

# İmipenemin *Escherichia coli* Gen İfadesi Profiline Kısa ve Uzun-Dönemli Etkilerinin Belirlenmesi

## *Evaluation of Short- and Long-term Effects of Imipenem on Gene Expression Profile in Escherichia coli*

Hüseyin Özgür Özdemirel\*<sup>ORCID</sup>, Sibel Küçükıldırım\*<sup>ORCID</sup>

\* Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

**Atf/Cite as:** Özdemirel HÖ, Küçükıldırım S. İmipenemin *Escherichia coli* gen ifadesi profiline kısa ve uzun-dönemli etkilerinin belirlenmesi. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2025;55(1):27-34.

### Öz

**Amaç:** Hastalık etkeni bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç kazanması önemli bir halk sağlığı sorunudur. Günümüzde yaygın olarak kullanılan pek çok antibiyotikğin etki mekanizmasının halen tam olarak anlaşılammış olmasına ilaveten antibiyotiklere maruz kalmanın bakterilerde kısa ve uzun dönemde neden olduğu etkiler hakkındaki bilgilerimiz de sınırlıdır. Bu çalışmada, imipenem antibiyotikğinin *Escherichia coli*'de yol açtığı etkilerin belirli zaman aralıklarında karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Eş zamanlı olarak oluşturulan *E. coli* kültürlerine öldürücü olmayan dozda imipenem uygulanmıştır. Farklı zaman aralıklarında örneklenen kültürlerde imipenemin neden olduğu hücresel etkiler RNA dizileme yöntemiyle incelenmiştir.

**Bulgular:** Antibiyotik uygulanan kültürlerde, hücre membranında yer alan proteinleri ya da bu proteinlerin taşınmasında rol oynayan diğer proteinleri kodlayan genler (*yajC*, *ldcA*, *lolA*, *ldtC*, *ygdI*) ve atım pompaları (*yhjE*) ile ilişkili genlerin ifadelerinde istatistiksel olarak önemli artış olduğu gözlemlenmiştir.

**Sonuç:** Gen ifadesi profilinde zamana bağlı değişimlerin tespit edildiği bu çalışma ile, düşük doz antibiyotik uygulamasının bakterilerde antibiyotik direncinin kazanılmasına kısa ve uzun dönemde sağlayacağı katkılar karşılaştırmalı olarak ortaya koyulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Antibiyotik direnci, karbapenem, RNA dizileme

### ABSTRACT

**Objective:** Resistance of disease-causing bacteria to antibiotics is a significant public health problem. Besides the fact that the mechanism of action of many common antibiotics is still not fully understood, our knowledge about the short and long-term effects of exposure to antibiotics on bacteria is also limited. We aimed to evaluate the impact of imipenem on *Escherichia coli* at certain time intervals comparatively, in the present study.

**Methods:** Non-lethal doses of imipenem were simultaneously applied to *E. coli* cultures. The cellular effects caused by imipenem in cultures sampled at different time intervals were examined by RNA sequencing.

**Results:** Statistically significant changes were observed in the expression of genes encoding proteins located in the cell membrane or proteins involved in the transportation of these proteins (*yajC*, *ldcA*, *lolA*, *ldtC*, *ygdI*) and genes that are directly related to efflux pumps (*yhjE*).

**Conclusion:** This study compared the short and long-term effects of low doses of antibiotics on the development of antibiotic resistance in bacteria by analyzing gene expression profiles.

**Keywords:** Antibiotic resistance, carbapenem, RNAseq

**Alındığı tarih / Received:**  
16.08.2024 / 16.August.2024

**Kabul tarihi / Accepted:**  
25.10.2024 / 25.October.2024

**Yayın tarihi / Publication date:**  
24.03.2025 / 24.March.2025

### ORCID Kayıtları

H. Ö. Özdemirel 0000-0002-3284-5185  
S. Küçükıldırım 0000-0003-2241-3060

✉ sibelkucukyildirim@gmail.com

### GİRİŞ

*Escherichia coli* idrar yolu enfeksiyonları, septisemi ve menenjit gibi ciddi hastalıklara neden olabilen fırsatçı bir patojendir. Dirençli Gram-negatif enfeksiyon etkenleri arasında *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca*, plazmit-aracılı AmpC β-laktamaz

üreten başlıca türler olmalarına ek olarak, genişlemiş spektrumlu β-laktamaz (GSBL) genlerini de yaygın olarak bulundurlar<sup>(1)</sup>. Bu durum, tedavi seçeneklerini nispeten azaltmaktadır. GSBL üreten *E. coli* suşları ve diğer çoklu ilaç direncine sahip patojenlerin neden olduğu ciddi enfeksiyonlarda etkili olan az sayıdaki ajanlardan biri karbapenem antibiyotikleridir.

Karbapenemler,  $\beta$ -laktam antibiyotiklerin bir alt sınıfıdır ve tüm  $\beta$ -laktam antibiyotikler gibi yapılarında bulunan  $\beta$ -laktam halkası ile bakteri hücre duvarı sentezini engellerler. Ancak kimyasal yapıları itibarıyla penisilin ve sefalosporinlerden farklıdır ve bu yapı, karbapenemlerin antibakteriyel spektrumunun genişlemesine olanak sağlar. Karbapenemler aerobik ve anaerobik, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı etki gösteren geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. İmipenem kompleks mikrobiyal enfeksiyonların tedavisinde kullanılmak üzere ticari olarak temin edilebilen ilk karbapenemdir<sup>(2)</sup>.

Karbapenemler bakteri hücre duvarından kolaylıkla difüze olamadıklarından Gram-negatif bakterilerde genel olarak dış membran (OM) proteinleri ya da porin olarak adlandırılan proteinler aracılığıyla hücreye girerler. Atım pompalarının ifadesinin artması,  $\beta$ -laktamaz üretimi, porinlerin ifadesinin azalması ile porinlerin ve/veya penisilin bağlayan proteinlerin (PBP) mutasyonlar yoluyla işlevinin değişmesi bakterilerin karbapenemlere karşı direnç geliştirmesini sağlayan mekanizmalar olarak tanımlanmıştır<sup>(2,3)</sup>. Ayrıca, bu mekanizmaların kombinasyonlarının *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve *K. pneumoniae*'de direnç seviyesini arttırdığı da gösterilmiştir<sup>(4)</sup>. *E. coli*'de ise, plazmit-aracılı AmpC  $\beta$ -laktamaz üretiminin ve porin ifadesindeki azalmanın karbapenem direncinden sorumlu temel mekanizmalar olduğu öne sürülmüştür<sup>(4-6)</sup>.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (ECDC) tarafından 2023 yılında yayınlanan ve 29 ülkeyi kapsayan Avrupa Antimikrobiyal Direnç İzleme Raporu'nda, 2017-2021 yılları arasında antimikrobiyal direncinin yaygın olarak gözlemlendiği sekiz bakteri türüne ait veriler sunulmuştur. Bu raporda, Türkiye'de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp. türlerinde karbapenem (imipenem ve meropenem) direncinin arttığı ve *E. coli*'de gözlenen karbapenem direncinin Avrupa genelinde %0-1.1 aralığında iken Türkiye'de %4.7 oranında olduğu ortaya

konulmuştur<sup>(7)</sup>. Karbapenem dirençli *E. coli* pnömoni, idrar yolu enfeksiyonları gibi ciddi enfeksiyonlara neden olmasına ek olarak insan ve hayvanlar arasında gözlenen bulaşma sıklığı nedeniyle de önemli bir halk sağlığı endişesi yaratmaktadır<sup>(5,8)</sup>. Avrupa'da ve Türkiye'de karbapenem direncinde gözlenen artış bu antibiyotiklerin etki ve direnç mekanizmalarının detaylı olarak çalışılmasına motivasyon sağlamaktadır.

Bu çalışmada, RNAseq yöntemi kullanılarak, öldürücü olmayan dozda kısa ve uzun süreli imipenem uygulamasının *E. coli* hücrelerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen veriler imipenemin etki mekanizması ve direnç evriminin detaylı olarak anlaşılmasına katkı sunma potansiyeline sahiptir. Ek olarak, farklı sürelerde antibiyotik uygulamasının yarattığı hücresel etkilerin de karşılaştırılmasına olanak sağlamıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan imipenem antibiyotığının stok çözeltisi üreticinin talimatlarına göre hazırlanmıştır (Sigma, Cat no: PHR1796). Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIK) ve öldürücü olmayan imipenem konsantrasyonunun belirlenmesi için Andrews'den<sup>(9)</sup> modifiye edilen sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır: *E. coli* ATCC25922 suşu Brain-Heart Infusion besiyerine ekilerek çalkalamalı etüvde 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Ardından, bu kültürden 1/100 oranında Mueller-Hinton sıvı besiyerine ekim yapılmış ve çalkalamalı etüvde (37°C) kültür yoğunluğu McFarland 0.5 bulanıklık standardına eşit olana kadar (yaklaşık dört saat) üretilmiştir. İstenilen yoğunluğa ulaşan kültür, serum fizyolojik ile 1/10 oranında seyreltilmiştir. Ardından, 96 kuyucuklu plaka kullanılarak, farklı konsantrasyonlarda (0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32  $\mu$ g/ml) imipenem içeren 0.1 ml Mueller-Hinton besiyerine 500.000 CFU/ml olacak şekilde ekim yapılarak sıvı mikrodilüsyon yöntemi uygulanmıştır<sup>(9)</sup>. 37°C'de 24 saat inkübasyonun ardından EnSight™ Multimode Plate Reader (Perkin Elmer) kullanılarak OD değerlerinin 600 nm dalga boyunda ölçülmesiyle

MIK ve öldürücü olmayan imipenem konsantrasyonu belirlenmiştir. Yöntem üç farklı günde, kendi içinde üçer tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir ve 0.5µg/ml imipenem konsantrasyonunun *E. coli* ATCC25922 için öldürücü olmadığı tespit edilmiştir.

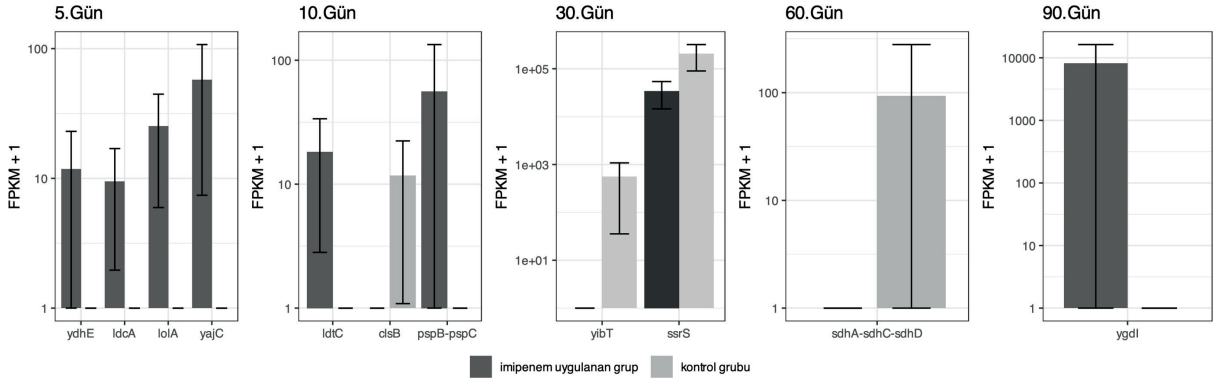
Antibiyotik dozunun tespit edilmesinin ardından, aynı atasal hücreden köken alan toplam 24 soy hattı oluşturulmuştur. Bu soy hatlarından 12 tanesi kontrol grubu olarak antibiyotik içermeyen ortamda 90 gün boyunca üretilmiştir. Deney grubunu oluşturan diğer 12 soy hattı ise, kontrol grubuyla eş zamanlı olarak, öldürücü olmayan dozda (0.5 µg/ml) imipenem içeren ortamda 90 gün boyunca üretilmiştir. Bu süreç boyunca (90 gün), tüm soy hatları, 24 kuyucuklu plakalar kullanılarak her gün taze besiyeri ortamına 1/100 oranında ekilerek üretilmiştir (2 ml besiyerine 20 µl ekim yapılmıştır). Antibiyotik'in kısa (5., 10., 15., 20. gün) ve uzun dönemli (30., 60., ve 90. gün) etkilerinin değerlendirilmesi için tüm soy hatlarından belirtilen günlerde RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonu GeneAll marka total RNA izolasyon kiti (Cat no: 305-101) kullanılarak ve üretici firmanın önerdiği protokol uygulanarak yapılmıştır. İzole edilen RNA örnekleri -80°C'de muhafaza edilmiştir. RNAseq kütüphaneleri hazırlanmadan önce RNA miktarları iQuant RNA HS assay kit (ABP Biosciences, Cat no: N016) ve Qubit flourometre kullanılarak ölçülmüştür. Ardından, RNAseq kütüphaneleri NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit (New England Biolabs, Cat no: E7770) kullanılarak hazırlanmıştır. Kütüphane hazırlama ve dizileme Ankara Üniversitesi Agrigenomics Hub (AgriGx) Hayvan ve Bitki Genomik Araştırmaları İnovasyon Merkezi'nde hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir.

Dizileme sonucunda elde edilen ham veriler FastQC kullanılarak kontrol edilmiştir<sup>(10)</sup>. Biyoinformatik analizlerin güvenilir şekilde gerçekleştirilmesi için, öncelikle, ham verilerden kalite skoru düşük okumalar (<30) ve adaptör diziler Trimmomatic kullanılarak çıkarılmıştır<sup>(11)</sup>. Bowtie2 kullanılarak referans genom indekslenmiştir ve okumalar referans genoma (NCBI, GCF\_000743255.1) hizalanmıştır<sup>(12)</sup>.

Samtools ile okumalar haritalanmıştır<sup>(13)</sup>. Cufflinks kullanılarak transkriptomlar bir araya getirilmiş ve genlerin ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir<sup>(14)</sup>. Cuffmerge ile örneklerden elde edilen okumalar gruplandırılmış ve karşılaştırmalı analiz yapılabilmesi için birleştirilmiştir<sup>(14)</sup>. DESeq2 R paketi ve Cuffdiff kullanılarak imipenem ve kontrol örnekleri arasında gen ifadesi profillerinin karşılaştırılması yapılmıştır<sup>(14,15)</sup>. Örnekler arasında, gen ifadesi profilleri açısından, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunan genler *CummeRbund* R paketi kullanılarak seçilmiş ve gen setleri oluşturulmuştur. *ggplot2* ve *CummeRbund* R paketleri kullanılarak veriler analiz edilmiş ve görselleştirilmiştir<sup>(16,17)</sup>.

## BULGULAR

Imipenemin minimum inhibitör konsantrasyonunun ve öldürücü olmayan dozunun belirlenmesi için sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır ve uygulanan deneysel şartlarda, 0.5 µg/ml imipenem konsantrasyonunun *E. coli* ATCC25922 için öldürücü olmadığı belirlenmiştir. Ardından, antibiyotik'in kısa ve uzun dönemli etkilerinin değerlendirilmesi için literatürde yer alan deneysel evrim çalışmalarından uyarlanan bir yöntem kullanılmıştır<sup>(18-21)</sup>. Aynı atasal hücreden köken alan 24 soy hattı (12'si kontrol grubu ve 12'si deney grubu olmak üzere) oluşturulmuş ve tüm soy hatları her gün taze sıvı besiyeri ortamına transfer edilerek üretilmiştir. Toplam 90 gün süren bu deneysel evrim çalışması sırasında belirli günlerde (5., 10., 15., 20., 30., 60., ve 90. gün) soy hatlarından izole edilen RNA'lar dizilenmiştir. Dizileme sonucunda, örneklerden ortalama 2980291 ham okuma elde edilmiştir (min= 647196, max= 9585974). Adaptör dizilerin uzaklaştırılması ve kalite skorlarına göre filtrelemeden sonra ortalama 2672531 okuma (min= 566736, max= 8713466) *E. coli* ATCC 25922 referans genomuna hizalanmıştır. Imipenem uygulanan grup ve kontrol grubu arasındaki gen ifadesi farklılıklarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde  $q < 0.05$  değeri kriter olarak uygulanmıştır.



Şekil 1. Antibiyotik uygulanan grup ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılığı gözlenen genler ( $p < 0.05$ )

Tablo 1. q değerlerine göre örneklerde ifadesi en çok artan on gen

5. gün	10.gün	15. Gün	20. Gün	30.gün	60.gün	90.gün
<i>yhdE</i> *	<i>ldtC</i> *	<i>yohJ-K</i> *	<i>lueO</i> *	<i>yibT</i> **	<i>sdhA-C-D</i> **	<i>ygdI</i> *
<i>ldcA</i> *	<i>clsB</i> **	<i>pstA-C</i> *	<i>damX</i> *	<i>ssrS</i> **	<i>ygeY</i> *	<i>crr</i>
<i>lolA</i> *	<i>pspB-C</i> *	<i>mltA</i> *	<i>rplV</i> *	<i>lepB</i>	<i>FPI65_23345</i> *	<i>yibT</i>
<i>yajC</i> *	<i>BE932_13290</i>	<i>D4N09_07100</i>	<i>ygdI</i> *	<i>fes</i> *	<i>nlpI</i> *	<i>rplB</i>
<i>ppiA</i>	<i>yidQ</i>	<i>ldcA</i>	<i>flhD</i>	<i>lpoA,yraN</i> *	<i>yqeB-C</i> *	<i>rplX</i>
<i>glnP-Q</i>	<i>FPI65_21005</i>	<i>yajG</i>	<i>tsaB</i>	<i>fsa</i> *	<i>recA</i> *	<i>rpsH</i>
<i>accB</i> *	<i>ydeR</i>	<i>yhbY</i>	<i>upp</i>	<i>hisJ</i>	<i>udp</i> *	<i>rplF</i>
<i>sgcQ</i>	<i>mltA</i>	<i>exuT</i> *	<i>ghxQ</i> *	<i>dgcN,yfiR</i>	<i>A5U30_004266</i> *	<i>gltI</i>
<i>thiB-P-Q</i>	<i>ydaV</i>	<i>yjDM</i>	<i>frdC</i> *	<i>uspG</i>	<i>rplX</i> *	<i>cyoB-C-D</i>
<i>traD</i>	<i>tesB</i> *	<i>frdC</i>	<i>yjgA</i>	<i>queD</i>	<i>rpoA</i> *	<i>grcA</i>

\*Kontrol grubunda, imipenem uygulanan grupla karşılaştırıldığında ifadesi düzeyi daha yüksek bulunan genler.

\*\*Kontrol grubu ve imipenem uygulanan grup arasında, ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı belirlenen genler ( $p < 0.05$ ).

Kontrol grubu ve imipenem uygulanan grup gen ifadesi farklılıkları bakımından karşılaştırıldığında, 5. günde izole edilen örneklerde dört genin ifadesinde fark gözlenmişken, 10. günde üç, 30. günde iki, 60 ve 90. günlerde ise sadece tek genin ifadesinde fark bulunmuştur (Şekil 1). 15. ve 20. günlerde ise, grupların gen ifadeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Imipenem uygulanan grupta, örnekleme yapılan tüm günlerde, q değerlerine göre ifadesi en çok değişen 10 gen Tablo 1'de verilmiştir.

## TARTIŞMA

Murray ve ark.<sup>(22)</sup> tarafından yayınlanan kapsamlı sistematik derlemede, 2019 yılında dünya genelinde yaklaşık her dört ölümden birinin bakteriyel

antimikrobiyal dirençle ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Türkiye antimikrobiyal direncin yüksek olduğu ülkeler arasında yer almaktadır<sup>(7,23)</sup> ve karbapenem dirençli Enterobacterales (CRE) enfeksiyonları yüksek morbidite ve mortalite oranlarıyla dikkat çekmektedir<sup>(24)</sup>. Önceki çalışmalarda, karbapenem direnci genellikle karbapenemaz üretimi ile ilişkilendirilmiştir, ancak porin kodlayan genlerde gerçekleşen mutasyonlar ile bu genlerin ifadesindeki azalma ya da atım pompalarını kodlayan genlerin ifadesinin artmasının da direnç kazanılmasına katkı sağladığı ortaya konulmuştur<sup>(25-28)</sup>. Bakterilerin karbapenemlere karşı direnç kazanmasını sağlayan mekanizmaların çeşitliliği ve dünya genelinde artan CRE kaynaklı enfeksiyonlar dikkate alınarak planlanan bu çalışmada bakterilerin direnç kazanma sürecinde takip ettikleri adımların izlenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda, karbapenem sınıfından bir antibiyotik

olan imipenemin *E. coli*'de yol açtığı değişikliklerin kısa ve uzun-dönemli etkilerinin gözlenmesi için kültürler farklı günlerde örneklendirilerek RNA dizileme yapılmıştır. Yüksek verimli RNA dizileme yöntemi, kontrol grubu ile antibiyotik uygulanan grubun gen ifadesi profillerinin detaylı incelenmesine ve imipenem direnciyle ilişkisi daha önce tanımlanmamış aday genleri belirlemeye olanak sağlama potansiyeli nedeniyle tercih edilmiştir.

Beşinci günde, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, imipenem uygulanan grupta *yajC*, *idcA*, *lola* ve *yhdE* genlerinin ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir (Şekil 1). *yajC* geninin ürünü hücre içi protein taşınmasıyla ilişkili bir protein alt birimidir<sup>(29)</sup> ve AcrAB-TolC atım pompası ile tam karakterizasyonu yapılamamış bir etkileşiminin olduğu gösterilmiştir<sup>(30)</sup>. Törnroth-Horsefield ve ark.<sup>(30)</sup> tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *YajC* ve *AcrB* arasındaki etkileşimin kaybıyla doğrudan ilişkilendirilememiş olmasına rağmen, *E. coli*'de *yajC* geninin silinmesinin  $\beta$ -laktam antibiyotiklere duyarlılığı az miktarda arttırdığı ortaya konulmuştur. *IdcA* geninin kodladığı murein tetrapeptid karboksipeptidaz enzimi hücre duvarı biyogenezi ve peptidoglikan dönüşümünde rol oynamaktadır ve  $\beta$ -laktam antibiyotikler tarafından aktivitesinin engellendiği gösterilmiştir<sup>(31)</sup>. Ek olarak, *E. coli*'de, *IdcA* geninin dahil olduğu bir gen ağının stresle uyarılmış mutagenез ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir<sup>(32)</sup>. Gen ifadesi farkının gözlemlendiği bir diğer gen olan *lola*, iç membrandan dış membrana lipoproteinlerin taşınması ve OM yapısının oluşturulmasında merkezi role sahip olan bir proteini kodlamaktadır<sup>(33)</sup>, *Lola*'nın yokluğunun hücreler için bölünmenin durması ve hücre için toksik olabilecek proteinlerin iç membranda birikmesi gibi ciddi sonuçları olduğu bilinmektedir<sup>(34)</sup>. *Lol* sisteminde görevli proteinler, OM yapısıyla ilişkileri nedeniyle antibiyotiklerin hücreye girişinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar ve yeni antibakteriyellerin geliştirilmesi için umut veren hedefler olarak kabul edilmektedirler<sup>(35)</sup>. *yhdE* geni ise taşıyıcı bir proteini kodlamaktadır ve dahil olduğu protein ailesinin hücre içindeki toksik bileşiklerin ve ilaçların dışa atılmasını sağladıkları bilinmektedir<sup>(36,37)</sup>. Önceki çalışmalarda, bu genin artmış ifadesinin *E. coli*'de çeşitli antibiyotiklere (norfloksasin, doksorubisin, novobiosin, enoksasin ve siprofloksasin), boyalara (rhodamine 6G, ethidium

bromide, acriflavine ve crystal violet) ve amonyumlu bileşiklere (berberine, benzalkonium) karşı direnç sağladığı gösterilmiştir<sup>(37-39)</sup>.

Onuncu günde, imipenem uygulanan grupta *pspB*-*pspC* ve *ldtC* genlerinin ifade düzeyinin kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir. *clsB* geninin ifadesi ise, kontrol grubunda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Şekil 1). *pspB* ve *pspC* proteinlerini kodlayan genler bakteriyofaj şok operonunda bulunmakta ve transkripsiyonel regülasyonda görev yapmaktadır. Bu operonun besin ya da enerjinin sınırlı olduğu koşullarda hayatta kalmak için rekabette önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir<sup>(40)</sup>. *ldtC* geni, 5. günde ifade artışı gözlenen *ldtA* genine benzer olarak, hücre duvarı biyogenezi ve peptidoglikan biyosentezinde görevli bir enzimi kodlamaktadır<sup>(41)</sup>, bu genin mutant olduğu *E. coli* hücrelerinde zar geçirgenliğinin bozulduğu gösterilmiştir<sup>(42)</sup>. Ayrıca, intraselüler membran yapısının oluşturulmasında temel bir role sahip olan cardiolipin biyosentezinde görevli bir enzimi kodlayan<sup>(43)</sup> *clsB* geninin kontrol grubunda daha fazla ifade edildiği gözlenmiştir.

Otuzuncu günde, *ssrS* ve *yibT* genlerinin ifade düzeyinin kontrol grubunda antibiyotik uygulanan gruptan istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 1). *yibT* geni, henüz karakterizasyonu tamamlanmamış sitoplazmik bir proteini kodlamaktadır. *ssrS* geni ise, *E. coli*'de hücre streslere yanıt olarak gen ifadesinin düzenlenmesinde görev yapan kodlamayan 6S RNA'yı ifade etmektedir<sup>(44,45)</sup>.

Altmışıncı günde, enerji metabolizmasındaki suksinat dehidrogenaz enzimini kodlayan *sdhA*-*sdhC*-*sdhD* genlerinin<sup>(46)</sup> ifade düzeyinin kontrol grubunda antibiyotik uygulanan deney grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış olduğu belirlenmiştir. Doksanıncı günde ise, *ygdI* geninin ifadesinin antibiyotik uygulanan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir. *ygdI* geni, bir dış membran lipoproteinini kodlamaktadır ve biyofilm formasyonunda rol aldığı düşünülse de henüz hücre rolü tam karakterize edilememiştir<sup>(47)</sup>.

Sonuç olarak, bu çalışmada antibiyotik etkisinde ifade artışının belirlendiği genlerin neredeyse tamamı hücre membranında yer alan proteinler ile bu proteinlerin taşınmasında rol oynayan diğer proteinleri (yajC, ldcA, lolA, ldtC, ygdI), atım pompalarıyla ilişkili proteinleri (ydhE) veya stres cevabıyla ilişkili proteinleri (pspB-pspC) kodlayan genlerdir. İlk örnekleme gününden (5. gün) itibaren antibiyotik uygulanan grupta çoğunlukla stres cevabı ya da antibiyotik direnciyle ilişkili genlerin ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış belirlenmiş olması bu çalışmadan elde edilen en önemli bulgudur. Ayrıca, tüm veriler beraber değerlendirildiğinde, imipenem antibiyotiğinin kısa ve uzun-dönemli uygulanması sırasında ifade düzeyi sürekli artan ya da değişen belirli bir genin belirlenememiş olması da çalışmanın bir diğer ilgi çekici bulgusudur. Imipenem gibi geniş spektrumlu antibiyotiklere karşı direnç gelişimini inceleyen çalışmaların çoğunda, genellikle ilgili antibiyotiğin etki mekanizmasıyla ve/veya antibiyotik direnciyle ilişkisi iyi tanımlanmış genlere odaklanılmaktadır<sup>(48-50)</sup> ve bu durum, elde edilen sonuçları sınırlandırmaktadır. RNA dizileme yöntemini kullandığımız bu çalışmada öldürücü olmayan dozda uygulanan imipenemin hedef hücrelerde kısa ve uzun dönemli transkriptomik etkileri detaylı olarak incelenmiştir ve elde edilen veriler bu antibiyotiğin hücresel etki mekanizmasının ve direnç evriminin aydınlatılması yönünde literatüre katkı sağlama potansiyeline sahiptir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (FHD-2021-192030). H. Özgür Özdemirel, 100/2000 Doktora Burs Programı kapsamında YÖK tarafından desteklenmiştir. RNA dizileme kütüphanelerinin hazırlanması ve dizilenmesi sırasında sağladıkları teknik destek için Ayşegül Er Gökçe ve Ankara Üniversitesi Agrigenomics Hub (AgriGx) Hayvan ve Bitki Genomik Araştırmaları İnovasyon Merkezi üyelerine teşekkür ederiz. Bu araştırma kapsamındaki biyoinformatik analizler TÜBİTAK ULAKBİM, Yüksek Başarım ve Grid Hesaplama Merkezi'nde (TRUBA kaynaklarında) gerçekleştirilmiştir.

**Etik Kurul Onayı:** Bu çalışma kapsamında klinik örnek, insan, hayvan vb. örnekleri ile bu örneklerden elde edilmiş materyaller kullanılmamıştır.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

**Finansman:** Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (FHD-2021-192030). H. Özgür Özdemirel, 100/2000 Doktora Burs Programı kapsamında YÖK tarafından desteklenmiştir.

**Ethics Committee Approval:** Within the scope of this study, clinical samples, human beings, animals, etc. and materials obtained from these samples were not used.

**Conflict of Interest:** No conflict of interest was declared by the authors.

**Funding:** This study was founded by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (FHD-2021-192030). H. Özgür Özdemirel was supported by YÖK within the scope of 100/2000 PhD Scholarship Program.

## KAYNAKLAR

1. Sümer Ş, Kurt Azap O, Aygün G, Akalin H, Akova M, Köksal İ. Dirençli Gram-negatif bakteri infeksiyonlarının yönetiminde sık karşılaşılan sorunlar ve çözüm önerileri: Klinik pratiğe yönelik uzman görüşü. *Flora*. 2024;29(1):1-24. <https://doi.org/10.5578/flora.2024011051>
2. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(11):4943-60. <https://doi.org/10.1128/AAC.00296-11>
3. Aurilio C, Sansone P, Barbarisi M, et al. Mechanisms of action of carbapenem resistance. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(3):421. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030421>
4. Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis*. 2019;69(Suppl 7):S521-S8. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz824>
5. Suay-García B, Pérez-Gracia MT. Present and future of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) infections. *Antibiotics (Basel)*. 2019;8(3)122. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030122>

6. Huang J, Lv C, Li M, et al. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* exhibit diverse spatiotemporal epidemiological characteristics across the globe. *Commun Biol.* 2024;7(1):51. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05745-7>
7. World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023-2021 data 2023. [<https://www.who.int/europe/publications/item/9789289058537>] (Erişim tarihi: Ağustos.2024)
8. Qamar MU, Aatika, Chughtai MI, et al. Antibiotic-resistant bacteria, antimicrobial resistance genes, and antibiotic residue in food from animal sources: One health food safety concern. *Microorganisms.* 2023;11(1):161. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010161>
9. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48(Suppl 1):5-16. [https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl\\_1.5](https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5)
10. Andrews S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data 2010. [<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>] (Erişim tarihi: Ağustos.2024)
11. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114-20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
12. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie2. *Nat Methods.* 2012;9(4):357-9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
13. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics (Oxford, England).* 2009;25(16):2078-9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
14. Trapnell C, Roberts A, Goff L, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc.* 2012;7(3):562-78. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.016>
15. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
16. Goff L, Trapnell C, Kelley D. cummeRbund: Amalysis, exploration, manipulation, and visualization of Cufflinks high-throughput sequencing data. R package version 2460. 2024.
17. Wickham H. ggplot2: Elegant graphics for data analysis. New York: Springer-Verlag; 2016.
18. Long H, Miller SF, Strauss C, et al. Antibiotics treatment enhances the genome-wide mutation of target cells. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2016;113(18):2498-505. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601208113>
19. Turner CB, Marshall CW, Cooper VS. Parallel genetic adaptation across environments differing in mode of growth or resource availability. *Evol Lett.* 2018;2(4):355-67. <https://doi.org/10.1002/evl3.75>
20. Santos-Lopez A, Marshall C, Scribner M, Synder D, Cooper V. Evolutionary pathways to antibiotic resistance era dependent upon environmental structure and bacterial lifestyle. *Elife.* 2019;8:e47612. <https://doi.org/10.7554/eLife.47612>
21. Kucukyildirim S. Whole-population genomic sequencing reveals the mutational profiles of the antibiotic-treated *Escherichia coli* populations. *Biologia.* 2022;77:525-31. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00959-8>
22. Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *Lancet.* 2022;399(10325):629-55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
23. Isler B, Keske S, Aksoy M, et al. Antibiotic overconsumption and resistance in Turkey. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25(6):651-3. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.02.024>
24. Akalin H. Karbapenem dirençli Enterobacteriaceae enfeksiyonlarının tedavisi. Görenek L, editör. Karbapenem Dirençli Gram-Negatif Bakteri Enfeksiyonları kitabında, 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2023:45-60.
25. Öcal D. Gram negatif bakterilerde antibakteriyel direncin fenotipik yöntemler ile tayin ve bildirimi. *Ankem Derg.* 2012;26(3):154-64. <https://doi.org/10.5222/ankem.2012.154>
26. Miller SI. Antibiotic resistance and regulation of the gram-negative bacterial outer membrane barrier by host innate immune molecules. *mBio.* 2016;7:e01541-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01541-16>
27. Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, et al.  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol.* 2019;431(18):3472-500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>
28. Lima LM, Silva BNMD, Barbosa G, Barreiro EJ.  $\beta$ -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *Eur J Med Chem.* 2020;208:112829. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829>
29. Komar J, Alvira S, Schulze RJ, et al. Membrane protein insertion and assembly by the bacterial holo-translocon SecYEG-SecDF-YajC-YidC. *Biochem J.* 2016;473(19):3341-54. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160545>

30. Törnroth-Horsefield S, Gourdon P, Horsefield R, et al. Crystal structure of AcrB in complex with a single transmembrane subunit reveals another twist. *Structure*. 2007;15(12):1663-73.  
<https://doi.org/10.1016/j.str.2007.09.023>
31. Templin MF, Ursinus A, Höltje J-V. A defect in cell wall recycling triggers autolysis during the stationary growth phase of *Escherichia coli*. *EMBO J*. 1999;18(15):4108-17.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/18.15.4108>
32. Al Mamun AA, Lombardo MJ, Shee C, et al. Identity and function of a large gene network underlying mutagenic repair of DNA breaks. *Science*. 2012;338(6112):1344-8.  
<https://doi.org/10.1126/science.1226683>
33. Matsuyama S, Tajima T, Tokuda H. A novel periplasmic carrier protein involved in the sorting and transport of *Escherichia coli* lipoproteins destined for the outer membrane. *EMBO J*. 1995;14(14):3365-72.  
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07342.x>
34. Tajima T, Yokota N, Matsuyama S, Tokuda H. Genetic analyses of the in vivo function of LolA, a periplasmic chaperone involved in the outer membrane localization of *Escherichia coli* lipoproteins. *FEBS Lett*. 1998;439(1-2):52-4.  
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)01334-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01334-9)
35. Smith HC, May KL, Grabowicz M. Teasing apart the evolution of lipoprotein trafficking in gram-negative bacteria reveals a bifunctional LolA. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2023;120(6):e2218473120.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.2218473120>
36. Brown MH, Paulsen IT, Skurray RA. The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Mol Microbiol*. 1999;31(1):394-5.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01162.x>
37. Nishino K, Latifi T, Groisman EA. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol*. 2006;59(1):126-41.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04940.x>
38. Yang S, Clayton SR, Zechiedrich EL. Relative contributions of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51(3):545-56.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkg126>
39. Hayashi M, Tabata K, Yagasaki M, Yonetani Y. Effect of multidrug-efflux transporter genes on dipeptide resistance and overproduction in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 2010;304(1):12-9.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01879.x>
40. Brissette JL, Weiner L, Ripmaster TL, Model P. Characterization and sequence of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. *J Mol Biol*. 1991;220(1):35-48.  
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90379-k](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90379-k)
41. Magnet S, Dubost L, Marie A, Arthur M, Gutmann L. Identification of the L,D-transpeptidases for peptidoglycan cross-linking in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2008;190(13):4782-5.  
<https://doi.org/10.1128/JB.00025-08>
42. Morè N, Martorana AM, Biboy J, et al. Peptidoglycan remodeling enables *Escherichia coli* to survive severe outer membrane assembly defect. *mBio*. 2019;10(1):e02729-18.  
<https://doi.org/10.1128/mBio.02729-18>
43. Carranza G, Angius F, Ilioaia O, Solgadi A, Miroux B, Arechaga I. Cardiolipin plays an essential role in the formation of intracellular membranes in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2017;1859(6):1124-32.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.03.006>
44. Chae H, Han K, Kim KS, Park H, Lee J, Lee Y. Rho-dependent termination of *ssrS* (6S RNA) transcription in *Escherichia coli*: implication for 3' processing of 6S RNA and expression of downstream *ygfA* (putative 5-formyl-tetrahydrofolate cyclo-ligase). *J Biol Chem*. 2011;286(1):114-22.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.150201>
45. Burenina OY, Elkina DA, Ovcharenko A, et al. Involvement of *E. coli* 6S RNA in oxidative stress response. *Int J Mol Sci*. 2022;23(7):3653.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23073653>
46. McCloskey D, Xu S, Sandberg TE, et al. Growth adaptation of *gnd* and *sdhCB* *Escherichia coli* deletion strains diverges from a similar initial perturbation of the transcriptome. *Front Microbiol*. 2018;9:1793.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01793>
47. Abdelwahed EK, Hussein NA, Moustafa A, Moneib NA, Aziz RK. Gene networks and pathways involved in *Escherichia coli* response to multiple stressors. *Microorganisms*. 2022;10(9):1793.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10091793>
48. Dumas JL, van Delden C, Perron K, Köhler T. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;254(3):217-25.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00008.x>
49. Suzuki S, Horinouchi T, Furusawa C. Prediction of antibiotic resistance by gene expression profiles. *Nat Commun*. 2014;5:5792.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms6792>
50. Sabino YNV, Santana MF, Oyama LB, et al. Characterization of antibiotic resistance genes in the species of the rumen microbiota. *Nat Commun*. 2019;10(1):5252.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-13118-0>