

YENİ BİR *SALMONELLA* TYPHIMURIUM PLAZMİDİ, pAnkS: ANTİBİYOTİK DİRENÇ GELİŞİMİNDE PLAZMİD EVRİMİNİN BİR ÖRNEĞİ*

A NOVEL *SALMONELLA* TYPHIMURIUM PLASMID, pAnkS: AN EXAMPLE FOR PLASMID EVOLUTION IN ANTIBIOTIC RESISTANCE

Fikret ŞAHİN¹, Djursun KARASARTOVA¹, Devran GERÇEKER¹, A. Derya AYSEV²,
Birsel ERDEM¹

¹ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. (fsahin29@hotmail.com)

² Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara.

ÖZET

Bu çalışmada, klinik olarak izole edilen ve ampisilin, kloramfenikol, streptomisin, sülfonamid ve tetrasikline (ACSSuT) dirençlilik fenotipi gösteren bir *Salmonella enterica* serotip Typhimurium suşundan elde edilen ve ampisilin (ampR) direnç geni taşıyan yeni bir plazmid tanımlanmaktadır. "pAnkS" (plasmid-*Ankara-Salmonella*) olarak adlandırdığımız bu plazmidin, *XmnI* enzimi ile kesimi sonucu ortaya çıkan bantlar pBSK vektörü içerisine klonlanmış, dizi analizi yapılmış ve elde edilen plazmid yapıları BLAST programı ile araştırılmıştır. pAnkS'nin dizi analizi doğrultusunda, bulundurduğu okuma çerçeveleri (open reading frame), transpozon ve ilgili gen bölgeleri analiz edilmiştir. Tüm dizi analizi sonunda plazmidin, 8271 baz çifti (bç) uzunluğunda olduğu belirlenmiştir. Yapılan analizler, pAnkS'nin daha önce tanımlanmış ve p4821 olarak bilinen plazmidi çekirdek bölge olarak bulundurduğunu; Tn3 benzeri 4950 bç uzunluğunda sol ve sağ terminal tekrarlarını ve transpozisyonla ilgili *tnpR* ve *tnpA* gen bölgelerini içerdiğini; ayrıca ampisilin direnç geni *blaTEM* gen bölgesinin mevcudiyetini ortaya koymuştur. pAnkS'nin p4821 çekirdek bölgesini ve Tn3 segmentinin belirli bölgesini taşıyan pNTP16 (bir diğer *Salmonella* Typhimurium plazmid) ile yüksek oranda homoloji gösterdiği belirlenmiştir. pNTP16'nın pAnkS'den farklı olarak Tn3 segmenti içerisinde *ampR* direnç genine ilaveten kanamisin direnç geni (*kanR*) taşıdığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak pAnkS'nin, *S. Typhimurium*'a ait tanımlanmış nadir plazmidlerden biri olarak, plazmid evrimleşmesinde p4821 ile pNTP16 arasında yer alan bir plazmid olduğu kanısına varılmış ve pAnkS'nin tanımlanmasının plazmid evriminin anlaşılmasında faydalı olacağı düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Plazmid, *Salmonella* Typhimurium, transpozon, antibiyotik direnci.

* Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda tamamlanmış ve SACEM Hayat Teknolojileri Ltd. tarafından desteklenmiştir. Çalışmanın bir bölümü XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (Aksu, Antalya, 2006)'nde sözlü olarak sunulmuştur.

ABSTRACT

In this study, a plasmid, carrying ampicillin resistance (*ampR*) gene, isolated from a clinical isolate of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium presenting ACSSuT (ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulphonamide, tetracycline) resistance phenotype, was defined. The length of complete sequence of this plasmid was 8271 base pairs (bp), and it was named as pAnkS owing to its isolation place (plasmid-Ankara- *Salmonella*). The plasmid was analyzed for potential reading frames and structural features indicative of transposons and transposon relics. The *XmnI* enzyme restriction fragments of pAnkS were cloned into *E. coli* plasmid vectors (pBSK), sequenced and analyzed with the BLAST programs. Plasmid pAnkS has contained a previously defined enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) plasmid p4821 as a core region and also contained a complete Tn3-like transposon of 4950 bp consisting of the left terminal repeat, Tn3-related *tnpR* and *tnpA* genes for transposition functions, ampicillin resistance gene *bla_{TEM}* and the right terminal repeats. pAnkS showed strong homology with another *Salmonella* plasmid, pNTP16, for sequences that belong to p4821 and partial Tn3 segments. It was found that pNTP16 also carries kanamycin resistance gene (*kanR*) in addition to *ampR* gene. Plasmid pAnkS is one of the few completely sequenced plasmids from *Salmonella* Typhimurium and is in the middle of the pathway of evolution of plasmid from p4821 to pNTP16. The identification of pAnkS might help better understanding of plasmid evolution.

Key words: Plasmid, *Salmonella* Typhimurium, transposons, antibiotic resistance.

GİRİŞ

Salmonellozis, tüm dünyada yaygın olan ve ölümle sonuçlanabilen önemli bir sağlık problemidir^{1,2}. Geçen 10 yıl içerisinde *Salmonella enterica* serotip Typhimurium'un dirençli suşlarıyla gelişen enfeksiyonlar dünyanın birçok bölgesinde artış göstermiştir³. *Salmonella* enfeksiyonlarının tedavi ve kontrolü için antibiyotik tedavisi uygulanmakta, bu uygulama da bakterinin hızlı bir şekilde antibiyotiklere direnç geliştirmesine neden olmaktadır^{4,5}. Birçok bakteride direnç, hareketli genlerin taşınması ile ortaya çıkar. Genlerin taşınması genel olarak bakteriyofaj, transpozon ve plazmidler ile gerçekleşir⁶. Özellikle beta-laktamlar ve tetrasiklin direnci taşıyan gram-negatif bakterilerde bu direnç transpozonlar tarafından horizontal olarak taşınmaktadır⁷. *bla_{TEM}*-1 geni T3 transpozonunda sık olarak konjugatif olan veya olmayan plazmid içerisinde ya da kromozomda sık olarak gösterilmiştir^{7,8}. Bu transpozonla dirençlilik taşıyan genetik oluşumların bazıları tamamen, bazıları ise kısmi dizi analizleri ile tanımlanmışlardır^{7,8}.

Bu çalışmada, klinik olarak izole edilen ve ampisilin, kloramfenikol, streptomisin, sülfonamid ve tetrasikline (ACSSuT) dirençlilik fenotipi gösteren bir *Salmonella enterica* serotip Typhimurium suşunda, çoklu direnç kaynağının araştırılması sırasında, ampisilin (amp) dirençlilik geni taşıyan bir plazmid izole edilmiş ve tüm plazmidin genom dizi analizi yapılarak bulundurduğu gen bölgeleri tanımlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

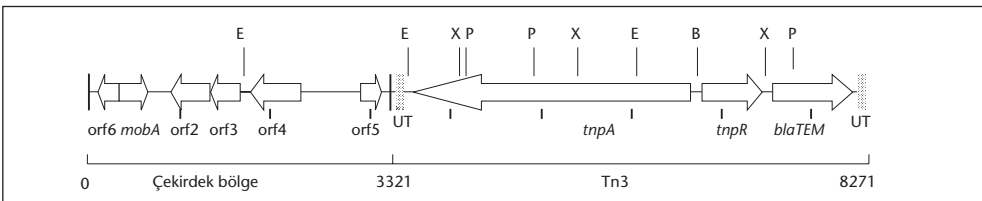
Bu çalışma, Ankara'da gastroenteritli bir hastadan izole edilen *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotip Typhimurium suşu ile gerçekleştirildi. İzolat "L-broth" (%1 w/v NaCl, %1 w/v'lik tripton, %0.5 maya özeti, pH: 7.5) içerisinde üretildi; plazmid DNA'sı alkali lizis yöntemiyle elde edildi ve daha sonra saflaştırıldı⁹.

Elde edilen plazmid, *Bam*H1, *Sall*, *Not* I, *Eco*RI, *Eco*RV ve *Xmn*I restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra, *Xmn*I ile kesim parçaları dizi analizleri için en uygunu olarak belirlendi. Plazmide ait üç parça ayrı ayrı pBSK (+) (Invitrogen, Groningen, Hollanda) klonlama vektörüne klonlandı; *Escherichia coli* DH5'e transforme edildi ve çoğaltıldı. Agaroz jelden DNA parçalarının saflaştırılması Gene-Clean kit (GeneMark, Hopegen Biotechnology, Çin) gen temizleme kiti ile sağlandı. Ligasyon ve transformasyon yöntemleri için standart moleküler biyoloji teknikleri kullanıldı⁹. Dizi analizlerine, pBSK vektöründe bulunan M13 "sense" ve "antisense" primerlerine uygun bölgelerden başlandı ve devam eden dizilimler "primer walking" adı verilen yöntemle, belirlenen dizilimler üzerinden seçilen primerler ile yapıldı¹⁰. Nükleotid dizi analizi, BigDye Terminator (PE Applied Biosystems), Sequencing Chemistry Automatic DNA Sequencer ABI 377 (Applied Biosystems) kullanılarak "primer walking" yöntemiyle tamamlandı.

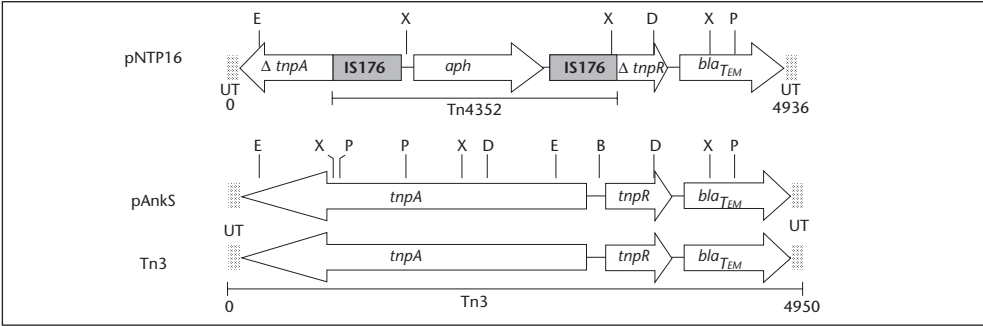
Dizilimlerin genetik analizi; BLAST programları olan blastn ve blastp (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) ORF Finder programı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) kullanılarak yapıldı. pAnkS'nin tamamlanmış nükleotid dizilimi, ulaşım numarası DQ916413 olarak GenBank veri bankasına (GenBank Data Base Center) kaydedildi.

BULGULAR

*Eco*RV ve *Xmn*I enzimlerinin plazmidi üç bölgeden ve *Bam*H1 enziminin tek bir bölgeden kestiği belirlenmiş, *Xmn*I'nin oluşturduğu bantların dizi analizlerine uygunluğu nedeniyle pBSK vektörü içerisine klonlanmıştır. Tüm dizi analizi sonunda, incelenen plazmidin 8271 baz çifti (bç)'nden oluştuğu ve daha önce tanımlanmamış yeni bir plazmid olduğu belirlenmiştir. Bu plazmid "pAnkS" (plazmid-Ankara-Salmonella) olarak adlandırılmış ve GC oranı %47 olarak saptanmıştır. pAnkS tüm dizi analizi, BLAST programı kullanılarak ortak homoloji gösteren diğer genomlarla kıyaslanmıştır. pAnkS'nin çekirdek bölgesinin, *S. Typhimurium*'un diğer bir plazmidi olan pNTP16'nın çekirdek bölgesi ile %99.8 ve enterohemorajik *E. coli* (EHEC) 0157:H7 plazmidi olan p4821 ile %98 benzer olduğu bulunmuştur. pAnkS'nin tüm genomu, bulundurduğu gen bölgeleri ve oryantasyonları, çekirdek bölgesi ve Tn3 transpozonu çizgisel olarak haritalandırılmıştır (Şekil 1). pAnkS'nin 3321-8271 dizilimleri arasında bulunan Tn3 benzeri bölgenin daha önce *S. Typhimurium* plazmidi olarak tanımlanan pFPTB1'de belirtilen Tn3 bölgesi ile %99.5 oranında benzerlik gös-



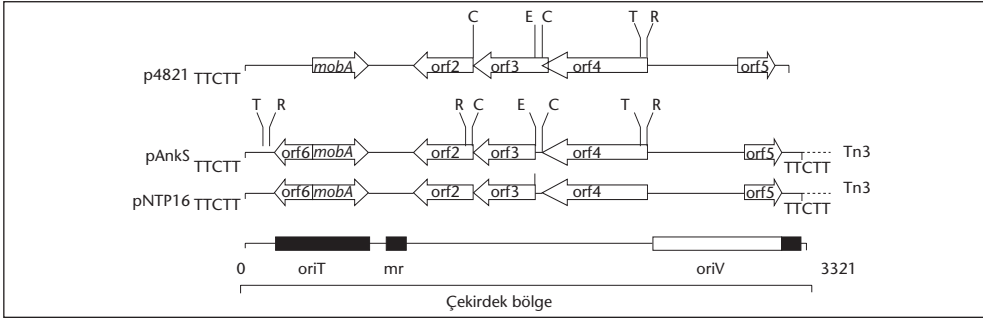
Şekil 1. pAnkS'nin çizgisel haritası. Plazmid üzerindeki *Eco*RV (E), *Xmn*I (X), *Pst*I (P), *Bam*HI (B) enzim kesim bölgeleri belirtilmiştir. ORF ve diğer plazmid bölgelerinin rölâtif büyüklükleri ve oryantasyonları oklarla belirtilmiştir. Siyah beyaz çizgili dikdörtgenler, uç tekrar bölgelerini şematize etmektedir. Dik siyah çizgiler, TTCTT dizilim bölgelerini göstermektedir.



Şekil 2. Tn3 (genbank ulaşım no: AJ634602), pNTP16 Tn3 (genbank ulaşım no: N L05392) ve pAnkS Tn3 bölgelerinin kıyaslamalı analizi. Plazmid üzerindeki EcoRV (E), XmnI (X), PstI (P), BamHI (B), Drall (D) enzim kesim bölgeleri belirtilmiştir. ΔtnpA ve ΔtnpR tam olmayan tnpA ve tnpR bölgelerini göstermektedir. Siyah beyaz çizgili dikdörtgenler uç tekrar bölgelerini şematize etmektedir. İçinde zıt olarak yerleşmiş IS176 bölgesi ve kanamisin dirençlilik geni (aph) pNTP16'nın çizgisel haritası üzerinde belirtilmiştir.

terdiği tespit edilmiştir (Şekil 2). pAnkS'de çekirdek bölgesinin iki taraftan 5'-TTCTT-3' kısa tekrarlarla çevrili olduğu; bu dizilimin p4821 ve pNTP16 plazmidlerinde de bulunduğu belirlenmiştir. pAnkS'nin 4950 bç'lik bölümünün, beta-laktamaz kodlayan bla_{TEM} geni ve Tn3 fonksiyonları için gerekli olan tnpA ve tnpR genleri ile sağ ve sol uç tekrar (UT) bölgelerini bulundurduğu görülmüştür. pAnkS'nin kodladığı 286 aminoasitlik bla_{TEM} geninin, daha önce belirlenmiş olan TEM geni genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz (GenBank accession no. DQ221256) ile aynı dizilimde olduğu saptanmıştır.

pAnkS çekirdek bölgesinin analizi sonucu, bu bölgenin beş okuma bölgesi (open reading frame; orf) bulundurduğu belirlenmiştir. Bunların bazılarının başlangıç noktaları ve oluşturdukları ürünlerin belirgin olmasına karşın, diğerlerinin farklı başlama kodonlarının varlığı nedeniyle gen bölgeleri ve oluşturdukları proteinleri kesinleştirmek mümkün olmamıştır. Orf 1'in altı farklı başlangıç noktası içermesine karşın, sadece en küçük olanı (pAnkS'da 417-737, pNTP16'de 1810-2130, p4821'de 408-731) tahmini Shine-Dalgarno başlangıç dizilimi bulundurmaktadır. Bu bölgenin GenBank veri tabanı kütüphanesi ile yapılan homoloji araştırması; *S. Typhimurium* plazmid olan pNTP16 mobA geni ile %100 ve p4821'in mobA geni ile %98.8 benzer olduğunu göstermiştir. 381 bç uzunluğundaki Orf 2 bölgesinin (972-1352), pNTP16 ve p4821 genlerine benzer olduğu ve 126 aminoasit uzunluğunda bir proteini kodladığı bulunmuştur. Orf 3'ü oluşturan başlangıç bölgesi okuma penceresi içerisinde altı farklı başlangıç noktası olabileceğinden ve hiçbirinde ribozomal bağlanma bölgesinin bulunmaması nedeniyle, bu bölgenin uzunluğu ve oluşturduğu proteinin fonksiyonu belirlenememiştir. Orf 4, pNTP16 ve p4821'de belirtilen hipotetik protein ile benzer olarak belirlenmiştir. Son orf olan ve 2992 ve 3177 dizilimlerini oluşturan bölge, pNTP16'nın hipotetik proteini ile benzer ve pNTP1'in replikasyon orijini ile ilişkili olarak saptanmıştır. pAnkS'nin 816-967 dizilimi arasındaki bölge, plazmid ColE1 cer bölgesi ile %60 oranında benzerlik göstermiştir. pAnkS'nin 190 ve 736 dizilimleri arasındaki bölge, pNTP16'nın orijin bölgesi ile aynı olup, p4821 ile yüksek homoloji göstermektedir (Şekil 3).



Şekil 3. p4821 ve pAnkS ile pNTP16'nın çekirdek bölgeleri çizgisel olarak şematize edilmiştir. Çekirdek bölge üzerindeki EcoRV (E), XmnI (X), PstI (P), ClaI (C), RsaI enzim kesim bölgeleri belirtilmiştir. ORF'lerin rölatif büyüklükleri ve oryantasyonları belirtilmiş, transfer orijini (oriT), multimer resolüsyon bölgesi (mr) ve replikasyon orijini bölgesi (oriV) kutucuklarla gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Plazmid pAnkS, *S. Typhimurium*'a ait daha önce tarif edilmemiş yeni bir plazmid olup, yapısında Tn3 transpozon ve daha önce EHEC 0157:H7'den izole edilerek tanımlanmış olan plazmid p4821'i bulundurmaktadır¹¹. p4821, plazmid olarak tarif edilen gen yapısının en basit bir şekli olup, sadece plazmidin replikasyonu, dayanıklılık ve hareketliliği ile ilgili gen bölgelerini içermektedir. Plazmid p4821'in EHEC suşlarında sık rastlanan bir plazmid olduğu belirtilmiştir¹¹. Bu bulguya ilave olarak, p4821'in *S. Typhimurium* ile ilişkili diğer plazmidler olan pNTP1 ve pNTP16 ve pAnkS'nin yapısında gösterilmesi, p4821'in filogenetik olarak oldukça eski olduğunu ve genetik transfer sonucu *Enterobacteriaceae* ailesi içindeki cins ve türlerde yayılmış olabileceğini düşündürmektedir^{12,13}.

pAnkS içinde çekirdek bölge ve transpozon iki taraftan kısa TTCTT direkt tekrar dizilimleriyle ayrılmışlardır. Bu dizilim p4821 plazmidinde bulunmakta, ancak sadece tek bir bölgede yer almaktadır. pAnkS'deki bu dizilimin çiftleşmesi, bu bölgenin transpozon için hedef bölgesi olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgu, pAnkS ile p4821 arasında görülen yüksek orandaki homolojinin, pAnkS Tn3'ünün p4821 plazmidine yerleşmesi şeklinde oluştuğunu akla getirmektedir. pAnkS ve pNTP16'nın ikisi de Tn3 transpozonunun sağ ve sol direkt tekrar bölgelerini bulundurmaktadır. pAnkS tüm Tn3 transpozonunu bulundururken, pNTP16, pAnkS'den farklı olarak Tn3 transpozonu içerisine yerleşmiş Tn4351 transpozonunu bulundurmaktadır. pNTP16'nın içerisinde bulundurduğu transpozon, Tn4351 yapısında kanamisin direnç genini (*kanR*) içermektedir. Dolayısıyla pAnkS, sadece ampisiline direnç geni (*ampR*) taşıırken, pNTP16 ampisiline ilave olarak kanamisin direnç genini de taşımaktadır¹⁴. pAnkS ve pNTP16'nın ortak olarak bulundukları ve p4821 çekirdek bölgesinin yanı sıra Tn3 transpozonuna ait *tnpA*, *tnpR*, *ampR* ile sağ ve sol terminal tekrar bölgelerinin yüksek oranda homoloji göstermeleri, pNTP16'nın *kanR* taşıyan Tn4351 transpozonunun pAnkS'deki Tn3 transpozonu içerisine yerleşmesi sonucu oluştuğunu düşündürmektedir.

p4821 plazmidinin orijinal bulunuş yerinin İngiltere olmasına karşın, diğer *Salmonella* plazmidleri olan pNTP1 ve pNTP16 Orta Doğu ülkelerinden elde edilmiştir¹⁵. Bu çalışmada tanımlanan pAnkS ise Türkiye’de bulunan ve tanımlanan yeni bir plazmidir. p4821 plazmidinin ilk olarak İngiltere’de tanımlanmış olması ve pNTP16 ile pAnkS’de yer alması, p4821’in Enterobacteriaceae ailesinde dünyada yaygın olarak bulunduğunu düşündürmektedir. Cannon ve arkadaşları⁸ pNTP16 plazmidini tanımladıklarında, pNTP16’nın doğrudan p4821 plazmidinden oluşmasının mümkün olmadığını, başka bir ara form plazmidin olması gerektiğini belirtmişlerdir. Bu bilgiden yararlanarak çalışmamızı değerlendirdiğimizde, pAnkS’nin, p4821’den pNTP16 oluşması için geçirilen evrimsel basamaklarda yer alan bir plazmid olabileceği düşünüyor; yukarıdaki verilerin doğrultusunda pAnkS’nin pNTP16 plazmidinin öncü formu olduğuna ve pAnkS’nin tanımlanmasının plazmid evriminin anlaşılmasında önemi olduğuna inanıyoruz.

KAYNAKLAR

1. Erdem B, Haşcelik G, Gedikoğlu S, et al. *Salmonella enterica* serotypes and *Salmonella* infections: a multicenter study covering ten provinces in Turkey. Mikrobiyol Bul 2004; 38: 173-86.
2. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, et al. Food-related illness and death in the United States. Emerg Infect Dis 1999; 5: 607-25.
3. Threlfall EJ. Epidemic *Salmonella typhimurium* DT 104--a truly international multiresistant clone. J Antimicrob Chemother 2000; 46: 7-10.
4. Quinn T, O’Mahony R, Baird AW, Drudy D, Whyte P, Fanning S. Multi-drug resistance in *Salmonella enterica*: efflux mechanisms and their relationships with the development of chromosomal resistance gene clusters. Curr Drug Targets 2006; 7: 849-60.
5. Salmon SA, Watts JL, Case CA, Hoffman LJ, Wegener HC, Yancey RJ Jr. Comparison of MICs of ceftiofur and other antimicrobial agents against bacterial pathogens of swine from the United States, Canada, and Denmark. J Clin Microbiol 1995; 33: 2435-44.
6. McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, et al. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. Nature 2001; 413: 852-6.
7. Pasquali F, Kehrenberg C, Manfreda G, Schwarz S. Physical linkage of Tn3 and part of Tn1721 in a tetracycline and ampicillin resistance plasmid from *Salmonella* Typhimurium. J Antimicrob Chemother 2005; 55: 562-5.
8. Cannon PM, Strike P. Complete nucleotide sequence and gene organization of plasmid NTP16. Plasmid 1992; 27: 220-30.
9. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
10. Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. Infect Immun 1995; 63: 1055-61.
11. Haarmann C, Karch H, Frosch M, Schmidt H. A 3.3-kb plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is closely related to the core region of the *Salmonella typhimurium* antibiotic resistance plasmid NTP16. Plasmid 1998; 39: 134-40.
12. Som T, Tomizawa J. Origin of replication of *Escherichia coli* plasmid RSF 1030. Mol Gen Genet 1982; 187: 375-83.
13. Grindley JN, Nakada D. The nucleotide sequence of the replication origin of plasmid NTP1. Nucleic Acids Res 1981; 9: 4355-66.
14. Wrigton CJ, Strike P. A pathway for the evolution of the plasmid NTP16 involving the novel kanamycin resistance transposon Tn4352. Plasmid 1987; 17: 37-45.
15. Lambert CM, Wrigton CJ, Strike P. Characterization of the drug resistance plasmid NTP16. Plasmid 1987; 17: 26-36.