1. **Plazmidler**

Amerikalı moleküler biyolog Joshua Lederberg ilk olarak 1952 yılında plazmid terimini kullanmıştır. Plazmidler; kromozomal DNA’dan bağımsız olarak kendi kendine replike olabilen, ekstra-kromozomal DNA molekülleridir. Tipik olarak halkasal ve çift zincirlidirler ve bakterilerde doğal olarak bulunurlar. Doğal olarak organizmada bulunsalar da, genellikle hücre içi zorunlu elemanlar değillerdir. Bazen ökaryotik organizmalarda da bulunabilirler (Ör: *Saccharomyces cerevisiae*’de 2 µm’lik bir halka yer almaktadır). Plazmidlerin büyüklüğü 1-400kbp arasında değişim gösterir. Hücrede tek bir kopyaları bulunabildiği gibi tek bir hücrede aynı plazmidin yüzlerce kopyası da bulunabilir.

Fonksiyonları gibi çeşitli özellikleri göz önünde bulundurularak plazmidler gruplandırılmaktadır. Bu şekilde 5 gruba ayrılırlar:

1. Fertilite (F) plazmidleri
2. Direnç (R) plazmidleri
3. Col-Plazmidler: diğer bakterileri öldürmek için proteinleri kodlayan genleri kodlar
4. Degredatif plazmidler: farklı maddeleri parçalama yeteneğinde olan plazmidlerdir
5. Virülens plazmidler: Bakterileri patojen hale getiren plazmidlerdir

Bir plazmid birden fazla fonksiyonel gruba dahil olabilir. Plazmidler ayrıca düşük kopya sayılı (1-25) ve yüksek kopya sayılı (hücre başına 100’den fazla molekül) şeklinde de tanımlanmaktadır.plazmidler uyum gruplarına ayrılabilirler. Farklı gruplara dahil plazmidler aynı hücrede uyumlu şekilde bir arada bulunabilirken, yakın ilişkili plazmidler genellikle uyumsuzluk içerirler ve yalnızca biri hücre hattı içinde kalır. Buna *E. coli* iyi bir örnek teşkil eder ve 7 farklı plazmidi yapısında bulundurur. Plazmidler; genetik materyalin konjugasyon ile aktarımını sağladıkları için yatay gen transferinin aktif üyeleridir.

**3.1 Konjugatif plazmidler**

Eğer seks; materyal değişiminin meydana geldiği hücre-hücre teması olarak tanımlanırsa, konjugasyon bakteriyal sekstir. Ökaryotlar tarafından gerçekleştirilen gerçek seksin aksine, gametlerin birleşmesi sonucu zigot oluşmaz ve de eşit düzeyde genetik materyal değişimi gerçekleşmez. Bakteriyal sekste, donor (konjugatif plazmidi içeren bakteri) pilusunu kullanarak teması başlatır ve alıcı bakteri temas devam ederken plazmidi yapısına alır. Bu süreç, plazmidin genellikle *tra* bölgesinde bulunan bir dizi gen tarafından kontrol edilir. Bazen plazmidler konak genomuna entegre olurlar ve bu plazmid konjugasyona uğradığında konak genomunun tamamı ya da bir kısmı alıcı hücreye transfer edilebilir.

Konjugatif plazmidlerin aktarımı sonrasında zaman zaman farklı durumlar ortaya çıkabilir. Örneğin *Agrobacterium* ve *Rhizobacterium* bakterilerinin taşıdıkları plazmidler bitki hücrelerine aktarılabilir. Bu aktarımın gerçekleşmesi sonrasında bakteriyal plazmidler bitkilerde ur ve nodüllerin çıkmasına neden olur.

**3.2. Konjugatif olmayan plazmidler**

Konjugatif olmayan (non-konjugatif) plazmidler konjugasyonu başlatamazlar, konjugatif plazmidlerle birlikte olduklarında transfer edilebilirler. Bu bağımlılığa rağmen, araştırmacılar halen bu plazmidlerin mobilizasyon potansiyelini araştırmaktadır. Örneğin, konjugatif olmayan plazmidler keçi sütünün olgunlaşması işlemlerinin yanı sıra antibiyotik direncine sahip *Staphylococcus* suşlarından izole edilmeleri çok farklı alanlarda karşımıza çıkmaktadır.

**3.3. Plazmidlerdeki IS elemanları**

Siguer ve arkadaşları (2006) IS elemanlarının plazmidlerde bulunma sıklığı konusunda bir araştırma yönetmiş ve sonuçta IS dizilerinin 20kb’den küçük plazmidlerde bulunma sıklığının yaklaşık “SIFIR” olduğunu belirlemişlerdir. IS dizisinin büyüklüğü 20 kb’den fazla olduğunda ortalama bulunma sıklıkları %5-15 iken, beklenmedik bir artışla %20-40’lara ulaşmaktadır. Siguer ve arkadaşları (2006) şöyle bir hipotez ortaya koymuşlardır: kendi transferini farklı türler ve hatta cinsler arasında gerçekleştirebilen plazmidler genellikle büyük plazmidlerdir çünkü farklı konak hücrelere geçiş sırasında yapılarına transfer fonksiyonlarının yanı sıra transpozonlar, IS’ler ve aksesuar genleri almaktadırlar. Siguer ve arkadaşları (2006) ayrıca çeşitli TE’lerin hedeflerinin genellikle transfer olabilen plazmidler olduğundan bahsetmiştir.

**KONJUGATİF PLAZMİDLERİN KALICILIĞINDA ROL OYNAYAN FAKTÖRLER**

**Plazmidlerin Seçici Avantajları**

Plazmidler; bakterilerde sıkça rastlanan ve Yatay Gen Transferi mekanizmaları ile aynı habitatta bulunan bakteriler arasında gen değişimini sağlayan araçlardır. Bu durumda bakteriler, değişen çevresel koşullara daha kolay adapte olurlar. Bunun en çarpıcı örneklerinden biri, patojenik bakteriler arasında çoklu antibiyotik direncine sahip plazmidlerin ortaya çıkışıdır.

**Plazmidlerin Aksesuar Elemanları**

Bakteriyal plazmidler tipik olarak: plazmid replikasyonu, stabilitesi ve transferi ile ilgili fonksiyonları kodlayan ve “plazmid omurgası” olarak adlandırılan farklı bölgelerden meydana gelmiştir. Bunun dışında “household” fonksiyonundaki plazmidler sıklıkla konak bakteri için yararlı ve seçici avantaj sağlayn bir ya da daha fazla sayıda “aksesuar elemanlar” ihtiva ederler. Bu aksesuar elemanların çoğu mikrobiyal komunitelere dağılım potansiyelini arttırmak için transposeable elementler içerisinde yer alırlar.

Buna en çarpıcı örneklerden biri, karma (birleşik) transpozon olan Tn*21*’dir. Tn*21* ve yakın akrabaları, Tn*21* ailesi olarak bilinirler ve çevreden ve klinik örneklerden farklı büyüklüklere sahip konjugatif plazmidler izole edilmiştir. Tn*21* ailesi “yüzen genomun amiral gemisi” olarak bilinmektedir. Bu transpozonlar transposeable elementlerin Tn3 ailesine dahildir ve inverted terminal tekrarların yanı sıra transpozaz kodlayan *tnp*A ve resolvaz kodlayan *tnp*R içermeleri ile karakterize edilirler. Tn*21* ayrıca, cıvaya karşı direnç sağlayan *mer* bölgesi ve gen kasetlerinin yakalanması ve ifadesini sağlayan sınıf 1 integronları yapılarında bulundururlar.

İntegronlar, DNA integraz olarak bilinen site spesifik rekombinazlar ve gen kasetlerinin spesifik olarak entegrasyonundan sorumlu rekombinasyon bölgesi olan *att*I’i kodlar. Sınıf 1 integronlar kendi başlarına hareketli değillerdir, ancak tipik olarak Tn402-benzeri transpozonlar ile ilişkilidirler. Sınıf 1 integronlara, konjugatif plazmidlerin çoğunda rastlanmaktadır.

Sınıf 1 integronlar ile ilişkili başlıca gen kasetleri: β- laktamlar (*bla* ve *oxa*), aminoglikozidazlar (*aad* ve *aac*), trimethoprim (*dfr*), kloramfenikol (*cat* ve *cml*), quarternar amonyum bileşenleri (*qac*), rifampisin (*arr*), sulfonamidler (*sul*), macrolidler (*ere*), lincosamidler (*lin*), streptorisin (*sat*)ve qinolonlara (*qnr*) direnç genleri taşır. Ancak, son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda, sınıf 1 integronların antibiyotik direnç genlerinden başka genler de taşıdığı belirlenmiştir.

Plazmidler üzerinde bulunan diğer aksesuar gen grupları katabolik yolaklar ve virülens faktörleri kodlayan genlerdir. Yakın zamanda yayınlanan bir derleme makaleye göre, bilinen 71 katabolik plazmid, taşıdıkları katabolik genler ve parçaladıkları maddeler açısından incelenmiş ve ortaya etkileyici bir tablo çıkmıştır. Parçalanan bu maddeler arasında pestisit olan 2,4-diklorofenoksi asetik asit, benzen, fenol ve tolüen gibi aromatik hidrokarbonlar ve fitalatlar yer almaktadır. Bugüne dek tanımlanan katabolik plazmidlerin çoğu bakteri suşlarında endojenken, çok azı; örneğin herbisit 2,4-D’yi parçalayabilen pEMT3 plazmidi ekzojendir ve verici bir suştan konjugasyon sonucunda kazanılmıştır.

Patojen bakterilerdeki virülens genlerin çoğu “patojenite adaları”nda kromozomlar üzerinde yer alırken, çoğu kez plazmidler ile de ilişkili oldukları belirlenmiştir. Virülens plazmidlere en çarpıcı örneklerden biri, Gram pozitif *Bacillus antracis*’in pxo1 ve pxo2 plazmidleridir ve sırasıyla anthrax toksinini ve kapsül proteinini kodlar. Bu plazmidlerin görece daha az zararlı olan toprak bakterisinden, insanlar için tehlikeli bir patojenine geçtiği (transforme olduğu) anlaşılmaktadır. Oldukça iyi karakterize edilmiş Gram negatif bakteri plazmidleri, *Salmonella* *enterica* subspecies *enterica*’ da çalışılmıştır. Bu plazmidler, insanların ve çiftlik hayvanlarının enfeksiyonu ile ilişkili Enteritidis, Typhimurium ve Dublin serotiplerinin çoğunda bulunmaktadır ve *spvRABCD* (*Salmonella* plazmid virülens) genlerini kodlamaktadır. Bu plazmidlerin virülensliğe diğer katkıları, enfeksiyon sırasında hücre adezyonunu arttıran fimbriya yapısını kodlayan genler ve öldürmeye dayalı sistemlere karşı direnç sağlamaktır.

Enterotoksijenik *Escherichia coli* (ETEC) önemli bir diğer patojendir ve dünya genelinde insanlarda görülen gıda ve su kaynaklı *E. coli* diyarelerinin bir numaralı etmenidir. Konak organizmanın ince bağırsağına ATAC hücrelerinin kolonizasyonu, genellikle plazmid kodlu kolonizasyon faktörleri ile sağlanır. Serolojik testler sonucunda ETEC’in 20’den fazla türü olduğu tanımlanmıştır. Bu kolonizasyon faktörlerinden biri olan CS1, fimbriya morfolojisini sağlar ve PCoo plazmidi tarafından kodlanmaktadır. İlginç olan, PCoo plazmidinin iki fonksiyonel replikasyon orjinine sahip olmasıdır. Bu orjinler R64 benzeri (IncI1) ve R100 benzeri (IncFII)’die ve bu plazmide hızlı evrimleşme gibi bir avantaj sağlamaktadırlar. ETEC enfeksiyonunu takiben bağırsaktan sıvı sızması meydana gelir ve buna sebep olan enterotoksinler çoğunlukla plazmid kodludur. Farklı genler, hareketli büyük patojenite adalarının oluşmasından sorumludur.

Plazmid kodlu virülensliğe verilebilecek bir örnek de *Yersinia* spp.’nin ihtiva ettipi 70 kb’lık pYV plazmididir. Bu plazmid *Yersinia* hücrelerinin konaklarının lenf dokusunda hayatta kalması ve çoğalmasını sağlayan Yop virülonunu kodlar. Ökaryotik hücreler ile temas, özel sekresyon kanallarından “Yops” proteininin salgılanmasını ve sitoiskelet dinamiklerinin bozulmaının yanında sitokinlerin sentezinin inhibe edilmesine neden olur.

**Plazmidlerin Konak Hücre Çeşitliliği**

Spesifik bir plazmidin farklı konaklara geçip, burada kalabilmesi, bakteri komunitelerine yayılması ve devamlılığını etkileyen en önemli faktördür ve “konak çeşitliliği” olarak adlandırılır. Enterobacteriaceae’nın IncF ve IncI plazmidleri gibi bazı plazmidlerin oldukça dar konak çeşitliliği vardır ve bu nedenle yalnızca birkaç bakteri cinsi ile sınırlı kalırlar. Buna karşın diğer plazmid grupları oldukça geniş konak çeşitliliğine sahip olabilirler (BHR). Bu BHR plazmidleri konjugatif olabilir ve farklı bakteri türlerine kendi transferlerini sağlayabilirler. Ya da hareketli olabilirler, hareketlerini konjugatif plazmidler ya da transpozonlar aracılığı ile sağlarlar. Bazı doğal plazmidler oldukça çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif bakteri türlerinde kararlı olarak bulunurlar ve bu tür plazmidlerin BHR oldukları aşıkardır. Bu plazmid grubuna örneklerden biri, *Listeria monocytogenes* BM4293 suşundan izole edilen pIP823 plazmididir. Bu plazmid trimetoprime yüksek düzeyde direnç sağlayan *dfr*D genini içerir ve *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* ve *E. coli* suşlarında replike olmaktadır. pIP823 plazmidi konjugasyon yolu ile kendini transfer edemez ancak, hem Gram pozitif ve hem de Gram negatif bakterilerde konjugatif plazmidler ve konjugatif transpozonlar aracılığı ile hareket edebilir.

Bakteriyal plazmidlerin konak çeşitliliğinin araştırılmasında kullanılan geleneksel yöntem, sıvı ya da katı ortamda alıcı ve verici hücrelerin bir filtre üzerinde eşleştirilmesinin ardından, filtrenin katı bir ortama alınması esasına dayanmaktadır. Bu araştıma için sağlanması gereken bazı koşullar vardır: (i) hem alıcı, hem de verici suşun kültüre edilebilir olması gerekmektedir, (ii) plazmid üzerinde antibiyotik direnç belirtici gibi seçici bir ajanın bulunması zorunludur, (iii) verici hücrenin de bulunduğu ortamda plazmidi alan yeni hücrelerin ayırd edilebilmesi gerekmektedir. Son yıllarda, HGT kinetiklerinin ve konjugatif plazmidlerin konak çeşitliliğinin araştırılmasında yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri, ilgilenilen plazmidin baskılanabilir promotorunun downstream bölgesine floresan gen kaseti ilave etmektir.

Transfer kinetiklerinin ve konak direncinin araştırılmasında yoğun olarak yeşil floresan protein kullanılmaktadır. Bakteri örneklerinin geliştirilmesne ihtiyaç duyulmayan yeni flow kromotografi temelli yöntemler ile transkonjugant örneklerin sayısı ve türünü tanımlamak mümkün olmakta ve daha sonraki aşamada 16S rDNA analizi ile filogenetik sınıflandırma yapılabilmektedir.

Bakteri popülasyonlarında plazmid kayıplarının araştırılmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu amaçla en yaygın kullanılan yöntem, hücreleri bir seçici ajan içeren ortamda ve bir de seçici ajan içermeyen ortamda geliştirerek plazmid içermeyen suşların elimine edilmesi prensibine dayanmaktadır. Ancak bu yöntem, çalışılan plazmidlerin antibiyotik direnci gibi seçici bir özelliği yapılarında bulundurmaları gerekmektedir. Ayrıca yine bu yöntemde, plazmid içeren tüm suşların koloni oluşturduğu varsayılmaktadır. Bu ikinci durum bazı problemlere yol açabilir çünkü gen susması ya da aktiviteye bağlı fenotipik duraklama sonucunda seçici ajanın bulunduğu ortamda CFU’da azalma olabilir, bu da plazmid kaybının asıl sayıdan daha fazla algılanmasına neden olur. Seçici ajan içermeyen katı besiyerinde geliştirilen suşların ardından seçici ortama alınması halinde lag probleminin ortaya çıkması önlenip istatistiki olarak daha kabul göreceğinden, tercih edilen bir yöntemdir.

lacZ genini kodlayan β-galaktozidaz geni ile floresan markerların istenilen plazmid içerisinde birleştirilmesi sureti ile plazmid taşıyan ve taşımayan suşların ayrımı çok daha kesin şekilde yapılmaktadır. Son on yıl içerisinde, yeşil floresan proteinini kodlayan *gfp* geni, bakteri popülasyonlarında plazmid kinetiklerinin çalışılması için oldukça kullanışlı bir ajan haline gelmiştir. Plazmid stabilitesi çalışmalarında kullanıldığında, plazmid içermeyen suşların plazmid içeren ve GFP ifade eden suşlara kıyasla daha düşük oranda ifade edildiği, konstraktların yapılmasının oldukça kullanışlı olduğu belirlenmiştir.