

# Streptomisin'in *Klebsiella aerogenes*'de Spontan Mutasyonların Hızı ve Moleküler Spektrumuna Etkisinin *In Vitro* Değerlendirilmesi

## *In Vitro* Evaluation of the Effect of Streptomycin on the Rate and Molecular Spectrum of Spontaneous Mutations in *Klebsiella aerogenes*

Sibel Küçükyıldırım <sup>®</sup>

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara

### Öz

**Amaç:** Hastalık etkeni bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç kazanması önemli bir halk sağlığı sorunudur. Ancak, antibiyotiklere maruz kalmanın bakterilerde özellikle uzun dönemde neden olduğu etkiler ve bu durumun antibiyotik dirençliliğinin kazanılmasındaki rolü üzerine bilgilerimiz halen sınırlıdır. Her ne kadar, antibiyotik kullanımının bakterilerde mutasyon hızını arttırdığı biliniyor olsa da, spontan mutasyonların spektrumu ve antibiyotik dirençliliğini artırıcı etkisi kesin değildir.

**Yöntem:** Bu çalışmada, uzun dönemli düşük dozda streptomisin uygulamasının *Klebsiella aerogenes*'de spontan mutasyon hızı ve spektrumuna etkisini araştırmak amacıyla mutasyon biriktirme ve yeni nesil tüm genom dizileme teknikleri kullanılmıştır.

**Bulgular:** Elde edilen sonuçlar, streptomisin antibiyotiğinin *Klebsiella aerogenes* bakterisinde mutasyon hızını arttırdığını doğrulamaktadır.

**Sonuç:** Bu çalışma ile antibiyotiklerin bakterilere yalnızca antibiyotiğin hedefi olma ya da olmama yönünde bir seçilimsel zorluk yaratmadığı aynı zamanda bakteri için yararlı olacak mutasyonların hızını artırarak da bakterilerin adaptasyonunu hızlandırdığı ortaya konulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Antibiyotik direnci, *Klebsiella aerogenes*, streptomisin, mutasyon hızı, mutasyon spektrumu, mutasyon biriktirme

### Alındığı tarih / Received:

03.11.2019 / 03.November.2019

### Kabul tarihi / Accepted:

12.02.2020 / 12.February.2020

### Yayın tarihi / Publication date:

30.09.2020 / 30.September.2020

### ORCID Kaydı

S. Küçükyıldırım 0000-0003-2241-3060

✉ sibelkucukyildirim@gmail.com

**Atıf:** Küçükyıldırım S. Streptomisin'in *Klebsiella aerogenes*'de spontan mutasyonların hızı ve moleküler spektrumuna etkisinin *in vitro* değerlendirilmesi. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2020;50(3):156-63.

### ABSTRACT

**Objective:** Gaining resistance to antibiotics is a major public health problem. However, our knowledge of the long-term effects of exposure to antibiotics, particularly on bacteria, and the role of this in the acquisition of antibiotic resistance remains limited. Although the use of antibiotics is known to increase the rate of mutation in bacteria, the spectrum of spontaneous mutations and the effect of increasing antibiotic resistance is not certain.

**Method:** In this study, mutation accumulation and next generation whole genome sequencing techniques were used to investigate the effect of long-term low dose streptomycin on spontaneous mutation rate and spectrum in *Klebsiella aerogenes*.

**Results:** The results confirm that streptomycin antibiotic increases the rate of mutation in *Klebsiella aerogenes* bacteria.

**Conclusion:** With this study, it has been shown that antibiotics not only cause a selective difficulty for bacteria to or not to become the target of the antibiotic, but also increase the rate of mutations that will be beneficial for the bacteria and accelerate the adaptation of the bacteria.

**Keywords:** Antibiotic resistance, *Klebsiella aerogenes*, Streptomycin, mutation rate, mutation spectrum, mutation accumulation

## GİRİŞ

İlk kez penisilinin keşfinden birkaç yıl sonra tanımlanan antibiyotik direnci, tüm dünyada önemi giderek artan bir halk sağlığı sorunu hâline gelmiştir<sup>(1,2)</sup>. İnsan hastalıklarının önlenmesinde ve hayvancılıkta antibiyotiklerin yaygın olarak kullanımının bir sonucu olarak, öldürücü olmayan antibiyotik konsantrasyonları çevrede yaygın olarak bulunmaktadır ve bu durum bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç gelişirmesinin yolunu açmıştır<sup>(1,3-5)</sup>. Bakterilerin horizontal gen transferi ya da yeni mutasyonlarla antibiyotiklere direnç kazandığı bilinmesine rağmen<sup>(6-8)</sup>, uzun süreli ve düşük doz antibiyotik maruziyetinin neden olduğu etkiler ve antibiyotik direncinin kazanılmasındaki rolü üzerine bilgilerimiz hâlen sınırlıdır. Literatürde yer alan çalışmalar, antibiyotik kullanımının bakterilerde mutasyon hızını arttırdığını göstermektedir<sup>(7,8)</sup>, ancak mutasyon spektrumuna etkileri ve antibiyotik direnci gelişmesini sağlayacak mutasyonlarla olan ilişkisi henüz kesin olarak ortaya konulamamıştır.

Bugün *Klebsiella aerogenes* olarak sınıflandırılan bakteriler, ilk kez *Aerobacter aerogenes* olarak bilinen türleri *Enterobacter aerogenes* olarak adlandıran Hormanche ve Edwards<sup>(9)</sup> tarafından tanımlanmıştır<sup>(10)</sup>. Gram-negatif ve rod şeklinde olan *K. aerogenes*, suda, havada ve toprakta yaygın olarak bulunan bir türdür. Aynı zamanda, insan ve hayvanların gastrointestinal kanalında da normal mikrobiyotanın bir elemanı olarak yer almaktadır<sup>(11)</sup>. Solunum ve idrar yolu enfeksiyonları, bakteriyemi ve sepsis etkeni olan *K. aerogenes*, 2000'li yılların başından beri çoklu ilaç direncinin (MDR) gözlemlendiği insan patojenlerinin (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter* sp.) arasına dâhil edilmiştir<sup>(11-14)</sup>. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın olarak kullanılmasıyla çoklu ilaç direnci gösteren *K. aerogenes* gibi izolatların ortaya çıkması arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir<sup>(2)</sup>.

Bu çalışmada, geniş spektrumlu bir antibiyotiğin (streptomisin) uzun süreli ve öldürücü olmayan dozda uygulamasının *K. aerogenes*'de mutasyon hızı ve spektrumuna etkisini belirlemek amaçlanmıştır. Streptomisin, çeşitli bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan aminoglikozid sınıfından geniş spektrumlu bir ilaçtır<sup>(15,16)</sup>. Gram pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı etkilidir. *Streptomyces griseus* bakterisinden köken alan streptomisin, bakteri hücrelerinde 16S rRNA alt birimine bağlanarak protein sentezinin engellenmesine neden olmaktadır ve literatürde yer alan çalışmalarda bu etki mekanizmasıyla uyumlu olarak, streptomisin direncinin ribozomal proteinlerle ilişkili genlerde (*rpsD*, *rpsL* gibi) ortaya çıkan belirli mutasyonlarla ilişkisi gösterilmiştir<sup>(15-17)</sup>.

Bugüne kadar, geniş spektrumlu antibiyotiklerin genom kararlılığı üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmaların çoğunda raportör genler kullanılmıştır<sup>(7,8)</sup>. Ancak bu deney sistemlerinin en büyük dezavantajı yalnızca bir ya da birkaç gen bölgesinin değerlendirmeye alınması dolayısıyla genomda gerçekleşen diğer mutasyonların belirlenememesidir<sup>(18)</sup>. Buna ek olarak, raportör sistemlerde elde edilen sonucun, seçilen bölgenin/bölgelerin içeriğinden etkilenmiş olma olasılığı göz önünde bulundurulmalıdır<sup>(18,19)</sup>. Mutasyon biriktirme (Mutation Accumulation, MA) ve yeni nesil tüm genom dizileme (Next-generation Whole Genome Sequencing, WGS) tekniklerinin beraber kullanılması yukarıda söz edilen sınırlamalar olmaksızın mutasyonların belirlenmesine olanak sağlamaktadır<sup>(7,19-22)</sup>. Mutasyon biriktirme deney sisteminde, aynı atasal hücreden oluşturulan soy hatları, yinelenen popülasyon dar boğazlarına (population bottleneck) maruz bırakılarak doğal seçim etkisinin asgari düzeyde tutulması amaçlanır. Bu sayede doğal seçilimin, çok büyük etkilere sahip olabilecek nadir mutasyonlar hariç olmak kaydıyla, tüm mutasyonları özendirmesi ya da yok etmesi önlenir ve her hücre bölünmesinde mutasyonlar birikir<sup>(7,19-22)</sup>. Literatürde farklı filogenetik gruplardan prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizmalarda bu yöntem kullanılarak mutasyon hızı ve spektrumu belirlenmiştir<sup>(7,19-22)</sup>.

Bu çalışmada, uzun süreli ve öldürücü olmayan dozda streptomisin uygulamasının *K. aerogenes*'de genomik mutasyonların hızı ve moleküler spektruma etkisini karakterize etmek için MA/WGS stratejisi kullanılmıştır. Aynı atasal hücreden köken alan 48 soy hattı oluşturulmuştur. Bu soy hatlarından 24 tanesi kontrol grubu olarak antibiyotik içermeyen ortamda yaklaşık 1.000 nesil boyunca üretilmiştir. Deney grubunu oluşturan diğer 24 soy hattı ise, kontrol grubuyla eşzamanlı olarak, öldürücü olmayan dozda streptomisin içeren ortamda yaklaşık 1.000 nesil boyunca üretilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, *K. aerogenes*'de geniş spektrumlu bir antibiyotik olan streptomisinin spontan mutasyonların hızı ve moleküler spektrumu üzerine etkileri hakkında literatüre katkıda bulunacaktır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma *Klebsiella aerogenes* Tindall ve ark. ATCC® 13048™ numaralı suş kullanılarak yapılmıştır. Çalışma boyunca tüm kültür aşamalarında ATCC tarafından önerilen şekilde nutrient broth (NB) (Cat no. 105443; Merck) ve nutrient agar (NA) (Cat no.#105450; Merck) kullanılmıştır ve kültürler 30°C'de aerobik koşullarda inkübe edilmiştir. Streptomisin stok çözeltisi üreticinin talimatlarına göre hazırlanmıştır (Cat no.#S9137; Sigma-Aldrich). Streptomisin, minimum inhibitör konsantrasyonunun ve bu çalışmada uygulanan öldürücü olmayan dozun kontrol edilmesi için Andrews<sup>(7,23)</sup>'den modifiye edilmiş bir protokol kullanılmıştır: *Klebsiella aerogenes* sıvı besiyeri kullanılarak yaklaşık 18 saat çalkalamalı etüvde (O.D. 600 değeri >0.5 olana kadar) üretilmiştir. Kültür daha sonra seri olarak seyreltilmiştir ve yaklaşık 1.000 hücre, farklı konsantrasyonlarda (0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 25 ve 50 µg/mL) streptomisin içeren NA plaklarına ekilmiştir. Uygun koşullarda, 24 saat inkübe edildikten sonra plaklardaki koloni sayısı hesaplanmıştır. Bu deney 3 tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir ve 3 yinelemenin ortalamasından 10 µg/mL streptomisin dozunun öldürücü olmadığı doğrulanmıştır.

Öldürücü olmayan dozda uygulanacak streptomisin

miktarının belirlenmesinden sonra, tek bir *K. aerogenes* kolonisinden (ATCC 13048) 48 bağımsız mutasyon biriktirme (MA) hattı oluşturulmuştur. Oluşturulan toplam 48 soy hattından 24'ü kontrol grubu olmak üzere, tüm süreç boyunca antibiyotiksiz NA plaklarına ekilmiştir. Diğer 24 soy hattı ise, deney grubu olarak tüm süreç boyunca 10 µg/mL streptomisin içeren NA plaklarına ekilmiştir. Her gün, her MA soy hattından rastgele seçilen bir koloni, taze besiyerine aktarılmıştır. Tüm soy hatları yaklaşık 1.000 hücre bölünmesi geçirene kadar mutasyon biriktirme süreci sürdürülmüştür. Soy hatları ortalama 1.000 hücre bölünmesini tamamladığında rastgele seçilen toplam 24 örnek (12 adet kontrol grubu ve 12 adet deney grubu örneği) tüm genom dizileme için hazırlanmıştır. Genomik DNA izolasyonu için, her örnekten 5 ml sıvı kültür hazırlanmıştır. Sıvı kültürlerin 3 ml'si DNA izolasyonu için, 1 ml'si ise gliserol stok (%20) hazırlanmak için kullanılmıştır. DNA izolasyonu, AMBRD Laboratuvarları (Türkiye) tarafından üretilen bakteri DNA İzolasyon kiti kullanılarak, üretici firmanın talimatlarına göre yapılmıştır. Yeni nesil genom dizileme için genomik DNA örnekleri BGI Genomics Ltd. Hong Kong'a gönderilmiştir.

Firmadan "fastq" formatında alınan okumalar, BWA 0.7.10(24) yazılımı kullanılarak referans genoma (NCBI, NC\_01563.1) haritalanmıştır. Duplike okumalar Picard Tools-1.141 ile belirlenerek analizlere dâhil edilmemiştir. "GATK Best Practices" önerileri takip edilerek standart filtreler uygulanmıştır ve "GATK HaplotypeCaller" kullanılarak tek nükleotit mutasyonları ve küçük insersiyon-delesyonlar belirlenmiştir<sup>(25-27)</sup>. Belirlenen tüm mutasyonlar, "Integrated Genomics Viewer" (IGV) uygulaması kullanılarak görsel olarak doğrulanmıştır<sup>(28)</sup> ve herhangi bir mutasyonun belirlenmesi için okumaların %99'unun uzlaşması kriteri uygulanmıştır<sup>(22)</sup>. Doğrulan mutasyonların fonksiyonel etkileri SnpEff (GNU, LGPLv3) yazılımı kullanılarak belirlenmiştir<sup>(29)</sup>. Mutasyon hızı (µ) Küçüküydürüm ve ark.'nda<sup>(22)</sup> izlenen yöntem kullanılarak, her bir soy hattı için belirlenen mutasyon sayısının, çalışmada analiz edilen dizinin (genom) büyüklüğü ve örneğin geçirdiği hücre bölünmesi sayısına bölünmesiyle hesaplanmıştır.

## BULGULAR

**Mutasyon hızı:** Soy hatlarının her biri için mutasyon hızı, gözlenen mutasyon sayısının, çalışmada analiz edilen dizinin büyüklüğü ve örneğin geçirdiği hücre bölünmesi sayısına bölünmesiyle hesaplanmıştır. Toplam 24 soy hattı için analiz edilen ortalama DNA uzunluğu yaklaşık olarak 5.17 Mb'dır (her bir soy hattında genomun ortalama % 97.9'si analiz edilmiştir) ve 13'ü kontrol grubunda, 20'si deney grubunda olmak üzere toplam 33 tek nükleotit mutasyonu tanımlanmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, öldürücü olmayan dozda streptomisin içeren plaklarda üretilen (deney grubu) soy hatlarında belirlenen mutasyon hızı, antibiyotik içermeyen ortamda üretilen (kontrol grubu) soy hatlarında belirlenen mutasyon hızından yaklaşık 1.5 kat yüksek bulunmuştur (Tablo 1 ve Şekil 1). On iki kontrol grubu soy hattında 13 tek nükleotit mutasyonu tanımlanmıştır, buna göre tek nükleotit mutasyonlarının hızı  $ubs = 1.8 \times 10^{-10}$  (%95 Poisson güven aralığı 0.96 ila  $3.08 \times 10^{-10}$ ) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubunda ölçülen mutasyon hızı genom büyüklüğüne oranlandığında, her hücre bölünmesinde genomik mutasyon hızı 0.0009 mutasyon olarak bulunmuştur. On iki deney grubu soy hattında ise 20 tek nükleotit mutasyonu tanımlanmıştır ve bu soy hatlarında tek nükleotit mutasyonlarının hızı  $ubs = 2.64 \times 10^{-10}$  dur (%95 Poisson güven aralığı 1.61 ila  $4.07 \times 10^{-10}$ ) (Tablo 1). Deney grubunda ölçülen mutasyon hızının genom büyüklüğüne oranlanmasıyla, her hücre bölünmesi için mutasyon hızı 0.001 mutasyon/genom olarak bulunmuştur. Ancak, iki grupta gözlenen mutasyon hızları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (t-test,  $p=0.2$ ).

Yirmi dört soy hattında toplam 9 adet küçük insersiyon ve delesyon (indel) olayı (1-30 bp boyutunda) tanımlanmıştır. On iki kontrol grubu soy hattında bir insersiyon ve iki delesyon tanımlanmıştır ve kontrol grubunda indel mutasyonlarının hızı  $4.16 \times 10^{-11}$  olarak hesaplanmıştır. On iki deney grubu soy hattında ise bir insersiyon beş delesyon olmak üzere toplam

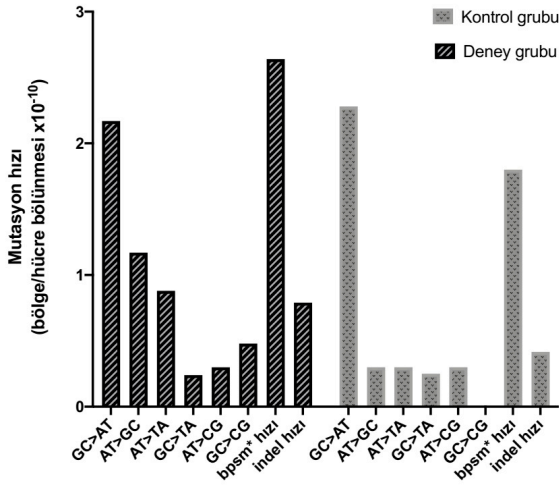
altı indel mutasyonu tanımlanmıştır ve deney grubu soy hatlarında indel mutasyonlarının hızı  $7.92 \times 10^{-11}$  bulunmuştur (Tablo 1). İnsersiyon-delesyon olaylarının hızı açısından iki bağımsız MA grubu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır (t-test,  $p=0.44$ ).

**Mutasyon spektrumu:** Kontrol grubunda 10 transisyon ve üç transversiyon (Transisyon/Transversiyon (Ts/Tv) oranı=  $10/3= 3.33$ ), deney grubunda ise 13 transisyon ve yedi transversiyon (Ts/Tv oranı= $13/7= 1.86$ ) olduğu bulunmuştur. Kontrol ve deney gruplarında belirlenen mutasyon spektrumları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ( $\chi^2=3.47$ ,  $df=5$ ,  $p=0.63$ ). Her iki grupta da  $G / C \rightarrow A / T$  yönündeki toplam transisyon ve transversiyon mutasyonlarının hızının (kontrol grubunda  $2.53 \times 10^{-10}$  ve deney grubunda  $2.41 \times 10^{-10}$ ),  $A / T \rightarrow G / C$  yönündeki toplam transisyon ve transversiyon mutasyonlarının hızından (kontrol grubunda  $0.61 \times 10^{-10}$  ve deney grubunda  $1.46 \times 10^{-10}$ ) yüksek olduğu belirlenmiştir (Tablo 1 ve Şekil 1).

**Tablo 1. Gözlenen mutasyon örüntüleri.**

	Kontrol grubu	Deney grubu
Analize dahil edilen ortalama genom büyüklüğü	5178270	5164065
Tek nükleotit mutasyonları	13	20
İnsersiyon-Delesyon mutasyonları	3	6
Transisyon/Transversiyon oranı	3.33	1.86
Sessiz (eş anlamlı) mutasyonlar	4	5
Eş anlamlı olmayan mutasyonlar	7	7
Kodlayıcı olmayan mutasyonlar	2	8
Tek nükleotit mutasyonlarının hızı ( $\times 10^{-10}$ )	1.8	2.64
İnsersiyon-Delesyon hızı ( $\times 10^{-11}$ )	4.16	7.92

**Mutasyonların fonksiyonel etkileri:** Bu çalışmada, mutasyonların fonksiyonel etkileri referans genom ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Kontrol grubunda belirlenen 13 tek nükleotit mutasyonundan ikisi, deney grubunda ise gözlenen 20 tek nükleotit mutasyonundan sekizi kodlayıcı olmayan intergenik bölgelerde meydana gelmiştir (Tablo 1) ve bu mutasyonlardan bazıları çoklu mutasyonlardır. Gözlenen tek nükleotit mutasyonlarının genomda dağılımının rastgeleliği test edilmiştir (Fisher's exact test,  $p=0.01$ ) ve beklenen ile gözlenen mutasyon dağılımları ara-



Şekil 1. Kontrol grubu ve deney grubunda gözlenen spontan mutasyon hızları ve spektrumları.

\*bpsm: tek nükleotit mutasyonu

sında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir. Kodlayıcı bölgelerde beklenen oranda mutasyon görülmezken (gözlenen: 23, beklenen: 29), kodlayıcı olmayan bölgelerde beklenenden daha yüksek oranda mutasyon gözlenmiştir (gözlenen: 10, beklenen: 4). Kontrol grubunda belirlenen indel olaylarının tamamı, deney grubunda ise belirlenen toplam altı indel olayından dördünün kodlayıcı olmayan intergenik bölgelerde meydana geldiği belirlenmiştir (Tablo 1). Gözlenen indel olaylarının genomda dağılımının rastgeleliği test edilmiştir (Fisher's exact test,  $p=0.015$ ) ve beklenen ile gözlenen indel dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir; kodlayıcı bölgelerde beklenen oranda indel gözlenmemiştir (gözlenen: 2, beklenen: 8), ancak kodlayıcı olmayan bölgelerde beklenenden daha yüksek oranda indel mutasyonu gözlenmiştir (gözlenen: 7, beklenen: 1).

Streptomisin uygulamasının ilaç direnci ile ilişkili özgül genlerde meydana gelen mutasyonlarla ilişkisini belirlemek için saptanan tüm mutasyonların fonksiyonel etkileri referans genom ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Fakat bu çalışmada, daha önce streptomisin direnciyle ilişkisi gösterilmiş olan ribozomal proteinlerle ilişkili genlerde (*rpsD*, *rpsL* gibi) herhangi bir mutasyon belirlenmemiştir<sup>(16-18)</sup>. Ancak, deney grubuna dâhil olan bir soy hattında, MdtH

çoklu ilaç direnci proteinini (multidrug resistance protein) kodlayan *mdtH* geninde bir tek nükleotit mutasyonu belirlenmiştir. Meydana gelen bu mutasyon *MdtH* proteinin 257. kodonunda yer alan lösin amino asidinin arjinin amino asidine dönüşümüne neden olmaktadır.

## TARTIŞMA

Bu çalışma, üç ay boyunca her gün tek hücre darboğazlarına maruz bırakılmış 24 *K. aerogenes* (12 kontrol grubu ve 12 deney grubu) MA soy hattında ortaya çıkan genomik mutasyonları ve streptomisin bu sürecine katkısını değerlendirmiştir. Bu çalışmada kullanılan mutasyon biriktirme ve tüm genom dizileme tekniklerinin kombinasyonu, kontrol ve deney gruplarında genom düzeyinde gerçekleşen tüm mutasyonlar belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, diğer antibiyotiklerin ve antimikrobiyal araçlarının da mutajenik etkilerini belirlemek için bu tekniklerin gücünü ve yüksek çözünürlüğünü ortaya koymaktadır. Bu çalışmada kullanılan deneysel tasarım, daha önce mutasyonların doğasını inceleyen çok sayıda çalışmada başarıyla kullanılmıştır ve antibiyotiklerin ya da diğer çevresel faktörlerin mutasyon süreçlerine etkisinin değerlendirilmesinde kullanılabilirliği ve yinelenebilirliği oldukça yüksektir<sup>(7,19-22,30)</sup>.

Bu çalışmada, öldürücü olmayan dozda streptomisin içeren plaklarda üretilen (deney grubu) soy hatlarında belirlenen mutasyon hızının ( $2.64 \times 10^{-10}$  nükleotit/hücre bölünmesi ya da 0.001 mutasyon/genom/hücre bölünmesi), antibiyotik içermeyen ortamda üretilen (kontrol grubu) soy hatlarında belirlenen mutasyon hızından ( $1.8 \times 10^{-10}$  nükleotit/hücre bölünmesi ya da 0.0009 mutasyon/genom/hücre bölünmesi) yaklaşık 1.5 kat yüksek olduğu bulunmuştur (Tablo 1 ve Şekil 1). Ek olarak, kontrol ve deney gruplarında ölçülen mutasyon hızlarının, prokaryotik organizmaların kullanıldığı önceki çalışmalarda belirlenen ortalama değerden önemli ölçüde düşük olduğu belirlenmiştir (ortalama değer: her hücre bölünmesinde genom başına ortalama 0.003-0.004 mutasyon)<sup>(20,30)</sup>. Delesyon hızı, her iki grupta da insersiyon

hızından yüksek bulunmuştur, bu durum genel olarak prokaryotlarda gözlenen delesyon eğilimiyle tutarlıdır<sup>(31,32)</sup>. Mutasyon spektumları incelendiğinde, kontrol grubu ve deney grubunda belirlenen G / C → A / T yönündeki toplam transisyon ve transversiyon mutasyonlarının hızı, A / T → G / C yönündeki toplam transisyon ve transversiyon mutasyonlarının hızından yüksek bulunmuştur ve bu sonuç evrensel AT eğilimi hipotezi ile uyumludur<sup>(30,33)</sup>.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, yabancı ve mutant *Escherichia coli* suşlarının norfloksasin uygulamasına verdiği yanıtı ortaya koyan çalışmada rapor edilen sonuçlarla uyumludur ve antibiyotik maruziyetinin doğal seçimle direnç oluşumunu teşvik etmediği, ancak spontan mutasyon hızını arttırarak adaptasyon için gerekli olan mutasyonların ortaya çıkma olasılığını arttırdığı sonucunu desteklemektedir<sup>(7)</sup>. Hastane kaynaklı enfeksiyonlarda yaygın şekilde rastlanan bir ajan olan *K. aerogenes*'in, adaptasyon yeteneğinin oldukça yüksek olduğu ve tedavi sırasında beta-laktam antibiyotiklere kolaylıkla direnç kazandığı bilinmektedir<sup>(2)</sup>. Özellikle, hastanede yatan hastalardan izole edilen *K. aerogenes* suşları genellikle geniş spektrumlu antibiyotiklere karşı yüksek dirence sahiptir<sup>(2,34)</sup>. Bu nedenle, elde edilen sonuçlar, *K. aerogenes*'in, adaptasyon yeteneğinin oldukça yüksek olduğunu öneren önceki çalışmalarla benzerdir ve görece kısa olabilecek üç aylık süre zarfında streptomisin uygulamasının MA soy hatlarında neden olduğu mutasyon hızı artışıyla da uyumludur.

Bakterilerde antibiyotik direnci, antibiyotiğin enzimatik degradasyonu, hedef moleküllerine (DNA) bağlanmasının engellenmesi (hedef bölgenin değişime uğraması), hücreye giriş yaptığı porların (porinler) azalması ya da kaybolması ve antibiyotiğin hücre dışına pompalanmasını sağlayacak proteinlerinin ifadesinin artması olarak özetlenebilecek dört temel mekanizma ile sağlanmaktadır<sup>(35)</sup>. Önceki çalışmalarda, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *K. aerogenes* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi bakterilerin membran porinlerinde meydana gelen fonksiyonel değişiklikler ya da porin kaybı yoluyla yapısal

olarak birbirinden farklı olan karbapenem, tetrasiklin, florokinolon, aminoglikozid ve kloramfenikol gibi antibiyotiklere karşı direnç kazandıkları gösterilmiştir<sup>(36,37)</sup>. Özellikle hastane enfeksiyonlarına etken olan *K. aerogenes* ve *K. pneumoniae* türlerinde, *marRAB*, *acrAB-toIC* ve *ramA* genlerinden ifade olan proteinler aracılığıyla antibiyotiklerin hücre dışına akışının sağlanmasının çoklu ilaç direnci fenotipine katkıda bulunduğu belirlenmiştir<sup>(38-41)</sup>. Mutasyonlarla hücre içi ilaç konsantrasyonunun düşük tutulmasını başaran bu bakterilerin tetrasiklin, kloroamfenikol, β-laktam ve kinolonlar gibi yapısal olarak birbirinden farklı moleküllere karşı yüksek direnç seviyesini kazanılabildiği bulunmuştur<sup>(38-43)</sup>. Bu çalışmada ise, ilaç direnci ile ilişkilendirilebilecek bir adet tek nükleotit mutasyonu deney grubundan bir soy hattında tanımlanmıştır ve bu nedenle, belirlenen tek nükleotit mutasyonlarından yalnızca %5'nin (1/20) ilaç direncinin seçilmesiyle ilişkili olduğu sonucuna varılabilir. Gözlenen bu mutasyonun streptomisin direnciyle bağlantısının kesin olarak ortaya konulabilmesi ancak biyokimyasal ve genetik deney sonuçlarıyla desteklenmesiyle mümkündür ve bu çalışmadan edinilen sonuçlar bu tür ileri araştırmalar için mantıklı bir başlangıç noktası sağlayacaktır.

Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan MA/WGS stratejisi, genomik bağlamda, antibiyotiklerin ve diğer kimyasalların mutasyon sürecine katkısını, raportör yapılarla mümkün olmayan hassasiyette değerlendirmek için güçlü bir yaklaşım sağlamaktadır. Antibiyotiklerin ve antimikrobiyal ajanların etki şekillerinin çeşitlilik göstermesi ve aynı zamanda farklı bakteri türlerinin farklı DNA onarım mekanizmalarında sahip olmaları nedeniyle, ancak benzer çalışmalarla literatürün bu konuda zenginleşmesi, bu ve benzeri çalışmalardan elde edilen sonuçların geliştirilmesini mümkün hale getirecektir. Son olarak, antibiyotiklerin dolaylı şekilde, bakterilerde mutajen gibi davranmasının, antibiyotik tedavisi gören hastaların hücrelerinde DNA kararlılığı için ne tip sonuçlara yol açacağı gelecek çalışmalar için önemli bir soru olarak ortaya çıkmaktadır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (FBI-2015-7197 ve FBB-2017-15738). Bu araştırmaya sağladıkları teknik katkılardan dolayı Hacettepe Üniversitesi öğrencileri Özgür Özdemirel, Alp Mete Ümmet, Dilara Ulusal, Merve Demirel ve Elif Melike Sasa'ya teşekkür ederim.

## KAYNAKLAR

- Lobanovska M, Pilla G. Penicillin's discovery and antibiotic resistance: lessons for the future? *Yale J Biol Med.* 2017; 90(1):135-45.
- Thiolas A, Bollet C, La Scola B, Raoult D, Pagès JM. Successive emergence of *Enterobacter aerogenes* strains resistant to imipenem and colistin in a patient. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(4):1354-8. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.4.1354-1358.2005>
- Frana TS, Beahm AR, Hanson BM, et al. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pork farms and visiting veterinary students. *PLoS One.* 2013;8(1):e53738. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053738>
- Zurek L, Ghosh A. Insects represent a link between food animal farms and the urban environment for antibiotic resistance traits. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(12):3562-7. <https://doi.org/10.1128/AEM.00600-14>
- Lazarus B, Paterson DL, Mollinger JL, Rogers BA. Do human extraintestinal *Escherichia coli* infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-producing animals? A systematic review. *Clin Infect Dis.* 2015;60(3):439-52. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu785>
- Woodford N, Ellington MJ. The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(1):5-18. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01492.x>
- Long H, Miller SF, Strauss C, et al. Antibiotics treatment enhances the genome-wide mutation of target cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113(18):2498-505. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601208113>
- Jørgensen KM, Wassermann T, Jensen PØ, et al. Sublethal ciprofloxacin treatment leads to rapid development of high-level ciprofloxacin resistance during long-term experimental evolution of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(9):4215-21. <https://doi.org/10.1128/AAC.00493-13>
- Hormaeche E, Edwards PR. A proposed genus *Enterobacter*. *Int Bull Bacteriol Nomen Taxon.* 1960;10:71-74. <https://doi.org/10.1099/0096266X-10-2-71>
- Tindall BJ, Sutton G, Garrity GM. *Enterobacter aerogenes* Hormaeche and Edwards 1960 (Approved Lists 1980) and *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the Approved Lists and are homotypic synonyms, with consequences for their name *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017;67(2):502-4. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001572>
- Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(4):589-603. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.4.589>
- Arpin C, Coze C, Rogues AM, Gachie JP, Bebear C, Quentin C. Epidemiological study of an outbreak due to multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* in a medical intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 1996;34(9):2163-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.34.9.2163-2169.1996>
- Canton R, Oliver A, Coque TM, Varela Mdel C, Perez-Diaz JC, Baquero F. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter isolates* in a Spanish hospital during a 12-year period. *J Clin Microbiol.* 2002;40(4):1237-43. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1237-1243.2002>
- Bosi C, Davin-Regli A, Bornet C, Malléa M, Pagès JM, Bollet C. Most *Enterobacter aerogenes* strains in France belong to a prevalent clone. *J Clin Microbiol.* 1999;37(7):2165-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.7.2165-2169.1999>
- Luzzatto L, Apirion D, Schlessinger D. Mechanism of action of streptomycin in *E. coli*: interruption of the ribosome cycle at the initiation of protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1968;60(3):873-80. <https://doi.org/10.1073/pnas.60.3.873>
- Humayun M Z, Ayyappan V. Potential roles for DNA replication and repair functions in cell killing by streptomycin. *Mutat Res.* 2013;749(1-2):87-91. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2013.07.009>
- Springer B, Kidan YG, Prammananan T, Ellrott K, Böttger EC, Sander P. Mechanisms of streptomycin resistance: selection of mutations in the 16S rRNA gene conferring resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(10):2877-84. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.10.2877-2884.2001>
- Stewart FM. Fluctuation tests: How reliable are the estimates of mutation rates? *Genetics.* 1994;137(4): 1139-46.
- Lee H, Popodi E, Tang H, Foster PL. Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium *Escherichia coli* as determined by whole-genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109(41):E2774-83. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210309109>
- Sung W, Ackerman MS, Miller SF, Doak TG, Lynch M. Drift-barrier hypothesis and mutation-rate evolution.

- Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109(45):18488-92.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1216223109>
21. Morgan AD, Ness RW, Keightley PD, Colegrave N. Spontaneous mutation accumulation in multiple strains of the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Evolution*. 2014;68(9):2589-602.  
<https://doi.org/10.1111/evo.12448>
  22. Kucukyildirim S, Long H, Sung W, Miller S F, Doak T G, Lynch M. The rate and spectrum of spontaneous mutations in *Mycobacterium smegmatis*, a bacterium naturally devoid of the postreplicative mismatch repair pathway. *G3 (Bethesda)*. 2016;6(7):2157-2163.  
<https://doi.org/10.1534/g3.116.030130>
  23. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *JAntimicrob Chemother*. 2001;48(Suppl 1):S5-16.  
[https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl\\_1.5](https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5)
  24. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754-60.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
  25. McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010;20(9):1297-303.  
<https://doi.org/10.1101/gr.107524.110>
  26. DePristo MA, Banks E, Poplin R, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet*. 2011;43(5):491-8.  
<https://doi.org/10.1038/ng.806>
  27. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, et al. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2013;43(1110):11.10.1-11.10.33.  
<https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1110s43>
  28. Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrated genomics viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform*. 2013;14(2):178-92.  
<https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>
  29. Cingolani, P, Platts A, Wang L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. 2012;6(2):80-92.  
<https://doi.org/10.4161/fly.19695>
  30. Long, H, Sung W, Kucukyildirim S, et al. Evolutionary determinants of genome-wide nucleotide composition. *Nat Ecol Evol*. 2018;2(2):237-40.  
<https://doi.org/10.1038/s41559-017-0425-y>
  31. Mira A, Ochman H, Moran NA. Deletional bias and evolution of bacterial genomes. *Trends Genet*. 2001;17(10):589-96.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02447-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02447-7)
  32. Sung W, Ackerman MS, Dillon MM, et al. Evolution of the insertion-deletion mutation rate across the tree of life. *G3 (Bethesda)*. 2016;6(8):2583-591.  
<https://doi.org/10.1534/g3.116.030890>
  33. Hershberg R, Petrov DA. Evidence that mutations is universally biased toward AT in bacteria. *PLoS Genet*. 2010;6(9):e1001115.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001115>
  34. Arpin C, Dubois V, Coulange L, et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in community and private health care centers. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(11):3506-14.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.47.11.3506-3514.2003>
  35. Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*. 2007;128(6):1037-50.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>
  36. Achouak W, Heulin T, Pages JM. Multiple facets of bacterial porins. *FEMS Microbiol Lett*. 2001;199(1):1-7.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10642.x>
  37. Page MG. The role of the outer membrane of Gram-negative bacteria in antibiotic resistance: Ajax' shield or Achilles' heel? *Handb Exp Pharmacol*. 2012;(211):67-86.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-642-28951-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-28951-4_5)
  38. Gayet S, Chollet R, Molle G, Pagès JM, Chevalier J. Modification of outer membrane protein profile and evidence suggesting an active drug pump in *Enterobacter aerogenes* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(5):1555-9.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.47.5.1555-1559.2003>
  39. Chollet R, Bollet C, Chevalier J, Malléa M, Pagès JM, Davin-Regli A. mar operon involved in multidrug resistance of *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(4):1093-7.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.46.4.1093-1097.2002>
  40. Pradel E, Pagès JM. The AcrAB-ToIC efflux pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(8):2640-3.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2640-2643.2002>
  41. Schneiders T, Amyes SGB, Levy SB. Role of AcrR and RamA in fluoroquinolone resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Singapore. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(9):2831-7.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2831-2837.2003>
  42. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs*. 2009; 69(12):1555-623.  
<https://doi.org/10.2165/11317030-000000000-00000>
  43. Chevalier J, Bredin J, Mahamoud A, Mallea M, Barbe J, Pages JM. Inhibitors of antibiotic efflux in resistant *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(3):1043-6.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.48.3.1043-1046.2004>