058-21>
 188. Vanja Perčulija, Songying Ouyang, Chapter 9 - Diverse Roles of DEAD/DEAH-Box Helicases in Innate Immunity and Diseases, Editor(s): Renu Tuteja, *Helicases from All Domains of Life*, Academic Press, 2019, Pages 141-171, ISBN 9780128146859, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814685-9.00009-9>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128146859000099>)
 189. Mohamed A.M. Ali, DEAD-box RNA helicases: The driving forces behind RNA metabolism at the crossroad of viral replication and antiviral innate immunity, *Virus Research*, Volume 296, 2021, 198352, ISSN 0168-1702, <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198352>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170221000599>)
 190. Maugeri, G., Calvo, M., Bongiorno, D., Bivona, D., Migliorisi, G., Privitera, G. F., Scalia, G., & Stefani, S. (2025). Sequencing Analysis of Invasive Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates Secondary to Gastrointestinal Colonization. *Microorganisms*, 13(1), 89. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13010089>
 191. Habib, S., Gibbon, M. J., Couto, N., Kakar, K., Habib, S., Samad, A., Munir, A., Fatima, F., Mohsin, M., & Feil, E. J. (2023). The Diversity, Resistance Profiles and

- Plasmid Content of *Klebsiella* spp. Recovered from Dairy Farms Located around Three Cities in Pakistan. *Antibiotics*, 12(3), 539. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030539>
192. Canchaya C, Proux C, Fournous G, Bruttin A, Brüssow H 2003. Prophage Genomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.2.238-276.2003>
 193. Zünd, M., Ruscheweyh, H.J., Field, C.M. *et al.* High throughput sequencing provides exact genomic locations of inducible prophages and accurate phage-to-host ratios in gut microbial strains. *Microbiome* 9, 77 (2021). <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01033-w>
 194. Nanda AM, Heyer A, Krämer C, Grünberger A, Kohlheyer D, Frunzke J. 2014. Analysis of SOS-Induced Spontaneous Prophage Induction in *Corynebacterium glutamicum* at the Single-Cell Level. *J Bacteriol* 196: <https://doi.org/10.1128/jb.01018-13>
 195. Tactical terminase: How a *Salmonella* prophage navigates oxidative stress Sønningsen, Sine Lø Cell Host & Microbe, Volume 32, Issue 6, 781 - 783
 196. Lemire S, Figueroa-Bossi N, Bossi L (2011) Bacteriophage Crosstalk: Coordination of Prophage Induction by Trans-Acting Antirepressors. *PLoS Genet* 7(6): e1002149. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002149>
 197. Joy Y. Yang, Wenwen Fang, Fabiola Miranda-Sanchez, Julia M. Brown, Kathryn M. Kauffman, Chantel M. Acevero, David P. Bartel, Martin F. Polz, Libusha Kelly, Degradation of host translational machinery drives tRNA acquisition in viruses, *Cell Systems*, Volume 12, Issue 8, 2021, Pages 771-779.e5, ISSN 2405-4712, <https://doi.org/10.1016/j.cels.2021.05.019>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405471221002052>)
 198. Guerrero-Bustamante CA, Hatfull GF. 2024. Bacteriophage tRNA-dependent lysogeny: requirement of phage-encoded tRNA genes for establishment of lysogeny. *mBio* 15:e03260-23. <https://doi.org/10.1128/mbio.03260-23>
 199. Haaber J, Leisner JJ, Cohn MT, Catalan-Moreno A, Nielsen JB, Westh H, Penadés JR, Ingmer H. Bacterial viruses enable their host to acquire antibiotic resistance genes from neighbouring cells. *Nat Commun.* 2016 Nov 7;7:13333. doi: 10.1038/ncomms13333. PMID: 27819286; PMCID: PMC5103068.
 200. Leona Wunderlichová, Leona Buňková, Marek Koutný, Tomáš Valenta, František Buňka, Novel touchdown-PCR method for the detection of putrescine producing Gram-

- negative bacteria in food products, *Food Microbiology*, Volume 34, Issue 2, 2013, Pages 268-276, ISSN 0740 0020, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.024>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002012002341>)
201. Stefan Biastoff, Wolfgang Brandt, Birgit Dräger, Putrescine N-methyltransferase – The start for alkaloids, *Phytochemistry*, Volume 70, Issues 15–16, 2009, Pages 1708–1718, ISSN 0031-9422, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.06.012>.
 202. Loconsole D, Accogli M, De Robertis AL, Capozzi L, Bianco A, Morea A, Mallamaci R, Quarto M, Parisi A, Chironna M. Emerging high-risk ST101 and ST307 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones from bloodstream infections in Southern Italy. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2020 Jun 1;19(1):24. doi: 10.1186/s12941-020-00366-y. PMID: 32487201; PMCID: PMC7266126..
 203. Bondy-Denomy, J., Garcia, B., Strum, S. *et al*. Multiple mechanisms for CRISPR–Cas inhibition by anti-CRISPR proteins. *Nature* 526, 136–139 (2015). <https://doi.org/10.1038/nature15254>
 204. Lina M León, Allyson E Park, Adair L Borges, Jenny Y Zhang, Joseph Bondy-Denomy, Mobile element warfare via CRISPR and anti-CRISPR in *Pseudomonas aeruginosa*, *Nucleic Acids Research*, Volume 49, Issue 4, 26 February 2021, Pages 2114–2125, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab006>
 205. Dong, D., Guo, M., Wang, S. *et al*. Structural basis of CRISPR–SpyCas9 inhibition by an anti-CRISPR protein. *Nature* 546, 436–439 (2017). <https://doi.org/10.1038/nature22377>
 206. Pawluk A, Bondy-Denomy J, Cheung VH, Maxwell KL, Davidson AR. A new group of phage anti-CRISPR genes inhibits the type I-E CRISPR-Cas system of *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*. 2014 Apr 15;5(2):e00896. doi: 10.1128/mBio.00896-14. PMID: 24736222; PMCID: PMC3993853.
 207. Marino, N.D., Pinilla-Redondo, R., Csörgő, B. *et al*. Anti-CRISPR protein applications: natural brakes for CRISPR-Cas technologies. *Nat Methods* 17, 471–479 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0771-6>
 208. <https://doi.org/10.1128/msphere.00452-21> ASM Journals K, Kawano M, Sugai M. 2021. Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence Genes within the Prophage-Associated Regions in Nosocomial Pathogens. *mSphere* 6:10.1128/msphere.00452-21.

209. Salvador-Oke KT, Pitout JDD, Peirano G, Strydom KA, Kingsburgh C, Ehlers MM, Ismail A, Takawira FT, Kock MM. Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Gauteng South Africa. Sci Rep. 2024 Nov 9;14(1):27337. doi: 10.1038/s41598-024-70910-9. PMID: 39521758; PMCID: PMC11550437.

