

Bakteriyel Sirkadiyen Ritim

Bacterial Circadian Rhythm

Ayşegül Ateş[✉], Şafak Ermertcan[✉]

Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Atf/Cite as: Ateş A, Ermertcan Ş. Bakteriyel sirkadiyen ritim. Turk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 2023;53(1):1-9.

Öz

Moleküler bir saat olarak tanımlanabilen sirkadiyen ritim metabolik, biyokimyasal, hormonal değişiklikler bütünüdür. Bitkiler, memeliler, böcekler, mantarlar gibi ökaryotik canlılarda sirkadiyen ritim benzerliklerin ve farklılıkların olduğu kompleks moleküler mekanizmalarla görülmektedir. Basit bir yaşam tarzına sahip oldukları düşünülen siyanobakterilerde de sirkadiyen ritmin kompleks mekanizmalarla ortaya çıktığı görülmektedir. Bu mekanizmaya bağlı olarak fotosentez gün ışığında, azot fiksasyonu ise karanlıkta gerçekleştirilir. Siyanobakterilerin oluşturdukları ritim gün ışığındaki değişimden bağımsız olarak da görülmektedir. Mekanizma üç temel adımdan oluşmaktadır: osilatör, giriş yolu (Input pathway) ve çıkış yolu (Output pathway). Giriş yollarından osilatörlere gelen bilgiler gen ifadesine çevrilir ve çıkış yolları (output pathway) tarafından belirli hücresel aktivitelerin günlük ritimde gerçekleşmesi sağlanır. Non-fotosentetik mikroorganizmalarda da sirkadiyen ritme benzeyen ritimler görülmüştür. Bakteriyel sirkadiyen ritmin göz önünde bulundurulmasıyla antibiyotik direnci, disbiyozis gibi sorunlarla mücadele sağlanabilir. Endüstri ve tarım alanlarında ise hem ürünün hem de üretimin kalitesini olumlu anlamda şekillendirebilecek yenilikler gerçekleştirilebilir.

Anahtar kelimeler: Sirkadiyen ritim, siyanobakteri, osilatör

ABSTRACT

Circadian rhythm, which can also be defined as a molecular clock, is the whole of metabolic, biochemical, and hormonal changes. Circadian rhythm can be seen through molecular mechanisms with similarities and differences in prokaryotes, fungi, plants, and insects. These rhythms are also seen in cyanobacteria, which are thought to have an extremely simple lifestyle. Depending on the rhythm, it performs photosynthesis in day and nitrogen fixation at night. The circadian rhythm created by cyanobacteria has started to appear independent of the change in daylight after. This mechanism can be examined in three basic steps; 'oscillator', 'input pathway', and 'output pathway'. The information coming to the oscillators from the input pathways is translated into gene expression, and by the output pathways, certain cellular activities occur in a daily rhythm. Rhythms that resemble the circadian rhythm are also observed in non-photosynthetic microorganisms. By considering the bacterial circadian rhythm, problems such as antibiotic resistance and dysbiosis can be combated in the field of medicine. In the field of industry and agriculture, innovations that can positively shape the quality of both the product and the production, can be realized.

Keywords: Circadian rhythm, cyanobacteria, oscillator

Alındığı tarih / Received:

01.08.2022 / 01.August.2022

Kabul tarihi / Accepted:

29.11.2022 / 29.November.2022

Yayın tarihi / Publication date:

24.03.2023 / 24.March.2023

ORCID Kayıtları

A. Ateş 0000-0001-6891-6662

Ş. Ermertcan 0000-0001-6686-6892

✉ aysegulates117@gmail.com

GİRİŞ

Dünyanın kendi eksenini etrafındaki dönüşünü 24 saatte tamamlaması gece gündüz döngüsünü oluşturmaktadır. Bu döngüye bağlı gerçekleşen sıcaklık ve ışıktaki değişikliklere adapte olabilmek için organizmalar bir iç zamanlama mekanizması geliştirmiştir⁽¹⁾. Bu iç zamanlama mekanizmasına 1959 yılında Franz Halberg tarafından Latince *Circa* (yaklaşık) ve *Dies* (Gün) terimlerinin birleştirilmesiyle sirkadiyen saat adı verilmiştir⁽²⁾. Moleküler bir saat olarak da tanımlayabileceğimiz sirkadiyen ritim veya

biyolojik saat metabolik, biyokimyasal, hormonal değişiklikler bütünüdür. Günümüzde sirkadiyen ritimleri ve onları etkileyen etmenleri inceleyen bilim dalı 'Kronobiyoloji' olarak bilinir⁽³⁾.

Fransız gökbilimci Jean-Jacques d'Ortois de Mairan, 1729 yılında *Mimosa pudica* bitkisinin yapraklarının gün ışığında açıldığını akşamları ise kapandığını gözlemledikten sonra bitkiyi tamamen karanlıkta bıraktığında değişimin nasıl olacağını sorguladı ve yaptığı deneyde karanlığa bağlı olarak yaprakların kapandığını ancak bir süre sonra yaprakların tekrar

açıldığını gördü. Aynı dönemde İsveçli botanikçi Carl Linneaus, belirli bitki türlerinin ne zaman çiçekleneceğine dair çalışmalarıyla gün içerisinde saati anlamak için kullanılabilecek bir "çiçek saati" geliştirdi⁽⁴⁾. 1950'lerin ortalarında Colin S. Pittendrigh ve Jürgen Aschoff tarafından modern sirkadiyen ritimle ilgili çalışmalar yapıldı ve sirkadiyen sisteminin ilkeleri tanımlandı. 1970'lere geldiğimizde Seymour Benzer iki kız çocuğu arasındaki davranışların aynı anne babadan olmalarına rağmen nasıl bu kadar farklı olabileceğini araştırmaya başladı. Genlerin ve genlerdeki değişimlerin davranışlar üzerindeki etkisini incelemek için *Drosophila melanogaster* (Sirke sineği) üzerinde çalışmaya başladı. Genlerde meydana getirdiği modifikasyonlarla optik görüşü, hareketi, cinsel dürtüleri kontrol eden birçok geni tanımladı. Benzer ve öğrencisi Ronald J. Konopka sirke sineklerinde gen modifikasyonlarına bağlı olarak kozadan çıkma sürelerinde değişim gerçekleştiğini ve bu genlerdeki değişime bağlı olarak sirke sineklerinin biyolojik saatinin aksadığını gördüler. Bu gene 'period' adını verdiler ancak genin mekanizmasını ve biyolojik saat üzerindeki etkinliğini net olarak ortaya koyamadılar^(5,6). 1973 yılında Jerry Feldman ve Marian Hoyle *Neurospora crassa*'da aseksüel spor üretim ritminin 'frequency' olarak tanımladıkları gen üzerinden gerçekleştiğini gösterdiler. Filamentöz bir mantar olan *Neurospora crassa*'da spor gelişimi, konidyum üretimi ve misel oluşumundan sorumlu sirkadiyen ritim mekanizması aydınlatılmıştır⁽⁷⁾. Bitkiler yaprak hareketi, büyüme, germinasyon, stoma hareketi, enzim aktivitesi, çiçek açma, fotosentez gibi metabolik ve gelişimsel aktivitelerini sirkadiyen ritme bağlı olarak gerçekleştirirler. Özellikle *Arabidopsis thaliana* üzerinde yapılan genomik çalışmalar ile bu bitkinin sirkadiyen ritminden sorumlu genlerin ve kodladıkları proteinlerin süreç üzerindeki etkisi aydınlatılmıştır^(8,9). Patojenik bir küf mantarı *Aspergillus flavus* da yine spor oluşumunda, misel oluşumunda, sklerotia gelişiminde sirkadiyen ritimden destek alır^(7,10). 2017 yılında üç bilim insanı Jeffrey C. Hall, Micheal Rosbash ve Michael W. Young biyolojik saat ile ilgili yaptıkları çalışmalar sonucunda Nobel tıp ödülünün sahibi oldular ve biyolojik saatin moleküler mekanizması net olarak aydınlatılmış oldu. Benzer'in *period* adını verdiği gen tarafından kodlanan PER proteininin gece boyunca hücrede biriktiği, gündüzleri ise çözüldüğü ve buna bağlı olarak 24 saatlik bir döngüde sirkadiyen ritmin oluştuğu

ayrıca PER proteininin belirli bir seviyeye ulaştığında *period* geni üzerinde transkripsiyonu baskılayıcı işlev gördüğü bildirildi⁽¹¹⁾. Bunun gerçekleştirilmesinde 1994 yılında Michael W. Young'un 'timeless' adını verdiği genin ürünü olan TIM proteininin rol aldığı doğrulandı⁽¹²⁾.

Bitkiler, memeliler, böcekler ve mantarlar gibi ökaryotik canlılarda sirkadiyen ritim; benzerliklerin ve farklılıkların olduğu kompleks moleküler mekanizmalarla görülmektedir⁽¹³⁾. Prokaryotik hücrelerde ise ritmik aktivite için nükleer yapının, hücreler arası iletişimin yeterli olmadığı öne sürülerek uzun bir süre sirkadiyen ritmin ökaryotlarla sınırlı olduğu düşünülmüştür⁽¹⁴⁾. Ancak yapılan çalışmalar *Synechococcus* sp. WH 7803'de sıcaklıkla ilişkili olarak hücre bölünmesine ait 24 saatlik ritimler ve *Cyanothece* sp. PCC 8801'deki sirkadiyen azot fiksasyonu düşünülenin aksini kanıtladı^(15,16). Yapılan çalışmalar son derece basit bir yaşam tarzına sahip oldukları düşünülen ancak aslında çok daha fazlası olan siyanobakterilerde de sirkadiyen ritmin kompleks mekanizmalarla ortaya çıktığını göstermektedir.

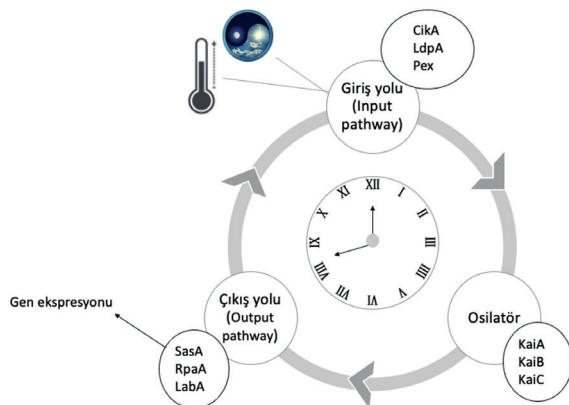
Siyanobakteriler ve sirkadiyen ritim

Eskiden mavi-yeşil algler olarak adlandırılan siyanobakteriler kloroplast içermeleriyle ökaryotik organizmalara benzeseler de prokaryotik özellikler taşımaktadırlar. Siyanobakteriler enerjilerini fotosentez yoluyla elde eder ve denizdeki karbon ile azot çevriminde önemli rol oynarlar. Siyanobakterilerin dünyadaki ilk yaşam formlarından biri oldukları ve en az 3.5 milyar yıl önce ortaya çıktıkları düşünülmektedir^(17,18). Bazı siyanobakteri türleri fotosentez ve azot fiksasyonu yapma yeteneğine sahiptir. Fotosentez sonucu oluşan oksijen, azot fiksasyonunda rol oynayan enzimler üzerinde inhibisyona yol açmaktadır. Siyanobakteriler bu iki metabolik olayı farklı zaman periyotlarında gerçekleştirmek için bir sirkadiyen ritim mekanizması geliştirmiştir. Bu mekanizmaya bağlı olarak fotosentezi gün ışığında, azot fiksasyonunu ise karanlıkta gerçekleştirirler. Yapılan çalışmalar sonucunda siyanobakterilerin oluşturdukları bu ritim bir süre sonra gün ışığındaki değişimden bağımsız olarak da

görölmeye başlamıştır. Prokaryotik hücrelerde böyle bir ritmin olmasına dair kanıtlar bilim insanlarını bu alana yöneltti ve *Synechococcus elongatus* PCC 7942 sirkadiyen ritmin moleküler mekanizmalarında tercih edilen bir model oldu^(13,19). Siyanobakteriyel genlerin büyük çoğunluğu sirkadiyen ritme bağlı olarak ifade edilir. Bu genler Sınıf I ve Sınıf II genler olarak kategorize edilirler ve gün boyunca eksprese edilerek birikirler. Sınıf I genler karanlıkta, Sınıf II genler ise gün aydınlanmaya başlayınca en yüksek miktarlara ulaşmış olur⁽²⁰⁾.

Siyanobakterilerde sirkadiyen ritim mekanizması

Siyanobakterilerdeki sirkadiyen saatin moleküler yapısı ve mekanizması oldukça karmaşık bir organizasyon içindedir. Bu mekanizma üç temel adımda incelenebilir (Şekil 1); Osilatör, giriş yolu (input pathway) ve çıkış yolu (output pathway)⁽²¹⁾. Sirkadiyen mekanizmanın merkezinde 24 saatlik ritmin sürdürülmesi, yayılması ve dağıtımından sorumlu olan osilatörler bulunur. Osilatörler çevresel değişimler tarafından direkt olarak kontrol edilmez. Bu kontrol giriş yolları (Input pathway) tarafından gerçekleştirilir. Giriş yollarından osilatörlere gelen bilgiler gen ifadesine, ekspresyonuna çevrilir ve çıkış yolları (output pathway) tarafından belirli hücresel aktivitelerin günlük ritimde gerçekleşmesi sağlanır. Sıcaklık, ışık, pH gibi farklı etmenlere bağlı olarak gelişen çevresel değişiklikler hücre zarının redoks potansiyelinde değişime neden olur. Bu değişim, redoksa duyarlı Cika (circadian input kinase A) ve LdpA (light-dependent period A) gibi giriş yolu proteinleri



Şekil 1. *Synechococcus elongatus* PCC 7942'nin sirkadiyen ritim mekanizması

tarafından algılanır ve osilatörlere iletilir. Osilatörde fosforilasyon temelinde gerçekleşen işlemler sonucu oluşan hücre bölünmesi ve gen ekspresyonu gibi moleküler çıktılar, biyolojik saatin devam etmesini sağlamak için SasA (*Synechococcus* adaptive sensor A) ve RpaA (Regulator of phycobilisome association A) proteinlerinden oluşan çıkış yoluna aktarılır⁽²²⁻²⁴⁾. Sirkadiyen mekanizmanın bu üç temel ayağı moleküler temeller üzerine kurulmuştur ve sirkadiyen ritmin gerçekleşmesinde oldukça önemlidirler.

Osilatörler

Ökaryotik hücrelerde sirkadiyen ritim 24 saatlik zaman diliminde moleküler düzeyde iç içe geçmiş iki adet "transkripsiyonel translasyonel geri bildirim döngüsü" (transcriptional translational feedback loop (TTFL)) ile kontrol edilen osilatörler tarafından sürdürülür^(25,26). Siyanobakterilerde ise fosforilasyon temeline dayanan post-translasyonel osilatörler (PTO) tarafından gerçekleşen bir ritim vardır⁽²⁷⁾.

1998 yılında dört bilim insanı Susan Golden, Carl Johnson, Masahiro Ishiura ve Takao Kondo lusiferaz aktivitesini kullanarak *S. elongatus*'un sirkadiyen ritmini düzenleyen osilatör proteinlerine Japonca 'Cycle' (döngü) anlamına gelen 'Kai' adını verdiler. Kai proteinleri birbirleriyle etkileşim içinde olan KaiA, KaiB ve KaiC adlı oligomerik proteinlerden oluşmaktadır⁽²¹⁾. Kai proteinleri temel olarak siyanobakterilerde fotosentez, hücre bölünmesi, çevresel değişikliklere adaptasyon gibi belirli bir döngü içindeki olayların kontrolünü sağlamaktadır⁽²⁸⁾. Farklı yapısal özellikler gösteren bu proteinler siyanobakteriyel ritmin temelini oluşturmaktadırlar (Şekil 2).

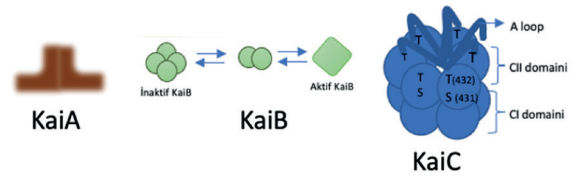
KaiC, halka şeklinde iki loblu homoheksamerik yapıda bir proteindir. Bu protein yapısı dört temel domain içerir: bir CI domaini, bir CII domaini, B-loop'u ve CII domaininin C terminalinden çıkan KaiA'nın bağlanması sağlayan 22 aminoasitlik uzantı şeklindeki A-loop'u⁽²⁹⁾. CI ve CII alt domainleri benzer yapısal özellikler gösterse de ATP bağlama bölgelerindeki farklılık fonksiyonel olarak önemlidir^(29,30). KaiC proteini KaiA ve KaiB'nin bağlanması ile aktif hale gelen ATPaz, otokinaz

ve otofosfat aktivitesine sahiptir. Özellikle CII halkasının 431. pozisyonundaki serin(S) (Ser431) ve 432. pozisyonundaki treonin (T) (Thr432) rezidülerinin fosforilasyon ve de-fosforilasyon durumu Kai osilatörüne bağlı olarak sirkadiyen ritmi yönlendirir⁽³¹⁾.

KaiC osilatörünün fosforilasyonu endojen ritimler üretme kabiliyetine sahip olmasına rağmen, gen ekspresyonunu doğrudan etkilemez; Kai proteinlerinin hiçbiri DNA-bağlama alanlarına sahip değildir⁽³²⁾. Bunun yerine, bir histidin kinazı olan SasA ve bir transkripsiyon faktörü olan RpaA'dan oluşan iki bileşenli bir sistem, KaiC fosforilasyonundaki değişiklikleri transkripsiyonel olaylara bağlar^(30,33).

KaiA, amino ve karboksit terminalleri bulunan, sahte alıcı bölgeye (pseudo-receiver) sahip ve KaiC'nin otokinaz aktivitesini indükleyen homodimerik yapıda bir proteindir. KaiA'nın aksine, KaiB ve KaiC proteinlerinin sirkadiyen döngü boyunca salındığı ve hücre içi konsantrasyonlarının KaiA ya göre 25 kat fazla olduğu bilinmektedir. KaiA aynı zamanda KaiC otofosforilasyonunun uyarılmasını kontrol eden giriş yolunda da görevlidir^(22,34).

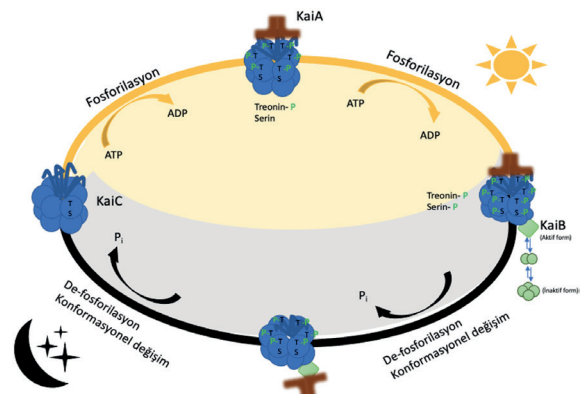
KaiB, SasA-RpaA yolunun (output pathway) ana düzenleyicisi olarak görev yapar ve sirkadiyen ritim oluşumuna katkıda bulunan ve SasA:KaiC ile etkileşimi kolaylaştıran yapısal modifikasyonlar gösterir. Siyanobakterilerde ifade edilen KaiB çoğunlukla KaiC ile etkileşime giremeyen, aktif olmayan bir homo-tetramerik yapıdadır. KaiB, KaiC ile etkileşime girebilmek için tetramerik formdan monomerik forma geçerek yapısal olarak konformasyonel değişikliğe uğramak zorundadır. Temel durumdaki inaktif formdan, KaiC'ye bağlanabilen katlanmış aktif forma dönüşür. KaiB bugüne kadar bilinen tek metamorfik saat proteindir^(35,36). Aktif konfigürasyondaki KaiB, SasA'nın N terminaline çok benzeyen bir katlanmaya sahiptir. Ayrıca kinazın KaiC'ye olan bağına kompetatif olarak değiştirir. Bununla birlikte, KaiB'deki inaktif formdan aktif forma olan konformasyon değişikliği, SasA'nın KaiC'ye bağlanmasına ve RpaA'nın görece olarak öğleden sonra aktivasyonunun azalmasına neden olur⁽³⁷⁾.



Şekil 2. Kai proteinlerinin yapısı

Sirkadiyen osilatörlerin mekanizması

Sirkadiyen ritmin Kai osilatörleri üzerinden mekanizması Şekil 3'te görüldüğü gibi özetlenebilir. Görece olarak günün ilk saatlerinde, KaiC'nin Ser431 ve Thr432 rezidüleri de-fosforile durumda ve A-loop'u yapısal olarak ortaya çıkarılmıştır. CII ve CI domainleri birbirine gevşek olarak bağlanmıştır. Günün ilerleyen saatlerinde KaiA, otokinaz aktivitesini modüle etmek için KaiC'nin A-loop'una bağlanır. Bu bağlanmayla birlikte önce Thr432 ardından Ser431 fosforile edilir. Görece olarak hava karamaya başladığında Ser431 rezidüsünün fosforilasyonu birlikte KaiC heksamerinde önemli konformasyonel değişiklikler meydana getirir. Protein kompleksinin CI ve CII domainleri arasındaki etkileşim artar ve CII domaini CI'ın üzerine çöker. Bu çökme ile birlikte A loop'u CII domainin içine girerken KaiA'nın bağlanma bölgesiyle etkileşimi azalmaya başlar. CI domaininde de genişleme meydana gelir ve B-loop'u ortaya çıkar. Bu sırada tetramerik yapıdaki inaktif KaiB aktif monomerik forma geçerek B-loop'una bağlanır. KaiB'nin bağlanmasıyla birlikte, KaiA değişiklik geçirerek A-loop'undan uzaklaşır ve KaiB ye bağlanır. KaiA:B kompleksi KaiC'nin otofosfataz aktivitesini artırır ve otokinaz aktivitesini inhibe eder. KaiC'nin de-fosforilasyonu gece meydana gelir



Şekil 3. Siyanobakterilerdeki sirkadiyen osilatörlerin mekanizması

ve fosforilasyonun tersi sırayla önce Thr432 ardından Ser431 defosforile edilir, döngü başa dönerek devam eder. Sonuçta, KaiA ve KaiB bağlanması tarafından regüle edilen KaiC fosforilasyonundaki bu ritim, değişen çevresel koşullara bağlı olarak hem giriş yollarıyla hem de transkripsiyon olaylarına aracılık etmek için çıkış yollarıyla etkileşim içindedir^(35,36).

Giriş yolu (Input pathway)

Gündüz-gece döngüsündeki değişiklikleri ökaryotlar doğrudan fotoreseptörler yoluyla algılayarak siyanobakteriler ise çevresel fonksiyonlara bağlı olarak hücrenin değişen redoks durumunu algılayarak değişiklikleri izler. CikA ve LdpA dahil olmak üzere birkaç redoks duyarlı protein tanımlanmıştır. Ek olarak, osilatör bileşenlerinden KaiA ve KaiC'nin sirkadiyen saati dış ortamla senkronize etmek için doğrudan fotosentez metabolitlerini (kinon, ATP) tespit ettiği de bilinmektedir^(23,24,38).

CikA bir histidin kinazdır ve tanımlanan ilk giriş yolu bileşenidir. CikA da meydana gelen mutasyon sirkadiyen periyotta kısalmaya, düşük genlikli salınlara, karanlıkta gen ifadesinin sıfırlanmamasına neden olur⁽³⁹⁾. Çevresel algılama siyanobakterilerde fotosentetik aktivitenin bir fonksiyonu olarak oluşan metabolitlerin varlığına ve redoks durumuna bağlı olarak CikA ve hatta KaiA ile sağlanır. Hem CikA hem de KaiA membranlardaki kinonlarla etkileşimi sağlayacak şekilde periferik membran üzerinde konumlanmış proteinlerdir⁽⁴⁰⁾.

Kinon havuzu, karanlıkla birlikte hızla okside olur. CikA ve KaiA, kendi sahte alıcılara (Pseudo receiver) (PsR) aracılığıyla kinonun okside formuna (Qq) bağlanabilir ancak redükte formuna (Rq) bağlanamaz^(40,41). CikA miktarı ışık yoğunluğuyla ters orantılıdır ve karanlıkta en yüksek seviyeleri sergiler⁽⁴²⁾. CikA/KaiA ve kinonlar arasındaki etkileşimlere ek olarak hücrenel redokstaki değişiklikler demir sülfür bağlayıcı redoks aktif proteini olan LdpA aracılığıyla da osilatöre aktarılır. LdpA, elektron taşınımındaki değişikliklerin algılanmasının bir sonucu olarak sirkadiyen ritimin düzenlenmesinden sorumludur ve konsantrasyonu ışık yoğunluğuna bağlıdır. LdpA'daki mutasyonlara bağlı olarak periyot kısalması meydana gelir. Çevresel

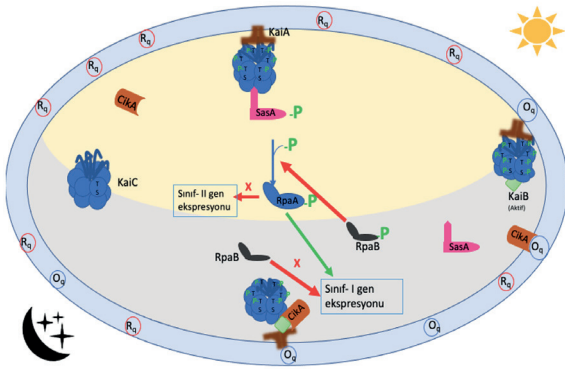
sinyalleri osilatöre iletmede CikA ile LdpA arasında etkileşim söz konusudur^(42,43).

CikA bir fosforil grubunu in vitro olarak RpaA'ya aktarabilmekte iken, in vivo olarak CikA'nın ana rolünün, SasA tarafından eklenen fosforil gruplarının RpaA'dan çıkarılmasını sağlayan bir fosfataz olduğu görülmektedir. RpaA'nın Sas A gibi negatif regülasyon yoluyla sirkadiyen ritmin çıkış yolunda da rol aldığı gösterilmiştir⁽⁴³⁾.

Çıkış yolu (Output pathway)

Belirli hücrenel aktivitelerin doğru ritim ve periyotta gerçekleşmesini sağlayan birtakım proteinler tanımlanmıştır. Bir histidin protein kinaz olan SasA'nın KaiC'den gerekli bilgileri almasıyla birlikte aralarında gerçekleşen bu protein-protein etkileşimi SasA'nın otofosforilasyonunu ve ardından fosforil grubunun yanıt düzenleyici protein RpaA'ya transferini uyarır^(44,45). RpaA, gen ekspresyonunun transkripsiyonel bir regülatörü olarak görev yapabilir. Fosforile edildiğinde (RpaA-P) transkripsiyon faktörü olarak DNA'ya bağlanabilir. RpaA-P uygun transkripsiyon bölgesine bağlanarak *kaiBC* promotöründen (*PkaiBC*) sirkadiyen ritme bağlı olarak gen ekspresyonunu regüle eder⁽⁴⁶⁾. Ek olarak, LabA proteini osilatörden gelen bilgilere dayanarak KaiC ve RpaA aktivitesinin bir baskılayıcısı olarak görev yapmaktadır⁽⁴⁵⁾. *pex* (period extender gene) geninin transkripsiyonu ile oluşan Pex proteini, kaiA ekspresyonunun doğrudan veya dolaylı bir baskılayıcısı olarak görünmektedir. Pex'in aşırı üretimi sirkadiyen dönemi uzatır, çünkü Pex oluşumuna bağlı olarak üretimi baskılanan KaiA, KaiC fosforilasyonunu uyaramaz ve sirkadiyen döngü normal bir şekilde ilerleyemez. Pex'in baskılanması KaiA protein üretimini artırır ve KaiC otofosforilasyonunu aşırı stimüle ederek sirkadiyen sürelerin kısalmasına neden olur⁽²²⁾.

Siyanobakterilerde sirkadiyen mekanizma Şekil 4'te özetlenmiştir. Sirkadiyen ritmin genel mekanizması KaiC osilatörünün fosforilasyon ve de-fosforilasyon durumuna göre ilerlemektedir. KaiA ve KaiC gün boyunca sitozolde bulunurlar. KaiA günün aydınlık evresinde KaiC ile etkileşime girerek KaiC'nin



Şekil 4. Siyanobakterilerde sirkadiyen mekanizma (Rq: Redükte kinonlar; Qq: Okside kinonlar)

fosforilasyonunu sağlar. CikA, hücrelerin kutuplarına doğru konumlanmıştır. Membrandaki kinon birikimine bağlı olarak redoks potansiyelindeki değişimi algılar. SasA, KaiC ile etkileşime girerek kendi otofosforilasyonunu, ardından RpaA'ya fosfor transferini sağlar. RpaA-P gün boyunca birikir, gece-gündüz geçişinde zirve yapar. RpaA-P, sınıf II genlerinin ekspresyonunu baskılar ve sınıf I genlerini aktive eder. Çevresel olarak kontrol edilen RpaB, RpaA'nın fosforilasyonunu inhibe edebilir. Gece boyunca, kinon havuzu geçici olarak oksitlenir. CikA ve KaiA oksitlenmiş kinonlarla etkileşime girer. KaiB, KaiC'ye bağlanmak için SasA ile yarışır ve KaiC'nin gece boyunca de-fosforilasyonunu sağlar. CikA KaiB'ye bağlanmak için KaiA ile rekabet eder. KaiBC kompleksi, CikA'nın RpaA'ya karşı fosfataz aktivitesini artırır. Defosforile hale gelen KaiC ile birlikte KaiB, KaiA ve CikA yeni bir döngüye başlar^(33,37,40).

Farklı bakterilerdeki sirkadiyen ritimler

Synechococcus elongatus'un sirkadiyen ritim mekanizması oldukça detaylı çalışılmış ve moleküler organizasyonu aydınlatılmıştır. Bu ritimdeki en önemli unsurlardan biri olan Kai osilatör proteinlerinin değişik varyasyonları farklı siyanobakterilerde de bulunabilmektedir. Fotosentetik bir deniz siyanobakterisi olan *Prochlorococcus* sp. *kaiB* ve *kaiC* genlerini taşır, ancak *kaiA* geni içermez *Prochlorococcus marinus*'un bu osilatörlere bağlı gösterdiği salınım çok uzun süreli olmamaktadır. Bu mekanizmanın sürmesi için belirli periyotlarla çevresel girdinin girilmesi gerekir. Gen ekspresyonuna

bağlı olarak kısa salınımlar ortaya çıkar ki bu durum denizlerdeki heterotrof bakteri popülasyonlarıyla metabolik etkileşiminde önemlidir. Bu durum siyanobakteriyel sirkadiyen saatin denizlerdeki ve doğadaki genel mekanizmaları da etkilediğini göstermektedir^(17,47). *Prochlorococcus* sp. dahil bazı siyanobakteriyel türler bu moleküler mekanizmadaki *kaiA*'yı kaybetmiş olsa da, *Synechocystis* sp. PCC 6803 *kaiB* ve *kaiC* paraloglarını kodlar. Standart *kaiAB1C1* kümesine ek olarak *kaiC2*, *kaiB2*, *kaiB3* ve *kaiC3* genleri dört genomik lokusta bulunur. Bu çoklu genler tarafından kodlanan Kai proteinlerinin nasıl etkileşime girebileceği ve bunların sirkadiyen mekanizmada işlev görüp görmediği henüz net olarak aydınlatılmamıştır. Bununla birlikte, *Synechocystis* sp.'in sirkadiyen mekanizmasında temel olarak *kaiAB1C1* lokusunun rol aldığı öne sürülmüştür⁽⁴⁸⁾.

Siyanobakteriler sirkadiyen ritme sahip olduğu bilinen ve incelenen prokaryotik model olmasına rağmen, siyanobakteriler dışındaki non-fotosentetik mikroorganizmalarda da sirkadiyen ritme benzeyen ritimler görülmüş ve bazı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Schimmer ve ark.⁽⁴⁹⁾ non-sirkadiyen olduğu düşünülen *Pseudomonas* sp. de KaiC homologlarını buldular. Paulose ve arkadaşları⁽⁵⁰⁾ bir hastanın bağırsak mikrobiyotasından izole edilen klinik *Klebsiella aerogenes* izolatında sıcaklıkla ilişkili 24 saatlik ritimler gösterebilen gen ekspresyonlarının olduğunu ortaya koymuştur. Bu ritmin melatonin varlığında oluşması bakterinin konaktan bağımsız serbest ritimler oluşturup oluşturamayacağını düşündürmüştür. Elderink-Chen ve ark.⁽⁵¹⁾ ise biyofilm oluşturan *Bacillus subtilis* kökenlerinde 24 saatlik periyotta sirkadiyen bir ritim oluştuğunu ortaya koymuşlardır. Diallo ve ark.⁽⁵²⁾ ise *Escherichia coli*'de KaiC homologu *radA* genini analizlerle ortaya koydular. *radA* geni dışında başka genlerin de sirkadiyen ritimle ilişkili olduğunu gösteren araştırmacılar *radA* ve *recA* genlerinin döngüsel bir sirkadiyen ekspresyona sahip olduğu, *ssrA* ve *cysG* genlerinin ise sirkadiyen gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol aldığını gösterdiler. RadA proteininin KaiC gibi sabah saatlerinde zirve yaptığı, 3 gün boyunca besiyeri ortamında kültür yapıldığında *radA* geninin sirkadiyen şekilde ekspresyonunun devam ettiği ortaya koyuldu.

SONUÇ

Birçok organizmada karşımıza çıkan sirkadiyen ritim, moleküler mekanizmalar yardımıyla çevresel değişikliklere adaptasyonda oldukça önemlidir. *S. elongatus* PCC 7942 prokaryotik sirkadiyen saatinin öneminin anlaşılmasını sağlayan, genetik manipülasyonların yapılabildiği ve gen ekspresyonlarının incelendiği model organizmadır.

Chen ve ark.⁽⁵³⁾ 2015 yılında *S. elongatus*'un sirkadiyen saatini göz önünde bulundurarak oluşturdukları sentetikbiyolojiksaat gelecekle ilgili farklı senaryoların oluşturulmasına olanak tanımıştır. Bu sentetik saati *E. coli*'ye transfer ettiklerinde bakteride 72 saat süreyle oluşan sirkadiyen ritmi, KaiC proteininin fosforilasyonunu inceleyerek göstermişlerdir. Bu çalışmada oluşturulan transplante edilebilir sentetik biyolojik saat ile özellikle kemoterapi alan hastalarda ilaç salınımının belirli periyotlarla ve uygun dozlarda olması, endüstride mikrobiyal proseslerde sirkadiyen kontrol ile yüksek verimde ürünler elde edilebilmesi ve sirkadiyen ritim bozukluklarının tedavi edilebilmesi amaçlanmıştır ve bu amaç doğrultusunda çalışmalar devam etmektedir. Patojenik bakterilerdeki sirkadiyen ritimlerin konak yanıtı ve antibiyotik direnciyle ilişkili çeşitli konularda da etkisi merak edilmektedir. Yakın zamanda Kovac ve ark.⁽⁵⁴⁾ *E. coli*'nin genomik yapısının memeli sirkadiyen saat genleri üzerinde bir etkiye sahip olduğunu gösterdi. Bu etki düşünüldüğünde gelecekte *E. coli* probiyotik suş olarak konakçı sirkadiyen ritmini etkilemek için kullanılabilir ve aslında patojenik bakteriler kendi sirkadiyen ritimleriyle konak organizmanın sirkadiyen ritmini etkileyebilirler. Kısacası ritmik bir mikrobiyom konağın sirkadiyen ritmini etkileyebileceği hatta bu iki ritmin asenkron olmasının disbiyozis ile sonuçlanabileceği düşünülmektedir.

Bakteriler tıp, tarım ve endüstriyel prosesler gibi pek çok alanda önemli rollere sahiptir⁽⁵⁵⁾. Tüm bu alanlarda bakteriyel sirkadiyen ritmin göz önünde bulundurulması onlarla nasıl etkileşime gireceğimizi kavramamızda bizlere yol gösterici olabilir. Global bir sağlık sorunu olan antibiyotik direncini bakteriyel sirkadiyen ritim perspektifinden ele aldığımızda, antibiyotik direnciyle mücadeleye

yeni bir bakış açısı kazandırılabilir. Bakterinin gün içinde metabolizmasının ve replikasyonunun yavaş seyrettiği zaman diliminde ilgili antibiyotiğe maruziyeti güçlü bir tedavi yaklaşımı olabilir ve direnç gelişimini geciktirebilir. Endüstriyel proseslerden özellikle fermentasyonda mikroorganizmaların ritmik saati göz önünde bulundurularak farklı metabolitlerin birikiminin önüne geçilebilir, hem ürünün hem de üretimin kalitesi iyi yönde şekillendirilebilir. Tarım alanında ise bitkinin biyolojik saati ile senkronize mikroorganizmalar bitkideki pek çok metabolik yolağın, hormonal sürecin, kök gelişiminin ve bitki hastalıklarıyla mücadelenin daha iyi anlaşılmasını sağlayabilir. Gelecek bu karmaşık sistemin mekanizmaları hakkında daha fazla bilgi edinmeyi vaat ediyor.

Çıkar Çatışması: Herhangi bir kişi ve/veya kurum ile ilgili çıkar çatışması yoktur.

Finansman: Bu makalede herhangi bir nakdi/aynı yardım alınmamıştır.

Conflict of Interest: The authors declare that there is no conflict of regarding any person and/or institution.

Funding: The authors declare the study received no funding.

KAYNAKLAR

1. Kartlaşmış K, Kökbaş U, Sanna B, Alparslan MM, Kayrın L. Sirkadiyen saatin epigenetikle ilişkisi. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. 2017;26(1):50-62. <https://doi.org/10.17827/aktd.280521>
2. Deutch M. Circadian: "Circa dies". N Engl J Med. 1969;280(12):673.
3. Wolverson M. Living by the clock: The science of chronobiology. Penn Medicine. 2013;(June):17-9. [https://medicalxpress.com/news/2013-06-clock-science-chronobiology.html] (Erişim Tarihi: 19.05.2022).
4. Pfaff DW. Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical. Silver R, Rainbow M, editors. New York: Springer; 2013. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1997-6>
5. Jan YN, Jan L. Retrospective: Seymour Benzer (1921-2007). Science. 2008;319(5859):45. <https://doi.org/10.1126/science.1154050>

6. Harris WA, Seymour Benzer 1921–2007 The man who took us from genes to behaviour. *PLoS Biol.* 2008;6(2):e41. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060041>
7. Feldman JF, Hoyle MN. A direct comparison between circadian and noncircadian rhythms in *Neurospora crassa*. *Plant Physiol.* 2008;53(6):928-30. <https://doi.org/10.1104/pp.53.6.928>
8. Más P. Circadian clock signaling in *Arabidopsis thaliana*: From gene expression to physiology and development. *Int J Dev Biol.* 2005;49(5-6):491-500. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041968pm>
9. Millar AJ, Kay SA. Circadian control of *cab* gene transcription and mRNA accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2007;3(5):541. <https://doi.org/10.2307/3869359>
10. Greene AV, Keller N, Haas H, Bell-Pedersen D. A circadian oscillator in *Aspergillus* spp. regulates daily development and gene expression. *Eukaryot Cell.* 2003;2(2):231-7. <https://doi.org/10.1128/ec.2.2.231-237.2003>
11. Nobel Prize Outreach AB 2022. NobelPrize.org, 2017. [<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2017/advanced-information/>] (Erişim Tarihi: 21.07.2022).
12. Vossshall LB, Price JL, Sehgal A, Saez L, Young MW. Block in nuclear localization of period protein timeless by a second clock mutation, timeless. *Science.* 1994;263(5153):1606-9. <https://doi.org/10.1126/science.8128247>
13. Bhadra U, Thakkar N, Das P, Pal Bhadra M. Evolution of circadian rhythms: from bacteria to human. *Sleep Med.* 2017;35:49-61. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2017.04.008>
14. Kippert F. Endocytobiotic coordination, intracellular calcium signaling, and the origin of endogenous rhythms. *Ann N Y Acad of Sci.* 1987;503:476-95. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1987.tb40631.x>
15. Sweeney B, Borgese M. A circadian rhythm in cell division in a prokaryote, the cyanobacterium *Synechococcus* WH7803. *J Phycol.* 1989;25(1):183-6. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1989.00183.x>
16. Huang TC, Chow TJ. Characterization of the rhythmic nitrogen-fixing activity of *Synechococcus* sp. RF-1 at the transcription level. *Curr Microbiol.* 1990;20:23-6. <https://doi.org/10.1007/BF02094019>
17. Dvornyk V, Vinogradova O, Nevo E. Origin and evolution of circadian clock genes in prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(5):2495-500. <https://doi.org/10.1073/pnas.0130099100>
18. Grobbelaar N, Huang TC, Lin HY, Chow TJ. Dinitrogen-fixing endogenous rhythm in *Synechococcus* RF-1. *FEMS Microbiol Lett.* 1986;37(2):173-7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01788.x>
19. Iwasaki H, Williams SB, Kitayama Y, Ishiura M, Golden SS, Kondo T. A KaiC-interacting sensory histidine kinase, SasA, necessary to sustain robust circadian oscillation in *Cyanobacteria*. *Cell.* 2000;101(2):223-33. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80832-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80832-6)
20. Hoyle NP, O'Neill JS. Circadian rhythms: Hijacking the cyanobacterial clock. *Curr Biol.* 2013;23(23):R1050-2. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.09.046>
21. Ishiura M, Kutsuna S, Aoki S, et al. Expression of a gene cluster *kaiABC* as a circadian feedback process in *Cyanobacteria*. *Science.* 1998;281(5382):1519-23. <https://doi.org/10.1126/science.281.5382.1519>
22. Williams SB. A circadian timing mechanism in the *Cyanobacteria*. *Adv Microb Physiol.* 2006;52(06):229-96. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(06\)52004-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(06)52004-1)
23. Rust MJ, Golden S, O'Shea EK. Light-driven changes in energy metabolism directly entrain the cyanobacterial circadian oscillator. *Science.* 2011;331(6014):220-3. <https://doi.org/10.1126/science.1197243>
24. Ivleva NB, Gao T, LiWang AC, Golden SS. Quinone sensing by the circadian input kinase of the cyanobacterial circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(46):17468-73. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606639103>
25. Sözlü S, Şanlıer N. Sirkadiyen ritim, sağlık ve beslenme ilişkisi. *Türkiye Klinikleri J Health Sci.* 2016;2(2):100-9. <https://doi.org/10.5336/healthsci.2015-48902>
26. Nakajima M, Nakajima M, Imai K, et al. Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. *Science.* 2005;308(5720):414-5. <https://doi.org/10.1126/science.1108451>
27. Jolley CC, Ode KL, Ueda HR. A design principle for a posttranslational biochemical oscillator. *Cell Rep.* 2012;2(4):938-50. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.09.006>
28. Brettschneider C, Rose RJ, Hertel S, Axmann IM, Heck AJR, Kollmann M. A sequestration feedback determines dynamics and temperature entrainment of the KaiABC circadian clock. *Mol Syst Biol.* 2010;6:389. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.44>
29. Pattanayek R, Williams DR, Pattanayek S, et al. Analysis of KaiA-KaiC protein interactions in the cyano-bacterial circadian clock using hybrid structural methods. *EMBO J.* 2006;25(9):2017-28. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601086>
30. Nishiwaki T, Iwasaki H, Ishiura M, Kondo T. Nucleotide binding and autophosphorylation of the clock protein KaiC as a circadian timing process of cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;97(1):495-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.1.495>
31. Johnson CH, Stewart PL, Egli M. The cyanobacterial circadian system: From biophysics to bioevolution. *Annu Rev Biophys.* 2011;40:143-67. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155317>
32. Mori T, Saveliev SV, Xu Y, et al. Circadian clock protein KaiC forms ATP-dependent hexameric rings and binds DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(26):17203-08. <https://doi.org/10.1073/pnas.262578499>

33. Tseng R, Goularte NF, Chavan A, et al. Structural basis of the day-night transition in a bacterial circadian clock. *Science*. 2017;355(6330):1174-80. <https://doi.org/10.1126/science.aag2516>
34. Johnson CH. Bacterial circadian programs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2007;72:395-404. <https://doi.org/10.1101/sqb.2007.72.027>
35. Kageyama H, Kondo T, Iwasaki H. Circadian formation of clock protein complexes by KaiA, KaiB, KaiC, and SasA in *Cyanobacteria*. *J Biol Chem*. 2003;278(4):2388-95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208899200>
36. Chang YG, Cohen SE, Phong C, et al. A protein fold switch joins the circadian oscillator to clock output in *Cyanobacteria*. *Science*. 2015;349(6245):324-8. <https://doi.org/10.1126/science.1260031>
37. Cohen SE, Golden SS. Circadian rhythms in *Cyanobacteria*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2015;79(4):373-85. <https://doi.org/10.1128/mmr.00036-15>
38. Wood TL, Bridwell-Rabb J, Kim YI, et al. The KaiA protein of the cyanobacterial circadian oscillator is modulated by a redox-active cofactor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(13):5804-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910141107>
39. Katayama M, Kondo T, Xiong J, Golden SS. *IcpA* encodes an iron-sulfur protein involved in light-dependent modulation of the circadian period in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J Bacteriol*. 2003;185(4):1415-22. <https://doi.org/10.1128/JB.185.4.1415-1422.2003>
40. Williams SB, Vakonakis I, Golden SS, LiWang AC. Structure and function from the circadian clock protein KaiA of *Synechococcus elongatus*: a potential clock input mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15357-62. <https://doi.org/10.1073/pnas.232517099>
41. Zhang X, Dong G, Golden SS. The pseudo-receiver domain of *CikA* regulates the cyanobacterial circadian input pathway. *Mol Microbiol*. 2006;60(3):658-68. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05138.x>
42. Ivleva NB, Bramlett MR, Lindahl PA, Golden SS. LdpA: A component of the circadian clock senses redox state of the cell. *EMBO J*. 2005;24(6):1202-10. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600606>
43. Gutu A, O'Shea EK. Two antagonistic clock-regulated histidine kinases time the activation of circadian gene expression. *Mol Cell*. 2013;50(2):288-94. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.02.022>
44. Iwasaki H, Kondo T. The current state and problems of circadian clock studies in cyanobacteria. *Plant Cell Physiol*. 2000;41(9):1013-20. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcd024>
45. Takai N, Nakajima M, Oyama T, et al. A KaiC-associating SasA-RpaA two-component regulatory system as a major circadian timing mediator in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(32):12109-14. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602955103>
46. Smith RM, Williams SB. Circadian rhythms in gene transcription imparted by chromosome compaction in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(22):8564-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508696103>
47. Harding LW, Prézélin BB, Sweeney BM, Cox JL. Diel oscillations of the photosynthesis-irradiance (P-I) relationship in natural assemblages of phytoplankton. *Marine Biol*. 1982;67(2):167-78. <https://doi.org/10.1007/BF00401282>
48. Holtzendorff J, Partensky F, Mella D, Lennon JF, Hess WR, Garczarek L. Genome streamlining results in loss of robustness of the circadian clock in the marine cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* PCC 9511. *J Biol Rhythms*. 2008;23(3):187-99. <https://doi.org/10.1177/0748730408316040>
49. Schmelling NM, Lehmann R, Chaudhury P, et al. Minimal tool set for a prokaryotic circadian clock. *BMC Evol Biol*. 2017;17(1):169. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-0999-7>
50. Paulose JK, Cassone CV, Graniczewska KB, Cassone VM. Entrainment of the circadian clock of the enteric bacterium *Klebsiella aerogenes* by temperature cycles. *iScience*. 2019;19:1202-13. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.09.007>
51. Eelderink-Chen Z, Bosman J, Sartor F, Dodd AN, Kovács ÁT, Merrow M. A circadian clock in a nonphotosynthetic prokaryote. *Sci Adv*. 2021;7(2):eabe2086. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe2086>
52. Diallo AB, Mezouar S, Boumaza A, et al. *RadA*, a key gene of the circadian rhythm of *Escherichia coli*. *Int J Mol Sci*. 2022;23(11):6136. <https://doi.org/10.3390/ijms23116136>
53. Chen AH, Lubkowicz D, Yeong V, Chang RL, Silver PA. Transplantability of a circadian clock to a noncircadian organism. *Sci Adv*. 2015;1(5):e1500358. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500358>
54. Kovač U, Žužek Z, Dall'olio LR, et al. *Escherichia coli* affects expression of circadian clock genes in human hepatoma cells. *Microorganisms*. 2021;9(4):869. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040869>
55. Sartor F, Eelderink-Chen Z, Aronson B, et al. Are there circadian clocks in non-photosynthetic bacteria? *Biology (Basel)*. 2019;8(2):41. <https://doi.org/10.3390/biology8020041>