

vanA Geninin Antisens RNA'sı Kullanılarak Vankomisine Dirençli Enterokoklarda Direnç Mekanizmasının Susturulması

Silencing of Resistance Mechanism in Vancomycin-Resistance Enterococci Using Antisense RNA of *vanA* Gene

Melis YALÇIN¹(ID), Melahat KURTULUŞ²(ID), Bülent BOZDOĞAN^{1,3}(ID)

¹ Adnan Menderes Üniversitesi, Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein Araştırma Merkezi, Aydın.

¹ Adnan Menderes University, Recombinant DNA and Recombinant Protein Research Center, Aydın, Türkiye.

² Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Gazi University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Ankara, Türkiye.

³ Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

³ Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Aydın, Türkiye.

*Bu çalışma, 34. Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi (34th ECCMID) (27-30 Nisan 2024, İspanya)'nde poster bildirisi olarak sunulmak üzere kabul edilmiştir.

Makale Atfı: Yalçın M, Kurtuluş M, Bozdoğan B. *vanA* geninin antisens RNA'sı kullanılarak vankomisine dirençli enterokoklarda direnç mekanizmasının susturulması. Mikrobiyol Bul 2024;58(2):125-134.

ÖZ

Dünya Sağlık Örgütü, antibiyotik direnci sorununu dünya çapında önemli ilk 10 sağlık tehdidi arasına dahil etmiştir. Antibiyotik direncinin taşınabilir elemanlarla bakteriler arasında yayılması nedeniyle enfeksiyon hastalıklarının tedavisi daha zor hale gelmiştir. Vankomisin dirençli enterokoklar [vancomycin-resistant enterococci (VRE)] ciddi hastane enfeksiyonlarıyla ilişkileri ve yüksek ölüm riski nedeniyle tıbbi açıdan ve halk sağlığı açısından kritik öneme sahiptir. VRE'lerin en önemli özelliklerinden biri de çoklu antibiyotik direncine sahip olmaları ve tedavi seçeneklerinin azalmasıdır. Bu nedenle yeni tedavi yöntemlerine gereksinim duyulmaktadır. *vanA* geni, vankomisin direnç mekanizmasının yapı taşı oluşturmakta ve vankomisine karşı yüksek dirence neden olmaktadır. Bu çalışmada *vanA* antisens RNA (asRNA) oluşturularak vankomisin direnç mekanizmasının nötralizasyonunu araştırmak amaçlanmıştır. Klinik örnekten izole edilen ve kültür koleksiyonumuzda bulunan *vanA* pozitif VRE50 suşu, bu suşa ait *vanA* geninin polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] yöntemiyle çoğaltılması amacıyla kullanılmıştır. Çoğaltılan *vanA* ampikonu, kullanılan primerlerde yer alan enzim kesim bölgeleri sayesinde pUC19 plazmidine invers olarak eklenmiştir. Elde edilen plazmit, gram-pozitif bakterilerde replike olabilen pAT392 plazmidi ile birleştirilmiş ve füzyon plazmit oluşturulmuştur. Oryantasyonu doğrulanan füzyon plazmit, vahşi suş VRE50'ye elektroporasyon yöntemiyle aktarılmıştır. Transforme VRE (tVRE50) ve kontrol olarak kullanılan vahşi tip VRE50 suşlarının minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri E-Test yöntemiyle belirlenmiştir. Vahşi tip VRE50 suşunun vankomisin MİK değeri 1024 µg/mL, tVRE50 suşunun ise 32 µg/mL olarak saptanmış, tVRE50 suşunun asRNA (antisens RNA) sayesinde vankomisin direncinin azaldığı tespit edilmiştir. Antisens RNA teknolojisi, genlerin ifadesinin nötralizasyonu için önemli bir yöntemdir. Bu çalışma, vankomisine direnç geninin nötralizasyonunun vankomisine dirençli enterokok suşunda daha düşük MİK değeri sağlayabileceğini ve duyarlılığın artmasına neden olabileceğini göstermiştir.

İletişim (Correspondence): Melis Yalçın, Adnan Menderes Üniversitesi, Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein Araştırma Merkezi, Aydın, Türkiye. Tel (Phone): +90 (256) 218 2000-4238, E-posta (E-mail): mels.yalcin@gmail.com

Bu yeni yaklaşım, vankomisin direnç mekanizmasını nötralize ederek VRE tedavisi için yeni bir yöntem sunmaktadır. Bu çalışmada elde edilen sonucun in vivo testlerle desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Vankomisin dirençli enterokoklar (VRE); antibiyotik direnci; minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK); vanA geni; antisens RNA.

ABSTRACT

The World Health Organization has included the problem of antibiotic resistance among the top 10 important health problems in the world. Treatment of infectious diseases has become more difficult due to the spread of antibiotic resistance between bacteria via transposable elements. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) are of critical medical and public health importance due to their association with serious nosocomial infections and high risk of death. One of the most important features of VREs is that they have multiple antibiotic resistance and treatment options are reduced. Therefore, new treatment methods are needed. The *vanA* gene constitutes the building block of the vancomycin resistance mechanism and causes high resistance to vancomycin. In this study, it was aimed to investigate the neutralization of the vancomycin resistance mechanism by creating *vanA* antisense RNA (asRNA). The *vanA* positive VRE50 strain in our culture collection which was isolated from the clinical sample, was used to amplify the *vanA* gene by polymerase chain reaction (PCR). The amplified *vanA* amplicon was inserted inversely into the pUC19 plasmid by means of the enzyme cutting sites in the primers used. The resulting plasmid was combined with the pAT392 plasmid which can replicate in gram-positive bacteria and a fusion plasmid was created. The fusion plasmid whose orientation was confirmed, was transferred to the wild strain VRE50 by electroporation method. Minimum inhibitory concentration (MIC) values of transformed VRE (tVRE50) and wild type VRE50 strains used as control were determined by the E-Test method. The vancomycin MIC value of the wild type VRE50 strain was determined as 1024 µg/mL and that of the tVRE50 strain was 32 µg/mL and it was determined that the vancomycin resistance of the tVRE50 strain decreased with asRNA (antisense RNA). Antisense RNA technology is an important method for neutralizing the expression of genes. This study showed that neutralization of the vancomycin resistance gene may provide a lower MIC value in a vancomycin-resistant enterococcus strain and lead to increased susceptibility. This new approach provides a new method for VRE treatment by neutralizing the vancomycin resistance mechanism. The result obtained in this study needs to be supported by in vivo tests.

Keywords: Vancomycin resistant enterococci (VRE); antibiotic resistance; minimum inhibitory concentration (MIC); *vanA* gene; antisense RNA.

GİRİŞ

Enterokoklar, doğal floranın bir parçası olarak insan ve hayvanların bağırsaklarında yaşayan, gram-pozitif, katalaz-negatif, spor oluşturmeyen, fakültatif anaerobik bakterilerdir¹. Ancak endokardit, idrar yolu enfeksiyonları ve cerrahi yara enfeksiyonlarına neden olur ve mortaliteyi artırır¹. Bilinen tüm enterokoklar arasında *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* hastanelerde özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastaları enfekte eden en önemli türlerdir². Genel olarak enterokoklar β-laktamlara (özellikle sefalosporinler ve penisilinaze dirençli penisilinlere), düşük konsantrasyondaki aminoglikozidlere ve klindamisin ve trimetoprim-sülfametoksazol gibi antibiyotiklere karşı dirençlidir. Ayrıca transpozon ve plazmit gibi hareketli elementler sayesinde yüksek düzeyde aminoglikozit, glikopeptitler (vankomisin, teikoplanin), tetrasiklin, eritromisin ve organizmaların özünde dirençli olmadığı diğer antibiyotik sınıfları dahil olmak üzere pek çok antibiyotiğe direnç kazanabilirler³.

Vankomisin direnci, çoğu antibiyotige doğal olarak dirençli olan enterokokların neden olduğu enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır⁴. *vanA* gen kompleksi, vankomisin dirençli enterokoklarda (VRE) en sık görülen direnç mekanizmalarından biridir ve yüksek düzeyde vankomisin direncine neden olur. *vanA* geni, D-Ala-D-Lac dipeptidinin sentezinden sorumlu ligaz enzimini kodlar. Bu dipeptit, peptidoglikan hücre duvarı öncüsünün ucuna bağlanır ve vankomisin peptidoglikan öncülünün bağlanmasını sınırlar⁵. *vanA* gen kümesi, transpozon Tn1546 genetik elemanında bulunur. *vanA* fenotipi hem vankomisine [minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) > 64 mg/mL] hem de teikoplanine (MİK > 16 µg/mL) direnç sağlar ve tüm genotipler arasında baskındır¹.

VRE'lerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde antibiyotik seçenekleri sınırlıdır ve linezolid tek başına veya gentamisin, doksisisiklin veya rifampisin ile kombinasyon halinde kullanılan tek FDA onaylı ajandır⁵. Ancak bakteriyostatik etkili linezolidin VRE bakteriyemisini tedavi etmede yetersiz olabileceğini öne süren son veriler, linezolidin yan etkileri ve linezolid dirençli VRE suşlarının ortaya çıkması tedavi için linezolid kullanımını belirgin şekilde kısıtlamaktadır⁶⁻⁸. Son yıllarda, hastanede yatan hastalardan elde edilen verilere göre, yüksek düzey aminoglikozit direnci [high-level aminoglycoside resistance (HLAR)] prevalansı yüksek olan enterokok türlerinin vankomisin ve linezolid gibi daha güçlü antibiyotiklere karşı direnç geliştirdiği gözlemlenmiştir. Bu tür izolatların, sınırlı terapötik seçeneklere sahip olması, endişe verici bir duruma yol açmaktadır ve bu da yeni tedavi yöntemleri arayışına neden olmaktadır.

Genomik dizileri değiştirmeyen, bunun yerine mRNA'nın translasyon düzeyinde koşullu baskılanması yoluyla gen ekspresyon profilini değiştiren yeni bir yaklaşım ortaya çıkmıştır. Bu gen susturma veya gen yıkımı, antisens RNA'lar (asRNA'lar) tarafından gerçekleştirilir⁹. Kodlamayan bir asRNA, baz eşleşmesi yoluyla hedef haberci RNA'ya (mRNA) bağlanabilir ve bunların etkileşimi, bir RNA dubleks yapısı oluşturur. Bu asRNA'dan türetilen dubleks kompleks, genellikle mRNA transkripsiyonunu veya translasyonunu inhibe eder ve düzenleyici işlevleri yerine getirir¹⁰.

Bu çalışmada, *vanA* komplementer RNA (*vanA* asRNA) üreten gen dizisinin transforme edilen vankomisin dirençli VRE50 suşunun direnç mekanizmasının nötralizasyon etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

vanA Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Amplifikasyonu

vanA amplikonu, REDPROM koleksiyonundan alınan klinik örnekten izole edilen ve MİK değerini 1024 µg/mL olarak belirlediğimiz *vanA* pozitif *Enterococcus faecium* VRE50 izolatından polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] yöntemiyle çoğaltıldı. Bu çalışmada amplifikasyon için EcoRI ve HindIII enzim kesim bölgelerine sahip iki primer tasarlandı. PCR yönteminde *vanAEco* primeri: 5'-TTA GAA TTC AAC ATT AAA AAC TGT TTG G-3' ve *vanAHind* primeri: 5'-TAT AAG CTT GCG TCC CAA CGA ACA CCG TG-3' kullanıldı. PCR koşulları 95 °C'de 5 dakika denatürasyonun ardından

35 döngü (94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 50 °C'de 30 saniye primer bağlanması, 72 °C'de 90 saniye polimerizasyon) amplifikasyon ve 72 °C'de 10 dakika son uzama olarak gerçekleştirildi. PCR amplikonu, %1 agaroz jelde elektroforez yöntemiyle incelendi.

vanA Amplikonunun pUC19 Plazmidine Klonlanması

Hem amplikon hem de pUC19 plazmidi, EcoRI ve HindIII enzimleriyle kesildi ve daha sonra T4 DNA Ligaz (Thermo Scientific, ABD) enzimi kullanılarak gece boyunca 16 °C'de bırakıldı. Antisens RNA oluşması için enzim kesim bölgeleri sayesinde pUC19 plazmidine vanA geninin ters oryantasyonda ligasyonu yapıldı. vanA amplikonunu içeren pUC19 plazmidi, ısı şoku yöntemiyle *Escherichia coli* DH10B kompetan hücrelerine transfer edildi¹¹. 37 °C'de bir saatlik inkübasyon süresinden sonra transformantlar, 100 µg/mL ampisilin, 50 µg/mL X-Gal ve 500 uM IPTG (izopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit) içeren triptik soy agar (TSA) ortamına ekildi. Mavi-beyaz tarama yöntemiyle içine DNA parçası alan beyaz koloniler seçildi ve vanAEco ve vanAHind primerleri kullanılarak koloni PCR yapıldı ve doğrulanan koloniler daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de stoklandı.

pUC19 ve pAT392 Plazmitleri ile Füzyon Plazmit Oluşturulması ve *E.coli* DH10B Kompetan Hücrelerine Transformasyonu

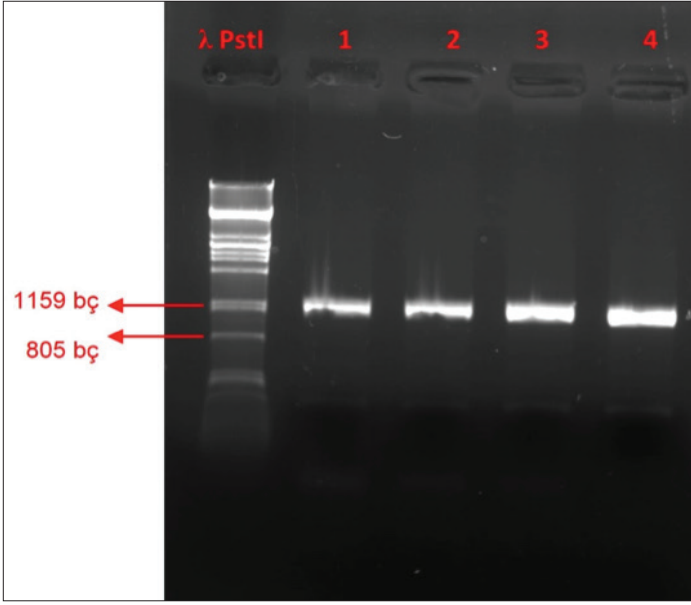
Gram-pozitif bakteride replikasyonu olabilen pAT392 plazmidi, vanA amplikonu içeren pUC19 plazmidiyle birleştirilip füzyon plazmit oluşturuldu. Bu amaçla önce komplementer vanA genini içeren pUC19 plazmidi ile pAT392 plazmidi, EcoRI enzimi kullanılarak kesildi ve iki plazmidin ligasyonu, T4 DNA Ligaz (Thermo Scientific, ABD) enzimiyle yapıldı. Oluşturulan füzyon plazmidinin öncelikle ısı şoku yöntemiyle *E.coli* DH10B kompetan hücrelerine transformasyonu yapıldı¹¹. Füzyon plazmidi oluşturan pAT392 plazmidi için 100 µg/mL gentamisin ve pUC19 plazmidi için 100 µg/mL ampisilin antibiyotiklerini içeren seçici ortam kullanıldı. *E.coli* suşuna transformasyonu yapılan füzyon plazmit seçilimi bu iki antibiyotik kullanılarak yapıldı ve oluşan koloniler seçildi. Füzyon plazmidi, pUC19 ve pAT392 plazmitlerinin oryantasyonunu incelemek için BamHI ve HindIII restriksiyon enzimleri kullanılarak doğrulama yapıldı. Bant profilleri %1 agaroz jeli ile elektroforez yoluyla analiz edildi.

VRE Suşuna Transformasyon

Doğrulanmış füzyon plazmidi, elektroporasyon yöntemiyle VRE50 suşuna aktarıldı¹¹. Bu yöntem için Gene Pulser Xcell (Bio-Rad, ABD) kullanılarak 2.50 kV, 200 Ω ve 25 µF koşulları uygulandı. Bakterinin seçici olarak tespiti için 100 µg/mL gentamisin antibiyotigi içeren TSA ortamı kullanıldı.

Antibiyotik Duyarlılık Testi

Füzyon plazmidiyle transforme edilmiş VRE50 (tVRE50) ve kontrol olarak kullanılan vahşi tip VRE50 suşları, triptik soy agar besiyerinde üretildi ve antibiyotik duyarlılıkları van-komisin E-Test (AB Biodisk) ve disk difüzyon testi (Oxoid, Thermo Scientific™ CT0058B, ABD) ile analiz edildi. Transforme edilmemiş vahşi tip VRE50 suşu kontrol olarak kullanıldı ve tVRE50 suşunun antibiyotik duyarlılığı vahşi tip VRE50 suşu ile karşılaştırıldı.



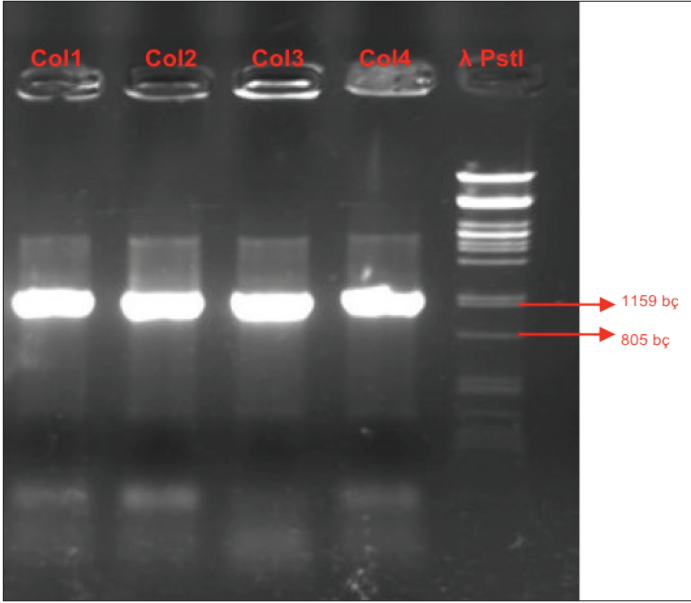
Şekil 1. *vanA* geninin PCR yöntemiyle amplifiye edilmesinden elde edilen elektroforez görüntüsü. Lambda DNA-PstI belirteçi olarak kullanılmış ve dört amplicon elde edilmiştir. Ampliconların boyutu ~1100 baz çiftidir.

BULGULAR

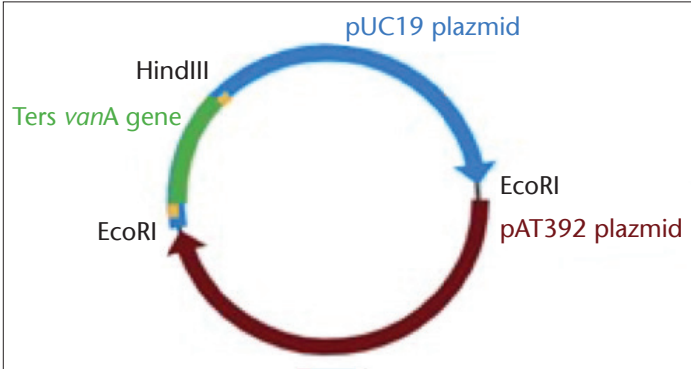
Çoğaltılan *vanA* genine ait elektroforez sonuçları Şekil 1’de gösterilmiştir. Elde edilen plazmidin ısı şoku yöntemiyle *E.coli* DH10B kompetan hücrelerine aktarılmasının ardından ampisilin içeren besiyerinde oluşan kolonilerden seçilen dördünün (col1, col2, col3 ve col4) doğrulanması yapılmıştır (Şekil 2). Elde edilen bantlar *vanA* ampliconuyla aynı boyutta elde edilmiştir.

Tamamlayıcı *vanA* ampliconunu içeren pUC19 plazmidi ve pAT392 plazmidi kullanılarak oluşturulan füzyon plazmidi Şekil 3’te gösterilmektedir. Şekil 4’te füzyon plazmidinin BamHI ve HindIII enzimleriyle kesilmesi sonucu elde edilen bant profilleri gösterilmektedir. X ve Y, iki farklı koloninin plazmitlerini temsil etmektedir. Oluşan bantlar 800, 1600, 2500, 3000 ve 4700 bp boyutunda olup ligasyonun doğru yönde olduğunu göstermektedir. İki plazmit aynı bant profilini göstermektedir ve bir tanesiyle devam edilmiştir. Devam edilmesi için belirlenen X füzyon plazmidinin, VRE50 klinik suşuna aktarılmasından sonra yapılan plazmit izolasyonu BamHI ve HindIII enzimleri ile kesilerek doğrulanmıştır.

Transforme VRE50 suşunun (tVRE50) vankomisin duyarlılığının vahşi VRE50 suşu ile karşılaştırılması sonucunda vahşi VRE50 suşunun vankomisine karşı yüksek direnç (1024 µg/mL) göstermesine karşın, tVRE50 suşunun vankomisine duyarlılığı 32 µg/mL olarak saptanmış ve disk difüzyon testiyle zon çapı 15 mm olarak ölçülmüştür (Şekil 5).

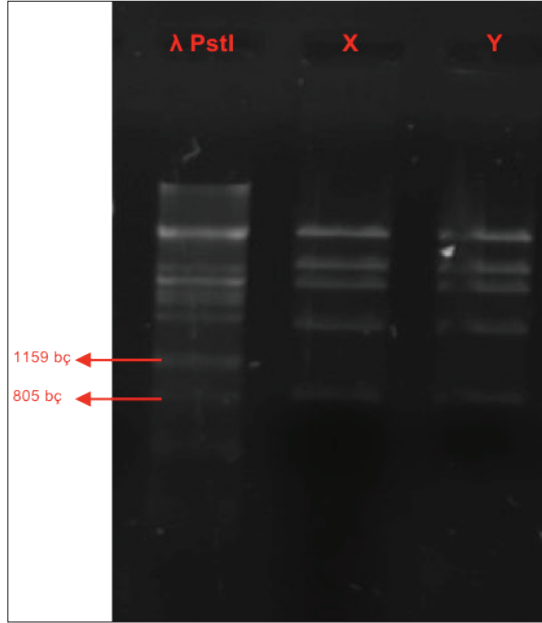


Şekil 2. Klonlanmış komplementer vanA geninin koloni PCR sonucunun elektroforez görüntüsü. pUC19 plazmidinin *E.coli* DH10B kompetan hücrelerine transformasyonun ardından dört koloni seçilerek koloni PCR yapılmıştır. Seçilen koloniler col1, col2, col3 ve col4 olarak adlandırılmış ve belirteç olarak Lambda DNA-PstI kullanılmıştır. Elde edilen bantlar ampikonla aynı boyuttadır ve boyutu ~1100 baz çiftidir.



Şekil 3. Oluşturulan füzyon plazmit haritası. pUC19 plazmidini mavi ve pAT392 plazmidini kahverengi olarak gösterilmiştir. Komplementer vanA ampikonu, yeşil olarak gösterilmiştir.

Füzyon plazmidinde bulunan tamamlayıcı vanA geni sayesinde tVRE50 suşunda antisens vanA RNA üretimi gerçekleşmiş ve bu asRNA, tVRE50 suşu vahşi VRE50 suşu ile karşılaştırıldığında yaklaşık 32 kat vankomisine hassasiyet kazanmış ve vankomisine duyarlılık sağlamıştır.

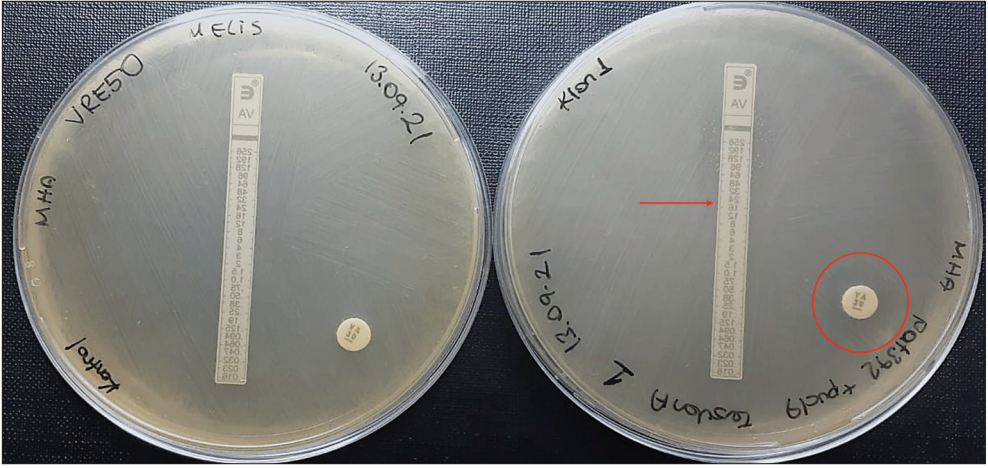


Şekil 4. *pUC19, komplementer vanA ve pAT392 ile oluşturulan füzyon plazmit E.coli DH10B bakterisine aktarılmış ve seçici besiyerinden iki koloni alınarak plazmitlerinin oryantasyonunu doğrulamak için enzim kesim profilleri incelenmiştir. Bu kolonilerden elde edilen X ve Y füzyon plazmitlerinin enzim kesim profilleri BamHI ve HindIII enzimleri kullanılarak incelenmiştir. Oluşan bant profilleri; 800, 1600, 2500, 3000 ve 4700 baz çifti boyutundadır ve oryantasyonunu doğrulamaktadır. Belirteç olarak Lambda DNA-PstI kullanılmıştır.*

TARTIŞMA

Bilinçsiz antibiyotik tüketimi, yüksek antibiyotik direncine sahip bakterilerin artmasına ve farklı antibiyotiklere karşı direnç gelişmesine neden olmaktadır. Bu nedenle antibiyotik kullanımın kontrolü ve antibiyotik direnç genlerinin ortadan kaldırılması önem kazanmıştır¹².

Gen susturma, hedeflenen genler büyüme için gerekli olan genler olsa bile uygulanabilir; üstelik koşullu veya tersine çevrilebilir gen susturulması kolaylıkla gerçekleştirilebilir. Bu çalışmada direnç geninin ekspresyonu engellenmemiş, yani susturulmamış ama komplementer sekans ile nötralize edilmiştir. mRNA düzeyinde hedef diziyeye komplementer olarak bağlanan asRNA'lar nötralizasyon işlemini yaparak bloklama görevi görmüştür. Antisens RNA ve RNA girişimi (RNAi) aracılı gen susturma, ökaryotlarda kullanılan popüler tekniklerdir ancak bakterilerde RNAi mekanizması yoktur ve bu nedenle ekspresyon vektörlerinden eksprese edilen tek sarmallı antisens RNA'lar (asRNA'lar), nötralizasyon



Şekil 5. Füzyon plazmidinin VRE50 suşuna transformasyonundan sonra antibiyotik duyarlılık testi. A paneli vahşi tip VRE50 test sonuçlarını, B paneli ise transforme VRE50 (tVRE50) test sonuçlarını göstermektedir. Duyarlılık analizi için vankomisin E-Testi ve disk difüzyon testi kullanılmıştır. Diskteki vankomisin duyarlılığının görüntüsü sağ taraftaki petri kabında daireyle ve E-Test için okla gösterilmiştir. Antisens vanA RNA'sını içeren tVRE50 suşunda vankomisin MİK değeri 1024 µg/mL'den 32 µg/mL'ye düşmüştür ve zon çapı 15 mm olarak belirlenmiştir.

için sıklıkla kullanılır¹³. Bu yöntem aynı zamanda antibiyotik direnç genlerinin ifadelerinin engellenmesi için de yardımcı olabilir.

E. coli ile yapılan bir çalışmada 400 nükleotit uzunluğunda hedefe mutlak tamamlayıcı olarak bir asRNA tasarlanmıştır. Bu asRNA'nın, hedef DNA'nın transkripsiyon düzeyini etkilemezken translasyon düzeyinde bozukluk oluşturduğu bulunmuştur. Bu yöntemin *E. coli* ve diğer bakteriler üzerinde gen işlevi inceleme çalışmalarında yararlı olabileceği vurgulanmıştır¹⁴.

Meng ve arkadaşları 2015'te yaptıkları bir çalışmada klinik olarak izole edilmiş patojenik metisilin-dirençli stafilokoklarda, *mecA* mRNA'nın ekspresyonunu inhibe etmek için anyonik bir lipozom içinde kapsüllenmiş spesifik anti-*mecA* antisens tiyofosfat oligonükleotit (PS-ODN) tasarlamışlardır. Anti-*mecA* PS-ODN'nin *mecA* ekspresyonunu inhibe edip edemeyeceği ve ardından bu suşları β-laktam antibiyotiklere duyarlı hale getirip getiremeyeceği incelenmiştir. Bu antisens sekansı ile tedavi edilen iki klinik suş, mevcut β-laktam antibiyotiklerine karşı duyarlı hale gelmiş ve bu suşların üremesi, in vitro ve in vivo olarak oksasilin tarafından inhibe edilmiştir¹⁵.

Literatürdeki bir çalışmada 450 baz çifti [base pair (bp)] civarında *vanH* promoteri ve 1000 bp civarında *vanA* direnç geni çoğaltılmıştır. *vanA* geni ve antisens oryantasyonu pAM401 plazmidine klonlanmıştır. asRNA aracılı gen susturma, klinik *E. faecalis* izolatu üzerinde incelenmiştir. Çalışmada *vanH* promoteri-*vanA* antisens ve *vanH* promoteri-*vanA* geninin elektrotransformasyonundan sonra, vankomisin MİK sonuçları karşılaştırılmıştır. Sonuçlara göre *vanH* promoter-*vanA* antisens MİK değerini 512 µg/mL'den 2 µg/mL'ye

düşürmüştür. 2001 yılında yapılan bu çalışmada asRNA ile VRE suşunda vankomisin duyarlılığının arttığı vurgulanmıştır¹⁶. Torres Viera ve arkadaşları¹⁶ bu çalışmada *vanH* promoterle sens ve antisens *vanA* geni kullanmış fakat antisens *vanA* geninin tek başına etkinliğine bakmamışlardır.

Bu çalışmada *vanA* geninin asRNA'sı üretilmiş ve bu asRNA, VRE suşunda vankomisin duyarlılığında kısmi artış sağlamıştır. Füzyon plazmidinde bulunan tamamlayıcı *vanA* geni asRNA'yı oluşturmuş ve hedef RNA'yı nötralize etme görevi görmüştür. Böylece vahşi tip VRE50 klinik suşunun vankomisin MİK değeri 1024 µg/mL'den transformasyon sonrasında 32 µg/mL'ye düşmesi sonrasında vankomisin duyarlılığında kısmi artışı gerçekleşmiştir. Transforme edilmemiş vahşi suş VRE50 suşu ile tVRE50 suşu karşılaştırıldığında, tVRE50 suşunun duyarlılığı yaklaşık 32 kat artmıştır.

asRNA sistemi, hedef genin susturulmasını veya bloke edilmesini sağlamak için kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışma aynı zamanda vankomisin dirençli enterokoklardan vankomisine duyarlı enterokokların elde edilmesi açısından önemli bir çalışmadır ve *vanA* geninin asRNA'sı vankomisin duyarlılığının kısmi oranda restorasyonunu sağlamaktadır. Hem vankomisin direnç mekanizması hem de asRNA oluşumuyla restorasyon sağlandığı için kısmi restorasyon oluşmuştur. Oluşturulan vektörden elde edilecek *vanA* asRNA kullanılarak vankomisin dirençli enterokokların tedavisinde vankomisin kullanımı sağlanabilecek ve tedavi yolu oluşacaktır. Çalışma sonuçları asRNA'ların dirençli bakterilerde antibiyotik duyarlılığının arttırılmasına yönelik ileri çalışmalara öncü olabilecektir.

TEŞEKKÜR

Sorumlu yazar, Türkiye'deki doktora çalışması sırasında YÖK 100/2000 ve TÜBİTAK-BİDEB 2211-C burs programı tarafından desteklenmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, insan ve hayvan deneyleri içermediğinden etik kurul onayı gerektirmemiştir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Ranotkar S, Kumar P, Zutshi S, Prashanth KS, Bezbaruah B, Anand J, et al. Vancomycin-resistant enterococci: Troublemaker of the 21st century. *J Glob Antimicrob Resist* 2014; 2(4): 205-12. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2014.04.002>
2. Said MS, Tirthani E, Lesho E. Enterococcus infections. In *StatPearls*. StatPearls Publishing 2022.
3. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(4): 686-707. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.686>
4. Guffey AA, Loll PJ. Regulation of resistance in vancomycin-resistant enterococci: The VanRS two-component system. *Microorganisms* 2021; 9(10): 2026. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102026>
5. Patel A, Vaghasiya H. Vancomycin resistant enterococci (VRE): A challenge to researchers and clinicians. *J Cell Tissue Res* Vol 2021; 21(1): 7063-7.

6. Contreras GA, Munita JM, Arias CA. Novel strategies for the management of vancomycin-resistant enterococcal infections. *Curr Infect Dis Rep* 2019; 21(7): 22. <https://doi.org/10.1007/s11908-019-0680-y>
7. Chua WC, Zaidah AR. First reported cases of linezolid-resistant vancomycin-resistant enterococci in South-East Asia: A report of three cases and literature review. *Proceedings of Singapore Healthcare* 2021; 30(4): 309-12. <https://doi.org/10.1177/2010105820978666>
8. Yadav G, Thakuria B, Madan M, Agwan V, Pandey A, et al. Linezolid and vancomycin resistant enterococci: A therapeutic problem. *J Clin Diagn Res* 2017; 11(8): GC7-GC11. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/27260.10474>
9. Nakashima N, Miyazaki K. Bacterial cellular engineering by genome editing and gene silencing. *Int J Mol Sci* 2014; 15(2): 2773-93. <https://doi.org/10.3390/ijms15022773>
10. Saberi F, Kamali M, Najafi A, Yazdanparast A, Moghaddam MM. Natural antisense RNAs as mRNA regulatory elements in bacteria: A review on function and applications. *Cell Mol Biol Lett* 2016; 21: 6. <https://doi.org/10.1186/s11658-016-0007-z>
11. Sambrook J., Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. A. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001, New York.
12. Zhang R, Yang S, An Y, Wang Y, Lei Y, Song L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in landfills: A review. *Sci Total Environ* 2022; 806: 150647. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150647>
13. Alshaer W, Zureigat H, Karaki AA, Al-Kadash A, Gharaibeh L, Hatmal MM, et al. siRNA: Mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches. *Eur J Pharmacol* 2021; 905: 174178. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174178>
14. Magistro G, Magistro C, Stief CG, Schubert S. A simple and highly efficient method for gene silencing in *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods* 2018; 154: 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.10.003>
15. Meng J, He G, Wang H, Jia M, Ma X, Da F, et al. Reversion of antibiotic resistance by inhibiting *mecA* in clinical methicillin-resistant *Staphylococci* by antisense phosphorothioate oligonucleotide. *J Antibiot* 2015; 68: 158-64. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.132>
16. Torres Viera C, Tsiodras S, Gold HS, Coakley EP, Wennersten C, Eliopoulos GM, et al. Restoration of vancomycin susceptibility in *Enterococcus faecalis* by antiresistance determinant gene transfer. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(3): 973-5. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.973-975.2001>