

Boğaziçi Üniversitesi
Temel Bilimler Fakültesi
Biyoloji Bölümü

FOR REFERENCE

NOT TO BE TAKEN FROM THIS ROOM

ESCHERICHIA COLI R-PLAZMITLERİNİN
DİRENÇ GENLERİNİN GENETİK ANALİZİ

(Doçentlik Tezi)

Dr. Ahmet Kadıkıran

Bogazici University Library



39001100375156

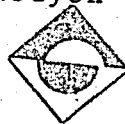
14

İstanbul - 1982



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
A. GİRİŞ	1
I. GENEL BİLGİ	1
1- Plazmitler	2
A. Plazmitlerin Sınıflandırılması	2
a) Taşıdıkları Genetik Bilgiye Göre Sınıflandırma	2
b) Taşıdıkları Genetik Bilginin Aktarımına Göre Sınıflandırma	4
B. Bakterilerde Plazmit Varlığının Tayini	4
a) Genetik Yöntemler	4
b) Biyokimyasal ve Biyofizik Yöntemler	5
C. R-Plazmitleri	5
2- Dirençliliğin Oluşumu	8
A. Kalıtsal Olmayan Direnç	8
B. Kalıtsal Dirençlilik	8
a) Kromozomal Dirençlilik	9
b) Plazmit Antibiyotik Dirençliliği	11
C. Hareketli Genetik Elementler	13
3- R-Plazmiti Eksilmesi (Curing)	14
4- Konjugasyon	16
5- Plazmit Modifikasyon-Restriksiyon Sistemi	17



	<u>Sayfa</u>
II. TEZİN AMACI	19
B. GEREÇ VE YÖNTEMLER	21
1- Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Alındıkları Firmalar	21
2- Kullanılan Tamponların Bileşimi	22
3- Besi Yerlerinin Hazırlanması	23
4- Baskı (Replika) Tabacı ve İğnesi	23
5- Kültürlerin Saklanması	24
6- Çalışmada Kullanılan E.coli Suşları	25
7- Plazmit Antibiyotik Direnci Eksilmesinin İncelenmesi	26
a) Kendiliğinden Direnç Eksilmesi	26
b) Hızlandırılmış Direnç Eksilmesi	27
8- Konjugal Aktarım Deneyinin Yapılışı	28
9- Agaroz Jel Elektrophorezi	29
a) Agaroz Jelin Hazırlanması	29
b) Plazmit DNA'sının Agaroz Jelindeki Ceplere Yüklenmesi	30
c) Elektrophorez ve Boyama İşlemi	31
C. BULGULAR	
1- R-Plazmitlerinde Antibiyotik Direnci Eksilmesinin İncelenmesi	34
2- R-Plazmitlerinin Direnç Genlerinin Aktarımının İncelenmesi (Konjugasyon)	43
3- R-Plazmitlerinin DNA Analizi	51
D. TARTISMA VE SONUÇ	58
E. ÖZET	70
F. KAYNAKLAR	72

A. GİRİŞ

I. GENEL BİLGİ

Antibiyotikler ve diğer kemoterapötiklerin yaygın kullanımının bu maddelere dirençli bakterilerin seleksiyonu için uygun bir çevre oluşturduğu bilinmektedir(1,2).

1935 yılında Domagk tarafından sulfonamidlerin, 1940 yılında Chain ve Florey tarafından Penisilinin kemoterapötik olarak kullanıma sunulmasından kısa bir süre sonra Japonya'da 1950 yıllarında sulfonamidlere direnç kazanan bakterilerde antibiyotik direncinin de görülmesinden hemen sonra yapılan çalışmalar, antibiyotik direnci gösteren bakterilerin tüm dünyada yaygın şekilde bulunduğunu göstermiştir(2-6).

Antibiyotik direnci taşıyan bakterilerin varlığı nedeniyle, birçok bakteri hastalığı günümüzde de önemini korumaktadır. Bakterilerde antibiyotik direnci oluşumunun mekanizması iyi bilinmesine rağmen bakterilerin direnç mekanizmasını aşacak, klinik tedavide etkin, az sayıda antibiyotik bulunmaktadır(7). Antibiyotiklerin yapısında meydana getirilen kovalan değişiklikler dirençlilik mekanizmasının en yaygın görülen biçimi olmakla birlikte, geçirgenlik (permeabilite) özelliğinin değiştirilmesi yanısıra diğer mekanizmaların varlığı da gösterilmiştir.

Plazmitler, bakteri DNAsından bağımsız olarak replike

olabilen (replikon), birçoğu kendi aktarımını (konjugasyon) sağlayan genleri taşıyan, iki iplikçikli genetik elementlerdir(8-10). Plazmit DNAsının ayrıca bazı antibiyotik direnci özelliğini veren genleri taşıdığı da bilinmektedir. Bu tür plazmitlere genellikle R-plazmitleri veya R-faktörleri denir ve pek çok bakteri türünde rastlanır(11-14). R-plazmitleri üzerinde taşınan genlerin sebep olduğu dirençliliğe bulaşıcı (infektif) direnç de denir. Bulaşıcı dirençlilik toplum sağlığı açısından ciddi bir konuyu teşkil eder. Antibiyotik ve diğer kemoterapötiklere dirençli suşların Türkiye'de de hızlı bir artış kaydettiği gösterilmiştir(15-20).

1- Plazmitler

A. Plazmitlerin sınıflandırılması

Plazmitler hemen her bakteri türünde barınan otonom, kendi replikasyon sistemine sahip, bakteri DNAsından bağımsız olarak varlıklarını sürdürebilen genetik elementlerdir (Tablo 1). Bununla beraber bazı plazmitler hücre DNAsına entegre olarak da bulunabilirler; bu tip plazmitlere epizom da denir(22). Bilinen tüm bakteri plazmitleri hücre içinde kovalan bağlı (kapalı) iki iplikçikli DNA yapısındadırlar. Bakteri plazmitlerinin sınıflandırılmasında çeşitli yöntemler kullanılmıştır(23):

a) Taşıdıkları genetik bilgiye göre sınıflandırma

a.1) Antibiyotik direnci genlerini taşıyan plazmitler (örneğin, R-plazmitleri veya R-faktörleri).

a.2) Bakteriosin proteinleri genlerini taşıyan plazmitler (örneğin, Col E, I, K, V plazmitleri).

TABLO 1- Doğal olarak bulunan plazmitlerin özgün bazı özellikleri(21).

Ö z e l l i ğ i	Taşıyıcı Plazmit
Fertilite (konjugal aktarım)	F, R, Col
Bakteriosin üretimi	CloDF13 (Enterobacterium cloacae), Col A, B, E, H, I, K ve V
Antibiyotik üretimi	SCP1 plazmiti (Streptomyces coelicolor)
Ağır metal direnci (Cd ⁺² , Hg ⁺² , Pb ⁺² ve Ni ⁺²)	p1258 (S.aureus), R6
UV direnci	Col 1b, R46
Enterotoksin üretimi	Ent
Virülans faktörleri Hemolisin K88 antijeni üretimi	ColV, Hly
Kamfor, Oktan metabolizması	Cam, Oct (Pseudomonas)
Bitkilerde tumörojenisite	T1-Agrobacter tumefaciens
Restriksiyon/Modifikasyon	EcoRI, EcoRII endonükleaz ve metilazların RY13 plazmitince üretilmesi

Not: Tabloda kaynağı verilenlerin dışındakilerin tümü Escherichia coli'ye aittir.

b) Taşıdıkları genetik bilginin aktarımına göre sınıflandırma

b.1) Aktarılabilen (konjugal) plazmitler: En iyi bilinen örnekler; F.(fertilite) ve R-plazmitleridir. Gram negatif bakterilerin R-plazmitleri bu sınıfa girerler(24).

b.2) Aktarımı olmayan (non-conjugal, non-transmissible) plazmitler: Konjugasyon genlerini taşımayan plazmitler olup, yavru hücrelere aktarımı aseksüel şekilde cereyan eder. Gram pozitif bakterilerdeki R-faktörleri en iyi örneğidir(25). Ancak, bakteri, aktarımı olmayan bir plazmitin yanı sıra aktarımı olan bir plazmiti de taşıyorsa, ikincinin birinciye mobilize ettiği saptanmıştır.

B) Bakterilerde plazmit varlığının tayini

a) Genetik yöntemler

Plazmit, R-plazmitlerinde olduğu gibi bulaşıcı (infektif) bir karakteri taşıyorsa, bu karakterin hücreden hücreye hızlı aktarımına dayanarak plazmit varlığından söz edilir. Aktarılan plazmit karakterleri bakteri hücre DNAsı üzerinde taşınan genler ile herhangi bir bağlılık (linkage) göstermezler(26,27).

Plazmit taşıyan bakteriler bazen plazmitini kaybetmiş segregantlar verebilirler. Plazmit kaybı spontan olabileceği gibi, konjugasyon ve transdüksiyon gibi genetik aktarım olayı esnasında da görülürler(28,29). Akridin oranj, etidyum bromit, SDS (sodyum dodesil sülfat), X-ışını ve timin açlığı gibi muamelelerin plazmitlerin kaybını hızlandırdıkları bilinmektedir(30,31).

Gerek spontan olarak, gerekse endükleme yoluyla

elde edilen segregantlar üremelerine devam ederler; ancak, plazmit genlerince tayin edilen özelliklerini kaybederler. Böylece, bir veya birçok direnç özelliğini birlikte kaybeden bakterilerin bu özelliklerini plazmit üzerinde taşıdığı söylenebilir(32). Hashimoto ve ark.(33,34) nokta mutasyonu sonucu tetrasiklin ve kloramfenikol dirençlerini kaybeden mutant R-plazmitleri elde ettiler. Reversiyon (geri-dönüş) hızının 10^{-6} - 10^{-8} olduğunu gösterdiler. Bu nedenle, plazmit kaybının tayininde esas alınan genetik kriterler:

- 1- antibiyotik direncinin kaybolma hızı,
- 2- bir hücrede birden fazla özelliğin aynı zamanda kaybedilmesidir.

b) Biyokimyasal ve biyofizik yöntemler

Bu yöntemlerin özü bakteri DNAsının fiziksel olarak plazmit DNAsından ayrılmasıdır. En yaygın görülenler:

1- Yoğunluk gradyenti hız (diferansiyel) santrifügasyon(u): Bakteri DNAsı dibe indirilir ve plazmit DNAsı üst sıvıda kalır(35).

2- Yoğunluk gradyenti hız (izopiknik) santrifügasyon(u): Etidyum bromit ilave edilmiş $CsCl_2$ yoğunluk gradyanında süpersarmal (supercoiled), gevşek (relaxed) ve lineer DNA'nın yoğunluk farkına göre ayrılması sağlanır(36).

3- Jel elektroforezi: Bakteri hücresinde bulunan farklı DNA moleküllerinin büyüklükleriyle ters orantılı olarak, mobilite farklılıklarına göre ayrılmasını sağlar(37).

C. R-plazmitleri

R-plazmiti direnç genlerinin spontan segregasyonu

ve transdüksiyon çalışmalarının sonucu Watanabe(38) R-plazmitlerinin iki ayrı genetik elementten oluştuğunu göstermiştir: RTF ve r faktörleri. RTF transfer ve replikasyon genlerini, r faktörleri ise antibiyotik direnç genlerini taşır. r faktörleri genellikle RTF ile birlikte bulunurlar. Ancak r ve RTF'nin aynı hücrede birbirinden ayrı bulunabildikleri de bilinmektedir(39).

Plazmitlerce taşınan antibiyotik direnci genleri, hücre DNAsınca şifrelenen eş işlevsel genlerden farklı olarak gösterilirler. Kromozomal genlerin sembolize edilmesinde Demerec ve ark.(40)'nin önerisi uyarınca antibiyotik direncinin ilk üç harfinin kullanılması tüm dünyaca benimsendiği halde, plazmit direnç genlerinin sembolize edilmesinde genelde bir birlik görülmemektedir. Bu nedenle bu çalışmada plazmit direnç genlerinin gösterilmesinde antibiyotiklerin sadece baş harfi kullanılarak; penisilin (P), ampicilin (A), tetrasiklin (T), kanamisin (K), streptomisin (S), kloramfenikol, ayırım sağlamak için, (C) olarak gösterilmiştir. Bir kemoterapötik madde olan sulfonamit direncinden söz etmek gerektiğinde, ayırım sağlayabilmek için, ilk iki harfiyle (Su) şeklinde gösterilecektir.

R-plazmitlerinin stabilitesi taşıyıcı hücreye göre farklılık gösterdiği gibi, bir bakteri hücresinde farklı plazmitler veya bir plazmitin çok sayıdaki kopyaları arasında stabilite yönünden farklılıklar görülebilmektedir. Guerry ve ark.(41) E.coli'de oldukça stabil ve büyük bir replikon olarak bulunan aynı R-plazmitinin Proteus'a aktarıldığında, replikasyonel kontrolün gevşemesi veya kaybedilmesi sonucu, bağımsız replikonlara ayrıldığını göstermişlerdir.

E.coli R-plazmitlerinin RTF ve r faktörleri oldukça stabil olmakla beraber spontan olarak veya konjugasyon ve transdüksiyonla aktarım sırasında bazen değişik kombinasyon-

lar gösteren replikonların oluşabildiği bilinmektedir. Anderson ve Lewis(42) RTF ve r faktörlerinin parçalarına ayrılma (disosiyasyon) ve tekrar birleşmesini (re-asosiyasyon) incelemek amacıyla S.typhimurium R(SuAST) plazmitini konjugasyonla E.coli'ye aktarmışlardır. Bu çalışmada A ile (Su S)direnç genlerinin ayrı ayrı 10^{-2} transfer hızı gösterdikleri ve birlikte 10^{-3} transfer hızına sahip oldukları, oysa T geninin 10^{-6} gibi oldukça düşük transfer hızı gösterdiği izlenmiştir. Araştırmacılar E.coli'ye aktarılan bu direnç genlerinin tekrar S.typhimurium'a aktarımını incelediklerinde diğer genlerin transfer hızının aynı kaldığı fakat T geninin transfer hızının 10^{-1} 'e yükseldiği görülmüştür. Bu sonuçlar, konjugasyonal aktarımı olan her direnç geninin RTF faktörü taşıdığını göstermektedir. Yazarlar, r direnç genlerinin kolaylıkla disosiyasyon olduğunu ve RTF-T tekrar birleşme frekansının hızlı olduğunu ancak tekrar birleştikten sonra ayrılma oranının düşük olması sonucu bakteri kültürünün T geniyle infeksiyonunda giderek belirgin bir artış görüldüğünü belirtmektedirler(43).

Anderson ve Natkin(44) E.coli'de R-(A Su S) plazmitinin RTF-A ve RTF-(Su S) olarak bağımsız replikonlara ayrıldığını Pl fajı ile yaptıkları transdüksiyon çalışmalarıyla göstermişlerdir. Milliken ve Clowes(45) moleküler seviyede yaptıkları çalışmalarında RTF ve r(Su S), r(A) faktörlerinin üç ayrı çembersel DNA molekülü oluşturduklarını, RTF'nin yönlendirdiği aktarımda RTF ve r faktörleri arasında kovalan bir bağın gerekli olmadığını göstermişlerdir. Anderson(46), r faktörlerinin hücre içinde RTF'den ayrı olarak varlıklarını aktarımsız şekilde sürdürdüklerini, çok sayıda kopyalarının bulunduğunu ve r(A), r(Su S) faktörlerinin yaklaşık $7.5 - 8.0 \times 10^3$ baz çifti uzunluğunda küçük moleküller olduğunu göstermiştir.

2- Dirençliliğin Oluşumu

Bakterilerde kalıtsal olmayan ve kalıtsal dirençlilik olmak üzere iki çeşit oluşum görülür.

A. Kalıtsal olmayan dirençlilik

Birçok antibakteriyel maddelerin etkilerinin görülmesi, bakterinin üremesini ve aktif replikasyonunu gerektirir. Aksi halde üremeyen bakteriler dirençli fenotip gösterebilirler. Örneğin, penisiline duyarlı bakteriler ortamda penisilin bulunduğu L-formuna geçebilirler. L-formundaki bakterilerin hücre duvarlarının bulunmamasının onları penisilin ve sefalosporinlerin etkilerine duyarsız kıldığı bilinmektedir(47). Birkaç generasyon sonra eski durumlarına dönerler; hücre duvarı sentezine başladıklarında yine duyarlı duruma geçerler.

B. Kalıtsal dirençlilik

Bakteri genetiği prensiplerine göre, bakteriler dirençliliklerini birer birer kazandıkları halde, çoğul dirençliliğin genellikle aynı zamanda kazanıldığı bilinmektedir. Genetik araştırmalar, çoğul direncin ekstrakromozomal bir genetik element olan R-plazmitleri üzerinde taşındığını göstermektedir(48).

Gram negatif bakteriler de antibiyotik direnci genlerinin büyük bir kısmı plazmitler üzerinde taşınırlar. Plazmitler, kendilerinin aktarımı için yeterli genetik potansiyele sahip olup, dirençliliğin süratle yayılmasına neden olurlar(49-51).

Gram pozitif bakterilerde de direnç genleri genellikle plazmitler üzerindedirler ancak konjugasyonel aktarım göstermezler, yalnız transdüksiyon fajları ile bir bakteriden

diğerine taşınabilirler(52,53). En iyi bilinen örneği Stafilokok plazmitleridir(54,55).

a) Kromozomal dirençlilik

Kromozomal antibiyotik dirençliliği (mutasyon) antibiyotiklerin etkisiyle değil, kendiliğinden (spontan) oluşurlar. Antibiyotiklerin varlığı mutant olmayan duyarlı bakterinin üremesini önleyerek, mutant bakteriler için selektif bir avantaj temin eder. Mutasyonların hızı $10^{-5} - 10^{-9}$ hücre/generasyon arasında değişir(56). Örneğin, E.coli'de tek aşamalı streptomisin direnci mutasyonunun hızı 10^{-9} 'dur. Mutasyon hızının antibiyotiklere göre farklılık göstermesi mümkündür.

Kromozomal mutasyonlar genellikle konjugasyon, transdüksiyon veya transformasyon yöntemlerinden biriyle diğer bakterilere aktarılırlar(57). Bakterilerde görülen dirençliliğin mekanizması kısaca özetlenirse:

a.1) Antibiyotikleri inaktive eden enzimlerin üretiminin artması; örneğin, E.coli amp A geninin ürünü penisilinaz seviyesinin artması ile ampisilin direnci yükselir(58).

a.2) Bakterinin antibiyotik geçirgenliğinin değişmesi: örneğin, duyarlı bakterilerde tetrasiklin birikimi görüldüğü halde dirençli bakteride görülmez(59).

a.3) Antibiyotiklerin hedefinde yapısal değişiklik:

a.3.1) 30 S ribozom alt birimindeki değişiklik. Örneğin, E.coli'de 30 S ribozom altbirimine ait S12 proteinindeki değişikliğe neden olan bir mutasyon (Str A), proteinin streptomi-

sine ilgisini azaltmak suretiyle direnç kazandırmıştır(60). Aynı şekilde S5 proteininde yapısal değişikliğe yol açan mutasyon (Spc-R), hücrenin spectinomisine direncini artırır(61,62).

a.3.2) E.coli'de 50 S ribozomal proteinlerinden 50-8'in yapısını değiştiren mutasyon hücreye eritromisin ve streptomisin direnci kazandırmıştır(63). Protein sentezi mekanizmasını etkileyen diğer bir mutasyon, G faktörü proteininde yaptığı yapısal değişiklik sonucu bakteri fusidik aside direnç kazanmıştır(64).

a.3.3) bugüne kadar 6 tane "penisilin bağlama proteini (penisilin binding proteins - PBP)" izole edilmiştir. Bunlardan 3 tanesinin R-plazmitlerince şifrelendiği gösterilmiş ve diğerlerinin kromozomal olabileceği belirtilmiştir(65,66). PBP genlerindeki mutasyonun bu proteinlerin penisiline ilgilerinde değişme sonucunu doğurduğu öne sürülmüştür.

a.4) Kemoterapötik etkisinin yeni açılan bir metabolik yolla aşılması; örneğin, sulfonamite dirençli bakteriler PABA (p-amino benzoik asit) gerektirmezler, onun yerine folik asit kullanırlar(67,68).

a.5) Enzim yapısındaki değişiklik; enzim metabolik işlevini yerine getirebildiği halde kemoterapötiğe duyarlılığı azalmıştır. Örneğin, duyarlı bakterilerin tetrahidropteroik asit sentetaz enziminin sulfonamite ilgisi PABA'dan daha fazla olduğu halde sulfonamite dirençli bakteride bunun aksi görülür(69,70).

Bakterilerde kromozomal dirençlilik de önemli olmakla beraber, plazmitlerce taşınan direnç gerek klinik olarak; gerek bakteri infeksiyonlarının epidemiyolojisi

yönünden daha önemlidir. Bunun nedenlerinden ikisi özetlenirse:

a.5.1) Kromozom genlerinin aktarım hızı, plazmit genlerinin aktarım hızına göre çok düşüktür.

a.5.2) Kromozomal mutasyonlar genellikle bakterinin metabolik dengesini değiştirmek suretiyle, normal bakteriye göre dirençli mutantın üremesinde dezavantaja yol açarak elimine edilmelerine neden olabilirler.

b) Plazmit antibiyotik dirençliliği

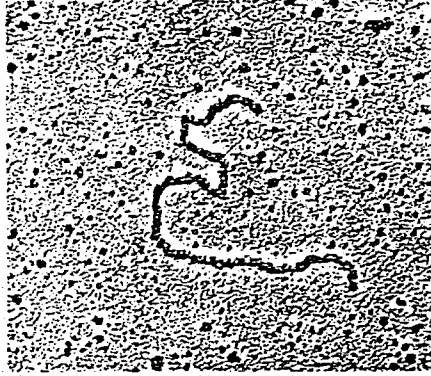
R-plazmitlerinin Watanabe(2) tarafından bulunmasından sonra antibiyotik direncinin en yaygın şeklinin plazmit direnci olduğu bilinmektedir.

R-plazmiti taşıyan bakterilerde antibiyotik direnci genellikle ya plazmitin sentezini sağladığı bir proteinin enzimatik aktivitesi nedeniyle ya da bu proteinin hücre duvarıyla etkileşimiyle hücre duvarının geçirgenliğinin değiştirilmesi sonucu görülür (Tablo 2).

TABLO 2 - Bu çalışmada kullanılan antibiyotiklere plazmitlerce sağlanan direnç oluşumunun mekanizması

<u>Antibiyotik</u>	<u>Direnç Oluşum Mekanizması</u>
Penisilin ve Ampisilin	Beta-laktamazlar(71,72), transport mekanizmasında değişiklik(73)
Streptomisin ve Kanamisin	O-asetilasyon(74,75) O-adenilasyon(76,77) O-fosforilasyon(78)
Tetrasiklin	Hücre duvarı geçirgenliğinde değişiklik(79).
Kloramfenikol	Asetiltransferaz (CAT)(80,81).

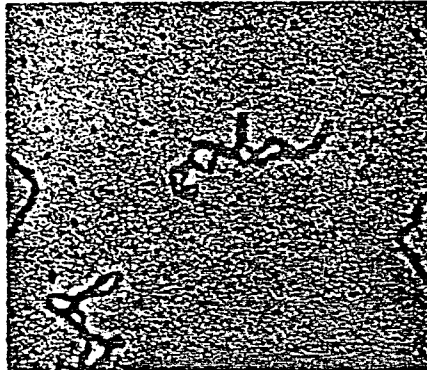
Clewell ve Helinsky(82) plazmitlerin genellikle kovalan, kapalı çembersel moleküller olarak izole edildiğini, bakterilerin logaritmik büyüme devrelerinin üst sınırında genellikle süpersarmal (supercoiled) şekilde bulunduğunu, nükleazlar tarafından kesime uğrayan plazmit DNAsının lineer yapıda olduğunu göstermiştir (Şekil 1).



(a)



(b)



(c)

ŞEKİL 1- Plazmit DNAsının elektron mikroskopunda görünümü(83).
(a) lineer, (b) gevşek, (c) süpersarmal

R-plazmitlerinin, E.coli'de genellikle 1-2 kopya halinde bulundukları bilinmektedir(84).

R-plazmitlerinin büyüklükleri genellikle 5-150 kilobaz (kb) baz çifti arasındadır. R-plazmitleri aynı hücre içinde bile farklı büyüklükte olabilirler. Bunun nedenlerinden biri de genetik rekombinasyondur. Farklı genleri taşıyan iki R-faktörü arasındaki rekombinasyon sonucu daha büyük, daha çok sayıda r faktörü taşıyan R-plazmitleri oluşabilir. Bu oluşum aşağıda belirtilen yöntemlerden biriyle gerçekleştirilir(85):

b.1) Genel rekombinasyon: Homolog kromozomlar arasında görülür(86).

b.2) Düzensiz (illegitimate) rekombinasyon: Homolog olmayan kromozom yapıları arasında görülür. Bu oluşumun insersiyon elementleri (IS) tarafından gerçekleştirildiği gösterilmiştir(87,88).

b.3) Yer değiştirme (Transpozisyon): Hareketli (Transposable) elementlerin benzerinin bulunması (duplikasyon) sonucu olabilmektedir(89,90).

C. Hareketli genetik elementler

Plazmit antibiyotik direncinin bir başka plazmitte aktarımında hareketli elementlerce yönlendirilen "yer-değiştirme"nin rolü oldukça iyi bilinmektedir. Bu elementlere transpozon (Tn) da denir. Hareketli elementler üzerinde taşınan DNA segmentlerine translokon denir. Hareketli elementler girme (insertion)-çıkma (excision) potansiyeline sahiptirler ve alıcı ile verici replikonlar arasında benzerlik (homoloji) gerekli değildir.

Tetrasiklin direnci genini taşıyan ve iki ucunda IS3 insersiyon elementi bulunan TnD(91), ampisilin direnci genini taşıyan TnA(92), streptomisin ve trimetoprim direnci genlerini taşıyan TnC(93)'nin yanısıra kloramfenikol ve kanamisin direnci genlerini taşıyan hareketli elementler izole edilmiştir(94).

Hareketli elementlerin taşınması bakterinin recA özelliğinden bağımsızdırlar ve bu özelliklerini gerek aktarımlı gerek aktarımsız plazmitler üzerinde uygularlar(95).

3- R-plazmiti eksilmesi (Curing)

R-plazmitleri antibiyotiksiz ortamda bakterilerin büyümeleri için gerekli değildir ve oldukça stabildirler(96). E.coli'de spontan R-plazmiti eksilmesi veya bazı genlerin eksilme (delesyon) hızı yaklaşık 10^{-4} - 10^{-5} bakteri/generasyon-dur. Genellikle segregasyon veya replikasyon hataları sonucu görülür. Spontan direnç eksilmesi en sık S.typhimurium, en düşük de E.coli'de görülür(97).

Akridin oranj ve etidyum bromit muamelesiyle bakterilerde % 1'den % 100'e kadar artan plazmit eksilmesi görülür(98,99). SDS muamelesi(100) ve tımin açılığı da aynı amaçla kullanılmaktadır. Plazmit genlerinde bir mutasyon sonucu ortaya çıkan direnç eksilmesi bazen yanlışlıkla plazmit kaybı şeklinde değerlendirilebilir. Delesyonların gen mutasyonlarından ayrılması için geri-dönüşsüz (non-reversible) olmalarından ve direnç eksilmesinin mutasyon hızından çok yüksek bir oranda görülmesinden faydalanılır. Bununla beraber, direnç eksilmesinin izlenmemesi de her zaman o karakterin bakteri kromozomu üzerinde taşındığını göstermez. Ayrıca, tüm direnç karakterlerinin de incelenmesi gereklidir zira, plazmitlerin direnç genlerinden yalnız biri veya bir kısmı eksilmiş olabilir. Plazmit direncinin eksilme mekanizmasının kesin

olarak bilinmemesine rağmen, eksilmeyi arttıran maddelerin tümünün mutajen etkilerine ilaveten bakterisit etkileri de görülmektedir.

R-plazmiti taşıyan bakterilerin, R-plazmiti taşımayan veya R-pilus yapımı baskılanan (repressed) aynı bakteriye kıyasla aminoakridin boyaları, SDS (sodyum dödesil sülfat), üre, atebrin-klorokin (chloroquine) gibi maddelere karşı daha duyarlı oldukları bilinmektedir. Bu maddelerle muamele sonucu plazmit kaybı gösteren segregantların seçilerek kültürdeki sayılarının giderek arttığı gösterilmiştir(101).

Etidyum bromit ve akridin oranjin DNaya sıkı bir ilgiyle bağlandığı bilinmektedir. Lerman(102) bu iki maddenin çiftsarmal DNA baz çiftlerinin arasına girerek (intercalation) lokal açılmaya yer verdiğini göstermiştir. Hahn ve Ciak(103), lokal açılmanın büyümesi sonucu, sağ-dönüslü (normal) DNA'nın sol dönüslü DNaya dönüştüğünü, doğal olmayan sol-dönüslü DNA'nın replikasyonunun olmadığını ve segregantlara plazmit yayılmasının önlendiğini ileri sürmüşlerdir. Bouanchaud ve ark.(104) 10^{-4} M etidyum bromit içinde üretilen bir gecelik bakteri kültürlerinde % 0-10 arasında değişen plazmit eksilmesi tespit etmişlerdir.

Plazmit eksilmesi her zaman plazmit DNA'sının direkt etkilenmesi sonucu değildir. Riva ve ark.(105), rifampisine duyarlı (rif-s) normal E.coli'de çok düşük seviyede rifampisin ilave edildiği zaman % 10 seviyesinde plazmit eksilmesi görülmesine karşılık, kromozomal dirençli (rif-r) E.coli'de rifampisin ilavesinde plazmit eksilmesi görülmemesi ile plazmit eksilmesinin RNA polimeraz enziminin inhibisyonu sonucu olduğunu göstermişlerdir.

Plazmit eksilmesi, in vitro mutajenin konsantrasyonu, pH, büyüme ortamı sıcaklığı, başlangıç bakteri inokülasyonu

ve generasyon sayısı gibi faktörlere bağlıdır.

4- Konjugasyon

E.coli klinik izolatlarında R-plazmitleri transferinin 37°C'de 60 dakika inkübasyon sonunda yaklaşık 10^{-4} olduğu gözlenmiştir(106). Bir diğer ifade ile, E.coli (R^+) verici suşu E.coli (R^-) alıcı suşuyla eşit miktarda karıştırılıp 60 dakika 37°C'de inkübe edilirse alıcıların % 0.01'i R-plazmini kazanırlar. 16-18 saat (gecelik) inkübasyondan sonra, transfer % 1-100 arasında görülmektedir. Bu farkın R-tipi fertilite pilusunun oluşumuyla ilgili olduğu bilinmektedir(107).

R-plazmitinin transferi, inkübasyonun ilk 5 dakikası içinde başlar ve yaklaşık 15 dakikada tamamlanır. Plazmiti transfer eden alıcı 15 dakika içinde verici durumuna geçerek diğer alıcılarla çiftleşmek suretiyle kazandığı direnci aktarabilir. R-plazmitleri, F (fertilite) faktörlerinden daha düşük bir aktarım hızı gösterirler(108). F faktörü ile R-plazmiti aynı hücrede bulunduğu zaman, oldukça düşük sayıdaki hücrenin F pilus yapabildiği görülmektedir(109). Bu durumun R-plazmitine ait bir represör proteinin F-pilus yapımını engellemesi sonucu olduğu gösterilmiştir. Finnegan ve Willets(110, 111) proteini sentez edemeyen (de-repressed) suşlar elde etmiş ve bu suşlarda F pilus yapımının önlenememesi nedeniyle bakteri kromozomunun aktarımında artış olduğunu saptamışlardır. R-plazmitinin F-pilus yapımını, dolayısıyla bakterinin fertilitesini, engellemesi özelliğine fertilite inhibisyonu denir ve bu plazmitler (fi^+) olarak gösterilir. Aynı hücrede bulunduklarında, F pilus yapımını engellemeyen R-plazmitlerine fertilite inhibisyonu göstermeyen (fi^-) R-plazmitleri denir(112,113).

(fi^+) R-plazmiti taşıyan bir bakteri, ikinci bir (fi^-)

R-plazmiti ile infekte edilirse iki plazmit aynı hücrede varlıklarını sürdürür ve replikasyon ve transferleri birbirinden bağımsız olarak devam eder. Ancak, alıcı bakteriye kendisinde bulunan R-plazmiti ile izogenik (homolog) ikinci bir R-plazmiti verilirse, birinci ikincinin hücreye girişini veya hücreye girdikten sonra hücre içinde muhafaza edilmesini önler. Bu iki özelliğe sırasıyla "girişte-dışlama" (entry exclusion) ve "uyuşmazlık" denir. Bu iki özellik birlikte bakteride "süperimmunité" (super immunity)yi oluştururlar(114).

Pek çok bakteri türlerinde bulundukları gösterildiği halde, R-plazmitlerinin aktarımı daha çok E.coli, Salmonella ve Shigella bakteri türleri arasında gözlenmektedir(115). R-plazmitlerinin aktarımı açısından E.coli iyi bir alıcı olduğu gibi, bilinen en iyi vericidir(116). Ancak, R-plazmitlerinin alıcı bakteride taşınması ve aktarılan direnç özelliklerini kazandırması, aktarılan replikonun alıcı hücre restriksiyon-modifikasyon sistemine karşı bağışık olmasını gerektirmektedir.

5- Plazmit modifikasyon ve restriksiyon sistemi

Bakterilere yabancı bir DNA segmenti aktarıldığında alıcı bakteri kendi restriksiyon modifikasyon enzim sistemini harekete geçirir. Taşıyıcı sisteme özgü modifikasyonu (metilasyon) taşımayan yabancı DNA taşıyıcının enzim sistemi tarafından kesilir(117,118). Bu enzim kompleksi palindromik dizileri tanır ve hücre metilasyonuna aykırı DNAYı keser. Palindromik dizi ikili rotasyonal simetriye sahip, 5'→3' yönünde aynı baz dizisini gösteren DNA segmentidir(119).

Modifikasyon, restriksiyon-modifikasyon enzim kompleksinin tanıma bölgesine göre simetrik bazları metile etmesidir. Restriksiyon, bu kompleksin yabancı DNA üzerinde taşınan tanıma dizisinde çift iplikçik üzerinde yaptığı kesmedir. Ke-

şim sonucu yabancı DNA, bakteri nükleazlarının parçalama aktivitelerine açıktır. Aynı hücreye ait bakteri ve plazmit DNAsı üzerindeki palindromik diziler bakteri enzim kompleksi tarafından tanınır ve modifiye edilir. Enzim kompleksi iki zinciri de metile edilmiş dizilere bağlanamaz (bağışıklık). Ayrıca, hücre DNAsı replike edildiğinde, yeni DNA sentezinden sonra, enzim kompleksi eski zincirdeki kendisince metile edilmiş baz dizisini tanır ve yeni zincirdeki diziyi de metile eder. E.coli restriksiyon-modifikasyon enzim kompleksi üç alt birimden oluşur:

a) hss genince şifrelenen altbirim: DNA üzerinde tanıyan, bir veya iki iplikçiği de metile edilmemiş diziyeye bağlanma işlevini,

b) hsm genince şifrelenen altbirim: metilasyon işlevini,

c) hsr genince şifrelenen altbirim: DNayı kesme işlevini, yerine getirir.

Restriksiyon işlevi için üç altbirimin de bulunması zorunludur. Modifikasyon işlevi için hss ve hsm gen ürünleri yeterlidir. E.coli B ve K suşları birbirinden farklı tanıma bölgeleri taşırlar. E.coli 15 de farklı iki restriksiyon-modifikasyon sistemi bulunmuş olup, diğer bakteriler de kendilerine özgü sistemlere sahiptirler.

E.coli R-plazmitlerinde iki ayrı sistemin bulunduğu gösterilmiştir(120). Bu iki sistem:

a) fi^+ R124 faktöründe taşınan RI sistemi (EcoRI)(121)

b) fi^- R-faktörlerince taşınan RII sistemi (EcoRII)(122)

olarak tanımlanmıştır.

II. TEZİN AMACI

Bakterilerde çoğul antibiyotik direncinin R-plazmitleri üzerinde taşınan direnç genlerinin bir işlevi olduğu bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı, R-plazmitlerinin genetik yapılarının incelenmesidir.

Bu amaçla, İstanbul bölgesinden izole edilen ve çoğul antibiyotik direnci bulunan klinik *Escherichia coli* suşları kullanılmıştır. Suşlarda saptanan antibiyotik direnç genlerinin hücre DNA sı üzerinde mi bulunduğu yoksa plazmit DNA sı tarafından mı taşındığını tesbit etmek üzere, direnç genlerinin direnç eksilmesi, konjugal aktarım modellerinin araştırılması ve DNA analizine dayanan yaklaşımlar gerekmektedir.

R-plazmitlerinin stabilitesini araştırmak için direnç genlerinin bir alıcı (R^-) suşa aktarımını incelemek gereklidir. Ayrıca, suşların DNA analizi de bu yönde tamamlayıcı bilgiler verebilir.

R-plazmitlerinin konjugal aktarımının incelenmesinde restriksiyon-modifikasyon enzim kompleksini kaybetmiş $B_1(F^-R^-r^-m^-)$ alıcı suşun kullanımı önem taşır. Böylece, R-plazmitlerinin direnç genlerinin β_1 'e konjugal aktarım modelleri doğrudan, vericideki bakteri DNA sıının R-plazmitleri ile etkileşimini, varsa hücre içindeki farklı plazmitlerin birbirleriyle olan ilişkilerini ve R plazmitlerinin stabilitesini yansıtacaktır.

R-plazmitlerinin genetik haritalarının yapılarak di-

renç genlerinin sırasının çıkarılmasında direnç eksilmesi ile konjugal aktarım sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi gerekir. Direnç genlerinin plazmit üzerindeki sıralarının çıkarılmasıyla plazmitlerin birbirleriyle ilgilerinin incelenmesi ve bulaşıcı dirençlilik faktörünün bölgedeki insan popülasyonuna yayılmasındaki rolü tartışılabilir. Konjugal aktarım modellerinin incelenmesiyle; R-plazmiti (RTF-r) nin stabilitesi ve (r) faktörü direnç genlerinin kendi içindeki stabilitesi incelenebilir.

Antibiyotiklerin yoğun kullanımının antibiyotik direnç genlerini taşımayan bakterilerin elimine edilmelerine neden olduğu düşünülürse, düzensiz ve farklı antibiyotik kullanımının da seçilen bakteri popülasyonunda bir üst seviyede seçimi zorlayarak benzer modeli taşıyan R-plazmitlerini barındıran bakterilerin seçimine yol açması beklenebilir. R-plazmitlerinin haritalanmasıyla bu konunun üst seviyede incelenmesi mümkün olabilir.

Çalışma anlatılan hususlara açıklık getirmek üzere başlatıldı..

B. GEREÇ VE YÖNTEMLER

1- Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Alındıkları Firmalar

a) Besiyeri Maddeleri

Bacto-Mac Conkey (Difco, ABD)

Bacto-Pen Assay Agar No.2 (Difco, ABD)

Bacto-Pen Assay No.3 (Difco, ABD)

EMB (Eosin Metilen mavisi) (Difco, ABD)

b) Antibiyotikler ve Kemoterapötikler

Ampisilin (Sodyum tuzu) (Sigma, ABD)

Kanamisin sülfat (Sigma, ABD)

Kloramfenikol (Eczacıbaşı, İstanbul)

Nalidiksikasit (İltaş, İstanbul)

Penisilin-G (Sigma, ABD)

Rifampisin (Sigma, ABD)

Sodyum azit (Matheson Coleman ve Bell, ABD)

Streptomisin sülfat (Sigma, ABD)

Tetrasiklin-HCl (Eczacıbaşı, İstanbul)

c) Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Maddeler

Agaroz tip I (Sigma, ABD)

Agaroz-Sea Plaque (Marine Colloids, ABD)

Borik asit (Mallinckrodt, ABD)

Bromofenol mavisi (Sigma, ABD)

Etidyum bromit (Sigma, ABD)

EDTA (Etilen diamin tetraasetik asit) (Merck, Almanya)

SDS (Sodyum dodesil sülfat) (Merck, Almanya)

Sukroz (Merck, Almanya)

Tris (hidroksimetil)-aminometan (Sigma, ABD)

d) Diğer Kimyasal Maddeler

Akridin oranj (BDH, İngiltere)

Hidroklorik asit (Merck, Almanya)

Sodyum hidroksit (Merck, Almanya)

2- Kullanılan Tamponların Bileşimi

a) Elektroforez tamponu (ET)

Tris	89 mM
Borik asit	89 mM
EDTA	2.5 mM

(pH 8.2)

b) Agaroz jeli: % 0.7 Agaroz (Sigma) ET içinde 100°C'de 15 dakika kaynatılmak suretiyle homojenize edilerek hazırlandı, -60°C'de inkübatörde beklemeye bırakıldı.

c) Tris-EDTA tamponu (T-E)

Tris	89 mM
EDTA	2.5 mM

(pH 8.2)

d) I. ince agaroz karışımı

1 x T-E

% 1 İnce agar

% 30-40 Sukroz. Karışım 100°C'de 5 dakika kaynatıldı. % 5 oranında Bromofenol mavisi ilave edildi ve 50°C'de ısıtıcıda bekletildi.

e) II. ince agaroz karışımı

1 x T-E

% 1 İnce agar

% 0.5 SDS. Bu karışım 100°C'de 5 dakika kaynatıldı. 50°C'de ısıtıcıda bekletildi.

f) Lizozim 5 mg/ml (T-E içinde yeni hazırlandı).

3- Besiyerlerinin Hazırlanması

a) Sıvı besiyeri

8 gr Pen Assay (PA) antibiyotik besiyeri No.3 (Difco)
500 ml H₂O (pH 7.5)

b) Katı besiyeri

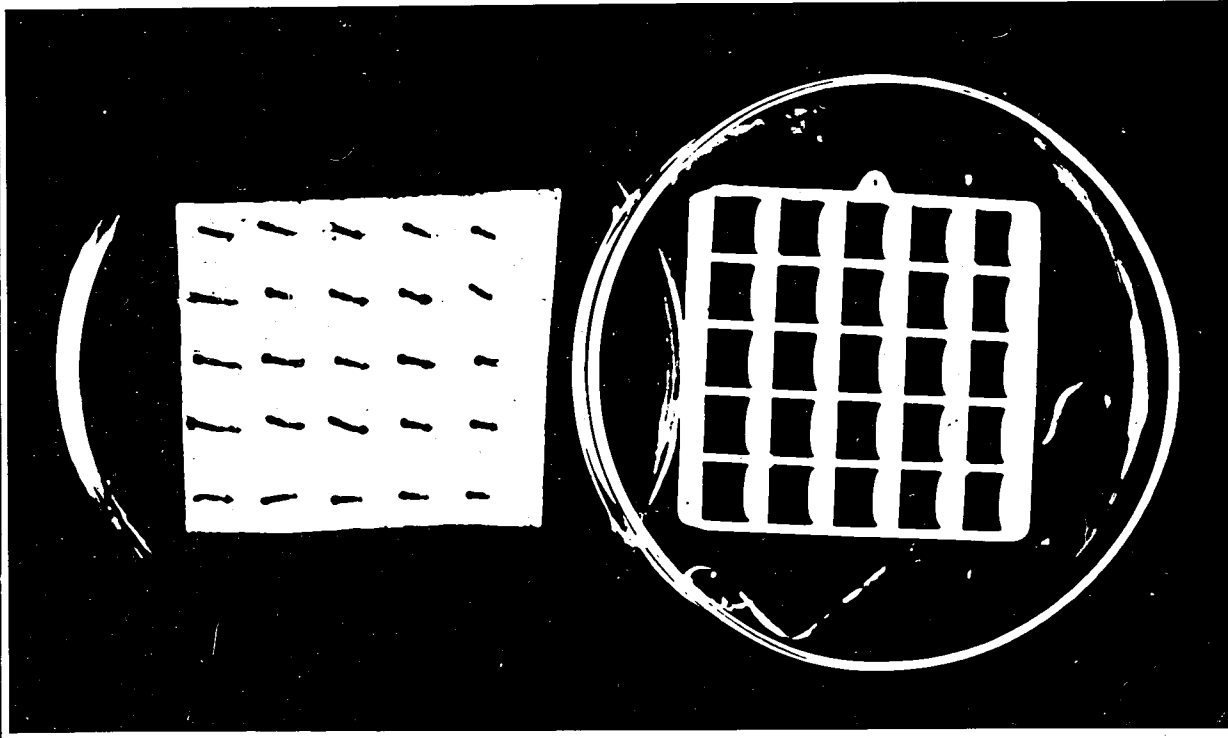
12 gr Pen Assay (PA) antibiyotik besiyeri No.2 (Difco)
500 ml H₂O (pH 7.5)

Her iki besiyeri 121°C'de 20 dakika otoklavda sterilize edildi.

Kemoterapötiklerin katı besiyerlerine ilavesi, sterilize edilen katı besiyeri 50°C su banyosunda en az 1 saat bekletildikten sonra yapıldı.

4- Baskı (replika) tabağı ve iğnesi

Bu çalışmada yapılan tüm antibiyotik direnci gözlemlerinde otoklava dayanıklı plastikten imal edilmiş, 25 tane ayrı (6 x 6 x 6 mm) yuvası bulunan replika (baskı) tabağı kullanıldı. Baskı tabakları petri kutuları içinde sterilize edildi. Baskı işlemi, bir defada 25 koloniyi taşıyabilen, 25 iğneli baskı kalıbı kullanılarak yapılmıştır.



ŞEKİL 2- Baskı (replika) tabağı ve baskı kalıbı (iğnesi)

5- Kültürlerin saklanması

Antibiyotik direnci taşıyan klinik E.coli suşları ile direnç eksilmesi ve konjugasyon çalışmalarında elde edilen tüm segregantlar dirençli oldukları antibiyotiklerden en az birinin ilave edildiği (20 µg/ml) PA katı besiyerinde muhafaza edildi. Stok suşlar 3 ml katı besiyeri ilave edilmiş kapaklı şişelerde ve oda ısısında (20°C'de), segregantlar ise petri kutularındaki katı besiyerinde +4°C'de tutuldu.

6- Çalışmada Kullanılan E.coli Suşları

TABLO 3- Çalışmada kullanılan E.coli suşlarının listesi

a) İdrar muayene maddelerinden izole edilen suşlar:

Suşlar	Protokol No	K a y n a k				
1	18671	İ.Ü.İstanbul Tıp Fak.Mikrobiyoloji Anabilim Dalı				
2	18738	"	"	"	"	"
3	18743	"	"	"	"	"
4	18799	"	"	"	"	"
5	18840	"	"	"	"	"
6	18880	"	"	"	"	"
7	19006	"	"	"	"	"
8	19015	"	"	"	"	"
9	19020	"	"	"	"	"
10	19277	"	"	"	"	"
11	19412	"	"	"	"	"
12	19419	"	"	"	"	"
13	19430	"	"	"	"	"
14	19478	"	"	"	"	"
15	19497	"	"	"	"	"
16	19642	"	"	"	"	"
17	19737	"	"	"	"	"
18	19746	"	"	"	"	"
19	19920	"	"	"	"	"
20	19936	"	"	"	"	"
21	19943	"	"	"	"	"
22	19972	"	"	"	"	"
23	19981	"	"	"	"	"
24	19992	"	"	"	"	"

b) Laboratuvar suşları:

S u ş	Genetik Özellikler	K a y n a k
E.coli K12 Hfr C(cavalli)	(Hfr R ⁻)	Kuen 122-E2-1-85*
" " Hfr C Nal	(Hfr R ⁻) Nal-r	A.Kadıkıran
" " K37	(Hfr R ⁻) sup D str	F.Stahl
" " RL108	(F ⁺ R ⁻) tet-r rec A56	F.Stahl
" " β pst	(F ⁻ pBR322G) r ⁻ m ⁻ str-r T	F.Stahl
" " β_1	(F ⁻ R ⁻ r ⁻ m ⁻)str-r rif-r	A.Kadıkıran
" " C600	(F ⁻ R ⁻) thr leu lac β_1 str-r	F.Stahl
" " 594	(F ⁻ R ⁻) str-r	F.Stahl

* İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Enstitüsü (KÜKENS) katalog numarasıdır.

7- Plazmit antibiyotik direnci eksilmesinin incelenmesi

Klinik E.coli suşları kullanılarak yapılan antibiyotik direnç eksilmesi a) kendiliğinden (spontan), b) hızlandırılmış (enhanced-induced) olmak üzere iki ayrı yöntemle incelendi.

a) Kendiliğinden direnç eksilmesi

2 ml PA sıvı besiyeri tek koloniden ekilerek oda sıcaklığında 18-24 saat durgun üremeye bırakıldı. Takibeden altı günde suşların pasajı besiyerine 1/100 oranında yapılarak hazırlandı. Altıncı pasaj sonunda (7'nci gün) elde edilen kültür PA katı besiyerine yayılarak, 37°C'de 16-18 saat inkübe edildi. Alınan tek koloniler, her birinde 0.3 ml PA sıvı besiyeri bulunan 25 yuvalı baskı (replika) tabağına taşındı.

Baskı tabağı 37°C'de en az 3-4 saat inkübe edildikten sonra 25'lik baskı kalıbı ile baskı tabağından alınan kültürler bir seri antibiyotik ilave edilmiş, taze PA katı besiyeri bulunan petri kutularına ekildi. 24-48 saat, 37°C'de inkübasyona bırakıldı ve antibiyotik direnç eksilmesi ince-

lendi.

b) Hızlandırılmış direnç eksilmesi

PA katı besiyerine ekilmiş klinik izolat E.coli suşlarından alınan tek koloniler öze ile 2 ml PA sıvı besiyerine taşındı ve bir gecelik bakteri kültürü hazırlandı. Ertesi gün, aynı besiyeri ile sulandırılarak $10^4 - 10^5$ bakteri/ml hazırlanan 2 ml hücre kültürlerine ayrı ayrı akridin oranj (100 µg/ml) ve etidyum bromit (100 µg/ml) ilave edildi. 37°C'de bir gece büyütülen kültür gerek görüldüğünde 2-3 defa ilave sulandırma-inkübasyon işlemine tabi tutuldu. Bundan sonraki işlemler (a)'da anlatıldığı gibi yürütüldü.

8- Konjugal aktarım deneyinin yapılışı

Konjugasyon deneyi aşağıda verilen aşamalarda gerçekleştirilmiştir:

a) Alıcı ve vericilerin Pen Assay sıvı antibiyotik besiyerinde, pH 7.5, bir gecelik kültürleri hazırlandı.

b) Durgun büyüme noktasına ulaşan kültürlerden 0.1 ml alınıp 5 ml PA sıvı besiyerine konarak 1/50 oranında sulandırıldı, 37°C'de hiç sallamadan 1-2 saat inkübe edildi.

c) Alıcı ve bakteri kültürlerinden eşit miktar (1 ml) kültür karıştırıldı ve 37°C'de 1-2 saat çalkalayıcılı inkübatörde inkübe edildi.

d) Daha sonra inkübasyona oda sıcaklığında ve durgun şekilde 16-18 saat devam edildi. Böylece dirençliliğin alıcı ve verici arasında aktarımı sürerken, aktarılmış dirençliliğin alıcı bakteriler yoluyla yayılması minimuma indirildi. Direnç aktarımında alıcı suşlardan HfrC'nin oda sıcaklığında

ve durgun üreme şeklinde tam bir alıcı olduğu bilinmektedir.

e) Aktarım gösteren alıcılar suşlar (konjugatlar) seçici (selektif) katı besiyerinde şu şekilde seçildi: 0.1 ml çiftleştirilen kültürlerin karışımından alınarak PA katı besiyerine ekildi. Katı besiyerinin hazırlanmasında verici suşa uygulanan karşı-seçimde kullanılan antimikrobikler aşağıda verilen konsantrasyonda ilave edildi:

rifampisin	100 µg/ml
nalidiksik asit	100 µg/ml
sodyum azit	400 µg/ml

Alıcıya uygulanan karşı-seçimde, vericinin taşıdığı direnç esas alınarak kullanılan antibiyotikler tek veya çoğul olarak kullanıldı. Aktarım seçiminde, alıcı bakterinin yeni kazandığı direnç özelliğinin alıcının fizyolojik dengesi üzerindeki etkisini dikkate alarak antibiyotikler önce 20-30 µg/ml seviyesinde kullanıldı.

f) Aktarım gösteren rekombinant koloniler, her yuva içinde 0.5 ml PA sıvı besiyeri bulunan baskı tabağına tek tek taşındılar.

g) Baskı tabakları 37°C'de en az 3-4 saat inkübe edildikten sonra baskı kalıbıyla yapılan replika işlemiyle:

g.1) 100 µg/ml konsantrasyonunda selektif antibiyotik ilave edilen katı besiyeri bulunan petri kutularına taşınarak alıcının aktardığı direnç özelliğinin tek aşamalı yüksek antibiyotik direnci izlendi.

g.2) Aktarımı izlenen antibiyotik direnci dışında vericideki antibiyotik dirençlerden hangisinin birlikte aktarıldığını incelemek için alıcılar, vericinin dirençli oldu-

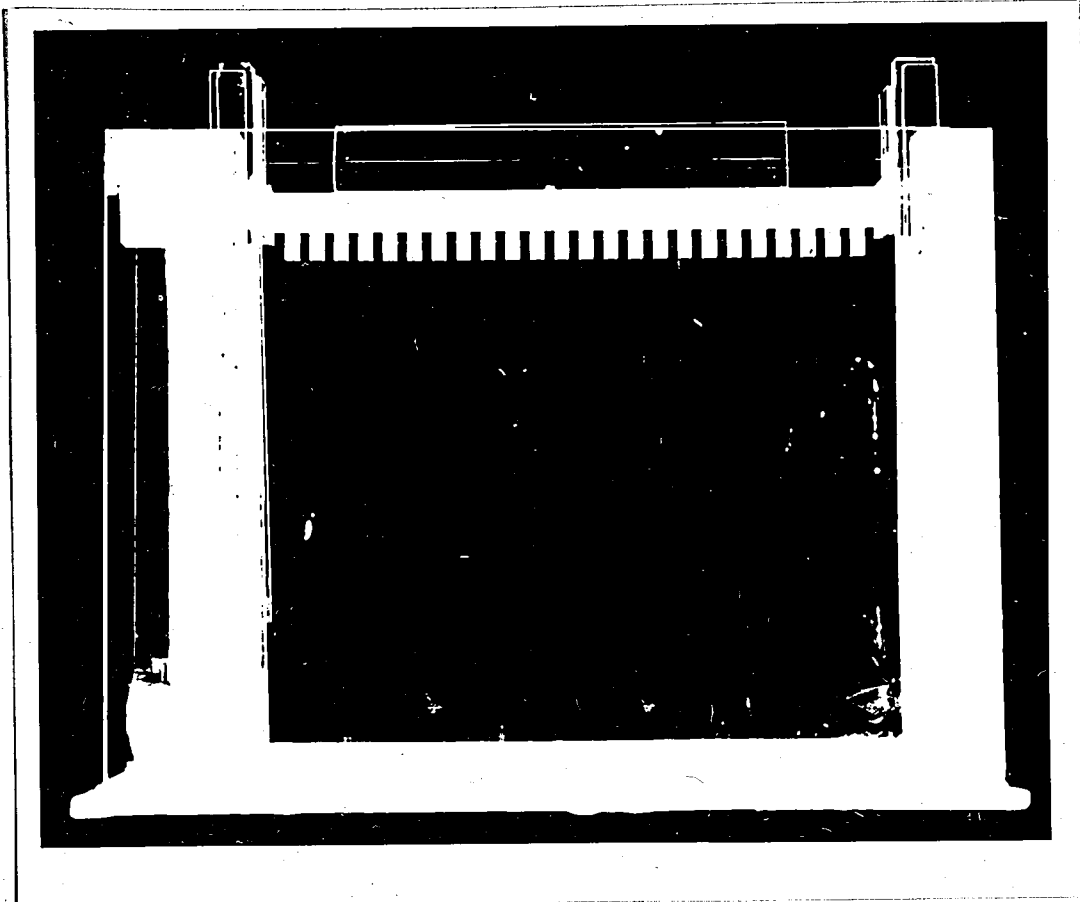
ğu diğer antibiyotiklerin ayrı ayrı ilâve edildiği (100 µg/ml) tabaklara basıldı.

9- Agaroz jel elektroforezi

Kullanılan yöntem Eckdart'ın(37) hafif değiştirilmiş yöntemidir.

a) Agaroz jelin hazırlanması:

a.1) Pleksiglastan yapılan bir elektroforez kutusu içinde iki cam levha (180 x 250 x 0.3 mm ve 210 x 250 x 3 mm) aralarında yaklaşık 6 mm aralık olacak şekilde sıkıştırıldı (Şekil 3).



ŞEKİL 3- Elektroforez kutusu ve cep tarağı

a.2) % 0.7 agaroz (60°C) iki cam levha arasına döküldü. Elektroforez kutusu yastıklama destek ile yaklaşık 60°C eğik şekilde yerleştirildi. Kısa olan ön camın üstüne 4 mm x 4 mm dişleri olan tarak yerleştirildi ve sıvı agaroz jelleşmeye bırakıldı.

a.3) Agaroz jelleşince tarak çıkarıldı ve tarak dişlerinin oturduğu yerlerde 4 mm x 4 mm x 8 mm'lik cepler oluştu.

a.4) Cepler, kalan tampon sıvısı alınarak, kurutuldu.

b) Plazmit DNAsının agaroz jelindeki ceplere yüklenmesi

b.1) Plazmit DNAsının hazırlanması.

b.1.1) Plazmit DNAsı kaynağı olarak klinik E.coli suşları kullanıldı. Dirençli oldukları antibiyotiklerden birinin ilâve edildiği PA katı besiyeri tabaklarında 24-48 büyüyen bakteri suşlarından 1-2 koloni ($10^7 - 10^8$ bakteri) daha önce sterilize edilen dibi düz bir kürdan ile toplandı.

b.1.2) Toplanan koloniler 30 λ T-E tamponu bulunan küçük bir tüpe taşındı ve hücre süspansiyonu hazırlandı.

b.1.3) Vortekslemeyle süspansiyon çalkalandı ve bakterilerin birbirinden ayrılması temin edildi.

b.2) Bakterilerin lize edilmesi ve ceplere yüklenmesi:

b.2.1) Bakteri süspansiyonu 30-60 saniye 50°C 'de ısıtıcıda bekletildi.

b.2.2) 10 λ lizozim (5 mg/ml) ilave edildi.

b.2.3) 50°C'de bekletilen I. ince agaroz karışımından 25 λ ilave edildi. Elde çalkalandı ve derhal 50 λ alınarak cebe konuldu. Kullanılan ince agaroz 35°C'de jelleşmektedir. Bunun için 50°C - 35°C arasında lizozimin bakteri hücre duvarını yıkması devam ederken aynı zamanda yapılacak diğer işlemler için yeterli zaman tanınmaktadır.

b.2.4) I. karışımın ceplere konulmasından hemen sonra, yine 50°C'de bekletilmekte olan SDS'li II. ince agaroz karışımından 50 λ alınarak I. tabakanın üzerine dikkatlice yerleştirilir. Hava kabarcıklarının olmamasına dikkat etmek gereklidir. Yaklaşık 10 dakika içinde ince agar katmanları jelleşmiş olacaktır.

b.2.5) Ceplerin üst boşluğu % 0.7 agaroz jeli (60°C) ile dolduruldu.

c) Elektroforez ve boyama işlemi

c.1) Ön ve arka hazneler ET ile dolduruldu.

c.2) Önce düşük akım (5 mA) verilerek elektroforeze başlandı.

c.3) 10-20 dakika sonra yani boya jele girmeye başladığı zaman 50-100 V Doğru-akım verildi.

c.4) Bromofenol boyası jelden çıkmak üzereyken akım kesildi. Agaroz jeli dikkatlice aparattan çıkarılarak plastik bir kaba taşındı.

c.5) 700-800 ml elektroforez tamponu içinde son konsantrasyonu 0.5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromit bulunan çözelti jelin içine konulduğu kaba ilave edildi.

c.6) Yaklaşık 2 saat sonra jel kabdan çıkarıldı ve UV kaynağının (C61 tipi, Ultraviolet Products, Inc.) üzerine yerleştirildi. 400 ASA film ve kırmızı filtre (Wratten 25) kullanarak jel üzerinde boyanan DNA bantlarının fotoğrafı çekildi.

Bu yöntemin yararlarını kısaca özetlemek gerekirse:

1- DNA analizi için gerekli materyalin miktarının az olmasıdır ve 1-2 koloni analiz için yeterlidir.

2- Analiz edilen materyalin ihtiva ettiği DNA fiziki bir baskı altında bulunmaksızın, taşıdıkları elektrik yüklerine ve büyüklüklerine göre ayrılırlar. Büyük olan en yavaş, en küçük olanı ise en hızlı şekilde yukarıdan aşağı hareket etmektedir.

3- 300×10^3 baz çifti ve daha küçük DNA moleküllerinin ayırımı mümkündür.

4- Kopya sayısı düşük plazmitlerin ayırımı ve analizi diğer yöntemler kullanıldığında hem güç ve hem de zaman almaktadır.

5- Hücre DNAsının jele girememesi, bu metodun plazmit DNAsı analizindeki önemini vurgulamaktadır.

6- Hazırlanan agaroz jelin üst bölümünde oluşturulan çok sayıdaki cepler, çok sayıda materyalin aynı zamanda, aynı şartlar altında mukayeseli olarak analiz edilmelerini mümkün kılmaktadırlar.

Agaroz jel elektroforezinde amaç, bakteri DNAsının ceplerde immobilize edilmesi ve sadece plazmitlerin jele girmeleri ve ayırımlarının yapılmasıdır.

Bozulmamış bakteri hücrelerinin ceplerde lize edilmesi sonucu bakteri DNAsı cepte kalır, zira hazırlanan jelin gözeneklerinden geçemeyecek kadar büyüktür (4500 baz çifti). Bu özelliği agaroz jel elektroforezinin bilinen iki karakteristiğinden birini oluşturmaktadır.

Önemli olmamakla birlikte diğer iyi bilinen bir karakteristiği de tüm örneklerde görülen ortak bir bantın varlığıdır. Bu bant tüm hücre DNAsının küçük bir kısmını temsil eden parçalanmış, lineer DNAdır. Hücrenin tampon içinde hazırlanması sırasında, vortekslleme işlemi sonucu parçalanmış hücrelerin veya kolonilerdeki ölü hücrelerin DNalarının parçalanmış fragmentleri jele girebilmektedir.

Analizi yapılan bakteri örneklerinin (I. ince agar karışımı) ceplere yerleştirilmesi karışımda sukrozun bulunması nedeniyle kolaylıkla yapılmaktadır. SDS'li II.inçe agar karışımının ilavesi ilkinin menisküsünü düzelterek elektroforezde ayrımın aynı noktadan başlamasını sağlamaktadır. Lizozim ceplerdeki bakterilerin hücre duvarını yıkar ve protoplastları oluşturur. Elektroforez başladığında, üst katmanda bulunan SDS en hızlı hareket eden küçük molekül olup, protoplastları deterjan etkisiyle parçalar. Açığa çıkan DNA(lar) elektroforetik alanda üstten(-) aşağıya (+) doğru hareket ederler.

C. BULGULAR

1- R-plazmitlerinde antibiyotik direnci eksilmesinin incelenmesi

Agaroz jel elektroforezi DNA analizi yöntemiyle (Şekil 4) plazmi taşıdıkları gözlenen çoğul dirençli klinik E.coli suşları (Tablo 4) arasından suşlar: 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 16, 17 ve 19 taşıdıkları antibiyotik direnci modeline, direnç seviyelerine (Tablo 4) ve jel-elektroforezinde görülen plazmit spektrumuna göre, tek bir plazmiti olanlar ile birden fazla plazmiti olanlar arasından seçildi (Şekil 4).

Gerek spontan, gerekse hızlandırılmış yöntemler kullanılarak izlenen direnç eksilmesi modellerinin incelenmesinden de anlaşılacağı gibi çoğu kez segregantlarda birden çok antibiyotik direnci birlikte eksilmektedir. R-plazmitinin iki ayrı direnç geninin birlikte mutasyona uğraması, 10^{-14} 'den de düşük bir olasılık taşımaktadır. Bu nedenle, direnç eksilmesinin bakteri popülasyonunda % 1-2'den fazla görülmesi ve geriye dönüşsüz (non-reversible) oluşu, direnç eksilmesinin, plazmit üzerindeki direnç genlerinin eksilme (delesyon) mutasyonu sonucu veya plazmit molekülünün kaybedilmesi şeklinde değerlendirilmesi için yeterli görüldü ve eksilme (delesyon) olarak değerlendirildi.

Segregantlarda görülen direnç eksilmesi modellerinin

incelenmesi sonucu plazmit direnç genlerinin en uygun lineer haritalanması yapıldı (Tablo 5). Suş 3, 6, 10, 13, 17 ve 19'un eksilme modellerinde A direncini kaybeden segregantların yine de P direncine sahip olmaları, ayrıca konjugatlardaki direnç modelinde A direncini aktardığı görülen konjugatın P direncini aktarmamış olması, penisilin ve ampisilin dirençliliklerinin iki ayrı gen (P ve A) olarak gösterilmesini gerektirdi.

Direnç eksilmesi gösteren suş 5 ve 6'nın tüm segregantları antibiyotik direnci eksilmesinin geri-dönürlülüğü bakımından birlikte incelendi.

Tüm segregantlar içinde akridin oranj (100 µg/ml) ve etidyum bromit (100 µg/ml) ilave edilen PA sıvı besiyerinde 16-18 saat 37°C'de çalkalanarak üretildi. 0.2 ml (10^9 bakteri/ml) segregant kültürleri, segregantların direncinin eksildiği bilinen antibiyotik(ler)in 20 ve 100 µg/ml miktarda ilave edilmesiyle hazırlanan, PA katı besiyerine ekildi ve 72 saat 37°C'de inkübe edildi. Segregantlardan hiçbirinin eksilen direnç(ler)ini yeniden kazanmadığı görüldü. Bu sonuçların doğrultusunda klinik suşların, en azından suş 5 ve suş 6'nın eksilen antibiyotik direnç genlerinin R-plazmitleri üzerinde taşındığı düşünüldü.

Uygulanan lineer haritalanma değerlendirmelerine örnek olarak suş 3'ün direnç eksilme modeli aşağıda verilmiştir.

Tablo 5'de görüldüğü gibi Suş 3'ün direnç eksilme modeli, kendi içinde uyumlu olup, direnç genlerinin lineer haritalanması için yeterli bilgiyi sağlamaktadır. En küçük direnç eksilmesi olarak ikili TC ve AT kaybı görüldü. Bu iki eksilme birlikte dikkate alındığında; A ve C genlerinin T nin iki ayrı tarafında haritalandığı anlaşılmaktadır.

PAT ve ATC üçlü eksilmeleri AT yi içerdigine göre genlerin sırası PATC dir. Ayrıca, PATC ve ATCS dörtlü direnç eksilmeleri genlerin sırasını tamamlamaktadır.

P A T C S

Suş 3'de bulunan plazmit direnç genlerinin sırası yukarıdaki bilgilerin ışığı altında PATCS olarak düşünülmüştür.

Direnç kaybı analizi yapılan 11 suştan sadece üçü, suş 3, 6 ve 13 gerek spontan olarak, gerekse akridin oranj ve etidyum bromit muamelesi sonucu tüm direnç genlerini kaybetmişlerdir.

Suş 5'in yalnız etidyum bromit muamelesiyle, suş 8'in ise akridin oranj ve etidyum bromit muamelesi sonucu S dışında diğer direnç karakterlerini kaybettikleri görülmektedir. Suş 9 yalnız akridin oranj muamelesiyle sadece tetrasiklin(T) direncini kaybettiği halde, suş 16'da hiçbir şekilde direnç kaybı görülmedi.

Suş 10, 11, 17 ve 19'da plazmit antibiyotik direncinin kısmen ve çeşitli modellerde ortaya çıktığı görüldü. Direnç eksilmesi sonuçları yalnız suş 3 ve 6'nın plazmit antibiyotik direnç genlerinin lineer haritalanmasını gerçekleştirecek yeterlidir. Diğer suşlardan elde edilen sonuçlar ilerde konjugal direnç aktarımı modelleriyle birlikte tekrar ele alınacaktır.

TABLO 4- Bu çalışmada kullanılan E.coli suşlarının dirençlilik seviyeleri

a) Klinik E.coli suşlarında bulunan dirençlilik seviyeleri

Suşlar	Penisilin G	Ampisilin	Tetrasiklin	Kloramfenikol	Streptomisin	Kanamisin	Genetik Özellikler			Bulunan Antibiyotik Direnç Modeli
							Lac	Azit	Nal	
							+/-	300	20	
1	100R-200S	100R-200S	5S	150R	5S	5S	+	R	S	PAC
2	100R-200S	100R-200S	5S	150R	5S	5S	+	S	S	PAC
3	2000R	2000R	2000R	150R	2000R	5S	+	S	S	PATCS
4	2000R	2000R	100R-200S	150R	500R-1000S	5S	+	S	S	PATCS
5	2000R	2000R	500R-1000S	150R	1000R-2000S	500R-1000S	+	S	S	PATCSK
6	200R-500S	100R-200S	100R-200S	150R	5S	5S	+	S	S	PATC
7	2000R	2000R	100R-200S	150R	100R-200S	5S	+	S	S	PATCS
8	500-1000R	100-200R	500R-1000S	150R	2000R	5S	-	S	S	PATCS
9	2000R	2000R	2000R	150R	500R-1000S	2000R	+	S	S	PATCSK
10	500R-1000S	100R-200S	100R-200S	150R	200R-500S	5S	-	S	S	PATCS
11	2000R	2000R	100R-200S	150R	500R-1000S	100R-200S	-	S	S	PATCSK
12	2000R	2000R	500R-1000S	150R	500R-1000S	5S	+	S	S	PATCS
13	500R-1000S	100R-200S	100R-200S	150R	5S	5S	+	S	S	PATC
14	2000R	2000R	100R-200S	150R	200R-500S	5S	-	S	S	PATCS
15	2000R	2000R	5S	150R	500R-1000S	1000R-2000S	+	S	S	PACSK
16	2000R	2000R	2000R	150R	200R-500S	5S	+	S	S	PATCS
17	500R-1000S	100R-200S	500R-1000S	150R	200R-500S	5S	+	S	S	PATCS
18	2000R	2000R	500R-1000S	150R	500R-1000S	5S	+	S	S	PATCS

19	2000R	100R-200S	100R-200S	150R	5S	5S	+	S	S	PATC
20	200R-500S	200R-500S	100R-200S	500R-1000S	100R-200S	1000R-2000S	+	S	S	PATCSK
21	100R-200S	500R-1000S	100R-200S	150R-200S	100R-200S	5S	+	S	S	PATCS
22	100R-200S	200R-500S	100R-200S	150R-200S	5S	5S	+	S	S	PATC
23	2000R	200R	100R-200S	150R-500S	5S	5S	+	S	S	PATC
24	2000R	200R	100R-200S	150R-500S	100R-200S	1000R-2000S	+	S	S	PATCSK

b) E.coli K12 laboratuvar suşlarında bulunan dirençlilik seviyeleri

594 F ⁻ R ⁻	5S	5S	5S	5S	50R-100S	5S	-	S	S	str
C600 F ⁻ R ⁻	20R-50S	5S	5S	5S	50R-100S	5S	-	S	S	pen str rif
βpst	5S	5S	500R-1000S	5S	200R-500S	5S	+	R	S	T str
β ₁	5S	5S	5S	5S	200R-500S	5S	+	R	S	str
RL108	5S	5S	50R-100S	5S	5S	5S	-	R	S	tet rif
K37	5S	5S	5S	5S	20R-50S	5S	+	S	S	str
HfrC	5S	5S	5S	5S	5S	5S	+	S	S	-

Not: a) E.coli suşlarının direnç testi uygulanan 6 antibiyotige karşı plazmit dirençlerinin tanımında antibiyotikler PA katı besiyerine 0,5,10,20,50,100,200,500,1000 ve 2000 µg/ml konsantrasyonda ilâve edildi. Kloramfenikol ise sadece 0-25-50-150 µg/ml konsantrasyonda kullanıldı. b) Na-azit, nalidiksik asit ve rifampisin tabloda verilen konsantrasyonda kullanıldı. c) Direnç seviyesinin 20 µg/ml'den fazla olması halinde dirençli (R), daha düşük olması halinde duyarlı (S) işaretleri kullanılmıştır. Bulunan dirençliliklere göre direnç modelleri verilmiştir. d) Antibiyotik direncinin gösterilmesinde duyarlı oldukları en küçük ve dirençli oldukları en büyük konsantrasyonlar birlikte verilmiştir. e) Verilen direnç modeli, suşların tabloda verilen antibiyotik sırasına göre dirençli oldukları antibiyotik dirençliliklerini anlatmak için gösterilmiş olup, direnç genlerinin haritalanmalarıyla ilgili değildir. f) Kromozomal antibiyotik direnç modeli ilk üç küçük harflerle gösterilmiştir.

TABLO 5- Antibiyotik direnç eksilme modeline göre R-plazmitlerinin direnç genlerinin lineer genetik haritalanması

<u>Suşlar</u>	<u>Eksilme Kapsamı</u>	<u>Eksilme Oranı</u>	<u>Yapılan Muamele</u>
3	P A T C S		
	— — —	26/200 18 6	Spontan
	— — — — —	11/200 16 11 20 29	AO-100
	— — — — — —	5/100 15 10 5 3 4	EB-100
5	T [(PA) [(KC) S]]		
	— —	-/100 2/100 3	Spontan AO-100
	— — — —	1/100 6 22 7	EB-100
6	P C A T		
	— — — —	4/100 3 3 3	Spontan
	— — —	8/100 19 8	AO-100
	— — — — —	6/100 3 5 1 4	EB-100

<u>Suşlar</u>	<u>Eksilme Kapsamı</u>	<u>Eksilme Oranı</u>	<u>Yapılan Muamele</u>
8	$\overline{T}(A P)\overline{C} S$		
	—	3/100	Spontan
	—	1/100	AO-100
	—	2	
	—	5	
	—	14	
	—	2/100	EB-100
	—	8	
	—	9	
9	(P,A,T,K,S,C)		
	—	-/100	Spontan
	—	38/100	AO-100
	—	-/100	EB-100
10	P A T($\overline{S C}$)		
	—	12/100	Spontan
	—	-/100	AO-100
	—	7/50	EB-100
	—	4	
	—	4	
	—	3	
11	$\boxed{(P,A,T)} \boxed{(K,S)C}$		
	—	-/100	Spontan
	—	-/100	AO-100
	—	7/100	EB-100
	—	3	
	—	5	
	—	3	
	—	23	

<u>Suşlar</u>	<u>Eksilme Kapsamı</u>	<u>Eksilme Oranı</u>	<u>Yapılan Muamele</u>
13	$P(A \ C) \bar{T}$		
	—	5/100	Spontan
	—	4	
	—	1	
	—	6	
	—	5	
	—	5/100	AO-100
	—	19	
	—	3	
	—	7	
	—	6/100	EB-100
	—	3	
	—	14	
	—	3	
	—	4	
	—	12	
16	(P, A, T, S, C)		
		-/100	Spontan
		-/175	AO-100
		-/100	EB-100
17	$P \ A \ S(\bar{T}, \bar{C})$		
		-/100	Spontan
	—	82/100	AO-100
	—	111/150	EB-100
	—	5	
	—	10	
	—	8	

<u>Suşlar</u>	<u>Eksilme Kapsamı</u>	<u>Eksilme Oranı</u>	<u>Yapılan Muamele</u>
19	$\overline{P}$ (A Q T)		
	—	3/100	Spontan
	—	3	
	—	3/100	AO-100
	—	6/100	
	—	5/100	
	—	15	
	—	15	
	—	2	

-
- (a) Klinik suşların R-plazmiti üzerinde taşıdıkları antibiyotik direnci genleri aşağıdaki şekilde gösterilmiştir:
P: penisilin, A: ampisilin, T: tetrasiklin, K: kanamisin, S: streptomisin, C: Kloramfenikol
- (b) Lineer haritalanma direnç eksilme modeline en uygun görülen sırada verilmiştir.
- (c) Gen dizisi hakkında yeterli bilginin bulunmadığı durumda plazmit direnç genleri arasına virgül (,) konulmuştur.
- (d) Sırası belli bir grup gene nazaran, hangi uçta lokalize olduğu kesin olarak saptanamayan gen(ler)in üstü çizilmiştir. Bu çizgi ile anlatılmak istenen; gen(ler)in her iki uçtan birinde bulunabileceğidir.
- (e) Aynı bölgede grup olarak haritalandıkları verilerle belirlendiği halde, grup içi gen dizisi hakkında yeterli bilginin olmadığı durumlarda genler parantez içinde gösterilmiştir.
- (f) Direnç kaybı gösteren segregantların kardeş olabilme olasılığı nedeniyle % oranı verilmemiştir.

2- R-plazmitlerinin direnç genlerinin aktarımının ince- lenmesi (Konjugasyon)

Klinik E.coli suşlarının, alıcı E.coli $\beta_1(F^-R^-r^-m^-)$ ve E.coli HfrC (HfrR⁻r⁻m⁻)'a taşıdıkları direnç genlerini aktarım modelleri incelendi (Tablo 6). Alıcılardan birincisi (F⁻), taşıdığı pBR322Gplazmitini spontan olarak kaybetmiş ve de rifampisin direnci geliştirilmiş β pst türevidir. İkincisi (Hfr), nalidiksik asite (200 μ g/ml) dirençli olarak seçilmiş bir HfrC türevidir. Her iki alıcı bu çalışma sırasında yapılmış olup, DNA analizleri Şekil 6, kolon 16, 17 ve Şekil 7, kolon 4, 2'de görülmektedir.

Klinik suşların direnç aktarımlarının incelenmesinde özellikle birden fazla antibiyotik üzerinde seçim yapılmıştır. Direnç aktarım modellerine göre en uygun lineer gen haritalaması yapılmıştır. Plazmit replikasyon genlerinin lokali araştırılmıştır.

Aktarımı incelenen 24 klinik suşun hepsinin dirençliklerini β pst(F⁻R⁻r⁻m⁻)'a aktardıkları görülürken, verici suş 1, 2, 3, 15 ve 22'nin dışındakilerin direnç genlerini ikinci alıcı suş HfrC(HfrR⁻r⁺m⁺)'a aktardıkları görülmektedir. Suş 1'in alıcı β_1 'e yalnız C genini aktarması, plazmitin replikasyonu için gerekli genlerin plazmitin C lokalinde olduğunu gösteren bir kanıt oluşturmıştır. Lokal bölge ile söz konusu geni içine alan ve iki tarafında bulunan komşu genlere kadar olan bölge anlatılmak istenmiştir.

Plazmit DNAsı üzerinde, replikasyon için gerekli genlerin lokalizasyonunu tayin etmek için, plazmit dirençlerinin kaybedilme modelleri ile aktarım modellerinin birlikte değerlendirilmiştir. Plazmitlerin replikasyonu için gerekli genler direnç eksilmesinde geride kalan veya aktarımı görülen, en küçük, ortak plazmit segmenti üzerindedirler.

Suş 3'de ortak segmentin C lokalinde olduğu ve P'ye kadar uzandığı aktarım ve eksilme sonuçlarından görülmekte olup, karşılaştırmalı değerlendirme sonraki bölümde verilecektir. Suş 3'ün konjugal PC ve CTA replikonları P ve A'nın iki ayrı gen olduğunu göstermektedir. CTA replikonuyla ampisilin dirençliliğini veren A geni $F^-(r^-m^-)$ 'a aktarıldığı halde penisilin dirençliliği veren P geninin aktarılmadığını; PC replikonu, P geni aktarıldığı halde A geninin aktarılmadığını göstermektedir.

Suş 4'ün plazmit dirençlilik karakterlerinin F^- ve Hfr'ye aktarım modelleri incelenerek plazmit direnç genlerinin CPATS lineer haritalaması gösterilmiştir. Suş 4'te plazmit replikasyon genlerinin C ve P genleri arasındaki bölgede olduğu sonucu çıkarılmıştır.

Suş 8'de S geninin aktarımı izlenmemiştir. S dışında diğer direnç genlerinin plazmit DNAsı üzerindeki sırası, F^- alıcıya aktarılan CP, PA ve PAT replikonlarına dayanarak CPAT şeklinde gösterilmiştir. Bu durum da CT genlerinin birlikte aktarımı lineer haritanın çembersel olarak gösterilmesini mümkün kılmaktadır. Suş 8'in DNA analizinde tek bir plazmit molekülü taşındığına ve S geni aktarımı olmayan ayrı bir plazmit üzerinde olmadığına göre; direnç kaybı görülmeyen S geninin kromozomal olduğu düşünülmüştür.



S (olası kromozomal)

Diğer suşların direnç genlerinin aktarım modelleri, aynı değerlendirmelerin ışığı altında incelenerek haritalamaları yapılmıştır (Tablo 6). Direnç kaybı ve direnç aktarımı sonuçları daha sonra birlikte değerlendirilecektir.

TABLO 6- Konjugatlarda görülen plazmit direnci aktarımı

<u>Suş No</u>	<u>Aktarılan Direnç</u>	<u>Alıcı Bakteri</u>	<u>Olası Replikasyon Genleri Lokali</u>
1	(P, A) C X	F ⁻	C
2	P(A, C) X X	F ⁻	P-(A/C)
3	P C(T, A) S X X X	F ⁻	C-P
4	C P A T S X X X X X	F ⁻ Hfr	C-P
5	[T (P, A)] (K C S) X X X X X X	F ⁻ Hfr	P/A

<u>Suş No</u>	<u>Aktarılan Direnç</u>	<u>Alıcı Bakteri</u>	Olası Replikasyon Genleri <u>Lokali</u> P/C
6	T(P, C)A x x x x x x x x	F ⁻ Hfr	
7	[(P A) C] $\bar{T}$ S x x x x x x x x	F ⁻ Hfr	P-A
8	C P A T S x x x x x x x x	F ⁻ Hfr	<u>P</u>

<u>Suş No</u>	<u>Aktarılan Direnç</u>	<u>Alıcı Bakteri</u>	<u>Olası Replikasyon Genleri Lokali</u> P/A
9	C T(P, A)K S x x x x x x x x x x	F ⁻ Hfr	
10	$\bar{S}$ C P A T x x x x x x x	F ⁻ Hfr	P ₋
11	$\bar{S}(C, P, A)T K$ x x x x x x x	F ⁻ Hfr	(CPA)
12	S C P A T x x x x x x x	F ⁻ Hfr	C_P

Olası
Replikasyon
Genleri
Lokali

Suş No

Aktarılan Direnç

Alıcı
Bakteri

C-(APT)

13

C(A, P, T)

x ———
— x ———
x ———

F⁻

Hfr

14

$\bar{S}$ C(P, A, T)

x ———
— x ———
x ———
x ———

F⁻

Hfr

C₂(PAT)

15

C(P A)K S

——— x
x ———
x ———

F⁻

C-(PA)

16

S C P A T

——— x
——— x
x ———
x ———
x ———
x ———
x ———
x ———
x ———

F⁻

Hfr

C-P

17

$\bar{S}$ C P A $\bar{T}$

x ———
x ———
x ———
x ———
x ———
x ———
x ———
x ———
x ———

F⁻

Hfr.

P

<u>Suş No</u>	<u>Aktarılan direnç</u>	<u>Alıcı Bakteri</u>	<u>Olası Replikasyon Genleri Lokali</u>
18	C(P, A)T $\bar{S}$ $\begin{array}{c} \text{---x---} \\ \text{---x---} \\ \text{---x---} \\ \text{---x---} \\ \text{---x---} \end{array}$	F^- Hfr	C_(PA)
19	(P, A, C) $\bar{T}$ $\begin{array}{c} \text{---x---} \\ \text{---x---} \\ \text{---x---} \end{array}$	F^- Hfr	(PAC)
20	$\bar{C}$ (P, A) ($\bar{T}$ K S) $\begin{array}{c} \text{---x---} \\ \text{---x---} \\ \text{---x---} \\ \text{---x---} \end{array}$	F^- Hfr	C-(PA)
21	S C(P, A)T $\begin{array}{c} \text{---x---} \\ \text{---x---} \\ \text{---x---} \\ \text{---x---} \\ \text{---x---} \\ \text{---x---} \end{array}$	F^- Hfr	C-(PA)
22	(C, P, A) $\bar{T}$ $\begin{array}{c} \text{---} \\ \text{---} \end{array}$	F^-	(CPA)

<u>Suş No</u>	<u>Aktarılan Direnç</u>	<u>Alıcı Bakteri</u>	<u>Olası Replikasyon Genleri Lokali</u>
23	$\overline{C(P, A)T}$		$C-(PA)$
	---^*	F^-	
	$^*\text{---}$		
	---	Hfr	
24	$[C(P, A)T] \overline{S} K$		C_P
	---^*	F^-	
	$^*\text{---}$		
	---^*	Hfr	
	$^*\text{---}$		
	---^*		

- (a) Direnç genleri arasındaki ilişkiyi ifade etmek için kullanılan işaretlemeler Tablo 5'de açıklandığı gibidir.
- (b) Aktarılan direnç genlerinin gösterilmesinde seçici antibiyotik (x) işareti ile belirtilmiştir.
- (c) Aktarımı görülen bir tip dirençliliği gösterenlerin kardeş konjugatlar olabilirliği nedeniyle seçilen konjugatların sayıları verilmemiştir.
- (d) Genlerin sıralanmasında direnç eksilmesi verileri de dikkate alınmıştır. Ancak yapılan değerlendirmeler aktarım verilerine dayanmaktadır.
- (e) Olası replikasyon genlerinin lokalinin belirtilmesinde kullanılan işaretlemeler:
- $\underline{P}$: P geni lokalinde
- $\underline{P}_C$: P ve C genleri lokalinde
- $\underline{P/A}$: P ve genleri arasında
- () : sırası saptanamayan genler olarak ifade edilmiştir.

3- R-plazmitlerinin DNA analizi

Çoğul antibiyotik direnci gösteren tüm klinik E.coli suşlarının DNA analizi Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi agaroz jel elektroforezi yöntemiyle yapıldı.

Bakteri DNAsı jel ceplerinde immobilize edilmiştir. Ceplerin hemen altında bakterilerin büyük plazmitler görülmektedir. Biraz aşağıda ise, tüm örneklerde ortak olarak görülen ve aynı noktaya kadar hareket eden, bakteri DNAsının parçalanma ürünü olan lineer DNA görülmektedir. Parçalanma ürünlerinden sonra, hızlı hareket eden küçük plazmitlerin DNAsı görülmektedir.

Tüm suşların en az bir büyük plazmit taşıması suşlarda tespit edilen yüksek seviyedeki antibiyotik dirençlerinin (Tablo 4) plazmit karakteri olduğunu desteklemekte olup, bir kısmında tek bir, diğerlerinde de en az iki küçük plazmit görülmüştür (Şekil 4). Bunun önemi ileride tartışılacaktır.

Suşlarda bulunan antibiyotik direnç genleri modeline, dirençlilik seviyelerine ve taşıdıkları plazmit sayısına göre suş 5, 6 ve 13 seçilmiş ve bu suşlar, tüm direnç genlerini kaybeden segregantlarıyla birlikte, plazmit DNA analizinde kullanılmıştır.

Suş 5 ve tüm dirençlerini kaybeden 6 segregantı, suş 6 ve tüm dirençlerini kaybeden 5 segregantı birlikte analiz edildi (Şekil 5). Kontrol olarak C600 ve RL108 laboratuvar suşları kullanıldı.

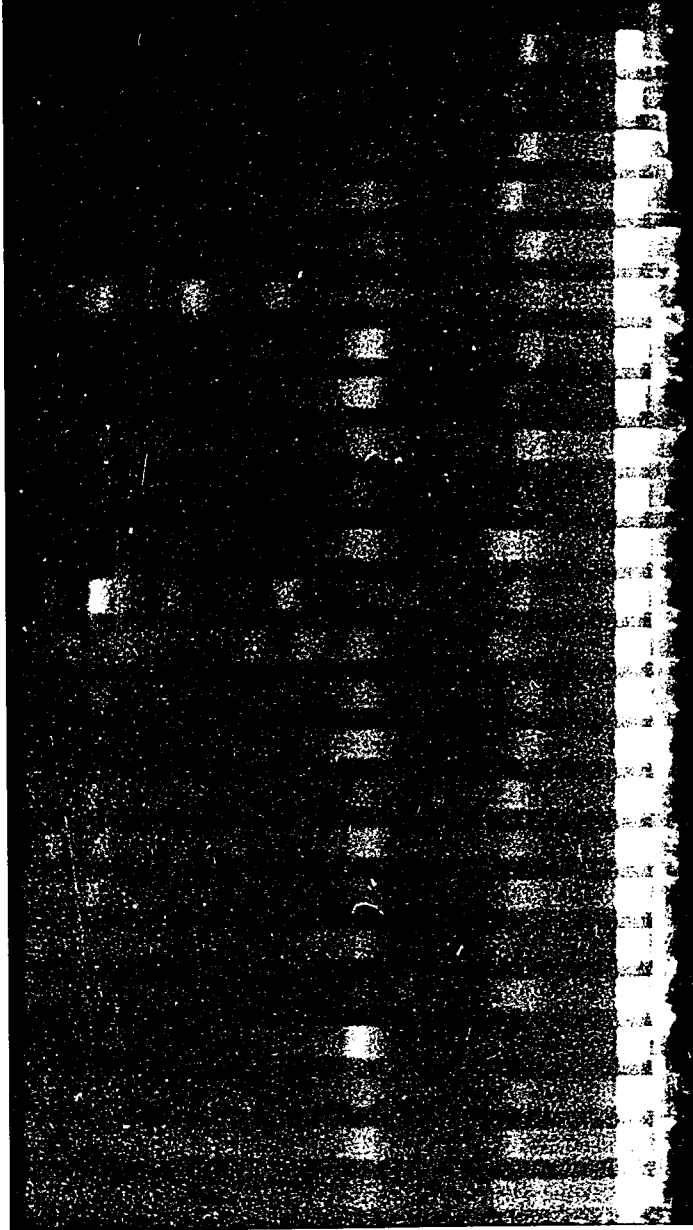
Kontrol olarak kullanılan C600 (F^-R^-) kolonunda görülen bant parçalanmış DNAYı göstermektedir. Bunun yanındaki kolon, RL108(F^+R^-) suşunun DNA analizinde F faktörü görülmektedir.

Jel cepleri ve
Bakteri DNAsı

Büyük plazmitler

Bakteri DNAsı
parçalanma
fragmentleri

Küçük
plazmit DNAları



Suşlar	Taşınan direnç*
1	PAC
2	PAC
3	PATCS
4	PATCS
5	PATCSK
6	PATC
7	PATCS
8	PATCS
9	PATCSK
10	PATCS
11	PATCSK
12	PATCS
13	PATC
14	PATCS
15	PACSK
16	PATCS
17	PATCS
18	PATCS
19	PATC
20	PATCSK
21	PATCS
22	PATC
23	PATC
24	PATCSK

ŞEKİL 4- 24 klinik izole E.coli suşlarının DNA analizi.

* Suşların 6 antibiyotiğe karşı dirençlilikleri test edilmiştir (Tablo 4). Taşıdıkları dirençler aynı sırada gösterilmiş olup, özel bir anlamı içermemektedir. Kloramfenikol (C) hariç, diğer antibiyotikler baş harfleriyle gösterilmiştir.

Şekil dikkatlice incelenirse suş 5'in iki büyük plazmit taşıdığı görülecektir. Birinci plazmitin RL108(F⁺)'in taşıdığı F-faktörü ile aynı noktaya kadar hareket ettiği görülmektedir. Birincinin biraz altında hafif boyanma gösteren ikinci plazmit görülmektedir. Etidyum bromit muamelesi sonucu direnç kaybı gösteren altı suş 5 segregantlarının birinci büyük plazmiti taşıdıkları ikinci plazmiti taşımadıkları görülmüştür.

Suş 6 ve taşıdığı tüm dirençleri kaybetmiş beş segregantın DNA analizinde, segregantların hepsinde suş 6'da görülen üç küçük plazmitin kaybolduğu ancak F-faktörü büyüklüğündeki plazmitin segregantlarda da bulunduğu tespit edilmiştir.

Her iki suşun taşıdıkları F-faktörü büyüklüğündeki plazmit DNA'sının önemi araştırıldı. Bu amaçla, suş 5 ve suş 6'nın analizi yapılan segregantlarından birer tanesinin (Şekil 5, Kolon 2 ve Kolon 9), taşıdıkları bilinen (azi-r lac⁺) genlerini alıcı C600 (F⁻R⁻rif-r str-r suşuna aktarıp aktarmadıkları konjugasyonla araştırıldı. Rifampisin (100 µg/ml) ve Na-azit (400 µg/ml) ilave edilen Mac Conkey katı besiyerinde yapılan seçimde segregantların seçici işaretlerini sırasıyla 4×10^{-7} ve 8×10^{-7} hızda vericiye aktardıkları tespit edilmiştir.

DNA analizleri ve konjugasyon sonuçları birlikte tüm antibiyotik dirençlerini kaybeden suş 5 ve suş 6 segregantlarında kaybolduğu görülen plazmitlerin R-plazmitleri olduğunu ve her ikisinde de F-faktörünün bulunduğunu kanıtlayan bulguları oluşturmaktadır.

Suş 13'ün spontan olarak, akridin oranj ve etidyum bromit muamelesiyle elde edilen, tüm antibiyotik dirençlerini kaybettikleri görülen, segregantlarının DNA analizi Şekil 13' de verilmektedir. Klinik suş 13 ile birlikte, 594, β pst, β_1 , HfrC ve C600 E.coli suşları kontrol olarak kullanılmıştır.

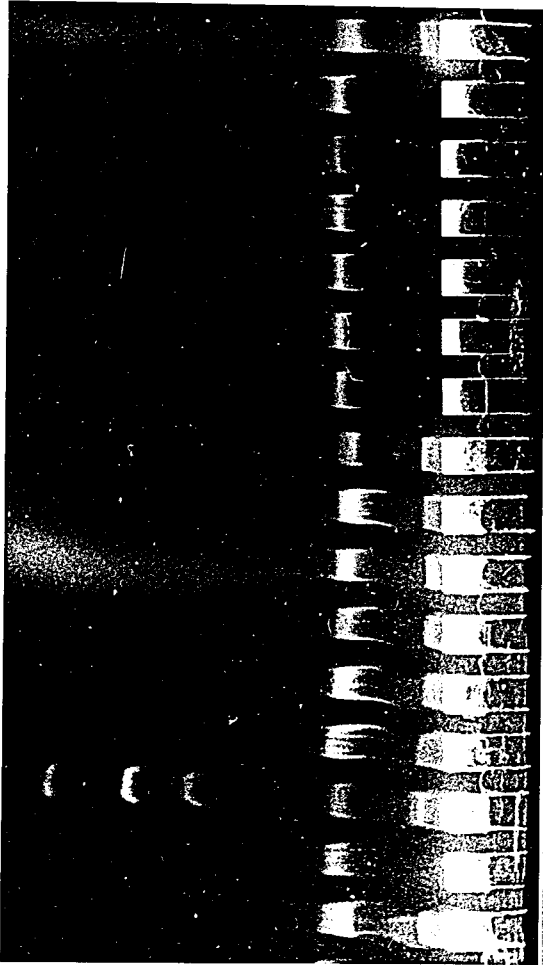
Küçük plazmit
DNAları

Bakteri DNAsı
parçalanma
fragmentleri

Jel cepleri ve
Bakteri DNAsı

Suşlar

Testedilen
taşınan direnç



1 Suş 5	PATCSK
2 EB seg 5	-
3 EB seg 5	-
4 EB seg 5	-
5 EB seg 5	-
6 EB seg 5	-
7 EB seg 5	-
8 suş 5	PATCSK
9 sp seg 6	-
10 A0 seg 6	-
11 A0 seg 6	-
12 A0 seg 6	-
13 A0 seg 6	-
14 suş 6	PATC
15 C 600 (F ⁻ R ⁻)	str-r
16 RL 108 (F ⁺ R ⁻)	tet-r

ŞEKİL 5- Suş 5 ve suş 6 nın segregantlarının, kontrol suşlarıyla birlikte DNA analizi

Kullanılan kısaltmalar: sp seg : spontan segregant

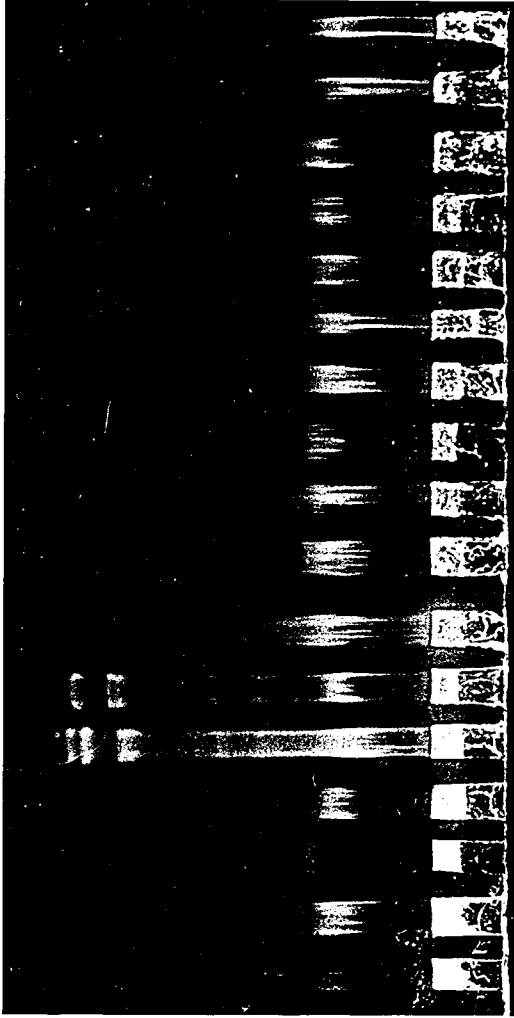
A0 seg : akridin oranj muamelesiyle elde edilen segregant

EB seg : etidyum bromit muamelesiyle elde edilen segregant

Küçük plazmit
DNAları

Bakteri DNAsı
parçalanma
fragmentleri

Jel cepleri ve
bakteri DNAsı



PBR322G
Plazmiti

Suşlar	Bulunan direnç
1. sp.seg	-
2. sp.seg	-
3. sp.seg	-
4. AO seg	-
5. AO seg	-
6. AO seg	-
7. AO seg	-
8. EB seg	-
9. EB seg	-
10. EB seg	-
11. EB seg	-
12. Suş 13	PATC
13. Suş 13	PATC
14. 594 (F ⁻ R ⁻)	str-r
15. βpst (F ⁻ R ⁺)	str-r, T
16. β ₁ (F ⁻ R ⁻)	str-r rif-r
17. HfrC (R ⁻)Nal	nal-r

ŞEKİL 6- Suş 13 ve segregantlarının kontrol olarak kullanılan laboratuvar suşlarıyla birlikte DNA analizi.

Kullanılan kısaltmalar: sp.seg: spontan segregant, AO seg: Akridin oranj muamelesiyle elde edilen segregant, EB seg: Etidyum bromit muamelesiyle elde edilen segregant.

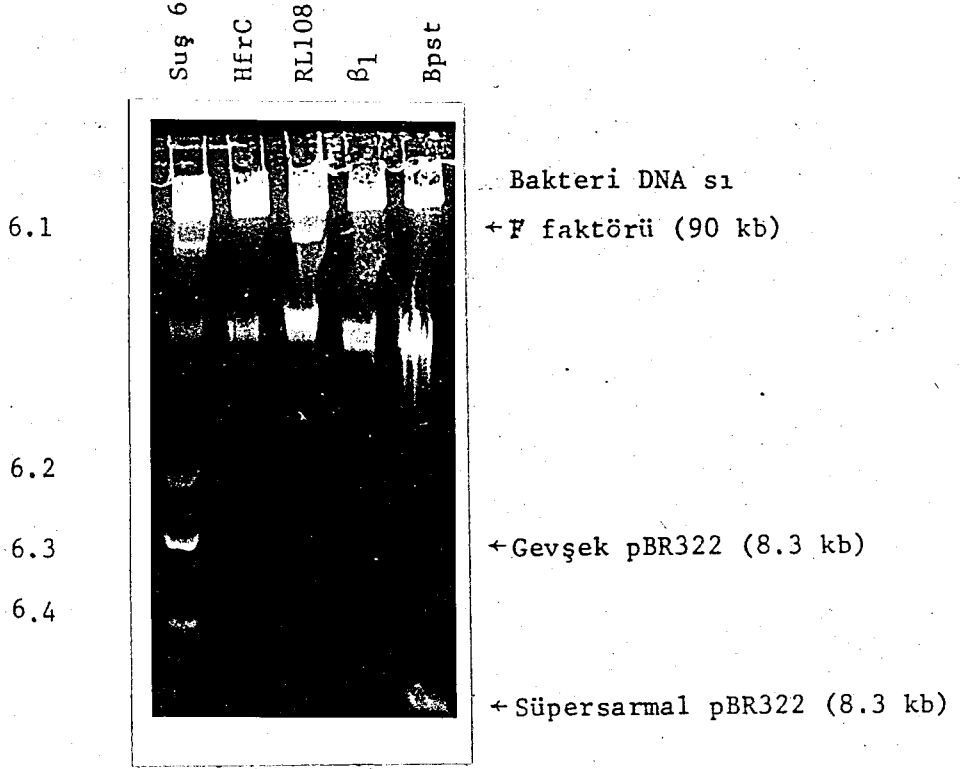
Suş 13'ün DNA analizinde (kolon 12, 13) küçük plazmitlerin ayırımı yapılmış olmakla beraber, daha önce incelendiğinde gözlenmiş olan büyük plazmit molekülünün (Şekil 6, kolon 13) henüz jele girmediği görülmüştür.

Tüm dirençlerini kaybetmiş 11 segregantın DNA analizinde küçük plazmitlerin kaybedildiği gözlenmiştir.

Kontrol olarak kullanılan laboratuvar suşlarından β_1 , β pst'in plazmit üzerinde taşındığı bilinen tetrasiklin direncini spontan olarak kaybeden bir türevi olarak bu çalışmada seçilmiştir. β pst suşunun taşıdığı pBR322G (İnsan globin geni taşıyan) "yeni-bileşim" plazmit (8.3 kilobaz) en alt uçta hafif boyanmış şekilde görülmektedir. β_1 suşunda plazmitin bulunmaması genetik seçimin doğruluğunu kanıtlamıştır. β_1 suşu, konjugasyon çalışmalarında alıcı olarak kullanılmıştır.

Klinik suşlarda taşındığı yukarıda gösterilen (Şekil 4) plazmitlerin molekül büyüklüklerini saptamak için RL108(F⁺)'ın F-faktörü (90 kb)(123) ve β pst suşunda bulunan pBR322G plazmiti (8.3 kb)(124) referans DNA molekülleri olarak alındı. RL108, β pst ve suş 6 tarafından taşındığı bilinen dört plazmitin DNA elektroforezi kontrol suşlarıyla birlikte yapıldı (Şekil 7).

F-faktörü ve pBR322G plazmitlerinin Log molekül ağırlık değerlerinin, Log Rf(mobilité) karşı çizimiyle elde edilen doğru üzerinden suş 6 plazmitlerinin Rf değerlerine karşılık molekül ağırlıkları, sırasıyla yaklaşık 80 kb; 14 kb; 12 kb ve 10 kb olarak bulundu (Bulunan değerler, sadece iki referans DNA'nın kullanılması ve agaroz jelinde örnek kolonlarının eşitsizliği nedeniyle % 20-30 oranında sapma beklenebilir. pBR322G plazmitinin biraz üstünde hafif boyanmış ikinci bir plazmit DNA bantı görülmektedir. Bu bantın gevşek plazmit DNAsı olduğu düşünülmüştür(83).



ŞEKİL 7- Suş 6 (R^+), RL108 (F^+), β_{pst} (pBR322) ve kontrol olarak β_1 (F^-R^-), HfrC(Hfr R^-) nın DNA elektroforezi. Referans plazmit DNAların büyüklükleri kilobaz (kb) olarak gösterilmiştir.

Yapılan karşılaştırmalı değerlendirmeler sonucu klinik suşlarda taşındığı görülen plazmitlerin büyüklükleri yaklaşık:

- a) Büyük plazmitler 38-60 kb
- b) Küçük plazmitler 11-17 kb olarak bulunmuştur (Şekil 7).

Konjugal aktarımın araştırılmasında kullanılan β_1 suşu (F^-R^-) restriksiyon-modifikasyon sistemini kaybetmiş (r^-m^-) bir suş olduğu için, verici klinik suşların direnç aktarım modelleri gayet açık şekilde yansıtılmış olmaktadır. Ancak β_1 suşu kromozomal streptomisin direnci ($str-r$) taşıdığı için HfrC($str-s$), verici klinik suşların streptomisin direncinin izlenmesi amacıyla, ikinci alıcı olarak kullanılmıştır. Hfr bakterinin oda sıcaklığında veya durgun (stationary) üreme devresinde fertilité özelliğini kaybettiği bilinmektedir.

D. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada bulaşıcı antibiyotik direncini belirleyen etmenler olarak bilinen R-plazmitlerinin yapıları direnç ek-silmesi, konjugaldirenç aktarımı ve DNA elektroforezi yöntemiyle incelenmiştir. Agaroz jel elektroforezi yöntemiyle incelen klinik suşların hepsinin en az bir büyük plazmit DNA sı taşıdığı gösterilmiş olup, dirençler arasında görülen eksilme oranı ve konjugal aktarım modeli bu plazmitlerin R-plazmitleri olduğunu kanıtlamaktadır.

Suş 6 ve 13'ün tüm direnç genlerini kaybetmiş segre-gantlarının DNA analizi küçük plazmitlerini de kaybettiklerini göstermiştir. Bu sonuçlar antibiyotik dirençleri taşıyan her iki suşun taşıdığı küçük replikonların R-plazmitleri olduğunu göstermektedir. Klinik suşların taşıdıkları direnç sayısı ile plazmit sayısı arasında bir bağlantı görülmemektedir. Altı direnç geni taşıyan beş suştan dört tanesi; suş 5, 9, 11 ve 20 yalnız bir büyük plazmit taşırken, suş 24 iki büyük plazmit taşımaktadır. Dört direnç geni taşıyan beş suştan; suş 6 da üç, suş 13 de dört küçük plazmit görüldüğü halde suş 19, 22 ve 23'te küçük plazmit görülmemektedir. Bu durum R-plazmitlerinin stabilitesi ile ilgili olup, suşlar arasında farklılık görülmektedir. Ayrıca, E.coli suşlarının R-plazmitlerini aktardıkları kaynağın bilinmediği düşünülürse, farklı orijine sahip plazmitlerin E.coli'deki stabilitelerinin farklılık göstermesi beklenebilir(125).

Akridin oranj ve etidyum bromit mutajenezinin direnç eksilmesini hızlandırdığı görülmektedir. Aynı direnç kaybı modeli gösteren segregantların bir kısmının kardeş hücreler olabilirliği nedeniyle direnç eksilmesi % oranı verilmemiştir. 11 suş üzerinde yapılan direnç eksilmesi çalışmaları suşların akridin oranj ve etidyum bromite farklı cevap verdiklerini göstermektedir. Suş 16 hiçbir şekilde direnç eksilmesi göstermezken, suş 9'da akridin oranj muamelesiyle yalnız T geni eksilmektedir. Bununla beraber suş 3, 5, 6, 8 ve 13'ün tüm dirençliliklerinin eksildiği izlendi. Tüm direnç eksilmesi gösteren segregantlar klinik suşlarla birlikte agaroz jel elektroforezinde incelendiğinde, segregantların plazmitlerini kaybettikleri gözlemlendi. Bununla beraber 9 suşın çeşitli kombinasyonlarda direnç eksilmesi gösterdiği, en az eksilen genin P olduğu gözlenmiştir.

Araştırılan 24 klinik suşın tümü direnç genlerini konjugasyonla alıcı B₁ (F⁻R⁻r⁻m⁻)'e aktarmışlardır. HfrC(HfrR⁻r⁺m⁺) alıcıya ise 18 suşın direnç aktarımı görülmüş, ancak suş 1, 2, 3, 15 ve 22 nin direnç genlerini aktaramadıkları, suş 20'nin direnç genlerinin sadece bir kısmını aktarabildiği saptanmıştır.

Tüm verici suşların direnç genlerinin B₁ alıcı suşuna konjugal aktarımı görüldüğü halde beş suşın direnç genlerinin HfrC alıcı suşuna aktarılamaması veya suş 20 ile görüldüğü gibi kısmen aktarılması aşağıda belirtilen nedenlerin sonucu olabilir:

a) Vericinin R-plazmiti ile HfrC alıcı suшта bulunan F-faktörü arasında uyumsuzluk olabilir; aktarım uyumsuzluğu (transfer-incompatibility) görülebilir(126).

b) Alıcıdaki F faktörü ile aktarılan R-plazmiti arasında replikasyonel uyumsuzluk sonucu R-plazmiti alıcı da ço-

galamayarak, yavru hücrelere aktarılamayabilir(127).

c) Alıcı suşta aktif bir restriksiyon sistemi bulunabilir. Vericinin plazmit DNA sının alıcı bakteri modifikasyonunu taşınamaması halinde, alıcıya aktarılmakta olan plazmit DNA sı kısmen parçalanmaya (partial degradation) uğrayabilir; sonuç olarak plazmit DNA sında eksilme (delesyon) görülebilir(128).

d) Bazı suşlar da kısmen aktarım görülmesinin nedeni plazmit direnç genlerinin tümünün aktarımı görülen plazmit(ler)in üzerinde taşınmaması olabilir(129).

Önemli bulgulardan biri de gerek direnç eksilmesi gerekse aktarım sonucunda segregant ve konjugatlarda penisilin ve ampisilin dirençliliğinin farklı iki gen tarafından oluşturulmasıdır. Bu olgu, aşağıdaki nedenlerden dolayı oluşabilir:

a) Özelleşme sonucu beta-laktamaz enzimlerinin penisilin ve ampisiline ilgileri farklılık kazanabilir. Gram negatif bakterilerde beta-laktamaz enzimlerinin sefalosporinazlar ve penisilinazlar olmak üzere iki ana gruba ayrıldığı bilinmektedir. Penisilinazların ise TEM-tipi ve O-tipi bulunmaktadır ve bu iki enzimin penisilin ve ampisilin üzerindeki aktiviteleri farklılık göstermektedir(130). Bu enzimleri şifreleyen plazmit genlerindeki bir mutasyon, enzimin bu iki antibiyotiğe ilgilerinde önemli farklılık yaratabilir. Nitekim penisiline karşı ilgisi daha az olan O-tipi beta laktamazın farklılık gösteren tipleri elde edilmiştir(131).

b) Bazı suşların penisilin bağlayan proteinlerinde (PBP) yapısal bir değişiklik bu iki antibiyotiği bağlama özelliklerinde farklılık yaratabilir(132,133).

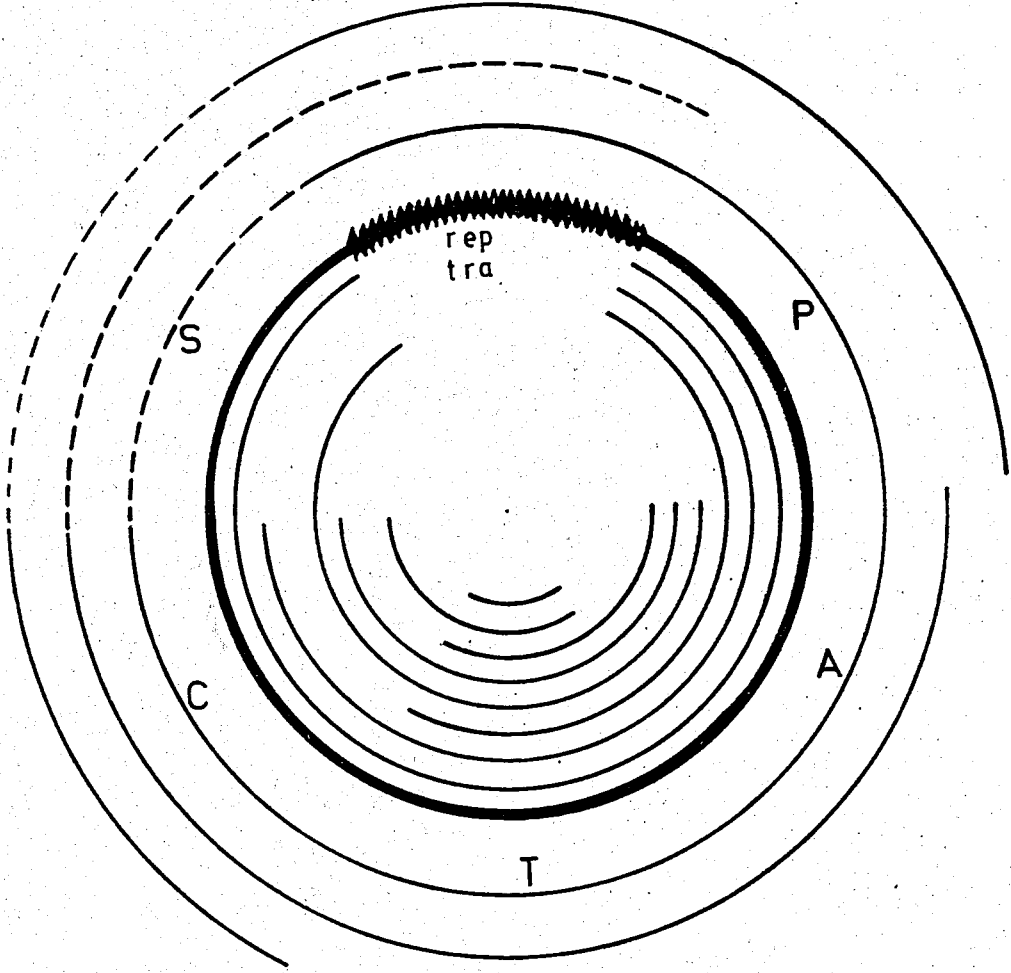
Bu çalışmada kullanılan bazı klinik suşlarda zaten farklı seviyelerde görülen penisilin ve ampisilin direncinin segregant ve konjugatlarda birbirinden ayrılması sonucu, farklı gösterilen P ve A direnç genlerini birlikte barındıran suşlar bundan sonraki çalışmalara konu olacak niteliktedirler. Bu suşların yeni geliştirilen antibiyotiklerin seçiminde önem kazanması sözkonusudur.

Suş 3 ün direnç genlerinin sırası direnç eksilmesi analizi ile çıkarılmış olup, konjugal aktarımın kesin bilgi vermekten uzak olduğu görülmüştür. Ayrıca aktarımı görülmeyen S geninin plazmit üzerinde olduğu direnç eksilmesi sonuçlarından çıkarılmıştır.

Suş 3 ün direnç eksilme modelinde görüleceği gibi aynı suşun segregantlarında görülen PC eksilmesi doğrusal gen dizisinin çembersel gösterilmesini sağlamakta ve aktarım analizlerinde sırası saptanamayan (TA) dizisini açıklığa kavuşturmaktadır. Aktarımı görülen genlerin vericide bir plazmit üzerinde taşındığını düşünerek; aktarılan PC replikonunun, suş 3 R-plazmitinin haritalanmasında çemberselliği kanıtladığını kabul edebiliriz.

B₁ alıcının streptomisine dirençli olması nedeniyle; S geninin Hfr'ye aktarımının görülmemesi, verici suşun S geninin lokalizasyonunu güçleştirmektedir. Ancak direnç eksilme modellerinde görülen PATCS ve ATCS eksilmeleri S in plazmit kromozomu üzerinde ve P ile C arasında olduğunu göstermektedir.

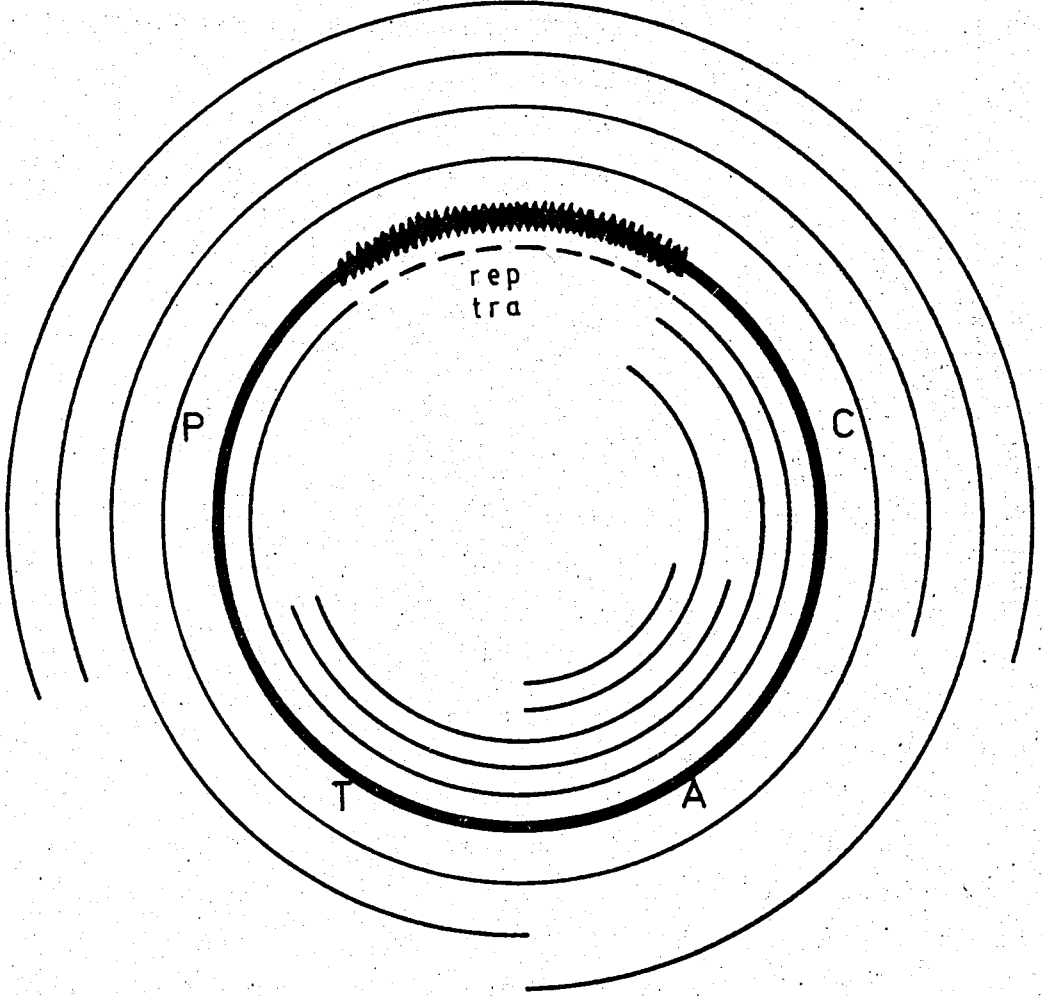
Replikasyon için gerekli genlerin (rep) herhangi tek veya çoğul dirençlilik eksilmesine yol açan eksilme mutasyonlarının dışında kalması gerektiğine göre rep bölgesinin S ile P arasında olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 8). Ancak birden fazla plazmitin taşındığı veya birden fazla rep bölgesinin



ŞEKİL 8- Suş 3 R-plazmitinin direnç genlerinin çembersel haritalanması. Bulunan direnç genleri: PATCS (Tablo 5). Kalın çizgi ile gösterilen çember R-plazmitinin DNA'sını göstermektedir. Çemberin içindeki ince çizgiler R-plazmitinin eksilen direnç genlerini, çemberin dışındaki çizgiler ise konjugasyonla alıcı bakteriye aktarılan verici direnç genlerini (Tablo 6) göstermektedir. rep.:

rep : plazmitin replikasyonu için gerekli genlerin lokali

tra : plazmitin transferi için gerekli genlerin lokali olup anlatımda daima rep'in içerildiği genler bölgesi olarak düşünülmüş ve ayrıca verilmemiştir.



ŞEKİL 9- Suş 6 R-plazmitinin direnç genlerinin çembersel haritalanması. Bulunan direnç genleri: PCAT (Tablo 4). Gerekli bilgiler Şekil 8'de anlatıldığı gibidir.

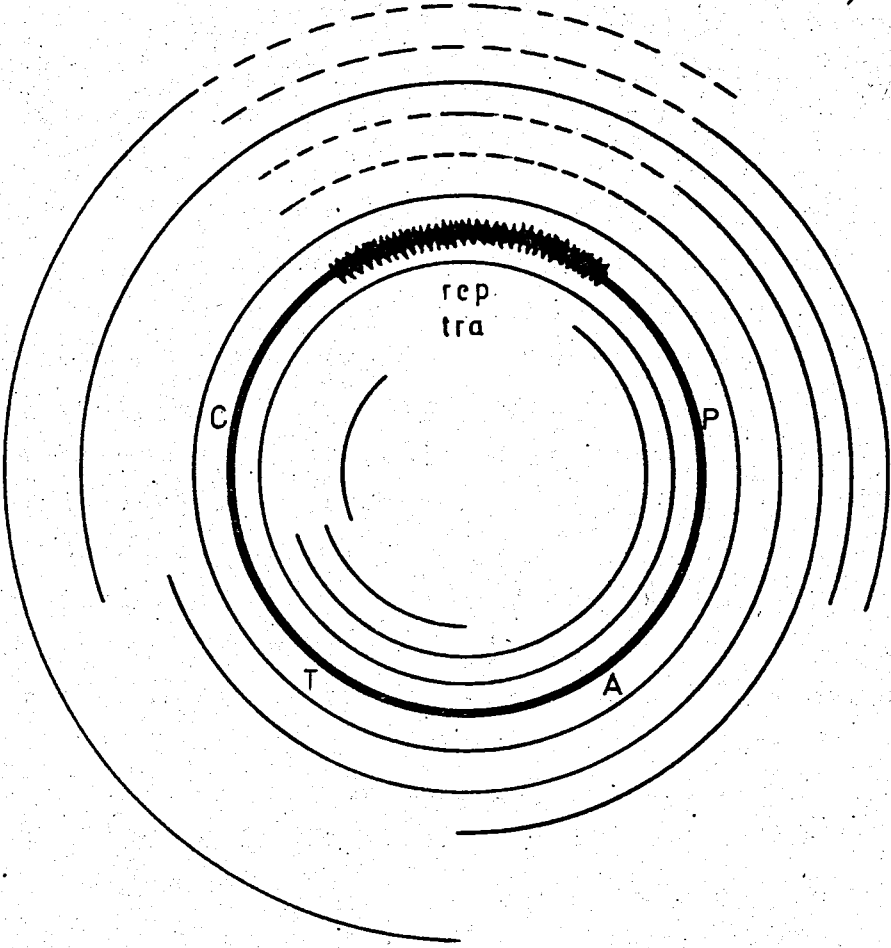
aynı plazmit üzerinde bulunduğu durumda aynı prensip geçerli olmayabilir.

Suş 4 R-plazmiti, Suş 3 R-plazmiti üzerinde taşınan aynı antibiyotik dirençliliği genlerini taşımasına rağmen Şekil 4 te görüldüğü gibi suş 3 R-plazmitinden daha küçüktür ve elektroforetik mobilitesi daha fazladır.

Suş 5'te görülen direnç eksilmesi ve konjugal aktarım sonuçları uyumlu olmasına rağmen antibiyotik dirençliliği genlerinin plazmit kromozomu üzerindeki sırasını göstermeye yeterli bulunmamaktadır. Suş 4'a ait bulguların birlikte değerlendirilmesi (P/A) ya ilaveten ikinci bir replikasyon lokali olduğunu sezindirmekteyse de, büyük plazmitin küçük replikonlara ayrılmasının sonucu olması da mümkündür. Bu oluşumda plazmit duplike genleri arasında olası rekombinasyon kadar yer değiştirmenin (transpozisyon) da önemini unutmamak gerekir(134). Suş 5'te kendiliğinden direnç eksilmesi gözlenmemesi plazmit RTF-r molekülünün oldukça stabil olduğunu düşündürmektedir.

Suş 6'nın direnç aktarımı sonuçlarına göre kesinlik kazanamayan direnç genlerinin dizisinin PCAT olduğu direnç eksilmesi sonuçlarından çıkarılmıştır. Ayrıca, direnç eksilmesi ve aktarımı bulguları birlikte değerlendirildiğinde, rep genlerinin P bölgesinde olduğu görülmektedir. Bu bulgular, P ve A genlerinin başka bir direnç geni (C) tarafından ayrıldığı ilk gözlemi oluşturmuştur (Şekil 9).

Suş 5 ve suş 6'nın segregantlarında görülen plazmitin F faktörü olduğu kanıtlanmıştır. Klinik suşlarda F-faktörünün bulunması bakterinin motilitesi bakımından önemli olup, dirençli bakterinin duyarlı bakteriye dirençliliklerini aktarmalarında rolü büyüktür. Ayrıca her iki suşun R-plazmitleriyle F-faktörleri arasındaki ilişkinin (f_i^-) olduğu anlaşılmaktadır.



ŞEKİL 10- Suş 8 R-plazmitinin direnç genlerinin çembersel haritalanması. Bulunan direnç genleri: PATCS (Tablo 4). Gerekli bilgiler Şekil 8'de anlatıldığı gibidir.

Suş 7 nin büyük bir plazmite ilaveten ikinci küçük bir plazmit taşıdığı görölmektedir (Şekil 4). S geni dışında tüm test edilen direnç genlerini aktarması, S geninin kromozomal olabileceğini veya ikinci küçük ve fakat aktarımsız bir plazmit üzerinde taşındığını düşündürmektedir.

Suş 8'in gerek akridin oranj gerekse etidyum bromit muamelesiyle S dışında diğer R-plazmiti genlerinin eksilmesi ve HfrC alıcıya S geninin aktarımının izlenmemesi, S direncinin kromozomal olduğunu desteklemektedir. Direnç kaybı modelleri incelendiğinde P ve C direnci birlikte eksildiği zaman diğer dirençlerde eksilmektedir. Oysa P veya C ayrı ayrı kaybedildiğinde geriye tek direnç geni bile kalsa varlıklarını sürdüren küçük replikonların kalması, replikasyon genlerinin P ve C genleri arasında olduğunu göstermektedir. Direnç aktarımı sonuçları da bu bakımdan uyumlu olup, plazmit genleri haritasının çemberselliğini mümkün kılmaktadır (Şekil 10).

Suş 9 da R-plazmitinin oldukça stabil olduğu, bununla beraber akridin oranj muamelesiyle yalnız T direncini kaybettiği görölmüştür. Ayrıca S genidişında diğer dirençlerini çeşitli kombinasyonlarda aktarmıştır. Plazmit direnç genlerinin haritalanması (PA) dışında kesinlik kazanmıştır.

Suş 10 da S direncinin plazmit haritasındaki yerinin PATC gen grubunun dışında kaldığı görölmektedir.

Suş 12 R-plazmitinin direnç genlerini aktarım modelleri dikkatle incelenirse rep ve P arasında bir bağıllık bulunmaktadır.

Suş 13'ün DNA analizinde farklı büyüklükte 5 plazmit molekülünün görölməsi, direnç kaybı modeli ile uyum gösterirken, direnç genlerinin aktarım modeli RTF-r tekrar-birleşme ürünlerinin oldukça stabil olduğunu ve parçalarına-ayrılmanın

pek sık görölmediğini sezindirmektedir.

Bu amaçla, suş 7, 12 ve 13'ün konjugatlarının bu kez verici olarak kullanılması ve aktarım modellerinin incelenmesi gerekli olup, gelecekteki çalışmalara konu olacak niteliktedir. İlaveten, aktarımı görülen replikonlar ile direnç kaybı gösteren suşlardaki replikonların taşıdıkları antibiyotik direncinin üst sınırlarının da saptanması ve orijinal klinik suşlarda bulunan direnç üst sınırı ile mukayesesinin direnç genlerinin kopya sayısı hakkında yararlı bilgiler verebileceği düşünülmektedir. Bu şekilde yapılacak çalışmalarda direnç kaybı vermeyen örneğin suş 16 da gerçek durum açıklığa kavuşabilir.

Klinik izolatlardaki küçük plazmitlerin elde edilmesi ve taşıdıkları antibiyotik dirençliliği genlerinin saptanması sonraki çalışmalara konu olabilir. Zira, bu çalışmanın amaçlarından biri Rekombinant-DNA yapımında kullanılabilecek özellikte taşıyıcı (vektör) plazmitlerinin izolasyonudur. Bu amaçla uygun olarak Suş 12'deki yaklaşık 11×10^3 baz çifti büyüklüğündeki koyuca boyanmış plazmit (Şekil 4).

1- küçük olması,

2- hücredeki kopya sayısının yüksek olması nedenlerinden dolayı tercih edilecektir. Seçilen plazmit üzerinde taşınan direnç karakterinin tayin edilmesi ve palindromik dizilerinin analizi daha ileri çalışmaların konularını oluşturacaktır.

Bu çalışmada araştırılan klinik E.coli suşlarının bulunan en yaygın direncinin (CPA) olduğu, ilaveten T geninin en sık (CPAT) sırasıyla taşındığı saptanmıştır.

Bu modellerin, doğada kendiliğinden süren R-plazmitleri evrimi ve insanoglunun müdahalesinin bir sonucu olarak

oluştugu düşünölebilir. Zira antibiyotik kullanımının P-plazmiti taşıyanlara seçici üstönlük verdiği bilinmektedir. Tek tip antibiyotiklerin kullanımının başladığı 1940'lı yıllardan itibaren mikroorganizmaların dengesi kullanılan antibiyotiklere dirençli olanların lehine değişmektedir(135). Antibiyotiklerin kombine kullanımı üst seviyede bir seleksiyona ve dirençlilik genlerinin çeşitli modellerde ortaya çıkmasına neden olabilir.

Tüm plazmitlerin kesin haritalanamamış olması nedeniyle bu çalışmada kullanılan suşların gösterdikleri direnç modelleriyle lineer gen haritaları arasındaki ilişkinin incelenmesi mümkün olamamıştır.

Genetik aktarımda büyük plazmit moleküllerinin taşıdıkları genlerin aktarımı yine çeşitlilik göstermektedir. Transferi görölen her gen plazmit aktarımını simgeler. P geni en sık aktarılan gen olup, aktarılan en küçük plazmit genidir. Direnç eksilmesi ve aktarım sonuçları birbirinden bağımsız olarak, P geni ve rep genleri arasında bağıllık (linkage) bulunduğunu desteklemektedir. Ayrıca, P geniyle birlikte en sık aktarılan genler A ve C dir. C ve A nın da rep bölgesiyle bağıllık gösterdiği izlenmiştir.

Antibiyotik dirençlerinin her zaman R-plazmitleri kanalıyla yayıldığını düşünmek doğru değildir. R-plazmitlerinin antibiyotik direnci çapraz dirençlilik gösterebilir. Bir antibiyotigin aşırı uygulanması bazen farklı antibiyotik direnci gösteren bakterilerin seçimini zorlar ve bu direncin giderek yayılmasına neden olabilir(136).

P geninin plazmit rep bölgesine yakın haritalanması ve CPA ortak dirençliliğinin tüm klinik suşlarda gözlenmesinin önemi söyleyebilmek için, bu doğrultudaki çalışmaların genişletilmesi ve söz konusu antibiyotiklerin klinik tedavide kullanımlarının memleketimizdeki başlangıcı ve günümüze dek kul-

lanılan miktarlarının bilinmesi gereklidir. Bu açıdan bakıldığında analizi yapılan 24 klinik E.coli suşlarından yalnız beşinin Kanamisine dirençlilik göstermesi ilginçtir.

E. ÖZET

İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı'nda idrar muayene maddelerinden elde edilen 24 Escherichia coli klinik suşları kullanılarak antibiyotik dirençliliğinin genetik analizi üzerinde çalışmalar yapılmıştır.

24 suşun; ikisinde üç, beşinde dört 12'sinde beş ve beşinde de altı antibiyotik direncinin bulunduğu ve PAC (P: penisilin, A: ampisilin, C: kloramfenikol) direnç genlerinin tüm suşlarda görülen ortak antibiyotik direncini oluşturdıkları saptanmıştır. Bulunan diğer dirençlilikler T: tetrasiklin, S: streptomisin, K: kanamisin'dir.

Plazmit dirençliliğinin tesbiti için, plazmit DNAsı analizi, dirençlerin konjugal aktarımı ve direnç eksilmesi araştırılmıştır.

Suşların plazmit DNA analizi agaroz jel elektroforezi yöntemiyle yapılmıştır. Tüm suşların en az bir büyük plazmit (yaklaşık 38-60 kb) taşıdıkları, 9 suşun ise 1-4 sayıda küçük plazmit DNAları (yaklaşık 11-17 kb) taşıdığı görülmüştür. Taşınan plazmit sayısı ile direnç genlerinin sayısı arasında bir bağ görülmemiştir. Suş 6 ve 13'ün tüm dirençlerinin eksildiği bilinen, segregantlarının DNA analizi yapılmış ve tüm küçük plazmitlerin kaybedildiği saptanmıştır. Böylece küçük plazmitlerin direnç genlerini taşıdığı gösterilmiştir.

Klinik suşların tüm direnç genlerini $B_1(F^-R^-r^-m^-)$ alıcı suşa aktarabildikleri gözlenirken; $HfrC(Hfr R^-r^+m^+)$ alıcıya, suşlardan birinin kısmen; 18'inin, çeşitli modellerde, tüm direnç genlerini aktardığı ancak beşinin ise hiçbir direnç genini aktaramadığı gözlenmiştir.

Akridin oranj ve etidyum bromitin plazmit direnç eksilmesini hızlandırdığı görülmüştür. Penisilin (P) ve ampisilin (A) dirençlerinin gerek direnç eksilmesi görülen segregantlarda gerekse konjugatlarda birbirinden ayrıldığı; P ve A'nın ayrı genler olduğu gözlenmiştir. Suş 6, 7, 8, 9 ve 10 da S geninin kromozomal olduğu saptanmıştır. Tüm plazmitlerde P'nin en az eksilen, en sık aktarılan direnç olduğu; T'nin en sık eksilen, K'nin en az bulunan direnç oldukları saptanmıştır.

Direnç eksilmesi ve konjugal aktarım sonuçları birlikte plazmit genlerinin haritalanmasında ve plazmitlerin stabilitelerinin incelenmesinde kullanılarak 8 suşun plazmit DNAsının kesin lineer haritalaması çıkarılmış olup, elde edilen bilgiler 5 suşun plazmit DNAsının çembersel olarak haritalanmasına olanak vermiştir.

R plazmitlerinin replikasyonu ve transferi için gerekli genlerin ($^{rep}_{tra}$) genellikle P ve C lokalinde olduğu gözlenmiştir.

F. KAYINAKLAR

- 1- Findland, M.: The present status of antibiotics in bacterial infections. Bull.N.Y.Acad.Med. 27, 199-207 (1951).
- 2- Watanabe, T.: Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. Bacteriol.Rev. 27, 87-115 (1963).
- 3- Mitsuhashi, S.: Review: The R factor. J.Infect.Dis. 119, 89-100 (1969).
- 4- Datta, N.: Transmissible drug resistance in an epidemic strain of *Salmonella typhimurium*. J.Hygiene.Camb. 60, 301-310 (1962).
- 5- Watanabe, T., Nishida, H., Ogata, C., Arai, T., Sato, S.: Episome mediated drug resistance of Enterobacteriaceae. J.Bacteriol. 88, 716-726 (1964).
- 6- Mitsuhashi, S.: Transferable drug resistance Factor R. University Park Press Baltimore Maryland. (1971).
- 7- Dulaney, E.L., Laskin, A.I. (Eds.): The problems of drug resistant pathogenic bacteria. N.Y.Acad. of Sci. New York, 182, 5-415 (1971).
- 8- Lederberg, J.: Cell genetics and hereditary symbiosis. Physiol.Rev. 32, 403-428 (1952).

- 9- Jacob,F., Brenner,S., Cuzin,F.: On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold Spring Harbor Symp.Quant. Biol.28, 329-348 (1963).
- 10- Jacob,F., Ryter,A., Cuzin,F.: On the association between DNA and the membrane in bacteria. Proc.Roy.Soc.B.164, 267-278 (1966).
- 11- Mitsuhashi,S.: Drug resistance of enteric bacteria. Science 30, 628-633 (1960).
- 12- Nakaya,R., Nakamura,A., Murata,Y.: Resistance transfer agents in shigella. Biochem.Biophys.Res.Commun.3, 654 - 659 (1960).
- 13- Watanabe,T., Fukasawa,T.: Resistance transfer factor an episome in Enterobacteriaceae. Biochem.Biophys.Res.Commun.3, 660-665 (1960).
- 14- Akalın,E., Baykal,M.: Gram negatif bakterilerin antibiyotik dirençlilik oranlarının yıllara göre karşılaştırılması. XVIII. Türk mikrobiyoloji kongresi serbest tebliğ özetleri kitabı. Türk Mikrobiyol.Cem. s.2-3, İstanbul (1978).
- 15- Akman,M.: Yurdumuzda enterik bakterilerin antibiyotik direnç durumları ve genetik nedenleri. Mikrobiyol.Bült. 9, 59-67 (1975).
- 16- Çetin,E.T., Anç,Ö., Töreci,K.: 1958-1959 senelerinde izole ettiğimiz 405 bakteri suşunun antibiyotiklere ve furodantine hassasiyetlerinin denenmesi. Tıp Fak.Mecm.23, 143-169 (1960).

- 17- Çetin,E.T., Anđ,Ö., Töreci,K., Berkiten,R.: 1960-1970 yılları arasında kürsümüzde incelenen muayene maddeleri ve izole edilen bakteriler. Tıp Fak.Mecm.35, 371-399 (1972).
- 18- Günalp,A.: Sokak tipi E coli suşlarında kromozom transferi yaptıran plazmitlerin dağılımı ve bulunuş oranları üzerinde bir araştırma. Mikrobiyol.Bült.12, 167-177 (1978).
- 19- Töreci,K., Çetin,E.T., Anđ,Ö.: 13 yıllık bir sürede (1958-1970) İstanbulda izole edilen bakterilerin antibiyotik hassasiyetlerindeki değışmeler. Türk Mikrobiyol. Cem.Derg.1, 208-213 (1971).
- 20- Töreci,K., Çetin,E.T., Anđ,Ö., Kasımoğlu,Ö.: 1976-1977 yıllarında muayene maddelerinden izole edilen 11385 bakteri suşunun kemoterapötiklere duyarlılıkları. XVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Rapor ve Ana Konuları kitabı. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, İstanbul (1978).
- 21- Cohen,S.N., Chang,A.C.Y., Hsu,L.: Non-chorosomal antibiotic resistance in bacteria genetic transformation of E.coli by R-factor DNA. Proc.Nat.Acad.Sci.69, 2110-2114 (1972).
- 22- Hayes,W.: Introduction "what are episomes plasmids?" Ciba Found Symp Bacterial Episomes and Plasmids. (Churchill - London), pp.4, 11 (1969).
- 23- Meynell,G.G.: Bacterial Plasmids. M.I.T. Press Cambridge Massachusetts (1973).
- 24- Davies,J.E., Rownd,R.: Transmissible multiple drug resistance in Enterobacteriaceae. Science 176, 758-768 (1972).

- 25- Novick, R.P.: Extrachromosomal inheritance in bacteria. Bacteriol. Rev. 33, 210-263 (1969).
- 26- Hirota, Y., Fuji, T., Nishimura, Y.: Loss and repair of conjugal fertility and infectivity of the resistance factor and sex factor in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 91, 1298-1304 (1961).
- 27- Sirotinak, F.M.: Chromosomal mutation to drug resistance in bacteria. Antibiot. Chemother. 20, 67-72 (1975).
- 28- Watanabe, T., Lyang, K.W.: Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae V Spontaneous segregation and recombination of resistance factors in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 84, 422-430 (1962).
- 29- Watanabe, T., Ogata, C.: Episome-mediated transfer of drug resistance. IX Recombination of an R-factor with F. J. Bacteriol. 91, 43-50 (1966).
- 30- Watanabe, T., Fukasawa, T.: Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. Elimination of resistance factors with acridine dyes. J. Bacteriol. 81, 679-683 (1961).
- 31- Willets, N.S.: The elimination of F-lac⁺ from *Escherichia coli* by mutagenic agents. Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 112-117 (1967).
- 32- Watanabe, T.: Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. Bacteriol. Rev. 27, 87-115 (1966).
- 33- Hashimoto, H., Hirota, Y.: Gene recombination and segregation of resistance factor R in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 91, 51-62 (1966).

- 34- Hashimoto, H., Mitsuhashi, S.: Drug resistance of enteric bacteria. VII Recombination of R-factor with tetracycline sensitive mutants. J. Bacteriol. 92, 1351-1356 (1966).
- 35- Freifelder, D.: "Isolation of extrachromosomal DNA from bacteria", in Methods in Enzymology, Eds.: L. Grossman, K. Moldave, Volume 21 Nucleic Acids. (Academic Press, New York), pp. 153-163 (1970).
- 36- Freifelder, D., Folkmanis, A., Kirschner, I.: Studies on Escherichia coli sex factors evidence that covalent circles exist within cells and the general problem of isolation of covalent circles. J. Bacteriol. 105, 722-731 (1971).
- 37- Eckdardt, T.: A rapid method for the identification of plasmid DNA in Bacteria Plasmid. 1, 584-588 (1978).
- 38- Watanabe, T.: Infectious Drug Resistance, Sci. Am. 217, 19-27 (1967).
- 39- Cohen, S., Miller, C. H.: Non-Chromosomal antibiotic resistance in bacteria. J. Mol. Biol. 50, 671-687 (1970).
- 40- Demerec, M., Adelberg, E. A., Clark, A. J., Hartman, P. E.: A Proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. Genetics. 54, 61-76 (1966).
- 41- Guerry, P., van Embden, J., Falkow, S.: Molecular nature of the two non-conjugative plasmids carrying drug resistance genes. J. Bacteriol. 117, 691-698 (1974).
- 42- Anderson, E. S., Lewis, M. J.: Characterization of a transfer factor associated with drug resistance in Salmonella typhimurium. Nature. 208, 843-849 (1965).

- 43- Anderson, E.S., Perret, D.: Mobilization of transduced tetracycline resistance by the Δ transfer factor in *Salmonella typhimurium* and *S. typhi*. Nature. 214, 810-811 (1967).
- 44- Anderson, E.S., Natkin, E.: Transductain of resistance determinants and R-factors of the Δ transfer systems by phage Plkc Mol. Gen. Genet. 114, 261-265 (1972).
- 45- Milliken, C.E., Clowes, R.C.: Molecular structure of an R-factor: its component drug resistance determinants and transfer factor. J. Bacteriol. 113, 1026-1033 (1973).
- 46- Anderson, E.S.: A rapid screening test for transfer factors in drug-sensitive Enterobacteriaceae. Nature, 208, 1016-1020 (1965).
- 47- Hartman, R.: Targets of penicillin action. Nature. 235, 426-430 (1972).
- 48- Meynel, G.G.: Bacterial Plasmids (Mac Millan, London) (1973).
- 49- Falkow, S., Johnson, E.M., Baron, L.S.: Bacterial conjugation and extrachromosomal elements. Ann. Rev. Genet. 1, 87-116 (1967).
- 50- Meynell, G.G., Lawn, A.M.: Sex pili and common pili in the conjugational transfer of colicin factor Ib by *Salmonella typhimurium*. Genet. Res. 9, 359-367 (1967).
- 51- Smith, H.W., Linggood, M.A.: Transfer factors in *Escherichia coli* with particular regard to their incidence in enteropathogenic strains. J. Gen. Microbiol. 62, 287-294 (1970).

- 52- Kahn, P., Helinski, D.R.: Relationship between colicinogenic factors E1 and V and an F-factor in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 88, 1573-1579 (1964).
- 53- Nomura, M.: Colicins and related bacteriocins. Ann. Rev. Microbiol. 21, 257-284 (1967).
- 54- Novick, R.P., Bouanchaud, D.: Extrachromosomal nature of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 182, 279-285 (1971).
- 55- Richmond, M.H.: The plasmids of *Staphylococcus aureus* and their relationship to other extrachromosomal elements in bacteria. Adv. Microb. Physiol. 2, 43-51 (1968).
- 56- Sherris, J.C., Minshew, B.H.: Mutational antibiotic resistance. In Lorian, V. (ed.): *Antibiotic in Laboratory Medicine*. Baltimore, Williams and Wilkins, p.418 (1980).
- 57- Hayes, W.: *The genetics of bacteria and their viruses*. Second Edition, Second Printing. Blackwell publications. (1970).
- 58- Lindström, E.B., Bowman, H.G., Steele, B.B.: Resistance of *Escherichia coli* to penicillins. VI Purification and characterization of the chromosomally, mediated penicillinase present in amp A-containing strains. J. Bacteriol. 101, 218-231 (1970).
- 59- Zimmerman, R.A., Moellering, R.C., Jr., Weinberg, A.N.: Mechanism of resistance to antibiotic synergism in enterococci. J. Bacteriol. 105, 873-879 (1971).
- 60- Pestka, S.: Inhibitors of ribosome function. Ann. Rev. Microbiol. 25, 487-514 (1971).

- 61- Funatsu, G., Nierhaus, K., Wittman-Liebold, B.: Ribosomal proteins XXII. Studies on the altered protein S5 from a spectinomycin resistant mutant of E.coli. J.Mol.Biol. 64, 201-210 (1972).
- 62- Funatsu, G., Schiltz, E., Wittman, H.G.: Ribosomal proteins. XXVII Localization of the amino acid exchanges in protein S5 from two E.coli mutants resistant to spectinomycin. Molec.Gen.Genet. 114, 106-111 (1972).
- 63- Takata, R.: Mapping of ribosomal protein components by intergenic mating experiments between *Serratia marcescens* and E.coli. Molec.Gen.Genet. 118, 363-372 (1972).
- 64- Rabbani, E., Srinivasan, P.R.: Role of the translocation factor G in the regulation of RNA synthesis. J.Bacteriol. 113, 1177-1183 (1973).
- 65- Curtis, N.A.C., Orr, D., Ross, G.W.: Affinities of penicillins and cephalosporins for the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K-12 and their antibacterial activity. Antimicrob.Agents Chemother. 16, 533-539 (1979).
- 66- Tomasz, A.: The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: How the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. Ann.Rev.Microbiol. 33, 113 - 138 (1979).
- 67- Amyes, S.G.B., Smith, J.T.: R-factor trimethoprim resistance mechanism an insusceptible target site. Biochem.Biophys.Res.Commun. 58, 412-420 (1974).
- 68- Wise, E.M., and Abou-Donia, M.M.: Sulfonamide resistance mechanism in E.coli R.plasmids can determine sulfonamide resistant dihydropteroate synthesis. Proc.Nat.Acad.Sci. 72, 2621-2625 (1975).

- 69- Wolf, B., Hotchkiss, R.D.: Genetically modified folic acid synthesizing enzymes of pneumococcus. Biochem. 2, 145 - 150 (1963).
- 70- Ho, R.I., Corman, L., Morse, S.: Alterations in dihydropteroate synthetase in cell-free extracts of sulfanilamide - resistant *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob. Agents Chemother. 5, 388-394 (1974).
- 71- Sykes, R.B., Matthew, M.: The β -lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. J. Antimicrob. Chemother. 2, 115-157 (1976).
- 72- Richmond, M.H., Sykes, R.B.: The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. Adv. Microb. Physiol. 9, 31-88 (1973).
- 73- Costerton, J.W., Cheng, K.J.: The role of bacterial cell envelope in antibiotic resistance. J. Antimicrob. Chemother., 1, 363-369 (1975).
- 74- Benveniste, R., Davies, J.: Enzymatic acetylation of aminoglycoside antibiotics by *Escherichia coli* carrying an R-factor. Biochem. 10, 1787-2022 (1971).
- 75- Umezawa, H., Okanishi, M., Utahara, R., Maeda, K., Kondo, S.: Isolation and structure of kanamycin inactivated by a cell free system of kanamycin-resistant *E. coli*. J. Antibiotics (Tokyo). Ser. A. 20, 136-141 (1967).
- 76- Benveniste, R., Yamada, T., Davies, J.: Enzymatic adenylation of streptomycin and spectinomycin resistance. Infection and immunity. 1, 120-125 (1970).

- 77- Davies, J., Brzezinska, M., Benveniste, R.: R-factors: Biochemical mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics. Ann.N.Y.Acad.Sci.182, 226-237 (1971).
- 78- Ozanne, B., Benveniste, R., Tipper, D., Davies, J.: Aminoglycoside antibiotics. Inactivation by phosphorylation in *Escherichia coli* carrying R-factors. J.Bacteriol.100, 1144-1151 (1969).
- 79- Chopra, I., Howe, T.B.G.: Bacterial resistance to the tetracyclines. Microbiol.Rev.42, 707-724 (1978).
- 80- Shaw, W.V.: The enzymatic acetylation of chloramphenicol by R-factor resistant *Escherichia coli*. J.Biol.Chem.242, 687-693 (1967).
- 81- Britz, M.L., Wilkinson, R.G.: Chloramphenicol acetyltransferase of *Bacteroides fragilis*. Antimicrob.Agents Chemother.14, 105-109 (1978).
- 82- Clewell, D.B., Helinsky, D.R.: Supercoiled circular DNA protein complex in *E.coli*; purification and induced conversion to open circular form Proc.Nat.Acad.Sci.62, 1159-1166 (1969).
- 83- Falkow, S.: Infectious multiple drug resistance. Pion Ltd., (1975).
- 84- Nisioka, T., Mitani, M., Clowes, R.: Composite circular forms of R-factor DNA molecules. J.Bacteriol.97, 376 - 385 (1969).
- 85- Nisioka, T., Mitani, M., Clowes, R.C.: Molecular recombination between R-factor DNA molecules in *E.coli* host cells. J.Bacteriol.103, 166-177 (1970).

- 86- Mitsuhashi, S., Harada, K., Hashimoto, H., Kameda, M., Suzuki, M.: Combination of two types of transmissible drug resistance factors in a host bacterium. J. Bacteriol. 84, 9-16 (1962).
- 87- Hu, S., Ohtsubo, E., Davidson, N., Saedler, H.: Electron microscope heteroduplex studies of sequence relations among bacterial plasmids: Identification and mapping of the insertion sequences IS1 and IS2 in F and R plasmids. J. Bacteriol. 122, 764-775 (1975).
- 88- Saedler, H., Heiss, B.: Multiple copies of the insertion DNA sequences IS1 and IS2 in the chromosome of E. coli K12. Molec. Gen. Genet. 122, 267-277 (1973).
- 89- Ohtsubo, H., Ohtsubo, E.: Isolation of inverted repeat sequences including IS1 and IS2 and IS3 in E. coli plasmids. Proc. Nat. Acad. Sci. 73, 2316-2320 (1976).
- 90- Berg, D.E., Davies, J., Allet, B., Rochaix, J.D.: Transposition of R-factor genes to phage λ . Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 3628-3632 (1975).
- 91- Foster, T.J., Howe, T.G.B., Richmond, K.M.V.: Translocation of the tetracycline resistance determinant from R 100-1 to E. coli chromosome. J. Bacteriol. 124, 1153-1158 (1975).
- 92- Heffron, F., Rubens, C., Falkow, S.: Translocation of a plasmid DNA sequence which mediates ampicillin resistance. Molecular nature and specificity of insertion. Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 3623-3627 (1975).
- 93- Barth, P.T., Datta, N., Hedges, R.W., Grinter, N.J.: Transposition of a DNA sequence encoding trimethoprim and streptomycin resistances from R 483 to other replicons. J. Bacteriol. 125, 800-810 (1976).

- 94- Gottesman, M.M., Rosner, J.L.: Acquisition of a determinant for chloramphenicol resistance by phage lambda. Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 5041-5045 (1975).
- 95- Kopecko, D.J., Cohen, S.N.: Site specific rec A-independent recombination between bacterial plasmids: involvement of palindromes at the recombinational loci. Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 1373-1377 (1975).
- 96- Watanabe, T., Ogata, Y.: Genetic stability of various R-factors in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 102, 363-368 (1970).
- 97- Hashimoto, H., Mitsuhashi, S.: Segregation of R-factors. Progr. Antimicrob. Anticancer. Chemother. 2, 545-551 (1970).
- 98- Mitsuhashi, S., Harada, K., Kameda, M.: Elimination of transmissible drug resistance by treatment with acriflavin. Nature. 189, 947 (1961).
- 99- Bouanchaud, D.H., Scavizzi, M.R., Chabbert, Y.A.: Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in *Enterobacteria* and *Staphylococci*. J. Gen. Microbiol. 54, 417-423 (1969).
- 100- Tomoeda, M., Inuzuka, M., Kubo, N., Nakamura, S.: Effective elimination of drug resistance and sex factors in *Escherichia coli* by sodium dodecyl sulfate. J. Bacteriol. 95, 1078-1089 (1968).
- 101- Clowes, R.C., Moody, E.E.M., Prichard, R.H.: The elimination of extrachromosomal elements in thymineless strains of *Escherichia coli* K-12. Genet. Res. 6, 147-152 (1965).

- 102- Lerman, L.: Acridine mutagens and DNA Structure J. Cellular Comp. Physiol. 64, Suppl. 1, 1-13 (1964).
- 103- Hahn, F.E., Ciak, J.: Elimination of bacterial episomes by DNA-complexing compounds in "Bacterial Plasmids and Antibiotic Resistance", Eds.: V. Krcmery, L. Rosival, T. Watanabe (Springer-Verlag, Berlin), pp. 297-307 (1972).
- 104- Bunchaud, D.H., Chabbert, Y.A.: Practical effectiveness of agents curing R-factors and plasmids. Ann. N.Y. Acad. Sci. 182, 305-312 (1971).
- 105- Riva, S., Fietta, A., Berti, M., Silvestri, L.G., Romero, E.: Relationships between curing of the F episome by rifampicin and by acridine orange in Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother. 3, 456-463 (1973).
- 106- Watanabe, T.: Selected methods of genetic study of episome mediated drug resistance in bacteria. Methods. Med. Res. 10, 202-213 (1964).
- 107- Freifelder, D.R., Freifelder, D.: Studies on E. coli sex factors. J. Mol. Biol. 32, 25-35 (1968).
- 108- Willetts, N.S.: The genetics of transmissible plasmids. Ann. Rev. Genet. 6, 257-268 (1972).
- 109- Grindley, N.D.F., Grindley, J.N., Anderson, E.S.: R-Factor compatibility groups. Mol. Gen. Genet. 119, 287-294 (1972).
- 110- Finnegan, D.J., Willetts, N.S.: The nature of the transfer inhibitor of several F-like plasmids. Molec. Gen. Genet. 119, 57-66 (1972).

- 111- Finnegan,D., Willetts,N.: The site of action of the F transfer inhibitor. Molec.Gen.Genetics.127, 307-316 (1973).
- 112- Meynell,E., Datta,N.: The relation of resistance transfer factors to the F-factor of E.coli. Genet.Res.7, 134-140 (1966).
- 113- Meynell,E., Meynell,G.G., Datta,N.: Phylogenetic relationships of drug resistance factors and other transmissible bacterial plasmids. Bacteriol.Rev.32, 55-83 (1968).
- 114- Chabbert,Y.A., Scavizz,M.R., Witchitz,J.L., Gerbaud,G. R., Bouanchaud,D.H.: Incompatibility groups and the classification of fi-resistance factors. J.Bacteriol. 112, 666-675 (1972).
- 115- Datta,N., Hedges,R.W.: Host ranges of R-factors. Nature 234, 222-223 (1972).
- 116- Anderson,E.S.: The ecology of transferable drug resistance in the Enterobacteria. Ann.Rev.Microbiol.22, 131-180 (1968).
- 117- Arber,W., Linn,S.: DNA modification and restriction. Ann.Rev.Biochem.38, 467-483 (1969).
- 118- Nathans,D., Smith,H.O.: Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. Ann.Rev. Biochem.44, 273-293 (1975).
- 119- Yoshimori,R., Roulland-Dussoix,D., Boyer,H.W.: R-factor controlled restriction and modification of deoxyribonucleic acid restriction mutants. J.Bacteriol.112, 1275 - 1279 (1972).

- 120- Bannister, D., Glover, S.W.: Restriction and modification of bacteriophages by R^+ strains of *Escherichia coli* K-12. Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 735-740 (1968).
- 121- Hedgpeth, J., Goodman, H.M., Boyer, H.W.: DNA nucleotide sequence restricted by the *RI* endonuclease. Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 3448-3452 (1972).
- 122- Boyer, H.W., Chōw, L.T., Dugaiczyk, A., Hedgpeth, J., Goodman, H.M.: DNA substrate site for the *Eco RII* restriction endonuclease and modification methylase. Nature. New. Biol. 244, 40-43 (1973).
- 123- Sharp, P.A., Cohen, S.N., Davidson, N.: Electron microscope studies of sequence relations among plasmids of *E. coli*. Structure of drug resistance (*R*) factors and (*F*) factors. J. Mol. Biol. 75, 235-255 (1973).
- 124- Maniatis, T., Hardison, R.C., Lacy, E., Lauer, J., O'Connell, C., Quon, D., Sim, G.K., Efstradiatis, A.: The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. Cell, 15, 687-701 (1978).
- 125- Falkow, S., Haapala, D.K., Silver, R.P.: Relationships between extrachromosomal elements in *ciba Found. Symp. "Bacterial Episomes and Plasmids"*. (Churchill London), pp. 136 - 158 (1969).
- 126- Le Blanc, D.J., Falkow, S.: Studies on superinfection immunity among transmissible plasmids in *E. coli*. J. Mol. Biol. 74, 689-701 (1973).
- 127- Dubnau, E., Maas, W.K.: Inhibition of replication of an $F^{\Delta lac}$ episome in *Hfr* cells of *E. coli*. J. Bacteriol. 95, 531-539 (1968).

- 128- Watanabe, T., Takuno, T., Arai, T., Nishida, H., Sato, S.: Episome mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. X. Restriction and modification of phages by Φ -R factors. J. Bacteriol. 92, 477-486 (1966).
- 129- Smith, H. R., Humphreys, G. D., Anderson, E. S.: Genetic and molecular characterization of some non-transferring plasmids. Mol. Gen. Genet. 129, 229-238 (1974).
- 130- Heffron, F., Sublett, R., Hedges, R. W.: Origin of the TEM β -lactamase gene found on plasmids. J. Bacteriol. 122, 250 - 256 (1975).
- 131- Matthew, M., Hedges, R. W.: Analytical isoelectric focusing of R-factor determined β -lactamases. J. Bacteriol. 125, 713-727 (1976).
- 132- Percheson, P. B., Bryan, L. E.: Penicillin-binding components of penicillin-susceptible and resistant strains of streptococcus pneumoniae- Antimicrob. Agents Chemother. 18, 390-396 (1980).
- 133- Scudamore, R. A., Beveridge, T. J., Goldner, M.: Outer membrane penetration barriers as components of intrinsic resistance to beta-lactam and other antibiotics in E. coli K-12. Antimicrob. Agents Chemother. 15, 182-189 (1979).
- 134- Bennett, P. M., Richmond, M. H.: Translocation of a discrete piece of DNA carrying an amp gene between replicons in E. coli. J. Bacteriol. 126, 1-6 (1976).
- 135- Arthur, L. Koch: Evolution of Antibiotic Resistance Gene Function. Microbiol. Rev. 45, 355-378 (1981).

136- Findland, M.: And the waals came tumbling Down: More anti-biotic resistance and now the pneumococcus. N.Engl.J. Med. 299, 770-771 (1978).